

**LÍPIDOS CATIÓNICOS IONIZABLES Y NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS, Y MÉTODOS DE SÍNTESIS Y
USO DE LOS MISMOS**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de y el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 63/350.404, presentada el 8 de junio, 2022, cuya divulgación se incorpora por el presente en la presente memoria por referencia en su totalidad.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS ELECTRÓNICO

Los contenidos del listado de secuencias electrónico (183952034240seqlist.xml; Tamaño: 168.364 bits; y Fecha de Creación: 1 de junio 1, 2023) se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención proporciona lípidos catiónicos ionizables y nanopartículas lipídicas para la administración de ácidos nucleicos a células inmunes, y métodos de fabricación y uso de dichos lípidos y nanopartículas lipídicas dirigidas.

ANTECEDENTES

En los últimos años, se han desarrollado varias modalidades terapéuticas que implican la administración de uno o más ácidos nucleicos a un sujeto. Las modalidades de tratamiento incluyen, por ejemplo, terapias génicas en las que un gen de interés en forma de ácido nucleico de desoxirribosa (ADN) se introduce en una célula, que se expresa a continuación para producir un producto génico, por ejemplo, una proteína, para tratar un trastorno causado por o asociado con una deficiencia o ausencia del producto génico. En este enfoque, el gen se transcribe en un ácido ribonucleico mensajero (ARNm), tras lo cual el ARNm se traduce para producir el producto génico. En otro enfoque, puede administrarse a la célula ARNm en lugar de un gen de interés. El producto de expresión resultante puede mejorar la deficiencia o ausencia de una proteína particular en un sujeto (por ejemplo, una deficiencia proteica que se produce en ciertas formas de fibrosis quística o trastornos de almacenamiento lisosomal), o puede usarse para modular una función celular, por ejemplo, reprogramando células inmunes para iniciar o modular de otro modo una respuesta inmune en el sujeto (por ejemplo, como agente terapéutico para tratar el cáncer o como vacuna profiláctica para prevenir o minimizar el riesgo o la gravedad de una infección microbiana o viral).

Sin embargo, la administración de ARNm a una célula para su traducción dentro de la célula ha supuesto un reto por diversos factores, tales como la degradación por nucleasas del ARNm antes de su entrada en la célula y después de su introducción en la célula, pero antes de su traducción.

El ARN puede administrarse a un sujeto usando diferentes vehículos de administración, por ejemplo, a base de polímeros catiónicos o lípidos que, junto con el ARN, forman nanopartículas. Las nanopartículas están destinadas a proteger el ARN de la degradación, permitir la administración del ARN en el sitio diana y facilitar la captación celular y el procesamiento por las células diana. Además de la composición molecular, también influyen en la eficacia de la administración parámetros como el tamaño de las partículas, la carga o el injerto con restos moleculares, tales como polietilenglicol (PEG) o ligandos.

Se cree que el injerto con PEG reduce las interacciones con el suero, aumenta su estabilidad en suero y aumenta el tiempo en circulación, lo que puede ser útil para determinados enfoques de direccionamiento.

En comparación con las tecnologías de administración de ADN usadas en determinadas terapias génicas, el tratamiento génico basado en ARNm presenta una serie de características superiores, por ejemplo, facilidad de manipulación, expresión rápida y transitoria, y convertibilidad adaptativa sin mutagénesis.

Sin embargo, la administración de ARN terapéuticos a las células es difícil debido a la relativa inestabilidad y baja permeabilidad celular de los ARN. Por tanto, existe una necesidad de desarrollar métodos y composiciones para facilitar la administración de los ARN, tales como ARNm a las células.

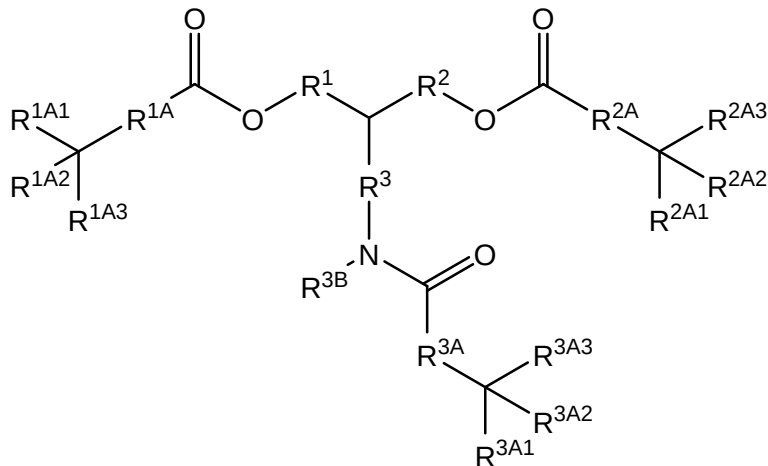
RESUMEN

La invención proporciona lípidos catiónicos ionizables, conjugados de lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes y composiciones de nanopartículas lipídicas que comprenden dichos lípidos catiónicos ionizables y/o conjugados lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes (p. ej., células T), kits médicos que contienen dichos lípidos y/o conjugados, y métodos de fabricación y uso de dichos lípidos y conjugados.

Las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria pueden comprender además un ácido nucleico, tal como un ARN, p. ej., un ARN mensajero o ARNm. Las composiciones de nanopartículas lipídicas pueden usarse para la administración de ARNm a una célula (p. ej., una célula inmune, tal como una célula T) de un sujeto. La terapia génica basada en ARN mensajero requiere la administración eficiente de ARNm a células circulantes (p. ej., células inmunes, tales como células T o células NK) en plasma o a células en un tejido determinado. Los principales retos asociados a la administración eficiente de ARNm para alcanzar niveles robustos de expresión proteica incluyen: (a) la capacidad de proteger la carga útil de ARNm contra las nucleasas séricas prevalentes tras la administración a un sujeto; (b) la capacidad de dirigir específicamente la administración de ARNm a, y por tanto maximizar la expresión de proteínas en la población de células diana (p. ej., células T); y (c) la capacidad de administrar al máximo la carga útil de ARNm al compartimento citosólico de las células (p. ej., células T) para su traducción a proteínas en el citoplasma.

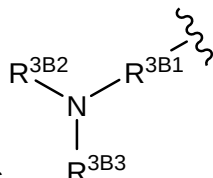
La invención proporciona lípidos catiónicos ionizables para producir composiciones de nanopartículas lipídicas que facilitan la administración de una carga útil (p. ej., un ácido nucleico, tal como un ADN o un ARN, tal como un ARNm) dispuesta en ellas a células, por ejemplo, células de mamíferos, por ejemplo, células inmunes. Los lípidos están diseñados para permitir la administración intracelular de un ácido nucleico, p. ej., ARNm, al compartimento citosólico de un tipo de célula diana y degradarse rápidamente en componentes no tóxicos. Estas funcionalidades complejas se consiguen mediante la interacción entre la química y la geometría del grupo de cabeza del lípido ionizable, los grupos hidrófobos "de cola acilo" y el enlazador que conecta el grupo de cabeza y los grupos de cola acilo en los lípidos catiónicos ionizables.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula (I):



(I), o una sal del mismo. En

algunas realizaciones, R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-3} . En algunas realizaciones, R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-10} . En algunas realizaciones, R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-20} , alquenilo C_{1-20} , $-(CH_2)_{0-10}C(O)OR^{a1}$, o $-(CH_2)_{0-10}OC(O)R^{a2}$. En algunas realizaciones, R^{a1} y R^{a2} son cada uno independientemente alquilo C_{1-20} o alquenilo C_{1-20} . En



algunas realizaciones, R^{3B} es R^{3B3} . En algunas realizaciones, R^{3B1} es alquileo C_{1-6} . En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} . En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-6} no sustituido, o alquilo C_{1-6} sustituido con uno o más sustituyentes seleccionado cada uno independientemente del grupo que consiste en -OH y -O-(alquilo C_{1-6}).

También se proporciona en la presente memoria una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende una mezcla lipídica que comprende un lípido catiónico ionizable y/o un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes (p. ej., un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células T) proporcionado en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un método para administrar un ácido nucleico a una célula inmune (p. ej., una célula T), comprendiendo el método exponer la célula inmune a una LNP descrita en la presente memoria que contiene el ácido nucleico en condiciones que permiten que el ácido nucleico entre en la célula inmune.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un método para administrar un ácido nucleico a una célula inmune (p. ej., una célula T) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición que comprende una LNP descrita en la presente memoria que contiene un ácido nucleico para administrar de esta manera el ácido nucleico a la célula inmune.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un método para dirigir la administración de un ácido nucleico (p. ej., ARNm) a una célula inmune (p. ej., una célula T) en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una LNP descrita en la presente memoria que contiene el ácido nucleico para facilitar la administración dirigida del ácido nucleico a la célula inmune.

En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria nanopartículas lipídicas (LNP) que comprenden una mezcla lipídica para la administración dirigida de un ácido nucleico en una célula inmune. En algunas realizaciones, la mezcla lipídica comprende un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes que comprende el compuesto de Fórmula (II): [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la mezcla lipídica comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable comprende un lípido catiónico ionizable como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la LNP comprende un ácido nucleico dispuesto en la misma.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células T. En algunas realizaciones, el antígeno de células T es CD3, CD4, CD7 o CD8, o una combinación de los mismos (p. ej., tanto CD3 como CD8, tanto CD4 como CD8, o tanto CD7 como CD8). En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células Asesinas Naturales (NK). En algunas realizaciones, el antígeno de células NK es CD7, CD8 o CD56, o una combinación de los mismos (p. ej., tanto CD7 como CD8). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se acopla covalentemente a un lípido de la mezcla lipídica mediante un enlazador que contiene polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el lípido acoplado covalentemente al grupo de direccionamiento a células inmunes mediante un enlazador que contiene PEG es diestearoilglicerol (DSG), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-glicero-fosfoglicerol (DSPG), dimiristoil-glicerol (DMG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-glicerol (DPG) o ceramida. En algunas realizaciones, el PEG es PEG 2000.

En algunas realizaciones, el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.002-0.2 por ciento en moles. En algunas realizaciones, la mezcla lipídica comprende uno o más de un lípido estructural (p. ej., un estero), un fosfolípido neutro y un lípido PEG libre. En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable está presente en la mezcla lipídica en un rango de 40-60 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el estero está presente en la mezcla lipídica en un rango de 30-50 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el estero está presente en la mezcla lipídica en un rango de 20-70 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el estero es colesterol.

En algunas realizaciones, el fosfolípido neutro se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), esfingomielina (SM). En algunas

realizaciones, el fosfolípido neutro está presente en la mezcla lipídica en un rango de 1-15 por ciento en moles, tal como aproximadamente 5-15 por ciento en moles.

En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre se selecciona del grupo que consiste en PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) o PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), N-(Metilpolioxietilen oxicarbonilo)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE-PEG) 1,2-Dimiristoil-rac-glicero-3-metilpolioxietileno (PEG-DMG), 1,2-Dipalmitoil-rac-glicero-3-metilpolioxietileno (PEG-DPG), 1,2-Dioleoil-rac-glicerol, metoxipolietilen Glicol (DOG-PEG) 1,2-Diestearoil-rac-glicero-3-metilpolioxietileno (PEG-DSG), N-palmitoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi(polietilenglicol)]} (PEG-ceramida), y DSPE-PEG-cisteína, o un derivado de los mismos. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende una diacilfosfatidiletanolamina que comprende cadena Dipalmitoilo (C16) o cadena Diestearoilo (C18). En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre es una mezcla de dos o más PEG-lípidos libres únicos. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre está presente en la mezcla lipídica en un rango de 1-4 por ciento en moles, tal como aproximadamente 1-2 por ciento en moles, o aproximadamente 2-4 por ciento en moles, o aproximadamente 1.5 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido o un lípido diferente que el lípido en el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes.

En algunas realizaciones, la LNP tiene un diámetro medio en el rango de 50-200 nm. En algunas realizaciones, la LNP tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, la LNP tiene un índice de polidispersidad en un rango de 0.05 a 1. En algunas realizaciones, la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +50 mV a pH 5, tal como de aproximadamente +10 mV a aproximadamente +30 mV a pH 5. En algunas realizaciones, la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +10 mV a pH 7.4.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ARN es un ARNm, ARNt, ARNsi, ARNg (ARN guía), ARNcirc (ARN circular), ribozimas, ARN señuelo o microARN. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un receptor, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un anticuerpo, un antígeno, una enzima o una vacuna. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de regular la respuesta inmune en la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de reprogramar la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un receptor sintético de células T (sinTCR) o un receptor quimérico de antígenos (CAR). En algunas realizaciones, el CAR es TTR-023 anti-CD20 (Leu-16). En algunas realizaciones, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica el CAR comprende la secuencia de polinucleótido de 25. La secuencia CAR TTR-023 anti-CD20 (Leu-16) (incluyendo líder) (SEQ ID NO: 24):

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKAKEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK
QTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYW
FFDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGSGGGGSSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKP
GSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGKLEIKGGG
GSAAAEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR

SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST
ATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 24)

Secuencia de ácido nucleico correspondiente (SEQ ID NO: 25):

5 atggagaccgacaccctgttgcttgggtactgttactttgggtgcccggatctaccggtgattacaaggccaaggagggtgcagctgcagc
agagcggagccgagctggtgaagccaggcgcttccgtgaagatgtcttgaaggcctccggctacacattcaccagctacaatatgcactgggtaa
agcagactccggggcagggcctggagtgatagtgccatctaccctggcaacggcgacaccagctacaaccagaagttaaggggaaggcta
cttaacagcggacaagtgcctctaccgcctacatgcaactcagctccctgacgagcgaggactccgaggactactactgtgccgctccaacta
ctacggctctagctattggttcttcgacgtgtggggcgctggaacgaccgtgaccgtgtctccggtggaggttccggggcggaagcggcggtggc
10 ggcagttcggacatcgctgacccagagccctgccatctgtccgcttccccggggagaaagttacgatgacctgccgagcgagctccagtgct
aactacatggattggtaccagaagaagcccggcagcagctccaagccgtggattacgctactagcaacctggcgctccggtgtccggctcgcttct
caggttctggtcgggtactagttattcattaaccatttctcgctggagggtgaggacgctgccactactactgccaacagtgttcaaccctccc
actttcggaggcggcaccaagctcgagatcaagggcggggtggctccgcagcagccattgaggtgatgtatctctccctatttggacaacgag
aagtcaaattggcaccatcatccacgttaagggcaagcacctgtgccatctcccgttccaggccctctaagcccttctgggtcctggtggtggtc
15 ggcggcgctcctggcatgttactctctgctggtgacccgtcgcttcacatcttttgggtccggtccaagcgagccgctgctccactccgactacatgaa
tatgactcctcgtaggcccggtccaaccgcaagcactaccagccgtacgcgcggccagagactttgctgcttaccgatccagagtgaatttcta
ggcggccgaacctcccgcatatcagcagggccagaaccagctgtacaacgaactcaactgggacggcgaggaatacagatgtgtggataa
acgccgtggccgcatcccagatgggcggaagccacgtcgaaaaaccctcaggagggcctttacaacgagttgcagaaggacaaaatgg
cggaggcctactccgagatcggaatgaagggggagcgccggcgcggaagggcatgacggcctctaccagggcctgtccacagccacgaa
20 agacacctatgacgcctgcataatgcaggccctgccccgcgctgataatga (SEQ ID NO: 25)

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo, y el anticuerpo es un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un Nanocuerpo. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv o scFv. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a
25 células inmunes comprende un Fab diseñado por ingeniería para eliminar uno o más enlaces disulfuro naturales entre cadenas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la sustitución C233S, numeración según Kabat, y/o un fragmento de cadena ligera que comprende la sustitución C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que está diseñado por ingeniería para
30 introducir uno o más enlaces disulfuro enterrados entre cadenas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la sustitución F174C, numeración según Kabat, y/o un fragmento de cadena ligera que comprende la sustitución S176C, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab diseñado por ingeniería para eliminar uno o más enlaces disulfuro naturales entre
35 cadenas y para introducir uno o más enlaces disulfuro enterrados entre cadenas. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende una cisteína en el extremo C del fragmento de cadena pesada o ligera. En algunas realizaciones, el Fab comprende además uno o más aminoácidos entre el fragmento de cadena pesada del Fab y la cisteína

C-terminal. En algunas realizaciones, el Fab comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio CH1 del anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera unido a un dominio constante de cadena ligera del anticuerpo, en donde el dominio CH1 y el dominio constante de cadena ligera están unidos por uno o más enlaces disulfuro entre cadenas, y en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende además un fragmento variable de cadena única (scFv) unido al extremo C del dominio constante de cadena ligera por un enlazador de aminoácidos. En algunas realizaciones, el anticuerpo Fab es un Fab DS (Fab con enlace disulfuro entre cadenas de tipo salvaje (natural)), un Fab NoDS (Fab con enlace disulfuro natural eliminado, tal como un Fab con sustitución C233S en la cadena pesada, y/o sustitución C214S en la cadena ligera, numeración según Kabat), un Fab bDS (Fab sin enlace disulfuro natural, y con enlace disulfuro enterrado entre cadenas no natural introducido, tal como un Fab con F174C y C233S en la cadena pesada, y/o sustitución S176C y C214S en la cadena ligera, numeración según Kabat), o un Fab bDS-ScFv (un Fab bDS unido a un ScFv mediante un enlazador, tal como (G4S)x), como se demuestra en la FIG 31.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un Nanocuerpo. En algunas realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina comprende una cisteína en el extremo C. En algunas realizaciones, el Nanocuerpo comprende además un espaciador que comprende uno o más aminoácidos entre el dominio V_{HH} y la cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios V_{HH} . En algunas realizaciones, los dos o más dominios V_{HH} están unidos por un enlazador de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio V_{HH} unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo y el dominio constante de cadena ligera de anticuerpo están unidos por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo está unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el dominio CH1 comprende sustituciones F174C y C233S, y/o el dominio constante de cadena ligera comprende sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un ScFv, un V_{HH} (Nb), un $2 \times V_{HH}$, un V_{HH} -CH1/Vk vacío, o un V_{HH} 1-CH1/ V_{HH} 2-Nb bDS, como se demuestra en la FIG. 31.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo descrito en los ejemplos.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende:

(a) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3;

(b) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5;

(c) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

(d) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;

(e) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;

(f) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;

(g) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15;

(h) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17;

(i) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;

(j) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; o

(k) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv o scFv. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab diseñado por ingeniería para eliminar el enlace disulfuro natural entre cadenas en el extremo C. En algunas realizaciones, el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la sustitución C233S, y un fragmento de cadena ligera que comprende la sustitución C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células

inmunes comprende un Fab que tiene un enlace disulfuro entre cadenas no natural (p. ej., un enlace disulfuro entre cadenas diseñado por ingeniería y enterrado). En algunas realizaciones, el Fab comprende la sustitución F174C en el fragmento de cadena pesada, y la sustitución S176C en el fragmento de cadena ligera, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende una cisteína en el extremo C del fragmento de cadena pesada o ligera. En algunas realizaciones, el Fab comprende además uno o más aminoácidos entre el fragmento de cadena pesada del Fab y la cisteína C-terminal.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio variable único de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina comprende una cisteína en el extremo C. En algunas realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina comprende un dominio VHH y comprende además un espaciador que comprende uno o más aminoácidos entre el dominio VHH y la cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios VHH. En algunas realizaciones, los dos o más dominios V_{HH} están unidos por un enlazador de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio V_{HH} unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio CH1 del anticuerpo y el dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo están unidos por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio VHH unido a un dominio CH1 de anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio CH1 de anticuerpo está unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el dominio CH1 comprende sustituciones F174C y C233S, y el dominio constante de cadena ligera comprende sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende: (a) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3; o (b) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria métodos para dirigir la administración de un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende el compuesto de la siguiente fórmula (II): [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a una LNP o una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método para dirigir la administración de un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se divulga a continuación. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP es una LNP como se describe en la presente divulgación.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para expresar un polipéptido de interés en una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura de Fórmula (II): [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido. En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a una LNP o una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método de expresión de un polipéptido de interés en una célula inmune diana de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se divulga a continuación. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP).

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para modular la función celular de una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura de Fórmula (II): [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modular la función celular de la célula inmune. En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a una LNP o a una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método para modular la función celular de una célula inmune diana de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se divulga a continuación. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP).

En algunas realizaciones, la modulación de la función celular comprende la reprogramación de las células inmunes para iniciar una respuesta inmune. En algunas realizaciones, la modulación de la función celular comprende la modulación de la especificidad antigénica de la célula inmune.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para tratar, mejorar o prevenir un síntoma de un trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesita. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria relativas a un método para tratar, mejorar y/o prevenir un síntoma de un trastorno o enfermedad mediante la administración de, p. ej., una LNP de la invención, se pretende que dichas divulgaciones también se interpreten como proporcionar la, p. ej., LNP para su uso en dichos métodos de tratamiento, mejora y/o prevención de un síntoma de un trastorno o enfermedad. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado con la siguiente estructura de Fórmula (II): [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico modula la respuesta inmune de la célula inmune, por lo tanto, para tratar o mejorar el síntoma. En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a una LNP o una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método de tratamiento, mejora o prevención de un síntoma de un trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesita. Una enfermedad o trastorno puede ser como se divulga a continuación. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP).

En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno inmune, un trastorno inflamatorio o cáncer. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica un antígeno para su uso en una vacuna terapéutica o profiláctica para tratar o prevenir una infección por un patógeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la sustitución F174C, numeración según Kabat, y/o un fragmento de cadena ligera que comprende la sustitución S176C, numeración según Kabat.

En algunas realizaciones, no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % de las células no inmunes son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % de las células inmunes no deseadas que no están destinadas a ser el destino de la administración son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, la semivida del ácido nucleico administrado por la LNP a la célula inmune o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP es al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más que la semivida

[illegible]

En un aspecto, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a las células inmunes del sujeto. La LNP comprende (a) Un lípido catiónico ionizable, (b) Un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]; (c) Un esteroide u otro lípido estructural; (d) Un fosfolípido neutro; (e) Un lípido de polietilenglicol (PEG) libre, y (f) el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a CD7 o CD8, y el lípido de PEG libre es DMG-PEG o DPG-PEG.

En un aspecto, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a las células inmunes del sujeto. La LNP comprende (a) Un lípido catiónico ionizable, (b) Un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]; (c) Un esteroide u otro lípido estructural; (d) Un fosfolípido neutro; (e) Un lípido de polietilenglicol (PEG) libre, y (f) el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo, y el anticuerpo es un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el Fab está diseñado por ingeniería para eliminar el disulfuro natural entre cadenas en el extremo C. En algunas realizaciones, el Fab tiene un disulfuro entre cadenas enterrado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un dominio variable único de inmunoglobulina (ISV), y el dominio ISV es un ISV de Nanobody® ISV. En algunas realizaciones, el lípido PEG libre comprende un PEG que tiene un peso molecular de al menos 2.000 daltons. En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 a 5.000 daltons. En algunas realizaciones, el Fab es un

anticuerpo anti-CD3, y el lípido PEG libre en la LNP comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 daltons. En algunas realizaciones, el Fab es un anticuerpo anti-CD4, y el lípido PEG libre en la LNP comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 a 3.500 daltons.

5 En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende una diacilfosfatidiletanolamina, una dialquilfosfatidiletanolamina, un diacilglicerol, una ceramida, un dialquilglicerol o una dialquilacetamida. En algunas realizaciones, la cadena alquílica es ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico o ácido esteárico. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre es DMG-PEG. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre es DPG-PEG.

10 En un aspecto, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a las células inmunes del sujeto. La LNP comprende (a) Un lípido catiónico ionizable, (b) Un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]; (c) Un esteroide u otro lípido estructural; (d) Un fosfolípido neutro; (e) Un lípido de polietilenglicol (PEG) libre, y (f) el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a CD3, y un anticuerpo que se une a CD11a o CD18.

15 En un aspecto, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a las células inmunes del sujeto. La LNP comprende (a) Un lípido catiónico ionizable, (b) Un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]; (c) Un esteroide u otro lípido estructural; (d) Un fosfolípido neutro; (e) Un lípido de polietilenglicol (PEG) libre, y (f) el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a CD7, y un anticuerpo que se une a CD8.

20 En un aspecto, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a dos tipos diferentes de células inmunes del sujeto. La LNP comprende (a) Un lípido catiónico ionizable, (b) Un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]; (c) Un esteroide u otro lípido estructural; (d) Un fosfolípido neutro; (e) Un lípido de polietilenglicol (PEG) libre, y (f) el ácido nucleico.

25 En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un resto de direccionamiento biespecífico. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento biespecífico se une a los dos tipos diferentes de células inmunes. En algunas realizaciones, los dos tipos diferentes de células inmunes son células T CD4+ y células T CD8+. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento biespecífico es un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es un Fab-ScFv.

30 En un aspecto, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a las células T CD4+ y CD8+ de un sujeto. La LNP comprende (a) Un lípido catiónico ionizable, (b) Un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]; (c) Un esteroide u otro lípido estructural; (d) Un fosfolípido neutro; (e)

Un lípido de polietilenglicol (PEG) libre, y (f) el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un único anticuerpo que se une a CD3 o CD7.

Se proporciona además una nanopartícula lipídica (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto, en donde la LNP comprende: (a) un lípido catiónico ionizable, (b) un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]; (c) un esteroide u otro lípido estructural; (d) un fosfolípido neutro; (e) un lípido de polietilenglicol (PEG) libre, y (f) el ácido nucleico, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que carece del enlace disulfuro nativo entre cadenas. En algunas realizaciones, el Fab está diseñado por ingeniería para reemplazar una o ambas cisteínas en la cadena ligera constante nativa y la cadena pesada constante nativa que forman el disulfuro nativo entre cadenas con un aminoácido distinto de cisteína, para eliminar, por lo tanto, el enlace disulfuro nativo entre cadenas en el Fab.

También se proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que se une a CD8 humano. En algunas realizaciones, el ISVD comprende tres dominios determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3, en donde

- (a) la CDR1 comprende GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100),
- (b) la CDR2 comprende IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101), y
- (c) la CDR3 comprende AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102).

En algunas realizaciones, el ISVD está humanizado.

En algunas realizaciones, el ISVD comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 77.

También se proporciona un polipéptido que comprende GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100), IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101) y AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102).

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende el ISVD como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende además un segundo resto de unión, en donde el segundo resto de unión se une a CD8 o a otra diana diferente. En algunas realizaciones, el segundo resto de unión es también un ISVD.

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende además un marcador detectable, o un agente terapéutico.

También se proporciona una composición que comprende el ISVD o el polipéptido como se describe en la presente memoria.

Se proporciona además una composición farmacéutica que comprende el ISVD o el polipéptido como se describe en la presente memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporciona además un método para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con CD8 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno inmune, un trastorno inflamatorio o cáncer.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica un antígeno para su uso en una vacuna terapéutica o profiláctica para tratar o prevenir una infección por un patógeno. En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable es un lípido catiónico ionizable como se divulga en la presente memoria, tal como los de la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células T. En algunas realizaciones, el antígeno de células T es CD3, CD8, o ambos CD3 y CD8.60. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células Asesinas Naturales (NK). En algunas realizaciones, el antígeno de células NK es CD56. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se acopla covalentemente a un lípido en la mezcla lipídica mediante un enlazador que contiene polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el lípido acoplado covalentemente al grupo de direccionamiento a células inmunes mediante un enlazador que contiene PEG es diestearoilglicerol (DSG), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-glicero-fosfoglicerol (DSPG), dimiristoil-glicerol (DMG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-glicerol (DPG) o ceramida. En algunas realizaciones, el PEG es PEG 2000. En algunas realizaciones, el PEG es PEG 3400.

En algunas realizaciones, el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.002-0.2 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable está presente en la mezcla lipídica en un rango de 40-60 por ciento en moles.

En algunas realizaciones, el esteroil es colesterol. En algunas realizaciones, el esteroil está presente en la mezcla lipídica en un rango de 30-50 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el fosfolípido neutro se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), esfingomielina (SM).

En algunas realizaciones, el fosfolípido neutro está presente en la mezcla lipídica en un rango de 1-15 por ciento en moles, tal como aproximadamente 5 a 15 por ciento en moles, o aproximadamente 5 a 10 por ciento en moles.

En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre se selecciona del grupo que consiste en fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilgliceroles modificados con PEG y dialquigliceroles modificados con PEG. Por ejemplo, un lípido PEG puede ser PEG-dioleoilglicerol (PEG-DOG), PEG-dimiristoil-glicerol (PEG-DMG), PEG-dipalmitoil-glicerol (PEG-DPG), PEG-dilinoleoil-glicero-fosfatidiletanolamina (PEG-DLPE), PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), PEG-dipalmitoil-

fosfatidiletanolamina (PEG-DPPE), PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSG), PEG-diacilglicerol (PEG-DAG, p. ej., PEG-DMG, PEG-DPG y PEG-DSG), PEG-ceramida, PEG-diestearoil-glicero-fosfoglicerol (PEG-DSPG), PEG-dioleoil-glicero-fosfoetanolamina (PEG-DOPE), 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditradecilacetamida o un lípido de PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE).

En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende una diacilfosfatidiletanolamina que comprende cadena Dipalmitoilo (C16) o cadena Diestearoilo (C18). En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre está presente en la mezcla lipídica en aproximadamente 0.1-4 por ciento en moles, tal como 0.5 a 2.5 por ciento en moles, o aproximadamente 1 a 2 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre está presente en la mezcla lipídica en aproximadamente 1.5 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido o un lípido diferente que el lípido en el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes.

En algunas realizaciones, la LNP tiene un diámetro medio en el rango de 50-200 nm. En algunas realizaciones, la LNP tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, la LNP tiene un índice de polidispersidad en un rango de 0.05 a 1. En algunas realizaciones, la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +50 mV a pH5, tal como aproximadamente +10 mV a aproximadamente +30 mV a pH 5. En algunas realizaciones, la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +10 mV a pH 7.4.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ARN es un ARNm, ARNt, ARNsi, ARNg (ARN guía), ARNcirc (ARN circular), ribozimas, ARN señuelo o microARN. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un receptor, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un anticuerpo, un antígeno, una enzima o una vacuna. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de regular la respuesta inmune en la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de reprogramar la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un receptor sintético de células T (sinTCR) o un receptor quimérico de antígenos (CAR).

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo, y el anticuerpo es un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv y scFv. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende uno o más enlaces disulfuro entre cadenas. En algunas realizaciones, el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende sustituciones F174C y C233S, y un fragmento de cadena ligera que comprende sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende una cisteína en el extremo C del fragmento de cadena pesada o ligera.

En algunas realizaciones, el Fab comprende además uno o más aminoácidos entre el fragmento de cadena pesada del Fab y la cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el Fab comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio CH1 del anticuerpo y un dominio variable de

cadena ligera unido a un dominio constante de cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio CH1 y el dominio constante de cadena ligera están unidos por uno o más enlaces disulfuro entre cadenas. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende además un fragmento variable de cadena única (scFv) unido al extremo C del dominio constante de cadena ligera mediante un enlazador de aminoácidos.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio variable único de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina comprende una cisteína en el extremo C. En algunas realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina comprende un dominio VHH y comprende además un espaciador que comprende uno o más aminoácidos entre el dominio VHH y la cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios VHH. En algunas realizaciones, los dos o más dominios VHH están unidos por un enlazador de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio VHH unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio VHH unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio CH1 del anticuerpo y el dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo están unidos por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio VHH unido a un dominio CH1 de anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio CH1 de anticuerpo está unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el dominio CH1 comprende sustituciones F174C y C233S, y el dominio constante de cadena ligera comprende sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende:

(a) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o 3;

(b) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, no más del 5 % de las células no inmunes son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, la semivida del ácido nucleico administrado por la LNP o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP es al menos un 10 % más larga que la semivida de un ácido nucleico administrado por una LNP de referencia o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por una LNP de referencia. En algunas realizaciones, al menos el 10 % de las células inmunes son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del ácido nucleico administrado por la LNP es al menos un 10 % mayor que el nivel de expresión de un ácido nucleico administrado por una LNP de referencia.

En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico

ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, la célula inmune es una célula NK. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a CD56.

En algunos aspectos, se proporcionan en la presente memoria nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado con la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a CD7 o CD8. En algunas realizaciones, el lípido de PEG libre es DMG-PEG o DPG-PEG.

En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, el Fab está diseñado por ingeniería para eliminar el disulfuro natural entre cadenas en el extremo C. En algunas realizaciones, el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende sustituciones C233S y un fragmento de cadena ligera que comprende sustituciones C214S. En algunas realizaciones, el Fab comprende un disulfuro entre cadenas no natural. En algunas realizaciones, el Fab comprende una sustitución F174C en el fragmento de cadena pesada, y una sustitución S176C en el fragmento de cadena ligera. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un dominio variable único de inmunoglobulina (ISV), y el dominio ISV es un ISV de Nanobody® ISV. En algunas realizaciones, el lípido PEG libre comprende un PEG que tiene un peso molecular de al menos 2.000 daltons. En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 a 5.000 daltons. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab. En algunas realizaciones, el Fab se une a CD3, y el lípido PEG libre en la LNP comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 daltons. En algunas realizaciones, el Fab es un anticuerpo anti-CD4, y el lípido

PEG libre en la LNP comprende un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 a 3.500 daltons.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios VHH. En algunas realizaciones, los dos o más dominios VHH están unidos por un enlazador de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio VHH unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio VHH unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo.

En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, la LNP se une a CD3, y también se une a CD11a o CD18. En algunas realizaciones, la LNP comprende dos conjugados. En algunas realizaciones, el primer conjugado comprende un anticuerpo que se une a CD3. En algunas realizaciones, el segundo conjugado comprende un anticuerpo que se une a CD11a o CD18. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado. En algunas realizaciones, el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico que se une tanto a CD3 como a CD11a. En algunas realizaciones, el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico que se une tanto a CD3 como a CD18. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es un dominio variable único de inmunoglobulina o Fab-ScFv. En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, la LNP se une a CD7 y CD8 de la célula inmune.

En algunas realizaciones, la LNP comprende dos conjugados. En algunas realizaciones, el primer conjugado comprende un anticuerpo que se une a CD7, y un segundo conjugado que se une a CD8. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado. En algunas realizaciones, el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico que se une a CD7 y CD8. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es un dominio variable único de inmunoglobulina o Fab-ScFv.

En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a dos tipos diferentes de células inmunes del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende: un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células

inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, la LNP se une a un primer antígeno en la superficie del primer tipo de célula inmune, y también se une a un segundo antígeno en la superficie del segundo tipo de célula inmune. En algunas realizaciones, los dos tipos diferentes de células inmunes son células T CD4+ y células T CD8+. En algunas realizaciones, la LNP comprende dos conjugados. En algunas realizaciones, el primer conjugado comprende un primer anticuerpo que se une al primer antígeno del primer tipo de célula inmune, y el segundo conjugado comprende un segundo anticuerpo que se une al segundo antígeno del segundo tipo de célula inmune. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado. En algunas realizaciones, el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une tanto al primer antígeno del primer tipo de célula inmune como al segundo antígeno del segundo tipo de célula inmune. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es un dominio variable único de inmunoglobulina o un Fab-ScFv.

En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a las células T tanto CD4+ como CD8+ de un sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un único anticuerpo que se une a CD3 o CD7.

En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico tanto a las células T como a las células NK de un sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a CD7, CD8, o ambos CD7 y CD8.

En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico tanto a las células T como a las células NK de un sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un

lípidos de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a (i) ambos CD3 y CD56; (ii) ambos CD8 y CD56; o (iii) ambos CD7 y CD56.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se acopla covalentemente a un lípido de la mezcla lipídica mediante un enlazador que contiene polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el lípido acoplado covalentemente al grupo de direccionamiento a células inmunes mediante un enlazador que contiene PEG es diestearoilglicerol (DSG), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-glicerol-fosfoglicerol (DSPG), dimiristoil-glicerol (DMG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-glicerol (DPG), dialquilacetamida o ceramida. En algunas realizaciones, el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.002-0.2 por ciento en moles. En algunas realizaciones, la mezcla lipídica comprende además uno o más de un lípido estructural (p. ej., un esteroide), un fosfolípido neutro y un lípido PEG libre.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable está presente en la mezcla lipídica en un rango de 40-60 por ciento en moles.

En algunas realizaciones, el esteroide está presente en la mezcla lipídica en un rango de 30-50 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el esteroide es colesterol.

En algunas realizaciones, el fosfolípido neutro se selecciona del grupo que consiste en: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diestearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DSPE), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DOPC). En algunas realizaciones, el fosfolípido neutro está presente en la mezcla lipídica en un rango de 1-15 por ciento en moles, tal como aproximadamente 5-15 por ciento en moles.

En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre se selecciona del grupo que consiste en PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) o PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), N-(Metilpolioxietileno oxycarbonil)-1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DPPE-PEG), 1,2-Dimiristoil-rac-glicerol-3-metilpolioxietileno (PEG-DMG), 1,2-Dipalmitoil-rac-glicerol-3-metilpolioxietileno (PEG-DPG), 1,2-Dioleoil-rac-glicerol, metoxipolietileno Glicol (DOG-PEG), 1,2-Diestearoil-rac-glicerol-3-metilpolioxietileno (PEG-DSG), N-palmitoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi(polietilenglicol)]} (PEG-ceramida), y DSPE-PEG-cisteína, o un derivado de los mismos. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende una diacilfosfatidiletanolamina que comprende cadena dipalmitoil (C16) o cadena diestearoil (C18). En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.1 a 4 por ciento en moles, tal como aproximadamente 0.5-2.5 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre es aproximadamente 1.5 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido o un lípido diferente que el lípido en el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes.

En algunas realizaciones, la LNP tiene un diámetro medio en el rango de 50-200 nm. En algunas realizaciones, la LNP tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, la

LNP tiene un índice de polidispersidad en un rango de 0.05 a 1. En algunas realizaciones, la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente -5 mV a 50 mV a pH 5, tal como de aproximadamente +10 mV a aproximadamente +30 mV a pH 5. En algunas realizaciones, la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +10 mV a pH 7.4.

5 En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ARN es un ARNm. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un receptor, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un anticuerpo, un antígeno, una enzima o una vacuna. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de regular la respuesta inmune en la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de reprogramar la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un receptor sintético de células T (sinTCR) o un receptor quimérico de antígenos (CAR).

10 En algunos aspectos, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido de polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico.

15 En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que carece del enlace disulfuro nativo entre cadenas. En algunas realizaciones, el Fab está diseñado por ingeniería para reemplazar una o ambas cisteínas en la cadena ligera constante nativa y la cadena pesada constante nativa que forman el disulfuro nativo entre cadenas con un aminoácido distinto de cisteína, para eliminar por lo tanto el enlace disulfuro nativo entre cadenas en el Fab.

20 En algunos aspectos, se proporcionan métodos para dirigir la administración de un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria. En algunas realizaciones, el método se dirige a células NK. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a CD56. En algunas realizaciones, el método se dirige simultáneamente a células T y células NK. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a CD7, CD8, o ambos CD7 y CD8. En algunas realizaciones, el método se dirige simultáneamente a células T CD4+ y CD8+. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un polipéptido que se une a CD3 o CD7.

25 En algunos aspectos, se proporcionan métodos para expresar un polipéptido de interés en una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria.

30 En algunos aspectos, se proporcionan métodos para modular la función celular de una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para tratar, mejorar o prevenir un síntoma de un trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria.

En algunos aspectos, se proporcionan dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) que se unen al CD8 humano. En algunas realizaciones, el ISVD comprende tres dominios determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3. En algunas realizaciones, la CDR1 comprende GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100). En algunas realizaciones, la CDR2 comprende IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101). En algunas realizaciones, la CDR3 comprende AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102). En algunas realizaciones, el ISVD está humanizado. En algunas realizaciones, el ISVD comprende la SEQ ID NO: 77.

En algunos aspectos, se proporcionan polipéptidos que comprenden GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100), IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101) y AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102). En otro aspecto, se proporcionan polipéptidos que comprenden el ISVD proporcionado en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un segundo resto de unión. En algunas realizaciones, el segundo resto de unión se une a CD8 o a otra diana diferente. En algunas realizaciones, el segundo resto de unión es también un ISVD. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un marcador detectable. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende un agente terapéutico.

En algunos aspectos, se proporcionan composiciones que comprenden el ISVD proporcionado en la presente memoria o el polipéptido proporcionado en la presente memoria.

En algunos aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el ISVD proporcionado en la presente memoria o el polipéptido proporcionado en la presente memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con CD8 en un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es cáncer.

A continuación, se describen con más detalle diversos aspectos y realizaciones de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 representa el espectro de RMN de protón del intermedio 13-11.

La FIG. 2A representa el espectro de RMN de protón del intermedio 13-11a; la FIG. 2B representa el espectro de RMN de protón del intermedio 13-11b; y la FIG. 2C representa la LC-ELSD del intermedio 13-11b.

La FIG. 3A representa el espectro de RMN de protón del intermedio 13-10; la FIG. 3B representa el cromatograma LC-CAD del intermedio 13-10.

La FIG. 4A-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 1; la FIG. 4A-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 1.

La FIG. 4B-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 3; la FIG. 4B-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 3.

La FIG. 4C-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 4; la FIG. 4C-2 representa el cromatograma LC-CAD L del Lípido 4.

La FIG. 4D-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 5A; la FIG. 4D-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 5A.

5 La FIG. 4E-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 6; la FIG. 4E-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 6.

La FIG. 4F-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 7; la FIG. 4F-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 7.

10 La FIG. 4G-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 2; la FIG. 4G-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 2;

La FIG. 4H-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 8; la FIG. 4H-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 8.

La FIG. 4I-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 9; la FIG. 4I-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 9.

15 La FIG. 4J-1 muestra el espectro de RMN de protón del Lípido 10A; la FIG. 4J-2 muestra el cromatograma LC-CAD del Lípido 10A.

La FIG. 4K-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 11A; la FIG. 4K-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 11A.

20 La FIG. 4L-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 12; la FIG. 4L-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 12.

La FIG. 4M-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 13; la FIG. 4M-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 13.

La FIG. 4N-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 15; la FIG. 4N-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 15.

25 La FIG. 4O-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 16; la FIG. 4O-2 representa el LC-CAD del Lípido 16.

La FIG. 4P-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 19; la FIG. 4P-2 representa el cromatograma LC-ELSD del Lípido 19.

30 La FIG. 4Q-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 20; la FIG. 4Q-2 representa el cromatograma LC-ELSD del Lípido 20.

La FIG. 4R-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 31; la FIG. 4R-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 31.

La FIG. 4S-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 32; la FIG. 4S-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 32.

35 La FIG. 4T-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 33; la FIG. 4T-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 33.

La FIG. 4U-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 34; la FIG. 4U-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 34.

La FIG. 4V-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 14A; la FIG. 4V-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 14A.

La FIG. 4W-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 17A; la FIG. 4W-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 17A.

5 La FIG. 4X-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 18A; la FIG. 4X-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 18A.

La FIG. 4Y-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 21A; la FIG. 4Y-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 21A.

10 La FIG. 4Z-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 22; la FIG. 4Z-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 22.

La FIG. 4AA-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 23A; la FIG. 4AA-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 23A.

La FIG. 4AC-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 25A; la FIG. 4AC-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 25A.

15 La FIG. 4AE-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 27; la FIG. 4AE-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 27.

La FIG. 4AF-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 28; la FIG. 4AF-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 28.

20 La FIG. 4AG-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 29; la FIG. 4AG-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 29.

La FIG. 4AH-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 37A; la FIG. 4AH-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 37A.

La FIG. 4AI-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 19A; la FIG. 4AI-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 19A.

25 La FIG. 4AJ-1 representa el espectro de RMN de protón del Lípido 20A; la FIG. 4AJ-2 representa el cromatograma LC-CAD del Lípido 20A.

La FIG. 5A representa el diámetro (DLS, nm) de las LNP basadas en el Lípido 1 a Lípido 8 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción de anticuerpos (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

30 La FIG. 5B representa la polidispersidad (DLS) de las LNP basadas en el Lípido 1 a Lípido 8 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 5C representa la carga (potencial Zeta, DLS) de las LNPs basadas en el Lípido 1 a Lípido 8 en MBS pH 5.5, HBS pH 7.4.

35 La FIG. 5D representa el % de recuperación de ARN y el ARN accesible al colorante en las LNP basadas en el Lípido 1 a Lípido 8.

La FIG. 6A representa el diámetro (DLS, nm) de las LNP basadas en los Lípidos 9, 10, 11 y 15 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 6B representa la polidispersidad (DLS) de las LNP basadas en los Lípidos 9, 10, 11 y 15 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 6C representa la carga (potencial Zeta, DLS) de las LNP basadas en los Lípidos 9, 10, 11 y 15 en MBS pH 5.5 y HBS pH 7.4.

La FIG. 6D representa el % de recuperación de ARN y el ARN accesible al colorante en las LNP basadas en los Lípidos 9, 10, 11 y 15.

La FIG. 7A representa el diámetro (DLS, nm) de las LNP basadas en Lípido 31 a Lípido 34 en HBS pH 7.4, MBS de 6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 7B representa la polidispersidad (DLS) de las LNP basadas en el Lípido 31 a Lípido 34 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 7C representa la carga (potencial Zeta, DLS) de las LNP basadas en el Lípido 31 a Lípido 34 en MBS pH 5.5, HBS pH 7.4.

La FIG. 7D representa el % de recuperación de ARN y el ARN accesible al colorante en las LNP basadas en el Lípido 31 a Lípido 34.

La FIG. 8A representa el diámetro (DLS, nm) de las LNP basadas en los Lípidos 1, 3, 4, 5, 9 y 15 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción de conjugados de anticuerpos α CD8 TRX-2 y T8.

La FIG. 8B representa la polidispersidad (DLS) de las LNP basadas en los Lípidos 1, 3, 4, 5, 9 y 15 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción de conjugados de anticuerpos α CD8 TRX-2 y T8.

La FIG. 9A representa el diámetro (DLS, nm) de las LNP basadas en los Lípidos 1, 8, 9, 10, 11 y 15 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción de conjugados de anticuerpos α CD8 TRX-2 y T8.

La FIG. 9B representa la polidispersidad (DLS) de las LNP basadas en los Lípidos 1, 8, 9, 10, 11 y 15 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción de conjugados de anticuerpos α CD8 TRX-2 y T8.

La FIG. 10A representa el diámetro (DLS, nm) de las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 33 y 34 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 10B representa la polidispersidad (DLS) de las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 33 y 34 en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 10C representa la carga (potencial Zeta, DLS) de las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 33 y 34 en MBS pH 5.5, HBS pH7.4, MBS pH6.5, después de la inserción del anticuerpo (α CD3, hSP34) y después de la congelación-descongelación (-80 °C).

La FIG. 10D representa el % de recuperación de ARN y el ARN accesible al colorante en las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 33 y 34.

La FIG. 11A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (hsp34) basadas en ALC-0315, DLin-MC3-DMA, Lípido 3, Lípido 6 y Lípido 7, almacenadas a 4 °C; % de células T GFP + a las 24 horas.

La FIG. 11B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en ALC-0315, DLin-MC3-DMA, Lípido 3, Lípido 6 y Lípido 7, después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); % de células T GFP + a las 24 horas.

La FIG. 11C representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en ALC-0315, DLin-MC3-DMA, Lípido 3, Lípido 6 y Lípido 7, almacenadas a 4 °C; MFI de GFP en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 11D representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en ALC-0315, DLin-MC3-DMA, Lípido 3, Lípido 6 y Lípido 7, después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); MFI de GFP en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 11E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en ALC-0315, DLin-MC3-DMA, Lípido 3, Lípido 6 y Lípido 7, después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); % de células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 12A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en SM-102, DLin-KC2-DMA, Lípido 3, Lípido 4 almacenadas a 4 °C; % de células T GFP + a las 24 horas.

La FIG. 12B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en SM-102, DLin-KC2-DMA, Lípido 3, Lípido 4, después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); % de células T GFP + a las 24 horas.

La FIG. 12C representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en SM-102, DLin-KC2-DMA, Lípido 3, Lípido 4, almacenadas a 4 °C; MFI de GFP en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 12D representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en SM-102, DLin-KC2-DMA, Lípido 3, Lípido 4, después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); MFI de GFP en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 12E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en SM-102, DLin-KC2-DMA, Lípido 3, Lípido 4, después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); % de células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 13A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 1 (almacenadas a 4 °C), Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), y Lípido 5 (almacenadas a 4 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 13B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 1, Lípido 3 y Lípido 5 después del ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 13C representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 1 (almacenadas a 4 °C), Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), y Lípido 5 (almacenadas a 4 °C), MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 13D representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 1, Lípido 3 y Lípido 5 después de un ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento a -80 °C); MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 13E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 1, Lípido 3 y Lípido 5 almacenadas a -80 °C.

La FIG. 14A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 1 (almacenadas a 4 °C), Lípido 8 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 8 (almacenado a -80 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 14B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 1 (almacenadas a 4 °C), Lípido 8 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 8 (almacenado a -80 °C); MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 14C representa el % de células vivas con LNP dirigidas basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 1 (almacenadas a 4 °C), Lípido 8 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 8 (almacenado a -80 °C).

La FIG. 15A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 8 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), y Lípido 10 (almacenadas a 4 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 15B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 8 (almacenadas a -80 °C) y Lípido 10 (almacenadas a -80 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 15C representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 8 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 10 (almacenadas a 4 °C); MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 15D representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 8 (almacenadas a -80 °C) y Lípido 10 (almacenadas a -80 °C); MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 15E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 8 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 10 (almacenadas a 4 °C); % de células T vivas.

La FIG. 15F representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 8 (almacenadas a -80 °C) y Lípido 10 (almacenadas a -80 °C); % de células T vivas.

La FIG. 16A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), Lípido 15 (almacenadas a 4 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 16B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 15 (almacenadas a -80 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 16C representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), Lípido 15 (almacenadas a 4 °C), MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 16D representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 15 (almacenadas a -80 °C); MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 16E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hsp34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C) y Lípido 15 (almacenadas a -80 °C).

La FIG. 17A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas; % de células T GFP +.

La FIG. 17B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas; MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 17C representa el % de células T +Dil con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas.

La FIG. 17D representa la MFI de Dil en células T vivas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas.

La FIG. 17E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas..

La FIG. 18A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas; % de células T GFP +.

La FIG. 18B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas; MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 18C representa el % de células T +Dil con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas.

La FIG. 18D representa la MFI de Dil en células T vivas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas.

La FIG. 18E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3, Lípido 4, Lípido 9, Lípido 15, y comparadas con las correspondientes LNP parentales no dirigidas.

La FIG. 19A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 2, Lípido 3, Lípido 31 y Lípido 32; almacenadas a 4 °C; % de células T GFP +.

La FIG. 19B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 2, Lípido 3, Lípido 31 y Lípido 32; almacenadas a 4 °C; MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 19C representa el % de células T vivas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA, Lípido 2, Lípido 3, Lípido 31 y Lípido 32; almacenadas a 4 °C.

La FIG. 20A representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 33 (almacenadas a 4 °C), Lípido 34 (almacenadas a 4 °C), o transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (muOKT8) basadas en Lípido 33 (almacenadas a 4 °C) Lípido 34 (almacenadas a 4 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 20B representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C), Lípido 34 (almacenadas a -80 °C); % de células T GFP +.

La FIG. 20C representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a 4 °C), Lípido 34 (almacenadas a 4 °C), o

transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (muOKT8) basadas en Lípido 33 (almacenadas a 4 °C) Lípido 34 (almacenadas a 4 °C); MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 20D representa la expresión de GFP en células T humanas primarias; transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Dlin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C), Lípido 34 (almacenadas a -80 °C); MFI de GFP en células T vivas.

La FIG. 20E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Dlin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C), Lípido 34 (almacenadas a -80 °C), o transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (muOKT8) basadas en Lípido 33 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 34 (almacenadas a 4 °C).

La FIG. 21A representa el % de células T CAR+ α CD20 (TTR-023) transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 33 (almacenadas a 4 °C); como se ilustra por el valor %M1.

La FIG. 21B representa el % de células T CAR+ α CD20 (TTR-023) transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C); como se ilustra por el valor %M1.

La FIG. 21C representa el % de MFI CAR α CD20 (TTR-023) en células T transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), y Lípido 33 (almacenadas a 4 °C).

La FIG. 21D representa el % de MFI CAR α CD3 (hSP34) en células T transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C).

La FIG. 21E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C) y Lípido 33 (almacenadas a 4 °C).

La FIG. 21F representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C).

La FIG. 22A representa el % de células T CAR+ α CD20 (TTR-023) (población CD8) con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), Lípido 33 (almacenadas a 4 °C), como se ilustra por el valor CD4- %M1.

La FIG. 22B representa la MFI de CAR α CD20 (TTR-023) en células T (población CD8) con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), Lípido 33 (almacenadas a 4 °C), como se ilustra por el valor de MFI de CD4- M1.

La FIG. 22C representa el nivel de CAR α CD20 (TTR-023) en células T CD4+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), Lípido 33 (almacenadas a 4 °C); como se ilustra por el valor %M1.

La FIG. 22D representa el nivel de CAR α CD20 (TTR-023) en células T CD4+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en DLin-KC2-DMA (almacenadas a -80 °C), Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C), Lípido 34 (almacenadas a -80 °C); como se ilustra por el valor MFI de M1.

La FIG. 22E representa el % de células T vivas (poblaciones CD4/CD8) transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a 4 °C), Lípido 4 (almacenadas a 4 °C), Lípido 9 (almacenadas a 4 °C), Lípido 33 (almacenadas a 4 °C).

La FIG. 23A representa el % de células T CAR+ α CD20 (TTR-023) (población CD8) transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C) después de un ciclo de congelación-descongelación, como se ilustra por el valor CD4- %M1.

La FIG. 23B representa la MFI de CAR α CD20 (TTR-023) en células T (población CD8) transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C) después de un ciclo de congelación-descongelación, como se ilustra por el valor de MFI de CD4- M1.

La FIG. 23C representa el nivel de CAR α CD20 (TTR-023) en células T CD4+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C); como se ilustra por el valor CD4+ %M1.

La FIG. 23D representa el nivel de CAR α CD20 (TTR-023) en células T CD4+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C); como se ilustra por el valor MFI de CD4+ M1.

La FIG. 23E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en Lípido 3 (almacenadas a -80 °C), Lípido 4 (almacenadas a -80 °C), Lípido 9 (almacenadas a -80 °C), Lípido 33 (almacenadas a -80 °C).

La FIG. 24A representa la expresión de GFP en células T CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células T GFP +.

La FIG. 24B representa la expresión de GFP en células T CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por la MFI de GFP.

La FIG. 24C representa la expresión de GFP en células T CD4+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células T GFP+.

La FIG. 24D representa la expresión de GFP en células T CD4+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por la MFI de GFP.

La FIG. 24E representa el % de células T CD8+ Dil+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células T Dil+.

La FIG. 24F representa la MFI de Dil en células T CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por la MFI de Dil.

La FIG. 24G representa el % de células T CD4+ Dil+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células T Dil+.

La FIG. 24H representa la MFI de Dil en células T CD4+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control de vector (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por la MFI de Dil.

La FIG. 25A representa la expresión de GFP en células NK en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células NK GFP+.

La FIG. 25B representa la expresión de GFP en células NK en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por la MFI de GFP.

La FIG. 25C representa la expresión de GFP en granulocitos en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de granulocitos GFP+.

La FIG. 25D representa la expresión de GFP en granulocitos en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por la MFI de GFP.

La FIG. 25E representa la expresión de GFP en células B en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células B GFP+.

La FIG. 25F representa la expresión de GFP en células B en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido

15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por MFI de GFP.

La FIG. 26A representa la unión de la LNP a las células NK en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células NK Dil+.

La FIG. 26B representa la unión de LNP a células NK en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por MFI de Dil.

La FIG. 26C representa la unión de LNP a granulocitos en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de granulocitos Dil+.

La FIG. 26D representa la unión de LNP a granulocitos en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por MFI de Dil.

La FIG. 26E representa la unión de LNP a células B en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por el % de células B Dil+.

La FIG. 26F representa la unión de LNP a linfocitos B en muestras de sangre completa transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) o dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en Lípido 9, Lípido 15 o DLin-KC3-DMA en comparación con el control sin unión (mutOKT8) y no transfectadas; como se ilustra por MFI de Dil.

La FIG. 27A representa el % de células T vivas 24 horas después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27B representa el % de células T CD8 (CD4-) que expresan CAR M1 (TTR-023) después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27C representa la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de M1 (TTR-023) en células T CD8 (CD4-) transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27D representa el % de células T CD8 (CD4-) con expresión de mCherry después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27E representa la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de mCherry en células T CD8 (CD4-) transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27F representa el % de células T CD4+ con expresión de CAR M1 (TTR-023) después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27G representa la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de M1 (TTR-023) en células T CD4+ después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27H representa el % de células T CD4+ con expresión de mCherry después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 27I representa el % de células Raji muertas en un experimento de cocultivo Raji (células B) con CAR-T generados usando LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 28A representa el % de células Raji muertas en un experimento de cocultivo Raji (células B) con células CAR-T generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA, con una relación efector : diana de 1:1, 4:1 y 8:1.

La FIG. 28B representa el % de células T CD8 (CD4-) vivas en un experimento de cocultivo Raji (células B) con células CAR-T generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA, con una relación efector : diana de 1:1, 4:1 y 8:1.

La FIG. 28C representa el % de células T CD4+ vivas en un experimento de cocultivo Raji (células B) con células CAR-T generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 9 o DLin-KC3-DMA, con una relación efector : diana de 1:1, 4:1 y 8:1.

La FIG. 29A representa el % de células T vivas 24 horas después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 29B representa el % de células T CD8 (CD4-) que expresan M1 (TTR-023 CAR) después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 29C d representa la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de M1 (TTR-023 CAR) en células T CD8 (CD4-) transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 29D representa el % de células T CD8 (CD4-) con expresión de mCherry después de ser transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 29E representa la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de mCherry en células T CD8 (CD4-) transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA.

La FIG. 30A representa el % de células Raji muertas en un experimento de cocultivo Raji (células B) con células CAR-T generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA, con una relación efector:diana de 0.31:1, 1:1, 3.16:1, 10:1 y 31.6:1.

La FIG. 30B representa el % de células T CD8 (CD4-) vivas en un experimento de cocultivo Raji (células B) con células CAR-T generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA, con una relación efector : diana de 0.31:1, 1:1, 3.16:1, 10:1 y 31.6:1.

La FIG. 30C representa el % de células T CD4+ vivas en un experimento de cocultivo Raji (células B) con células CAR-T generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) que expresan CAR α CD20 (TTR-023) o mCherry basadas en Lípido 15 o DLin-KC3-DMA, con una relación efector : diana de 0.31:1, 1:1, 3.16:1, 10:1 y 31.6:1.

La FIG. 31 representa las estructuras de varios híbridos Fab, VHH (Nb), ScFv, Fab-ScFv y Fab-VHH.

La FIG. 32A representa la expresión de GFP en células T transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 basadas en Lípido 9, Lípido 10, Lípido 13, Lípido 15, o DLin-KC2-DMA, almacenadas a 4 °C o después de congelación-descongelación (almacenadas a -80 °C), como se ilustra por el % de células T GFP+.

La FIG. 32B representa la expresión de GFP en células T transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 basadas en Lípido 9, Lípido 10, Lípido 13, Lípido 15, o DLin-KC2-DMA, almacenadas a 4 °C o después de congelación-descongelación (almacenadas a -80 °C), como se ilustra por la MFI de GFP.

La FIG. 32C representa el % de células T Dil+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 basadas en Lípido 9, Lípido 10, Lípido 13, Lípido 15 o DLin-KC2-DMA, almacenadas a 4 °C o después de congelación-descongelación (almacenadas a -80 °C), como se ilustra por el % de células T Dil+.

La FIG. 32D representa la MFI de Dil en células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 basadas en Lípido 9, Lípido 10, Lípido 13, Lípido 15 o DLin-KC2-DMA, almacenadas a 4 °C o después de congelación-descongelación (almacenadas a -80 °C), como se ilustra por el % MFI de Dil.

La FIG. 32E representa el % de células T vivas transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 basadas en Lípido 9, Lípido 10, Lípido 13, Lípido 15 o DLin-KC2-DMA, almacenadas a 4 °C o después de congelación-descongelación (almacenadas a -80 °C).

Las FIG. 33A a FIG. 33C representan el % de células T GFP+ (poblaciones CD4 y CD8) en muestras de sangre (FIG. 33A), bazo (FIG. 33B) e hígado (FIG. 33C) (analizadas para otros tipos celulares de interés según la leyenda) 24 horas después de la inyección de ARN GFP usando

formulaciones de LNP de Lípido 15, DLin-KC3-DMA y Lípido 9 y dirigidas a α -CD8 con el anticuerpo TRX-2.

Las FIG. 34A a FIG. 34C representan el % de células T Dil+ (poblaciones CD4 y CD8) en muestras de sangre (FIG. 34A), bazo (FIG. 34B) e hígado (FIG. 34C) (analizadas para tipos celulares adicionales de interés según la leyenda) 24 horas después de la inyección de ARN de GFP usando formulaciones de LNP de Lípido 15 (marcado con colorante Dil), DLin-KC3-DMA (sin el uso de marcaje con colorante Dil) y Lípido 9 (marcado con colorante Dil) y dirigidas a α -CD8 con el anticuerpo TRX-2.

La FIG. 35A representa el % de expresión de GFP en células T CD8 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 35B representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la expresión de GFP en células T CD8 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 35C representa el % de expresión de GFP en células T CD8 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 35D representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la expresión de GFP en células T CD8 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 35E representa el % de expresión de GFP en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 35F representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la expresión de GFP en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 35G representa el % de expresión de GFP en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 35H representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la expresión de GFP en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36A representa el % de células T CD8 Dil + con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36B representa MFI de Dil en células T CD8 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36C representa el % de Dil + en células T CD8 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36D representa el % de Dil + en células T CD8 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36E representa el % de Dil + en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36F representa MFI de Dil en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido 15 junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36G representa el % de Dil + en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 36H representa MFI de Dil en células T CD4 con LNP dirigidas a α -CD2, α -CD4, α -CD7, α -CD28, α -TCR y sin unión (OKT8 mutado) en Lípido DLin-KC3-DMA junto con la diana α -CD8 y α -CD3.

La FIG. 37A representa los diámetros (DLS, nm) de LNP dirigidas (α CD8) de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y Lípido ALC-0315 antes y después de la congelación-descongelación.

La FIG. 37B representa la polidispersidad (DLS) de LNP dirigidas (α CD8) de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y Lípido ALC-0315 antes y después de la congelación-descongelación.

La FIG. 37C representa el Potencial Zeta (mV) de LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y Lípido ALC-0315 en MES pH 5.5 y HBS pH 7.4.

La FIG. 37D representa el contenido de ARN total (μ g/mL) y el % de ARN accesible al colorante de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y Lípido ALC-0315.

La FIG. 38A representa el % de células T GFP+ en transfecciones con LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315.

La FIG. 38B representa MFI de GFP de células T en transfecciones con LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315.

La FIG. 38C representa el % de células T Dil+ en transfecciones con LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315.

La FIG. 38D representa MFI de Dil de células T en transfecciones con LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315.

La FIG. 38E representa el % de células T vivas en transfecciones con LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315.

La FIG. 39A representa la carga (Potencial zeta, DLS) de LNP GFP y BiTE basadas en DLin-KC3-DMA en MBS pH 5.5, HBS pH 7.4 antes de la inserción del anticuerpo.

La FIG. 39B representa el diámetro (DLS, nm) de LNP GFP y BiTE basadas en DLin-KC3-DMA y la polidispersidad (DLS) de LNP GFP y BiTE basadas en DLin-KC3-DMA antes de la inserción del anticuerpo.

La FIG. 39C representa el % de recuperación de ARN y ARN accesible al colorante en LNP GFP y BiTE basadas en DLin-KC3-DMA antes de la inserción del anticuerpo.

La FIG. 39D representa el tamaño del diámetro Z-promedio (DLS, nm) de LNP de BiTE basadas en DLin-KC3-DMA y polidispersidad (DLS) de LNP de BiTE basadas en DLin-KC3-DMA después de la inserción del anticuerpo (α CD3, 500A2 y α CD8, YTS156.7.7).

La FIG. 40A representa el % de células T murinas primarias vivas transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 40B representa la asociación de LNP Dil en células T CD4 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T Dil+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 40C representa la asociación LNP Dil en células T CD8 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T Dil+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 40D representa la asociación LNP Dil en células T CD4 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; MFI de Dil en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 40E representa la asociación LNP Dil en células T CD8 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; MFI de Dil en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 40F representa la transfección de LNP de GFP en células T CD4 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T GFP+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 40G representa la transfección de LNP de GFP en células T CD8 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T GFP+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 40H representa la transfección de LNP de GFP en células T CD4 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; MFI de GFP en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 40I representa la transfección de LNP de GFP en células T CD8 murinas primarias transfectadas por electroporación, LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5), α CD3 (500A2), y/o α CD8 (YTS156.7.7) basadas en DLin-KC3-DMA; MFI de GFP en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 41A representa la asociación de LNP Dil en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (2.43, YTS156.7.7, o YTS169.4.2.1) (insertadas a 5, 15, o 30 Fab/LNP) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T Dil+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 41B representa la transfección de LNP de GFP en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (2.43, YTS156.7.7, o YTS169.4.2.1) (insertadas a 5, 15, o 30 Fab/LNP) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T GFP+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 41C representa la asociación de LNP Dil en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (2C11, 500A2, o KT3) o α TCR (H57) (insertadas a 5, 15, o 30 Fab/LNP) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T Dil+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 41D representa la transfección de LNP de GFP en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD3 (2C11, 500A2, o KT3) o α TCR (H57) (insertadas a 5, 15, o 30 Fab/LNP) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T GFP+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 41E representa la asociación de LNP Dil en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1) (insertadas a 2.5, 5, 15, o 30 Fab/LNP) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T Dil+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 41F representa la transfección de LNP de GFP en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1) (insertadas a 2.5, 5, 15, o 30 Fab/LNP) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T GFP+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 41G representa el % de Dil en células T murinas transfectadas con diversas LNP de DLIN-KC3-DMA dirigidas a α -CD3/ α -CD8.

La FIG. 41H representa el % de células T murinas GFP+ transfectadas con diversas LNP de DLIN-KC3-DMA dirigidas a α -CD3/ α -CD8.

La FIG. 42A representa la expresión de CD69 en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de células T CD69+ vivas a las 24 horas.

La FIG. 42B representa la secreción de IFN-gamma de células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; Concentración (pg/mL) de IFN-gamma en los sobrenadantes a las 24 horas.

La FIG. 42C representa la secreción de TNF-alfa de células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; Concentración (pg/mL) de TNF-alfa en los sobrenadantes a las 24 horas.

La FIG. 42D representa el fenotipo de células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; CM, memoria central; EM, memoria efectora; SCM, similar a célula madre de T de memoria; Las células se fenotiparon 24 horas después de la transfección.

La FIG. 42E representa los niveles de expresión génica de genes asociados con la activación en células T murinas primarias transfectadas con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; La expresión génica se valoró 24 horas después de la transfección.

La FIG. 43A representa la asociación de LNP Dil de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de Dil+ de células T CD8+ en sangre 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43B representa la asociación de LNP Dil de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de Dil+ de células T CD4+ en sangre 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43C representa la expresión de LNP de mCherry de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de mCherry+ de células T CD8+ en sangre 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43D representa la expresión de LNP de mCherry de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de mCherry+ de células T CD4+ en sangre 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43E representa la asociación de LNP Dil de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de Dil+ de células T CD8+ en bazo 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43F representa la asociación de LNP Dil de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de Dil+ de células T CD4+ en bazo 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43G representa la expresión de LNP de mCherry de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de mCherry+ de células T CD8+ en bazo 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43H representa la expresión de LNP de mCherry de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de mCherry+ de células T CD4+ en bazo 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43I representa la asociación de LNP Dil de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de Dil+ de células T CD8+ en hígado 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43J representa la asociación de LNP Dil de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de Dil+ de células T CD4+ en hígado 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43K representa la expresión de LNP de mCherry de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de mCherry+ de células T CD8+ en hígado 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 43L representa la expresión de LNP de mCherry de células T murinas primarias in vivo tratadas con LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1), α CD8 (YTS156.7.7) y/o α CD3 (500A2) basadas en DLin-KC3-DMA; % de mCherry+ de células T CD4+ en hígado 24 horas después de la inyección intravenosa.

La FIG. 44A representa el % de células CT26 muertas en un experimento de cocultivo de CT26 (línea celular EphA2+) con células T murinas que secretan BiTE generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) que secretan BiTE o expresan Fluc basadas en DLin-KC3-DMA, en un curso de tiempo (0-120 horas).

La FIG. 44B representa el % de células CT26 muertas en un experimento de cocultivo de CT26 (línea celular EphA2+) con células T murinas que secretan BiTE generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y α CD3 (500A2) que secretan BiTE o expresan Fluc basadas en DLin-KC3-DMA, en un curso de tiempo (0-120 horas).

La FIG. 44C representa el % de células CT26 muertas en un experimento de cocultivo de CT26 (línea celular EphA2+) con células T murinas que secretan BiTE generadas usando LNP dirigidas a α CD4 (GK1.5v1) que secretan BiTE o expresan Fluc basadas en DLin-KC3-DMA, en un curso de tiempo (0-120 horas).

La FIG. 44D representa el % de células CT26 muertas en un experimento de cocultivo de CT26 (línea celular EphA2+) con células T murinas que secretan BiTE generadas usando LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) que secretan BiTE o expresan Fluc basadas en DLin-KC3-DMA, en un curso de tiempo (0-120 horas). r500A2, proteína BiTE 500A2/EphA2 recombinante. Fluc, luciferasa de luciérnaga.

La FIG. 45A representa el estudio de eficacia de la inoculación tumoral y el régimen de dosificación de las LNP.

La FIG. 45B representa la eficacia (curva de supervivencia) de ratones tratados con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y α CD3 (500A2) que secretan BiTE basadas en DLin-KC3-DMA.

La FIG. 45C representa el crecimiento tumoral de ratones tratados con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y α CD3 (500A2) que secretan BiTE basadas en DLin-KC3-DMA.

La FIG. 45D representa el crecimiento tumoral de ratones tratados con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y α CD3 (500A2) que no expresan la proteína BiTE, basadas en DLin-KC3-DMA.

La FIG. 45E representa el crecimiento tumoral de ratones tratados con proteína BiTE recombinante.

La FIG. 45F representa el crecimiento tumoral de ratones tratados con Ab de PD-1.

La FIG. 45G representa el crecimiento tumoral de ratones tratados con vehículo.

La FIG. 45H representa el peso corporal en relación con la línea base (%) de ratones tratados con LNP dirigidas a α CD8 (YTS156.7.7) y α CD3 (500A2) que expresan la proteína BiTE, basadas en DLin-KC3-DMA.

La FIG. 46A representa la carga (Potencial zeta, DLS) de LNP de mCherry y CAR basadas en el Lípido 15 en MBS pH 5.5, HBS pH 7.4 antes de la inserción del anticuerpo.

La FIG. 46B representa el diámetro (DLS, nm) de LNP de mCherry y CAR basadas en el Lípido 15 y la polidispersidad (DLS) de LNP de mCherry y CAR basadas en el Lípido 15 antes de la inserción del anticuerpo.

La FIG. 46C representa el % de recuperación de ARN y ARN accesible al colorante en LNP de mCherry y CAR basadas en el Lípido 15 antes de la inserción del anticuerpo.

La FIG. 46D representa el diámetro (DLS, nm) de LNP de mCherry y CAR basadas en el Lípido 15 y la polidispersidad (DLS) de LNP de mCherry y CAR basadas en el Lípido 15 después de la inserción del anticuerpo (α CD8, TRX2 y/o α CD8, Ibalizumab).

La FIG. 47A representa % de células T humanas primarias vivas CD3+, CD4+, y CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD4 (Ibalizumab) y/o α CD8 (TRX2) basadas en el Lípido 15; % de células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 47B representa la expresión de CAR en células T humanas primarias CD3+, CD4+, y CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD4 (Ibalizumab) y/o α CD8 (TRX2) basadas en el Lípido 15 24 horas después de la transfección; MFI de CAR en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 47C representa la expresión de CAR en células T humanas primarias CD3+, CD4+, y CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD4 (Ibalizumab) y/o α CD8 (TRX2) basadas en el Lípido 15 24 horas después de la transfección; % de células T vivas CAR+ a las 24 horas.

La FIG. 47D representa la expresión de mCherry en células T humanas primarias CD3+, CD4+, y CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD4 (Ibalizumab) y/o α CD8 (TRX2) basadas en el Lípido 15 24 horas después de la transfección; MFI de mCherry en células T vivas a las 24 horas.

La FIG. 47E representa la expresión de mCherry en células T humanas primarias CD3+, CD4+, y CD8+ transfectadas con LNP dirigidas a α CD4 (Ibalizumab) y/o α CD8 (TRX2) basadas en el Lípido 15 24 horas después de la transfección; % de mCherry+ en células T vivas a las 24 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona lípidos catiónicos ionizables, conjugados lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes y composiciones de nanopartículas lipídicas que comprenden dichos lípidos catiónicos ionizables y/o conjugados lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes (p. ej., células T), kits médicos que contienen dichos lípidos y/o conjugados, y métodos de fabricación y uso de dichos lípidos y conjugados.

La práctica de la presente invención emplea, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química orgánica, farmacología, biología celular y bioquímica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía, tal como en "Comprehensive Organic Synthesis" (B.M. Trost e I. Fleming, eds., 1991-1992); "Current protocols in molecular biology" (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, y actualizaciones periódicas); y "Current protocols in immunology" (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991), cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Varios aspectos de la invención se exponen a continuación en secciones; sin embargo, los aspectos de la invención descritos en una sección particular no deben limitarse a ninguna sección particular.

I. DEFINICIONES

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación, se definen una serie de términos y frases.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las abreviaturas usadas en la presente memoria tienen su significado convencional dentro de las artes química y biológica. Las estructuras y fórmulas químicas expuestas en la presente memoria deben interpretarse de acuerdo con las reglas estándar de valencia química conocidas en las artes químicas. Además, cuando un grupo químico es un diradical, por ejemplo, se entiende a que los grupos químicos pueden estar unidos a sus átomos adyacentes en el resto de la estructura en una o ambas orientaciones, por ejemplo, -OC(O)- es intercambiable con -C(O)O- o -OC(S)- es intercambiable con -C(S)O-.

Los términos "un" y "una" tal y como se usan en la presente memoria significan "uno o más" e incluyen el plural a no ser que el contexto sea inapropiado. En algunas realizaciones, "uno o más" es 1 o 2. En algunas realizaciones, "uno o más" es 1, 2 o 3. En algunas realizaciones, "uno o más" es 1, 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, "uno o más" es 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, "uno o más" es 1, 2, 3, 4, 5 o más.

El término "alquilo" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un hidrocarburo saturado, recto o ramificado, tal como un grupo recto o ramificado de 1-12, 1-10 o 1-6 átomos de carbono, denominado en la presente memoria alquiloC₁-C₁₂, alquiloC₁-C₁₀, o alquiloC₁-C₆, respectivamente. En algunas realizaciones, el alquilo está opcionalmente sustituido. Los grupos alquilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2-dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butilo, 3,3-dimetil-1-butilo, 2-etil-1-butilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo, etc.

El término "alquilenilo" se refiere a un diradical de un grupo alquilo. En algunas realizaciones, el alquilenilo está opcionalmente sustituido. Un grupo alquilenilo ejemplar es -CH₂CH₂-.

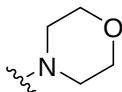
El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con al menos un halógeno. Por ejemplo, -CH₂F, -CHF₂, -CF₃, -CH₂CF₃, -CF₂CF₃, y similares.

"Alquenilo" se refiere a un grupo alquilo insaturado de cadena ramificada o lineal que tiene el número de átomos de carbono indicado (p. ej., 2 a 8, o 2 a 6 átomos de carbono) y al menos un enlace doble carbono-carbono. El grupo puede estar en la configuración cis o trans (configuración Z o E) alrededor del o de los enlaces dobles. Los grupos alquenilo incluyen, pero no se limitan a, etenilo, propenilo (p. ej., prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo (alilo), prop-2-en-2-ilo), y butenilo (p. ej., but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-).

"Alquinilo" se refiere a un grupo alquilo insaturado de cadena ramificada o lineal que tiene el número de átomos de carbono indicado (p. ej., 2 a 8, o 2 a 6 átomos de carbono) y al menos un enlace triple carbono-carbono. Los grupos alquinilo incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propinilo (p. ej., prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo) y butinilo (p. ej., but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo).

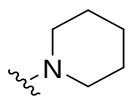
El término "oxo" está reconocido en la técnica y se refiere a un sustituyente "=O". Por ejemplo, un ciclopentano sustituido con un grupo oxo es ciclopentanona.

El término "morfolinilo" se refiere a un sustituyente que tiene la estructura de:



, que está opcionalmente sustituido.

El término "piperidinilo" se refiere a un sustituyente que tiene una estructura de:



, que está opcionalmente sustituido.

En general, el término "sustituido", tanto si va precedido del término "opcionalmente" como si no, significa que uno o más hidrógenos del resto designado se reemplazan por un sustituyente adecuado. A no ser que se indique otra cosa, un grupo "opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede sustituirse con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas en esta invención son preferentemente aquellas que dan lugar a la formación de compuestos estables o químicamente viables. En algunas realizaciones, "opcionalmente sustituido" es equivalente a "no sustituido o sustituido". En algunas realizaciones, "opcionalmente sustituido" indica que el átomo o grupo designado está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de los sustituyentes opcionales proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, el sustituyente opcional puede seleccionarse del grupo que consiste en: alquilo_{C₁₋₆}, ciano, halógeno, -O-alquilo_{C₁₋₆}, haloalquilo_{C₁₋₆}, cicloalquilo_{C₃₋₇}, heterociclilo de 3 a 7 miembros, heteroarilo de 5 a 6 miembros y fenilo. En algunas realizaciones, el sustituyente opcional es alquilo, ciano, halógeno, halo, azida, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, ácido carboxílico, -C(O)alquilo, -CO₂alquilo, carbonilo, carboxilo, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, sulfonamida, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, arilo o heteroarilo. En algunas realizaciones, el sustituyente opcional es -OR^{s1}, -NR^{s2}R^{s3}, -C(O)R^{s4}, -C(O)OR^{s5}, C(O)NR^{s6}R^{s7}, -OC(O)R^{s8}, -OC(O)OR^{s9}, -OC(O)NR^{s10}R^{s11}, -NR^{s12}C(O)R^{s13}, o -NR^{s14}C(O)OR^{s15}, en donde R^{s1}, R^{s2}, R^{s3}, R^{s4}, R^{s5}, R^{s6}, R^{s7}, R^{s8}, R^{s9}, R^{s10}, R^{s11}, R^{s12}, R^{s13}, R^{s14}, y R^{s15} son cada uno independientemente H, alquilo_{C₁₋₆}, cicloalquilo_{C₃₋₁₀}, arilo_{C₆₋₁₄}, heteroarilo de 5 a 10 miembros, o heterociclilo de 3 a 10 miembros, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con al menos un halógeno. Por ejemplo, -CH₂F, -CHF₂, -CF₃, -CH₂CF₃, -CF₂CF₃, y similares.

El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado monovalente saturado cíclico, bicíclico, cíclico con puente (p. ej., adamantilo) o espirocíclico de 3-12, 3-10, 3-8, 4-8 o 4-6 carbonos, denominado en la presente memoria, p. ej., "cicloalquilo_{C₄₋₈}", derivado de un cicloalcano. En algunas realizaciones, el cicloalquilo está opcionalmente sustituido. Los grupos cicloalquilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ciclohexanos, ciclopentanos, ciclobutanos y ciclopropanos. A no ser que se especifique otra cosa, los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos en una o más posiciones del anillo con, por ejemplo, alcanoilo, alcoxi, alquilo, haloalquilo, alquenilo, alquinilo, amido, amidino, amino, arilo, arilalquilo, azido, carbamato, carbonato, carboxi, ciano, cicloalquilo, éster, éter, formilo, halógeno, haloalquilo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxilo, imino, cetona, nitro, fosfato, fosfonato, fosfinato, sulfato, sulfuro, sulfonamido, sulfonilo o tiocarbonilo. En determinadas realizaciones, el grupo cicloalquilo no está sustituido, es decir, no está sustituido.

Los términos "heterociclilo" y "grupo heterocíclico" están reconocidos en la técnica y se refieren a estructuras anulares saturadas, parcialmente insaturadas o aromáticas de 3 a 10 miembros, alternativamente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras anulares incluyen de uno a cuatro heteroátomos, tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunas realizaciones, el heterociclilo está opcionalmente sustituido. El número de átomos de anillo en el grupo heterociclilo puede especificarse usando la nomenclatura C_x-C_x , donde x es un número entero que especifica el número de átomos de anillo. Por ejemplo, un grupo heterociclilo C_3-C_7 se refiere a una estructura anular saturada o parcialmente insaturada de 3 a 7 miembros que contiene de uno a cuatro heteroátomos, tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. La designación " C_3-C_7 " indica que el anillo heterocíclico contiene un total de 3 a 7 átomos de anillo, incluido cualquier heteroátomo que ocupe una posición de átomo de anillo. Un ejemplo de heterociclilo C_3 es aziridinilo. Los heterociclos pueden ser, por ejemplo, sistemas de anillos mono, bi u otros multicíclicos (p. ej., fusionados, espiro, bicíclicos con puente). Un heterociclo puede estar fusionado a uno o más anillos arilos, parcialmente insaturados o saturados. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, biotinilo, cromenilo, dihidrofurilo, dihidroindolilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, ditiazolilo, homopiperidinilo, imidazolidinilo, isoquinolilo, isotiazolidinilo, isooxazolidinilo, morfolinilo, oxolanilo, oxazolidinilo, fenoxantenilo, piperazinilo, piperidinilo, piranilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolidin-2-onilo, pirrolinilo, tetrahidrofurilo, tetrahidroisoquinolilo, tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolilo, tiazolidinilo, tiolanilo, tiomorfolinilo, tiopiranilo, xantenilo, lactonas, lactamas tales como azetidinonas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas y similares. A no ser que se especifique otra cosa, el anillo heterocíclico está opcionalmente sustituido en una o más posiciones con sustituyentes tales como alcanilo, alcoxi, alquilo, alquenilo, alquinilo, amido, amidino, amino, arilo, arilalquilo, azido, carbamato, carbonato, carboxi, ciano, cicloalquilo, éster, éter, formilo, halógeno, haloalquilo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxilo, imino, cetona, nitro, oxo, fosfato, fosfonato, fosfinato, sulfato, sulfuro, sulfonamido, sulfonilo y tiocarbonilo. En determinadas realizaciones, el grupo heterociclilo no está sustituido, es decir, no está sustituido.

El término "arilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo aromático carbocíclico. En algunas realizaciones, el arilo está opcionalmente sustituido. Los grupos arilo representativos incluyen fenilo, naftilo, antracenilo y similares. El término "arilo" incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos carbocíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos son "anillos fusionados"), en donde al menos uno de los anillos es aromático y, p. ej., el otro o los otros anillos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos y/o arilos. A no ser que se especifique otra cosa, el anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con, por ejemplo, halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, ácido carboxílico, $-C(O)$ alquilo, CO_2 alquilo, carbonilo, carboxilo, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, sulfonamida, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, arilo o heteroarilo, $-CF_3$, $-CN$, o similares. En ciertas realizaciones, el anillo aromático está sustituido en una o más posiciones del anillo con halógeno, alquilo, hidroxilo o alcoxilo. En ciertas otras realizaciones, el anillo aromático no está sustituido, es decir, no está sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo arilo es una estructura de anillo de 6 a 10 miembros. En algunas realizaciones, el grupo arilo es un arilo C_6-C_{14} .

El término "heteroarilo" está reconocido en la técnica y se refiere a grupos aromáticos que incluyen al menos un heteroátomo en el anillo. En algunas realizaciones, el heteroarilo está opcionalmente sustituido. En ciertos casos, un grupo heteroarilo contiene 1, 2, 3 o 4 heteroátomos en el anillo. Los ejemplos representativos de grupos heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tiofenilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, triazolilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo y pirimidinilo, y similares. A no ser que se especifique otra cosa, el anillo heteroarilo puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con, por ejemplo, restos de halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, ácido carboxílico, C(O)alquilo, -CO₂alquilo, carbonilo, carboxilo, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, sulfonamida, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, arilo o heteroarilo, -CF₃, -CN, o similares. El término "heteroarilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos son "anillos fusionados") en donde al menos uno de los anillos es heteroaromático, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos y/o arilos. En ciertas realizaciones, el anillo heteroarilo está sustituido en una o más posiciones del anillo con halógeno, alquilo, hidroxilo o alcoxilo. En ciertas otras realizaciones, el anillo heteroarilo no está sustituido, es decir, no está sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo heteroarilo es una estructura de anillo de 5 a 10 miembros, alternativamente una estructura de anillo de 5 a 6 miembros, cuya estructura de anillo incluye 1, 2, 3 o 4 heteroátomos, tales como nitrógeno, oxígeno y azufre.

Los términos "amina" y "amino" están reconocidos en la técnica y se refieren tanto a aminas no sustituidas como sustituidas, p. ej., un resto representado por la fórmula general -N(R¹⁰)(R¹¹), en donde R¹⁰ y R¹¹ representan cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, alquenilo, arilo, aralquilo, o (CH₂)_m-R¹²; o R¹⁰ y R¹¹, tomados junto con el átomo de N al que están unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura de anillo; R¹² representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclo o un policiclo; y m es cero o un número entero en el rango de 1 a 8. En ciertas realizaciones, R¹⁰ y R¹¹ representan cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, o -(CH₂)_m-R¹².

Los términos "alcoxilo" o "alcoxi" están reconocidos en la técnica y se refieren a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical oxígeno unido al mismo. En algunas realizaciones, el alcoxilo está opcionalmente sustituido. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terc-butoxi y similares. Un "éter" son dos hidrocarburos unidos covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que hace que ese alquilo sea un éter es o se parece a un alcoxilo, tal como puede representarse por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo, O-alquinilo, -O-(CH₂)_m-R¹², donde m y R¹² se describen anteriormente. El término "haloalcoxilo" se refiere a un grupo alcoxilo que está sustituido con al menos un halógeno. Por ejemplo, -O-CH₂F, -O-CHF₂, -O-CF₃, y similares. En ciertas realizaciones, el haloalcoxilo es un grupo alcoxilo que está sustituido con al menos un grupo flúor. En ciertas realizaciones, el haloalcoxilo es un grupo alcoxilo que está sustituido con de 1-6, 1-5, 1-4, 2-4 o 3 grupos flúor.

El símbolo " ~~~ " indica un punto de unión.

Los compuestos de la divulgación pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por tanto, existir como estereoisómeros, tales como isómeros geométricos, enantiómeros o diastereómeros. El término "estereoisómeros" cuando se usa en la presente memoria consiste en todos los isómeros geométricos, enantiómeros o diastereómeros. Estos compuestos pueden designarse con los símbolos "R" o "S", dependiendo de la configuración de los sustituyentes alrededor del átomo de carbono estereogénico. La presente invención abarca varios estereoisómeros de estos compuestos y mezclas de los mismos. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros y diastereómeros. Las mezclas de enantiómeros o diastereómeros pueden designarse "(±)" en la nomenclatura, pero el experto reconocerá que una estructura puede denotar un centro quiral implícitamente. Se entiende que las representaciones gráficas de estructuras químicas, p. ej., estructuras químicas genéricas, abarcan todas las formas estereoisoméricas de los compuestos especificados, a no ser que se indique otra cosa.

Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la presente invención pueden prepararse sintéticamente a partir de materiales de partida comercialmente disponibles que contengan centros asimétricos o estereogénicos, o mediante la preparación de mezclas racémicas seguida de métodos de resolución bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos de resolución se ejemplifican mediante (1) unión de una mezcla de enantiómeros a un auxiliar quiral, separación de la mezcla resultante de diastereómeros por recristalización o cromatografía y liberación del producto ópticamente puro a partir del auxiliar, (2) formación de sales empleando un agente de resolución ópticamente activo, o (3) separación directa de la mezcla de enantiómeros ópticos en columnas cromatográficas quirales. Las mezclas estereoisoméricas también pueden resolverse en sus estereoisómeros componentes mediante métodos bien conocidos, tales como cromatografía de gases en fase quiral, cromatografía líquida de alto rendimiento en fase quiral, cristalización del compuesto como complejo salino quiral o cristalización del compuesto en un disolvente quiral. Además, los enantiómeros pueden separarse mediante técnicas de cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) descritas en la bibliografía. Además, los estereoisómeros pueden obtenerse a partir de intermedios, reactivos y catalizadores estereoméricamente puros mediante métodos sintéticos asimétricos bien conocidos.

También pueden existir isómeros geométricos en los compuestos de la presente invención. El símbolo "" denota un enlace que puede ser un enlace simple, doble o triple como se describe en la presente memoria. La presente invención abarca los diversos isómeros geométricos y mezclas de los mismos resultantes de la disposición de los sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono o de la disposición de los sustituyentes alrededor de un anillo carbocíclico. Los sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono se designan como en configuración "Z" o "E", en donde los términos "Z" y "E" se usan de acuerdo con los estándares de la IUPAC. A no ser que se especifique otra cosa, las estructuras que representan dobles enlaces abarcan tanto los isómeros "E" como "Z".

Los sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono pueden denominarse alternativamente "cis" o "trans", donde "cis" representa sustituyentes en el mismo lado del doble enlace y "trans" representa sustituyentes en lados opuestos del doble enlace. La disposición de los sustituyentes alrededor de un anillo carbocíclico se designa como "cis" o "trans". El término "cis" representa

sustituyentes en el mismo lado del plano del anillo y el término "trans" representa sustituyentes en lados opuestos del plano del anillo. Las mezclas de compuestos en donde los sustituyentes están dispuestos tanto en el mismo lado como en lados opuestos del plano del anillo se designan "cis/trans".

La invención también abarca compuestos de la invención marcados isotópicamente que son idénticos a los recitados en la presente memoria, excepto porque uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra normalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , y ^{36}Cl , respectivamente.

Ciertos compuestos divulgados marcados isotópicamente (p. ej., los marcados con ^3H y ^{14}C) son útiles en ensayos de distribución tisular de compuestos y/o sustratos. Los isótopos tritiados (es decir, ^3H) y de carbono-14 (es decir, ^{14}C) son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados, tales como el deuterio (es decir, ^2H), puede ofrecer ciertas ventajas terapéuticas derivadas de una mayor estabilidad metabólica (p. ej., una mayor semivida in vivo o requisitos de dosificación reducidos) y, por tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias. Los compuestos de la invención marcados isotópicamente pueden prepararse generalmente siguiendo procedimientos análogos a los descritos en, p. ej., los Ejemplos de la presente memoria, sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente por un reactivo no marcado isotópicamente.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a organismos que van a ser tratados por los métodos de la presente invención. Dichos organismos son preferentemente mamíferos (p. ej., murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares), y más preferiblemente seres humanos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, que hace que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (p. ej., tales como emulsiones aceite/agua o agua/aceite) y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes, véase Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006.

Como es sabido por los expertos en la técnica, las "sales" de los compuestos de la presente invención pueden derivarse de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos incluyen, pero no se limitan a, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfónico, ácido bencenosulfónico, y similares. Otros ácidos, tales como oxálico, mientras no son en sí mismos farmacéuticamente aceptables, pueden

emplearse en la preparación de sales útiles como intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de bases incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos (p. ej., sodio), hidróxidos de metales alcalinotérreos (p. ej., magnesio), amoníaco y compuestos de fórmula NW_4^+ , en donde W es alquilo C_{1-4} , y similares.

Los ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan a: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flutoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención formando un compuesto con un catión adecuado tal como Na^+ , NH_4^+ , y NW_4^+ (en donde W es un grupo alquilo C_{1-4}), y similares.

Las abreviaturas tal y como se usan en la presente memoria incluyen diisopropiletilamina (DIPEA); 4-dimetilaminopiridina (DMAP); yoduro de tetrabutilamonio (TBAI); 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), cloruro de tetrabutildimetilsililo (TBDMSCl), fluoruro de hidrógeno (HF), fenilo (Ph), bis(trimetilsilil)amina (HMDS), dimetilformamida (DMF); cloruro de metileno (DCM); tetrahidrofurano (THF); cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); espectrometría de masas (MS), detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD), electropulverización (ES)); espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un compuesto (p. ej., un ácido nucleico, p. ej., un ARNm) suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no pretende limitarse a una formulación o vía de administración particular. Puede considerarse que el término cantidad efectiva incluye cantidades terapéuticamente y/o profilácticamente efectivas de un compuesto.

La frase "cantidad terapéuticamente efectiva", tal y como se usa en la presente memoria, significa aquella cantidad de un compuesto (p. ej., un ácido nucleico, p. ej., un ARNm), material o composición que comprende un compuesto (p. ej., un ácido nucleico, p. ej., un ARNm) que es efectiva para producir algún efecto terapéutico deseado en al menos una subpoblación de células en un mamífero, por ejemplo, un ser humano, o un sujeto (p. ej., un sujeto humano) a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

La frase "cantidad profilácticamente efectiva", tal y como se usa en la presente memoria, significa la cantidad de un compuesto (p. ej., un ácido nucleico, p. ej., un ARNm), material o composición que comprende un compuesto (p. ej., un ácido nucleico, p. ej., un ARNm) que es efectiva para producir algún efecto profiláctico deseado en al menos una subpoblación de células en un mamífero, por ejemplo, un ser

humano, o un sujeto (p. ej., un sujeto humano) reduciendo, minimizando o eliminando el riesgo de desarrollar una afección o reduciendo o minimizando la gravedad de una afección a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

5 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" incluyen cualquier efecto, p. ej., disminuir, reducir, modular, mejorar o eliminar, que dé lugar a la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares, o a la mejora de un síntoma de los mismos.

10 La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

15 En la solicitud, cuando se dice que un elemento o componente está incluido en y/o seleccionado de una lista de elementos o componentes citados, debe entenderse que el elemento o componente puede ser uno cualquiera de los elementos o componentes citados, o que el elemento o componente puede seleccionarse de un grupo que consiste en dos o más de los elementos o componentes citados.

20 Además, debe entenderse que los elementos y/o características de una composición o un método descritos en la presente memoria pueden combinarse de diversas maneras sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención, ya se mencione explícita o implícitamente en la presente memoria. Por ejemplo, cuando se hace referencia a un compuesto particular, ese compuesto puede usarse en diversas realizaciones de composiciones de la presente invención y/o en métodos de la presente invención, a no ser que se entienda otra cosa a partir el contexto. En otras palabras, dentro de la presente solicitud, las realizaciones se han descrito y representado de manera que se pueda escribir y dibujar una solicitud clara y concisa, pero se pretende y se apreciará que las realizaciones se pueden combinar o separar de diversas maneras sin apartarse de las presentes enseñanzas e invención(es). Por ejemplo, se apreciará que todas las características descritas y representadas en la presente memoria pueden ser aplicables a todos los aspectos de la(s) invención(es) descrita(s) y representada(s) en la presente memoria.

25 Debe entenderse que la expresión "al menos uno de" incluye individualmente cada uno de los objetos recitados después de la expresión y las diversas combinaciones de dos o más de los objetos recitados, a no ser que se entienda otra cosa a partir del contexto y el uso. Debe entenderse que la expresión "y/o" en relación con tres o más objetos recitados tiene el mismo significado, a no ser que se entienda otra cosa a partir del contexto.

30 El uso del término "incluyen", "incluye", "que incluye", "tienen", "tiene", "que tiene", "contienen", "contiene" o "que contiene", incluidos los equivalentes gramaticales de los mismos, debe entenderse en general como abierto y no limitativo, por ejemplo, sin excluir elementos o etapas adicionales no recitados, a no ser que se indique específicamente otra cosa o se entienda a partir del contexto.

35 Cuando el uso del término "aproximadamente" precede a un valor cuantitativo, la presente invención también incluye el propio valor cuantitativo específico, a no ser que se indique específicamente

otra cosa. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a una variación de $\pm 10\%$ del valor nominal, a no ser que se indique o infiera otra cosa.

Tal y como se usa en la presente memoria, a no ser que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" significa cualquier molécula de unión a antígeno o complejo molecular que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une a o interacciona específicamente con un antígeno particular. Se entiende que el término abarca un anticuerpo intacto (p. ej., un anticuerpo monoclonal intacto), o un fragmento del mismo, tal como un fragmento Fc de un anticuerpo (p. ej., un fragmento Fc de un anticuerpo monoclonal), o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo (p. ej., un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal), incluido un anticuerpo intacto, un fragmento de unión a antígeno o un fragmento Fc que ha sido modificado o preparado por ingeniería. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, anticuerpos de cadena única (p. ej., scFv), minicuerpos y diacuerpos. Los ejemplos de anticuerpos que han sido modificados o diseñados por ingeniería incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos). El término también abarca un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un Nanocuerpo (p. ej., un V_{HH}).

Tal y como se usa aquí, un "anticuerpo que se une a X" (es decir, siendo X un antígeno particular), o "un anticuerpo anti-X", es un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno X.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "enlace disulfuro enterrado entre cadenas" o un "enlace disulfuro entre cadenas enterrado" se refiere a un enlace disulfuro en un polipéptido que no es fácilmente accesible para los agentes reductores solubles en agua, o está efectivamente "enterrado" en las regiones hidrófobas del polipéptido, de tal manera que no está disponible tanto para los agentes reductores como para la conjugación con otros PEG hidrófilos. Los enlaces disulfuro enterrados entre cadenas se describen con más detalle en WO2017096361A1, que se incorpora por referencia en su totalidad.

Tal y como se usa en la presente memoria, la especificidad de la administración dirigida por una LNP se define por la relación entre el % de un tipo de célula inmune deseada que recibe el ácido nucleico administrado (p. ej., administración en la diana) y el % de un tipo de célula inmune no deseada que no está destinada a ser el destino de la administración, pero que recibe el ácido nucleico administrado (p. ej., administración fuera de la diana). Por ejemplo, la especificidad es mayor cuando más células inmunes deseadas reciben el ácido nucleico administrado, mientras que menos células inmunes no deseadas reciben el ácido nucleico administrado. La especificidad de la administración dirigida por una LNP también puede definirse como la relación entre la cantidad de ácido nucleico que se administra a las células inmunes deseadas (p. ej., administración en la diana) y la cantidad de ácido nucleico que se administra a las células inmunes no deseadas (p. ej., administración fuera de la diana). La especificidad de la administración puede determinarse usando cualquier método adecuado. Como ejemplo no limitativo, el nivel de expresión del ácido nucleico en el tipo de célula inmune deseada puede medirse y compararse con el de un tipo de célula inmune diferente que no se pretende que sea el destino de la administración.

Tal y como se usa en la presente memoria, en algunas realizaciones, una LNP de referencia es una LNP que no tiene el grupo de direccionamiento a células inmunes pero que, por lo demás, es igual que la LNP ensayada. En algunas otras realizaciones, una LNP de referencia es una LNP que tiene un lípido catiónico ionizable diferente, pero que por lo demás es igual que la LNP ensayada. En algunas realizaciones, una LNP de referencia comprende D-Lin-MC3-DMA como lípido catiónico ionizable que es diferente del lípido catiónico ionizable en una LNP ensayada, pero por lo demás es igual que la LNP ensayada.

Tal y como se usa en la presente memoria, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que es total o parcialmente de origen no humano y cuya secuencia proteica se ha modificado para reemplazar determinados aminoácidos, por ejemplo, que se producen en la posición o posiciones correspondientes en las regiones marco de los dominios VH y VL en una secuencia de anticuerpo de un ser humano, para aumentar su similitud con los anticuerpos producidos naturalmente en los seres humanos, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmune en los seres humanos. Por ejemplo, usando técnicas de ingeniería genética, los dominios variables de un anticuerpo no humano de interés pueden combinarse con los dominios constantes de anticuerpos humanos. Los dominios constantes de un anticuerpo humanizado son la mayoría de las veces dominios CH y CL humanos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "lípido estructural" se refiere a los esteroides y también a los lípidos que contienen moléculas de esteroles.

Debe entenderse que el orden de las etapas o el orden para realizar ciertas acciones es irrelevante siempre que la presente invención siga siendo operable. Además, pueden realizarse simultáneamente dos o más etapas o acciones.

En varios lugares de la presente memoria descriptiva, los sustituyentes se divulgan en grupos o en rangos. Se pretende específicamente que la descripción incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos y rangos. Por ejemplo, el término "alquilo C₁₋₆" pretende específicamente divulgar individualmente alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₁-C₆, C₁-C₅, C₁-C₄, C₁-C₃, C₁-C₂, C₂-C₆, C₂-C₅, C₂-C₄, C₂-C₃, C₃-C₆, C₃-C₅, C₃-C₄, C₄-C₆, C₄-C₅, y C₅-C₆. A modo de otros ejemplos, un número entero en el rango de 0 a 40 está específicamente destinado a divulgar individualmente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, y 40, y un número entero en el rango de 1 a 20 está específicamente destinado a divulgar individualmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20.

El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o del lenguaje ejemplar en la presente memoria, por ejemplo, "tal como" o "incluyendo", pretende simplemente ilustrar mejor la presente invención y no supone una limitación del alcance de la invención a no ser que se reivindique. Ningún lenguaje de la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de ningún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la presente invención.

A lo largo de la descripción, cuando las composiciones y los kits se describen como que tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, o cuando los procesos y métodos se describen como

que tienen, incluyen o comprenden etapas específicas, se contempla que, además, hay composiciones y kits de la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes recitados, y que hay procesos y métodos según la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento recitadas.

En general, las composiciones que especifican un porcentaje se expresan en peso, a no ser que se especifique otra cosa. Además, si una variable no va acompañada de una definición, entonces prevalecerá la definición anterior de la variable.

Dominio variable único de inmunoglobulina

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes de las LNP descritas en la presente memoria comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un Nanocuerpo.

El término "dominio variable único de inmunoglobulina" (ISV), usado indistintamente con "dominio variable único", define las moléculas de inmunoglobulina en donde el sitio de unión al antígeno está presente en, y formado por, un único dominio de inmunoglobulina. Esto diferencia a los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas "convencionales" (p. ej., anticuerpos monoclonales) o sus fragmentos (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, di-scFv), en donde dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interaccionan para formar un sitio de unión al antígeno. Típicamente, en las inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de V_H y V_L contribuirán al sitio de unión al antígeno, es decir, un total de 6 CDR estarán implicadas en la formación del sitio de unión al antígeno. A la vista de la definición anterior, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo convencional de 4 cadenas (tal como una molécula de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE; conocidos en la técnica) o de un Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv tal como un Fv unido por disulfuro o un fragmento scFv, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivado de dicho anticuerpo convencional de 4 cadenas, normalmente no se consideraría un dominio variable único de inmunoglobulina, ya que, en estos casos, la unión al epítipo respectivo de un antígeno normalmente no se produciría por un (único) dominio de inmunoglobulina, sino por un par de dominios de inmunoglobulina (asociados), tales como los dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par de dominios de inmunoglobulina V_H-V_L, que se unen conjuntamente a un epítipo del antígeno respectivo.

En cambio, los dominios variables únicos de inmunoglobulina son capaces de unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un único dominio V_H, un único dominio V_{HH} o un único dominio V_L. Por lo tanto, el sitio de unión al antígeno de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por no más de tres CDR.

Como tal, el dominio variable único puede ser una secuencia de dominio variable de cadena ligera (p. ej., una secuencia de V_L) o un fragmento adecuado del mismo; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (p. ej., una secuencia de V_H o una secuencia de V_{HH}) o un fragmento

adecuado del mismo; siempre que sea capaz de formar una unidad de unión a antígeno única (es decir, una unidad funcional de unión a antígeno que consista esencialmente en el dominio variable único, de manera que el dominio único de unión a antígeno no necesite interaccionar con otro dominio variable para formar una unidad funcional de unión a antígeno).

Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISV) puede ser, por ejemplo, un ISV de cadena pesada, tal como un V_H , V_{HH} , incluido un V_H camelizado o un V_{HH} humanizado. En una realización, es un V_{HH} , incluido un V_H camelizado o un V_{HH} humanizado. Los ISV de cadena pesada pueden derivarse de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas o de un anticuerpo de cadena pesada.

Por ejemplo, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo de dominio (único) (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para su uso como anticuerpo de dominio único), un "dAb" o dAb (o una secuencia de aminoácidos que sea adecuada para su uso como dAb) o un ISV de Nanobody® (como se define en la presente memoria y que incluye pero no se limita a un V_{HH}); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos.

En particular, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un ISV de Nanobody® (tal como un V_{HH} , incluido un V_{HH} humanizado o un V_H camelizado) o un fragmento adecuado de los mismos. [Nota: Nanobody® es una marca registrada de Ablynx N.V.].

Los "dominios V_{HH} ", también conocidos como V_{HH} , fragmentos de anticuerpos V_{HH} y anticuerpos V_{HH} , se han descrito originalmente como el dominio variable de inmunoglobulina de unión a antígeno de los "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, de los "anticuerpos desprovistos de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman et al. 1993 (Nature 363: 446-448). Se ha elegido el término "dominio V_{HH} " con el fin de distinguir estos dominios variables de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas (a los que se hace referencia en la presente memoria como "dominios V_H ") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas (a los que se hace referencia en la presente memoria como "dominios V_L "). Para una descripción más detallada de los dominios V_{HH} , se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302).

Para los términos "dAb" y "anticuerpo de dominio", se hace referencia, por ejemplo, a Ward et al. 1989 (Nature 341: 544), a Holt et al. 2003 (Trends Biotechnol. 21: 484); así como a, por ejemplo, WO 2004/068820, WO 2006/030220, WO 2006/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. También debe tenerse en cuenta que, aunque menos preferidos en el contexto de la presente invención porque no son de origen mamífero, los dominios variables únicos pueden derivarse de ciertas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados "dominios IgNAR", véase, por ejemplo, WO 2005/18629).

Típicamente, la generación de inmunoglobulinas implica la inmunización de animales de experimentación, la fusión de células productoras de inmunoglobulinas para crear hibridomas y el cribado de las especificidades deseadas. Alternativamente, las inmunoglobulinas pueden generarse mediante el cribado de bibliotecas no estimuladas, inmunes o sintéticas, p. ej., por exposición en fagos.

La generación de secuencias de inmunoglobulinas, tales como VHH, se ha descrito ampliamente en diversas publicaciones, entre las que destacan WO 1994/04678, Hamers-Casterman *et al.* 1993 (Nature 363: 446-448) y Muyldermans *et al.* 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001). En estos métodos, se inmuniza a los camélidos con el antígeno diana con el fin de inducir una
 5 respuesta inmune contra dicho antígeno diana. El repertorio de VHH obtenido de dicha inmunización se criba adicionalmente en busca de VHH que se unan al antígeno diana.

En estos casos, la generación de anticuerpos requiere un antígeno purificado para la inmunización y/o el cribado. Los antígenos pueden purificarse a partir de fuentes naturales, o en el curso de la producción recombinante. La inmunización y/o el cribado de secuencias de inmunoglobulinas
 10 pueden realizarse usando fragmentos peptídicos de dichos antígenos.

En la presente memoria pueden usarse secuencias de inmunoglobulina de distinto origen, que comprende secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, ser humano y camélido. Asimismo, en el método descrito en la presente memoria pueden usarse secuencias totalmente humanas, humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, pueden usarse secuencias de inmunoglobulina de camélido y
 15 secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o anticuerpos de dominio camelizado, p. ej., dAb camelizados como los descritos por Ward *et al.* 1989 (Nature 341: 544), WO 1994/04678, y Davis y Riechmann (1994, Febs Lett., 339:285-290; y 1996, Prot. Eng., 9:531-537). Además, los ISV se fusionan formando una construcción multivalente y/o multiespecífica (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a
 20 Conrath *et al.* 2001 (J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350) así como, por ejemplo, a WO 1996/34103 y WO 1999/23221).

Un " V_{HH} humanizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_{HH} natural, pero que se ha "humanizado", es decir, reemplazando uno o
 25 más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia V_{HH} natural (y en particular en las secuencias marco) por uno o más de los residuos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio V_H de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano (p. ej., indicado anteriormente). Esto puede realizarse de una manera conocida per se, que será clara para el experto en la técnica, por ejemplo, sobre la base de la técnica anterior (p. ej., WO 2008/020079). Una vez más, debe tenerse en cuenta que dichos V_{HH} humanizados pueden obtenerse de
 30 cualquier manera adecuada conocida per se y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VHH natural como material de partida.

Un " V_H camelizado" comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H natural, pero que se ha "camelizado", es decir, reemplazando uno o
 35 más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H natural de un anticuerpo convencional de 4 cadenas por uno o más de los residuos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada (camélido). Esto puede realizarse de una manera conocida per se, que será clara para el experto en la técnica, por ejemplo, sobre la base de la descripción en la técnica anterior (p. ej., Davies y Riechman

1994, FEBS 339: 285; 1995, Biotechnol. 13: 475; 1996, Prot. Eng. 9: 531; y Riechman 1999, J. Immunol. Methods 231: 25). Dichas sustituciones "camelizantes" se insertan en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfaz V_H - V_L , y/o en los denominados residuos distintivos de Camelidae, tal como se definen en la presente memoria (véanse, por ejemplo, WO 1994/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996, supra). En una realización, la secuencia V_H que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar la secuencia V_H camelizada es una secuencia V_H de un mamífero, tal como la secuencia V_H de un ser humano, tal como una secuencia V_{H3} . Sin embargo, debe tenerse en cuenta que dichos V_H camelizados pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida per se y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_H natural como material de partida.

Puede considerarse que la estructura de una secuencia de dominio variable único de inmunoglobulina está comprendida por cuatro regiones marco ("FR"), que se denominan en la técnica y en la presente memoria "Región marco 1" ("FR1"); "Región marco 2" ("FR2"); "Región marco 3" ("FR3"); y "Región marco 4" ("FR4"), respectivamente; regiones marco que están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), denominadas en la técnica y en la presente memoria "Región determinante de la complementariedad 1" ("CDR1"); "Región determinante de la complementariedad 2" ("CDR2"); y "Región determinante de la complementariedad 3" ("CDR3"), respectivamente.

En dicha secuencia de inmunoglobulina, las secuencias marco pueden ser cualquier secuencia marco adecuada, y los ejemplos de secuencias marco adecuadas estarán claros para el experto en la técnica, por ejemplo, sobre la base de los manuales estándar y la divulgación adicional y el estado de la técnica mencionado en la presente memoria.

Las secuencias marco son (una combinación adecuada de) secuencias marco de inmunoglobulina o secuencias marco que se han derivado de secuencias marco de inmunoglobulina (por ejemplo, por humanización o camelización). Por ejemplo, las secuencias marco pueden ser secuencias marco derivadas de un dominio variable de cadena ligera (p. ej., una secuencia V_L) y/o de un dominio variable de cadena pesada (p. ej., una secuencia V_H o una secuencia V_{HH}). En un aspecto particular, las secuencias marco son secuencias marco que se han derivado de una secuencia V_{HH} (en la que dichas secuencias marco pueden opcionalmente haber sido parcial o totalmente humanizadas) o son secuencias V_H convencionales que han sido camelizadas (como se define en la presente memoria).

En particular, las secuencias marco presentes en la secuencia de ISV descrita en la presente memoria pueden contener uno o más de los residuos distintivos (como se definen en la presente memoria), de manera que la secuencia de ISV sea un ISV de Nanobody®, tal como, p. ej., un V_{HH} , incluido un V_{HH} humanizado o un V_H camelizado. Los ejemplos no limitantes de (combinaciones adecuadas de) dichas secuencias marco quedarán claros a partir de la divulgación adicional de la presente memoria.

El número total de residuos de aminoácidos en un dominio V_H y un dominio V_{HH} estará normalmente en el rango de 110 a 120, a menudo entre 112 y 115. No obstante, cabe señalar que

secuencias más pequeñas y más largas también pueden ser adecuadas para los fines descritos en la presente memoria.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los ISV descritos en la presente memoria no están limitados en cuanto al origen de la secuencia de ISV (o de la secuencia de nucleótidos usada para expresarla), ni en cuanto a la forma en que la secuencia de ISV o la secuencia de nucleótidos es (o ha sido) generada u obtenida. Así, las secuencias de ISV pueden ser secuencias naturales (de cualquier especie adecuada) o secuencias sintéticas o semisintéticas. En un aspecto específico pero no limitante, la secuencia de ISV es una secuencia natural (de cualquier especie adecuada) o una secuencia sintética o semisintética, incluyendo, pero no limitada a, secuencias de inmunoglobulina "humanizadas" (como se definen en la presente memoria) (tales como secuencias de inmunoglobulina de ratón o conejo parcial o totalmente humanizadas, y en particular secuencias V_{HH} parcial o totalmente humanizadas), secuencias de inmunoglobulina "camelizadas" (como se definen en la presente memoria) (y en particular secuencias V_H camelizadas), así como ISV que se hayan obtenido mediante técnicas tales como la maduración por afinidad (por ejemplo, partiendo de secuencias de inmunoglobulina sintéticas, aleatorias o naturales), injerto de CDR, recubrimiento en superficie, combinación de fragmentos derivados de diferentes secuencias de inmunoglobulina, ensamblaje por PCR usando cebadores solapados, y técnicas similares para la ingeniería de secuencias de inmunoglobulina bien conocidas por el experto en la técnica; o cualquier combinación adecuada de cualquiera de las anteriores.

De forma similar, las secuencias de nucleótidos pueden ser secuencias de nucleótidos naturales o secuencias sintéticas o semisintéticas, y pueden ser, por ejemplo, secuencias aisladas por PCR a partir de un molde natural adecuado (p. ej., ADN o ARN aislado de una célula), secuencias de nucleótidos que se han aislado de una biblioteca (y, en particular, de una biblioteca de expresión), secuencias de nucleótidos que se han preparado introduciendo mutaciones en una secuencia de nucleótidos natural (usando cualquier técnica adecuada conocida per se, tal como la PCR de emparejamiento erróneo), secuencias de nucleótidos que se han preparado mediante PCR usando cebadores solapados, o secuencias de nucleótidos que se han preparado usando técnicas para la síntesis de ADN conocidas per se.

En general, las ISV de Nanobody® (en particular las secuencias V_{HH} , incluidas las secuencias V_{HH} (parcialmente) humanizadas y las secuencias V_H camelizadas) pueden caracterizarse por la presencia de uno o más "residuos distintivos" (como se describe en la presente memoria) en una o más de las secuencias marco (también como se describe en la presente memoria). Así, en general, un ISV de Nanobody® puede definirse como una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que uno o más de los residuos distintivos son como se definen adicionalmente en la presente memoria.

En particular, un ISV de Nanobody® puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que las secuencias marco son como se definen adicionalmente en la presente memoria.

Más en particular, un ISV de Nanobody® puede ser una secuencia de inmunoglobulina con la estructura (general)

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3, respectivamente, y en la que: uno o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 y 108 según la numeración de Kabat se eligen entre los residuos distintivos mencionados en la **Tabla A** siguiente.

Tabla A: Residuos distintivos en los ISV de Nanobody®

Posición	V _H 3 Humano	Residuos Distintivos
11	L, V; predominantemente L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; preferiblemente L
37	V, I, F; habitualmente V	F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, preferiblemente F ⁽¹⁾ o Y
44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; preferiblemente G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ o Q ⁽³⁾ ; lo más preferiblemente G ⁽²⁾ o Q ⁽³⁾ .
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; preferiblemente L ⁽²⁾ o R ⁽³⁾
47 ⁽⁸⁾	W, Y	F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ o W ⁽²⁾ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; preferiblemente W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ o F ⁽¹⁾
83	R o K; habitualmente R	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; preferiblemente K o R; lo más preferiblemente K
84	A, T, D; predominantemente A	P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; preferiblemente P
103	W	W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; preferiblemente W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; preferiblemente G
108	L, M o T; predominantemente L	Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; preferiblemente Q o L ⁽⁷⁾

Notas:

En particular, pero no exclusivamente, en combinación con KERE (SEQ ID NO: 103) o KQRE (SEQ ID NO: 104) en las posiciones 43-46.

Habitualmente como GLEW (SEQ ID NO: 105) en las posiciones 44-47.

Habitualmente como KERE (SEQ ID NO: 103) o KQRE (SEQ ID NO: 104) en las posiciones 43-46, p. ej., como KEREL (SEQ ID NO: 106), KEREF (SEQ ID NO: 107), KQREL (SEQ ID NO: 108), KQREF (SEQ ID NO: 109), KEREG (SEQ ID NO: 110), KQREW (SEQ ID NO: 111) o KQREG (SEQ ID NO: 112) en las posiciones 43-47. Alternativamente, también son posibles secuencias tales como TERE (SEQ ID NO: 113) (por ejemplo, TEREL (SEQ ID NO: 114)), TQRE (SEQ ID NO: 115) (por ejemplo, TQREL (SEQ ID NO: 116)), KECE (SEQ ID NO: 117) (por ejemplo, KECER (SEQ ID NO: 119)), KQCE (SEQ ID NO: 120) (por ejemplo, KQCEL (SEQ ID NO: 121)), RERE (SEQ ID NO: 122) (por ejemplo, REREG (SEQ ID NO: 123)), RQRE (SEQ ID NO: 124) (por ejemplo, RQREL (SEQ ID NO: 125)), RQREF (SEQ ID NO: 126) o RQREW (SEQ ID NO: 127)), QERE (SEQ ID NO: 128) (por ejemplo, QEREG (SEQ ID NO: 129)), QQRE (SEQ ID NO: 130), (por ejemplo, QQREW (SEQ ID NO: 131)), QQREL (SEQ ID NO: 132) o QQREF (SEQ ID NO: 133)), KGRE (SEQ ID NO: 134) (por ejemplo, KGREG (SEQ ID NO: 135)), KDRE (SEQ ID NO: 136) (por ejemplo, KDREV (SEQ ID NO: 137)). Algunas otras secuencias posibles, pero menos preferidas, incluyen, por ejemplo, DECKL (SEQ ID NO: 138) y NVCEL (SEQ ID NO: 139).

Con ambas GLEW (SEQ ID NO: 105) en las posiciones 44-47 y KERE (SEQ ID NO: 103) o KQRE (SEQ ID NO: 104) en las posiciones 43-46.

Frecuentemente, como KP o EP en las posiciones 83-84 de dominios V_{HH} naturales.

En particular, pero no exclusivamente, en combinación con GLEW (SEQ ID NO: 105) en las posiciones 44-47.

Con la condición de que cuando las posiciones 44-47 son re GLEW (SEQ ID NO: 105), la posición 108 es siempre Q en secuencias V_{HH} (no humanizadas) que también contienen un W en 103.

El grupo GLEW también contiene secuencias similares a GLEW en las posiciones 44-47, tales como, por ejemplo, GVEW (SEQ ID NO: 140), EPEW (SEQ ID NO: 141), GLER (SEQ ID NO: 142), DQEW (SEQ ID NO: 143), DLEW (SEQ ID NO: 144), GIEW (SEQ ID NO: 145), ELEW (SEQ ID NO: 146), GPEW (SEQ ID NO: 147), EWLP (SEQ ID NO: 148), GPER (SEQ ID NO: 149), GLER (SEQ ID NO: 142) y ELEW (SEQ ID NO: 146).

En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina tiene ciertas sustituciones de aminoácidos en las regiones marco eficaces para prevenir o reducir la unión de los denominados "anticuerpos preexistentes" a los polipéptidos. Los ISV en los que (i) el residuo de aminoácido en la posición 112 es uno de K o Q; y/o (ii) el residuo de aminoácido en la posición 89 es T; y/o (iii) el residuo de aminoácido en la posición 89 es L y el residuo de aminoácido en la posición 110 es uno de K o Q; y (iv) en cada uno de los casos (i) a (iii), el aminoácido en la posición 11 es preferiblemente V se han descrito en WO2015/173325.

Polipéptidos

Los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden formar parte de una proteína o polipéptido, que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más (al menos uno) dominios

variables únicos de inmunoglobulina y que puede comprender opcionalmente además una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas unidas opcionalmente mediante uno o más enlazadores adecuados). El término "dominio variable único de inmunoglobulina" también puede englobar dichos polipéptidos. El uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden usarse como unidad de unión en dicha proteína o polipéptido, que puede contener opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales que pueden servir como unidad de unión, para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico de la invención, respectivamente (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen uno o más dominios VHH y su preparación, también se hace referencia a Conrath et al. 2001 (J. Biol. Chem. 276: 7346), así como, por ejemplo, a WO 1996/34103, WO 1999/23221 y WO 2010/115998).

Los polipéptidos pueden comprender o consistir esencialmente en un dominio variable único de inmunoglobulina, como se ha descrito anteriormente. Dichos polipéptidos también se denominan en la presente memoria polipéptidos monovalentes.

El término "multivalente" indica la presencia de múltiples ISV en un polipéptido. En una realización, el polipéptido es "bivalente", es decir, comprende o consiste en dos ISV. En una realización, el polipéptido es "trivalente", es decir, comprende o consiste en tres ISV. En otra realización, el polipéptido es "tetraivalente", es decir, comprende o consiste en cuatro ISV. Así, el polipéptido puede ser "bivalente", "trivalente", "tetraivalente", "pentavalente", "hexavalente", "heptavalente", "octavalente", "noavalente", etc., es decir, el polipéptido comprende o consiste en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, etc., ISV, respectivamente. En una realización, el polipéptido ISV multivalente es trivalente. En otra realización, el polipéptido ISV multivalente es tetraivalente. En otra realización más, el polipéptido ISV multivalente es pentavalente.

En una realización, el polipéptido ISV multivalente también puede ser multiespecífico. El término "multiespecífico" se refiere a la unión a múltiples moléculas diana diferentes (también denominadas antígenos). Así, el polipéptido ISV multivalente puede ser "bienespecífico", "triespecífico", "tetraespecífico", etc., es decir, puede unirse a dos, tres, cuatro, etc., moléculas diana diferentes, respectivamente.

Por ejemplo, el polipéptido puede ser bienespecífico-trivalente, tal como un polipéptido que comprende o consiste en tres ISV, en donde dos ISV se unen a una primera diana y un ISV se une a una segunda diana diferente de la primera diana. En otro ejemplo, el polipéptido puede ser triespecífico-tetraivalente, tal como un polipéptido que comprende o consiste en cuatro ISV, en donde un ISV se une a una primera diana, dos ISV se unen a una segunda diana diferente de la primera diana y un ISV se une a una tercera diana diferente de la primera y la segunda diana. En otro ejemplo más, el polipéptido puede ser triespecífico-pentavalente, tal como un polipéptido que comprende o consiste en cinco ISV, en donde dos ISV se unen a una primera diana, dos ISV se unen a una segunda diana diferente de la primera diana y un ISV se une a una tercera diana diferente de la primera y la segunda diana.

En una realización, el polipéptido ISV multivalente también puede ser multiparatópico. El término "multiparatópico" se refiere a la unión a múltiples epítomos diferentes en las mismas moléculas diana (también denominadas antígenos). Así, el polipéptido ISV multivalente puede ser "biparatópico",

"triparatópico", etc., es decir, puede unirse a dos, tres, etc., epítomos diferentes en las mismas moléculas diana, respectivamente.

En otro aspecto, el polipéptido de la invención que comprende o consiste esencialmente en uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina (o fragmentos adecuados de los mismos), puede comprender además uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales. Dichos grupos, residuos, restos, unidades de unión o secuencias de aminoácidos adicionales pueden o no proporcionar funcionalidad adicional al dominio variable único de inmunoglobulina (y/o al polipéptido en el que está presente) y pueden o no modificar las propiedades del dominio variable único de inmunoglobulina.

Por ejemplo, dichos grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales pueden ser uno o más aminoácidos adicionales, de manera que el compuesto, construcción o polipéptido sea una proteína (de fusión) o polipéptido (de fusión). En un aspecto preferido, pero no limitante, dicho uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales son inmunoglobulinas. Aún más preferiblemente, dicho uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión se eligen del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, aminoácidos que son adecuados para su uso como anticuerpos de dominio, anticuerpos de dominio único, aminoácidos que son adecuados para su uso como anticuerpos de dominio único, "dAb", aminoácidos que son adecuados para su uso como dAb, o Nanocuerpos.

Alternativamente, dichos grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden ser, por ejemplo, grupos químicos, residuos, restos, que pueden o no ser por sí mismos biológica y/o farmacológicamente activos. Por ejemplo, y sin limitación, dichos grupos pueden unirse a uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina para proporcionar un "derivado" del dominio variable único de inmunoglobulina.

En otra realización, dichos residuos adicionales pueden ser efectivos para prevenir o reducir la unión de los denominados "anticuerpos preexistentes" a los polipéptidos. Con este fin, los polipéptidos y construcciones pueden contener una extensión C-terminal (X)_n (SEQ ID NO: 150) (en la que n es de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 (y preferiblemente 1 o 2, tal como 1); y cada X es un residuo de aminoácido (preferiblemente de origen natural) que se elige independientemente, y preferiblemente se elige independientemente del grupo que consiste en alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I), para lo que se hace referencia a WO 2012/175741. Por consiguiente, el polipéptido puede comprender además una extensión C-terminal (X)_n (SEQ ID NO: 151), en la que n es de 1 a 5, tal como 1, 2, 3, 4 o 5, y en la que X es un aminoácido natural, preferiblemente distinto de cisteína.

En los polipéptidos descritos anteriormente, el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina y el uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden unirse directamente entre sí y/o a través de uno o más enlazadores o espaciadores adecuados. Por ejemplo, cuando los uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión son aminoácidos, los enlazadores también pueden ser aminoácidos, de modo que el polipéptido resultante sea una proteína de fusión o un polipéptido de fusión.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "enlazador" denota un péptido que fusiona entre sí dos o más ISV en una única molécula. El uso de enlazadores para conectar dos o más

(poli) péptidos es bien conocido en la técnica. En la Tabla B se muestran enlazadores peptídicos ejemplares adicionales. Una clase de enlazador peptídico usado con frecuencia se conoce como enlazador "Gly-Ser" o "GS". Se trata de enlazadores que consisten esencialmente en residuos de glicina (G) y serina (S), y normalmente comprenden una o más repeticiones de un restos peptídico tal como el resto GGGGS (SEQ ID NO:154) (por ejemplo, que tiene la fórmula (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO: 152) en la que n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más). Algunos ejemplos usados frecuentemente de dichos enlazadores GS son los enlazadores 9GS (GGGSGGGGS, SEQ ID NO: 157), enlazadores 15GS (n=3) y enlazadores 35GS (n=7). Se hace referencia, por ejemplo, a Chen et al. 2013 (Adv. Drug Deliv. Rev. 65(10): 1357-1369) y Klein et al. 2014 (Protein Eng. Des. Sel. 27 (10): 325-330).

Tabla B: Secuencias de enlazadores ("ID" se refiere al SEQ ID NO como se usa en la presente memoria)

Nombre	ID	Secuencia de aminoácidos
Enlazador 3A	153	AAA
Enlazador 5GS	154	GGGGS
Enlazador 7GS	155	SGGSGGS
Enlazador 8GS	156	GGGSGGGS
Enlazador 9GS	157	GGGSGGGGS
Enlazador 10GS	158	GGGSGGGGS
Enlazador 15GS	159	GGGSGGGGS
Enlazador 18GS	160	GGGSGGGGS
Enlazador 20GS	161	GGGSGGGGS
Enlazador 25GS	162	GGGSGGGGS
Enlazador 30GS	163	GGGSGGGGS
Enlazador 35GS	164	GGGSGGGGS
Enlazador 40GS	165	GGGSGGGGS
Bisagra G1	166	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-Bisagra G1	167	GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
Región bisagra larga superior de llama	168	EPKTPKPQAAA
Bisagra G3	169	ELKTPGLDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

En un aspecto, la divulgación también se refiere a dichas secuencias de aminoácidos y/o Nanocuerpos que pueden unirse a y/o están dirigidos contra CD8 y que comprenden secuencias de CDR que son generalmente como se define en la presente memoria, a fragmentos adecuados de los mismos, así como a polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en uno o más de dichos Nanocuerpos y/o fragmentos adecuados. En algún aspecto, la divulgación se refiere a Nanocuerpos con la SEQ ID NO: 77. En particular, la divulgación en algunos aspectos específicos proporciona:

I) secuencias de aminoácidos que están dirigidas contra CD8 y que tienen al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 85 %, tal como un 90 % o 95 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 77;

II) secuencias de aminoácidos que bloquean de forma cruzada la unión de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 a CD8 y/o que compiten con al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77 para unirse a CD8;

Dichas secuencias de aminoácidos pueden ser como se describe adicionalmente en la presente memoria (y pueden ser, por ejemplo, Nanocuerpos); así como polipéptidos de la divulgación que comprenden una o más de dichas secuencias de aminoácidos (que pueden ser como se describe adicionalmente en la presente memoria), y particularmente polipéptidos biespecíficos (o multiespecíficos) como se describe en la presente memoria, y secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas secuencias de aminoácidos y polipéptidos. Dichas secuencias de aminoácidos y polipéptidos no incluyen ningún ligando natural.

En algunas realizaciones, el CD8 se deriva de un animal mamífero, tal como un ser humano. En un aspecto específico, pero no limitante, la divulgación se refiere a una secuencia de aminoácidos dirigida contra CD8, que comprende:

a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77;

b) secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con una SEQ ID NO: 77, o

c) secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 77;

o cualquier combinación adecuada de los mismos.

En algunas realizaciones, se divulga un Nanocuerpo contra CD8, que consiste en 4 regiones marco (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente). En algunas realizaciones, en dicho Nanocuerpo:

(I) CDR1 comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100),

o secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o más de identidad de secuencia con GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100), en la que (1) cualquier sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o (2) dicha secuencia de aminoácidos solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácidos con GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100), en la que

cualquier sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o

dicha secuencia de aminoácidos solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100).

(II) CDR2 comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101),

o secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o más de identidad de secuencia con IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101), en la que (1) cualquier sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o (2) dicha secuencia de aminoácidos solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácidos con IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101), en la que

cualquier sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o dicha secuencia de aminoácidos solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101).

(III) CDR3 comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102),

o secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o más de identidad de secuencia con AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102), en la que (1) cualquier sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o (2) dicha secuencia de aminoácidos solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102);

y/o del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácidos con AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102), en la que

cualquier sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o dicha secuencia de aminoácidos solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102).

Los Nanocuerpos frente a CD8 como se divulga en la presente memoria pueden comprender una, dos o las tres CDR enumeradas explícitamente anteriormente. En algunas realizaciones, el Nanocuerpo frente a CD8 comprende:

CDR1: GSTFSDYG (SEQ ID NO: 100), basado en la designación IMGT;

CDR2: IDWNGEHT (SEQ ID NO: 101), basado en la designación IMGT; y

CDR3: AADALPYTVRKYNY (SEQ ID NO: 102), basado en la designación IMGT.

En los Nanocuerpos de la divulgación que comprenden las combinaciones de CDR mencionadas anteriormente, cada CDR puede reemplazarse por una CDR elegida del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, incluso más preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia con las CDR mencionadas; en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácidos es preferiblemente una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferiblemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con la o las secuencias de aminoácidos anteriores;

y/o se eligen del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que tienen 3, 2 o solo 1 (como se indica en el párrafo anterior) "diferencia(s) de aminoácidos" con la(s) CDR(s) mencionada(s) una de las secuencias de aminoácidos anteriores, en las que:

(1) cualquier sustitución de aminoácidos es preferiblemente una sustitución de aminoácidos conservativa; y/o

(2) dicha secuencia de aminoácidos preferiblemente solo contiene sustituciones de aminoácidos, y ninguna delección o inserción de aminoácidos, en comparación con la o las secuencias de aminoácidos anteriores.

En una realización, el Nanocuerpo frente a CD8 es BDSn:

Secuencia de Nb BDSn anti-CD8 (CDR1, CDR2, CDR3 subrayadas basado en la designación IMGT):

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSDYGVGWFRQAPGKGRFVADIDWNGEHTSYAD
SVKGRFATSRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAADALPYTVRKYNWYWGQGTQVTVSSGGCGGHHH
HHH (SEQ ID NO: 77)

En algunas realizaciones, un Nanocuerpo frente a CD8 de la presente divulgación se une a CD8 con una constante de disociación (KD) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro (M) o menos, y preferiblemente 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro (M) o menos y más preferiblemente 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (M), y/o con una constante de asociación (KA) de al menos 10^7 M⁻¹, preferiblemente de al menos 10^8 M⁻¹, más preferiblemente de al menos 10^9 M⁻¹, tal como al menos 10^{12} M⁻¹; y en particular con una KD inferior a 500 nM, preferiblemente inferior a 200 nM, más preferiblemente inferior a 10 nM, tal como inferior a 500 μM. Los valores de KD y KA del Nanocuerpo de la divulgación frente a vWF pueden determinarse de una manera conocida per se, por ejemplo, usando el ensayo descrito en la presente memoria. Más generalmente, los Nanocuerpos descritos en la presente memoria tienen preferiblemente una constante de disociación con respecto a vWF que es como se describe en este párrafo.

Generalmente, debe señalarse que el término Nanocuerpo, tal y como se usa en la presente memoria en su sentido más amplio, no se limita a una fuente biológica específica o a un método específico de preparación. Por ejemplo, como se expondrá con más detalle a continuación, los Nanocuerpos pueden obtenerse (1) aislando el dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada natural; (2) por expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VHH natural; (3) por "humanización" (como se describe más adelante) de un dominio VHH natural o por expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio VHH humanizado; (4) por "camelización" (como se describe más adelante) de un dominio VH natural de cualquier especie animal, en particular de una especie de mamífero, tal como de ser humano, o por expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio VH camelizado; (5) por "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "Dab" como se describe por Ward et al (supra), o por expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio VH camelizado; (6) usando

técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos; (7) por preparación de un ácido nucleico que codifica un Nanocuerpo usando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos, seguido de la expresión del ácido nucleico así obtenido; y/o (8) por cualquier combinación de las anteriores. Los métodos y técnicas adecuados para llevar a cabo lo anterior serán evidentes para el experto en la técnica basándose en la divulgación de la presente memoria y, por ejemplo, incluyen los métodos y técnicas descritos con más detalle a continuación en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los Nanocuerpos frente a CD8 de la presente divulgación no tienen una secuencia de aminoácidos que sea exactamente la misma que (es decir, con un grado de identidad de secuencia del 100 % con) la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural, tal como la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural de un mamífero, y en particular de un ser humano.

Una clase de Nanocuerpos frente a CD8 de la divulgación comprende Nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH natural, pero que se ha "humanizado", es decir, reemplazando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia VHH natural por uno o más residuos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo convencional de 4 cadenas de un ser humano (p. ej., los indicados anteriormente). Debe señalarse que dichos Nanocuerpos frente a CD8 humanizados de la presente divulgación pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida per se (es decir, como se indica en los puntos (1)-(8) anteriores) y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se hayan obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VHH natural como material de partida.

Otra clase de Nanocuerpos frente a CD8 de la presente divulgación comprende Nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural que se ha "camelizado", es decir, reemplazando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH natural de un anticuerpo convencional de 4 cadenas por uno o más de los residuos de aminoácidos que se encuentran en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada. Esto puede realizarse de una manera conocida per se, que será clara para el experto en la técnica, por ejemplo, sobre la base de la descripción posterior. También se hace referencia a WO 94/04678. Dicha camelización puede producirse preferentemente en posiciones de aminoácidos que están presentes en la interfaz VH-VL y en los denominados residuos distintivos de Camelidae (véase también, por ejemplo, WO 94/04678), como también se menciona a continuación. En algunas realizaciones, el dominio o secuencia VH que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el Nanocuerpo camelizado es una secuencia VH de un mamífero, p. ej., la secuencia VH de un ser humano. Debe señalarse que dichos Nanocuerpos camelizados de la presente divulgación pueden obtenerse de cualquier manera adecuada conocida per se y, por lo tanto, no están estrictamente limitados a polipéptidos que se hayan obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VH natural como material de partida.

Por ejemplo, tanto la "humanización" como la "camelización" pueden llevarse a cabo proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifique dicho dominio VHH o dominio VH natural, respectivamente, y luego cambiando, de una manera conocida per se, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifique un Nanocuerpo humanizado o camelizado de la presente divulgación, respectivamente, y luego expresando la secuencia de nucleótidos así obtenida de una manera conocida per se para proporcionar el Nanocuerpo deseado. Alternativamente, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH o dominio VH natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos del Nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la presente divulgación, respectivamente, puede diseñarse y luego sintetizarse de novo usando técnicas de síntesis de péptidos conocidas per se. Asimismo, basándose en la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos de un dominio VHH o dominio VH natural, respectivamente, puede diseñarse una secuencia de nucleótidos que codifique el Nanocuerpo humanizado o camelizado deseado y luego sintetizarse de novo usando técnicas de síntesis de ácidos nucleicos conocidas per se, tras lo cual la secuencia de nucleótidos así obtenida puede expresarse de una manera conocida per se para proporcionar el Nanocuerpo deseado.

Otras formas y técnicas adecuadas para obtener Nanocuerpos y/o secuencias de nucleótidos y/o ácidos nucleicos que codifican los mismos, partiendo de (la secuencia de aminoácidos de) dominios VH naturales o preferiblemente dominios VHH y/o de secuencias de nucleótidos y/o secuencias de ácidos nucleicos que codifican los mismos serán claras para el experto en la técnica, y pueden, por ejemplo, comprender la combinación de una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos de dominios VH naturales (tales como una o más FR y/o CDR) con una o más secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos de dominios VHH naturales (tales como una o más FR o CDR), de una manera adecuada para proporcionar (una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica) un Nanocuerpo. También se proporcionan compuestos y construcciones, y en particular proteínas y polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos y/o Nanocuerpo de la divulgación (o fragmentos adecuados de la misma), y opcionalmente comprenden además uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales. En algunas realizaciones, dichos grupos, residuos, restos, unidades de unión o secuencias de aminoácidos adicionales pueden o no proporcionar funcionalidad adicional a la secuencia de aminoácidos y/o al Nanocuerpo (y/o al compuesto o construcción en el que está presente) y pueden o no modificar las propiedades de la secuencia de aminoácidos y/o del Nanocuerpo.

La divulgación también abarca cualquier polipéptido de la presente divulgación que ha sido glicosilado en una o más posiciones de aminoácidos, dependiendo habitualmente del huésped usado para expresar el polipéptido. Un polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos de un Nanocuerpo frente a CD8 de la presente divulgación, que está fusionado en su extremo amino terminal, en su extremo carboxi terminal, o tanto en su extremo amino terminal como en su extremo carboxi terminal, con al menos una secuencia de aminoácidos adicional. Dicha secuencia de aminoácidos adicional puede comprender al menos un Nanocuerpo adicional, para proporcionar un polipéptido que

comprende al menos dos, tal como tres, cuatro o cinco, Nanocuerpos, en los que dichos Nanocuerpos pueden estar opcionalmente unidos a través de una o más secuencias enlazadoras (como se definen en la presente memoria). Los polipéptidos que comprenden el Nanocuerpo frente a CD8 de la presente divulgación y uno o más de otros Nanocuerpos son polipéptidos multivalentes. En un polipéptido multivalente, los dos o más Nanocuerpos pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, los dos o más Nanocuerpos en un polipéptido multivalente:

pueden estar dirigidos frente al mismo antígeno, es decir, frente a las mismas partes o epítomos de dicho antígeno o frente a dos o más partes o epítomos diferentes de dicho antígeno; y/o:

pueden estar dirigidos frente a los diferentes antígenos;

o una combinación de los mismos.

Así, un polipéptido bivalente, por ejemplo:

puede comprender dos Nanocuerpos idénticos;

puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido frente a una primera parte o epítomo de un antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido frente a la misma parte o epítomo de dicho antígeno o frente a otra parte o epítomo de dicho antígeno;

o puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido frente a un primer antígeno y un segundo Nanocuerpo dirigido frente a un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno;

mientras que un Polipéptido trivalente de la Invención, por ejemplo:

puede comprender tres Nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos frente a las mismas o diferentes partes o epítomos del mismo antígeno;

puede comprender dos Nanocuerpos idénticos o diferentes dirigidos frente a las mismas o diferentes partes o epítomos de un primer antígeno y un tercer Nanocuerpo dirigido frente a un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno; o

puede comprender un primer Nanocuerpo dirigido frente a un primer antígeno, un segundo Nanocuerpo dirigido frente a un segundo antígeno diferente de dicho primer antígeno, y un tercer Nanocuerpo dirigido frente a un tercer antígeno diferente de dicho primer y segundo antígeno.

Los Nanocuerpos y polipéptidos frente a CD8 como se divulga en la presente memoria también pueden introducirse y expresarse en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo, con fines profilácticos y/o terapéuticos (p. ej., como terapia génica). Con este fin, las secuencias de nucleótidos que codifican los Nanocuerpos frente a CD8 o los polipéptidos como se divulga en la presente memoria pueden introducirse en las células o tejidos de cualquier forma adecuada, por ejemplo, como tales (p. ej., usando liposomas) o después de haber sido insertados en un vector de terapia génica adecuado (por ejemplo, derivado de retrovirus tal como adenovirus, o parvovirus tal como el virus adenoasociado). Como también estará claro para el experto en la técnica, dicha terapia génica puede realizarse in vivo y/o in situ en el cuerpo de un paciente administrando un ácido nucleico de la invención o un vector de terapia génica adecuado que codifique el mismo al paciente o a células específicas o a un tejido u órgano específico del paciente; o células adecuadas (a menudo tomadas del cuerpo del paciente a tratar, tales como linfocitos explantados, aspirados de médula ósea o biopsias de

tejido) pueden tratarse in vitro con una secuencia de nucleótidos de la invención y luego (re)introducirse adecuadamente en el cuerpo del paciente. Todo esto puede llevarse a cabo usando vectores de terapia génica, técnicas y sistemas de administración que son bien conocidos por el experto en la técnica, por Culver, K. W., "Gene Therapy", 1994, p. xii, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, Nueva York, N.Y.).

5 Giordano, Nature F Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Verma, Nature 389 (1994), 239; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodera, Blood 91; (1998), 30-36; Verma, Gene Ther. 5 (1998), 692-699; Nabel, Ann. N.Y. Acad. Sci.: 811 (1997), 289-292; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-51; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, Pat. de EE. UU. No. 10 5.580.859; 1 Pat. de EE. UU. No. 5.589.5466; o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640. Por ejemplo, se ha descrito en la técnica la expresión in situ de fragmentos ScFv (Afanasieva et al., Gene Ther., 10, 1850-1859 (2003)) y de diacuerpos (Blanco et al., J. Immunol, 171, 1070-1077 (2003)).

Por consiguiente, también se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican los Nanocuerpos frente a CD8 como se describe en la presente memoria, y construcciones de expresión y 15 células huésped que comprenden la secuencia de ácido nucleico.

También se divulgan métodos de uso de los Nanocuerpos frente a CD8 y los polipéptidos de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un Nanocuerpo frente a CD8 puede usarse en las nanopartículas lipídicas de la presente divulgación para administrar un ácido nucleico a una 20 célula inmune, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, los Nanocuerpos frente a CD8 y los polipéptidos de la presente divulgación pueden usarse para tratar una afección o una enfermedad en un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, dichas afecciones o enfermedades incluyen, pero no se limitan a, cáncer, infecciones, trastornos inmunes, enfermedades autoinmunes.

En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un Nanocuerpo frente a CD8 puede 25 usarse en un agente de imagenología. En algunas realizaciones, el agente de imagenología permite la detección de CD8 humano, que es un biomarcador específico que se encuentra en la superficie de un subconjunto de células T para la imagenología de diagnóstico del sistema inmune. La imagenología de CD8 permite la detección in vivo de la localización de las células T. Los cambios en la localización de las células T pueden reflejar la progresión de una respuesta inmune y pueden producirse a lo largo del 30 tiempo como resultado de diversos tratamientos terapéuticos o incluso estados de enfermedad. En algunas realizaciones, se usa para obtener imágenes de la localización de células T para inmunoterapia.

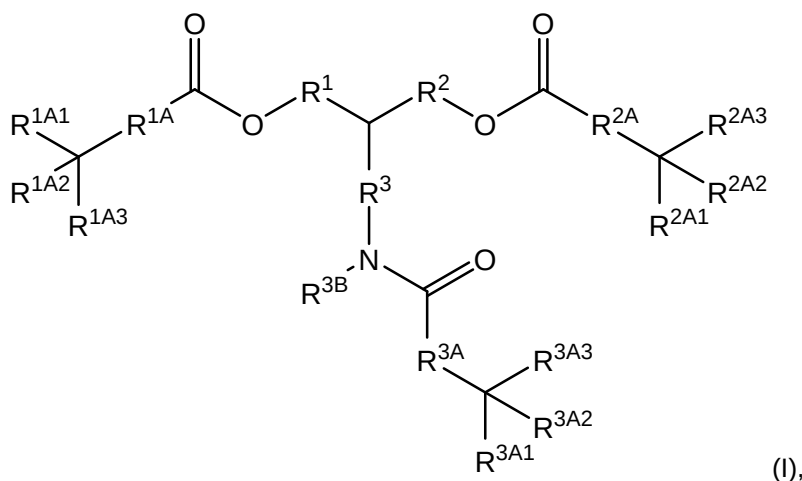
Además, CD8 desempeña un papel en la activación de vías de señalización aguas abajo que son importantes para la activación de células T citolíticas que funcionan para eliminar patógenos virales y proporcionar inmunidad a los tumores. Las células T positivas para CD8 pueden reconocer péptidos 35 cortos presentados dentro de la proteína MHCI de las células presentadoras de antígenos. En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un Nanocuerpo frente a CD8 puede potenciar la señalización a través del receptor de células T y mejorar la capacidad de un sujeto para eliminar

patógenos virales y responder a antígenos tumorales. Así, en algunas realizaciones, las construcciones de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria pueden ser agonistas y activar la diana CD8.

II. LÍPIDOS CATIÓNICOS IONIZABLES

En la presente memoria se proporcionan lípidos catiónicos ionizables que pueden usarse para producir composiciones de nanopartículas lipídicas que facilitan la administración de una carga útil (p. ej., un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN, tal como un ARNm) dispuesta en ellas a células, p. ej., células de mamíferos, p. ej., células inmunes. Los lípidos catiónicos ionizables se han diseñado para permitir la administración intracelular de un ácido nucleico, p. ej., ARNm, al compartimento citosólico de un tipo de célula diana y degradarse rápidamente en componentes no tóxicos. Las funcionalidades complejas de los lípidos catiónicos ionizables se ven facilitadas por la interacción entre la química y la geometría del grupo de cabeza del lípido ionizable, los grupos "de cola acilo" hidrófobos y los enlaces que conectan el grupo de cabeza y los grupos de cola acilo. Típicamente, el pK_a del grupo de cabeza de amina ionizable se diseña para que esté en el rango de 6-8, tal como entre 6.2-7.4, o entre 6.7-7.2, de modo que permanezca fuertemente catiónico en condiciones de formulación ácidas (p. ej., pH 4 - pH 5.5), neutro o ligeramente aniónico en pH fisiológico (7.4) y catiónico en los compartimentos endosomales temprano y tardío (p. ej., pH 5.5 - pH 7). Los grupos de cola acilo desempeñan un papel clave en la fusión de la nanopartícula lipídica con las membranas endosomales y en la desestabilización de la membrana a través de la perturbación estructural. Se cree que la estructura tridimensional de la cola de acilo (determinada por su longitud y el grado y lugar de insaturación), junto con los tamaños relativos del grupo de cabeza y el grupo de cola, desempeñan un papel en la promoción de la fusión de membranas y, por tanto, en el escape endosomal de la nanopartícula lipídica (un requisito clave para la administración citosólica de una carga útil de ácido nucleico). El enlazador que conecta el grupo de cabeza y los grupos acilo de cola está diseñado para degradarse por enzimas fisiológicamente prevalentes (p. ej., esterazas o proteasas) o por hidrólisis catalizada por ácidos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula (I):



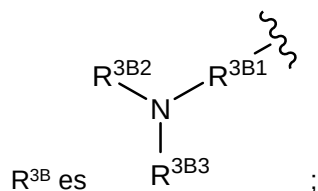
o una sal del mismo, en donde:

R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-3} ;

R^{1A} , R^{2A} y R^{3A} son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-10} ;

R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-20} , alquenilo C_{1-20} , $-(CH_2)_{0-10}C(O)OR^{a1}$, o $-(CH_2)_{0-10}OC(O)R^{a2}$;

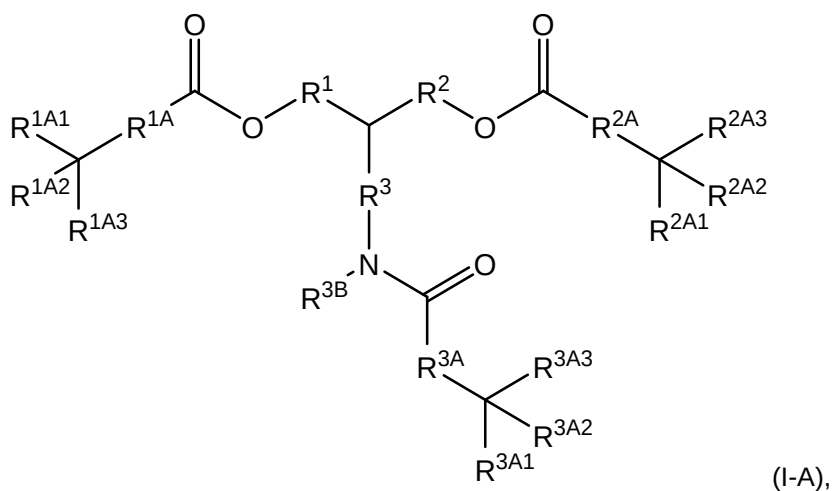
R^{a1} y R^{a2} son cada uno independientemente alquilo C_{1-20} o alquenilo C_{1-20} ;



R^{3B1} es alquileo C_{1-6} ; y

R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} .

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula (I-A):



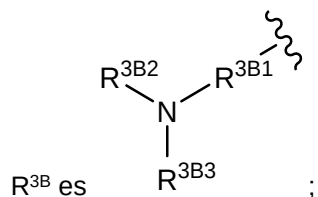
o una sal del mismo, en donde:

R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-3} ;

R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-10} ;

R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-20} , alquenilo C_{1-20} , $-(CH_2)_{0-10}C(O)OR^{a1}$, o $-(CH_2)_{0-10}OC(O)R^{a2}$;

R^{a1} y R^{a2} son cada uno independientemente alquilo C_{1-20} o alquenilo C_{1-20} ;



R^{3B1} es alquileo C_{1-6} ; y

R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-6} no sustituido, o alquilo C_{1-6} sustituido con uno o más sustituyentes cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en -OH y -O-(alquilo C_{1-6}).

Cualquiera de las variables o sustituyentes proporcionados en la presente memoria está sin
 5 sustituir o sustituido con uno o más sustituyentes. En algunas realizaciones, cualquiera de las variables o sustituyentes proporcionados en la presente memoria está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, cualquiera de las variables o sustituyentes proporcionados en la presente memoria está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que
 10 consiste en $-OR^{s1}$, $-NR^{s2}R^{s3}$, $-C(O)R^{s4}$, $-C(O)OR^{s5}$, $C(O)NR^{s6}R^{s7}$, $-OC(O)R^{s8}$, $-OC(O)OR^{s9}$, $-OC(O)NR^{s10}R^{s11}$, $-NR^{s12}C(O)R^{s13}$, y $-NR^{s14}C(O)OR^{s15}$, en donde R^{s1} , R^{s2} , R^{s3} , R^{s4} , R^{s5} , R^{s6} , R^{s7} , R^{s8} , R^{s9} , R^{s10} , R^{s11} , R^{s12} , R^{s13} , R^{s14} , y R^{s15} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-10} , arilo C_{6-14} , heteroarilo de 5 a 10 miembros, o heterociclilo de 3 a 10 miembros, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un enlace o alquileo
 15 C_{1-3} . En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un enlace o metileno. En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son cada uno metileno y R^3 es un enlace. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno metileno. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , y R^3 están cada uno independientemente no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , y R^3 no están sustituidos.

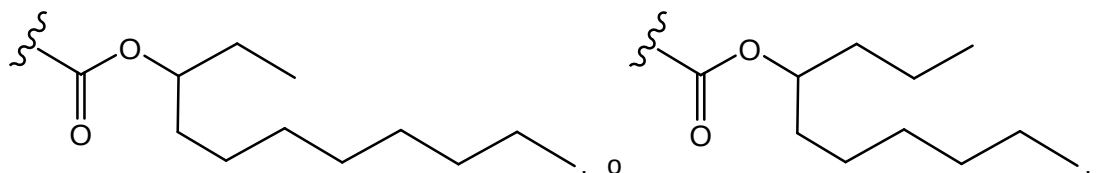
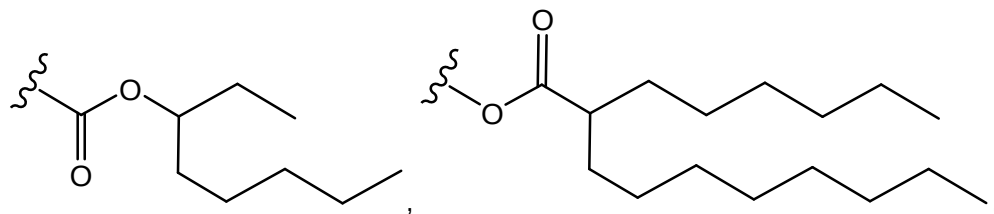
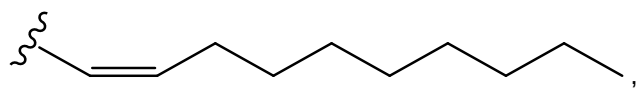
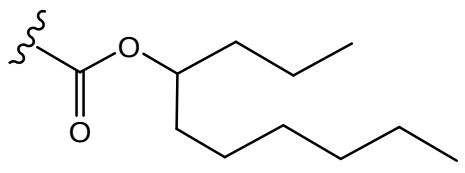
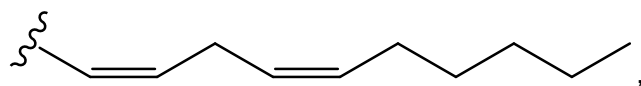
En algunas realizaciones, R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} son cada uno independientemente un enlace o alquileo
 20 C_{1-10} . En algunas realizaciones, R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} son cada uno independientemente un enlace o $-(CH_2)_{1-10}$. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno independientemente un enlace, $-CH_2$, $-(CH_2)_2$, $-(CH_2)_3$, $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_5$, $-(CH_2)_6$, $-(CH_2)_7$, o $-(CH_2)_8$. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno un enlace, cada uno $-CH_2$, cada uno $-(CH_2)_2$, cada uno $-(CH_2)_3$, cada uno $-(CH_2)_4$, cada uno $-(CH_2)_5$, cada uno $-(CH_2)_6$, cada uno $-(CH_2)_7$, o cada uno $-(CH_2)_8$. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada
 25 uno independientemente un enlace, $-(CH_2)_2$, $-(CH_2)_4$, $-(CH_2)_6$, $-(CH_2)_7$, o $-(CH_2)_8$. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno un enlace, cada uno $-(CH_2)_2$, cada uno $-(CH_2)_4$, cada uno $-(CH_2)_6$, cada uno $-(CH_2)_7$, o cada uno $-(CH_2)_8$. En algunas realizaciones, R^{3A} es un enlace, $-CH_2$, $-(CH_2)_2$, o $-(CH_2)_7$. En algunas realizaciones, R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} están cada uno independientemente no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} no están sustituidos.

En algunas realizaciones, R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno
 30 independientemente H, alquilo C_{1-20} , alquienilo C_{1-20} , $-(CH_2)_{0-10}C(O)OR^{a1}$, o $-(CH_2)_{0-10}OC(O)R^{a2}$. En algunas realizaciones, R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-15} , $-CH=CH$ -(alquilo C_{1-15}), $-CH=CH-CH_2-CH=CH$ -(alquilo C_{1-10}), $(CH_2)_{0-4}C(O)OCH$ -(alquilo C_{1-10})-(alquilo C_{1-15}), $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH$ -(alquilo C_{1-10})-(alquilo C_{1-15}), $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2$ -(alquilo C_{1-15}), o $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2$ -(alquilo C_{1-15}). En algunas realizaciones, R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , R^{3A3} , R^1 , R^2 , R^3 , R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} están cada uno independientemente no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , R^{3A3} , R^1 , R^2 , R^3 , R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} están cada uno no sustituido. En algunas realizaciones, R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} ,

R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} están cada uno independientemente no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} están cada uno no sustituido. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , R^3 , R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} están cada uno independientemente no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , R^3 , R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} están cada uno no sustituido. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 , y R^3 están cada uno no sustituido.

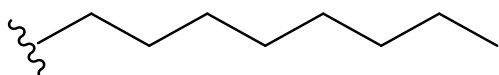
En algunas realizaciones, R^{3B1} no está sustituido. En algunas realizaciones, R^{3B1} no está sustituido con oxo.

En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno independientemente $-\text{CH}=\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-15})$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-10})$, $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$, o $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$; y R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A2} , y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno $-\text{CH}=\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-15})$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-10})$, $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$, o $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$; y R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A2} , y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno

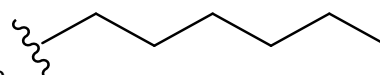


En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno $-\text{CH}=\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-15})$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-10})$, $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$, o $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$. En algunas realizaciones, R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A2} , y R^{2A3} son cada uno H.

En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno alquilo C_{1-15} ; R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno alquilo C_{1-15} ; y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno



; y R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno



En algunas realizaciones, R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno un enlace.

En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2$ (alquilo C_{1-15}); R^{2A1} y R^{2A2} son cada uno $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-15}); y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones,

5 R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno  y R^{2A1} y R^{2A2} son cada uno

10  En algunas realizaciones, R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones R^{1A} y R^{2A} son cada uno un enlace.

En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno $-C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-15})$; R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-15})$; y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A1}

15

y R^{2A1} son cada uno



; y R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno

 . En algunas realizaciones, R^{1A1} y

20

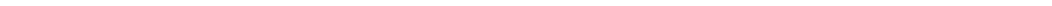
R^{2A1} son cada uno ; y R^{2A1} y R^{2A2} son cada uno

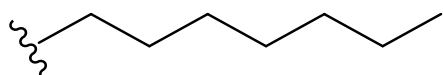
25

. En algunas realizaciones, R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno un enlace.

En algunas realizaciones, R^{3A1}, R^{3A2}, y R^{3A3} son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₅, -
 30 (CH₂)₀₋₄C(O)OCH(alquilo C₁₋₅)(alquilo C₁₋₁₀), -(CH₂)₀₋₄OC(O)CH(alquilo C₁₋₅)(alquilo C₁₋₁₀), -(CH₂)₀₋₄C(O)OCH₂(alquilo C₁₋₁₀), o -(CH₂)₀₋₄OC(O)CH₂(alquilo C₁₋₁₀).

En algunas realizaciones, R^{3A1} y R^{3A2} son cada uno independientemente alquilo C_{1-15} ; y R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A1} y R^{3A2} son cada uno independientemente etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, o heptilo. En algunas realizaciones, R^{3A1} y R^{3A2} son cada uno independientemente etilo,

35 



. En algunas realizaciones, R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A} es un enlace.

En algunas realizaciones, R^{3A1} es alquilo C_{1-15} ; y R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno H. En algunas

realizaciones, R^{3A1} es . En algunas realizaciones, R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{3A} es un enlace.

En algunas realizaciones, R^{3A1} es $-C(O)OCH(\text{alquilo } C_{1-5})(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A2} y R^{3A3} son cada

uno H. En algunas realizaciones, R^{3A1} es o

. En algunas realizaciones, R^{3A1} es

. En algunas realizaciones, R^{3A} es etileno o $-(CH_2)_2-$. En algunas realizaciones, R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno H.

En algunas realizaciones, R^{3A1} es $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; R^{3A2} es $-(CH_2)_0$.

$_4(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A1} es o

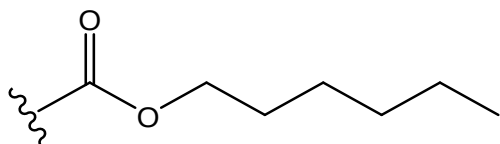
; y R^{3A2} es . En

algunas realizaciones, R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A} es un enlace.

En algunas realizaciones, R^{3A1} es $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; R^{3A2} es $-(CH_2)_0$.

$_4C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A1} es

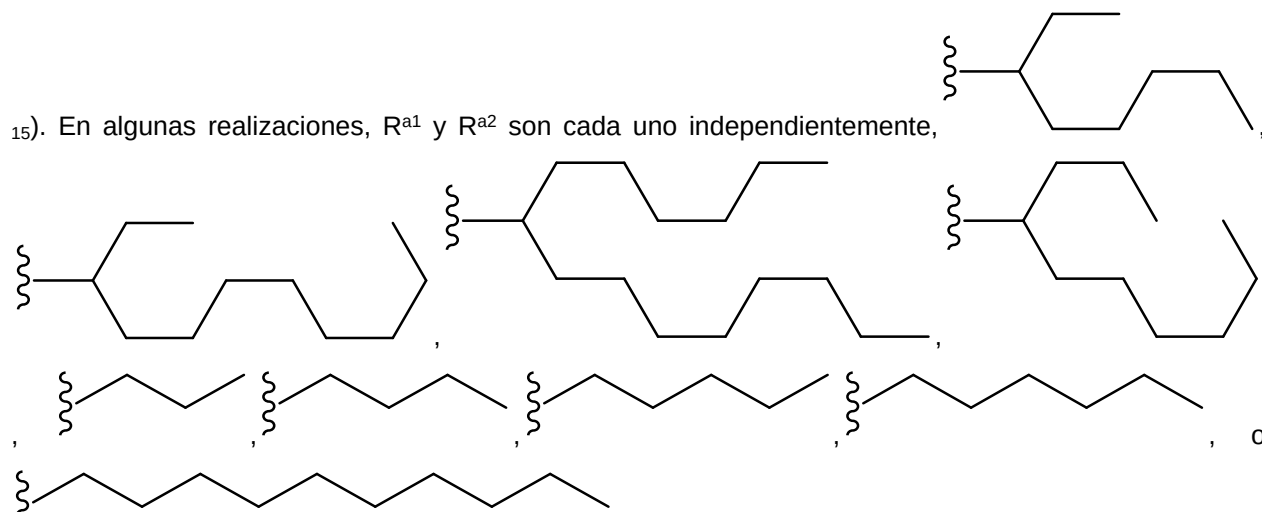
; y R^{3A2} es o



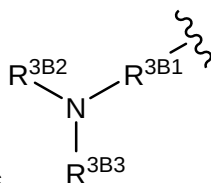
. En algunas realizaciones, R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A} es un enlace.

En algunas realizaciones, R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno H.

R^{a1} y R^{a2} son cada uno independientemente alquilo C_{1-20} o alquenilo C_{1-20} . En algunas realizaciones, R^{a1} y R^{a2} son cada uno independientemente $-(CH_2)_{0-15}CH_3$ o $-CH(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$.



, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^{a1} y R^{a2} están cada uno independientemente no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^{a1} y R^{a2} no están sustituidos.



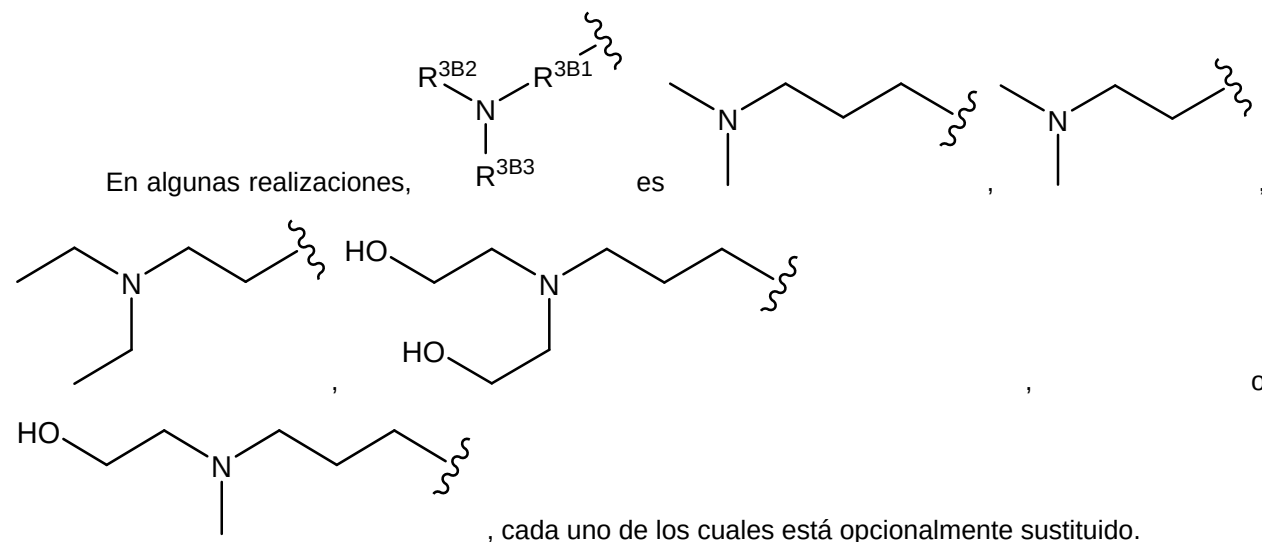
En algunas realizaciones, R^{3B} es R^{3B3} . En algunas realizaciones, R^{3B} es H. En algunas realizaciones, R^{3B} está no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^{3B} no está sustituido.

En algunas realizaciones, R^{3B1} es alquileo C_{1-6} . En algunas realizaciones, R^{3B1} es etileno o propileno. En algunas realizaciones, R^{3B1} está no sustituido o sustituido. En algunas realizaciones, R^{3B1} está opcionalmente sustituido.

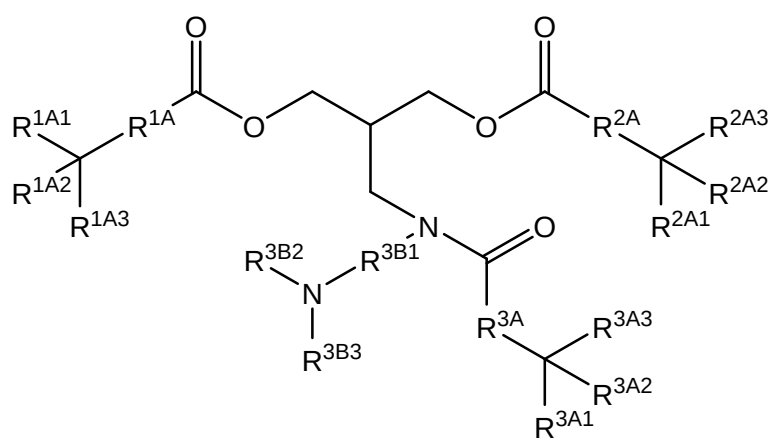
En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} están cada uno independientemente y opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste en $-OH$ y $-O-(\text{alquilo } C_{1-6})$. En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en $-OR^{s1}$, $-NR^{s2}R^{s3}$, $-C(O)R^{s4}$, $-C(O)OR^{s5}$, $C(O)NR^{s6}R^{s7}$, -

OC(O)R^{s8},

-OC(O)OR^{s9}, -OC(O)NR^{s10}R^{s11}, -NR^{s12}C(O)R^{s13}, y -NR^{s14}C(O)OR^{s15}, en donde R^{s1}, R^{s2}, R^{s3}, R^{s4}, R^{s5}, R^{s6}, R^{s7}, R^{s8}, R^{s9}, R^{s10}, R^{s11}, R^{s12}, R^{s13}, R^{s14}, y R^{s15} son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₁₀, arilo C₆₋₁₄, heteroarilo de 5 a 10 miembros, o heterociclilo de 3 a 10 miembros, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H, metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados cada uno independientemente del grupo que consiste en -OH y -O-(alquilo C₁₋₆). En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente metilo o etilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más -OH. En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno metilo o cada uno etilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más -OH. En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno metilo no sustituido.

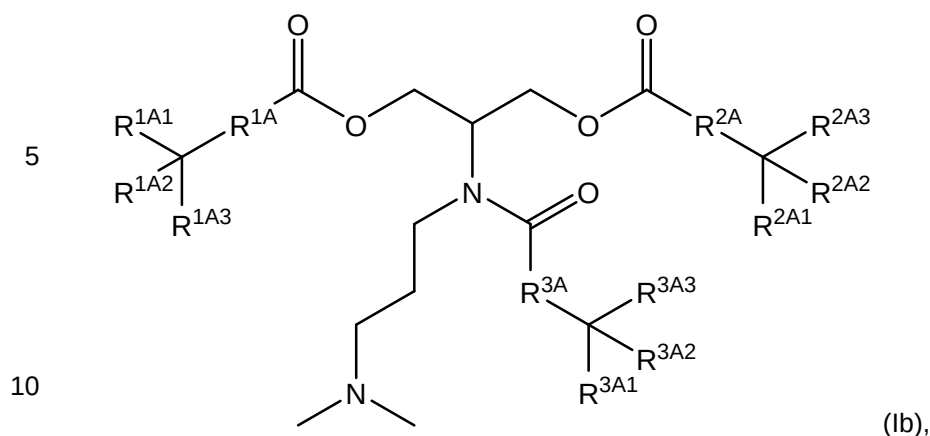


En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula (Ia):



o una sal del mismo, en donde R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{1A1}, R^{1A2}, R^{1A3}, R^{2A1}, R^{2A2}, R^{2A3}, R^{3A1}, R^{3A2}, R^{3A3}, R^{3B1}, R^{3B2}, y R^{3B3} son como se definen para la Fórmula (I) o cualquier variación o realización de la misma.

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto representado por la Fórmula (Ib):



o una sal del mismo, en donde R^{1A} , R^{2A} , R^{3A} , R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son como se definen para la Fórmula (I) o cualquier variación o realización de la misma.

III. CONJUGADOS LÍPIDO-GRUPO DE DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS INMUNES

Como se ha discutido en la presente memoria, las LNP pueden dirigirse a un tipo de célula en particular, p. ej., una célula inmune, p. ej., una célula T, una célula B o una célula asesina natural (NK). Esto puede lograrse usando uno o más de los lípidos descritos en la presente memoria. Además, el direccionamiento puede mejorarse incluyendo un grupo de direccionamiento en una superficie accesible al disolvente de una partícula de LNP. Por ejemplo, los grupos de direccionamiento pueden incluir un miembro de un par de unión específico, p. ej., un par anticuerpo-antígeno, un par ligando-receptor, etc. En ciertas realizaciones, el grupo de direccionamiento es un anticuerpo. El direccionamiento puede implementarse, por ejemplo, mediante el uso de conjugados lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes descritos en la presente memoria.

Opcionalmente, el resto de direccionamiento es un fragmento de anticuerpo sin un componente Fc. En intentos anteriores de tomar como diana células inmunes circulantes con LNP se han empleado anticuerpos completos (WO 2016/189532 A1). Los liposomas o las partículas basadas en lípidos con anticuerpos completos conjugados se eliminan más rápidamente de la circulación debido a la unión del Fc, lo que reduce su potencial para alcanzar la célula diana de interés (Harding et al. (1997) Biochim Biophys. Acta 1327, 181-192; Sapra et al. (2004) Clin Cancer Res 10, 1100-1111; Aragnol et al., (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83, 2699-2703). Los liposomas dirigidos con fragmentos de anticuerpos conservan sus propiedades de larga circulación, como los dirigidos a EGFR (Mamot et al., (2005) Cancer Res 65, 11631-11638), ErbB2 (Park et al. (2002) Clin Cancer Res 8, 1172-1181) o EphA2 (Kamoun et al., 2019 Nat. Biomed. Eng 3, 264-280). Además, los vehículos basados en lípidos pueden prepararse usando un proceso de inserción micelar que permite la incorporación casi cuantitativa de la conjugación de anticuerpos tras su fabricación por separado (Nellis et al. (2005) Biotechnol Prog 21, 221-232), en comparación con una inserción altamente ineficiente cuando se conjugan IgG completas (Ishida et al. (1999) FEBS Lett. 460, 129-133) o la necesidad de completar la conjugación directamente en una LNP

intacta (WO 2016/189532 A1). Los fragmentos scFv, Fab o VHH también pueden conjugarse directamente con PEG-lípidos activados para preparar conjugados insertables.

En algunas realizaciones, PEG-(lípidos) es equivalente a (lípidos)-PEG.

En determinadas realizaciones, un grupo de direccionamiento puede ser un anticuerpo unido a la superficie o un fragmento de unión a antígeno unido a la superficie del mismo, que puede permitir el ajuste de la especificidad del direccionamiento celular. Esto es especialmente útil, ya que pueden obtenerse anticuerpos altamente específicos frente a un epítipo de interés para el sitio de direccionamiento deseado. En una realización, pueden incorporarse múltiples anticuerpos diferentes en, y presentarse en la superficie de una LNP, donde cada anticuerpo se une a diferentes epítopos en el mismo antígeno o a diferentes epítopos en diferentes antígenos. Dichos enfoques pueden aumentar la avidez y especificidad de las interacciones dirigidas a una célula diana particular.

Puede seleccionarse un grupo de direccionamiento o una combinación de grupos de direccionamiento basándose en la localización, función o características estructurales deseadas de una célula diana determinada. Por ejemplo, con el fin de tomar como diana una célula T, población de células T o subpoblación de células T, pueden seleccionarse uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno o derivados de unión a antígeno de los mismos que se dirijan a una célula T, tal como a través de un antígeno de superficie de células T. Los antígenos de superficie de células T ejemplares incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD28, CD39, CD69, CD103, CD137, CD45, receptor de células T (TCR) β , TCR- α , TCR- α/β , TCR- γ/δ , PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, CD18, receptor de IL-2, CD11a, GL7, TLR2, TLR4, TLR5 y receptor de IL-15. Con el fin de tomar como diana una célula NK, o una población de células NK, pueden seleccionarse uno o más anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o derivados de unión a antígeno de los mismos que se dirijan a una célula NK, tal como a través de un antígeno de superficie de células NK. Los antígenos de superficie de células NK ejemplares incluyen, pero no se limitan a, CD48, CD56, CD85a, CD85c, CD85d, CD85e, CD85f, CD85i, CD85j, CD158b2, CD161, CD244, CD16a, CD16b, IL-2 receptor, CD27, CD28, CD48, CD69, CD70, CD86, CD112, CD122, CD155, CD161, CD244, CD266, CD314 / NKG2D, CD336 / NKP44, CD337 / NKP30. Con el fin de tomar como diana una célula B o una población de células B, pueden seleccionarse uno o más anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o derivados de unión a antígeno de los mismos que se dirijan a una célula B, tal como a través de un antígeno de células B. Los antígenos de células B ejemplares incluyen, pero no se limitan a, CD19 para todas las células B excepto células plasmáticas, CD19, CD25 y CD30 para células B activadas, CD27, CD38, CD78, CD138 y CD319 para células plasmáticas, CD20, CD27, CD40, CD80 y PDL-2 para las células de memoria, Notch2, CD1, CD21 y CD27 para las células B de la zona marginal, CD21, CD22 y CD23 para las células B foliculares, y CD1, CD5, CD21, CD24 y TLR4 para las células B reguladoras.

En ciertas realizaciones, el direccionamiento puede implementarse, por ejemplo, mediante el uso de conjugados lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes descritos en la presente memoria. Los

conjugados lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes ejemplares pueden incluir compuestos de Fórmula (II),

[Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes, p. ej., molécula dirigida a células T, p. ej., anticuerpo anti-CD2, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD7 o anticuerpo anti-CD8].

(Fórmula II).

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes es un polipéptido, y el lípido se conjuga con el extremo N, extremo C, o en cualquier lugar de la parte media del polipéptido.

En ciertas realizaciones, el grupo de direccionamiento o la molécula de direccionamiento es un agente de direccionamiento de células T, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un antígeno de células T seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD28, CD137, CD45, receptor de células T (TCR) β , TCR- α , TCR- α/β , TCR- γ/δ , PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, CD18, receptor de IL-2, CD11a, TLR2, TLR4, TLR5, receptor de IL-7, o receptor de IL-15. En ciertas realizaciones, el antígeno de células T puede ser CD2, y el grupo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD2. En ciertas realizaciones, el antígeno de células T puede ser CD3, y el grupo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3. En ciertas realizaciones, el antígeno de células T puede ser CD4, y el grupo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD4. En ciertas realizaciones, el antígeno de células T puede ser CD5, y el grupo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD5. En ciertas realizaciones, el antígeno de células T puede ser CD7, y el grupo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD7. En ciertas realizaciones, el antígeno de células T puede ser CD8, y el grupo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD8. En ciertas realizaciones, el antígeno de células T puede ser TCR β , y el grupo de direccionamiento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-TCR β . En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

Un agente de unión a CD2 ejemplar puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 9.6 (<https://academic.oup.com/intimm/article/10/12/1863/744536>), TS2/18.1.1 (ATCC HB-195), Lo-CD2b (ATCC PTA-802), Lo-CD2a/BTI-322 (Patente de EE. UU. 6849258B1), Sipilzumab/MEDI-507 (Patente de EE. UU. 6849258B1/en), 35.1 (ATCC HB-222), OKT11 (ATCC CRL-8027), RPA-2.1 (Publicación PCT WO2020023559A1), AF1856 (R&D Systems), MAB18562 (R&D Systems), MAB18561 (R&D Systems), MAB1856 (R&D Systems), PAB30359 (Abnova Corporation), 10299-1 (Abnova Corporation), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AF1856 (R&D Systems), MAB18562 (R&D Systems), MAB18561 (R&D Systems), MAB1856 (R&D Systems), PAB30359 (Abnova Corporation), y 10299-1 (Abnova Corporation). En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena pesada y CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena ligera determinados según Kabat (véase, Kabat *et al.*, (1991)

Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (véase, p. ej., Chothia C y Lesk A M, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase, MacCallum R M *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 732-745), o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que
 5 consiste en AF1856 (R&D Systems), MAB18562 (R&D Systems), MAB18561 (R&D Systems), MAB1856 (R&D Systems), PAB30359 (Abnova Corporation), y 10299-1 (Abnova Corporation).

Un agente de unión a CD2 ejemplar también puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de los clones 9.6, 9-1, TS2/18.1.1, Lo-CD2b, Lo-CD2a, BTI-322, sipilzumab, 35.1, OKT11, RPA-2.1, SQB-3.21, LT2, TS1/8, UT329, 4F22, OX-34, UQ2/42, MU3, U7.4,
 10 NFN-76, o MOM-181-4-F(E).

Un agente de unión a CD3 ejemplar (CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$, CD3 γ , CD3 δ , CD3 γ/ϵ , CD3 δ/ϵ , o CD3 ϵ) puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MEM-57 (CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$, EnzoLife Sciences), MAB100 (CD3 ϵ , R&D Systems), CD3-H5 (CD3 ϵ , Abnova Corporation), CD3-12 (CD3 ϵ , Cell Signaling Technology), LE-CD3 (CD3 ϵ , Santa Cruz Biotechnology, Inc.), NBP1-31250 (CD3 γ , Novus Biologicals), 16669-1-AP
 15 (CD3 δ , Invitrogen) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MEM-57 (CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$, EnzoLife Sciences), MAB100 (CD3 ϵ , R&D Systems), CD3-H5 (CD3 ϵ , Abnova Corporation), CD3-12 (CD3 ϵ , Cell Signaling Technology), LE-CD3 (CD3 ϵ , Santa Cruz Biotechnology, Inc.), NBP1-31250 (CD3 γ , Novus Biologicals), y 16669-1-AP (CD3 δ , Invitrogen). En
 20 ciertas realizaciones, el agente de unión comprende CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena pesada y CDR₁, CDR₂, and CDR₃ de cadena ligera, determinados según Kabat (véase, Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (véase, p. ej., Chothia C y Lesk A M, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase, MacCallum R M *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 732-745), o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la
 25 técnica, de las secuencias V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MEM-57 (CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$, EnzoLife Sciences), MAB100 (CD3 ϵ , R&D Systems), CD3-H5 (CD3 ϵ , Abnova Corporation), CD3-12 (CD3 ϵ , Cell Signaling Technology), LE-CD3 (CD3 ϵ , Santa Cruz Biotechnology, Inc.), NBP1-31250 (CD3 γ , Novus Biologicals), y 16669-1-AP (CD3 δ , Invitrogen).

Un agente de unión a CD3 ejemplar también puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de los clones hsp34, OKT-3, UCHT1, 38.1, HIT3a, RFT8, SK7, BC3, SP34-2, HU291, TRX4, Catumaxomab, teplizumab, 3-106, 3-114, 3-148, 3-190, 3-271, 3-550, 4-10, 4-48, H2C, F12Q, I2C, SP7, 3F3A1, CD3-12, 301, RIV9, JB38-29, JE17-74, GT0013, 4E2, 7A4, 4D10A6, SPV-T3b, M2AB, ICO-90, 30A1 o Hu38E4.v1 (Solicitud de Patente de EE. UU. 20200299409A1), REGN5458 (Solicitud de Patente de EE. UU. 20200024356A1), Blinatumomab
 30 (https://go.drugbank.com/drugs/DB09052/polypeptide_sequences.fasta). En algunas realizaciones, el conjugado comprende un Fab, en donde el Fab comprende (a) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3.
 35

Un agente de unión a CD4 ejemplar puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Ibalizumab (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?D09575), AF1856 (R&D Systems), MAB554 (R&D Systems), BF0174 (Affinity Biosciences), PAB31115 (Abnova Corporation), CAL4 (Abcam), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AF1856 (R&D Systems), MAB554 (R&D Systems), BF0174 (Affinity Biosciences), PAB31115 (Abnova Corporation), y CAL4 (Abcam). En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena pesada y CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena ligera, determinados según Kabat (véase, Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (véase, p. ej., Chothia C y Lesk A M, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase, MacCallum R M *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 732-745), o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AF1856 (R&D Systems), MAB554 (R&D Systems), BF0174 (Affinity Biosciences), PAB31115 (Abnova Corporation), y CAL4 (Abcam).

Un agente de unión a CD4 ejemplar también puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de los clones Ibalizumab, OKT4, RPA-T4, S3.5, SK3, N1UG0, RIV6, OTI18E3, MEM-241, B486A1, RFT-4g, 7E14, MDX.2, MEM-115, MEM-16, ICO-86, Edu-2, o ilbalizumab.

Un agente de unión a CD5 ejemplar puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en He3, MAB1636 (R&D Systems), AF1636 (R&D Systems), MAB115 (R&D Systems), C5/473 + CD5/54/F6 (Abcam), CD5/54/F6 (Abcam), 65152 (Proteintech), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de unión comprende un dominio V_H y un V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAB1636 (R&D Systems), AF1636 (R&D Systems), MAB115 (R&D Systems), C5/473 + CD5/54/F6 (Abcam), CD5/54/F6 (Abcam), y 65152 (Proteintech). En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena pesada y CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena ligera, determinados según Kabat (véase, Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (véase, p. ej., Chothia C y Lesk A M, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase, MacCallum R M *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 732-745), o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAB1636 (R&D Systems), AF1636 (R&D Systems), MAB115 (R&D Systems), C5/473 + CD5/54/F6 (Abcam), CD5/54/F6 (Abcam), y 65152 (Proteintech).

Un agente de unión a CD5 ejemplar también puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones de zolimomab, 5D7, L17F12, y UCHT2, 1D8, 3I21, 4H10, 8J23, 5O4, 4H2, 5G2, 8G8, 6M4, 2E3, 4E24, 4F10, 7J9, 7P9, 8E24, 6L18, 7H7, 1E7, 8J21, 7I11, 8M9, 1P21, 2H11, 3M22, 5M6, 5H8, 7I19, 1A2, 8E15, 8C10, 3P16, 4F3, 5M24, 5O24, 7B16, 1E8, 2H16, BLA1, 1804, DK23, Cris1, MEM-32, H65, 4C7, OX-19, Leu-1, 53-7.3, 4H8E6, T101, EP2952, D-9, H-3, HK231, N-20, Y2/178, H-300, CD5/54/F6, Q-20, CC17, MOM-18539-S(P), o MOM-18885-S(P).

Un agente de unión a CD7 ejemplar puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAB7579 (R&D Systems), AF7579 (R&D Systems), EPR22065 (Abcam), 1G10D8 (Proteintech), NBP2-32097 (Novus Biologicals), NBP2-38440 (Novus Biologicals), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende un dominio V_H y un V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAB7579 (R&D Systems), AF7579 (R&D Systems), EPR22065 (Abcam), 1G10D8 (Proteintech), NBP2-32097 (Novus Biologicals), y NBP2-38440 (Novus Biologicals). En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena pesada y CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena ligera, determinados según Kabat (véase, Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (véase, p. ej., Chothia C y Lesk A M, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase, MacCallum R M *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 732-745), o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en MAB7579 (R&D Systems), AF7579 (R&D Systems), EPR22065 (Abcam), 1G10D8 (Proteintech), NBP2-32097 (Novus Biologicals), y NBP2-38440 (Novus Biologicals).

Un agente de unión a CD7 ejemplar también puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de clones TH-69, 3Af1, T3-3A1, 124-1D1, 3A1f, CD7-6B7 o VHH6.

Un agente de unión a CD8 (CD8 α , CD8 α/α , CD8 α/β o CD8 β) ejemplar puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 2.43 (Invitrogen), Du CD8-1 (CD8 α , Invitrogen), 9358-CD (CD8 α/β , R&D Systems), MAB116 (CD8 α , R&D Systems), ab4055 (CD8 α , Abcam), C8/144B (CD8 α , Novus Biologicals), YTS105.18 (CD8 α , Novus Biologicals), TRX2 (<https://patents.justia.com/patent/20170198045>), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 2.43 (Invitrogen), 51.1 (ATCC HB-230), Du CD8-1 (CD8 α , Invitrogen), 9358-CD (CD8 α/β , R&D Systems), MAB116 (CD8 α , R&D Systems), ab4055 (CD8 α , Abcam), C8/144B (CD8 α , Novus Biologicals), e YTS105.18 (CD8 α , Novus Biologicals). En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena pesada y CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena ligera, determinados según Kabat (véase, Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (véase, p. ej., Chothia C y Lesk A M, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase, MacCallum R M *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 732-745), o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 2.43 (Invitrogen), Du CD8-1 (CD8 α , Invitrogen), 9358-CD (CD8 α/β , R&D Systems), MAB116 (CD8 α , R&D Systems), ab4055 (CD8 α , Abcam), C8/144B (CD8 α , Novus Biologicals), e YTS105.18 (CD8 α , Novus Biologicals).

Un agente de unión a CD8 ejemplar también puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de clones OKT-8, 51.1, S6F1, TRX2, y UCHT4, SP16, 3B5, C8-144B, HIT8a, RAVB3, LT8, 17D8, MEM-31, MEM-87, RIV11, DK-25, YTC141.1HL, o YTC182.20. En algunas realizaciones, el conjugado comprende un Fab, en donde el Fab comprende un fragmento de cadena

pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

Un agente de unión a CD137 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de los clones 4B4-1, P566 o Urelumab. Un agente de unión a CD28 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR del clon TAB08. Un agente de unión a CD45 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de los clones BC8, 9.4, 4B2, Tu116 o GAP8.3. Un agente de unión a CD18 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones 1B4, TS1/18, MEM-48, YFC118-3, TA-4, MEM-148, o R3-3, 24. Un agente de unión a CD11a ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR del clon MHM24 o Efalizumab. Un agente de unión al receptor de IL-2 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones YTH 906.9HL, IL2R.1, BC96, B-B10, 216, MEM-181, ITYV, MEM-140, ICO-105, Daclizumab, o del grupo que consiste en IL2 o fragmentos de IL2. Un agente de unión a IL-15R ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones JM7A4 u OTI3D5, o del grupo que consiste en IL15 o fragmentos de IL15. Un agente de unión a TLR2 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones JM22-41, TL2.1, 11G7, o TLR2.45. Un agente de unión a TLR4 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones HTA125, o 76B357-1. Un agente de unión a TLR5 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones 85B152-5, o 9D759-2. Un agente de unión a GL7 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR del clon GL7.

Un agente de unión a PD1 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que emplean CDR de clones MIH4, J116, J150, OTIB11, OTI17B10, OTI3A1, u OTI16D4. Además, los anticuerpos anti-PD-1 ejemplares se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. No. 8.952.136, 8.779.105, 8.008.449, 8.741.295, 9.205.148, 9.181.342, 9.102.728, 9.102.727, 8.952.136, 8.927.697, 8.900.587, 8.735.553 y 7.488.802. Los anticuerpos anti-PD-1 ejemplares incluyen, por ejemplo, nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb Co.), pembrolizumab (Keytruda®, Merck Sharp & Dohme Corp.), PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) y pidilizumab (CT-011, Cure Tech). Los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. No. 9.273.135, 7.943.743, 9.175.082, 8.741.295, 8.552.154 y 8.217.149. Los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares incluyen, por ejemplo, atezolizumab (Tecentriq®, Genentech), durvalumab (AstraZeneca), MEDI4736, avelumab y BMS 936559 (Bristol Myers Squibb Co.).

Un agente de unión a CTLA-4 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de los clones ER4.7G.11 [7G11], OTI9G4, OTI9F3, OTI3A5, A3.4H2.H12, 14D3, OTI3A12, OTI1A11, OTI1E8, OTI3B11, OTI3D2, OTI10C8, OTI2E9, OTI6F1, OTI7D3, OTI85B, OTI12C6. Los anticuerpos anti-CTLA-4 ejemplares se describen en las Patentes de EE. UU. 6.984.720, 6.682.736, 7.311.910; 7.307.064, 7.109.003, 7.132.281, 6.207.156, 7.807.797, 7.824.679, 8.143.379,

8.263.073, 8.318.916, 8.017.114, 8.784.815, y 8.883.984, Publicaciones Internacionales (PCT) No. WO98/42752, WO00/37504, y WO01/14424, y Patente Europea No. EP 1212422 B1. Los anticuerpos frente a CTLA-4 ejemplares incluyen ipilimumab o tremelimumab.

Un agente de unión a TCR β ejemplar puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en H57-597 (Invitrogen), 8A3 (Novus Biologicals), R73 (TCR α/β , Abcam), E6Z3S (TRBC1/TCR β , Cell Signaling Technology), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende un dominio V_H y un V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en H57-597 (Invitrogen), 8A3 (Novus Biologicals), R73 (TCR α/β , Abcam), y E6Z3S (TRBC1/TCR β , Cell Signaling Technology). En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena pesada y CDR₁, CDR₂, y CDR₃ de cadena ligera, determinados según Kabat (véase, Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (véase, p. ej., Chothia C y Lesk A M, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase, MacCallum R M *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 732-745), o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en H57-597 (Invitrogen), 8A3 (Novus Biologicals), R73 (TCR α/β , Abcam), y E6Z3S (TRBC1/TCR β , Cell Signaling Technology).

Un agente de unión a CD137 ejemplar puede seleccionarse de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que empleen CDR de los clones 4B4-1, P566 o Urelumab.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv y scFv. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un Nanocuerpo. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que no comprende un enlace disulfuro natural entre cadenas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende una sustitución C233S, y/o un fragmento de cadena ligera que comprende una sustitución C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende uno o más enlaces disulfuro entre cadenas no nativos. En algunas realizaciones, los enlaces disulfuro entre cadenas se encuentran entre dos residuos de cisteína no nativos en el fragmento de cadena ligera y el fragmento de cadena pesada, respectivamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la sustitución F174C, y/o un fragmento de cadena ligera que comprende la sustitución S176C, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende sustituciones F174C y C233S, y/o un fragmento de cadena ligera que comprende sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un residuo de cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende una cisteína en el extremo C del fragmento de cadena pesada o ligera. En algunas realizaciones, el Fab

comprende además uno o más aminoácidos entre la cadena pesada del Fab y la cisteína C-terminal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el Fab comprende dos o más aminoácidos derivados de una región bisagra del anticuerpo (p. ej., una secuencia bisagra parcial) entre el extremo C del Fab y la cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el Fab comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio CH1 del anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera unido a un dominio constante de cadena ligera del anticuerpo, en donde el dominio CH1 y el dominio constante de cadena ligera están unidos por uno o más enlaces disulfuro entre cadenas, y en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende además un fragmento variable de cadena única (scFv) unido al extremo C del dominio constante de cadena ligera por un enlazador de aminoácidos. En algunas realizaciones, el anticuerpo Fab es un DS Fab, un NoDS Fab, un bDS Fab, un bDS Fab-ScFv, como se demuestra en la FIG 47.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un Nanocuerpo (p. ej., un V_{HH}). En algunas realizaciones, el Nanocuerpo comprende una cisteína en el extremo C. En algunas realizaciones, el Nanocuerpo comprende además un espaciador que comprende uno o más aminoácidos entre el dominio V_{HH} y la cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el espaciador comprende uno o más residuos de glicina, p. ej., dos residuos de glicina. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios V_{HH} . En algunas realizaciones, los dos o más dominios V_{HH} están unidos por un enlazador de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador de aminoácidos comprende uno o más residuos de glicina y/o serina (p. ej., una o más repeticiones de la secuencia GGGGS). En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio V_{HH} unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo y el dominio constante de cadena ligera de anticuerpo están unidos por uno o más enlaces disulfuro (p. ej., enlaces disulfuro entre cadenas). En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo está unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, el dominio CH1 comprende sustituciones F174C y C233S, y el dominio constante de cadena ligera comprende sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un ScFv, un V_{HH} , un $2xV_{HH}$, un V_{HH} -CH1/Vk vacío, o un V_{HH1} -CH1/ V_{HH2} -Nb bDS, como se demuestra en la FIG. 31.

Un resto de direccionamiento ejemplar puede tener una secuencia amino como se muestra a continuación:

Secuencias de hSP34-Fab anti-CD3:

Secuencia de la cadena pesada (HC) de hSP34 (SEQ ID NO: 1):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA
DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSASTKGPS

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

Secuencia de cadena ligera (LC) de hSP34-mlam (lambda de ratón) (SEQ ID NO: 2):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF
5 SGSELLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELTNKA
TLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEG
HTVEKSLSRADSS

LC de SP34-hlam (lambda humana) (SEQ ID NO: 3):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF
10 SGSELLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA
TLVCLVSDFYPGAFTVAWKADGSPVKVGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEG
STVEKTVAPAESS

Secuencias de Hu291-Fab anti-CD3:

HC de Hu291 (SEQ ID NO: 4):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQ
15 KLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de Hu 291 (SEQ ID NO: 5):

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAKCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQKPGK
20 APKRLIYDTSKLASGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQWSSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES

Secuencias de TRX2-Fab anti-CD8:

HC de TRX2 (SEQ ID NO: 6):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWRQAPGKGLEWVALIYYDGSNKFYADS
25 VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGYHFFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de TRX2 (SEQ ID NO: 7):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKGSQDINNYLAWYQKPGKAPKLLIYNTDILHTGVPSRFGSG
30 SGTDFTFITSSLQPEDATYYCYQYNNGYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGES

Secuencias de OKT8-Fab anti-CD8:

HC de OKT8 (SEQ ID NO: 8):

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDNTLYASK
35 FQGRVTITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPS

SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de OKT8 (SEQ ID NO: 9):

DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSRISQYLAWYQEKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGS
5 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNNENPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGES

Secuencias de Ibalizumab-Fab anti-CD4:

HC de ibalizumab (SEQ ID NO: 10):

10 QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEK
FKGKATLTSDTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de ibalizumab (SEQ ID NO: 11):

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQYYSYRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGES

Secuencias de He3-Fab anti-CD5:

HC de He3 (SEQ ID NO: 12):

20 EIQLVQSGGGLVKPGGSRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADS
FKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

25 LC de He3 (SEQ ID NO: 13):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQYDESPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
KSFNRGES

Secuencias de TH-69-Fab anti-CD7:

HC de TH-69 (SEQ ID NO: 14):

30 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDSVK
GRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARDEVGRYLDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
35 KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

LC de TH-69 (SEQ ID NO: 15):

DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYTTSSLHSGVPSRFSGSG
SGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQYQSKLPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF

YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

Secuencias de TS2/18.1-Fab anti-CD2:

HC de TS2/18.1 (SEQ ID NO: 16):

5 EVQLVESGGGLVMPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISGGGFTYYPDTV
KGRFTLSRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQGANWELVYWGQGLTVVSAASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de TS2/18.1 (SEQ ID NO: 17):

10 DIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSI SDFLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSG
SGSDFTLSINSVEPEDVG VYFCQNGHNFPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGES

Secuencias de 9.6-Fab anti-CD2:

15 HC de 9.6 (SEQ ID NO: 18):

QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKF
KDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

20 LC de 9.6 LC (SEQ ID NO: 19):

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAVYYCHQYLSSHTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKS FNRGES

25 **Secuencias de 9-1-Fab anti-CD2:**

HC de 9-1 (SEQ ID NO: 20):

QVQLQQPGTELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWVNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQK
FTDKAISTIDTSSNTAYMQLSTLTSDASAVYYCSRSPRDSSTNLADWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
30 NHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de 9-1 (SEQ ID NO: 21):

DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSI SDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSG
SGSDFTLSINSVEPEDVG VYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
35 KSFNRGES

Secuencias de mutOKT8-Fab:

HC de mutOKT8 (SEQ ID NO: 22):

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDNTLYASKF
 QGRVTITADTSSNTAYMELSSLRSEDVAVYYCGRGAGAYVFDHWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

5 LC de mutOKT8 (SEQ ID NO: 23):

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRSRSISAALAWYQEKP GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSG
 SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 SFNRGES.

10 **Secuencia de A1 Fab anti-CD56**

HC de A1 bDS (SEQ ID NO: 26):

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSNWIRQSPSGLEWLGRYYR
 SKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARENIAAWTWAFDIWGQGTMTVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 15 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de A1 bDS (SEQ ID NO: 27):

EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGAPRLIYDTSLRATDIPDRFSGS
 GSGTAFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 20 KSFNRGES

Secuencia de A2 Fab anti-CD56

HC de A2 bDS (SEQ ID NO: 28):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA
 QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDLSSGYSGYFDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVF
 25 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de A2 bDS (SEQ ID NO: 29):

DVVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSQSLHNSGYNLWYLQKPGQSPQLLIYLSNRRASGVP
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEGEDVGDYYCMQALQSPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 30 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVT KSFNRGES

Secuencia de A3 Fab anti-CD56

HC de A3 bDS (SEQ ID NO: 30):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA
 QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDLSSGYSGYFDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVF
 35 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de A3 bDS (SEQ ID NO: 31):

DVVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLHNSNGYNFLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGYYCMQSLQTPWTFGHGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGES

5 **Secuencia de Fab de Lorvotuzumab anti-CD56**

HC de Lorvotuzumab bDS (SEQ ID NO: 32):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAYISSGSFTIYY
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARMR KGYAMDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGL
 YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de Lorvotuzumab bDS (SEQ ID NO: 33):

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQIIHSDGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPD
 RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQGSHVPHFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
 LSSPVTKSFNRGES

15 **Secuencia de Fab de RPA-2.10v1 anti-CD2**

HC de RPA-2.10v1 bDS (SEQ ID NO: 34):

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVASISGGGFLYYLDSVK
 GRFTISRDNARNILYLHMTSLRSEDAMYYCARSSYGEIMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de RPA-2.10v1 bDS (SEQ ID NO: 35):

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQRIGTSIHWYQQRRTTGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS
 GTDFTLSINSVESEDVADYYCQQSHGWPFTEGGGKLEIERTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGES

25 **Secuencia de Fab 4B4-1 anti-CD137**

HC de 4B4-1 bDS (SEQ ID NO: 36):

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWKQRPQGVLEWIGEINPGNGHTNYNE
 KFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSFTTARGFAYWGQGTSLTVTSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de 4B4-1 bDS (SEQ ID NO: 37):

DIVMTQSPATQSVTPGDRVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGS
 SGSDFTLSINSVEPEDVGYYCQDGHSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGES

35 HC de hSP34-hlam NoDS (SEQ ID NO: 38):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA
 DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

5 LC de hSP34-hlam NoDS (SEQ ID NO: 39):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF
 SGSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA
 TLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEG
 STVEKTVAPAESS

10 LC de hSP34-hlam DS (SEQ ID NO: 40):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA
 DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

15 LC de hSP34-hlam DS (SEQ ID NO: 41):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF
 SGSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA
 TLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEG
 STVEKTVAPAECs

20 **Fab de TS2/18.1 DS anti-CD2**

HC de TS2/18.1 DS (SEQ ID NO: 42):

EVQLVESGGGLVMPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISGGGFTYYPDVT
 KGRFTLSRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARQGANWELVYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

25 LC de TS2/18.1 DS (SEQ ID NO: 43):

DIVMTQSPATLSVTPGDRVFLSCRASQSI SDFLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSG
 SGSDFTLSINSVEPEDVGVYFCQNGHNFPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC

30 **Fab 9.6 DS anti-CD2**

HC de 9.6 DS (SEQ ID NO: 44):

QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTRYWIHWVKQRPIQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKF
 KDKATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATEDLYYAMEYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

35 LC de 9.6 DS (SEQ ID NO: 45):

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAVYYCHQYLSSHTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

5 HC de hSP34-hlam bDS (SEQ ID NO: 46):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA
DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

10 LC de hSP34-hlam bDS (SEQ ID NO: 47):

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARF
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA
TLVCLVSDFYPGAFTVAWKADGSPVKVGVETTKPSKQSNKYYAACSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEG
STVEKTVAPAESS

15 Secuencia de Fab TR66 bDS anti-CD3

HC de TR66 bDS (SEQ ID NO: 48):

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQ
KFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDNYSLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
20 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de TR66 bDS (SEQ ID NO: 49):

QIVLTQSPSSLSASLGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQKPGTSPKRWIYDTSKVASGVDPDRFSGS
GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
25 TKSFNRRGES

Secuencia de Fab TRX4 bDS anti-CD3

HC de TRX4 bDS (SEQ ID NO: 50):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFPMWVRQAPGKGLEWVSTISTSGGRYYRDS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRQYSGGFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP
30 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de TRX4 bDS (SEQ ID NO: 51):

DIQLTQPNVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNYVHWYQLYEGRSPTTMIYDDDKRPDGVDPDRFSG
SIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSFNVFSGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLV
35 CLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYYAACSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV
EKTVAPTES

Secuencia de Fab HzUCHT1 bDS anti-CD3

HC de HzUCHT1(Y59T) bDS (SEQ ID NO: 52):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPTKGVSTYNQK
FKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDSWDYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

5 LC de HzUCHT1 bDS (SEQ ID NO: 53):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES

10 Secuencia de Fab Teplizumab bDS anti-CD3

HC de Teplizumab bDS (SEQ ID NO: 54):

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVIYFCARYYDDHYCLDYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

15 LC de Teplizumab bDS (SEQ ID NO: 55):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISSLQPEDATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES

20 **Secuencia de Fab TRX2 bDS anti-CD8**

HC de TRX2 bDS (SEQ ID NO: 56):

QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWVRQAPGKGLEWVALIYYDGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGYHFFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

25 LC de TRX2 bDS (SEQ ID NO: 57):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKGSQDINNYLAWYQQKPGKAPKLLIYNTDILHTGVPSRFSGSGSGTDFTTISSLQPEDATYYCYQYNNGYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES

30 **Secuencia de Fab Lo-CD2b bDS anti-CD2**

HC de Lo-CD2b bDS (SEQ ID NO: 58):

EVQLVESGGGLVQPGASLKLSCLVASGFTFSFYWMSWVRQTPGKPMEWIGHIKYDGSYTNYAPSLKNRFTISRDNKNTLYLQMSNVRSEDSATYYCAREAPGAASYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

35 LC de Lo-CD2b bDS (SEQ ID NO: 59):

DVVLTPVAQPVTLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWFLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSQVP
 DRFIGSGSGSDFTLKISRVEPEDWGVYCFQGTHTDPYTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 SVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
 GLSSPVTKSFNRGES

5 **Secuencia de Fab 35.1 bDS anti-CD2**

HC de 35.1 bDS (SEQ ID NO: 60):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCRTSGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLKWIGRIDPANGNTKYDPKF
 QDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCVTYAYDGNWYFDVWGAGTAVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 10 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de 35.1 bDS (SEQ ID NO: 61):

DIKMTQSPSSMYVSLGERVTITCKASQDINSFLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGS
 GSGQDYSLTISSEYEDMEIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 15 TKSFNRGES

Secuencia de Fab OKT11 bDS anti-CD2

HC de OKT11 bDS (SEQ ID NO: 62):

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWIKQRPEQGLEWIGRIDPYDSETHYNEKF
 KDKAILSVDKSSSTAYIQLSSLTSDDSAVYYCSRDAKYDGYALDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAP
 20 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de OKT11 bDS (SEQ ID NO: 63):

DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKTLHSNGNTYLYWFLQRPQGQSPQVLIYRMSNLAGVNP
 RFSGSGSETTFTLRISRVEAEDVGIYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIERTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 25 VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGES

Secuencia de Fab HzMHM24 bDS anti-CD11a

HC de HzMHM24 bDS (SEQ ID NO: 64):

EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGYSTGHWMNWVRQAPGKLEWVGMIHPDSETRYNQ
 30 KFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFYGTTYFDYWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de HzMHM24 bDS (SEQ ID NO: 65):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLAQYQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGS
 35 GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPLTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNRGES

Secuencia de Fab h1B4 bDS anti-CD18

HC de h1B4 bDS (SEQ ID NO: 66):

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVAAIDNDGGSISYPDT
VKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRVEDTALYYCARQGRLRRDYFDYWGGQGLTVTVSTASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI
5 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de h1B4 bDS (SEQ ID NO: 67):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPS
RFGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQSNEPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
10 SSPVTKSFNRGES

Secuencia de Fab Erlizumab bDS anti-CD18

HC de Erlizumab bDS (SEQ ID NO: 68):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYTMHWMRQAPGKGLEWVAGINPKNGGTSNMQ
RFMDRFTISVDKSTSTAYMQMNSLRAEDTAVYYCARWRGLNYGFDVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGP
15 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de Erlizumab bDS (SEQ ID NO: 69):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
20 NNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGES

Secuencia de Fab-ScFv Ibalizumab/TRX2 bDS anti-CD4/CD8

HC de Fab-ScFv Ibalizumab/TRX2 bDS (SEQ ID NO: 70):

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEK
25 FKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

LC de Fab-ScFv Ibalizumab/TRX2 bDS (SEQ ID NO: 71):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
30 PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGESGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNW
VRQAPGKGLEWVALIYYDGSNKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGY
HFFDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKGSQDINN
35 YLAWYQQKPGKAPKLLIYNTDILHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCYQYNNGYTFGQGT
VEIK

Secuencia de Fab Ibalizumab NoDS anti-CD4

LC de Ibalizumab NoDS (SEQ ID NO: 72):

QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGLDWIGYINPYNDGTDYDEK
FKGKATLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDNYATGAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

5 HC de Ibalizumab NoDS (SEQ ID NO: 73):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQQYYSYRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGES

10 **Secuencia de Fab OKT4 bDS anti-CD4**

LC de OKT4 bDS (SEQ ID NO: 74):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKRLEWVSAISDHSTNTYYPDS
VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKYGGDYDPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
15 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCHHHHHH

HC de OKT4 bDS (SEQ ID NO: 75):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDINNYIAWYQHKGPKGPKLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSG
SGRDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDNLLFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
20 SFNRGES

Secuencia de T023200008 Nb anti-CD4 (SEQ ID NO: 76)

CDR1, CDR2, CDR3 subrayadas basadas en la designación IMGT:

EVQLVESGGGSVQPGGSLTSCGTSGRTFNVMGWFRQAPGKEREFVAAVRWSSTGIYYTQYA
DSVKSRTISRDNANTVYLEMNSLPEDTAVYYCCAADTYNSNPARWDGYDFRGQGLTVTVSSGGCGG
25 HHHHHH

Secuencia de BDSn Nb anti-CD8 (SEQ ID NO: 77)

CDR1, CDR2, CDR3 subrayadas basadas en la designación IMGT:

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSDYGVGWFRQAPGKGREFVADIDWNGEHTSYADS
VKGRFATSRDNANTAYLQMNSLPEDTAVYYCCAADALPYTVRKYNYWGQGTQTVTVSSGGCGGHHHHH
30 H

Secuencia de T0170117G03-A Nb anti-CD3 (SEQ ID NO: 78)

EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTRYRGYSMGWFRQAPGKEREFVAAIVWSSGNTYYED
SVKGRFTISRDNANKNIMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGLTVTVSSAGGGSGGH
HHHHHC

35 **Secuencia de T0170060E11 Nb anti-CD3** (SEQ ID NO: 79)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRRTNY
ADSVKGRFTISRDTGTNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTLTVTVSSGGGSGGHHHHHH
C

Secuencia de V1 Nb anti-CD7 (SEQ ID NO: 80)

DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGYPYSSYCMGWFRQAPGKEREGVAAIDSDGRTRYADS
VKGRFTISQDNAKNTLYLQMNRMKPEDTAMYYCAARFGPMGCVDLSTLSFGHWGQGTQVTVSITGGGC
HHHHHHHH

5 **Secuencia de T017000700 Nb anti-TCR (SEQ ID NO: 81)**

CDR1, CDR2, CDR3 subrayadas basadas en la designación IMGT:

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGYVHKINFYGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAK
GRFTISRDESKNTVYLQMNSLRPEDTAAYYCRALSRIWPYDYWGQGTTLTVSSGGCGGHHHHHH

Secuencia de 28CD065G01 Nb anti-CD28 (SEQ ID NO: 82)

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRLHMEWYRRTPETQREWVATITSGGTTNYPDSVK
GRFTISRDDTKKTVYLQMNSLKPEDTAVYYCHAVATEDAGFPSPNYWGQGTTLTVSSGGCGGHHHHHH

Secuencia de T0170061C09 Nb anti-CD3 (SEQ ID NO: 83)

EVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCAASGRTYRGYSMGWFRQAPGREREFVAAIWSDGNITYYED
SVKGRFTISRDNKNTMYLQMTSLKPEDSATYYCAAKIRPYIFKIAGQYDYWGQGTTLTVSSGGCGGHHH
15 HHH

Secuencia de Fab 12D2 bDS anti-CD3

HC de 12D2 bDS (SEQ ID NO: 84):

EVKLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNFYAYWMGWVRQAPGKLEWIGEIKKDGTINYPSTL
KDRFTISRDNAQNTLYLQMTKLGS EDTALYYCAREERDGYFDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
20 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de 12D2 bDS (SEQ ID NO: 85):

QFVLTQPNVSTNLGSTVKLSCKRSTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPDGVPRFS
GSIDRSSNSALLTINNVTED EADYFCQSYSSGIVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL
25 VCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKVGVETTKPSKQSNKYAACSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGS
TVEKTVAPAESS

Secuencia de Fab 8G8A anti-CD28

HC de 8G8A bDS (SEQ ID NO: 86):

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIQWVKQKPGQGLEWIGSINPYNDYTKYNEKF
30 KGKATLTSDKSSITAYMEFSLTSEDSALYCARWGDGNYWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de 8G8A bDS (SEQ ID NO: 87):

DIEMTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYFHWYQKPGSSPKLCIYSTSNLASGVPPRFSGS
35 GSTSYSLTISMEAEDAATYFCHQYHRSPTFGGGTKLETKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGES

Secuencia de Fab 2E12 anti-CD28

HC de 2E12 bDS (SEQ ID NO: 88):

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGSTDYNSAL
KSRLSITKDNSKSQVFLKMNSLQTDARTARYYCARDGYSNFHYVMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
5 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de 2E12 bDS (SEQ ID NO: 89):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSMLQWYQQKPGQPPKLLISAASNVESGVPAR
FSGSGSGTDFTSLNIHPVEEDDIAMFYCQQSRKVPWTFGGGTKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
10 LSSPVTKSFNRGES

Secuencia de Fab CD28.9.3 anti-CD28

HC de CD28.9.3 bDS (SEQ ID NO: 90):

QVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSAL
MSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLA
15 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de CD28.9.3 bDS (SEQ ID NO: 91):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVEYYVTSMLQWY QKPGQPPKL LIFAASNVES
GVPARFSGSG SGTNFSLNHPVEDDDVAMY FCQQSRKVPY
20 TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES

Secuencia de Fab HzTN228 anti-CD28

HC de HzTN228 bDS (SEQ ID NO: 92):

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGFSLTSYGVHWIRQPGKGLEWLGVIWPGTNFNSALMSRL
25 TISEDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYCARDRAYGNLYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de HzTN228 bDS (SEQ ID NO: 93):

DIQMTQSPSLSASVGDRVTITCRASESVEYVTSMLQWYQKPGKAPKLLIYAASNVDSGVPSRFSG
30 SGTDFTLTISLQPEDIATYCQSRKVPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGES

Secuencia de Fab TGN2122.C anti-CD28

HC de TGN2122.C bDS (SEQ ID NO: 94):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYKIHWRQAPGQGLEWIGYIYPYSGSSDYNQKF
35 KSRATLTVDNSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGGDAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de TGN2122.C bDS (SEQ ID NO: 95):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWWYQRKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGS
GSGRDYTLTISSLQPEDFATYFCQNILGTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
5 SFNRGES

Secuencia de Fab TGN2122.H anti-CD28

HC de TGN2122.H bDS (SEQ ID NO: 96):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIIYMSWVRQAPGKGLVLAAPDPGGNTYYPDVT
KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYGGPGFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
10 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

LC de TGN2122.H bDS (SEQ ID NO: 97):

ENVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWWYQQKPGQAPRLWIYDTSKLASGIPARFSGS
GSRNDYTLTISSLEPEDFAVYYCFPGSGFPFMYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
15 LLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRRGES

Secuencia de ScFv TRX2 anti-CD8 (SEQ ID NO: 98):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWRQAPGKGLEWVALIYYDGSNKFYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGYHFFDSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS
20 GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKGSQDINNYLAWYQQKPGKAPKLLIYNTDILHTGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCYQYNNGYTFGGQTKVEIKGGGSGGCGGHHHHHH

HC de V1 VHH-CH1 bDS (SEQ ID NO: 99):

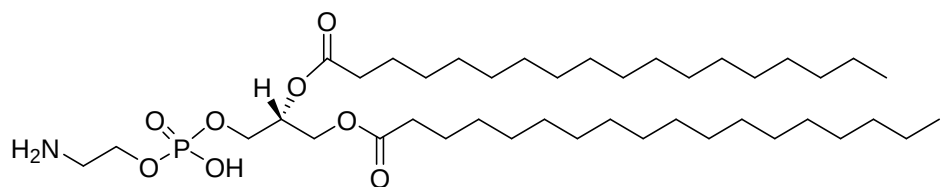
DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGYPYSSYCMGWFRQAPGKEREGVAIDS DGRTRYADS
VKGRFTISQDNAKNTLYLQMNRMPEDTAMYYCAARFGPMGCVDLSTLSFGHWGQGTQVTVSITASTKG
25 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH

En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento comprende una secuencia polipeptídica como se divulga en la presente memoria. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento comprende las seis CDR de una secuencia polipeptídica como se divulga en la presente memoria. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) como se divulga en la presente memoria. En realizaciones adicionales, el resto de direccionamiento se une al mismo epítipo que la molécula diana al que se une una secuencia polipeptídica como se divulga en la presente memoria. En realizaciones adicionales, el resto de direccionamiento compite con una secuencia polipeptídica como se divulga en la presente memoria para unirse al mismo epítipo en la molécula diana.

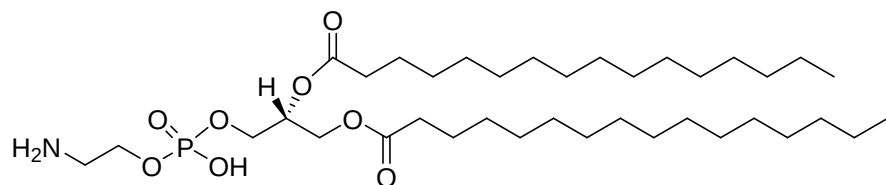
En ciertas realizaciones, el grupo de direccionamiento o grupo de direccionamiento a células inmunes (p. ej., agente de direccionamiento a células T, agente de direccionamiento a células B o agente

de direccionamiento a células NK) puede acoplarse covalentemente a un lípido mediante un enlazador que contenga polietilenglicol (PEG).

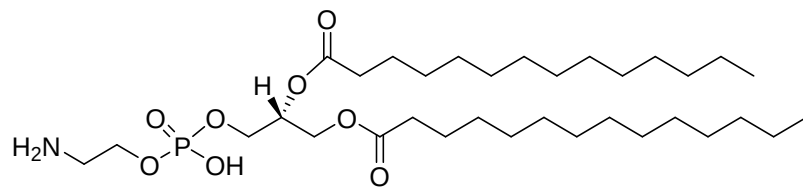
En otras realizaciones, el lípido usado para crear un conjugado puede seleccionarse de diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE):



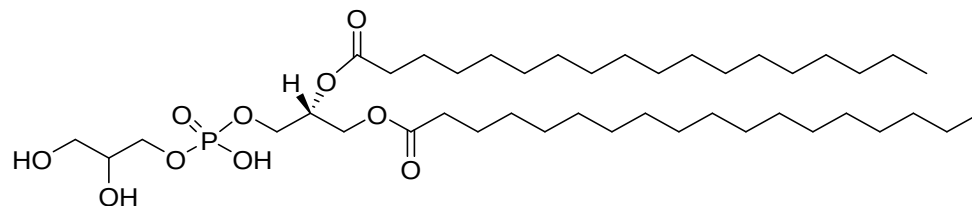
dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE):



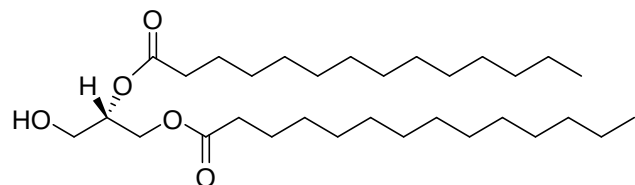
dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE):



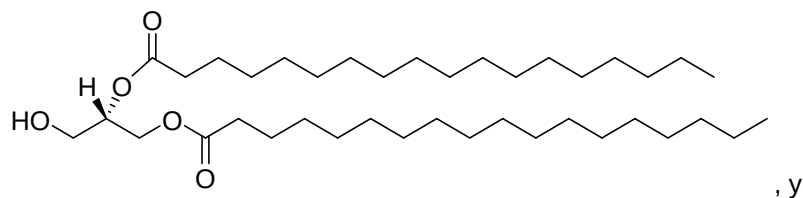
diestearoil-glicero-fosfoglicerol (DSPG):



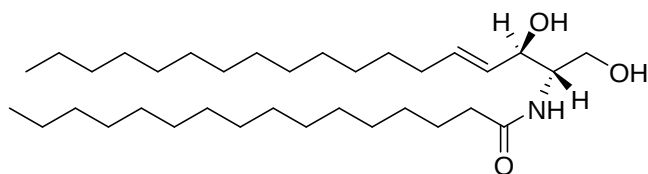
dimiristoil-glicerol (DMG):



diestearoilglicerol (DSG):



N-palmitoil-esfingosina (C16-ceramida)



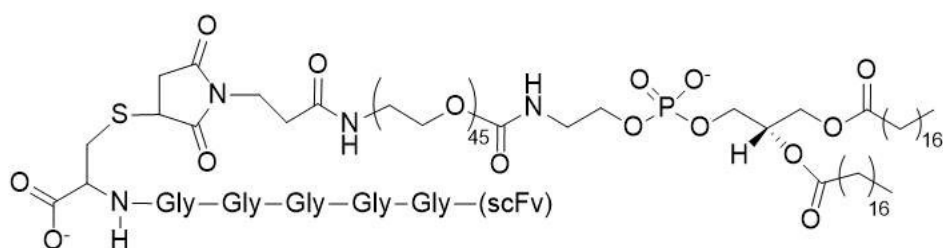
El grupo de direccionamiento a células inmunes puede acoplarse covalentemente a un lípido bien directamente o a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador que contenga polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, el PEG es PEG 1000, PEG 2000, PEG 3400, PEG 3000, PEG 3450, PEG 4000 o PEG 5000. En ciertas realizaciones, el PEG es PEG 2000.

En algunas realizaciones, el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.001-0.5 por ciento en moles, 0.001-0.3 por ciento en moles, 0.002-0.2 por ciento en moles, 0.01-0.1 por ciento en moles, 0.1-0.3 por ciento en moles, o 0.1-0.2 por ciento en moles.

En ciertas realizaciones, el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes comprende DSPE, un componente PEG y un anticuerpo de direccionamiento. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un agente de direccionamiento a células T, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD2, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5, un anticuerpo anti-CD7, un anticuerpo anti CD8 o un anticuerpo anti-TCR β .

Un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes ejemplar comprende DSPE y PEG 2000, por ejemplo, como se describe en Nellis *et al.* (2005) BIOTECHNOL. PROG. 21, 205-220. Un conjugado ejemplar comprende la estructura de Fórmula (III), donde el scFv representa un sitio de unión de anticuerpo diseñado por ingeniería que se une a una diana de interés. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del anticuerpo diseñado por ingeniería se une a cualquiera de las dianas descritas anteriormente en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del anticuerpo diseñado por ingeniería puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 diseñado por ingeniería o un anticuerpo anti-CD8 diseñado por ingeniería. En ciertas realizaciones, el sitio de unión del anticuerpo diseñado por ingeniería puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD2 diseñado por ingeniería o un anticuerpo anti-CD7 diseñado por ingeniería.

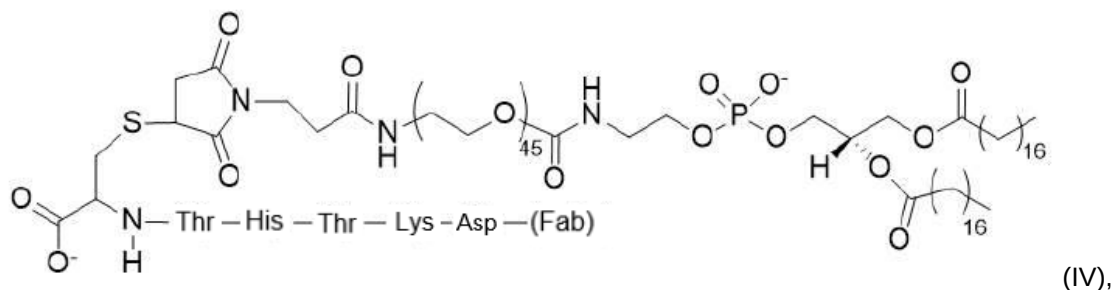
Un ejemplo de un compuesto de Fórmula (III) es como se muestra a continuación:



(III).

Se contempla que el scFv de la Fórmula (III) puede reemplazarse por un anticuerpo intacto o un fragmento de antígeno del mismo (p, ej., un Fab).

Otro ejemplo de un compuesto de Fórmula (IV) es como se muestra a continuación:

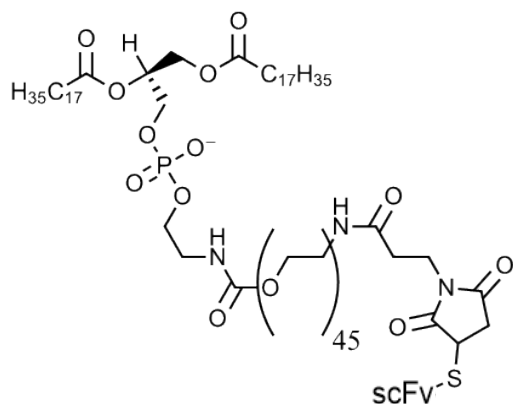


cuya producción se describe en Nellis *et al.* (2005) *supra*, o en la Patente de EE. UU. No. 7.022.336. Se contempla que el Fab de la Fórmula (IV) puede reemplazarse por un anticuerpo intacto o un fragmento de antígeno del mismo (p. ej., un fragmento (Fab')₂) o un sitio de unión del anticuerpo diseñado por ingeniería (p. ej., un scFv).

Otros conjugados lipídicos de grupo de direccionamiento a células inmunes se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 7.022.336, donde el grupo de direccionamiento puede reemplazarse por un grupo de direccionamiento de interés, por ejemplo, un grupo de direccionamiento que se une a un antígeno de superficie de células T o células NK como se describe anteriormente en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, el componente lipídico de un conjugado ejemplar de Fórmula (II) puede ser cualquiera de los lípidos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el componente lipídico de un conjugado de Fórmula (II) se basa en un lípido ionizable, catiónico descrito en la presente memoria, por ejemplo, un lípido ionizable, catiónico de Fórmula (I), Fórmula (Ia), Fórmula (Ib), o una sal de los mismos. Por ejemplo, un lípido ionizable, catiónico ejemplar puede seleccionarse de la Tabla 1, o una sal del mismo.

En ciertas realizaciones, el conjugado basado en un lípido de la presente divulgación puede incluir:



, donde scFv representa un sitio de unión del anticuerpo diseñado por ingeniería que se une a una diana descrita anteriormente en la presente memoria, p. ej., CD2, CD3, CD7 o CD8.

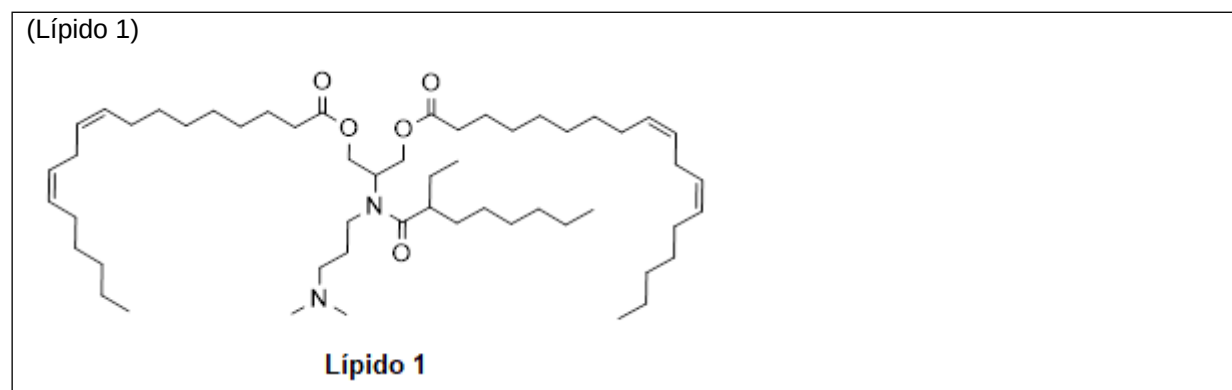
En ciertas realizaciones, la mezcla lipídica puede comprender además PEG-lípido libre para reducir la cantidad de unión inespecífica a través del grupo de direccionamiento. El PEG-lípido libre puede ser el mismo o diferente del PEG-lípido incluido en el conjugado. En determinadas realizaciones, el PEG-lípido libre se selecciona del grupo que consiste en PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) o PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), N-(Metilpolioxietilen oxicarbonilo)-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE-PEG) 1,2-Dimiristoil-rac-glicero-3-metilpolioxietileno (PEG-DMG), 1,2-Dipalmitoil-rac-glicero-3-metilpolioxietileno (PEG-DPG), 1,2-Dioleoil-rac-glicerol, metoxipolietilen Glicol (DOG-PEG) 1,2-Diestearoil-rac-glicero-3-metilpolioxietileno (PEG-DSG), N-palmitoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi(polietilenglicol)]} (PEG-ceramida), DSPE-PEG-cisteína, o un derivado de los mismos, todos con longitudes medias de PEG entre 2000-5000, con 2000, 3400 o 5000. Una composición final puede contener una mezcla de dos o más de estos lípidos pegilados. En ciertas realizaciones, la composición de LNP comprende una mezcla de PEG-lípidos con cadenas de acil miristoil y esteárico. En determinadas realizaciones, la composición de LNP comprende una mezcla de PEG-lípidos con cadenas acil palmitoilo y estearoilo.

En ciertas realizaciones, el derivado del PEG-lípido tiene un grupo terminal metoxi, hidroxilo o ácido carboxílico en el extremo del PEG.

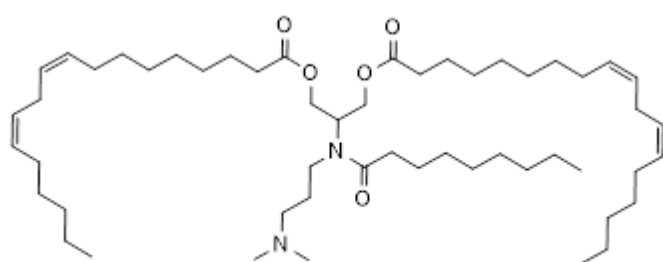
El conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes puede incorporarse en las LNP como se describe a continuación, por ejemplo, en LNP que contengan, por ejemplo, un lípido catiónico ionizable, un esteroil, un fosfolípido neutro y un PEG-lípido. Se contempla que, en ciertas realizaciones, las LNP que contienen el lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes pueden contener un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria o un lípido catiónico descrito, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 10.221.127, 10.653.780 o la solicitud Publicada de EE. UU. No. US2018/0085474, US2016/0317676, la Publicación Internacional No. WO2009/086558, o Miao *et al.* (2019) NATURE BIOTECH 37:1174-1185, o Jayaraman *et al.* (2012) ANGEW CHEM INT. 51: 8529-8533.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico puede seleccionarse de un lípido catiónico ionizable mostrado en la Tabla 1, o una sal del mismo.

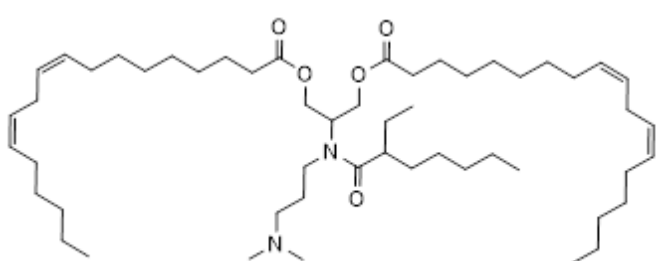
Tabla 1. Estructuras de los Lípidos



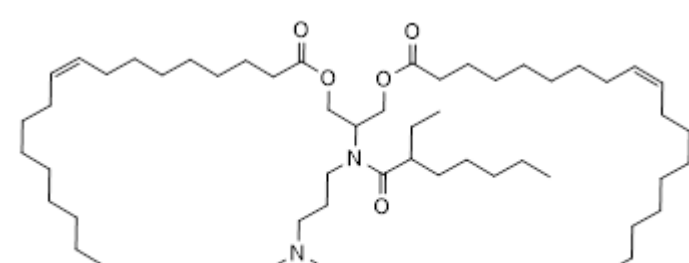
(Lípido 2)

**Lípido 2**

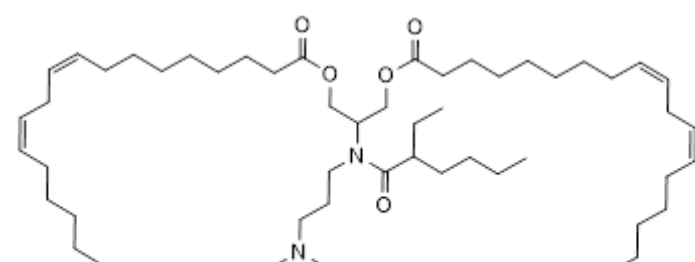
(Lípido 3)

**Lípido 3**

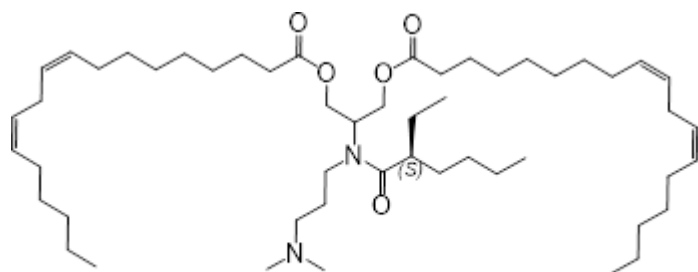
(Lípido 4)

**Lípido 4**

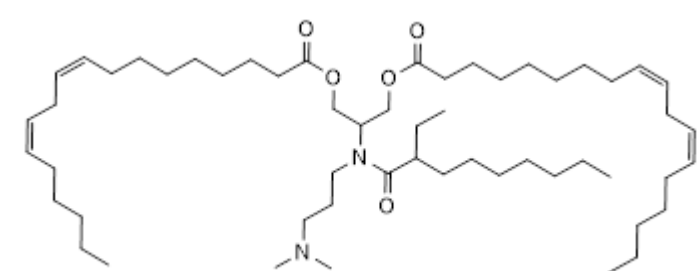
(Lípido 5)

**Lípido 5**

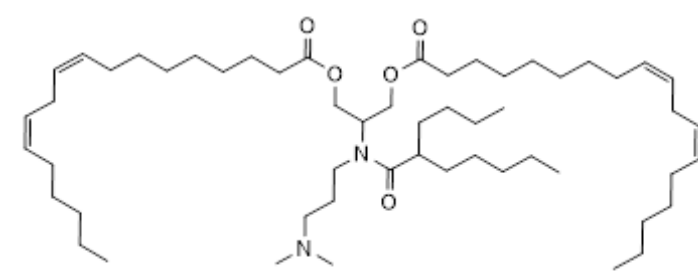
(Lípido 5A)

**Lípido 5A**

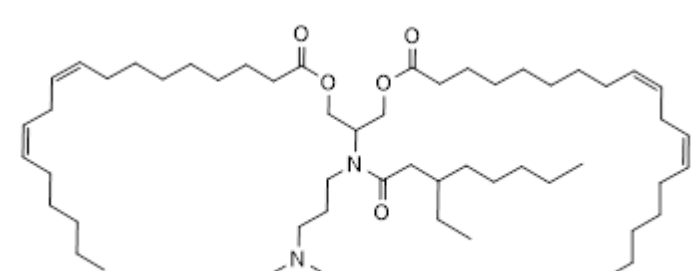
(Lípido 6)

**Lípido 6**

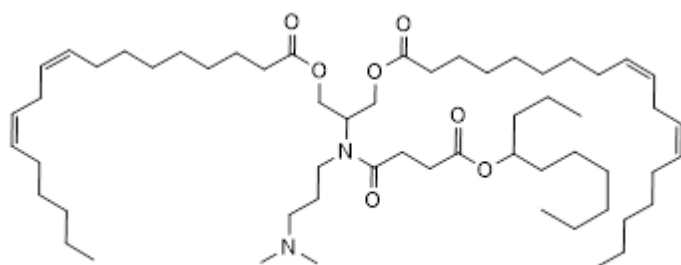
(Lípido 7)

**Lípido 7**

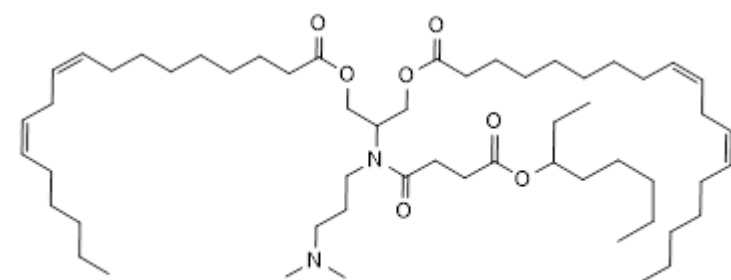
(Lípido 8)

**Lípido 8**

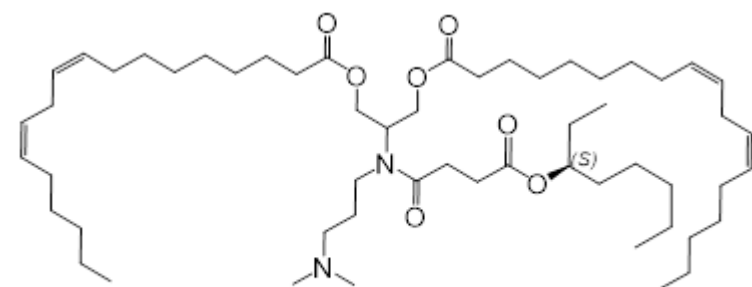
(Lípido 9)

**Lípido 9**

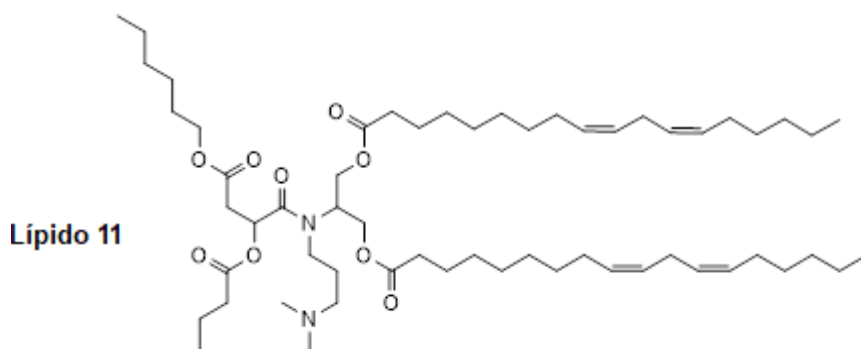
(Lípido 10)

**Lípido 10**

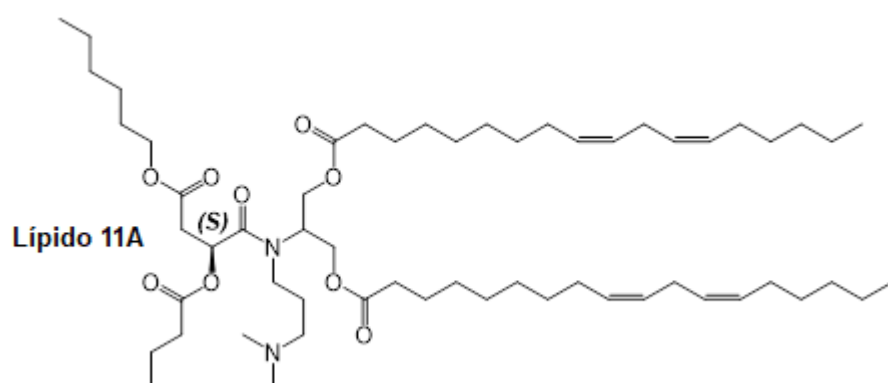
(Lípido 10A)

**Lípido 10A**

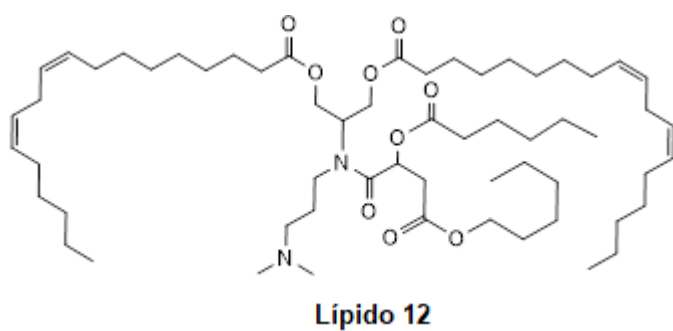
(Lípido 11)

**Lípido 11**

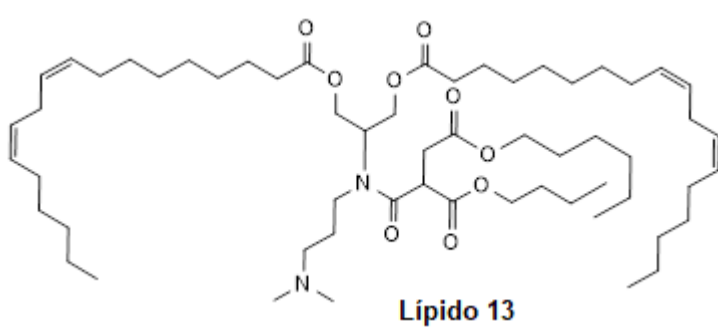
(Lípido 11A)



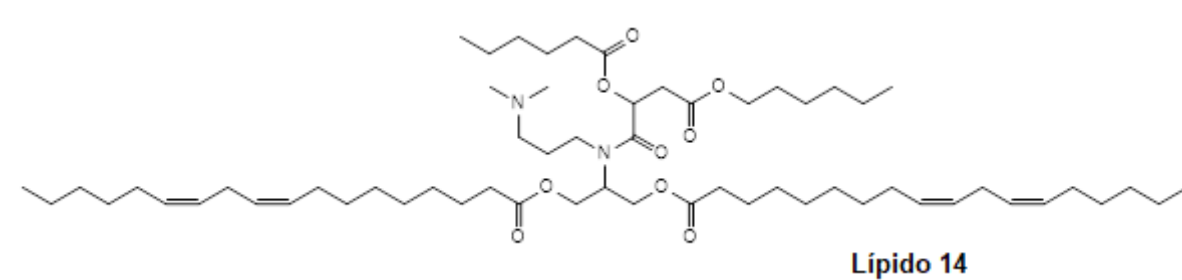
(Lípido 12)



(Lípido 13)

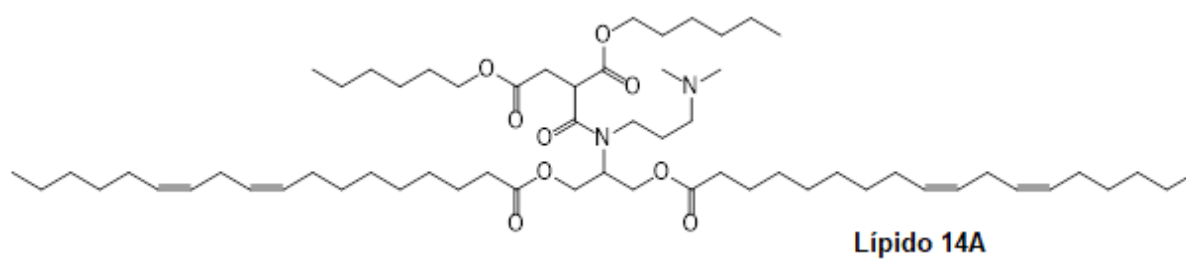


(Lípido 14)



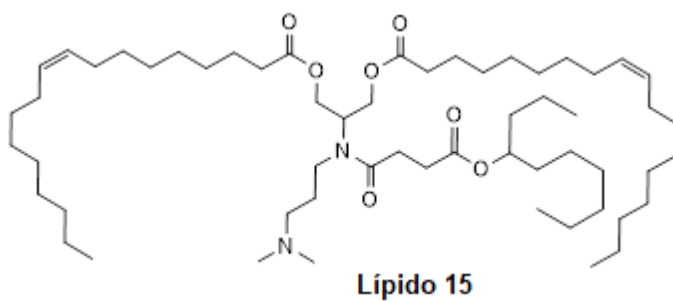
(Lípido 14A)

5



(Lípido 15)

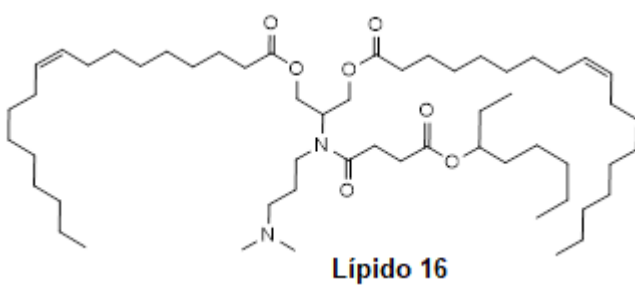
10



15

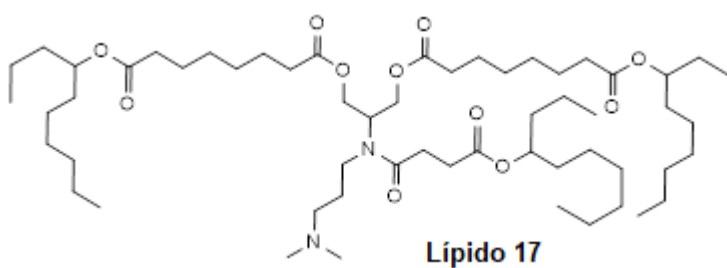
(Lípido 16)

20



(Lípido 17)

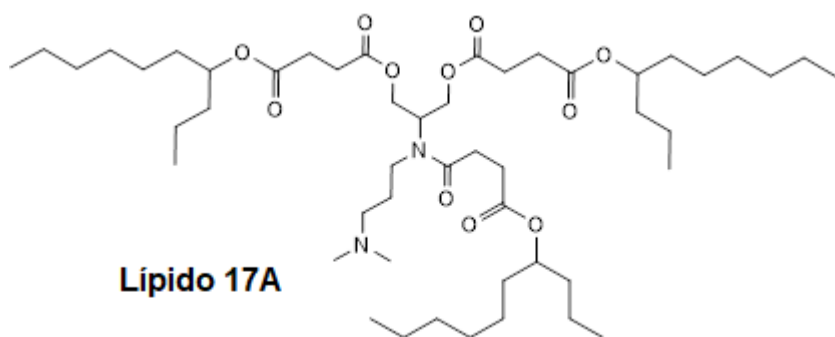
25



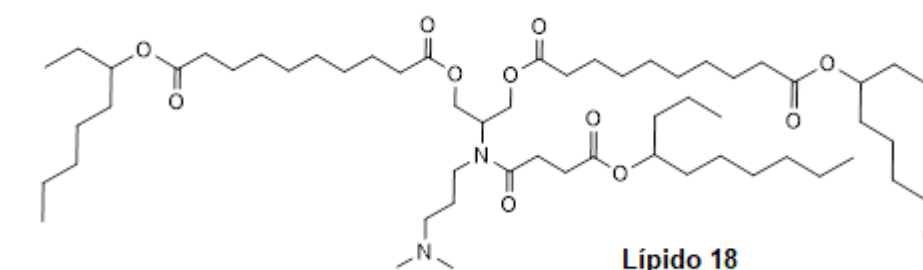
30

35

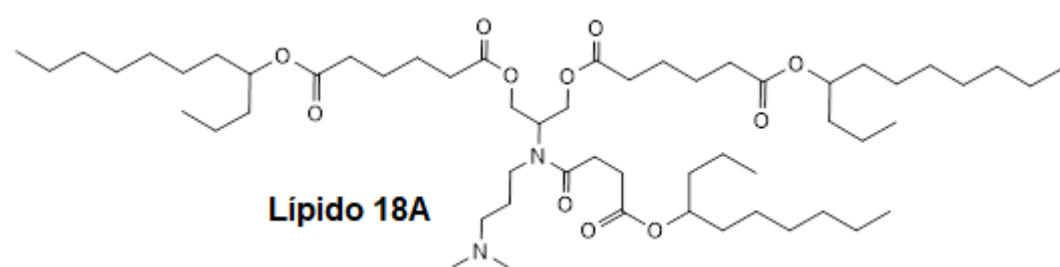
(Lípido 17A)

**Lípido 17A**

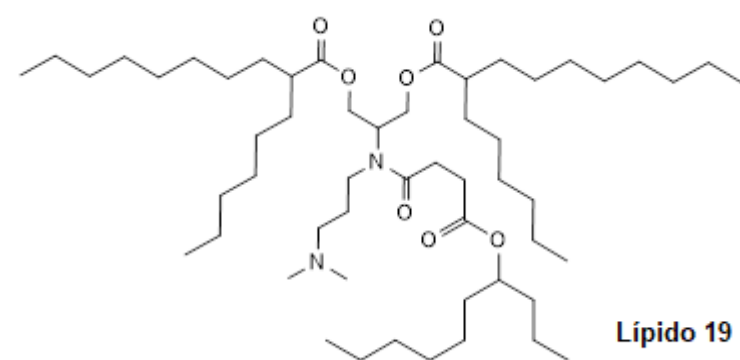
(Lípido 18)

**Lípido 18**

(Lípido 18A)

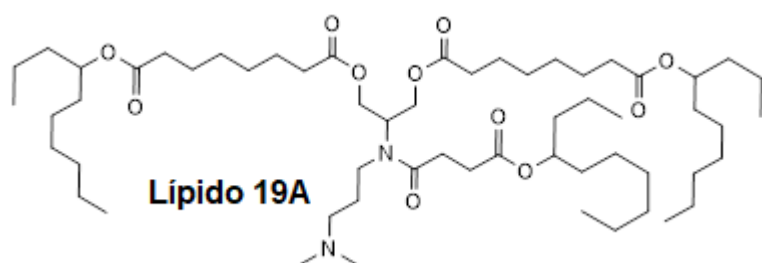
**Lípido 18A**

(Lípido 19)

**Lípido 19**

(Lípido 19A)

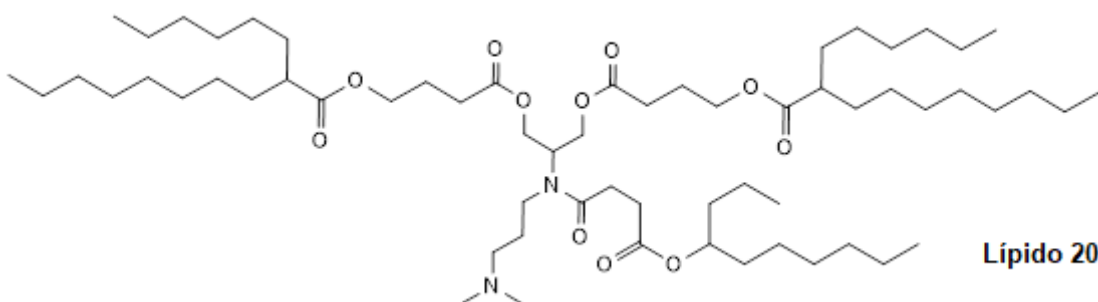
5



(Lípido 20)

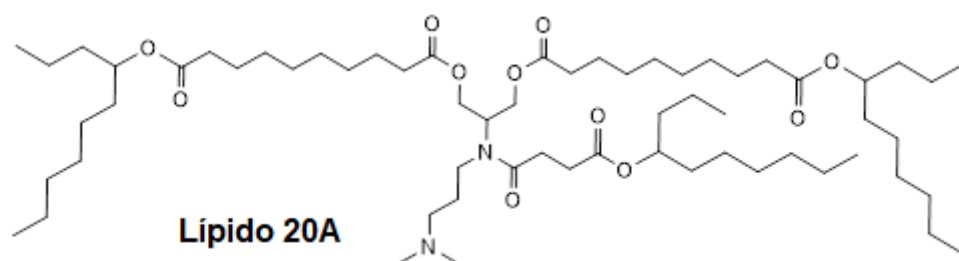
10

15



(Lípido 20A)

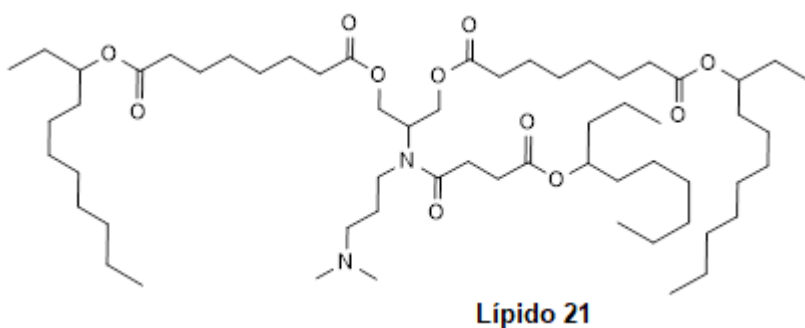
20



(Lípido 21)

25

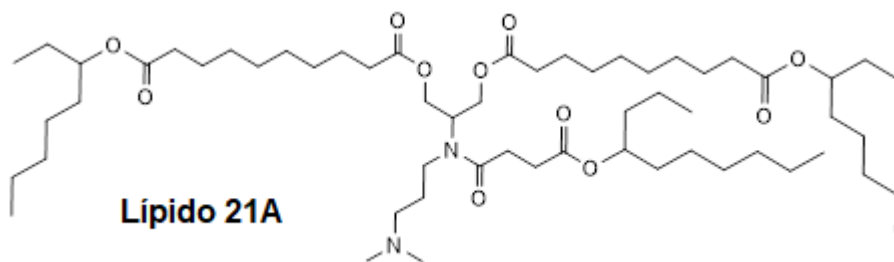
30



35

(Lípido 21A)

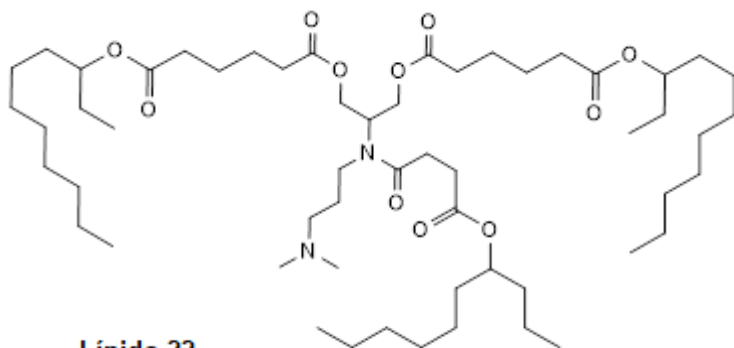
5

Lípido 21A

(Lípido 22)

10

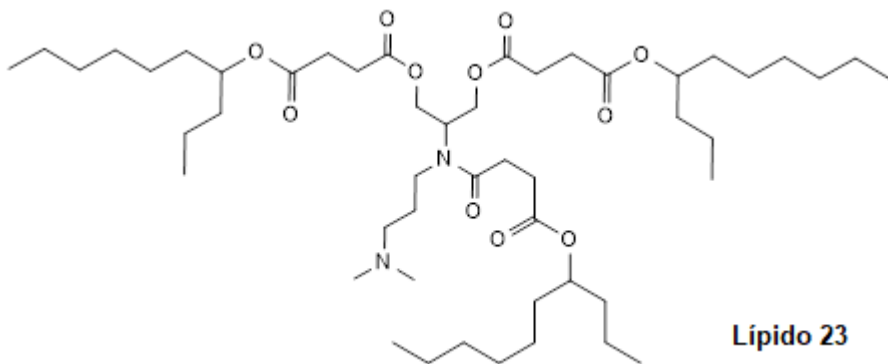
15

Lípido 22

(Lípido 23)

20

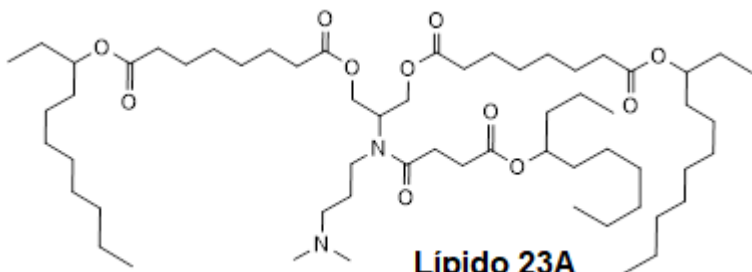
25

Lípido 23

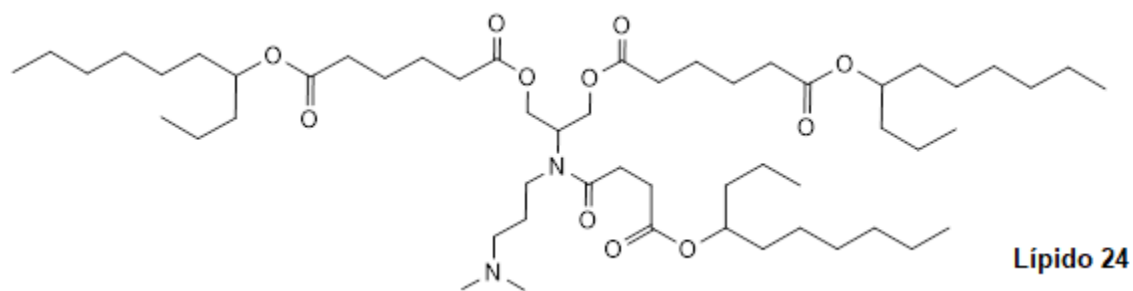
(Lípido 23A)

30

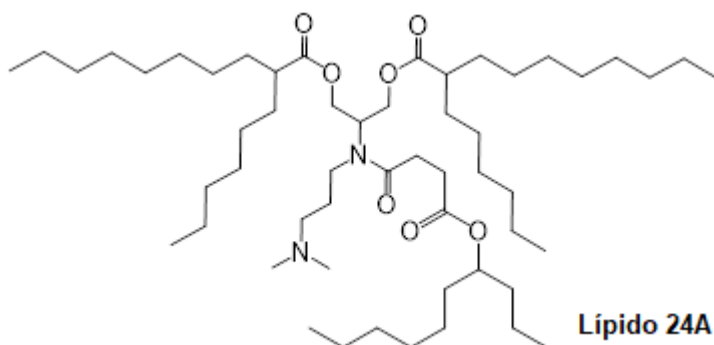
35

Lípido 23A

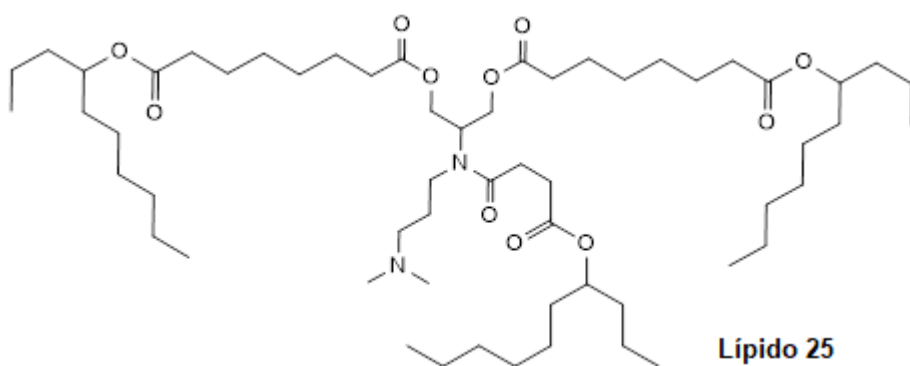
(Lípido 24)



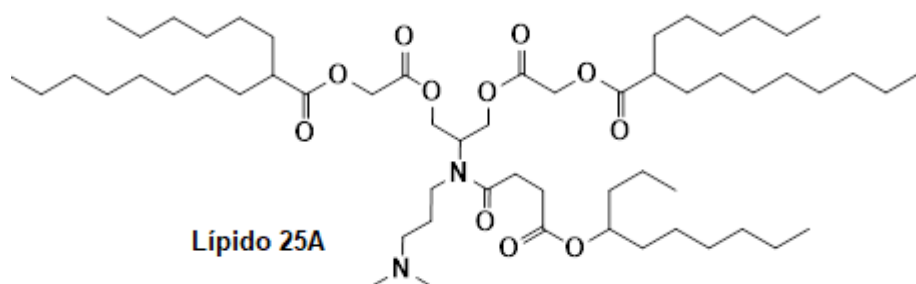
(Lípido 24A)



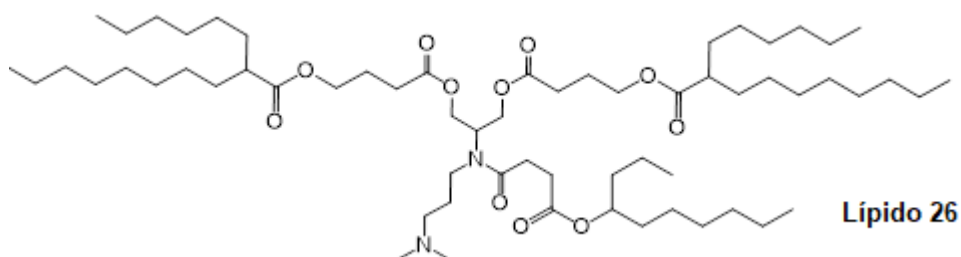
(Lípido 25)



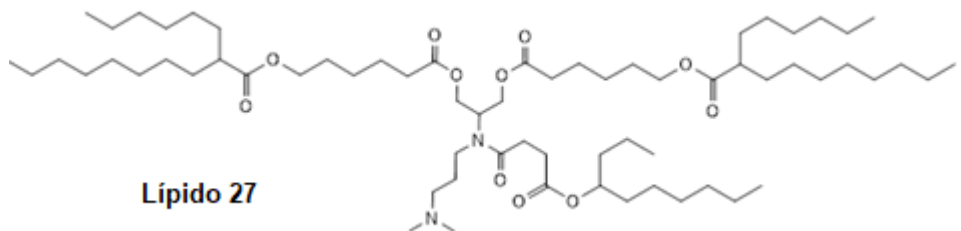
(Lípido 25A)



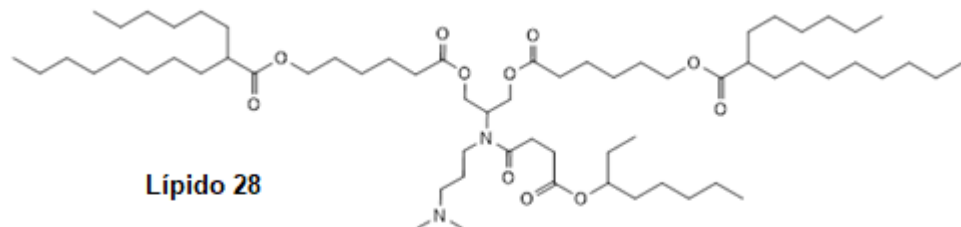
(Lípido 26)

**Lípido 26**

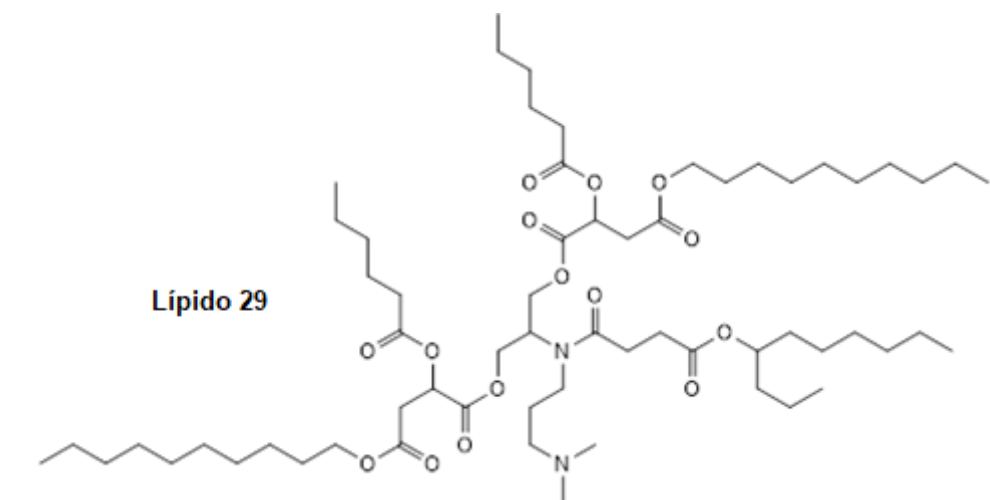
(Lípido 27)

**Lípido 27**

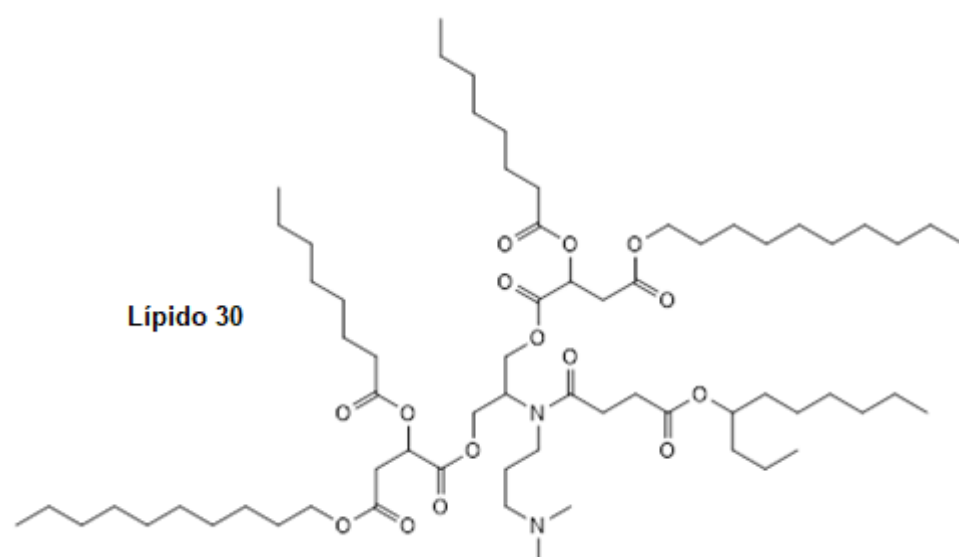
(Lípido 28)

**Lípido 28**

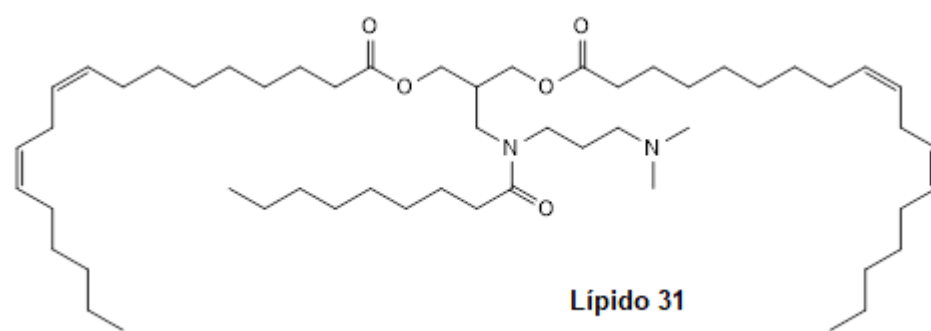
(Lípido 29)

**Lípido 29**

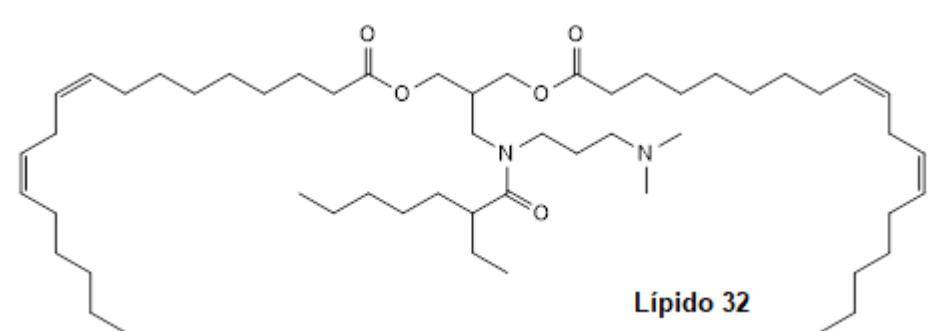
(Lípido 30)



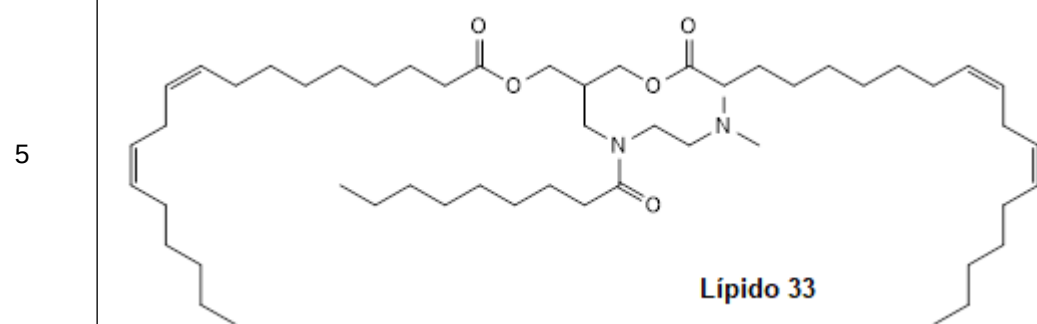
(Lípido 31)



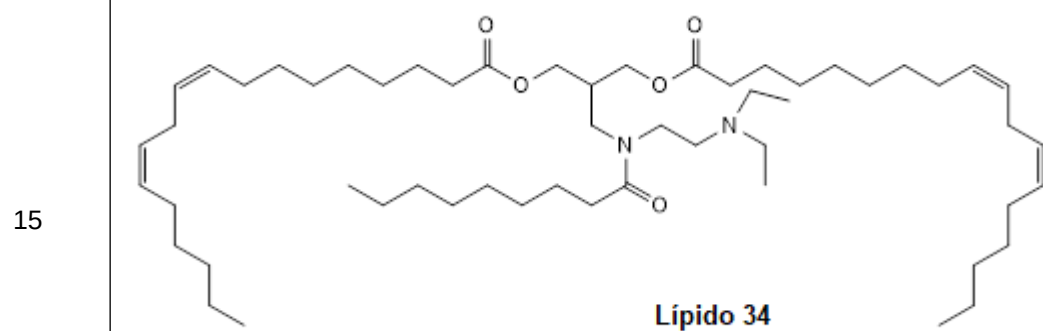
(Lípido 32)



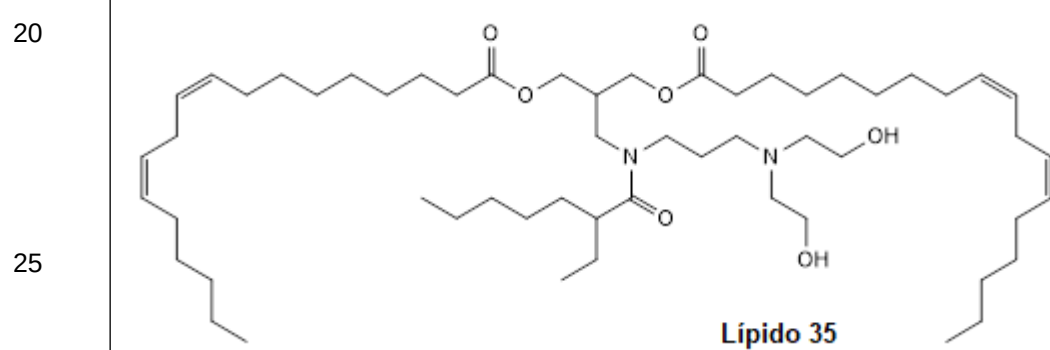
(Lípido 33)



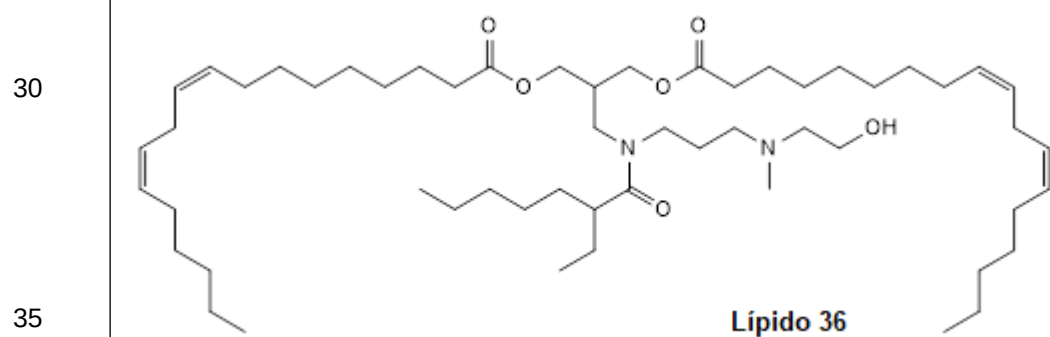
(Lípido 34)



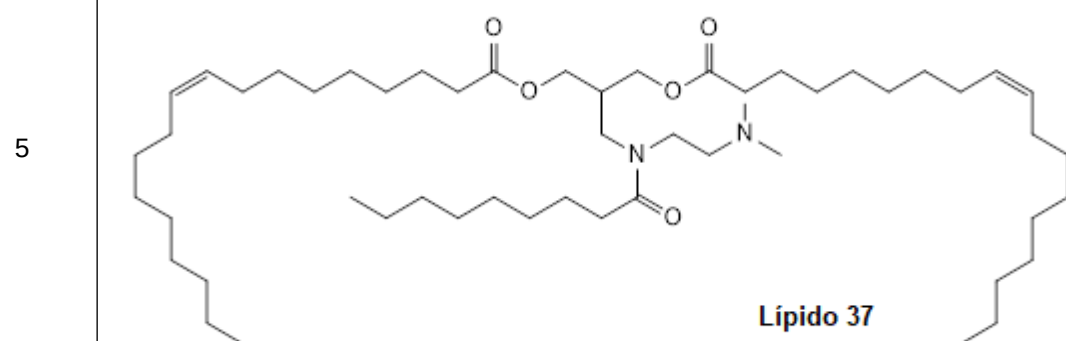
(Lípido 35)



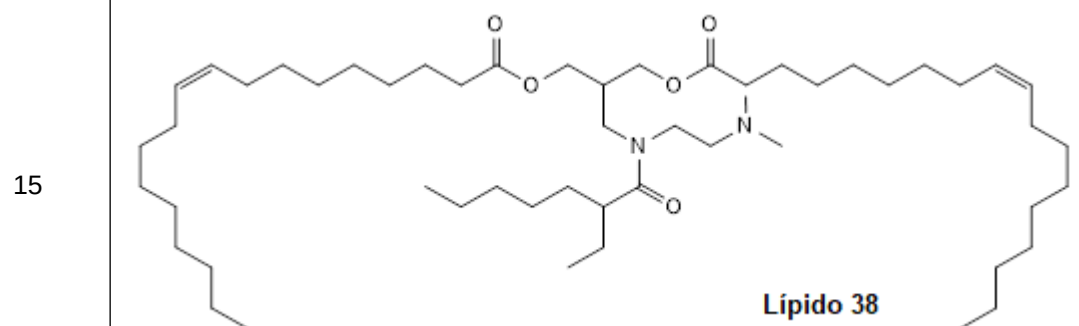
(Lípido 36)



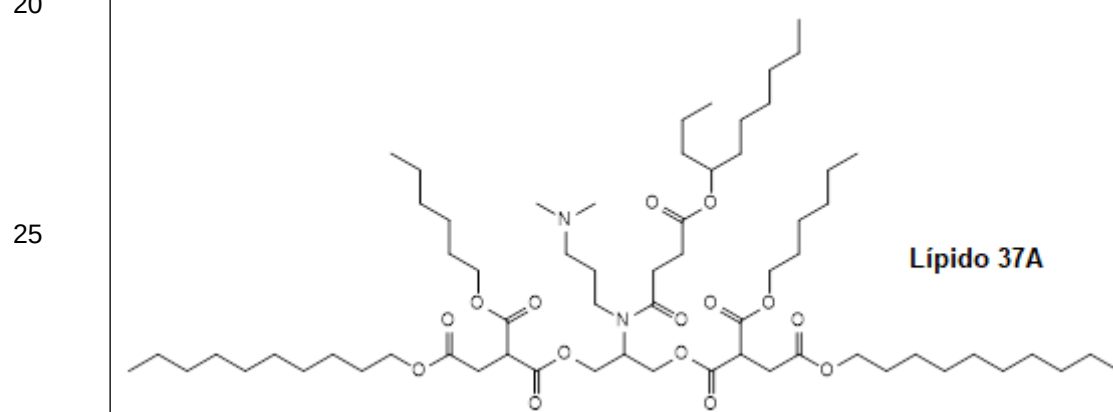
(Lípido 37)



(Lípido 38)

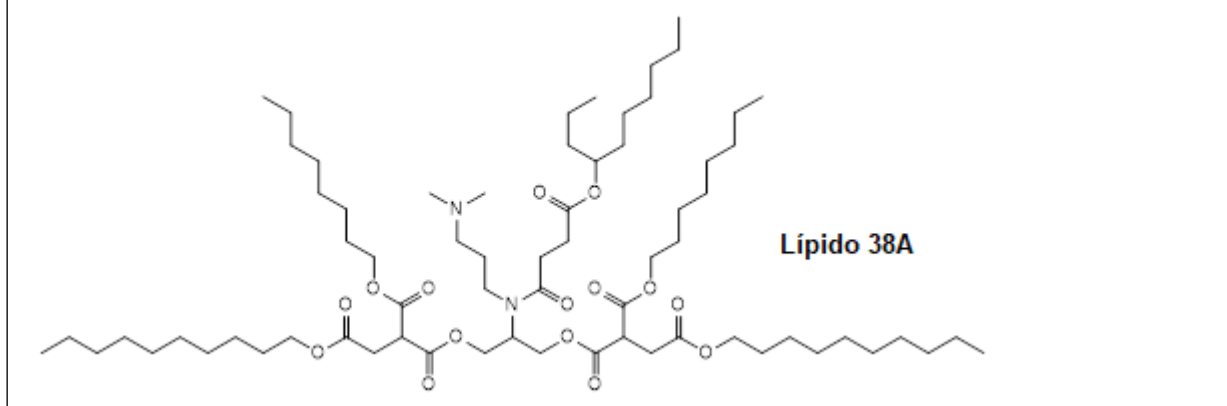


(Lípido 37A)



35

(Lípido 38A)



Cualquier variación o realización de R^1 , R^2 , R^3 , R^{1A} , R^{2A} , R^{3A} , R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , R^{3A3} , R^{a1} , R^{a2} , R^{3B} , R^{3B1} , R^{3B2} , R^{3B3} , R^{s1} , R^{s2} , R^{s3} , R^{s4} , R^{s5} , R^{s6} , R^{s7} , R^{s8} , R^{s9} , R^{s10} , R^{s11} , R^{s12} , R^{s13} , R^{s14} , o R^{s15} proporcionada en la presente memoria puede combinarse con cualquier otra variación o realización de R^1 , R^2 , R^3 , R^{1A} , R^{2A} , R^{3A} , R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , R^{3A3} , R^{a1} , R^{a2} , R^{3B} , R^{3B1} , R^{3B2} , R^{3B3} , R^{s1} , R^{s2} , R^{s3} , R^{s4} , R^{s5} , R^{s6} , R^{s7} , R^{s8} , R^{s9} , R^{s10} , R^{s11} , R^{s12} , R^{s13} , R^{s14} , o R^{s15} , como si cada combinación se hubiera descrito individualmente y específicamente.

Las LNP pueden formularse usando los métodos y otros componentes que se describen a continuación en las secciones siguientes.

IV. COMPOSICIONES DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

La invención proporciona una composición de nanopartículas lipídicas (LNP) que comprende una mezcla lipídica que contiene un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria y/o un conjugado de lípido-agente de direccionamiento a células inmunes descrito en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la mezcla lipídica puede comprender un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria y uno o más de un estero, un fosfolípido neutro, un PEG-lípido y un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes descrito.

En ciertas realizaciones, el lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria puede estar presente en la mezcla lipídica en un rango de 30-70 por ciento en moles, 30-60 por ciento en moles, 30-50 por ciento en moles, 40-70 por ciento en moles, 40-60 por ciento en moles, 40-50 por ciento en moles, 50-70 por ciento en moles, 50-60 por ciento en moles, o de aproximadamente 30 por ciento en moles, aproximadamente 35 por ciento en moles, aproximadamente 40 por ciento en moles, aproximadamente 45 por ciento en moles, aproximadamente 50 por ciento en moles, aproximadamente 55 por ciento en moles, aproximadamente 60 por ciento en moles, aproximadamente 65 por ciento en moles, o aproximadamente 70 por ciento en moles.

ESTEROL

En ciertas realizaciones, la mezcla lipídica de la nanopartícula lipídica puede comprender un componente estero, por ejemplo, uno o más esterole seleccionados del grupo que consiste en

colesterol, fecosterol, β -sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, estigmastanol, brasicasterol. En determinadas realizaciones, el esteroles es colesterol.

El esteroles (p. ej., colesterol) puede estar presente en la mezcla lipídica en un rango de 20-70 por ciento en moles, 20-60 por ciento en moles, 20-50 por ciento en moles, 30-70 por ciento en moles, 30-60 por ciento en moles, 30-50 por ciento en moles, 40-70 por ciento en moles, 40-60 por ciento en moles, 40-50 por ciento en moles, 50-70 por ciento en moles, 50-60 por ciento en moles, o aproximadamente 20 por ciento en moles, aproximadamente 25 por ciento en moles, aproximadamente 30 por ciento en moles, aproximadamente 35 por ciento en moles, aproximadamente 40 por ciento en moles, aproximadamente 45 por ciento en moles, aproximadamente 50 por ciento en moles, aproximadamente 55 por ciento en moles, aproximadamente 60 mol por ciento o aproximadamente 65 por ciento en moles.

FOSFOLÍPIDO NEUTRO

En ciertas realizaciones, la mezcla lipídica de la nanopartícula lipídica puede contener uno o más fosfolípidos neutros. El fosfolípido neutro puede seleccionarse del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), esfingomielina (SM).

Otros fosfolípidos neutros pueden seleccionarse del grupo que consiste en diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-glicero-fosfocolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), dioleoil-glicero-fosfoetanolamina (DOPE), dilinoleoil-glicero-fosfocolina (DLPC), dimiristoil-glicero-fosfocolina (DMPC), dioleoil-glicero-fosfocolina (DOPC), dipalmitoil-glicero-fosfocolina (DPPC), diundecanoil-glicero-fosfocolina (DUPC), palmitoil-oleoil-glicero-fosfocolina (POPC), dioctadecenil-glicero-fosfocolina, oleoil-colesterilhemisuccinoil-glicero-fosfocolina, hexadecil-glicero-fosfocolina, dilinolenoil-glicero-fosfocolina, diaraquidonoil-glicero-3-fosfocolina, didocosahexaenoil-glicero-fosfocolina, o esfingomielina.

El fosfolípido neutro puede estar presente en la mezcla lipídica en un rango de 1-10 por ciento en moles, 1-15 por ciento en moles, 1-12 por ciento en moles, 1-10 por ciento en moles, 3-15 por ciento en moles, 3-12 por ciento en moles, 3-10 por ciento en moles, 4-15 por ciento en moles, 4-12 por ciento en moles, 4-10 por ciento en moles, 4-8 por ciento en moles, 5-15 por ciento en moles, 5-12 por ciento en moles, 5-10 por ciento en moles, 6-15 por ciento en moles, 6-12 por ciento en moles, 6-10 por ciento en moles, o aproximadamente 1 por ciento en moles, aproximadamente 2 por ciento en moles, aproximadamente 3 por ciento en moles, aproximadamente 4 por ciento en moles, aproximadamente 5 por ciento en moles, aproximadamente 6 por ciento en moles, aproximadamente 7 por ciento en moles, aproximadamente 8 por ciento en moles, aproximadamente 9 por ciento en moles, aproximadamente 10 por ciento en moles, aproximadamente 11 por ciento en moles, aproximadamente 12 por ciento en moles, aproximadamente 13 por ciento en moles, aproximadamente 14 por ciento en moles, o aproximadamente 15 por ciento en moles.

PEG-LÍPIDO

La mezcla lipídica de la nanopartícula lipídica puede incluir uno o más PEG o lípidos modificados con PEG. Dichas especies pueden denominarse alternativamente lípidos PEGilados. Un lípido PEG es un lípido modificado con polietilenglicol. Como se ha indicado anteriormente, pueden incluirse PEG-lípidos libres en la mezcla lipídica para reducir o eliminar la unión inespecífica a través de un grupo de direccionamiento cuando se incluye en la mezcla lipídica un lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes.

Un lípido PEG puede seleccionarse del grupo no limitativo que consiste en fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilglicerol modificados con PEG y dialquiglicerol modificados con PEG. Por ejemplo, un lípido PEG puede ser PEG-dioleoilglicerol (PEG-DOG), PEG-dimiristoil-glicerol (PEG-DMG), PEG-dipalmitoil-glicerol (PEG-DPG), PEG-dilinoil-glicerol-fosfatidiletanolamina (PEG-DLPE), PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), PEG-dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DPPE), PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSG), PEG-diacilglicerol (PEG-DAG, p. ej., PEG-DMG, PEG-DPG y PEG-DSG), PEG-ceramida, PEG-diestearoil-glicerol-fosfoglicerol (PEG-DSPG), PEG-dioleoil-glicerol-fosfoetanolamina (PEG-DOPE), 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditradecilacetamida o un lípido de PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE).

En determinadas realizaciones, la mezcla puede contener un PEG-lípido libre que puede seleccionarse del grupo que consiste en PEG-diestearoil-glicerol (PEG-DSG), PEG-diacilglicerol (PEG-DAG, p. ej., PEG-DMG, PEG-DPG y PEG-DSG), PEG-dimiristoil-glicerol (PEG-DMG), PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) y PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE). En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende una diacilfosfatidilcolina que comprende una cadena Dipalmitoil (C16) o una cadena Diestearoil (C18).

El PEG-lípido puede estar presente en la mezcla lipídica en un rango de 1-10 por ciento en moles, 1-8 por ciento en moles, 1-7 por ciento en moles, 1-6 por ciento en moles, 1-5 por ciento en moles, 1-4 por ciento en moles, 1-3 por ciento en moles, 2-8 por ciento en moles, 2-7 por ciento en moles, 2-6 por ciento en moles, 2-5 por ciento en moles, 2-4 por ciento en moles, 2-3 por ciento en moles, o aproximadamente 1 por ciento en moles, aproximadamente 2 por ciento en moles, aproximadamente 3 por ciento en moles, aproximadamente 4 por ciento en moles, o aproximadamente 5 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es un PEG-lípido libre.

En algunas realizaciones, el PEG-lípido puede estar presente en la mezcla lipídica en el rango de 0.01-10 por ciento en moles, 0.01-5 por ciento en moles, 0.01-4 por ciento en moles, 0.01-3 por ciento en moles, 0.01-2 por ciento en moles, 0.01-1 por ciento en moles, 0.1-10 por ciento en moles, 0.1-5 por ciento en moles, 0.1-4 por ciento en moles, 0.1-3 por ciento en moles, 0.1-2 por ciento en moles, 0.1-1 por ciento en moles, 0.5-10 por ciento en moles, 0.5-5 por ciento en moles, 0.5-4 por ciento en moles, 0.5-3 por ciento en moles, 0.5-2 por ciento en moles, 0.5-1 por ciento en moles, 1-2 por ciento en moles, 3-4 por ciento en moles, 4-5 por ciento en moles, 5-6 por ciento en moles, o 1.25-1.75 por ciento en moles. En algunas realizaciones, el PEG-lípido puede ser aproximadamente un 0.5 por ciento en moles, aproximadamente 1 por ciento en moles, aproximadamente 1.5 por ciento en moles, aproximadamente 2

por ciento en moles, aproximadamente 2.5 por ciento en moles, aproximadamente 3 por ciento en moles, aproximadamente 3.5 por ciento en moles, aproximadamente 4 por ciento en moles, aproximadamente 4.5 por ciento en moles, aproximadamente 5 por ciento en moles o aproximadamente 5.5 por ciento en moles de la mezcla lipídica. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es un PEG-lípido libre.

5 En algunas realizaciones, la longitud del anclaje lipídico del PEG-lípido es C14 (como en PEG-DMG). En algunas realizaciones, la longitud del anclaje lipídico del PEG-lípido es C16 (como en DPG). En algunas realizaciones, la longitud del anclaje lipídico del PEG-lípido es C18 (como en PEG-DSG). En algunas realizaciones, el grupo de anclaje o cabeza del PEG-lípido es diacilglicerol o fosfoetanolamina. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es un PEG-lípido libre.

10 Una LNP de la presente divulgación puede comprender uno o más PEG-lípido libre que no está conjugado con un grupo de direccionamiento a células inmunes, y un PEG-lípido que está conjugado con un grupo de direccionamiento a células inmunes. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido o un lípido diferente que el lípido en el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes.

15 **CONJUGADO DEL GRUPO DE DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS INMUNES**

En ciertas realizaciones, la mezcla lipídica también puede incluir un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes.

El conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes puede estar presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.001-0.5 por ciento en moles, 0.001-0.1 por ciento en moles, 0.01-0.5 por ciento en moles, 0.05-0.5 por ciento en moles, 0.1-0.5 por ciento en moles, 0.1-0.3 por ciento en moles, 0.1-0.2 por ciento en moles, 0.2-0.3 por ciento en moles, aproximadamente 0.01 por ciento en moles, aproximadamente 0.05 por ciento en moles, aproximadamente 0.1 por ciento en moles, aproximadamente 0.15 por ciento en moles, aproximadamente 0.2 por ciento en moles, aproximadamente 0.25 por ciento en moles, aproximadamente 0.3 por ciento en moles, aproximadamente 0.35 por ciento en moles, aproximadamente 0.4 por ciento en moles, aproximadamente 0.45 por ciento en moles o aproximadamente 0.5 por ciento en moles.

Además de los lípidos presentes en la mezcla lipídica, las composiciones de LNP pueden comprender además una carga útil, por ejemplo, una carga útil descrita a continuación en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la carga útil es un ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, por ejemplo, un ARNm, ARN de transferencia (ARNt), un microARN o un ARN de interferencia pequeño (ARNsi).

En ciertas realizaciones, el número de nucleótidos en el ácido nucleico es de aproximadamente 400 a aproximadamente 6.000.

PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

35 En algunas realizaciones, las LNP se producen usando bien mezclado rápido con un agitador vórtex orbital o mediante mezclado microfluídico. El mezclado por agitador vórtex orbital se consigue mediante la adición rápida de una solución de lípidos en etanol a la solución acuosa de un ácido nucleico de interés, seguida inmediatamente de agitación con vórtex a 2.500 rpm. En algunas realizaciones, las

LNP se producen usando una etapa de mezclado microfluídico. En algunas realizaciones, el mezclado microfluídico se consigue mezclando las corrientes acuosa y orgánica a velocidades de flujo controladas en un canal microfluídico usando, p. ej., un dispositivo NanoAssemblr y chips microfluídicos con geometría de cámara de mezcla optimizada (Precision Nanosystems, Vancouver, BC). En algunas realizaciones, las LNP se producen usando una etapa de mezclado microfluídico para mezclar rápidamente la solución lipídica etanólica y la solución acuosa de ácido nucleico, lo que resulta en la encapsulación del ácido nucleico en las nanopartículas lipídicas sólidas. A continuación, se intercambia el tampón de la suspensión de nanopartículas a un tampón totalmente acuoso usando un dispositivo de filtración por membrana para eliminar el etanol y madurar las nanopartículas.

En ciertas realizaciones, las composiciones de LNP resultantes comprenden una mezcla lipídica que contiene, por ejemplo, de aproximadamente 40 por ciento en moles a aproximadamente 60 por ciento en moles de uno o más lípidos catiónicos ionizables descritos en la presente memoria, de aproximadamente 35 por ciento en moles a aproximadamente 50 por ciento en moles de uno o más esteroides, de aproximadamente 5 por ciento en moles a aproximadamente 15 por ciento en moles de uno o más lípidos neutros, y de aproximadamente 0.5 por ciento en moles a aproximadamente 5 por ciento en moles de uno o más PEG-lípidos.

PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Las características de una composición de LNP pueden depender de los componentes, de sus cantidades absolutas o relativas, contenidos en una composición de nanopartículas lipídicas (LNP). Las características también pueden variar dependiendo del método y las condiciones de preparación de la composición de LNP.

Las composiciones de LNP pueden caracterizarse por una variedad de métodos. Por ejemplo, puede usarse microscopía (p. ej., microscopía electrónica de transmisión o microscopía electrónica de barrido) para examinar la morfología y la distribución de tamaños de una composición de LNP. La dispersión dinámica de la luz o la potenciometría (p. ej., valoraciones potenciométricas) pueden usarse para medir los potenciales zeta. La dispersión dinámica de la luz también puede utilizarse para determinar el tamaño de las partículas. También pueden usarse instrumentos tales como el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para medir múltiples características de una composición de LNP, tales como el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial zeta. La eficiencia del ARN encapsulado se determina mediante una combinación de métodos basados en colorantes de unión al ARN (ribogreen, cybergreen para determinar la fracción de ARN accesible al colorante) y la desformulación de la LNP seguida de un análisis por HPLC del contenido total de ARN.

En algunas realizaciones, la LNP puede tener un diámetro medio en el rango de 1-250 nm, 1-200 nm, 1-150 nm, 1-100 nm, 50-250 nm, 50-200 nm, 50-150 nm, 50-100 nm, 75-250 nm, 75-200 nm, 75-150 nm, 75-100 nm, 100-250 nm, 100-200 nm, 100-150 nm. En ciertas realizaciones, las composiciones de LNP pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 1 nm, aproximadamente 10 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 30 nm, aproximadamente 40 nm, aproximadamente 50 nm,

aproximadamente 60 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 80 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 130 nm, aproximadamente 140 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 160 nm, aproximadamente 170 nm, aproximadamente 180 nm, aproximadamente 190 nm, o aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, la LNP tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm.

En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, muestran un cambio en el diámetro promedio después de congelación-descongelación de menos del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, o 40 %. En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, muestran un cambio en el diámetro promedio después de congelación-descongelación de menos del 30 %. En algunas realizaciones, la congelación-descongelación y las mediciones del diámetro se llevan a cabo con sacarosa al 10 % en tampón MES pH 6.5.

En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, muestran un cambio en el diámetro promedio después de la inserción del anticuerpo de direccionamiento de menos del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, o 40 %. En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, muestran un cambio en el diámetro promedio después de la inserción del anticuerpo de direccionamiento de menos del 15 %. En algunas realizaciones, el cambio en el diámetro después de la inserción del anticuerpo de direccionamiento se mide en MES pH 6.5 MES usando una incubación a 37 °C durante 4 horas.

En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un diámetro promedio de la LNP de menos de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200 nm. En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un diámetro promedio de la LNP de menos de 100 nm.

Alternativamente o adicionalmente las composiciones de LNP pueden tener un índice de polidispersidad en un rango de 0.05-1, 0.05-0.75, 0.05-0.5, 0.05-0.4, 0.05-0.3, 0.05-0.2, 0.08-1, 0.08-0.75, 0.08-0.5, 0.08-0.4, 0.08-0.3, 0.08-0.2, 0.1-1, 0.1-0.75, 0.1-0.5, 0.1-0.4, 0.1-0.3, 0.1-0.2. En ciertas realizaciones, el índice de polidispersidad está en el rango de 0.1-0.25, 0.1-0.2, 0.1-0.19, 0.1-0.18, 0.1-0.17, 0.1-0.16, o 0.1-0.15.

En algunas realizaciones, las composiciones de LNP o las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen una polidispersidad de menos de 0.4, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, o 0.05. En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la

presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen una polidispersidad de menos de 0.25.

Alternativamente o adicionalmente, las composiciones de LNP pueden tener un potencial zeta de aproximadamente -30 mV a aproximadamente +30 mV. En ciertas realizaciones, la composición de LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +20 mV. El potencial zeta puede variar en función del pH. Como resultado, en ciertas realizaciones, las composiciones de LNP pueden tener un potencial zeta de aproximadamente 0 mV a aproximadamente + 30 mV o de aproximadamente +10 mV a + 30 mV o de aproximadamente + 20 mV a aproximadamente + 30 mV a pH 5.5 o pH 5, y/o un potencial zeta de aproximadamente -30 mV a aproximadamente + 5 mV o de aproximadamente - 20 mV a aproximadamente + 15 mV a pH 7.4.

En algunas realizaciones, las composiciones de LNP o las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un Potencial Zeta a pH 7.4 mayor de -10, -9, -8, -7, -6, -5.5, -5, -4.5, -4, -3.5, -3, -2.5, -2, -1.5, -1, o -0.5 mV. En algunas realizaciones, las composiciones de LNP o las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un Potencial Zeta a pH 7.4 mayor de -10 mV. En algunas realizaciones, las composiciones de LNP o las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un Potencial Zeta a pH 7.4 mayor de -1 mV. En algunas realizaciones, las composiciones de LNP o las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un Potencial Zeta a pH 5.5 mayor de -1, 0, 1, 2, 3, 4, 4.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, o 25 mV. En algunas realizaciones, las composiciones de LNP o las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un Potencial Zeta a pH 5.5 mayor de 5 mV. En algunas realizaciones, las composiciones de LNP o las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, tienen un Potencial Zeta a pH 5.5 mayor de 15 mV.

V. CARGA ÚTIL

Las composiciones de LNP pueden comprender un agente, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico para su administración a una célula (p. ej., una célula inmune) o tejido, por ejemplo, una célula (p. ej., una célula inmune) o tejido de un sujeto.

Las composiciones de LNP de la presente invención pueden incluir un ácido nucleico, por ejemplo, un ADN o ARN, tal como un ARNm, ARNt, microARN, ARNsi, ARNg (ARN guía), ARNcirc (ARN circular), ribozimas, ARN señuelo o ARNsi de sustrato dicer. Se contempla que los ácidos nucleicos pueden contener componentes naturales, tales como bases, azúcares o grupos de enlace naturales (p. ej., grupos de enlace fosfodiéster) o pueden contener componentes o modificaciones no naturales (p. ej., grupos de enlace tioéster). Por ejemplo, el ácido nucleico puede sintetizarse para contener

modificaciones de bases, azúcares y enlaces conocidos por los expertos en la técnica. Además, los ácidos nucleicos pueden ser lineales o circulares, o tener cualquier configuración deseada. Las composiciones de LNP pueden incluir múltiples moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, múltiples moléculas de ARN, que pueden ser iguales o diferentes.

En ciertas realizaciones, la carga útil es un ARNm. En ciertas realizaciones, una composición de LNP particular puede contener varias moléculas de ARNm que pueden ser iguales o diferentes. En ciertas realizaciones, una o más composiciones de LNP que incluyen uno o más ARNm diferentes pueden combinarse, y/o ponerse en contacto simultáneamente, con una célula. Se contempla que un ARNm puede incluir uno o más de un tallo bucle, un nucleósido de terminación de cadena, una secuencia poliA, una señal de poliadenilación, y/o una estructura de cubierta en 5'. El ARNm puede codificar un receptor, tal como un receptor de antígeno quimérico (CAR), para su uso en, por ejemplo, un trastorno inmune, un trastorno inflamatorio o cáncer. Además, el ARNm puede codificar un antígeno para su uso en una vacuna terapéutica o profiláctica, por ejemplo, para tratar o prevenir una infección por un patógeno, por ejemplo, un patógeno microbiano o viral, o para reducir o mejorar los efectos secundarios causados directa o indirectamente por dicha infección.

En ciertas realizaciones, la composición de LNP puede incluir uno o más de otros componentes, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, pequeñas moléculas hidrófobas, agentes terapéuticos, carbohidratos, polímeros, moléculas potenciadoras de la permeabilidad y agentes alteradores de la superficie.

En algunas realizaciones, la relación peso/peso del componente lipídico con respecto a la carga útil (p. ej., ARNm) en la composición de LNP resultante es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1. En ciertas realizaciones, la relación peso/peso del componente lipídico con respecto a la carga útil (p. ej., ARNm) en la composición resultante es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 50:1. En ciertas realizaciones, la relación peso/peso es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 40:1. En ciertas realizaciones, la relación peso/peso es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1. En ciertas realizaciones, la relación peso/peso es de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 25:1.

En ciertas realizaciones, la eficiencia de encapsulación de la carga útil (p. ej., ARNm) en las nanopartículas lipídicas es de al menos el 50 %. En ciertas realizaciones, la eficiencia de encapsulación es de al menos el 80 %, al menos el 90 % o superior al 90 %.

En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, presentan una eficiencia de encapsulación mayor del 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 82.5, 85, 87.5, 90, 92.5, 95, 97.5, o 99 %. En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, presentan una eficiencia de encapsulación mayor del 87.5%. En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, presentan un ARN accesible al colorante de menos del 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 17.5, 15, 12.5, 10, 7.5, 5, 2.5, o 1 %. En algunas

realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, presentan un ARN accesible al colorante de menos del 12.5 %.

En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, presentan una recuperación de ARNm total mayor del 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 %. En algunas realizaciones, las LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, preparadas y caracterizadas usando métodos descritos en la presente memoria, presentan una recuperación de ARNm total mayor del 80 %.

CARGA ÚTIL DE ARN

En ciertas realizaciones, la carga útil de ARN es un ARNm, ARNt, microARN o ARNsi.

En ciertas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas están optimizadas para la administración de ARN, p. ej., ARNm, a una célula diana para su traducción dentro de la célula. Un ARNm puede ser un ARNm natural o no natural. Un ARNm puede incluir una o más nucleobases, nucleósidos o nucleótidos modificados.

Las nucleobases pueden seleccionarse del grupo no limitativo que consiste en adenina, guanina, uracilo, citosina, 7-metilguanina, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, timina, pseudouracilo, dihidrouracilo, N1-metilpseudouracilo, hipoxantina y xantina. En algunas realizaciones, la nucleobase es N1-metilpseudouracilo.

Un nucleósido de un ARNm es un compuesto que incluye una molécula de azúcar (p. ej., un azúcar de 5 carbonos o 6 carbonos, tal como pentosa, ribosa, arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa o un derivado desoxi de los mismos) en combinación con una nucleobase. Un nucleósido puede ser un nucleósido canónico (p. ej., adenosina, guanosina, citidina, uridina, 5-metiluridina, desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina, desoxiuridina y timidina) o un análogo del mismo y puede incluir una o más sustituciones o modificaciones.

Un nucleótido de un ARNm es un compuesto que contiene un nucleósido y un grupo fosfato o grupo alternativo (p. ej., boranofosfato, tiofosfato, selenofosfato, fosfonato, grupo alquilo, amidato y glicerol). Un nucleótido puede ser un nucleótido canónico (p. ej., monofosfatos de adenosina, guanosina, citidina, uridina, 5-metiluridina, desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina, desoxiuridina y timidina) o un análogo de los mismos y puede incluir una o más sustituciones o modificaciones incluyendo, pero no limitado a, sustituciones alquilo, arilo, halo, oxo, hidroxilo, alquiloxi y/o tio; uno o más anillos fusionados o abiertos; oxidación; y/o reducción de la nucleobase, azúcar, y/o fosfato o componente alternativo. Un nucleótido puede incluir uno o más grupos fosfato o alternativos. Por ejemplo, un nucleótido puede incluir un nucleósido y un grupo trifosfato. Un "nucleósido trifosfato" (p. ej., guanosina trifosfato, adenosina trifosfato, citidina trifosfato y uridina trifosfato) puede referirse al nucleósido trifosfato canónico o a un análogo o derivado del mismo y puede incluir una o más sustituciones o modificaciones como se describe en la presente memoria.

Un ARNm puede incluir una región no traducida en 5', una región no traducida en 3' y/o una secuencia codificante o de traducción. Un ARNm puede incluir cualquier número de pares de bases, incluyendo decenas, cientos o miles de pares de bases. Cualquier número (p. ej., todos, algunos o ninguno) de nucleobases, nucleósidos o nucleótidos puede ser un análogo de una especie canónica, sustituido, modificado o de otro modo no natural. En ciertas realizaciones, todas las nucleobases de un tipo particular pueden estar modificadas. Por ejemplo, toda la citosina de un ARNm puede ser 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, una o más o todas las bases de uridina pueden ser N1-metilpseudouridinas.

En ciertas realizaciones, un ARNm puede incluir una estructura de cubierta en 5', un nucleótido de terminación de cadena, un tallo bucle, una secuencia poliA y/o una señal de poliadenilación.

Una estructura de cubierta o especie de cubierta es un compuesto que incluye dos moléculas de nucleósido unidas por un enlazador y puede seleccionarse de una cubierta natural, una cubierta no natural o un análogo de cubierta. Una especie de cubierta puede incluir uno o más nucleósidos modificados y/o restos enlazadores. Por ejemplo, una cubierta natural de ARNm puede incluir un nucleótido de guanina y un nucleótido de guanina (G) metilado en la posición 7 unido por un enlace trifosfato en sus posiciones 5', p. ej., m7G(5')ppp(5')G, comúnmente escrito como m7GpppG. Una especie de cubierta también puede ser un análogo de cubierta anti-inverso. Una lista no limitativa de posibles especies de cubierta incluye m7GpppG, m7Gpppm7G, m73'dGpppG, m7Gpppm7G, m73'dGpppG, y m27 02'GppppG.

Alternativamente o adicionalmente, un ARNm puede incluir un nucleósido de terminación de cadena. Por ejemplo, un nucleósido de terminación de cadena puede incluir aquellos nucleósidos desoxigenados en las posiciones 2' y/o 3' de su grupo de azúcar. Dichas especies pueden incluir 3'-desoxiadenosina (cordicepina), 3'-desoxiuridina, 3'-desoxicitosina, 3'-desoxiguanosina, 3'-desoxitimina y 2',3'-dideoxinucleósidos, tales como 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxiuridina, 2',3'-didesoxicitosina, 2',3'-didesoxiguanosina y 2',3'-didesoxitimina.

Alternativamente o adicionalmente, un ARNm puede incluir un tallo bucle, tal como un tallo bucle de histona. Un tallo bucle puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más pares de bases de nucleótidos. Por ejemplo, un tallo bucle puede incluir 4, 5, 6, 7 u 8 pares de bases de nucleótidos. Un tallo bucle puede estar localizado en cualquier región de un ARNm. Por ejemplo, un tallo bucle puede estar localizado en, antes o después de una región no traducida (una región no traducida en 5' o una región no traducida en 3'), una región codificante o una secuencia o cola poliA.

Alternativamente o adicionalmente, un ARNm puede incluir una secuencia poliA y/o una señal de poliadenilación. Una secuencia poliA puede estar compuesta en su totalidad o en su mayor parte por nucleótidos de adenina o análogos o derivados de los mismos. Una secuencia poliA puede ser una cola localizada adyacente a una región no traducida en 3' de un ARNm.

Un ARNm puede codificar cualquier polipéptido de interés, incluido cualquier polipéptido natural o no natural o modificado de otro modo. Un polipéptido codificado por un ARNm puede tener cualquier tamaño y puede tener cualquier estructura secundaria o actividad. En algunas realizaciones, un

polipéptido codificado por un ARNm puede tener un efecto terapéutico cuando se expresa en una célula. En algunas realizaciones, el ARNm puede codificar un anticuerpo, enzima, factor de crecimiento, hormona, citoquina, proteína viral (p. ej., una proteína de cápside viral), antígeno, vacuna o receptor. En algunas realizaciones, el ARNm puede codificar un receptor diseñado por ingeniería tal como un CAR o un antígeno para su uso en una vacuna terapéutica (p. ej., una vacuna contra el cáncer) o una vacuna profiláctica (p. ej., una vacuna para minimizar el riesgo o la gravedad de una infección por un patógeno microbiano o viral). En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de regular la respuesta inmune en la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido capaz de reprogramar la célula inmune. En algunas realizaciones, el ARNm codifica un receptor sintético de células T (sinTCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Una composición lipídica puede diseñarse para una o más aplicaciones o dianas específicas. Por ejemplo, una composición de LNP puede diseñarse para administrar ARNm a una célula, tejido, órgano, sistema o grupo de los mismos particulares del cuerpo de un mamífero, tal como el sistema renal. Las propiedades fisicoquímicas de las composiciones de LNP pueden alterarse con el fin de aumentar la selectividad para un sitio diana particular en un sujeto. Por ejemplo, el tamaño de las partículas puede ajustarse en función de los tamaños de fenestración de los distintos órganos. El ARNm incluido en una composición de LNP también puede depender de la diana o dianas de administración deseadas. Por ejemplo, un ARNm puede seleccionarse para una indicación, afección, enfermedad o trastorno particular y/o para su administración a una célula, tejido, órgano o sistema o grupo de los mismos particulares (p. ej., administración localizada o específica).

La cantidad de ARNm en una composición lipídica puede depender del tamaño, la secuencia y otras características del ARNm. La cantidad de ARNm en una LNP también puede depender del tamaño, la composición, la diana deseada y otras características de la composición de LNP. Las cantidades relativas de ARNm y otros elementos (p. ej., lípidos) también pueden variar. La cantidad de ARNm en una composición de LNP puede medirse, por ejemplo, usando espectroscopia de absorción (p. ej., espectroscopia ultravioleta-visible).

En algunas realizaciones, el uno o más ARNm, lípidos y polímeros y las cantidades de los mismos pueden seleccionarse para proporcionar una relación N:P específica (la relación de grupos amina (N = nitrógeno) del lípido o polímero cargados positivamente y grupos fosfato (P) del ácido nucleico cargados negativamente). La relación N:P de la composición se refiere a la relación molar entre los átomos de nitrógeno de uno o más lípidos y el número de grupos fosfato de un ARNm. En general, se prefiere una relación N:P más baja. La relación N:P puede depender de un lípido específico y de su pKa. En ciertas realizaciones, el ARNm y la composición de LNP, y/o sus cantidades relativas pueden seleccionarse para proporcionar una relación N:P de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1. En ciertas realizaciones, la relación N:P puede ser, por ejemplo, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 u 8:1. En ciertas realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1. En ciertas realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 4:1. En otras realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 4:1 a

aproximadamente 8:1. Por ejemplo, la relación N:P puede ser aproximadamente 4:1, aproximadamente 4.5:1, aproximadamente 4.6:1, aproximadamente 4.7:1, aproximadamente 4.8:1, aproximadamente 4.9:1, aproximadamente 5.0:1, aproximadamente 5.1:1, aproximadamente 5.2:1, aproximadamente 5.3:1, aproximadamente 5.4:1, aproximadamente 5.5:1, aproximadamente 5.6:1, aproximadamente 5.7:1, aproximadamente 6.0:1, aproximadamente 6.5:1, o aproximadamente 7.0:1.

La cantidad de ARNm en una composición de nanopartículas puede depender del tamaño, la secuencia y otras características del ARNm. La cantidad de ARNm en una composición de nanopartículas también puede depender del tamaño, la composición, la diana deseada y otras características de la composición de nanopartículas. Las cantidades relativas de ARNm y otros elementos (p. ej., lípidos) también pueden variar. En algunas realizaciones, la relación peso/peso del componente lipídico con respecto al ARNm en una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 50:1, tal como 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, y 50:1. Por ejemplo, la relación peso/peso del componente lipídico con respecto a un ARNm puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1. La cantidad de ARNm en una composición de nanopartículas puede medirse, por ejemplo, usando espectroscopia de absorción (p. ej., espectroscopia ultravioleta-visible).

La eficiencia de encapsulación de un ARNm describe la cantidad de ARNm que queda encapsulado o asociado de otro modo a una composición lipídica tras la preparación, en relación con la cantidad inicial proporcionada. La eficiencia de encapsulación es deseablemente alta (p. ej., cercana al 100 %). La eficiencia de encapsulación puede medirse, por ejemplo, comparando la cantidad de ARNm en una solución que contiene la composición lipídica antes y después de romper la composición de LNP con uno o más disolventes orgánicos o detergentes. La fluorescencia puede usarse para medir la cantidad de ARNm libre en una solución. Para las composiciones de LNP de la invención, la eficiencia de encapsulación de un ARNm puede ser de al menos el 50 %, por ejemplo, el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En ciertas realizaciones, la eficiencia de encapsulación puede ser de al menos el 80 %.

VI. FORMULACIÓN Y MODO DE ADMINISTRACIÓN

Las composiciones de LNP de la invención pueden formularse total o parcialmente como una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables o ingredientes auxiliares tales como los descritos en la presente memoria. Las directrices generales para la formulación y fabricación de composiciones y agentes farmacéuticos están disponibles, por ejemplo, en Remington's (2006) *supra*. Los excipientes e ingredientes auxiliares convencionales pueden usarse en cualquier composición farmacéutica de la invención, excepto en la medida en que cualquier excipiente o ingrediente auxiliar convencional pueda ser incompatible con uno o más componentes de una composición de LNP de la invención. Un excipiente o ingrediente auxiliar puede ser incompatible con un componente de una composición de LNP si su combinación con el componente puede dar lugar a cualquier efecto biológico indeseable o a un efecto nocivo de otro tipo.

En algunas realizaciones, uno o más excipientes o ingredientes auxiliares pueden constituir más del 50 % de la masa o volumen total de una composición farmacéutica que incluya una composición de LNP de la invención. Por ejemplo, uno o más excipientes o ingredientes auxiliares pueden constituir el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, el excipiente está aprobado para su uso en seres humanos y para uso veterinario, por ejemplo, por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. En ciertas realizaciones, el excipiente es de grado farmacéutico. En ciertas realizaciones, un excipiente cumple con los estándares de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

Las cantidades relativas de uno o más lípidos o LNP, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica variarán, dependiendo de la identidad, tamaño, y/o condición del sujeto tratado y además dependiendo de la vía por la que se va a administrar la composición.

Las composiciones lipídicas y/o composiciones farmacéuticas que incluyen una o más composiciones de LNP pueden administrarse a cualquier sujeto, incluyendo un paciente humano que pueda beneficiarse de un efecto terapéutico proporcionado por la administración de un ácido nucleico, p. ej., un ARN (p. ej., ARNm, ARNt o ARNsi) a una o más células, tejidos, órganos o sistemas o grupos de los mismos particulares, tales como el sistema renal. Aunque las descripciones proporcionadas en la presente memoria de composiciones de LNP y composiciones farmacéuticas que incluyen composiciones de LNP se dirigen principalmente a composiciones que son adecuadas para la administración a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para la administración a cualquier otro mamífero. Se entiende la modificación de composiciones adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación puede prepararse, envasarse y/o venderse a granel, como una dosis unitaria única y/o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Tal y como se usa en la presente memoria, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo (p. ej., la carga útil).

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en una variedad de formas adecuadas para una variedad de vías y métodos de administración. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse en formas de dosificación líquidas (p. ej., emulsiones, microemulsiones, nanoemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires), formas inyectables, formas de dosificación sólidas (p. ej., cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos), formas de dosificación para administración tópica y/o transdérmica (p. ej., pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, aerosoles, inhalantes y parches), suspensiones, polvos y otras formas.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral y parenteral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, nanoemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires

farmacéuticamente aceptables. Además de los ingredientes activos, las formas de dosificación líquidas pueden comprender diluyentes inertes de uso común en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato etílico, acetato etílico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saporíferos y/o perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse según la técnica conocida usando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. En la preparación de inyectables pueden usarse ácidos grasos tales como el ácido oleico.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retenga bacterias, y/o incorporando agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas estériles que puedan disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Otros Componentes

Además, se contempla que las composiciones farmacéuticas puedan incluir uno o más componentes además de los descritos anteriormente en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir una o más moléculas potenciadoras de la permeabilidad, carbohidratos, polímeros, agentes terapéuticos, agentes alteradores de la superficie u otros componentes. Una molécula potenciadora de la permeabilidad puede ser una molécula descrita, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 2005/0222064. Los carbohidratos pueden incluir azúcares simples (p. ej., glucosa) y polisacáridos (p. ej., glucógeno y derivados y análogos del mismo).

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener un agente alterador de la superficie, incluyendo, por ejemplo, proteínas aniónicas (p. ej., albúmina sérica bovina), tensioactivos (p. ej., tensioactivos catiónicos tales como bromuro de dimetildiocetadecil-amonio), azúcares o derivados de azúcares (p. ej., ciclodextrina), polímeros (p. ej., heparina, polietilenglicol y poloxámero), agentes mucolíticos (p. ej., acetilcisteína, artemisa, bromelaína, papaína, clerodendro, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, estepronina, tiopronina, gelsolina, timosina

β4, dornasa alfa, neltexina y erdoesteína) y ADNAsas (p. ej., rhADNasa). Puede disponerse un agente alterador de la superficie dentro y/o sobre la superficie de una composición descrita en la presente memoria.

Además de estos componentes, una composición farmacéutica que contenga una composición de LNP de la invención puede incluir cualquier sustancia útil en composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables o ingredientes auxiliares tales como, pero no limitados a, uno o más disolventes, medios de dispersión, diluyentes, auxiliares de dispersión, auxiliares de suspensión, auxiliares de granulación, disgregantes, cargas, deslizantes, vehículos líquidos, aglutinantes, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, agentes tamponadores, agentes lubricantes, aceites, conservantes y otras especies. También pueden incluirse excipientes tales como ceras, mantecas, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, agentes saporíferos y perfumantes. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Remington (2006) *supra*).

Los agentes dispersantes pueden seleccionarse de la lista no limitativa que consiste en almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato sódico de almidón, arcillas, ácido alginico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato cálcico, silicatos, carbonato sódico, poli(vinilpirrolidona) reticulada (crospovidona), carboximetilalmidón sódico (glicolato sódico de almidón), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica reticulada (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa cálcica, silicato de magnesio y aluminio (VEEGUM®), laurilsulfato sódico, compuestos de amonio cuaternario y/o combinaciones de los mismos.

Los agentes tensioactivos y/o emulsionantes pueden incluir, pero no se imitan a, emulsionantes naturales (p. ej., goma arábica, agar, ácido alginico, alginato de sodio, tragacanto, condrox, colesterol, xantano, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, grasa de lana, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (p. ej., bentonita [silicato de aluminio] y VEEGUM® [silicato de aluminio y magnesio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (p. ej., alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, diestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (p. ej., carboxipolimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenano, derivados celulósicos (p. ej., carboximetilcelulosa sódica, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (p. ej., monolaurato de sorbitán polioxietilenado [TWEEN®20], sorbitán polioxietilenado [TWEEN®60], monooleato de sorbitán polioxietilenado [TWEEN®80], monopalmitato de sorbitán [SPAN®40], monoestearato de sorbitán [SPAN®60], triestearato de sorbitán [SPAN®65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitán [SPAN®80]), ésteres de polioxietileno (p. ej., monoestearato de polioxietileno [MYRJ® 45], aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, aceite de ricino polietoxilado, estearato de polioximetileno y SOLUTOL®), ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de

polietilenglicol (p. ej., CREMOPHOR®), éteres de polioxietileno, (p. ej., polioxietilen lauril éter [BRIJ® 30]), poli(vinilpirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato de sodio, PLURONIC®F 68, POLOXAMER® 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato

5 sódico y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de conservantes pueden incluir, pero no se limitan a, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes alcohólicos, conservantes ácidos y/u otros conservantes. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a,

10 alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de acorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfito de sodio. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidratado, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato sódico, ácido tartárico y/o edetato trisódico.

Los ejemplos de conservantes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio,

15 cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Los ejemplos de conservantes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato potásico, sorbato potásico, benzoato

20 sódico, propionato sódico y/o ácido sórbico. Los ejemplos de conservantes alcohólicos incluyen, pero no se limitan a, etanol, polietilenglicol, alcohol bencílico, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletílico. Los ejemplos de conservantes ácidos incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido dehidroascórbico, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero no se limitan a,

25 tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), etilendiamina, lauril sulfato sódico (SLS), lauril éter sulfato sódico (SLES), bisulfito sódico, metabisulfito sódico, sulfito potásico, metabisulfito potásico.

Los ejemplos de agentes tamponadores incluyen, pero no se limitan a, soluciones tampón de citrato, soluciones tampón de acetato, soluciones tampón de fosfato, cloruro de amonio, carbonato

30 cálcico, cloruro cálcico, citrato cálcico, glubionato cálcico, gluceptato cálcico, gluconato cálcico, ácido d-glucónico, glicerofosfato cálcico, lactato cálcico, lactobionato cálcico, ácido propanoico, levulinato cálcico, ácido pentanoico, fosfato cálcico dibásico, ácido fosfórico, fosfato cálcico tribásico, hidróxido fosfato cálcico, acetato potásico, cloruro potásico, gluconato potásico, mezclas de potasio, fosfato potásico dibásico, fosfato potásico monobásico, mezclas de fosfato potásico, acetato sódico, bicarbonato sódico,

35 cloruro sódico, citrato sódico, lactato sódico, fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico, mezclas de fosfato sódico, trometamina, tampones de aminosulfonato (p. ej., HEPES), hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua libre de pirógenos, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico y/o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas y las formulaciones de las mismas están adaptadas para la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraarterial, intratumoral o por inhalación. En ciertas realizaciones, se administra a un sujeto una dosis de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Las composiciones según la presente divulgación pueden formularse en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de una composición de la presente divulgación será decidido por un médico dentro del ámbito del buen juicio médico.

El nivel de dosis específico terapéuticamente efectivo, profilácticamente efectivo o apropiado de otro modo (p. ej., para imagenología) para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la gravedad y la identificación de un trastorno que se esté tratando, si lo hay; el uno o más ARNm empleados; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración y la tasa de excreción de la composición farmacéutica específica empleada; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con la composición farmacéutica específica empleada; y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

VII. MÉTODOS

La presente divulgación proporciona métodos para administrar una carga útil a una célula o tejido diana, por ejemplo, una célula o tejido diana en un sujeto, y LNP o composiciones farmacéuticas que contienen las LNP para su uso en dichos métodos. Cualquier divulgación en la presente memoria de un método de, p. ej., tratamiento de una enfermedad o trastorno o, p. ej., administración de un ácido nucleico a una célula o, p. ej., producción de un polipéptido de interés en una célula debe interpretarse también como una divulgación de una LNP o composición farmacéutica que comprende dicha LNP para su uso en dichos métodos.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para producir de un polipéptido de interés (p. ej., una proteína de interés) en una célula de mamífero, y LNP o composiciones farmacéuticas que contienen las LNP para su uso en dichos métodos. Los métodos para producir polipéptidos en dicha célula implican el contacto de una célula con una composición de LNP que comprende un ARN de interés (p. ej., un ARNm que codifica el polipéptido de interés (p. ej., una proteína de interés). Al entrar en contacto la célula con la composición de LNP, el ARNm puede ser captado y traducido en la célula para producir el polipéptido de interés.

En general, la etapa de contacto de una célula de mamífero con una composición de LNP que incluye un ARNm que codifica un polipéptido de interés puede realizarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La cantidad de una composición de LNP que entra en contacto con una célula, y/o la cantidad de ARNm que contiene, puede depender del tipo de célula o tejido con el que se entra en contacto, los medios de administración, las características fisicoquímicas de la composición de LNP y el ARNm (p. ej., tamaño, carga y composición química) que contiene, y otros factores. En general, una cantidad efectiva de la composición de LNP permitirá la producción eficiente del polipéptido en la célula. La métrica de la

eficiencia puede incluir la traducción del polipéptido (indicada por la expresión del polipéptido), el nivel de degradación del ARNm y los indicadores de la respuesta inmune.

La etapa de contacto de una composición de LNP que incluye un ARNm con una célula puede implicar o provocar la transfección, en la que la composición de LNP puede fusionarse con la membrana de la célula para permitir la introducción del ARNm en la célula. Una vez introducido en el citoplasma de la célula, el ARNm se traduce en una proteína o péptido a través de la maquinaria de síntesis de proteínas en el citoplasma de la célula.

En ciertas realizaciones, las composiciones de LNP descritas en la presente memoria pueden usarse para administrar agentes terapéuticos o profilácticos a un sujeto. Por ejemplo, un ARNm incluido en una composición de LNP puede codificar un polipéptido y producir el polipéptido terapéutico o profiláctico al entrar en contacto y/o introducirse (p. ej., transfección) en una célula. En ciertas realizaciones, un ARNm incluido en una composición de LNP de la invención puede codificar un polipéptido que puede mejorar o aumentar la inmunidad de un sujeto.

En ciertas realizaciones, el contacto de una célula con una composición de LNP que incluye un ARNm puede reducir la respuesta inmune innata de una célula a un ácido nucleico exógeno. Una célula puede ponerse en contacto con una primera composición de LNP que incluye una primera cantidad de un primer ARNm exógeno que incluye una región traducible y puede determinarse el nivel de la respuesta inmune innata de la célula al primer ARNm exógeno. Posteriormente, la célula puede ponerse en contacto con una segunda composición que incluye una segunda cantidad del primer ARNm exógeno, siendo la segunda cantidad una cantidad menor del primer ARNm exógeno en comparación con la primera cantidad. Alternativamente, la segunda composición puede incluir una primera cantidad de un segundo ARNm exógeno que es diferente del primer ARNm exógeno. Las etapas de contacto de la célula con las composiciones primera y segunda pueden repetirse una o más veces.

Además, la eficiencia de la producción de polipéptidos en la célula puede determinarse opcionalmente, y la célula puede volver a ponerse en contacto con la primera y/o segunda composición repetidamente hasta que se alcance una eficiencia de producción de proteínas diana.

La presente divulgación proporciona métodos para administrar un ácido nucleico (p. ej., un ARNm) a una célula o tejido de mamífero, por ejemplo, una célula o tejido de mamífero en un sujeto. La administración de un ARNm a dicha célula o tejido implica administrar una composición de LNP que incluye el ARNm a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección, p. ej., mediante inyección intramuscular o administración intravascular en el sujeto. Tras la administración, la LNP puede dirigirse y/o entrar en contacto con una célula, por ejemplo, una célula inmune, tal como una célula T. Al entrar en contacto la célula con la composición de LNP, un ARNm traducible puede traducirse en la célula para producir un polipéptido de interés.

En ciertas realizaciones, una composición de LNP de la invención puede dirigirse a un tipo o clase particular de células. Este direccionamiento puede facilitarse usando los lípidos descritos en la presente memoria para formar las LNP, que también pueden incluir un grupo de direccionamiento para dirigirse a las células de interés. En ciertas realizaciones, la administración específica puede dar lugar a

un aumento superior a 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces o 20 veces en la cantidad de ARNm en el destino diana (p. ej., células que expresan o expresan en niveles altos el receptor de interés que se une al grupo de direccionamiento a células inmunes de las LNP) en comparación con otros destinos (p. ej., células que no expresan o expresan solo en niveles bajos el receptor de interés).

Las composiciones de LNP de la invención pueden ser útiles para tratar una enfermedad, trastorno o afección caracterizada por la ausencia o aberración de la actividad de una proteína o polipéptido. Tras la administración de un ARNm que codifica el polipéptido ausente o aberrante a una célula, la traducción del ARNm puede producir el polipéptido, reduciendo o eliminando así un problema causado por la ausencia de o la actividad aberrante causada por el polipéptido. Debido a que la traducción puede ocurrir rápidamente, los métodos y composiciones de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades trastornos o condiciones agudas, tales como sepsis, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. Un ARNm incluido en una composición de LNP de la invención también puede ser capaz de alterar la tasa de transcripción de una especie determinada, afectando así a la expresión génica.

Las enfermedades, trastornos y/o afecciones caracterizadas por una actividad proteica o polipeptídica disfuncional o aberrante para las que puede administrarse una composición de la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (p. ej., fibrosis quística), enfermedades autoinmunes, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y renovasculares y enfermedades metabólicas. Múltiples enfermedades, trastornos y/o afecciones pueden caracterizarse por la ausencia de actividad proteica (o por una disminución sustancial de la misma, de modo que no se produce la función proteica adecuada). Dichas proteínas pueden no estar presentes o ser esencialmente no funcionales. Un ejemplo específico de una proteína disfuncional son las variantes de mutación sin sentido del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que producen una variante proteica disfuncional de la proteína CFTR, que causa la fibrosis quística. La presente divulgación proporciona un método para tratar dichas enfermedades, trastornos y/o afecciones en un sujeto mediante la administración de una composición de LNP que incluye un ARNm y un componente lipídico que incluye KL10, un fosfolípido (opcionalmente insaturado), un lípido PEG y un lípido estructural, en donde el ARNm codifica un polipéptido que antagoniza o supera de otro modo una actividad proteica aberrante presente en la célula del sujeto.

Las composiciones terapéuticas y/o profilácticas descritas en la presente memoria pueden administrarse a un sujeto usando cualquier cantidad razonable y cualquier vía de administración efectiva para prevenir, tratar, diagnosticar o visualizar una enfermedad, trastorno y/o afección y/o cualquier otro fin. La cantidad específica administrada a un sujeto dado puede variar dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, el propósito de la administración, la composición particular, el modo de administración y similares. Las composiciones según la presente divulgación pueden formularse en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Se entenderá,

sin embargo, que el uso diario total de una composición de la presente divulgación será decidido por un médico dentro del ámbito del buen juicio médico.

Una composición de LNP que incluye uno o más ARNm puede administrarse por diversas vías, por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular, trans o intradérmica, intradérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica, mucosal, nasal, intratumoral. En ciertas realizaciones, una composición de LNP puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intratumoral o subcutánea. Sin embargo, la presente divulgación abarca la administración de las composiciones de LNP de la invención por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los avances probables en las ciencias de la administración de fármacos. En general, la vía de administración más apropiada dependerá de una variedad de factores incluyendo la naturaleza de la composición de LNP que incluye uno o más ARNm (p. ej., su estabilidad en diversos entornos corporales tales como el torrente sanguíneo y el tracto gastrointestinal), el estado del paciente (p. ej., si el paciente es capaz de tolerar vías particulares de administración), etc.

Las composiciones de LNP que incluyen uno o más ARNm pueden usarse en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de imagenología. Por "en combinación con" no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para su administración conjunta, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden administrarse en combinación una o más composiciones de LNP que incluyan uno o más ARNm diferentes. Las composiciones pueden administrarse concurrentemente con, antes o después de, uno o más de otros procedimientos terapéuticos o médicos deseados. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un esquema de tiempo determinado para dicho agente. En algunas realizaciones, la presente divulgación abarca la administración de composiciones de la invención, o composiciones de imagenología, diagnóstico o profilácticas de las mismas en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción, y/o modifican su distribución en el cuerpo.

Se apreciará además que los agentes activos terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o imagenología utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen a niveles que no superen los niveles a los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación pueden ser inferiores a los utilizados individualmente.

La combinación particular de terapias (agentes terapéuticos o procedimientos) que se emplee en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desee conseguir. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, una composición útil para tratar el cáncer puede administrarse concurrentemente con un agente quimioterapéutico), o pueden lograr efectos diferentes (p. ej., el control de cualquier efecto adverso).

En algunas realizaciones, no más del 1 %, no más del 2 %, no más del 3 %, no más del 4 %, no más del 5 %, no más del 6 %, no más del 7 %, no más del 8 %, no más del 9 %, no más del 10 %, no más del 15 %, no más del 20 %, no más del 25 %, no más del 30 %, no más del 35 %, no más del 40 %, no más del 45 %, o no más del 50 % de las células que no están destinadas a ser el destino de la administración son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, las células que no están destinadas a ser el destino de la administración son células no inmunes del sujeto. En algunas realizaciones, las células que no están destinadas a ser el destino de la administración son células a las que no se dirige el método. En algunas realizaciones, las células que no están destinadas a ser el destino de la administración son células del sujeto a las que no se dirige el método.

En algunas realizaciones, la semivida del ácido nucleico administrado por la LNP descrita en la presente memoria a la célula inmune o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP y expresado en la célula inmune es al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces mayor que la semivida del ácido nucleico administrado por una LNP de referencia a las células inmunes o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP de referencia y expresado en la célula inmune.

En algunas realizaciones, la composición de la LNP difiere de la composición de la LNP de referencia en el tipo de lípido catiónico ionizable, la cantidad relativa de lípido catiónico ionizable, la longitud del anclaje lipídico en el lípido PEG, el núcleo o el grupo de cabeza del lípido PEG, la cantidad relativa de lípido PEG, o el tipo de grupo de direccionamiento a células inmunes, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición de la LNP difiere de la composición de la LNP de referencia únicamente en el tipo de lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la composición de la LNP difiere de la composición de la LNP de referencia únicamente en la cantidad de lípido PEG. En algunas realizaciones, la LNP de referencia comprende el lípido catiónico DLin-KC3-DMA, pero por lo demás es igual que la LNP ensayada. En algunas realizaciones, la LNP de referencia comprende el lípido catiónico DLin-KC2-DMA, pero por lo demás es igual que una LNP ensayada. En algunas realizaciones, la LNP de referencia comprende el lípido catiónico ALC-0315, pero por lo demás es igual que una LNP ensayada. En algunas realizaciones, la LNP de referencia comprende el lípido catiónico SM-102, pero por lo demás es igual que una LNP ensayada. En algunas realizaciones, el lípido PEG es un lípido PEG libre.

En algunas realizaciones, al menos el 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % de las células inmunes son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, las células inmunes son células inmunes del sujeto. En algunas realizaciones, las células inmunes son células inmunes diana del método.

En algunas realizaciones, las células inmunes son células inmunes del sujeto a las que se dirige el método.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión del ácido nucleico administrado por la LNP es de al menos el 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces superior al nivel de expresión del ácido nucleico administrado por una LNP de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide y compara con un método descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide por la relación de células que expresan el polipéptido codificado. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide con FACS. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide por la cantidad promedio del polipéptido codificado expresado en las células. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide como la intensidad media de fluorescencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide por la cantidad del polipéptido codificado u otros materiales secretados por las células.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para dirigir la administración de un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende el compuesto de la siguiente fórmula: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a una LNP o una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método para dirigir la administración de un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se divulga a continuación en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP es una LNP como se describe en la presente divulgación.

En algunas realizaciones, la LNP proporciona al menos uno de los siguientes beneficios:

- (i) especificidad incrementada de la administración dirigida a la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;
- (ii) semivida incrementada del ácido nucleico o de un polipéptido codificado por el ácido nucleico en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;
- (iii) tasa de transfección incrementada en comparación con una LNP de referencia; y

(iv) un nivel bajo de ARNm accesible al colorante (<15 %) y altas eficiencias de encapsulación del ARN, en donde se recuperó al menos un 80 % del ARNm en la formulación final en relación con el ARN total usado en la preparación del lote de LNP.

En algún aspecto, se proporcionan métodos para expresar un polipéptido de interés en una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido. En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a una LNP o una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método de expresión de un polipéptido de interés en una célula inmune diana de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se divulga a continuación en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP).

En algunas realizaciones, la LNP proporciona al menos uno de los siguientes beneficios:

(i) nivel de expresión incrementado en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(ii) especificidad de expresión incrementada en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(iii) semivida incrementada del ácido nucleico o de un polipéptido codificado por el ácido nucleico en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(iv) tasa de transfección incrementada en comparación con una LNP de referencia; y

(v) un nivel bajo de ARNm accesible al colorante (<15 %) y altas eficiencias de encapsulación del ARN, en donde se recuperó al menos un 80 % de ARNm en la formulación final en relación con el ARN total usado en la preparación del lote de LNP.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para modular la función celular de una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modular la función celular de la célula inmune. En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a

una LNP o a una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método para modular la función celular de una célula inmune diana de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad o trastorno como se divulga a continuación en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP).

En algunas realizaciones, la LNP proporciona al menos uno de los siguientes beneficios:

(i) nivel de expresión incrementado en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(ii) especificidad de expresión incrementada en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(iii) semivida incrementada del ácido nucleico o de un polipéptido codificado por el ácido nucleico en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(iv) tasa de transfección incrementada en comparación con una PNL de referencia;

(v) la LNP puede administrarse a una dosis inferior en comparación con una LNP de referencia para alcanzar el mismo efecto biológico en la célula inmune; y

(vi) un nivel bajo de ARNm accesible al colorante (<15 %) y altas eficiencias de encapsulación del ARN, en donde se recuperó al menos un 80 % del ARNm en la formulación final en relación con el ARN total usado en la preparación del lote de LNP.

En algunas realizaciones, la modulación de la función celular comprende la reprogramación de las células inmunes para iniciar una respuesta inmune. En algunas realizaciones, la modulación de la función celular comprende modular la especificidad antigénica de la célula inmune.

En algún aspecto, se proporcionan métodos para tratar, mejorar o prevenir un síntoma de un trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP) para administrar un ácido nucleico a una célula inmune del sujeto. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la LNP comprende un conjugado que comprende siguiente estructura: [Lípido] - [enlazador opcional] - [grupo de direccionamiento a células inmunes]. En algunas realizaciones, la LNP comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la LNP comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la LNP comprende un lípido polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la LNP comprende el ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico modula la respuesta inmune de la célula inmune, por lo tanto, para tratar o mejorar el síntoma. En algunas realizaciones, un aspecto de la divulgación se refiere a una LNP o una composición farmacéutica que contiene la misma, como se divulga en la presente memoria, para su uso en un método para tratar, mejorar, o prevenir un síntoma de un trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesita. Una enfermedad o trastorno puede ser como se divulga a continuación en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método como se divulga en la

presente memoria puede comprender poner en contacto in vitro o ex vivo la célula inmune de un sujeto con una nanopartícula lipídica (LNP).

En algunas realizaciones, la LNP proporciona al menos uno de los siguientes beneficios:

(i) especificidad de administración incrementada del ácido nucleico a la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(ii) semivida incrementada del ácido nucleico o de un polipéptido codificado por el ácido nucleico en la célula inmune en comparación con una LNP de referencia;

(iii) tasa de transfección incrementada en comparación con una LNP de referencia;

(iv) la LNP puede administrarse a una dosis inferior en comparación con una LNP de referencia para alcanzar la misma eficacia de tratamiento;

(v) nivel de ganancia de función incrementado por parte de una célula inmune en comparación con una LNP de referencia; y

(vi) un nivel bajo de ARNm accesible al colorante (<15 %) y altas eficiencias de encapsulación del ARN, en donde se recuperó al menos un 80 % del ARNm en la formulación final en relación con el ARN total usado en la preparación del lote de LNP.

En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno inmune, un trastorno inflamatorio o cáncer. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica un antígeno para su uso en una vacuna terapéutica o profiláctica para tratar o prevenir una infección por un patógeno.

En algunas realizaciones, no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % de las células no inmunes son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % de las células inmunes no deseadas que no están destinadas a ser el destino de la administración son transfectadas por la LNP. En algunas realizaciones, la semivida del ácido nucleico administrado por la LNP a la célula inmune o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP es al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o más que la semivida del ácido nucleico administrado por una LNP de referencia a la célula inmune o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP de referencia.

En algunas realizaciones, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o más de las células inmunes que están destinadas a ser el destino de la administración son transfectadas por la LNP.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión del ácido nucleico administrado por la LNP es al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, al menos un 10 %, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más superior al nivel de expresión del ácido nucleico en las mismas células inmunes a las que se administra una LNP de referencia.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para dirigir la administración de un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria. En algunas realizaciones, el método se dirige a células NK. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a CD56. En algunas realizaciones, el método se dirige simultáneamente a células T y células NK. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a CD7, CD8, o ambos CD7 y CD8. En algunas realizaciones, el método se dirige simultáneamente a células T CD4+ y CD8+. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un polipéptido que se une a CD3 o CD7.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para expresar un polipéptido de interés en una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la célula inmune con una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria.

En algún aspecto, se proporciona un método para modular la función celular de una célula inmune diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria.

En algunos aspectos, se proporciona un método para tratar, mejorar o prevenir un síntoma de un trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (LNP) proporcionada en la presente memoria.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con CD8 en un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es cáncer.

Las LNP divulgadas en la presente divulgación y como se reivindican son adecuadas para los métodos descritos anteriormente.

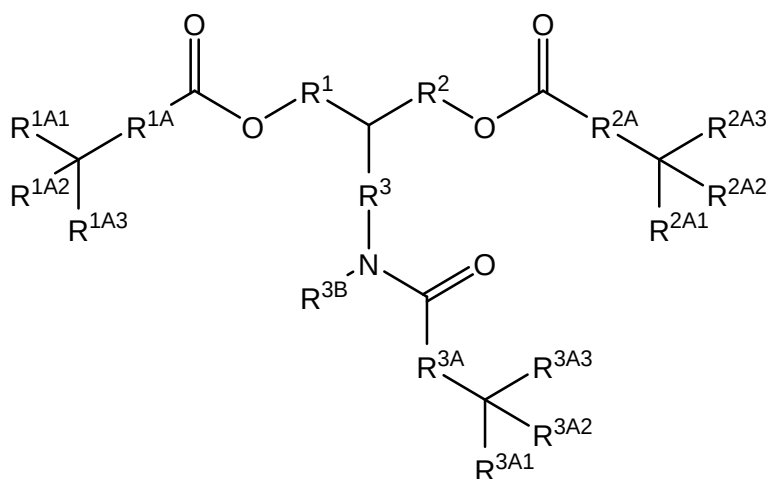
VIII. KITS PARA USO EN APLICACIONES MÉDICAS

Otro aspecto de la invención proporciona un kit para tratar un trastorno. El kit comprende: un lípido catiónico ionizable, un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes, una composición de nanopartículas lipídicas que comprende un lípido catiónico ionizable y/o un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes con o sin una carga útil encapsulada (p. ej., un ARNm), e instrucciones para tratar un trastorno médico, tal como cáncer o una infección microbiana o viral.

REALIZACIONES ENUMERADAS

Las siguientes realizaciones enumeradas son representativas de algunos aspectos de la invención.

1. Un compuesto de Fórmula (I):



(I),

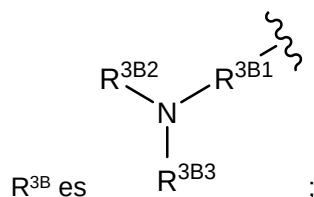
o una sal del mismo, en donde:

R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-3} ;

R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} son cada uno independientemente un enlace o alquileo C_{1-10} ;

R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-20} , alquenido C_{1-20} , $-(CH_2)_{0-10}C(O)OR^{a1}$, o $-(CH_2)_{0-10}OC(O)R^{a2}$;

R^{a1} y R^{a2} son cada uno independientemente alquilo C_{1-20} o alquenido C_{1-20} ;

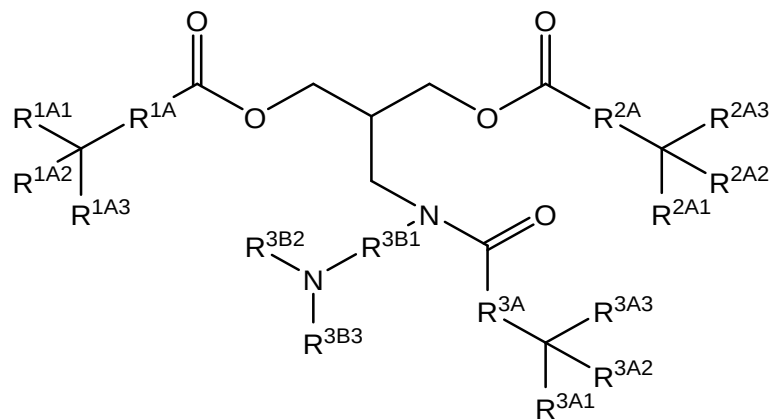


R^{3B} es

R^{3B1} es alquileo C_{1-6} ; y

R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} .

2. El compuesto de la realización 1, o una sal del mismo, en donde el compuesto es un



(Ia).

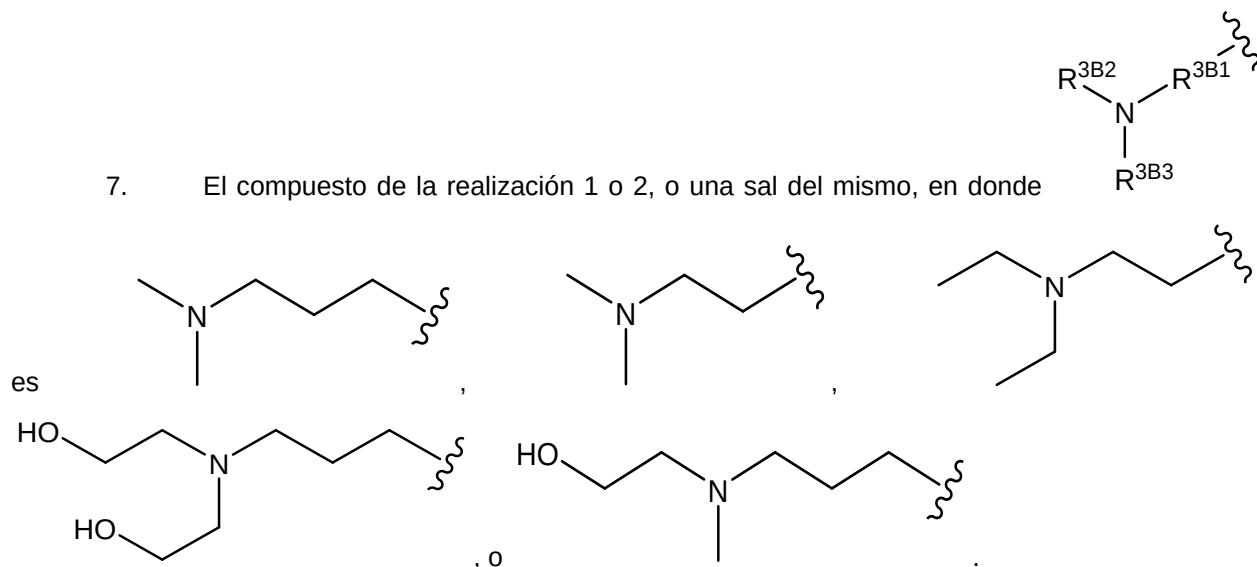
compuesto de Fórmula (Ia):

3. El compuesto de la realización 1 o 2, o una sal del mismo, en donde R^{3B1} es etileno o propileno.

4. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, o una sal del mismo, en donde R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en -OH y -O- (alquilo C_{1-6}).

5. El compuesto de la realización 4, o una sal del mismo, en donde R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno independientemente metilo o etilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más -OH.

6. El compuesto de la realización 5, o una sal del mismo, en donde R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno metilo no sustituido.

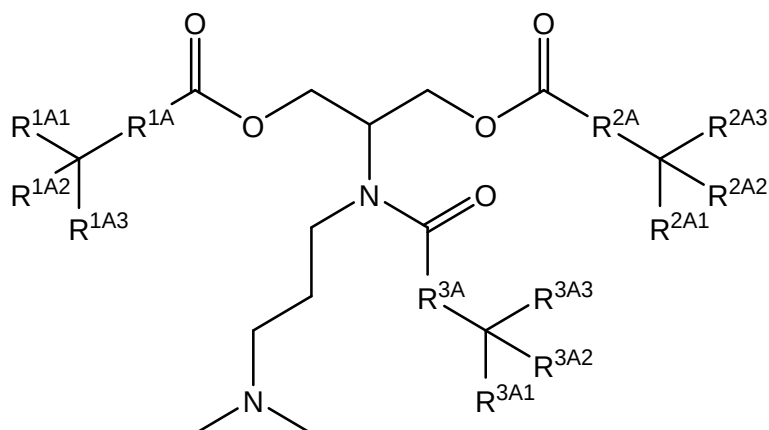


8. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, o una sal del mismo, en donde R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente un enlace o metileno.

9. El compuesto de la realización 8, o una sal del mismo, en donde R^1 y R^2 son cada uno metileno y R^3 es un enlace.

10. El compuesto de la realización 8, o una sal del mismo, en donde R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno metileno.

11. El compuesto de la realización 1, o una sal del mismo, en donde el compuesto es un



compuesto de Fórmula (Ib):

(Ib).

12. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 11, o una sal del mismo, en donde R^{1A} , R^{2A} , y R^{3A} son cada uno independientemente un enlace o $-(CH_2)_{1-10}$.

13. El compuesto de la realización 12, o una sal del mismo, en donde R^{1A} y R^{2A} son cada uno independientemente un enlace, $-CH_2-$, $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$, o $-(CH_2)_8-$.

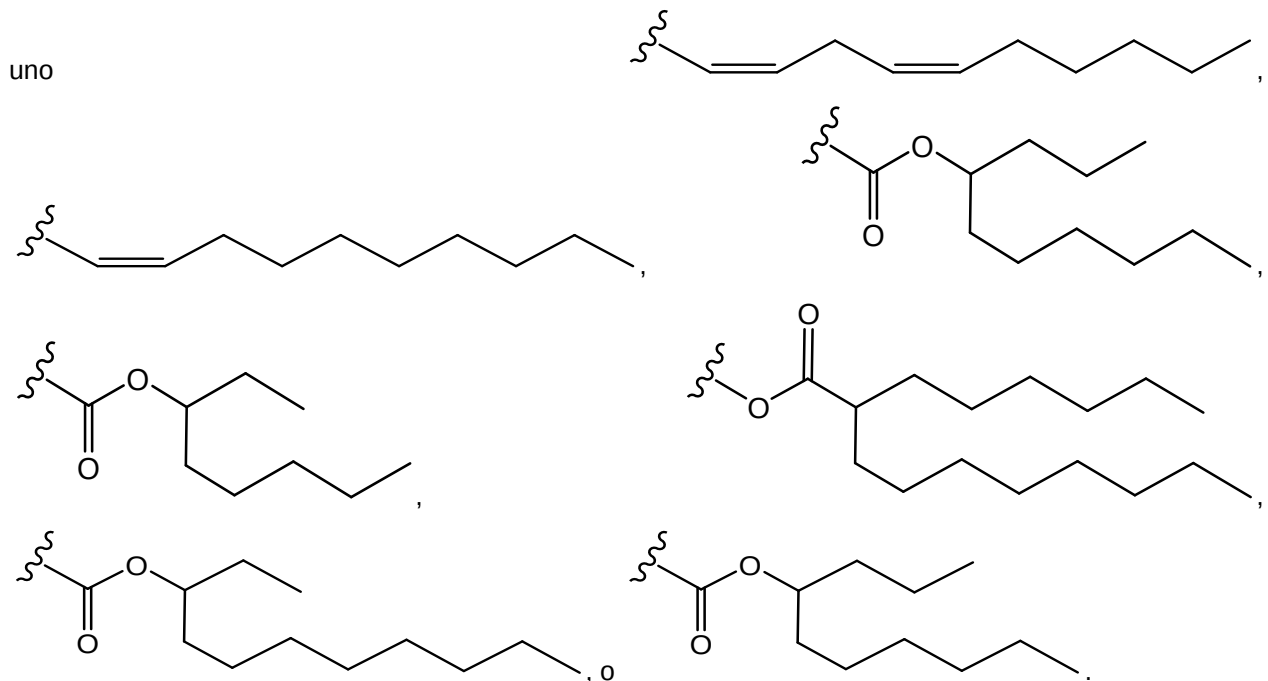
14. El compuesto de la realización 13, o una sal del mismo, en donde R^{1A} y R^{2A} son cada uno independientemente un enlace, $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$, o $-(CH_2)_8-$.

15. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 12 a 14, o una sal del mismo, en donde R^{3A} es un enlace, $-CH_2-$, $-(CH_2)_2-$, o $-(CH_2)_7-$.

16. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 15, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , y R^{2A3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-15} , $-CH=CH-$ (alquilo C_{1-15}), $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ (alquilo C_{1-10}), $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH$ (alquilo C_{1-10}) (alquilo C_{1-15}), $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH$ (alquilo C_{1-10}) (alquilo C_{1-15}), $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-15}), o $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2$ (alquilo C_{1-15}).

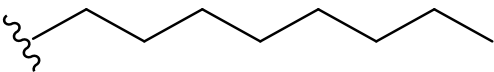
17. El compuesto de la realización 16, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno independientemente $-CH=CH-$ (alquilo C_{1-15}), $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ (alquilo C_{1-10}), $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH$ (alquilo C_{1-10}) (alquilo C_{1-15}), o $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH$ (alquilo C_{1-10}) (alquilo C_{1-15}); y R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A2} , y R^{2A3} son cada uno H.

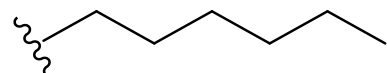
18. El compuesto de la realización 17, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada



19. El compuesto de la realización 16, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno alquilo C_{1-15} ; R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno alquilo C_{1-15} ; y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H.

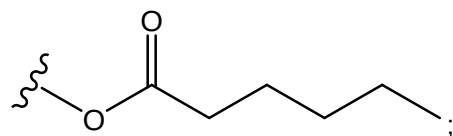
20. El compuesto de la realización 19, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada

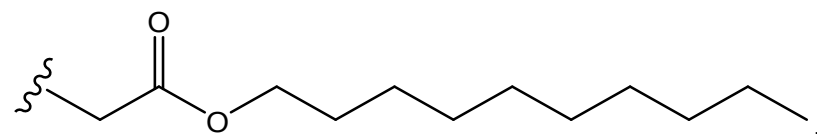
uno  ; y R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno



21. El compuesto de la realización 16, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2$ (alquilo C_{1-15}); R^{2A1} y R^{2A2} son cada uno $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-15}); y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H.

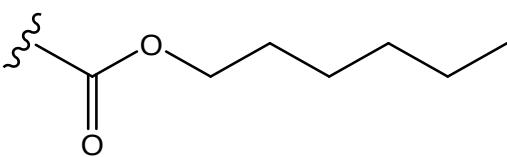
22. El compuesto de la realización 21, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada

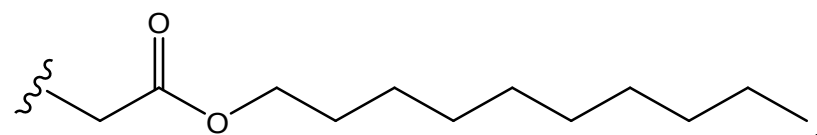
uno  ; y R^{2A1} y R^{2A2} son cada uno



23. El compuesto de la realización 16, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno $-C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-15}); R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-15}); y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H.

24. El compuesto de la realización 23, o una sal del mismo, en donde R^{1A1} y R^{2A1} son cada

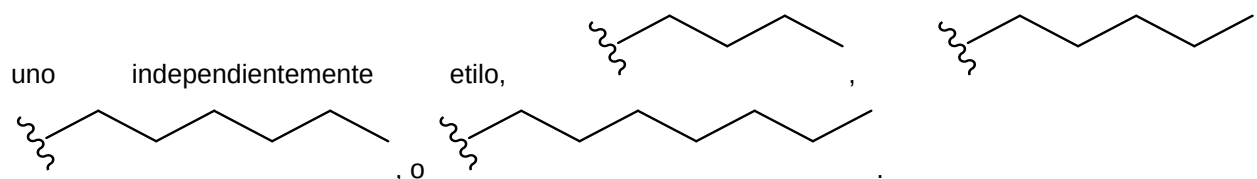
uno  ; y R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno



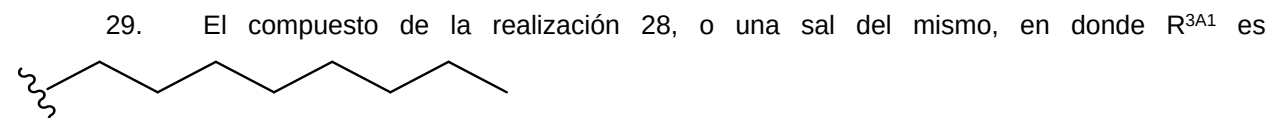
25. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 24, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno independientemente H, alquilo C_{1-15} , $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH$ (alquilo C_{1-5})(alquilo C_{1-10}), $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH$ (alquilo C_{1-5})(alquilo C_{1-10}), $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-10}), o $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2$ (alquilo C_{1-10}).

26. El compuesto de la realización 25, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} y R^{3A2} son cada uno independientemente alquilo C_{1-15} ; y R^{3A3} es H.

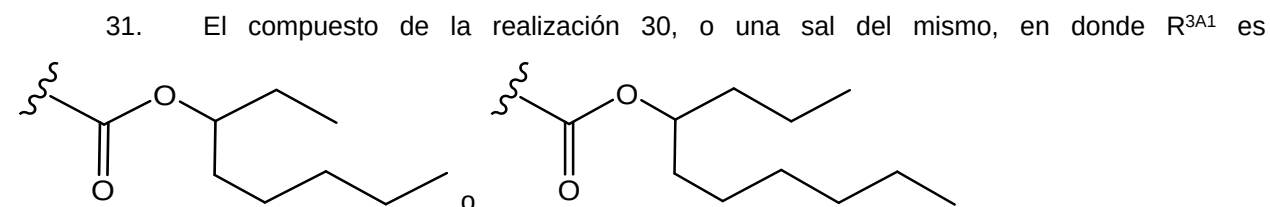
27. El compuesto de la realización 26, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} y R^{3A2} son cada



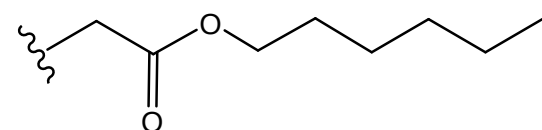
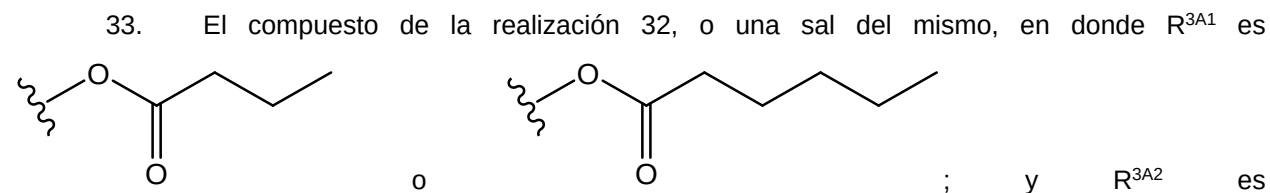
28. El compuesto de la realización 25, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} es alquilo C_{1-15} ; y R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno H.



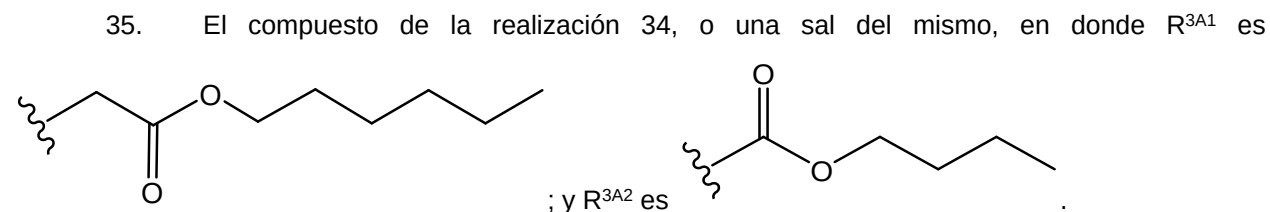
30. El compuesto de la realización 25, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} es $-C(O)OCH(\text{alquilo } C_{1-5})(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno H.



32. El compuesto de la realización 25, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} es $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; R^{3A2} es $-(CH_2)_{0-4}(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A3} es H.



34. El compuesto de la realización 25, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} es $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; R^{3A2} es $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A3} es H.

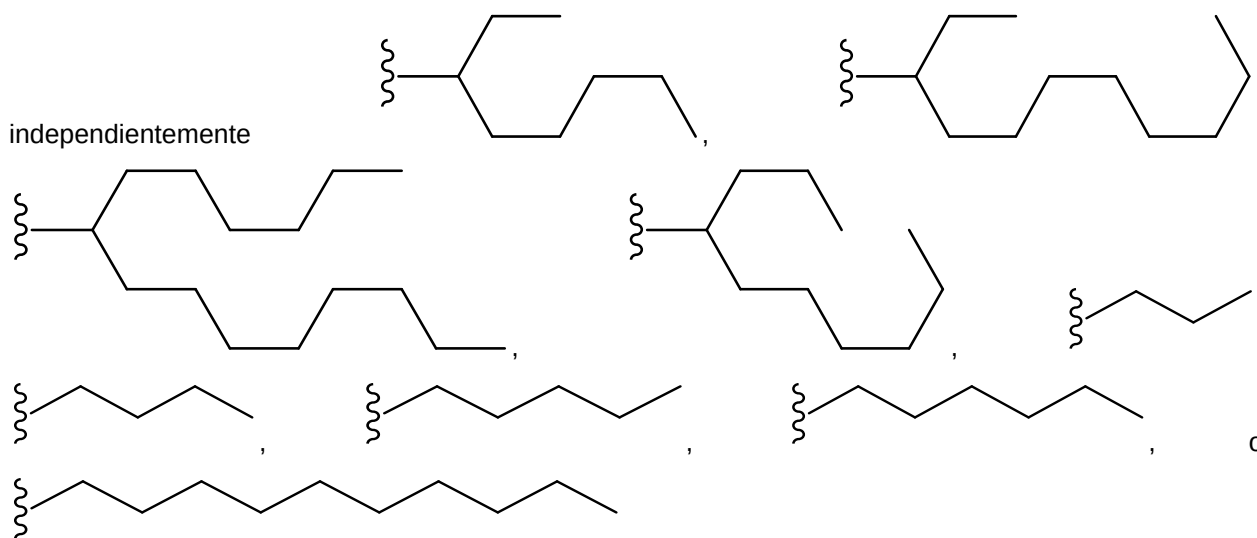


36. El compuesto de la realización 25, o una sal del mismo, en donde R^{3A1} , R^{3A2} , y R^{3A3} son cada uno H.

37. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1 a 15, o una sal del mismo, en donde R^{a1} y R^{a2} son cada uno independientemente $-(CH_2)_{0-15}CH_3$ o $-CH(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$.

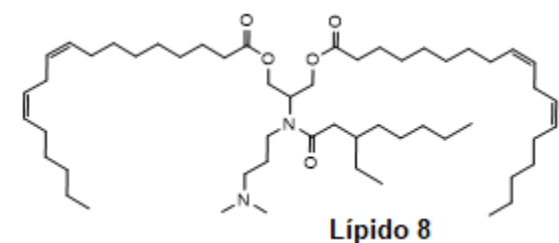
38. El compuesto de la realización 37, o una sal del mismo, en donde R^{a1} y R^{a2} son cada uno

independientemente

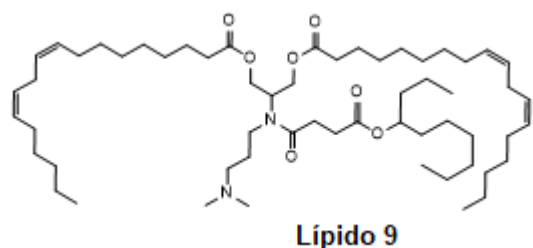


39. El compuesto de la realización 1, o una sal del mismo, en donde el compuesto se selecciona de la Tabla 1.

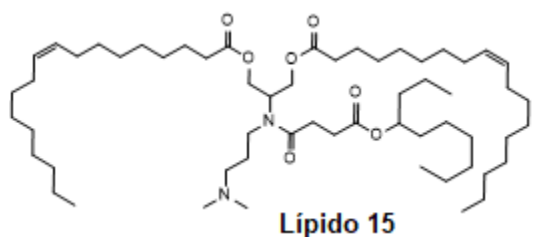
40. El compuesto de la realización 1, o una sal del mismo, en donde el compuesto es



41. El compuesto de la realización 1, o una sal del mismo, en donde el compuesto es



42. El compuesto de la realización 1, o una sal del mismo, en donde el compuesto es



43. Una nanopartícula lipídica (LNP) que comprende una mezcla lipídica para la administración dirigida de un ácido nucleico en una célula inmune, comprendiendo la mezcla lipídica:

(a) un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes que comprende el compuesto de Fórmula (II): [Lípido] – [enlazado opcional] – [grupo de direccionamiento a células inmunes], y

(b) un lípido catiónico ionizable que comprende uno cualquiera del compuesto de las realizaciones 1 a 42,

en donde la LNP comprende además un ácido nucleico dispuesto en ella.

44. La LNP de la realización 43, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células T.

45. La LNP de la realización 44, en donde el antígeno de células T es CD3, CD4, CD7, CD8, o una combinación de los mismos (p. ej., tanto CD3 como CD8, tanto CD4 como CD8, o tanto CD7 como CD8).

46. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 45, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células Asesinas Naturales (NK).

47. La LNP de la realización 46, en donde el antígeno de células NK es CD7, CD8, CD56, o una combinación de los mismos (p. ej., tanto CD7 como CD8).

48. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 47, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes está acoplado covalentemente a un lípido en la mezcla lipídica mediante un enlazador que contiene polietilen glicol (PEG).

49. La LNP de la realización 48, en donde el lípido acoplado covalentemente al grupo de direccionamiento a células inmunes mediante un enlazador que contiene PEG es diestearoilglicerol (DSG), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-glicero-fosfoglicerol (DSPG), dimiristoil-glicerol (DMG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-glicerol (DPG), o ceramida.

50. La LNP de la realización 48 o 49, en donde el PEG es PEG 2000 o PEG 3400.

51. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 50, en donde el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.001 a 0.5 por ciento en moles (p. ej., 0.002-0.2 por ciento en moles).

52. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 51, en donde la mezcla lipídica comprende además uno o más de un lípido estructural (p. ej., un esteroles), un fosfolípido neutro, y un PEG-lípido libre.

53. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 52, en donde el lípido catiónico ionizable está presente en la mezcla lipídica en un rango de 30-70 (p. ej., 40-60) por ciento en moles.

54. La LNP de la realización 52, en donde el esteroles está presente en la mezcla lipídica en un rango de 20-70 (p. ej., 30-50) por ciento en moles.

55. La LNP de la realización 52 o 54, en donde el esteroles es colesterol.

56. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 52 a 55, en donde el fosfolípido neutro se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diestearoil-sn-glicero-3-

fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), y esfingomielina.

57. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 52 a 56, en donde el fosfolípido neutro está presente en la mezcla lipídica en un rango de 5-15 por ciento en moles.

58. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 52 a 57, en donde el PEG-lípido libre se selecciona del grupo que consiste en fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilglicerol modificados con PEG, y dialquiglicerol modificados con PEG. Por ejemplo, un PEG lípido puede ser PEG-dioleoilglicerol (PEG-DOG), PEG-dimiristoil-glicerol (PEG-DMG), PEG-dipalmitoil-glicerol (PEG-DPG), PEG-dilinoleoil-glicero-fosfatidil etanolamina (PEG-DLPE), PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), PEG-dipalmitoil- fosfatidiletanolamina (PEG-DPPE), PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSG), PEG-diacilglicerol (PEG-DAG, p. ej., PEG-DMG, PEG-DPG, y PEG-DSG), PEG-ceramida, PEG-diestearoil-glicero-fosfoglicerol (PEG-DSPG), PEG-dioleoil-glicero-fosfoetanolamina (PEG-DOPE), 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida, o un lípido PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE).

59. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 52 a 57, en donde el PEG-lípido libre comprende una diacilfosfatidiletanolamina que comprende una cadena Dipalmitoil (C16) o una cadena Diestearoil (C18), y opcionalmente el PEG-lípido libre comprende PEG-DPG y PEG-DMG.

60. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 52 a 59, en donde el PEG-lípido libre está presente en la mezcla lipídica en un rango de 1-4 por ciento en moles.

61. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 52 a 60, en donde el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido o uno diferente del lípido en el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes.

62. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 61, en donde la LNP tiene un diámetro medio en el rango de 50-200 nm.

63. La LNP de la realización 62, donde la LNP tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm.

64. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 63, en donde la LNP tiene un índice de polidispersidad en un rango de 0.05 a 1.

65. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 64, en donde la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente +10 mV to aproximadamente + 30 mV a pH 5.

66. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 65, en donde el ácido nucleico es ADN o ARN.

67. La LNP de la realización 66, en donde el ARN es un ARNm.

68. La LNP de la realización 67, en donde el ARNm codifica un receptor, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un anticuerpo, un antígeno, una enzima, o una vacuna.

69. La LNP de la realización 67, en donde el ARNm codifica un polipéptido capaz de regular la respuesta inmune en la célula inmune.

70. La LNP de la realización 67, en donde el ARNm codifica un polipéptido capaz de reprogramar la célula inmune.

71. La LNP de la realización 69, en donde el ARNm codifica un receptor sintético de células T (sinTCR) o un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR).

5 72. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 71, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo, y el anticuerpo es un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina (p. ej., un Nanocuerpo).

73. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 71, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, o scFv.

10 74. La LNP de la realización 72 o realización 73, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que se diseña para eliminar el enlace disulfuro entre cadenas natural en el extremo C.

15 75. La LNP de la realización 74, en donde el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende la sustitución C233S, y un fragmento de cadena ligera que comprende la sustitución C214S, numeración según Kabat.

76. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 73 a 75, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que tiene un enlace disulfuro entre cadenas no natural (p. ej., un enlace disulfuro entre cadenas diseñado, enterrado).

20 77. La LNP de la realización 76, en donde el Fab comprende la sustitución F174C en el fragmento de cadena pesada, y la sustitución S176C en el fragmento de cadena ligera, numeración según Kabat.

78. La LNP de las realizaciones 73 a 77, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende una cisteína en el extremo C del fragmento de cadena pesada o ligera.

25 79. La LNP de la realización 78, en donde el Fab comprende además uno o más aminoácidos entre el fragmento de cadena pesada del Fab y la cisteína C-terminal.

80. La LNP de la realización 72, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio variable único de inmunoglobulina.

30 81. La LNP de la realización 72 o 80, en donde el dominio variable único de inmunoglobulina comprende una cisteína en el extremo C.

82. La LNP de la realización 81, en donde el dominio variable único de inmunoglobulina comprende un dominio VHH y comprende además un espaciador que comprende uno o más aminoácidos entre el dominio VHH y la cisteína C-terminal.

35 83. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 73 y 80 a 82, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios V_{HH}.

84. La LNP de la realización 83, en donde los dos o más dominios V_{HH} están unidos mediante un enlazador de aminoácidos.

85. La LNP de la realización 83, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio V_{HH} unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo y el dominio constante de cadena ligera de anticuerpo están unidos por uno o más enlaces disulfuro.

86. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 72 y 80 a 82, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo está unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo por uno o más enlaces disulfuro.

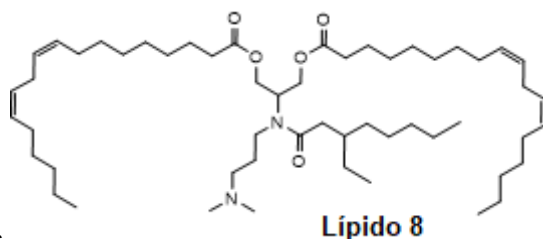
87. La LNP de la realización 85 o 86, en donde el dominio CH1 comprende las sustituciones F174C y C233S, y el dominio constante de cadena ligera comprende las sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat.

88. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 69, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende:

(a) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3; o

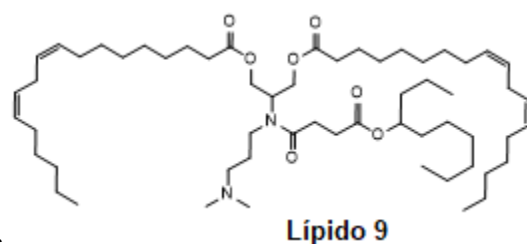
(b) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

89. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 88, en donde el lípido catiónico



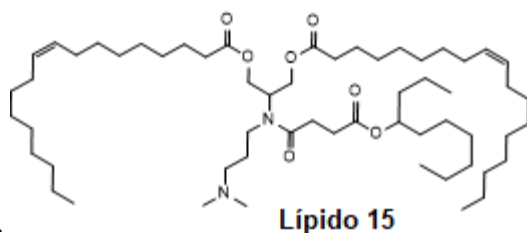
ionizable es

90. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 88, en donde el lípido catiónico



ionizable es

91. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 88, en donde el lípido catiónico



ionizable es

92. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 91, en donde la LNP comprende:

- (a) el lípido catiónico ionizable,
- (b) el conjugado que comprende el compuesto de la siguiente fórmula:
[Lípido] – [enlazador opcional] – [grupo de direccionamiento a células inmunes];
- (c) un esteroide u otro lípido estructural;
- (d) un fosfolípido neutro
- (e) un lípido Polietilenglicol (PEG) libre, y
- (f) el ácido nucleico.

93. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico en una célula inmune, y en donde la célula inmune es una célula NK, y el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a CD56.

94. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico en una célula inmune, y en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a CD7 o CD8, y el lípido PEG libre es DMG-PEG o PEG-DPG.

95. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo, y el anticuerpo es un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina.

96. La LNP de la realización 95, en donde el Fab está diseñado para eliminar el disulfuro entre cadenas natural en el extremo C.

97. La LNP de la realización 96, en donde el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende las sustituciones C233S, y un fragmento de cadena ligera que comprende las sustituciones C214S.

98. La LNP de la realización 96, en donde el Fab comprende un disulfuro entre cadenas no natural.

99. La LNP de la realización 96, en donde el Fab comprende la sustitución F174C en el fragmento de cadena pesada, y la sustitución S176C en el fragmento de cadena ligera.

100. La LNP de la realización 95, en donde el anticuerpo es un dominio variable único de inmunoglobulina (ISV), y el dominio ISV es un ISV de Nanobody®.

101. La LNP de la realización 100, en donde el lípido PEG libre comprende un PEG que tiene un peso molecular de al menos 2.000 daltons.

102. La LNP de la realización 101, en donde el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3.000 a 5.000 daltons.

103. La LNP de la realización 95, en donde el anticuerpo es un Fab.

104. La LNP de la realización 103, en donde el Fab se une a CD3, y el lípido PEG libre en la LNP comprende un PEG que tiene un peso molecular de de aproximadamente 2.000 daltons.

105. La LNP de la realización 103, en donde el Fab es un anticuerpo anti-CD4, y el lípido PEG libre en la LNP comprende un PEG que tiene un peso molecular de de aproximadamente 3.000 a 3.500 daltons.

106. La LNP de la realización 95, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios V_{HH} .

107. La LNP de la realización 106, en donde los dos o más dominios V_{HH} están unidos por un enlazador de aminoácidos.

108. La LNP de la realización 107, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio V_{HH} unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo.

109. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico en una célula inmune, y en donde la LNP se une a CD3, y también se une a CD11a o CD18.

110. La LNP de la realización 109, en donde la LNP comprende dos conjugados, en donde el primer conjugado comprende un anticuerpo que se une a CD3, y el segundo conjugado comprende un anticuerpo que se une a CD11a o CD18.

111. La LNP de la realización 109, en donde la LNP comprende un conjugado, y el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico que se une tanto a CD3 como a CD11a.

112. La LNP de la realización 109, en donde la LNP comprende un conjugado, y el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico que se une tanto a CD3 como a CD18.

113. La LNP de la realización 111 o 112, en donde el anticuerpo biespecífico es un dominio variable único de inmunoglobulina o Fab-ScFv.

114. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 to 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico en una célula inmune, y en donde la LNP se une a CD7 y CD8 de la célula inmune.

115. La LNP de la realización 114, en donde la LNP comprende dos conjugados, en donde el primer conjugado comprende un anticuerpo que se une a CD7, y un segundo conjugado que se une a CD8.

116. La LNP de la realización 114, en donde la LNP comprende un conjugado, en donde el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico que se une a CD7 y CD8.

117. La LNP de la realización 116, en donde el anticuerpo biespecífico es un dominio variable único de inmunoglobulina o Fab-ScFv.

118. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP se une a un primer antígeno en la superficie del primer tipo de célula inmune, y también se une a un segundo antígeno en la superficie del segundo tipo de célula inmune.

119. La LNP de la realización 118, en donde los dos tipos diferentes de células inmunes son células T CD4+ y células T CD8+.

120. La LNP de la realización 118, en donde la LNP comprende dos conjugados, y el primer conjugado comprende un primer anticuerpo que se une al primer antígeno del primer tipo de célula inmune, y el segundo conjugado comprende un segundo anticuerpo que se une al segundo antígeno del segundo tipo de célula inmune.

121. La LNP de la realización 118, en donde la LNP comprende un conjugado, y el conjugado comprende un anticuerpo biespecífico, y el anticuerpo biespecífico se une tanto al primer antígeno en el primer tipo de célula inmune, como al segundo antígeno en el segundo tipo de célula inmune.

122. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde el anticuerpo biespecífico es un dominio variable único de inmunoglobulina o un Fab-ScFv.

123. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico en una célula inmune, y en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un único anticuerpo que se une a CD3 o CD7.

124. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico en una célula inmune, y en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a CD7, CD8, o ambos CD7 y CD8.

125. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico tanto a células T como a células NK, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes se une a

(a) ambos CD3 y CD56;

(b) ambos CD8 y CD56; o

(c) ambos CD7 y CD56.

126. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 93 a 125, en donde la LNP tiene un diámetro medio en el rango de 50-200 nm.

127. La LNP de la realización 126, donde la LNP tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm.

128. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 93 a 125, en donde la LNP tiene un índice de polidispersidad en un rango de 0.05 a 1.

129. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 93 a 128, en donde la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente +10 mV a aproximadamente + 30 mV a pH 5.

130. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 93 a 129, en donde el ácido nucleico es ADN o ARN.

131. La LNP de la realización 130, en donde el ARN es un ARNm.

132. La LNP de la realización 131, en donde el ARNm codifica un receptor, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un anticuerpo, un antígeno, una enzima, o una vacuna.

133. La LNP de la realización 131, en donde el ARNm codifica un polipéptido capaz de regular la respuesta inmune en la célula inmune.

5 134. La LNP de la realización 133, en donde el ARNm codifica un polipéptido capaz de reprogramar la célula inmune.

135. La LNP de la realización 134, en donde el ARNm codifica un receptor sintético de células T (sinTCR) o un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR).

10 136. La LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 92, en donde la LNP es para administrar un ácido nucleico en una célula inmune, y en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que carece del enlace disulfuro entre cadenas nativo.

15 137. La LNP de la realización 136, en donde el Fab se diseña para reemplazar una o ambas cisteínas en la cadena ligera constante nativa y la cadena pesada constante nativa que forman el disulfuro entre cadenas nativo con un aminoácido distinto de cisteína, para eliminar así el enlace disulfuro entre cadenas nativo en el Fab.

138. Un método para dirigir la administración de un ácido nucleico a una célula inmune de un sujeto, que comprende poner en contacto la célula inmune con la LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 137, en donde la LNP comprende el ácido nucleico.

20 139. Un método para expresar un polipéptido de interés en una célula inmune diana de un sujeto, que comprende poner en contacto la célula inmune con la LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 137, en donde la LNP comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido.

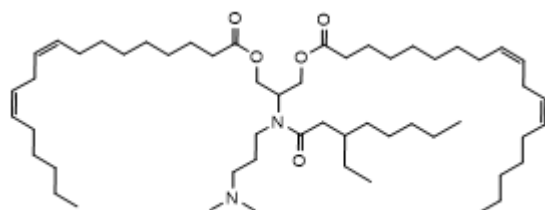
140. Un método para modular la función celular de una célula inmune diana de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la LNP de una cualquiera de las realizaciones 43 a 137, en donde la LNP comprende un ácido nucleico que modula la función celular de la célula inmune.

25 141. Un método para tratar, mejorar, o prevenir un síntoma de un trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una LNP para administrar un ácido nucleico en una célula inmune del sujeto, en donde la LNP es una cualquiera de las realizaciones 43 a 137, en donde la LNP comprende el ácido nucleico.

30 142. El método de la realización 141, en donde el trastorno es un trastorno inmune, un trastorno inflamatorio, o cáncer.

143. El método de la realización 141, en donde el ácido nucleico codifica un antígeno para su uso en una vacuna terapéutica o profiláctica para tratar o prevenir una infección por un patógeno.

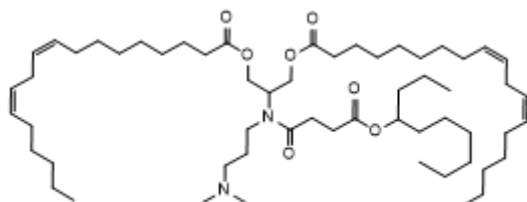
144. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 143, en donde el lípido catiónico



Lípido 8

ionizable es

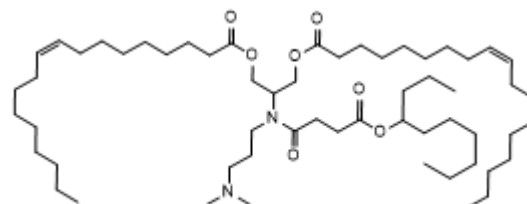
145. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 143, en donde el lípido catiónico



Lípido 9

ionizable es

146. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 143, en donde el lípido catiónico



Lípido 15

ionizable es

147. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 146, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células T.

148. El método de la realización 147, en donde el antígeno de células T es CD3, CD8, o ambos CD3 y CD8.

149. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 to 146, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo que se une a un antígeno de células Asesinas Naturales (NK).

150. El método de la realización 149, en donde el antígeno de células NK es CD7, CD8, o CD56.

151. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 150, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

152. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 151, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes está acoplado covalentemente a un lípido en la mezcla lipídica mediante un enlazador que contiene polietilenglicol (PEG).

153. El método de la realización 152, en donde el lípido acoplado covalentemente al grupo de direccionamiento a células inmunes mediante un enlazador que contiene polietilenglicol es diestearoilglicerol (DSG), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina

(DMPE), diestearoil-glicerol-fosfoglicerol (DSPG), dimiristoil-glicerol (DMG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-glicerol (DPG), o ceramida.

154. El método de la realización 152 o 153, en donde el PEG es PEG 2000.

155. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 154, en donde el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.002-0.2 por ciento en moles.

156. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 to 155, en donde el lípido catiónico ionizable está presente en la mezcla lipídica en un rango de 40-60 por ciento en moles.

157. El método de la realización 138 a 156, en donde el esteroles es colesterol.

158. El método de una cualquiera de las realizaciones 49 a 157, en donde el esteroles está presente en la mezcla lipídica en un rango de 30-50 por ciento en moles.

159. El método de la realización 138 a 158, en donde el fosfolípido neutro se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diestearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DOPC), esfingomielina (SM).

160. El método de la realización 138 a 159, en donde el fosfolípido neutro está presente en la mezcla lipídica en un rango de 5-15 por ciento en moles.

161. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 160, en donde el PEG-lípido libre se selecciona del grupo que consiste en fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilglicerol modificados con PEG, y dialquilglicerol modificados con PEG. Por ejemplo, un lípido PEG puede ser PEG- dioleoilglicerol (PEG-DOG), PEG-dimiristoil-glicerol (PEG-DMG), PEG-dipalmitoil-glicerol (PEG-DPG), PEG-dilinoil-glicerol-fosfatidil etanolamina (PEG-DLPE), PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), PEG-dipalmitoil- fosfatidiletanolamina (PEG-DPPE), PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSG), PEG-diacilglicerol (PEG-DAG, p. ej., PEG-DMG, PEG-DPG, y PEG-DSG), PEG-ceramida, PEG-diestearoil-glicerol-fosfoglicerol (PEG-DSPG), PEG-dioleoil-glicerol-fosfoetanolamina (PEG-DOPE), 2-[(polietilenglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida, o un lípido PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE).

162. El método de las realizaciones 138 a 160, en donde el PEG-lípido libre comprende diacilfosfatidiletanolaminas que comprenden una cadena dimiristoilo (C14), una cadena Dipalmitoilo (C16) o una cadena Diestearoilo (C18).

163. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 162, en donde el PEG-lípido libre está presente en la mezcla lipídica en un rango de 0.5-2.5 por ciento en moles.

164. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 163, en donde el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido o uno diferente del lípido en el conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes conjugado.

165. El método de las realizaciones 138 a 164, en donde la LNP tiene un diámetro medio en el rango de 50-200 nm.

166. El método de la realización 165, donde la LNP tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm.

167. El método de las realizaciones 138 a 166, en donde la LNP tiene un índice de polidispersidad en un rango de 0.05 a 1.

5 168. El método de las realizaciones 138 a 167, en donde la LNP tiene un potencial zeta de aproximadamente +10 mV a aproximadamente + 30 mV a pH 5.

169. El método de las realizaciones 138 a 168, en donde el ácido nucleico es ADN o ARN.

170. El método de la realización 169, en donde el ARN es un ARNm, ARNt, ARNsi, ARNg, o microARN.

10 171. El método de la realización 170, en donde el ARNm codifica un receptor, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un anticuerpo, un antígeno, una enzima, o una vacuna.

172. El método de la realización 170, en donde el ARNm codifica un polipéptido capaz de regular la respuesta inmune en la célula inmune.

15 173. El método de la realización 170, en donde el ARNm codifica un polipéptido capaz de reprogramar la célula inmune.

174. El método de la realización 170, en donde el ARNm codifica un receptor sintético de células T (sinTCR) o un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR).

20 175. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 174, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un anticuerpo, y el anticuerpo es un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina.

176. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 174, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, y scFv.

25 177. El método de la realización 175 o 176, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende uno o más enlaces disulfuro entre cadenas.

178. El método de la realización 177, en donde el Fab comprende un fragmento de cadena pesada que comprende las sustituciones F174C y C233S, y un fragmento de cadena ligera que comprende las sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat.

30 179. El método de una cualquiera de las realizaciones 175 a 178, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende una cisteína en el extremo C del fragmento de cadena pesada o ligera.

180. El método de la realización 175, en donde el Fab comprende además uno o más aminoácidos entre el fragmento de cadena pesada del Fab y la cisteína C-terminal.

35 181. El método de una cualquiera de las realizaciones 176 a 180, en donde el Fab comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, en donde el dominio CH1 y el dominio constante de cadena ligera están unidos por uno o más enlaces disulfuro entre cadenas, y en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende además un fragmento variable de

cadena única (scFv) unido al extremo C del dominio constante de cadena ligera por un enlazador de aminoácidos.

182. El método de la realización 175, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio variable único de inmunoglobulina.

183. El método de la realización 175 o 182, en donde el dominio variable único de inmunoglobulina comprende una cisteína en el extremo C.

184. El método de la realización 183, en donde el dominio variable único de inmunoglobulina comprende un dominio V_{HH} y comprende además un espaciador que comprende uno o más aminoácidos entre el dominio V_{HH} y la cisteína C-terminal.

185. El método de una cualquiera de las realizaciones 175 y 182 a 184, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende dos o más dominios V_{HH} .

186. El método de la realización 185, en donde los dos o más dominios V_{HH} están unidos por un enlazador de aminoácidos.

187. El método de la realización 185, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un primer dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio V_{HH} unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo y el dominio constante de cadena ligera de anticuerpo están unidos por uno o más enlaces disulfuro.

188. El método de una cualquiera de las realizaciones 175, y 182 a 184, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un dominio V_{HH} unido a un dominio CH1 de anticuerpo, y en donde el dominio CH1 de anticuerpo está unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo por uno o más enlaces disulfuro.

189. El método de la realización 185 o 186, en donde el dominio CH1 comprende las sustituciones F174C y C233S, y el dominio constante de cadena ligera comprende las sustituciones S176C y C214S, numeración según Kabat.

190. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 174, en donde el grupo de direccionamiento a células inmunes comprende un Fab que comprende:

(a) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3;

(b) un fragmento de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y un fragmento de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

191. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 190, en donde no más del 5 % de las células no inmunes se transfectan por la LNP.

192. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 191, en donde la semivida del ácido nucleico administrado por la LNP o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP es al menos un 10 % más larga que la semivida del ácido nucleico administrado por una LNP de referencia o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la LNP de referencia.

193. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 192, en donde al menos un 10 % de las células inmunes se transfectan por la LNP.

194. El método de una cualquiera de las realizaciones 138 a 193, en donde el nivel de expresión del ácido nucleico administrado por la LNP es al menos un 10 % mayor que el nivel de expresión del ácido nucleico administrado por una LNP de referencia.

EJEMPLOS

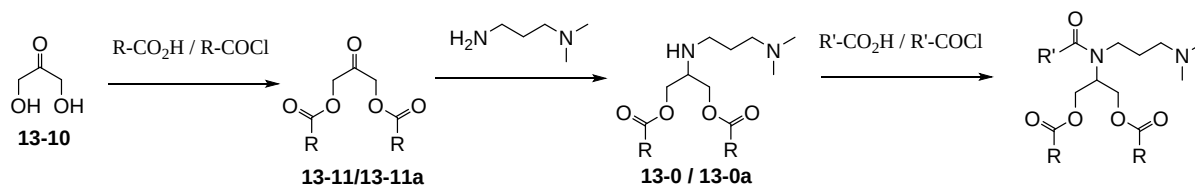
La invención que se describe ahora de forma general, será entendida más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente para los propósitos de la ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y que no se pretende que limiten la invención.

EJEMPLO 1. PREPARACIÓN DE LÍPIDOS CATIÓNICOS IONIZABLES

Este Ejemplo describe la síntesis de varios lípidos catiónicos.

Esquema general para la síntesis de los Lípidos 1 a Lípido 30

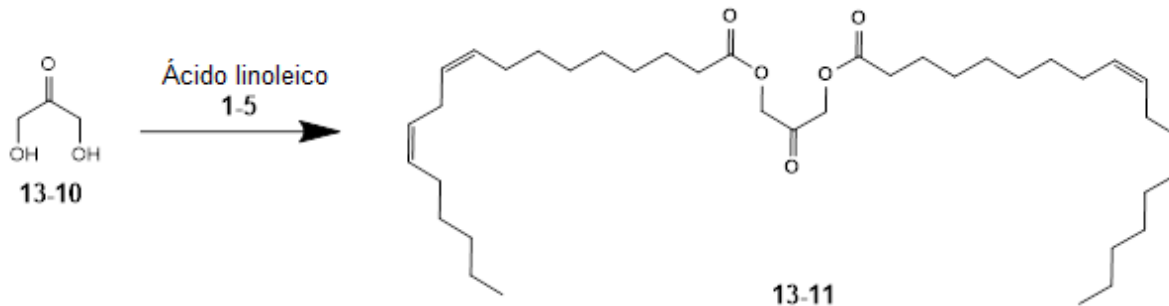
Un esquema general para la síntesis de los Lípidos 1 a Lípido 30 se proporciona en el Esquema 1 a continuación. Los R y R' correspondientes a cada lípido se proporcionan en las Tablas 2 a 4 a continuación.



Esquema 1. Síntesis de los lípidos 1 a 30 usando acilación y aminación reductora

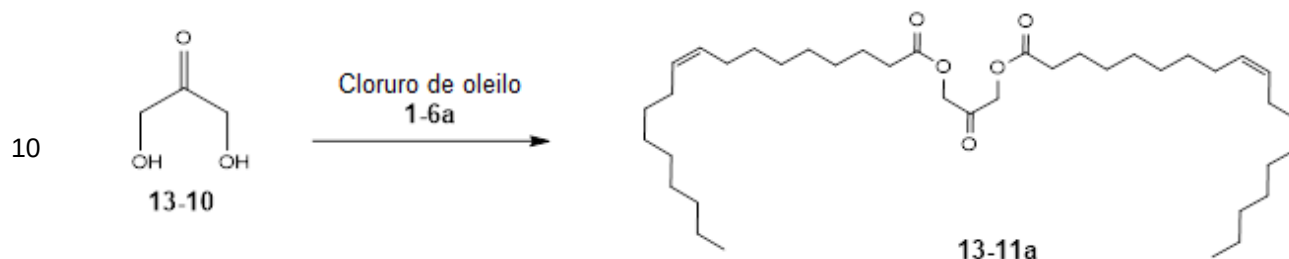
Síntesis de los intermedios 13-11 y 13-11a

El intermedio 13-11 (Esquema 2) se sintetizó por acilación de dihidroxiacetona (13-10) con ácido linoleico. Se hizo reaccionar dihidroxiacetona (22 mmoles, 2 g, 1 eq.) con ácido linoleico 1-5 (55 mmoles, 15.4 g, 2.5 eq.) usando activación por EDCI (55 mmoles, 10.5 g, 2.5 eq.) en 50 mL de DCM, en presencia de DIPEA (55 mmoles, 9.6 mL, 2.5 eq.), DMAP (4.4 mmoles, 540 mg, 0.2 eq.) a temperatura ambiente rindiendo 11.1 g (79 %) de producto bruto. El producto purificado se obtuvo por cromatografía en columna y se caracterizó por espectroscopia de RMN de protones (FIG. 1).



Esquema 2. Síntesis del Intermedio 13-11 usando O-acilación mediada por EDCI del ácido linoleico con dihidroxiacetona.

Los intermedios 13-11a (Esquema 3) se sintetizaron por acilación de dihidroxiacetona (13-10) con cloruro de oleilo. Se hizo reaccionar dihidroxiacetona (44.4 mmoles, 4 g, 1 eq.) con cloruro de oleilo 1-6a (111 mmoles, 36.7 mL, 2.5 eq.) en presencia de piridina (133.3 mmoles, 11 mL, 3 eq.), DMAP (13.3 mmoles, 1.63 g, 0.3 eq.) en 80 mL de DCM, a temperatura ambiente, rindiendo 14.9 g (54 %) de producto bruto. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna y se caracterizó por espectroscopia de RMN de protones (FIG. 2A).

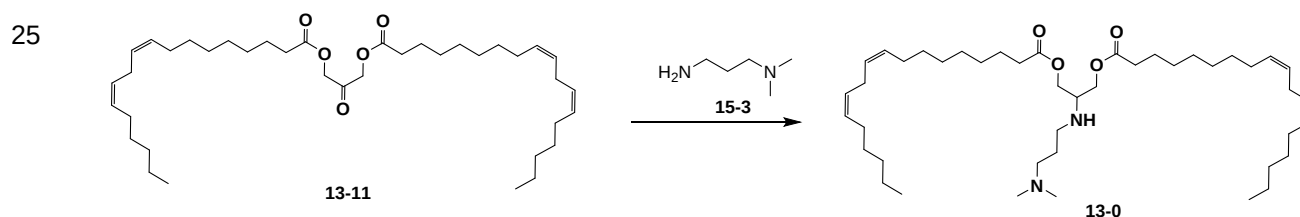


Esquema 3. Síntesis del Intermedio 13-11a por O-acilación de cloruro de oleilo con dihidroxiacetona.

Síntesis de los intermedios 13-0a y 13-11b

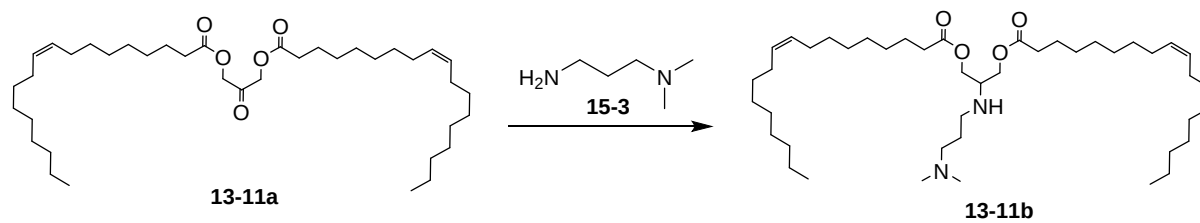
Los intermedios 13-0a y 13-11b se sintetizaron por aminación reductora de los intermedios 13-11 y 13-11a respectivamente.

El intermedio 13-0 se produjo por aminación reductora (esquema 4) del intermedio 13-11 (13.1 mmoles, 8.1 g, 1.0 eq.) usando N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina 15-3 (26 mmoles, 3.2 mL, 2.0 eq.) en DCM (10 mL) usando ácido acético (26.0 mmoles, 1.50 mL, 2 eq.) y triacetato de borohidruro sódico (4.32 mmoles, 3.3 g, 1.2 eq.) rindiendo 3.1g (32 %) de producto bruto. La purificación en columna dio lugar a un producto puro (espectro de RMN de protón y cromatograma LC-CAD mostrados en las FIG. 3A y FIG. 3B, respectivamente).



Esquema 4. Síntesis del intermedio 13-0 por aminación reductora del intermedio 13-11 con N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina

El intermedio 13-11b se produjo por aminación reductora (esquema 5) del intermedio 13-11a (24.2 mmoles, 14.9 g, 1.0 eq.) usando N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina 15-3 (48.4 mmoles, 6.05 mL, 2.0 eq.) en DCM (60 mL) usando ácido acético (48.4 mmoles, 2.8 mL, 2 eq.) y triacetato de borohidruro sódico (29.1 mmoles, 6.05 g, 1.2 eq.) rindiendo 6 g (35 %) de producto bruto. La purificación en columna dio lugar a un producto purificado (espectro de RMN de protón y cromatograma LC-ELSD mostrados en las FIG. 2B y FIG. 2C, respectivamente).



Esquema 5. Síntesis del intermedio 13-11b por aminación reductora del intermedio 13-11a con N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina

10

15

20

25

30

35

Tabla 2. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los lípidos 1 a 8

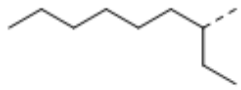
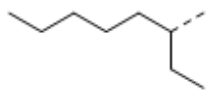
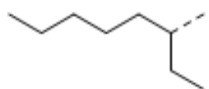
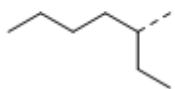
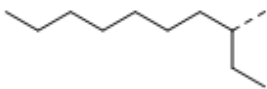
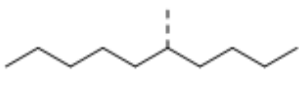
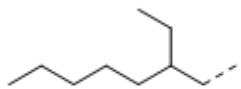
No. de Lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
Lípido 1		
Lípido 2		
Lípido 3		
Lípido 4		
Lípido 5		
Lípido 6		
Lípido 7		
Lípido 8		

Tabla 3. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los Lípidos 9 a 16

No. de Lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
Lípido 9		
Lípido 10		
Lípido 11		
Lípido 11A		
Lípido 12		
Lípido 13		
Lípido 14		
Lípido 14A		
Lípido 15		
Lípido 16		

Tabla 4-1. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los Lípidos 17, 17A, 18, 18A, 19, 19A, 20, 20A, 21, 21A, 22, 23 y 23A

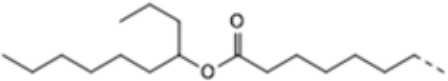
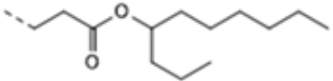
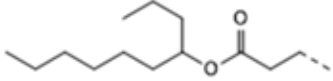
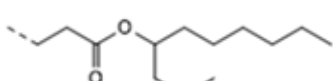
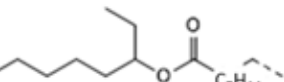
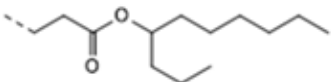
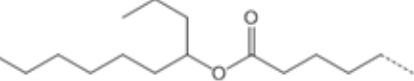
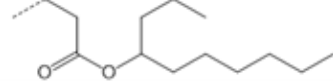
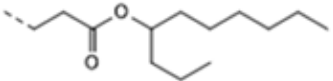
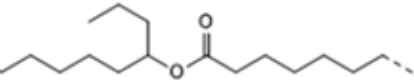
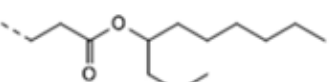
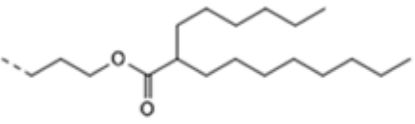
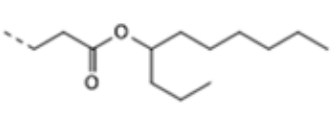
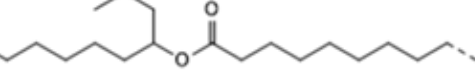
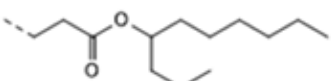
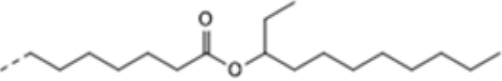
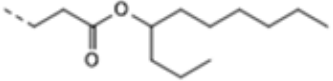
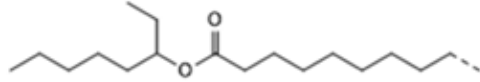
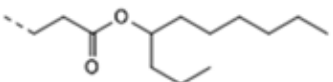
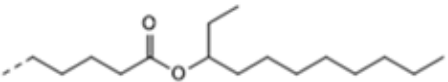
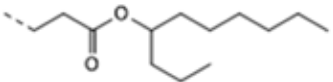
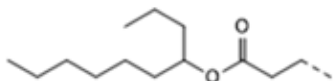
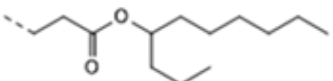
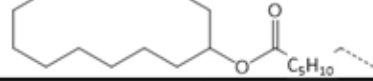
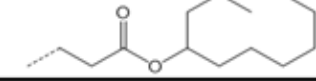
No. de Lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
Lípido 17		
Lípido 17A		
Lípido 18		
Lípido 18A		
Lípido 19		
Lípido 19A		
Lípido 20		
Lípido 20A		
Lípido 21		
Lípido 21A		
Lípido 22		
Lípido 23		
Lípido 23A		

Tabla 4-2. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los Lípidos 24, 25, 25A, 26, 27, 28, 29, y 30

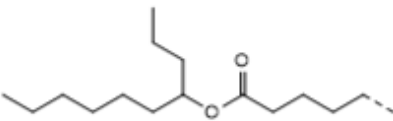
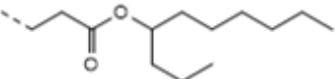
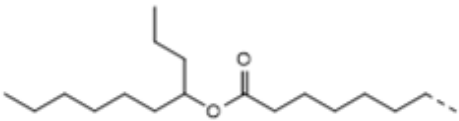
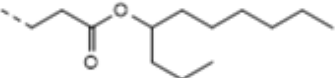
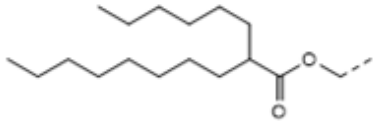
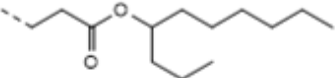
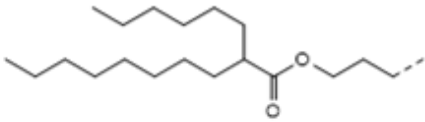
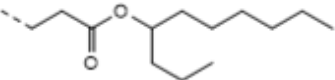
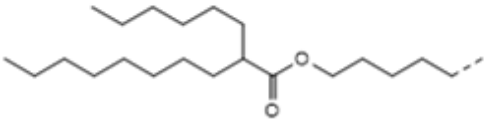
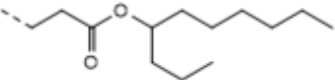
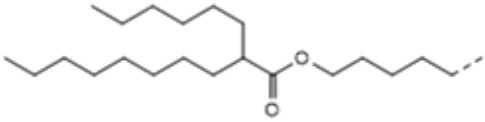
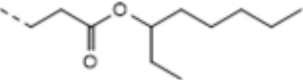
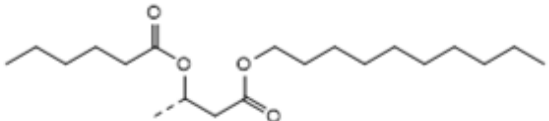
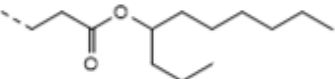
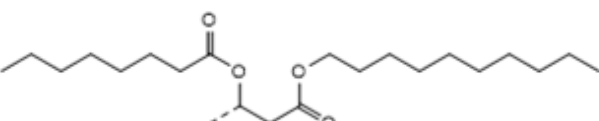
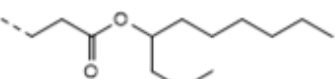
No. de Lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
Lípido 24		
Lípido 25		
Lípido 25A		
Lípido 26		
Lípido 27		
Lípido 28		
Lípido 29		
Lípido 30		

Tabla 4-3. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los Lípidos 31 a 38, 37A y 38A

No. de Lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
Lípido 31		
Lípido 32		
Lípido 33		
Lípido 34		
Lípido 35		
Lípido 36		
Lípido 37		
Lípido 38		
Lípido 37A		
Lípido 38A		

Tabla 5. Masa esperada y observada (m/z) de los lípidos ionizables nombrados

Entrada	Código del compuesto	Masa esperada (g/mol)	Masa observada (m/z)
1	Lípido 1	854.75	855.7, 856.7, 857.7 (M+1, M+2, M+3)
2	Lípido 2	840.73	841.7, 842.7, 843.7 (M+1, M+2, M+3)
3	Lípido 3	840.73	841.7, 842.7, 843.7 (M+1, M+2, M+3)
4	Lípido 4	845.39	845.7, 846.7, 847.7 (M, M+1, M+2)
5	Lípido 5 isómero (S) (Lípido 5A)	827.33	827.7, 828.7, 829.7 (M, M+1, M+2)

5

10

15

20

25

30

35

6	Lípido 6	868.76	869.7, 870.7, 871.7 (M+1, M+2, M+3)
7	Lípido 7	868.76	869.7, 870.7, 871.7 (M+1, M+2, M+3)
8	Lípido 8	854.75	855.7, 856.7, 857.7 (M+1, M+2, M+3)
9	Lípido 9	940.78	941.7, 942.7, 943.7 (M+1, M+2, M+3)
10	Lípido 10 isómero (S) (Lípido 10A)	912.75	913.7, 914.7, 915.7 (M+1, M+2, M+3)
11	Lípido 11 isómero (S) (Lípido 11A)	970.76	971.7, 972.7, 973.7 (M+1, M+2, M+3)
12	Lípido 12	999.51	999.0, 1.001, 1.002 (M+1, M+2, M+3)
13	Lípido 13	984.77	985.7, 986.7, 987.6 (M+1, M+2, M+3)
14	Lípido 14A	1.013.54	1.013.1, 1.014.1, 1.015.1 (M+1, M+2, M+3)
15	Lípido 15	944.82	945.1, 946.1, 947.1 (M+1, M+2, M+3)
16	Lípido 16	916.78	917.2, 918.2, 919.2 (M+1, M+2, M+3)
17	Lípido 17A	896.67	897.9, 898.9, 899.9 (M+1, M+2, M+3)
18	Lípido 18A	952.73	953.7, 954.7, 955.7 (M+1, M+2, M+3)
19	Lípido 19A	1.008.80	1.009.8, 1.010.8, 1.011.8 (M+1, M+2, M+3)
20	Lípido 20A	1.064.9	1.065.7, 1.066.7, 1.067.7 (M+1, M+2, M+3)
21	Lípido 21A	1.008.80	1.009.7, 1.010.7, 1.011.7 (M+1, M+2, M+3)

5

10

15

20

25

30

35

22	Lípido 22	980.76	981.7, 982.7, 983.7 (M+1, M+2, M+3)
23	Lípido 23A	1.036.8	1.037.7, 1.038.6, 1.039.7 (M+1, M+2, M+3)
24	Lípido 19 (Lípido 24A)	892.78	893.7, 894.7, 895.7 (M+1, M+2, M+3)
25	Lípido 25A	1.008.80	1.009.7, 1.010.7, 1.011.7 (M+1, M+2, M+3)
26	Lípido 20 (Lípido 26)	1.064.86	1.065.1, 1.066.1, 1.067.1, 1.068.1 (M+1, M+2, M+3, M+4)
27	Lípido 27	1.120.92	1.121.9, 1.122.9, 1.123.9 (M+1, M+2, M+3)
28	Lípido 28	1.092.9	1.093.8, 1.094.8, 1.095.8 (M+1, M+2, M+3)
29	Lípido 29	1.124.81	1.125.8, 1.126.8, 1.127.8 (M+1, M+2, M+3)
30	Lípido 30	1.180.87	NA
31	Lípido 31	854.75	855.1, 856.1, 857.1 (M+1, M+2, M+3)
32	Lípido 32	854.75	855.7, 856.7, 857.7 (M+1, M+2, M+3)
33	Lípido 33	840.73	841.7, 842.7, 843.7 (M+1, M+2, M+3)
34	Lípido 34	868.76	869.7, 870.7, 871.7 (M+1, M+2, M+3)
35	Lípido 35	914.77	NA
36	Lípido 36	884.76	NA
37	Lípido 37A	1.153.63	1.153.8, 1.154.8, 1.155.8 (M+1, M+2, M+3)

38	Lípido 38A	1.209.74	NA
----	------------	----------	----

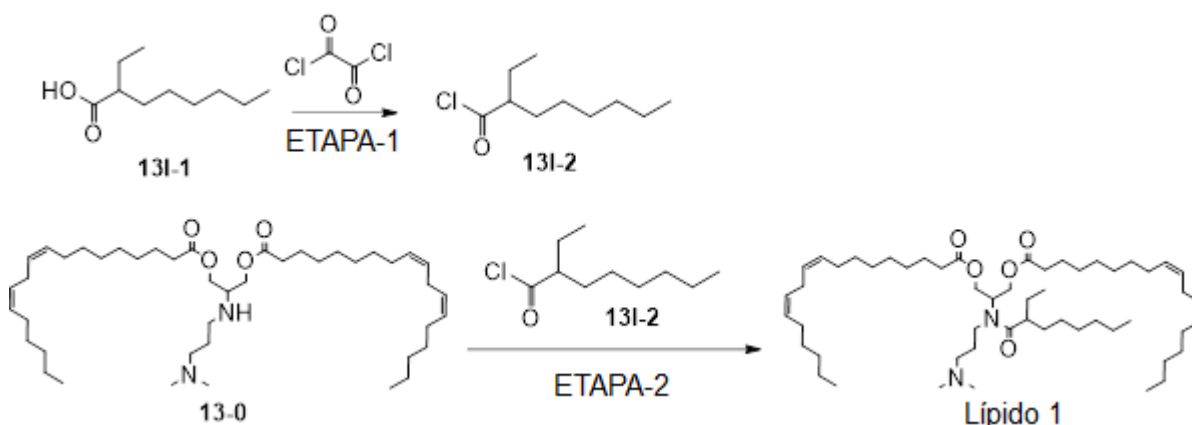
Síntesis de los lípidos 1 a 16 por N-acilación de los intermedios 13-0 o 13-11b

La N-acilación de los intermedios 13-0 y 13-11b con compuestos R'CO₂H o R'COCl (estructuras R' mostradas en la Tabla 2 y Tabla 3) rindió los lípidos 1 a 16 como se describe en los ejemplos siguientes.

Síntesis de los Lípidos 1, 3, 4, 5, 6 y 7 por N-acilación del intermedio 13-0 usando los cloruros de ácido correspondientes

Síntesis del Lípido 1

El Lípido 1 se sintetizó como se proporciona en el esquema 6 a continuación y como sigue. El material de partida, 13I-1 (0.75 mmoles, 130 mg, 1.0 eq) se convirtió en el cloruro de ácido (Etapa 1) usando cloruro de oxalilo (3.7 mmoles, 320 µl, 5 eq.) y DMF (10 µl, catalítico) en 6 mL de benceno. El producto (143 mg, 98 %) mostró una sola mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 2) del intermedio 13-0. El intermedio 13-0 (0.35 mmoles, 250 mg, 1.0 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13I-1 (0.75 mmoles, 143 mg, 1.7 eq.) usando TEA (240 µl, 5 eq, 1.8 mmoles) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica). El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X), rindiendo 124 mg (76 %) de Lípido 1 puro (≥99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4A-1 para el espectro de RMN del Lípido 1, y la Tabla 5 para la masa del producto).

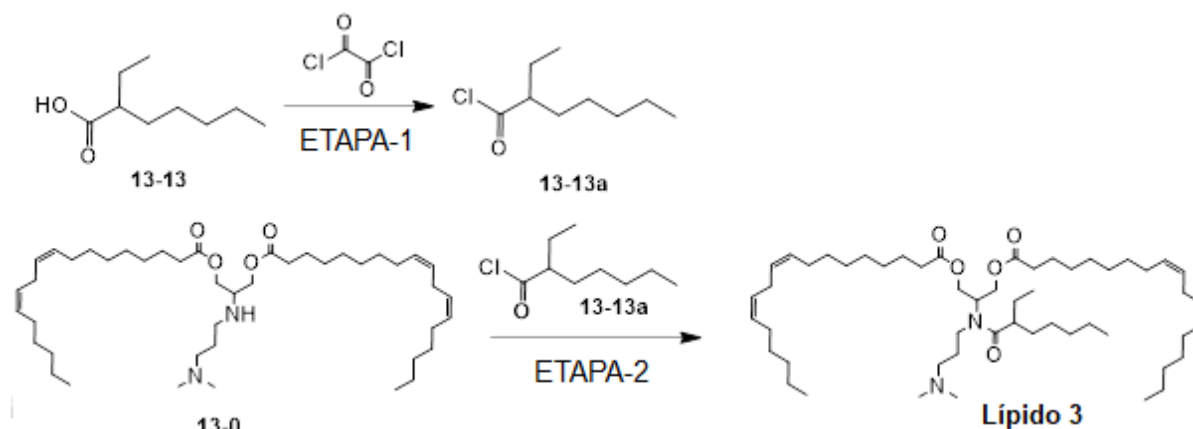


Esquema 6. Síntesis del Lípido 1

Síntesis del Lípido 3

El Lípido 3 se sintetizó como se proporciona en el esquema 7 a continuación y como sigue. El material de partida, 13-13 (8.3 mmoles, 1.30 g, 1.0 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido, 13-13a (Etapa 1) usando cloruro de oxalilo (2.8 mmoles, 2.4 ml, 5 eq.) y DMF (100 µl, catalítico) en 60 mL de benceno. El producto (1.44 g, 98 %) mostró una sola mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 2) del intermedio 13-0. El intermedio 13-0 (5.4 mmoles, 3.78 g, 1.0 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-13a (1.44 g, 1.5 eq, 8.1 mmoles) usando TEA (3.76 mL, 5 eq, 27 mmoles) y DMAP (50 mg, cat, cantidad catalítica) en benceno (100 mL). El producto bruto se

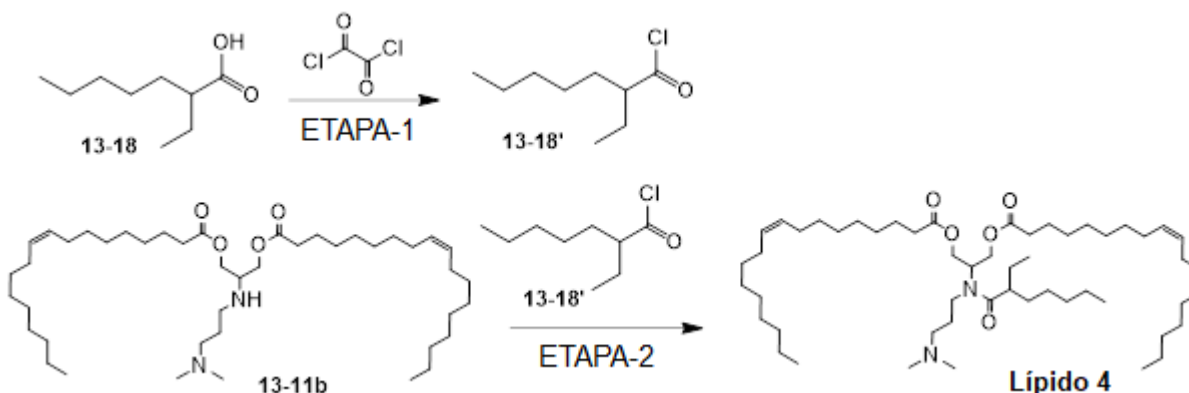
purificó por cromatografía en columna (2X) rindiendo 2.1 g (46.3 %) de Lípido 3 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la FIG. 4B-1 para el espectro de RMN del Lípido 3, la FIG. 4B-2 para LC-MS del Lípido 3, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 7. Síntesis del Lípido 3

Síntesis del Lípido 4

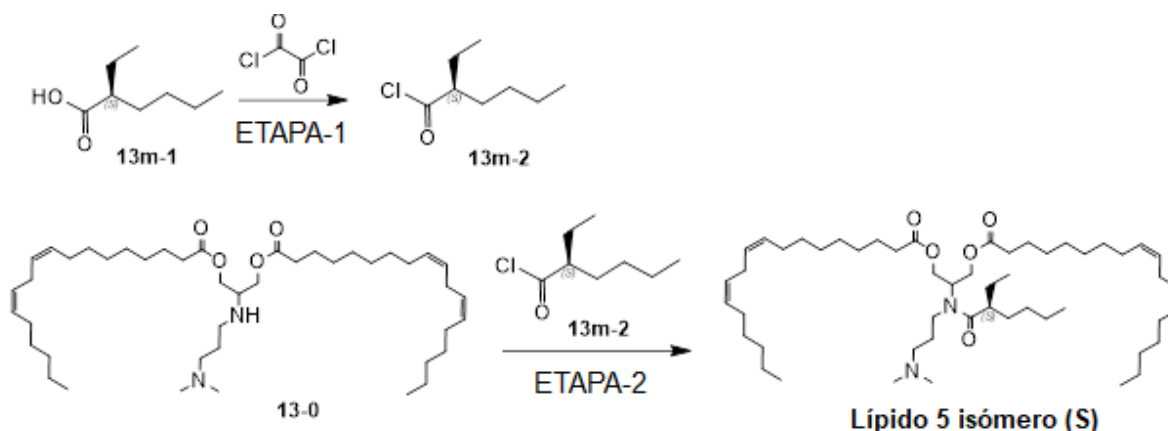
El Lípido 4 se sintetizó como se proporciona en el esquema 7 a continuación y como sigue. El material de partida, 13-18 (0.95 mmoles, 150 mg, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido, 13-18' (Etapa 1) usando cloruro de oxalilo (3.23 mmoles, 227 μ L, 3.4 eq.) y DMF (10 μ L, catalítico) en 6 mL de benceno. El producto una sola mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 2) del intermedio 13-11b. El intermedio 13-11b (0.63 mmoles, 444 mg, 1.0 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-18' (167 mg, 1.5 eq, 0.95 mmoles) usando TEA (445 μ L, 5.0 eq, 3.2 mmoles) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en benceno (10 mL). El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (5X) rindiendo 140 mg (26 %) de Lípido 4 puro (97 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la FIG. 4C-1 para el espectro de RMN del Lípido 4, la FIG. 4C-2 para LC-MS del Lípido 4, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 8. Síntesis del Lípido 4

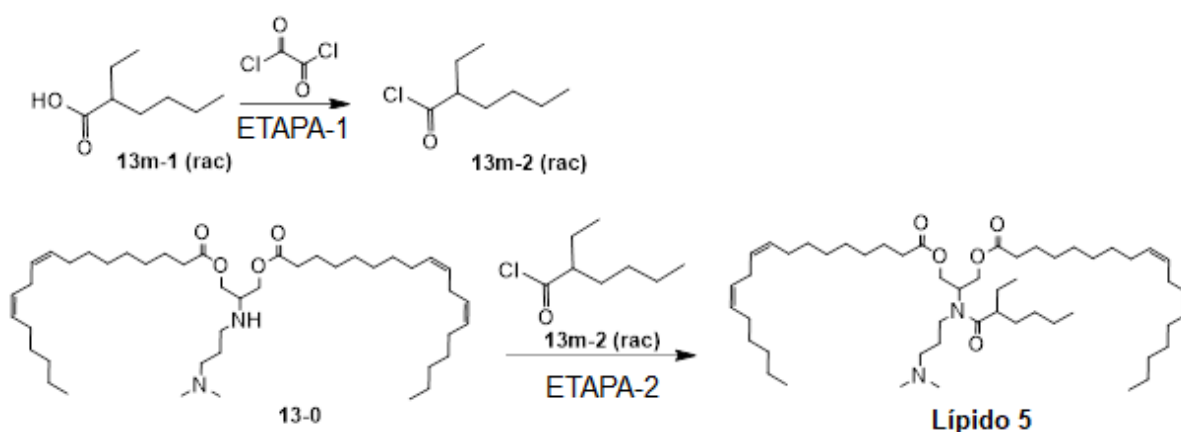
Síntesis del Lípido 5 y de su isómero (S)

El isómero (S) del lípido 5 se sintetizó como se proporciona en el esquema 9-1 a continuación y como sigue. El material de partida, ácido etilhexenoico 13m-1 (110 mg, 1.0 eq, 0.75 mmoles) se convirtió en el cloruro de ácido, 13m-2 (Etapa 1) usando cloruro de oxalilo (320 µl, 1.0 eq, 3.7 mmoles) y DMF (20 µl, catalítico) a reflujo durante 2 horas en 3 mL de benceno. El producto solo mostró una mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 2) del intermedio 13-0. El intermedio 13-0 (250 mg, 1.0 eq, 0.35 mmoles) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13m-2 (120 mg, 1.8 eq, 0.75 mmoles) usando TEA (240 µl, 5.0 eq, 1.8 mmoles) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 10 mL de benceno, toda la noche a temperatura ambiente. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) rindiendo 95 mg (32 %) de Lípido 5 puro (≥99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4D-1 para el espectro de RMN del Lípido 5, la FIG. 4D-2 para LC-MS del Lípido 5, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 9-1. Síntesis del Lípido 5 isómero (S)

El Lípido 5 como mezcla racémica se sintetizó de forma similar a como se proporciona en el esquema 9-2 a continuación.

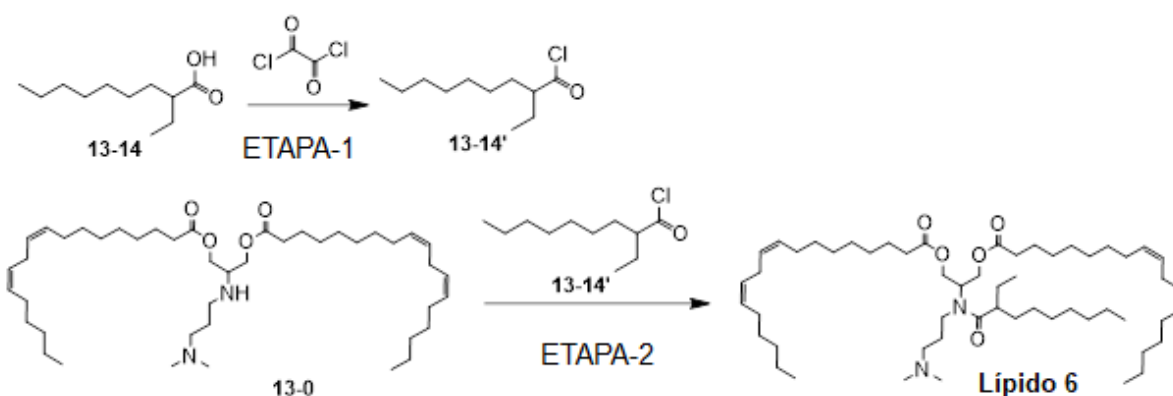


Esquema 9-2. Síntesis del Lípido 5

Síntesis del Lípido 6

El Lípido 6 se sintetizó como se proporciona en el esquema 10 a continuación y como sigue. El material de partida, ácido 2-etilnonanoico 13-14 (132 mg, 0.17 mmoles, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido,

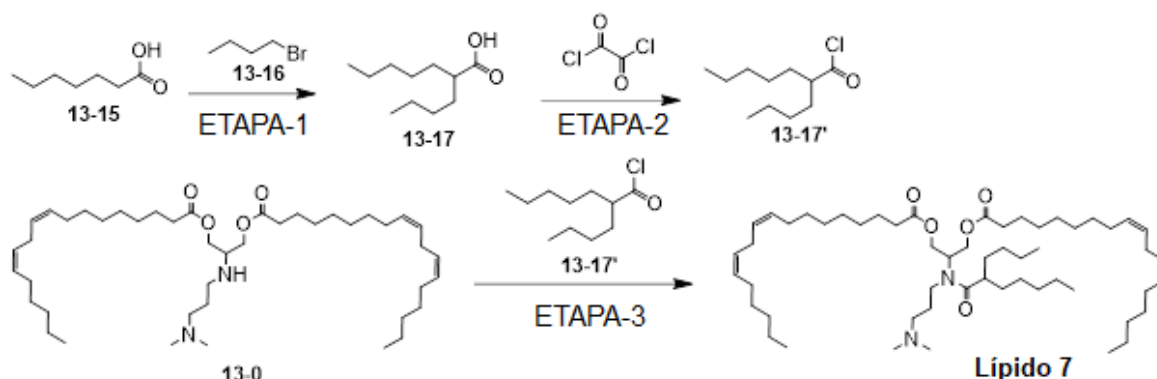
13-14' (Etapa 1) usando cloruro de oxalilo (207 μ l, 3.4 eq, 2.4 mmoles) y DMF (10 μ l, cantidad catalítica) en 6 mL de benceno. El producto solo mostró una mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 2) del intermedio 13-0. El intermedio 13-0 (0.47 mmoles, 330 mg, 1 eq.) se aciló con cloruro ácido bruto, 13-14' (145 mg, 1.5 eq, 0.7 mmoles) usando TEA (327 μ L, 5.0 eq, 2.4 mmoles) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 10 mL de benceno. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) rindiendo 75 mg (18 %) de Lípido 6 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4E-1 para el espectro de RMN del Lípido 6, la FIG. 4E-2 para LC-MS del Lípido 6, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 10. Síntesis del Lípido 6

Síntesis del Lípido 7

El Lípido 7 se sintetizó como se proporciona en el esquema 11 a continuación y como sigue. El material de partida, ácido heptanoico, 13-15 (23.1 mmoles, 3.0 g, 1 eq.) se alquiló (etapa 1) con bromuro de n-butilo, 13-16 ((2.5 mL, 1.0 eq, 23.1 mmoles) y n-butil litio 2.5 M en hexano (20.0 mL, 2.2 eq, 51 mmoles) usando diisopropilamina (7.2 mL, 2.2 eq, 51 mmoles) en HMPA (4.4 mL) y 30 mL de THF. Se aislaron 1.5 g (35 %) de ácido 2-butil heptanoico, 13-17, de la mezcla de reacción por cromatografía flash. El intermedio 13-17 (360 mg, 0.94 mmoles, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido, 13-17' (Etapa 2) usando cloruro de oxalilo (6.6 mmoles, 568 μ l, 3.4 eq.) y DMF (5 μ l, catalítico) en 3 mL de benceno. El producto solo mostró una mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 3) del intermedio 13-0. El intermedio 13-0 (0.64 mmoles, 450 mg, 1 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-17' (395 mg, 3.0 eq, 1.94 mmoles), TEA (446 μ L, 5.0 eq, 3.2 mmoles), DMAP (10 mg) en 10 mL de benceno. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) rindiendo 228 mg (41 %) de Lípido 7 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4F-1 para el espectro de RMN del Lípido 7, la FIG. 4F-2 para LC-MS del Lípido 7, y la Tabla 5 para la masa del producto).

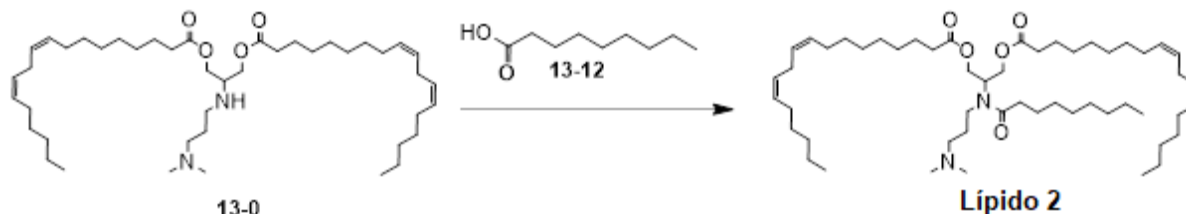


Esquema 11. Síntesis del Lípido 7

Síntesis de los Lípidos 2, 8, 9 y 10 por N-acilación del intermedio 13-0 usando la activación por carbodiimida de los ácidos carboxílicos correspondientes

Síntesis del Lípido 2

El Lípido 2 se sintetizó como se proporciona en el esquema 12 a continuación y como sigue. El intermedio 13-0 (0.14 mmoles, 320 mg, 1.0 eq.) se aciló con ácido nonanoico 13-12 (1.15 mmoles, 198 μ L, 2.5 eq.), EDCI (1.15 mmoles, 221 mg, 2.5 eq.), DIPEA (1.15 mmoles, 198 μ L, 2.5 eq.) y DMAP (0.05 mmoles, 6.4 mg, 0.1 eq.) en 5 mL de DCM. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (3X) rindiendo 107 mg (%) de Lípido 2 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4G-1 para el espectro de RMN del Lípido 2, la FIG. 4G-2 para LC-MS del Lípido 2, y la Tabla 5 para la masa del producto).

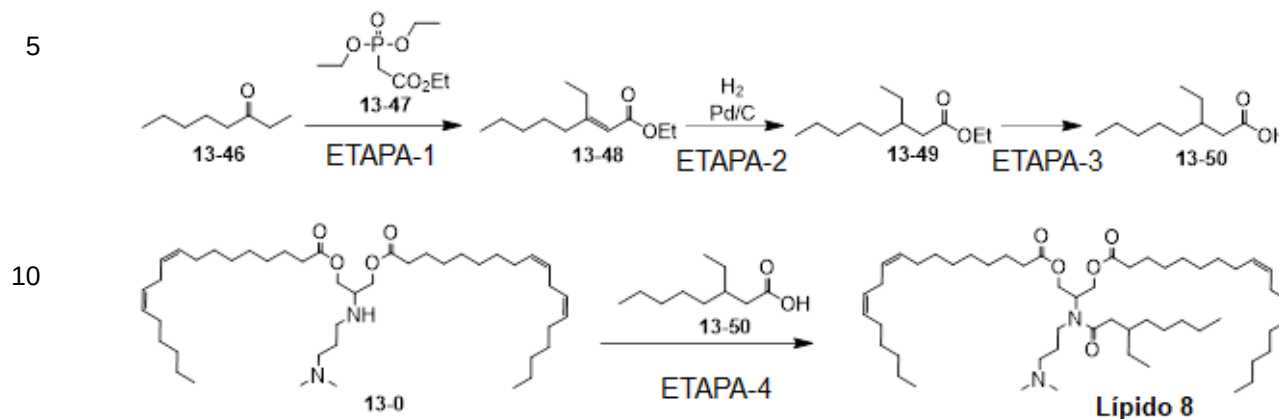


Esquema 12. Síntesis del Lípido 2

Síntesis del Lípido 8

El Lípido 8 se sintetizó como se proporciona en el esquema 13 a continuación y como sigue. Se accedió al alqueno 13-48 por la reacción HWE (etapa 1) de octan-3-ona, 13-46 (2 g, 15.6 mmoles) con 2-(dietoxifosforil)acetato de etilo, 13-47 (7.0 g, 2.0 eq, 31.2 mmoles), NaHMDS 2M en THF (15.6 mL, 2.0 eq, 31.2 mmoles) y 9 mL de disolvente THF. El procesamiento de la reacción rindió 2.38 g (77 %) de 13-48 confirmado por RMN, masa del producto y una única mancha de TLC. El alqueno, 13-48 (5.1 mmoles, 1 g, 1 eq.) se hidrogenó (etapa 2) usando Pd/C (50 mg) en 8 mL de acetato de etilo rindiendo el intermedio 13-48 (958 mg, 77 %). La hidrólisis de éster (etapa 3) de 13-49 (5.1 mmoles, 412 mg) usando THF/MeOH/LiOH 1M (3.0/2.0/3.0 mL) rindió el intermedio ácido carboxílico 13-50 (336 mg, 95 %). El intermedio 13-0 (0.33 mmoles, 234 mg) se aciló con 13-50 (0.66 mmoles, 115 mg, 2.0 eq.) usando EDCI (0.66 mmoles, 102 mg, 2.0 eq.), DIPEA (0.66 mmoles, 114 μ L, 2.0 eq.), DMAP (0.33 mmoles, 41 mg, 1.0

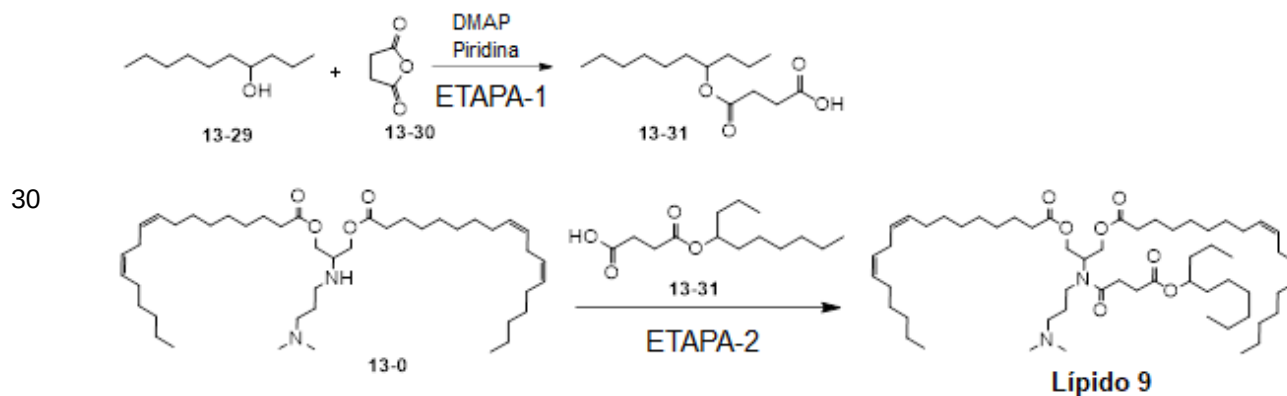
eq.), en 2 mL de DCM rindiendo 77 mg (27 %) de Lípido 8 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y caracterizado por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4H-1 para el espectro de RMN del Lípido 8, la FIG. 4H-2 para LC-MS del Lípido 8, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 13. Síntesis del Lípido 8

Síntesis del Lípido 9

El Lípido 9 se sintetizó como se proporciona en el esquema 14 a continuación y como sigue. El material de partida, decan-4-ol, 13-29 (32.0 mmoles, 5.0 g, 1.0 eq.) se aciló con ácido succínico, 13-30 (6.3 g, 2.0 eq, 63.0) usando DMAP (3.55 g, 1.0 eq, 32.0 mmoles) y piridina (5.0 ml) en 5 mL de THF. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 4.26 g (81 %) del intermedio ácido puro 13-31. El intermedio 13-0 (2.1 mmoles, 1.5 g, 1 eq.) se aciló con 13-31 (2.13 mmoles, 0.554 g, 1.1 eq), usando DIPEA (745 μ L, 4.26 mmoles, 2.5 eq), EDCI (820 mg, 4.26 mmoles, 2.5 eq.), y DMAP (480 mg, 0.43 mmoles, 0.25 eq), en 50 mL de DCM. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (3X) rindiendo 1.4 g (73 %) de Lípido 9 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la FIG. 4I-1 para el espectro de RMN del Lípido 9, la FIG. 4I-2 para LC-MS del Lípido 9, y la Tabla 5 para la masa del producto).

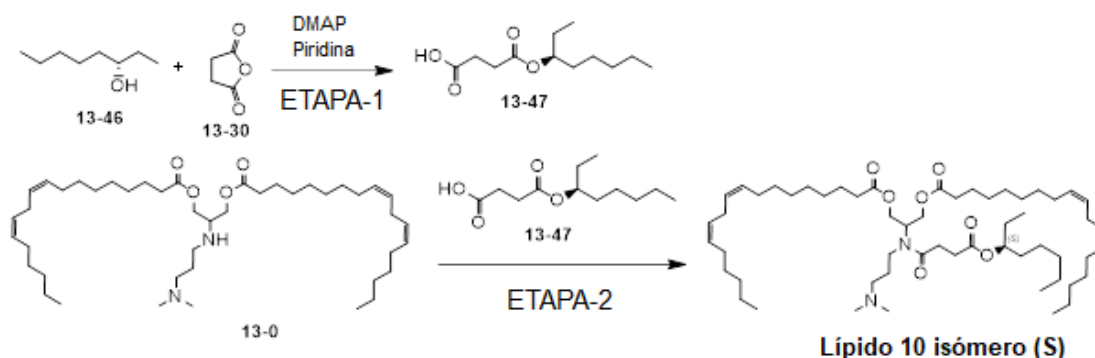


Esquema 14. Síntesis del Lípido 9

Síntesis del Lípido 10 y su isómero (S)

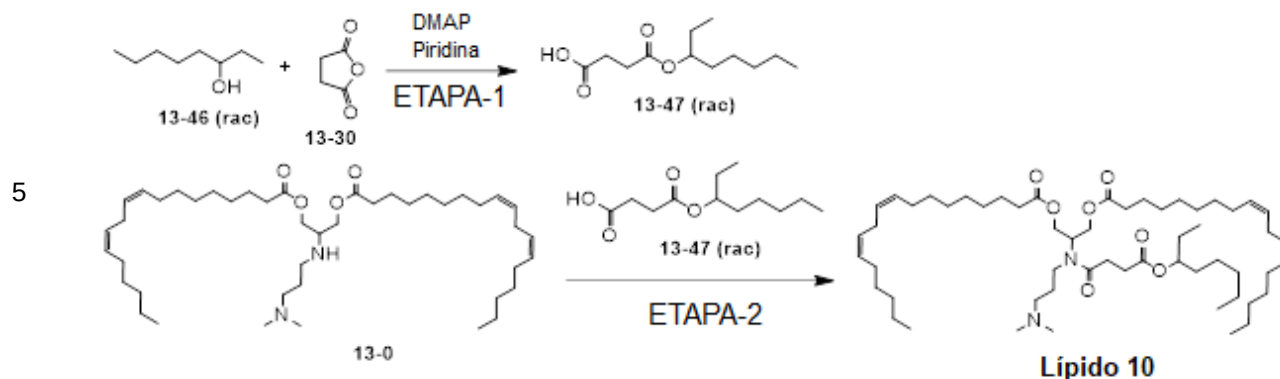
El isómero (S) del lípido 10 se sintetizó como se proporciona en el esquema 15-1 a continuación y como sigue. El material de partida, octan-3-ol, 13-46 (2.0 g, 1.0 eq, 15.3 mmoles) se aciló con ácido

succínico, 13-30 (3.1 g, 2.0 eq, 30.6 mmoles) usando DMAP (1.72 g, 1.0 eq, 15.3 mmoles) y piridina (2.0 ml) en 2 mL de THF y 6 mL de DCM. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 1.1 g (31 %) del intermedio ácido puro 13-47. El intermedio 13-0 (250 mg, 1.0 eq, 0.36 mmoles) se aciló con 13-47 (123 mg, 1.5 eq, 0.53 mmoles), usando EDCI (207 mg, 3.0 eq, 1.80 mmoles), DIPEA (188 μ l, 3.0 eq, 1.8 mmoles) y DMAP (15.0 mg, 3.0 eq, 0.018 mmoles), en 5 mL de DCM. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) rindiendo 261 mg (54 %) de Lípido 10 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la FIG. 4J-1 para el espectro de RMN del Lípido 10, la FIG. 4J-2 para LC-MS del Lípido 10, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 15-1. Síntesis del Lípido 10 isómero (S)

El Lípido 10 como mezcla racémica se sintetizó de forma similar a la proporcionada en el esquema 15-2 a continuación. El material de partida, octan-3-ol, 13-46 (2.0 g, 1.0 eq, 15.3 mmoles) se aciló con ácido succínico, 13-30 (3.1 g, 2.0 eq, 30.6 mmoles) usando DMAP (1.72 g, 1.0 eq, 15.3 mmoles) y piridina (2.0 ml) en 2 mL de THF y 6 mL de DCM para obtener el intermedio 13-47. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 1.1 g (31 %) del intermedio ácido puro 13-47. Se aciló 13-0 (250 mg, 1.0 eq, 0.36 mmoles) con 13-38 (123 mg, 1.5 eq, 0.53 mmoles) usando DIPEA (188 μ L, 3.0 eq, 1.8 mmoles), EDCI (207 mg, 3.0 eq, 1.80 mmoles), y DMAP (15.0 mg, 3.0 eq, 0.018 mmoles), en 5 mL de DCM. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) rindiendo 261 mg (54 %) de Lípido 10 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la FIG. 4J-1 para el espectro de RMN del Lípido 10, la FIG. 4J-2 para LC-MS del Lípido 10, y la Tabla 5 para la masa del producto).



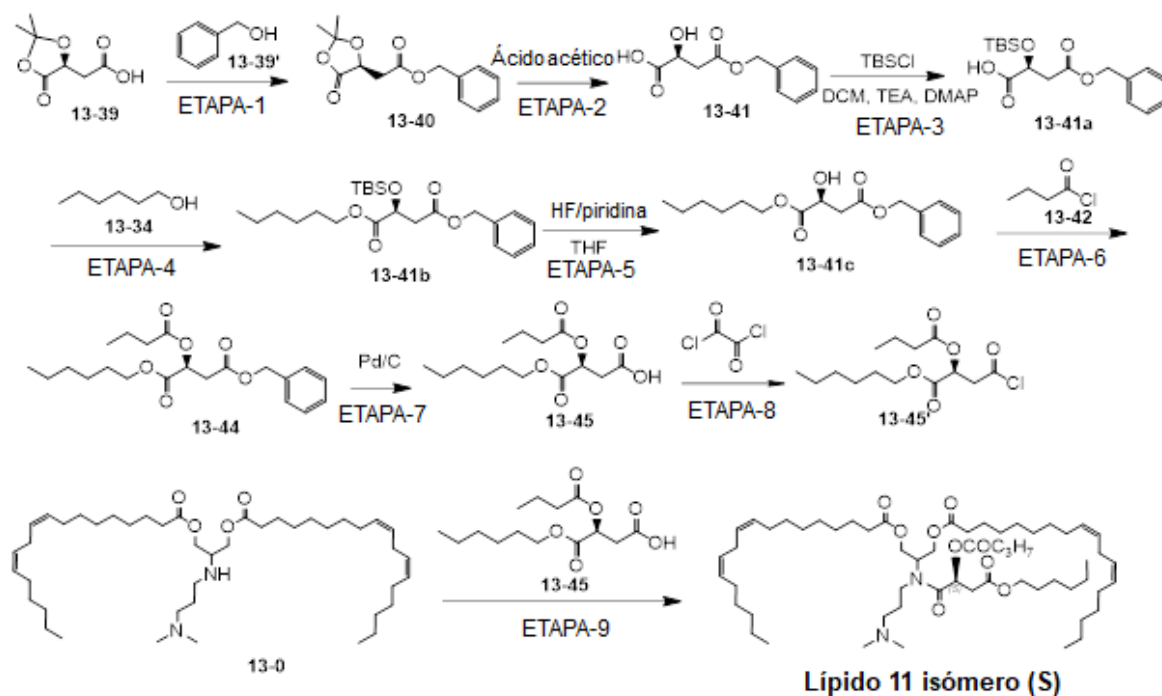
Esquema 15-2. Síntesis del Lípido 10

Síntesis del Lípido 11 por N-acilación del intermedio 13-0 usando el cloruro de ácido correspondiente

Síntesis del Lípido 11 y su isómero (S)

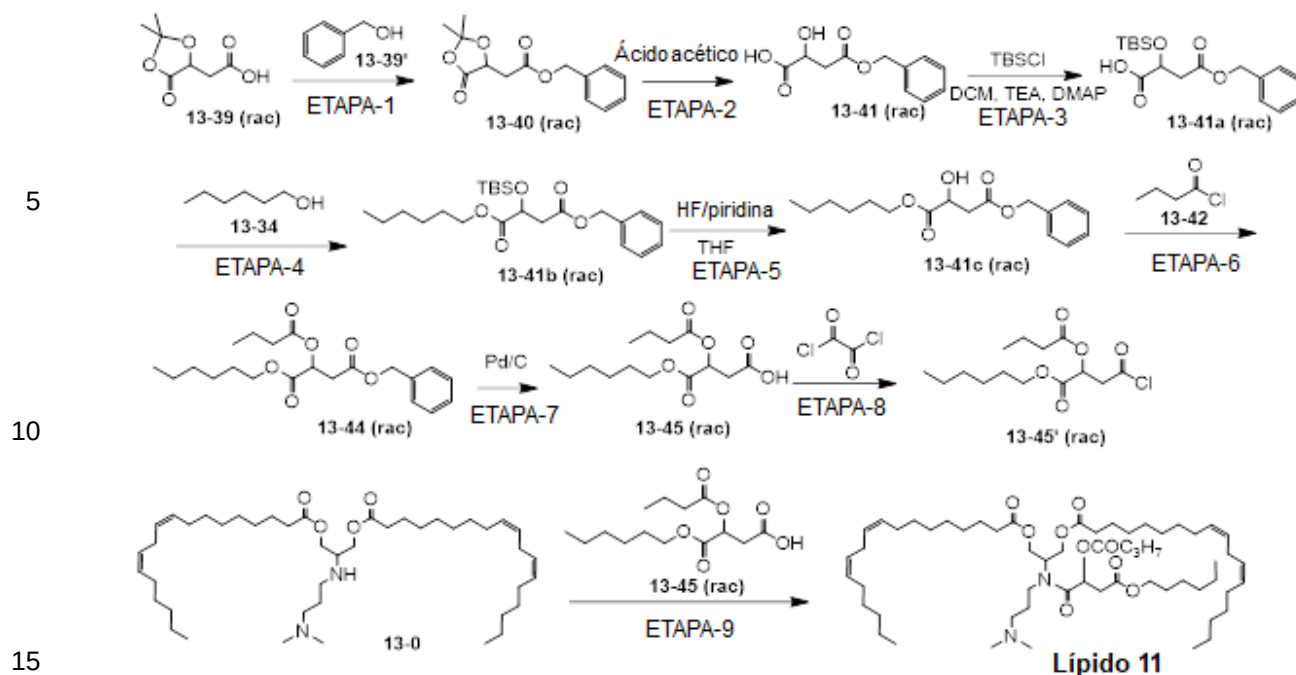
El isómero (S) del lípido 5 se sintetizó como se proporciona en el esquema 16-1 a continuación y como sigue. El material de partida, alcohol bencílico, 13-39' (18.5 mmoles, 2 g) se usó para acilar el compuesto 13-39 (4.8 g, 1.5 eq, 27.8 mmoles) usando EDCI (5.4 g, 1.5 eq, 27.8 mmoles), DIPEA (4.6 mL, 1.5 eq, 27.8 mmoles), y DMAP (463 mg, 0.2 eq, 3.7 mmoles) rindiendo 3.6 g (74 %) del intermedio 13-40 purificado en columna (producto confirmado por espectrometría de masas y RMN de protones). El intermedio 13-40 (684 mg, 2.6 mmoles, 1 eq.) se desprotegió en ácido acético para obtener el intermedio 13-41 (~600 mg, cuantitativo y la estructura del producto se confirmó por espectrometría de masas y RMN de protones). Se generó una cantidad adicional del intermedio 13-41 y 1.68 g, 7.5 mmoles de 13-41 se protegió selectivamente en el grupo hidroxilo usando TBSCl (1.7 g, 11.25 mmoles, 1.5 eq), TEA (5.3 mL, 5.0 eq, 37.5 mmoles), y DMAP (92 mg, 0.75 mmoles, 0.1 eq), en 20 mL de DCM rindiendo el intermedio protegido 13-41a (~2.5 g, cuantitativo) (la masa del producto se confirmó por espectrometría de masas y RMN de protones). El intermedio 13-41a (1.61 g, 4.76 mmoles) se esterificó con alcohol n-hexílico 13-34 (2.94 mL, 23.8 mmoles, 5.0 eq) usando EDCI (2.76 g, 14.2 mmoles, 3.0 eq), DIPEA (1.6 mL, 2.0 eq, 9.52 mmoles) y DMAP (580 mg, 4.76 mmoles, 1.0 eq) en 11.0 mL de DCM para obtener 13-41b (0.95 g, 48 %). Se generó una cantidad adicional de 13-41b y se desprotegió un total de 1.36 g (3.2 mmoles) usando HF-piridina (5.8 mL, 80.6 mmoles, 25 eq.) en 30 mL de THF para obtener el intermedio 13-41c (837 mg, 84 %). El intermedio 13-41c (456 mg, 1.48 mmoles) se aciló con cloruro de n-butanilo, 13-42 (760 µL, 7.4 mmoles, 5.0 eq) en 4.0 mL de piridina (4.0 mL) rindiendo el compuesto 13-44 (505 mg, 90 %). El intermedio 13-44 (505 mg, 1.34 mmoles) se desprotegió usando Pd/C (30 mg) en 3.0 mL de acetato de etilo rindiendo el compuesto 13-45 (370 mg, 96 %). El compuesto 13-45 (188 mg, 0.65 mmoles) se convirtió en el intermedio cloruro de ácido usando cloruro de oxalilo (190 µg, 3.4 eq, 2.2 mmoles) y DMF (10 µL, cantidad catalítica), en 3 mL de benceno. El producto solo mostró una mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 9) del intermedio 13-0. El intermedio 13-0 (152 mg, 0.22 mmoles, 1 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-45' (200

mg, 3.0 eq, 0.65 mmoles), TEA (152 μ L, 5.0 eq, 1.1 mmoles), DMAP (10 mg) en 5 mL de benceno para obtener el Lípido 11. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para rendir 77 mg (37 %) de Lípido 11 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4K-1 para el espectro de RMN del Lípido 11, la FIG. 4K-2 para LC-MS del Lípido 11, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 16. Síntesis del Lípido 11 isómero (S)

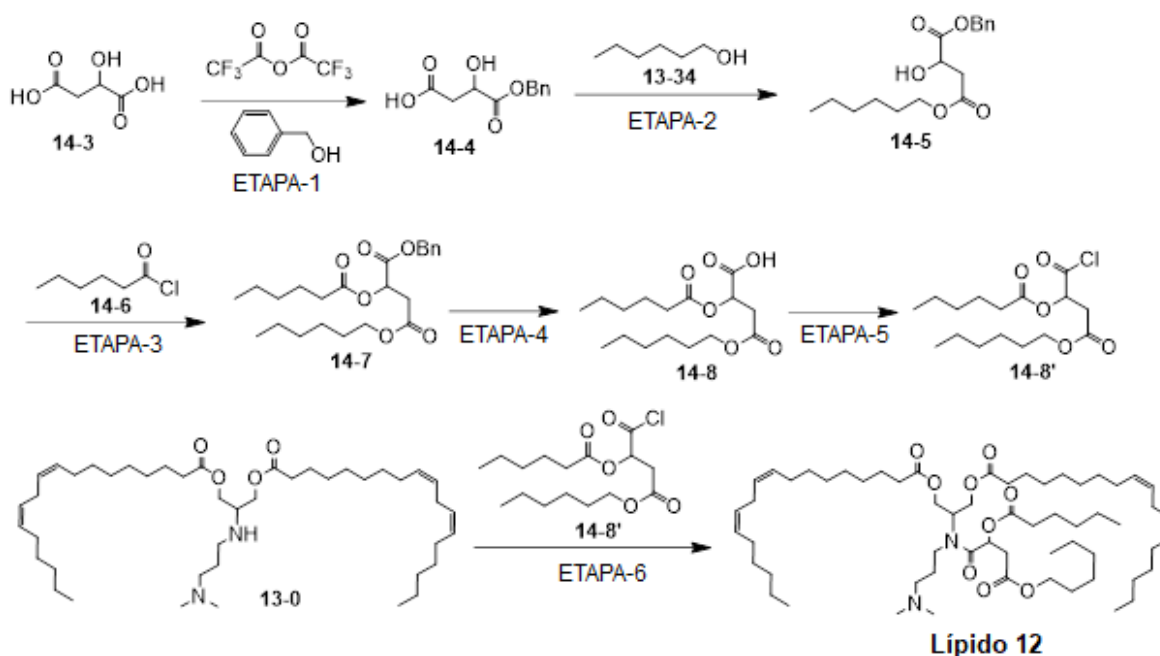
El Lípido 11 como mezcla racémica se sintetizó de forma similar a como se proporciona en el esquema 16-2 a continuación.



Esquema 16-2. Síntesis del Lípido 11

Síntesis del Lípido 12

El Lípido 12 se sintetizó como se proporciona en el esquema 34 a continuación y como sigue. El material de partida, **14-3** (3 g, 1.0 eq, 22.37 mmoles) se protegió selectivamente en anhídrido trifluoroacético (11.27 g, 2.4 eq, 53.69 mmoles) y alcohol bencílico (15 mL) a temperatura ambiente, toda la noche, rindiendo el intermedio **14-4**. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 4.7 g (96 %) de 14-4 purificado. La acilación posterior de 14-4 (1.0 eq, 4.44 mmoles) con n-butanol, 13-34 (4.55 g, 10.0 eq, 44.60 mmoles) usando EDCI (1.71 g, 2 eq, 8.92 mmoles) y DMAP (1.089 g, 2 eq, 8.92 mmoles) en 10 mL de DCM a TA, toda la noche rindió 14-5. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 800 mg (58 %) de 14-5 purificado. La acilación del hidroxilo libre de 14-5 (800 mg, 1.0 eq, 2.59 mmoles) con cloruro de hexanoilo (1.39 g, 4.0 eq, 10.37 mmoles) usando TEA (1.31 g, 5 eq, 12.97 mmoles) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 10 mL de tolueno a temperatura ambiente, toda la noche, rindió el intermedio 14-7. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna (1X) rindió 470 mg (46 %) de 14-7 purificado. El intermedio 14-7 (470 mg, 1 eq., 3.4 mmoles) rindió 340 mg (93 %) de ácido 14-8 libre. El 14-8 bruto (56 mg, 1 eq., 0.18 mmoles) se convirtió en el cloruro correspondiente, 14-8', usando cloruro de oxalilo (50 µl, 3.4 eq., 0.60 mmoles) y DMF (0.2 µl, cantidad catalítica) en 1 mL de tolueno a temperatura ambiente, toda la noche para rendir 56 mg de cloruro 14-8' bruto. La N-acilación de 13-0 (42 mg, 1 eq., 0.059 mmoles) con 14-8' (56.0 mg, 3.0 eq, 0.17 mmoles) usando TEA (39.0 µL, 5.0 eq, 0.29 mmoles) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 3 mL de tolueno rindió el Lípido 12. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener Lípido 12 puro (23 mg, 39 %) (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4L-1 para el espectro de RMN del Lípido 12, la FIG. 4L-2 para el cromatograma LC-ELSD del Lípido 12 y la Tabla 5 para la masa del producto).

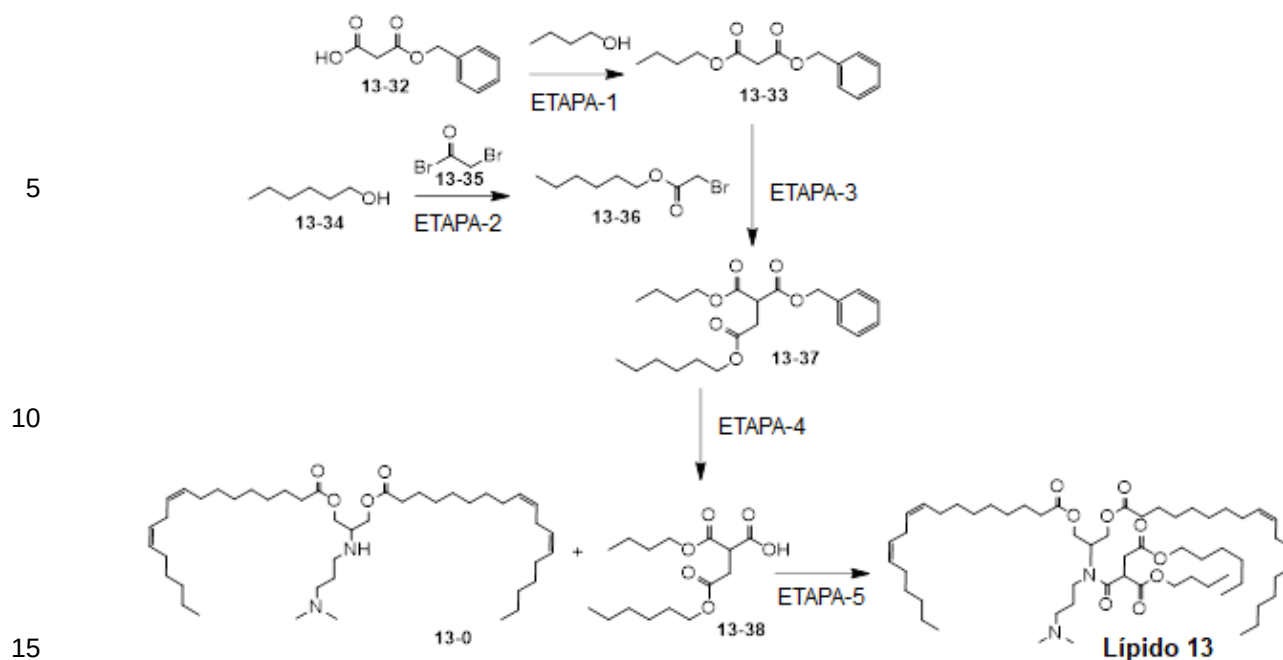


Esquema 34. Síntesis del Lípido 12

Síntesis de Lípidos 13 por N-acilación del intermedio 13-0 activación por carbodiimida del ácido carboxílico correspondiente

Síntesis del Lípido 13

El Lípido 13 se sintetizó como se proporciona en el esquema 17 a continuación y como sigue. El material de partida 13-32 (4.8 g, 2.0 eq, 25.0 mmoles) se esterificó con 1-Butanol (1.13 mL, 1 eq, 12.4 mmoles) usando EDCI (4.8 g, 2 eq, 25.0 mmoles), DIPEA (4.35 mL, 2 eq, 25.0 mmoles), y DMAP (280 mg, 0.2 eq, 2.5 mmoles) en 20 mL de DCM para obtener el intermedio 13-33. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para obtener 2.78 g (44 %) del intermedio 13-33 puro. Se accedió al intermedio 13-36 por acilación de n-hexanol (2 g, 1.0 eq, 19.6 mmoles) con bromuro de 2-bromoacetilo, 13-35 (5.05 g, 1.3 eq, 25.0 mmoles) usando NaHCO_3 (3.95 g, 2.4 eq, 47.0 mmoles) en 50 mL de acetonitrilo. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 4.32 g (97 %) del intermedio puro 13-36.



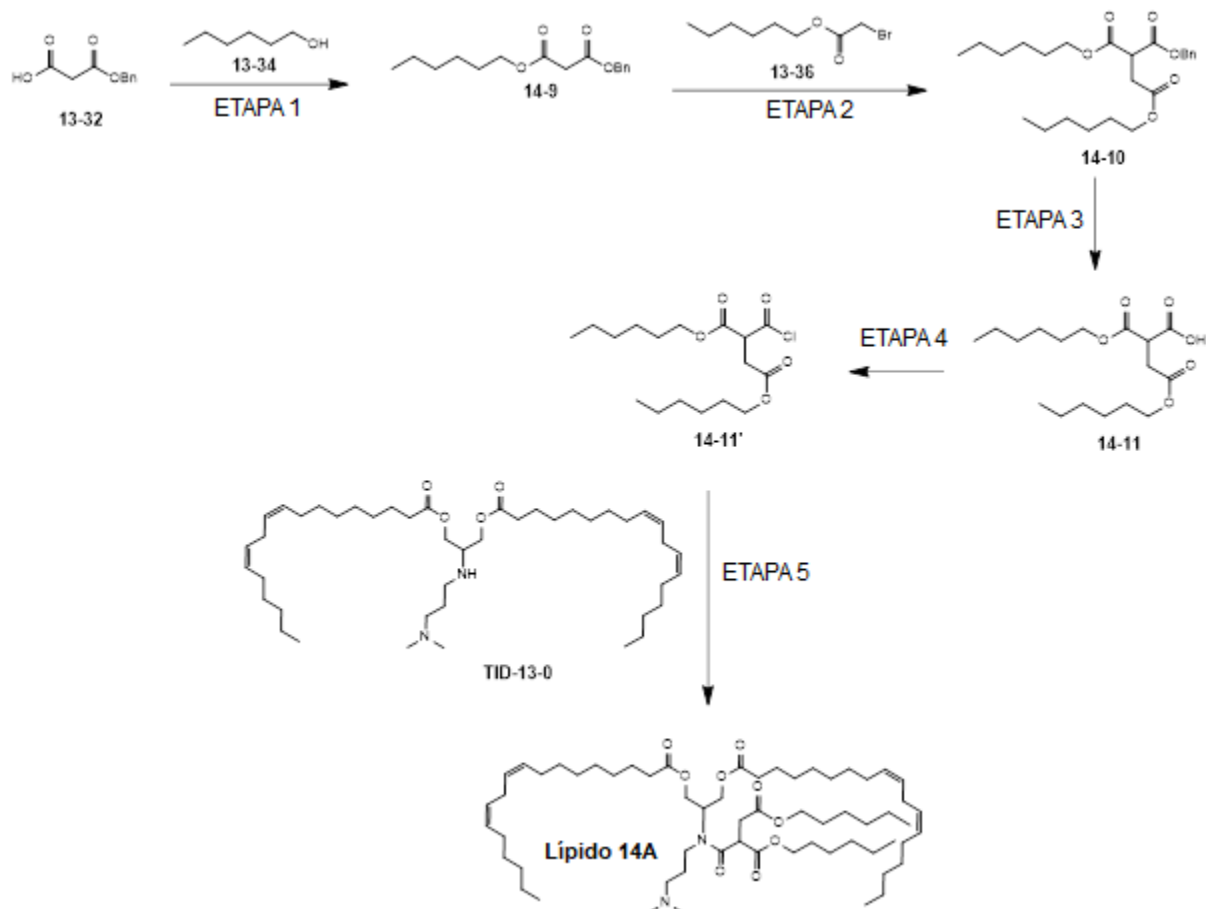
Esquema 17. Síntesis del Lípido 13

Se accedió al intermedio 13-37 por generación in situ del carbanión nucleófilo del 13-33 (1.25 g, 1.0 eq., 5.0 mmoles) usando NaH (200 mg, 1.0 eq, 5.0 mmoles) en 8 mL de DMF y reacción de desplazamiento con el intermedio 13-36 (1.1 g, 1.0 eq, 5.0 mmoles). El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) hasta 1.15 g (58 %) de intermedio puro 13-37. El intermedio ácido libre 13-38 se obtuvo por desprotección (Pd/C, 230 mg de catalizador e hidrógeno gaseoso en metanol) del intermedio 13-37 (1.15 g, 1.0 eq, 2.9 mmoles). El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (4X) para obtener 88 mg (9 %) de intermedio puro 13-38. El intermedio 13-0 (105 mg, 1.0 eq, 0.04 mmoles) se aciló con 13-38 (2.13 mmoles, 0.554 g, 1.1 eq), usando DIPEA (78 µl, 3.0 eq, 0.45 mmoles), EDCI (87 mg, 3.0 eq, 0.45 mmoles) y DMAP (5 mg, 0.3 eq, 0.04 mmoles), en 2 mL de DCM. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (3X) rindiendo 41 mg (27 %) de Lípido 13 puro (≥99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4M-1 para el espectro de RMN del Lípido 13, la FIG. 4M-2 para LC-MS del Lípido 13, y la Tabla 5 para la masa del producto).

Síntesis del Lípido 14A por N-acilación del intermedio 14-11 usando el correspondiente cloruro de ácido

Síntesis del Lípido 14A

El Lípido 14A se sintetizó como se proporciona en el Esquema 37 a continuación y como sigue.



Esquema 37. Síntesis del Lípido 14A

El material de partida, ácido malónico protegido con mono-bencilo, **13-32** (9.26 mmoles, 1.8 g, 1.0 eq.) se esterificó con N-hexanol, **13-34** (92.69 mmoles, 9.47 g, 10.0 eq.) usando EDCI (18.53 mmoles, 3.55 g, 2 eq.) y DMAP (2.26 g, 2 eq, 18.53 mmoles) en DCM (20 mL) a temperatura ambiente, toda la noche para obtener el intermedio, **14-9** (2.04 g, 79 %), el Compuesto **13-36** se preparó haciendo reaccionar bromuro de bromoacetilo (38.17 mmoles, 7.70 g, 1.3 eq.) con 3.0 g de N-hexanol, **13-34** (1.0 eq, 29.36 mmoles) usando NaHCO_3 (5.9 g, 2.4 eq, 70.47 mmoles) en 30 mL de acetonitrilo (0 °C hasta temperatura ambiente) toda la noche para obtener 6.0 g (91.6 %) de intermedio **13-36**. El intermedio **14-9** (7.2 mmoles, 2.03 g, 1.0 eq.) se convirtió en el carbanión correspondiente y se hizo reaccionar con bromuro de bromoacetilo (7.70 g, 1.3 eq, 38.17 mmoles) usando NaHCO_3 (5.9 g, 2.4 eq, 70.47 mmoles) en 30 mL de acetonitrilo (0 °C hasta temperatura ambiente, toda la noche) para obtener el intermedio, **14-10** (1.15 g, 38 %).

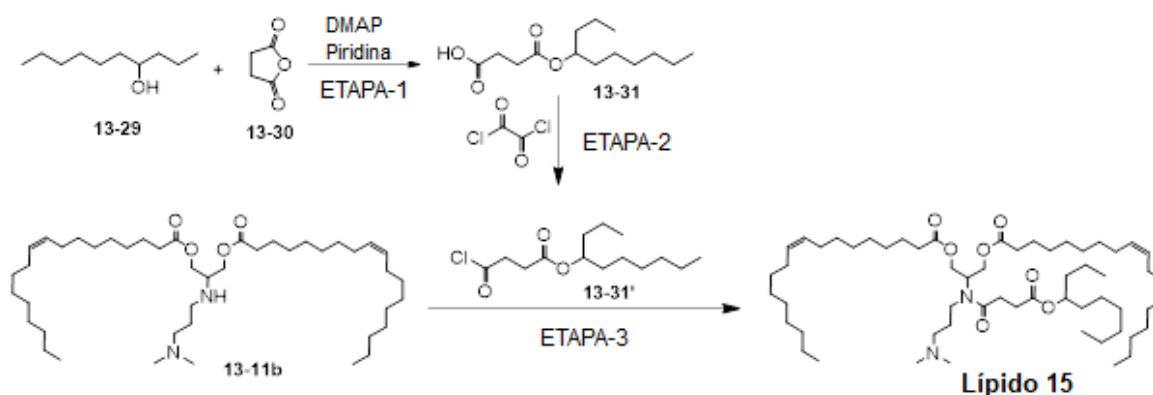
La desprotección del Intermedio **14-10** (3.4 mmoles, 1.15 g, 1.0 eq.) por hidrogenación (Pd/C , H_2 , RT, toda la noche) en acetato de etilo rindió el Intermedio **14-11** (850 mg, 94 %). Se convirtió **14-11** (300 mg, 0.9 mmoles, 1.0 eq.) en el cloruro correspondiente, **14-11'** usando cloruro de oxalilo (3.0 mmoles, 260 μL , 3.4 eq.) en 4 mL de tolueno usando DMF (0.2 μL , cantidad catalítica) a temperatura ambiente durante 2 horas. El **14-11'** crudo (0.17 mmoles, 280 mg, 3.0 eq.) se usó para la N-acilación del Intermedio **13-0**

(0.059 mmoles, 200 mg, 1.0 eq.) usando TEA (39.0 μ L, 5.0 eq, 0.29 mmoles), DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 3 mL de tolueno para obtener el Lípido 14A. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna (DCM:MeOH al 10 % en DCM) rindió 220 mg (76 %) de Lípido 14A purificado (98 % por HPLC-CAD) y se caracterizó por RMN de protón y espectrometría de masa (FIG. 4V-1 y FIG. 4V-2 para RMN de protón y HPLC-CAD y Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

Síntesis del Lípido 15 por N-acilación del intermedio 13-11a usando el cloruro de ácido correspondiente

Síntesis del Lípido 15

El Lípido 15 se sintetizó como se proporciona en el esquema 18 a continuación y como sigue. El material de partida, decan-4-ol, 13-29 (10.0 g, 63.0 mmoles) se aciló con ácido succínico, 13-30 (12.6 g, 126 mmoles, 2.0 eq) usando DMAP (7.7 g, 63 mmoles, 1 eq) y piridina (5.0 ml) en 5 mL de THF y 15 mL de DCM para obtener el intermedio 13-31. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (3X) para obtener 8.9 g (55 %) de intermedio ácido puro 13-31. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (3X) para obtener 8.9 g (55 %) de intermedio ácido puro 13-31. El intermedio 13-31 (1.26 g, 4.9 mmoles) se convirtió en el intermedio cloruro de ácido 13-31' usando cloruro de oxalilo (1.43 mL, 3.4 eq, 16.66 mmoles) y DMF (50 μ L, cantidad catalítica), en 5 mL de benceno. El producto solo mostró una mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 3) del intermedio 13-11b. El intermedio 13-11b (275 mg, 0.39 mmoles) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-31' (324 mg, 3.0 eq, 1.17 mmoles), TEA (270 μ L, 5.0 eq, 1.95 mmoles), DMAP (20 mg, cantidad catalítica) en 10 mL de benceno para obtener el Lípido 15. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) para rendir 230 mg g (64 %) de Lípido 15 puro (99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4N-1 para el espectro de RMN del Lípido 15, la FIG. 4N-2 para LC-MS del Lípido 15, y la Tabla 5 para la masa del producto).

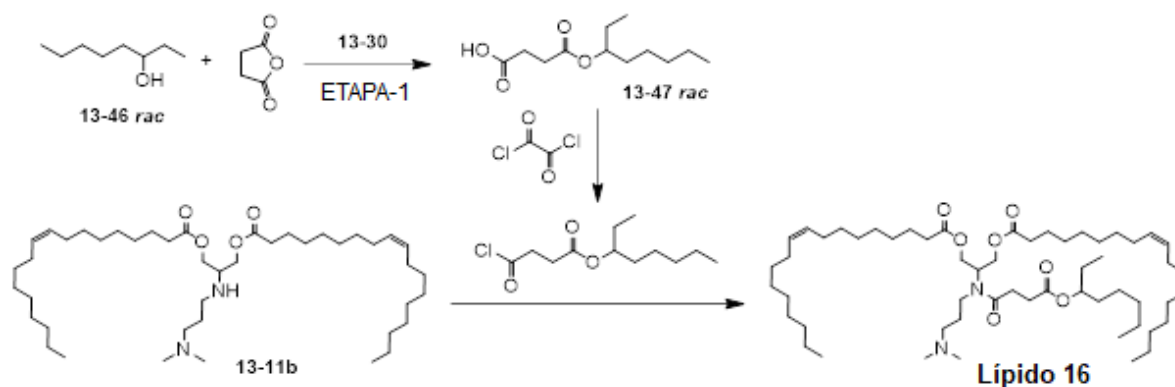


Esquema 18. Síntesis del Lípido 15

Síntesis del Lípido 16

El Lípido 16 se sintetizó como se proporciona en el esquema 19 a continuación y como sigue. El material de partida, octan-3-ol, 13-48 rac (3 g, 23 mmoles) se aciló con ácido succínico, 13-30 (46.08 mmoles, 4.61 g, 2.0 eq) usando DMAP (23.04 mmoles, 2.8 g, 1.0 eq.) y piridina (5.0 ml) en 5 mL de THF

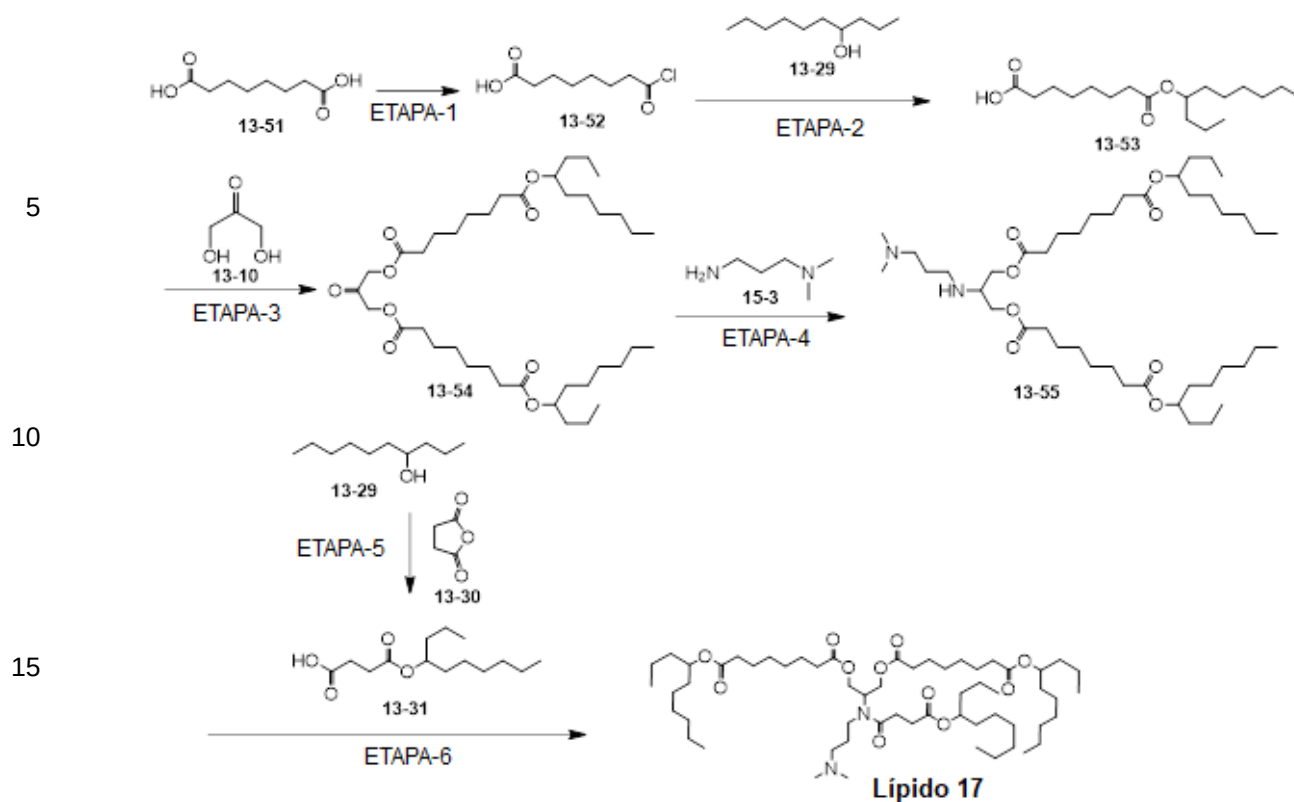
y 15 mL de DCM para obtener el intermedio 13-31. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 3.4 g (64 %) del intermedio ácido puro 13-47 rac. El intermedio 13-47 rac (300 mg, 0.42 mmoles) se convirtió en el intermedio cloruro de ácido 13-47' rac usando cloruro de oxalilo (0.38 mL, 4.4 mmoles, 3.4 eq.) y DMF (2 μ L, cantidad catalítica). El producto solo mostró una mancha en la TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 3) del intermedio 13-11b. El intermedio 13-11b (270 mg, 0.38 mmoles) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-47' rac (0.42 mmoles, 300 mg, 3.0 eq.), TEA (260 μ L, 5.0 eq, 1.9 mmoles), DMAP (20 mg, cantidad catalítica) en 5 mL de tolueno para obtener el Lípido 16. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para rendir 165 mg (47 %) de Lípido 16 puro (99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4O-1 para el espectro de RMN del Lípido 16, la FIG. 4O-2 para LC-MS del Lípido 16, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 19. Síntesis del Lípido 16

Síntesis del Lípido 17

El Lípido 17 se sintetizó como se proporciona en el esquema 20 a continuación. El ácido octanodioico, 13-51 (5.0 g, 2.0 eq, 28.5 mmoles) se monoaciló con decan-3-ol, 13-29 (2.75 mL, 1.0 eq, 14.3 mmoles) usando EDCI (3.29 g, 1.2 eq, 17.2 mmoles), DMAP (160 mg, 0.12 eq, 1.72 mmoles) y TEA (9.96 mL, 5.0 eq, 71.5 mmoles) en 50 mL de DCM/DMF (1:1 v/v) (50 mL) a temperatura ambiente toda la noche para obtener el ácido libre 13-53. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 1.06 g (28 %) de 13-53 purificado. El ácido 13-53 (1.06 g, 2 eq., 3.7 mmoles) se hizo reaccionar con dihidroxiacetona (152 mg, 1.0 eq, 1.7 mmoles) usando EDCI (816 mg, 2.5 eq, 4.25 mmoles), DMAP (50 mg, 0.25 eq, 0.43 mmoles) y DIPEA (740 μ L, 2.5 eq, 4.3 mmoles) en 15 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche para obtener la cetona 13-54. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 890 mg (69 %) de 13-54 purificado. La aminación reductora de 13-54 (890 mg, 1.0 eq, 1.3 mmoles) con amina, 15-3 (327 μ L, 2.0 eq, 2.6 mmoles) usando ácido acético (150 μ L, 2.0 eq, 2.6 mmoles) y triacetato de borohidruro sódico, Na(OAc)₃BH (331 mg, 1.2 eq, 1.5 mmoles) en 20 mL de DCM (20 mL) a temperatura ambiente durante 3 horas, rindió el intermedio 13-55. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 13-55 purificado (470 mg, 47 %). La N-acilación del intermedio 13-55 usando el ácido 13-31 y las condiciones de reacción descritas para la N-acilación de la síntesis del Lípido 15 dio como resultado el Lípido 17.

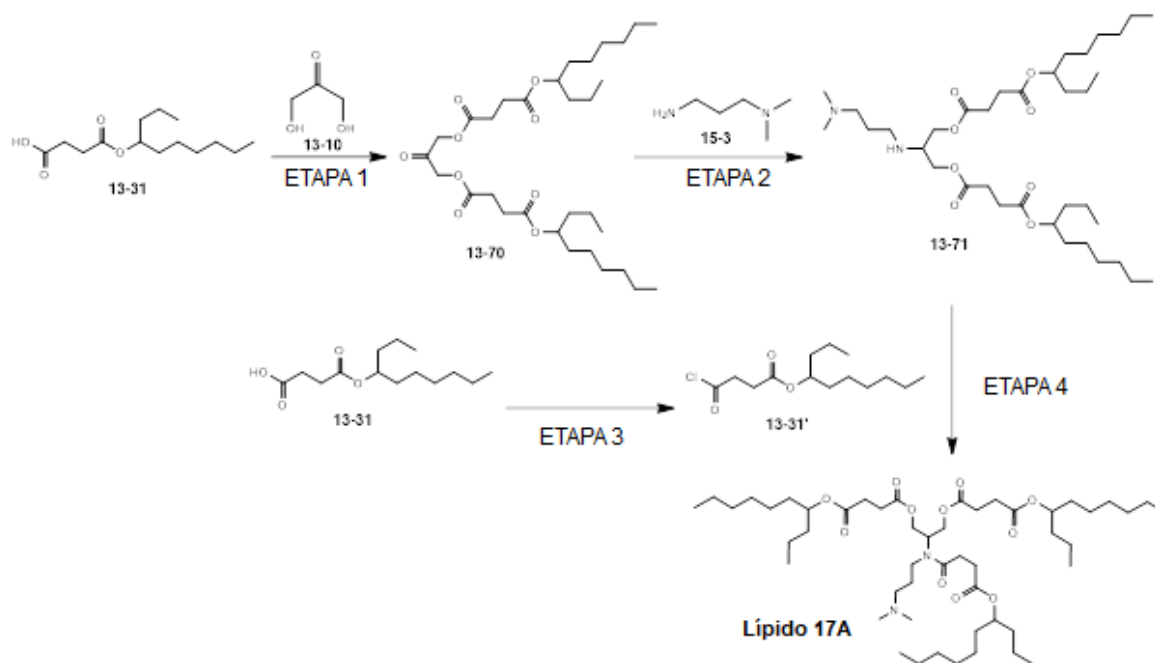


Esquema 20. Síntesis del Lípido 17

Síntesis del Lípido 17A

El material de partida 4-hidroxidecanol (63.1 mmoles, 10 g, 1 eq.) se aciló con anhídrido succínico, **13-30** (12.64 g, 2.0 eq, 12.2 mmoles) usando EDCI (2.65 g, 2.5 eq, 126.3 mmoles), DMAP (7.7 g, 1.0 eq, 63.1 mmoles) y piridina (17 mL) en una mezcla de 17 mL de THF y 50 mL de DCM a temperatura ambiente, toda la noche para obtener 8.8 g (54 %) de intermedio ácido, 13-31. El material de partida, 1,3-dihidroxiacetona, 13-10 (8.32 mmoles, 0.75 g, 1 eq.) se diaciló con el intermedio **13-31** (20.8 mmoles, 5.36 g, 2.5 eq.) usando EDCI (3.98 g, 2.5 eq, 20.8 mmoles) y DMAP (0.203 g, 0.2 eq, 1.6 mmoles) en 20 mL de DCM a RT, toda la noche para obtener 1.89 g (40 %) de intermedio cetona **13-70**. El Intermedio **13-70** (3.2 mmoles, 31.87 g, 1 eq.) se convirtió en el intermedio diamina **13-71** por aminación reductora con N,N-dimetilamino-3-aminopropano, **15-3** (6.5 mmoles, 0.66 g, 2.0 eq.) usando Na(OAc)₃BH (1.38 g, 2.0 eq, 6.5 mmoles), ácido acético (0.37 mL, 2.0 eq, 6.5 mmoles) en 15 mL de DCM (15 mL) a temperatura ambiente durante 3 horas. La purificación del producto bruto 2X por cromatografía en columna (MeOH al 10 % en DCM) rindió 500 mg (23 %) de Intermedio **13-71** purificado. Una cantidad adicional del Intermedio ácido 13-31 (19.4 mmoles, 0.24 g, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente 13-31' usando cloruro de oxalilo (0.92 mmoles, 0.26 mL, 3.4 eq.) y DMF (20 µL, cantidad catalítica) en 3 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas y se usó cloruro de ácido **13-31** bruto (0.9 mmoles, 0.23 g, 3 eq.) para la N-acilación del intermedio diamina **13-71** (0.3 mmoles, 0.2 g, 1 eq.) usando TEA (1.5 mmoles, 3.98 g, 5.0 eq.) y DMAP (20 mg, cantidad catalítica) en 4 mL de tolueno a temperatura ambiente toda la noche para rendir el **Lípido 17A**. El producto crudo se purificó 2X por

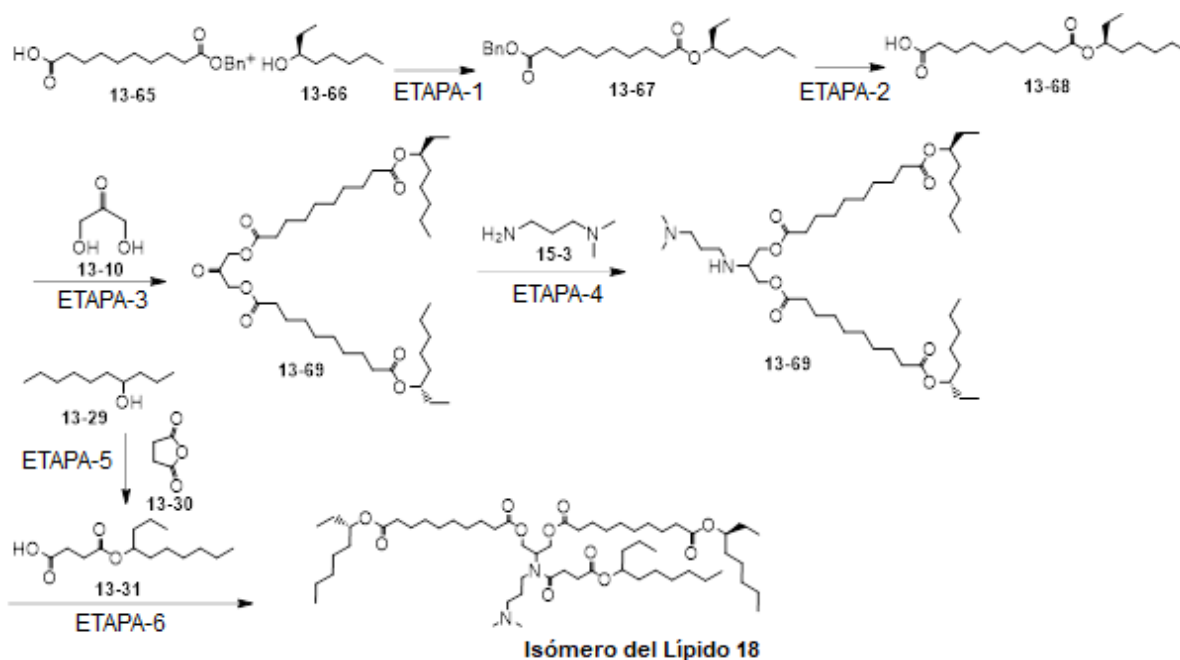
cromatografía en columna (DCM:MeOH al 10 % en DCM) para obtener 165 mg (60 %) de **Lípido 17A** puro (>99 % por HPLC-CAD) y se caracterizó por RMN de protón y espectrometría de masa (FIG. 4W-1 y FIG. 4W-2 para RMN de protón y HPLC-CAD y Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).



Esquema 21. Síntesis del Lípido 17A

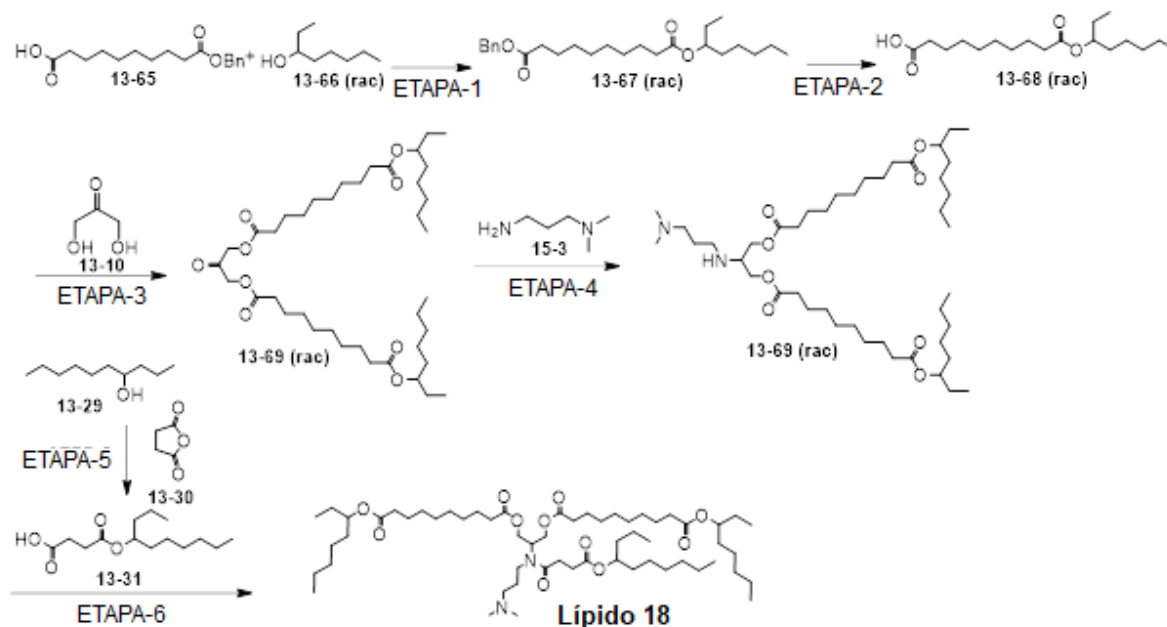
Síntesis del Lípido 18 y su isómero

Se sintetizó un isómero del Lípido 18 como se proporciona en el esquema 21-1 a continuación. El Lípido 18 se sintetizó usando métodos análogos a los descritos para el Lípido 17, reemplazando el decan-3-ol por octano-2-ol en la Etapa 1.



Esquema 21-1. Síntesis del isómero del Lípido 18

El Lípido 18 como mezcla racémica se sintetizó como se proporciona en el esquema 21-2 a continuación.

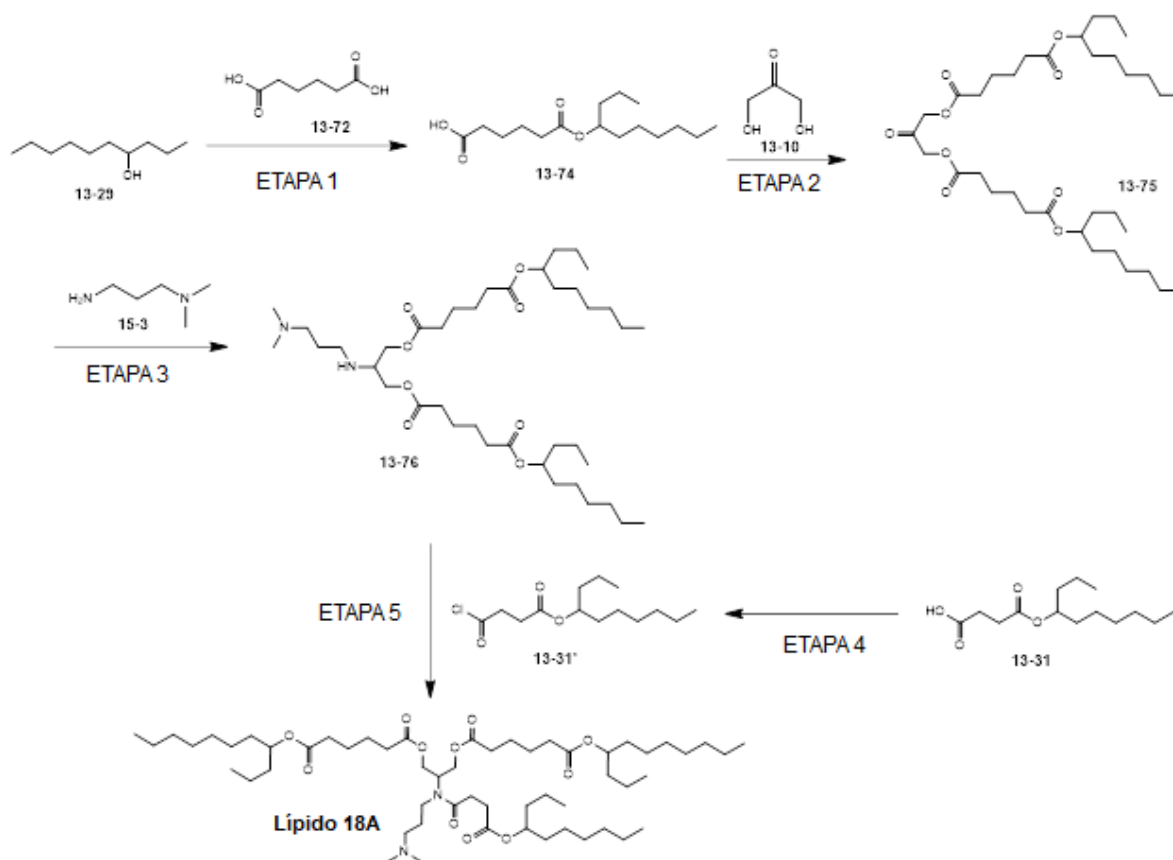


Esquema 21-2. Síntesis del Lípido 18

Síntesis del Lípido 18A

El material de partida 4-hidroxidecanol, **13-29** (31.6 mmoles, 5 g, 1 eq.) se aciló con ácido adípico, **13-72** (10.4 g, 2.0 eq, 63.2 mmoles) usando EDCI (37.90 mmoles, 7.3 g, 1.2 eq.), DMAP (0.5 g, 0.12 eq, 3.8 mmoles, 0.5 g, 0.12 eq.) y TEA (158 mmoles, 22 mL, 5.0 eq.) en una mezcla de 50 mL de DCM (50 mL) 50 mL DMF (50 mL) a temperatura ambiente, RT, toda la noche para obtener 9.8 g (90 %)

de intermedio ácido, 13-74. El material de partida, 1,3-dihidroxiacetona, 13-10 (11.09 mmoles, 1.0 g, 1.0 eq.) se diaciló con Intermedio ácido **13-74** (27.7 mmoles, 7.93 g, 2.5 eq.) usando EDCI (27.7 mmoles, 5.32 g, 2.5 eq.) y DMAP (3.58 g, 0.2 eq, 2.2 mmoles) en 30 mL a temperatura ambiente toda la noche para obtener 1.18 g (17 %) de intermedio cetona **13-75**. El intermedio **13-75** (3.2 mmoles, 1.16 g, 1.0 eq.) se convirtió en el intermedio diamina **13-76** por aminación reductora con N,N-dimetilamino-3-aminopropano, **15-3** (6.5 mmoles, 0.66 g, 2.0 eq.) usando Na(OAc)₃BH (1.38 g, 2.0 eq, 6.5 mmoles), ácido acético (0.37 mL, 2.0 eq, 6.5 mmoles) en 15 mL de DCM (15 mL) a temperatura ambiente durante 3 – 4 horas. La purificación del producto bruto 2X por cromatografía en columna (MeOH al 10 % en DCM) rindió 660 mg (50 %) de Intermedio **13-76** purificado. Una cantidad adicional del Intermedio ácido 13-31 (19.4 mmoles, 0.24 g, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente 13-31' usando cloruro de oxalilo (0.92 mmoles, 0.26 mL, 3.4 eq.) y DMF (20 µL, cantidad catalítica) en 3 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas y el cloruro de ácido bruto **13-31'** (0.9 mmoles, 0.23 g, 3 eq.) se usó para la N-acilación del intermedio diamina **13-76** (0.3 mmoles, 0.2 g, 1 eq.) usando TEA (1.5 mmoles, 3.98 g, 5.0 eq.) y DMAP (20 mg, cantidad catalítica) en 4 mL de tolueno a temperatura ambiente toda la noche para rendir el **Lípido 18A**. El producto bruto se purificó 2X por cromatografía en columna (DCM:MeOH al 10 % en DCM) para obtener 175 mg (60 %) de **Lípido 18A** puro (>99 % por HPLC-CAD) y se caracterizó por RMN de protón y espectrometría de masa (FIG. 4X-1 y FIG. 4X-2 para RMN de protón y HPLC-CAD y Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

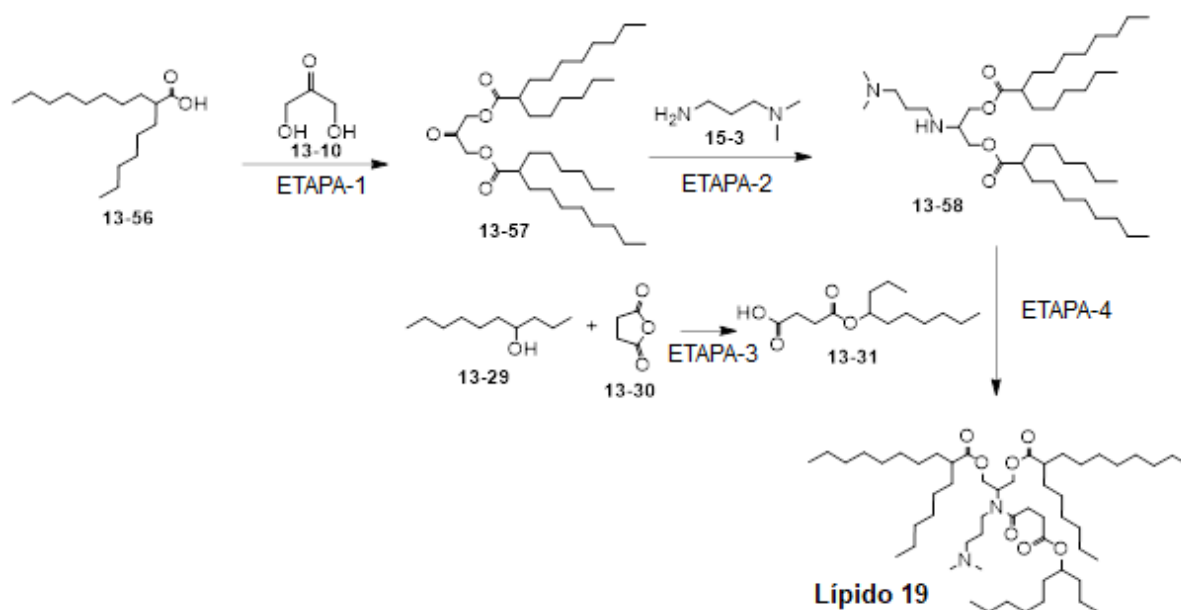


Esquema 21-3. Síntesis del Lípido 18A

Síntesis del Lípido 19

El Lípido 19 se sintetizó como se proporciona en el esquema 22 a continuación y como sigue. El material de partida dihidroxiacetona (422 mg, 4.7 mmoles) se aciló con el compuesto 13-56 (3.0 g, 2.5 eq, 11.71 mmoles) usando EDCI (2.24 g, 2.5 eq, 11.71 mmoles), DIPEA (2.0 mL, 2.5 eq, 11.71 mmoles) y DMAP (115 mg, 0.2 eq, 0.94 mmoles) en 10 mL de DCM rindiendo 2.1 g (79 %) del intermedio 13-57. La aminación reductora de 13-57 (2.1 g, 1.0 eq, 3.7 mmoles) con la amina 15-3 (925 μ L, 2.0 eq, 7.4 mmoles) usando ácido acético (430 μ L, 2.0 eq, 7.4 mmoles), Na(OAc) $_3$ BH (923 mg, 1.2 eq, 4.44 mmoles) en 10.0 mL de DCM rindiendo 1.55 g (65 %) del intermedio 13-58. El intermedio 13-31 se produjo como se describió anteriormente en la síntesis del Lípido 9 y el Lípido 15. La N-acilación del intermedio 13-58 (484 mg, 1.0 eq, 0.74 mmoles) con 13-31 (380 mg, 2.0 eq, 1.48 mmoles) usando EDCI (291 mg, 2.0 eq, 1.48 mmoles), DIPEA (247 μ L, 2.0 eq, 1.48 mmoles), y DMAP (45 mg, 0.5 eq, 0.37 mmoles) en 4.0 mL de DCM a temperatura ambiente, toda la noche rindió 423 mg (63 %) de Lípido 19 puro (pureza >99 %).

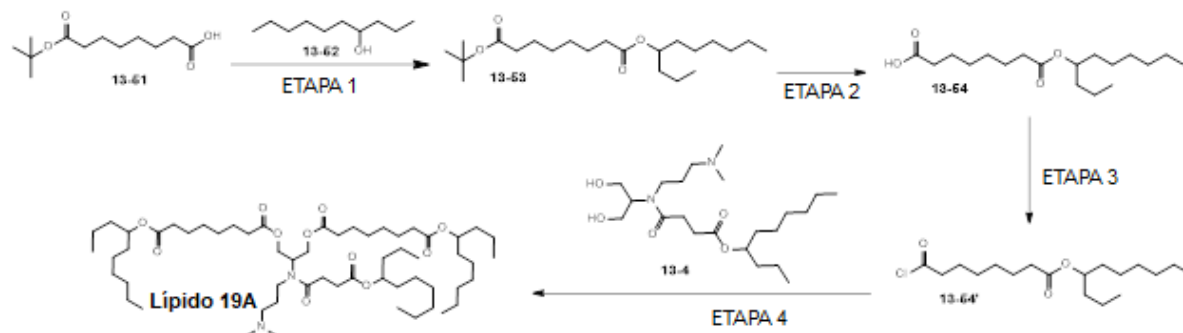
Véanse la FIG. 4P-1 para el espectro de RMN del Lípido 19, la FIG. 4P-2 para el cromatograma LC-ELSD de fase inversa del Lípido 19 y la Tabla 5 para la masa del producto.



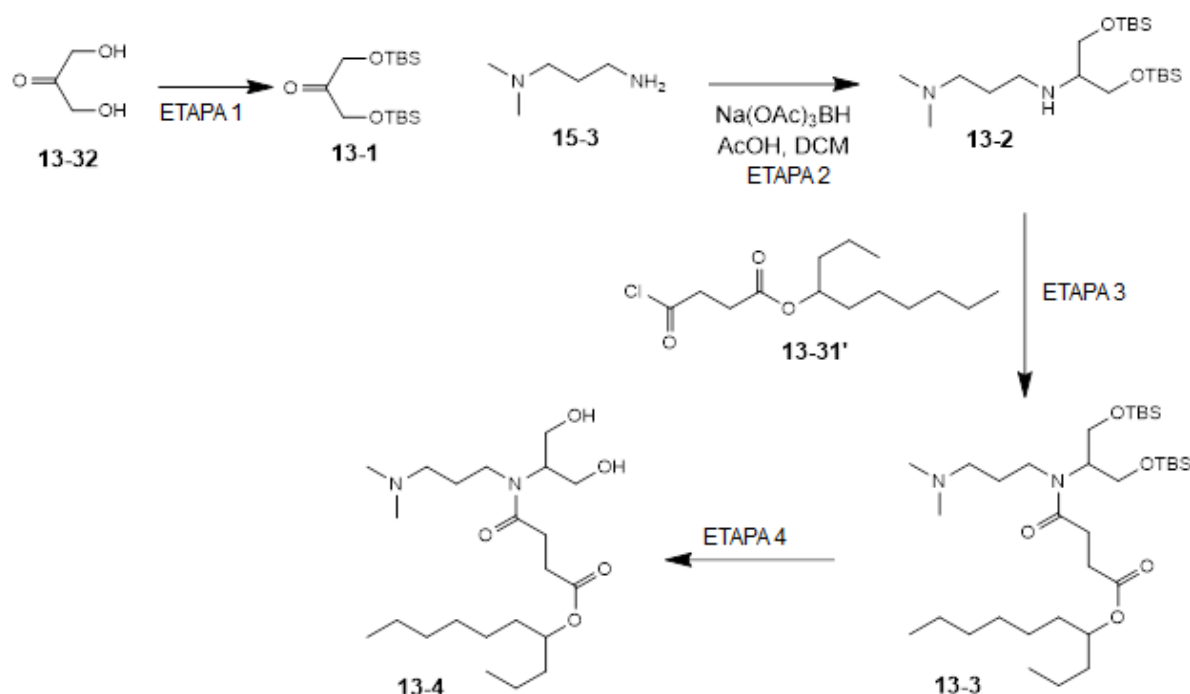
Esquema 22. Síntesis del Lípido 19

Síntesis del Lípido 19A

El material de partida ácido subérico protegido con butilo terciario 13-51 (8.6 mmoles, 2.0 g, 1 eq.) se esterificó usando 4-hidroxidecanol **13-52** (13.02 mmoles, 2.06 g, 1.5 eq) usando EDCI (13.02 mmoles, 2.49 g, 1.5 eq), DMAP (4.3 mmoles, 0.53 g, 0.5 eq) y DIPEA (13.02 mmoles, 1.68 g, 1.5 eq) en 20 mL de diclorometano a temperatura ambiente durante 4 horas, rindiendo 2.83 g (88 %) de intermedio 13-53 protegido. El intermedio 13-53 (4.05 mmoles, 1.5 g, 1.0 eq.) se desprotegió usando HCl 4N en 10 mL de dioxano a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 1.07 g (84 %) de intermedio ácido 13-54.



Esquema 22-1. Síntesis del Lípido 19A



Esquema 22-2. Síntesis del Intermedio 13-4

La protección del material de partida dihidroxiacetona 13-32 (111 mmoles, 10 g, 1 eq.) usando cloruro de terc-butiltrimetilsililo TBSCl (332 mmoles, 50 g, 3.0 eq), TEA (148 mmoles, 160 mL, 10.34 eq.) y DMAP (23 mmoles, 2.80 g, 0.21 eq.) en 420 mL de DCM (420.0 mL) a temperatura ambiente toda la noche rindió el intermedio 13-1 protegido. Se produjo un segundo lote de 13-1 a partir de 50 g (0.56 moles, 1.0 eq) de 13-32 adicional usando TBSCl (1.68 moles, 250 g, 3.0 eq), TEA (5.6 moles, 400 mL, 10.34 eq.), DMAP (0.11 moles, 13.7 g, 0.21 eq.) en 800 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche. Los productos brutos de los dos lotes se sometieron a aminación reductora separadamente y se combinaron antes de la purificación. El primer lote de 13-1 (176 g, 552.0 mmoles) se sometió a aminación reductora usando N,N-dimetilaminopropil amina **15-3**, (1.104.0 mmoles, 139 mL, 2.0 eq.), ácido acético (1.104.0 mmoles, 64 mL, 2.0 eq.), y Na(OAc)₃BH (662.0 mmoles, 135 g, 1.2 eq.), en 1.5 L de diclorometano a temperatura ambiente durante 3 horas. El segundo lote de 13-1 (36.8 g, 115.4 mmoles) se sometió a aminación reductora usando N,N-dimetilaminopropil amina **15-3**, (230.8 mmoles, 29 mL, 2.0

30

35

eq.), ácido acético (230.8 mmoles, 13.4 mL, 2.0 eq.), y Na(OAc)₃BH (138.5 mmoles, 28.2 g, 1.2 eq.), en 300 mL de diclorometano a temperatura ambiente durante 3 horas. El producto bruto combinado de los dos lotes se purificó por cromatografía en columna de filtro en columna de sílice eluyendo con DCM y (MeOH al 10 % en DCM + NH₄OH al 1 %) para obtener el producto deseado, rindiendo 17 g de intermedio **13-2** puro basado en TLC.

Los dos lotes de **13-2** se desprotejeron separadamente usando condiciones idénticas de reacción; consistiendo cada una en **13-2** (300 mg, 0.465 mmoles) en **HF-piridina**, (4.65 mmoles, 0.42 mL, 10.0 eq.) y 2 mL de THF a temperatura ambiente durante 2 horas.

Los dos lotes del intermedio ácido **13-54** se convirtieron separadamente en el cloruro de ácido correspondiente usando condiciones idénticas de reacción; consistiendo cada una en **13-54** (881 mg, 2.8 mmoles) usando cloruro de oxalilo (9.5 mmoles, 0.8 mL, 3.4 eq.), DMF (100 µL, cantidad catalítica) en 6.0 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas.

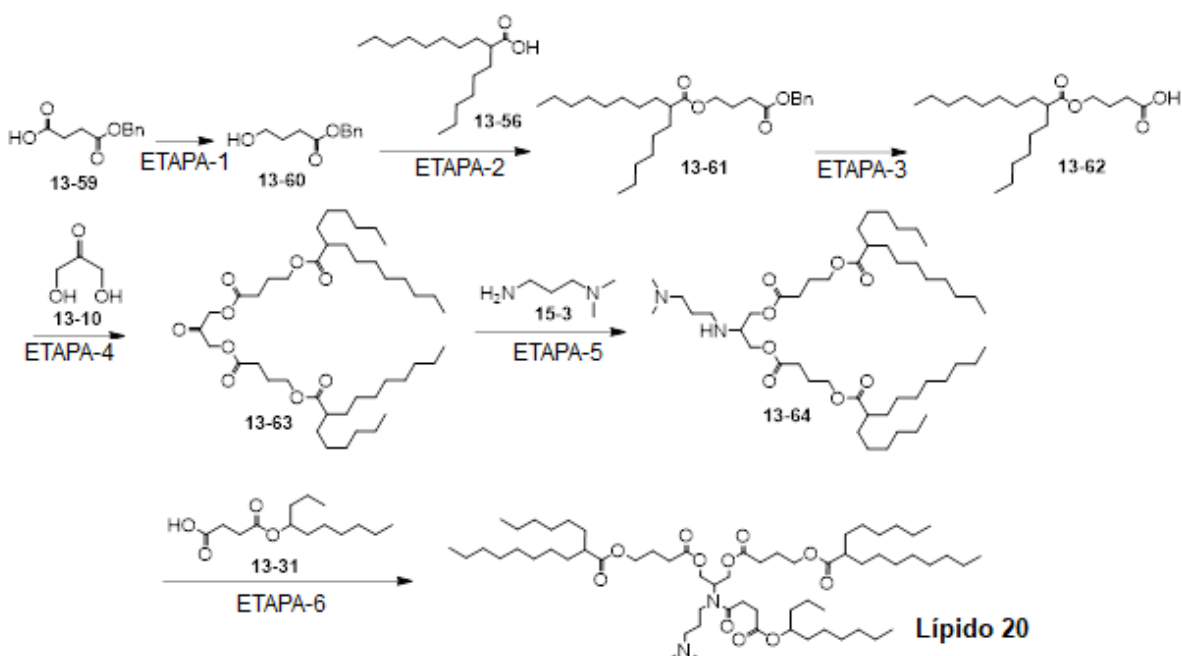
El intermedio di-hidroxi bruto 13-4 (194 mg, 0.465 mmoles) y el cloruro de ácido bruto 13-54' (2.8 mmoles, 881 mg, 6.0 eq.), se combinaron con TEA (4.65 mmoles, 0.65 mL, 10.0 eq.) en 8.0 mL de tolueno a temperatura ambiente toda la noche. El producto bruto se purificó en cromatografía en columna ISCO en columna de sílice eluyendo con DCM y MeOH al 10 % en DCM. La purificación en columna se repitió después del aislamiento del producto rindiendo 247 mg (53 %) de Lípido 19A con una pureza del 76 % (HPLC-CAD). El producto se volvió a purificar en cromatografía en columna ISCO en columna de sílice eluyendo con DCM y MeOH al 10 % en DCM, rindiendo 122 mg de Lípido 19A con una pureza >99 % (HPLC-CAD) (véanse la FIG. 4AI-1 y la FIG. 4AI-2 para la caracterización por RMN de protón, y la pureza LC-CAD y la Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

Síntesis del Lípido 20

El Lípido 20 se sintetizó como se proporciona en el esquema 23 a continuación y como sigue. El ácido succínico monoprotegido, 13-59 (2.0 g, 1.0 eq, 9.65 mmoles) se redujo al alcohol correspondiente usando borano-dimetil sulfuro (6.2 mL, 7.0 eq, 67.0 mmoles) a 0-5 °C, 1 h seguido de reacción a temperatura ambiente toda la noche. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) rindiendo 1.3 g (71 %) de compuesto puro 13-60. El intermedio 13-60 (1.3 g, 1.3 eq, 6.7 mmoles) se usó para acilar el ácido 13-56 (1.51 mL, 1.0 eq, 5.0 mmoles) usando EDCI (1.63 g, 1.7 eq, 8.5 mmoles), DIPEA (1.48 mL, 1.7 eq, 8.5 mmoles) y DMAP (98 mg, 0.17 eq, 0.85 mmoles) en 10.0 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X), rindiendo 1.88 g (65 %) del intermedio puro 13-61. La posterior desprotección por hidrogenación sobre Pd/C/Hidrógeno gaseoso (400 mg) en metanol rindió 1.42 g de ácido libre 13-62 (99 %) de producto bruto. El 13-62 bruto (1.32 g, 2.2 eq, 4.2 mmoles) se usó para acilar dihidroxiacetona, 13-10 (172 mg, 1.0 eq, 1.9 mmoles), EDCI (958 mg, 2.6 eq, 5.0 mmoles), DIPEA (870 µL, 2.6 eq, 5.0 mmoles), y DMAP (56 mg, 0.26 eq, 0.5 mmoles) en 10.0 mL de DCM a temperatura ambiente, toda la noche para obtener la cetona 13-63. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para obtener 120 mg (3.8 %) de 13-63 puro. La aminación reductora de 13-63 (120 mg, 1.0 eq, 0.16 mmoles) con la amina 15.-3 (42 µl, 2.0 eq, 0.32 mmoles) usando ácido acético (18 µl, 2.0 eq, 7.8 mmoles) y Na(OAc)₃BH (41 mg, 1.2 eq,

0.19 mmoles) en 3 mL de DCM a temperatura ambiente durante 3 horas rindió el intermedio 13-64. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 23 mg (17 %) de intermedio 13-64 purificado. La N-acilación de 13-64 (23 mg, 1.0 eq, 0.028 mmoles) con el ácido 13-31 (8.7 mg, 1.2 eq, 0.034 mmoles) usando EDCI (6.4 mg, 1.2 eq, 0.034 mmoles), DIPEA (5.8 μ L, 1.2 eq, 0.034 mmoles) y DMAP (1 mg, cat) en 1.5 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche rindió el Lípido 20. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 21 mg (70 %) de Lípido 20 puro (99 %).

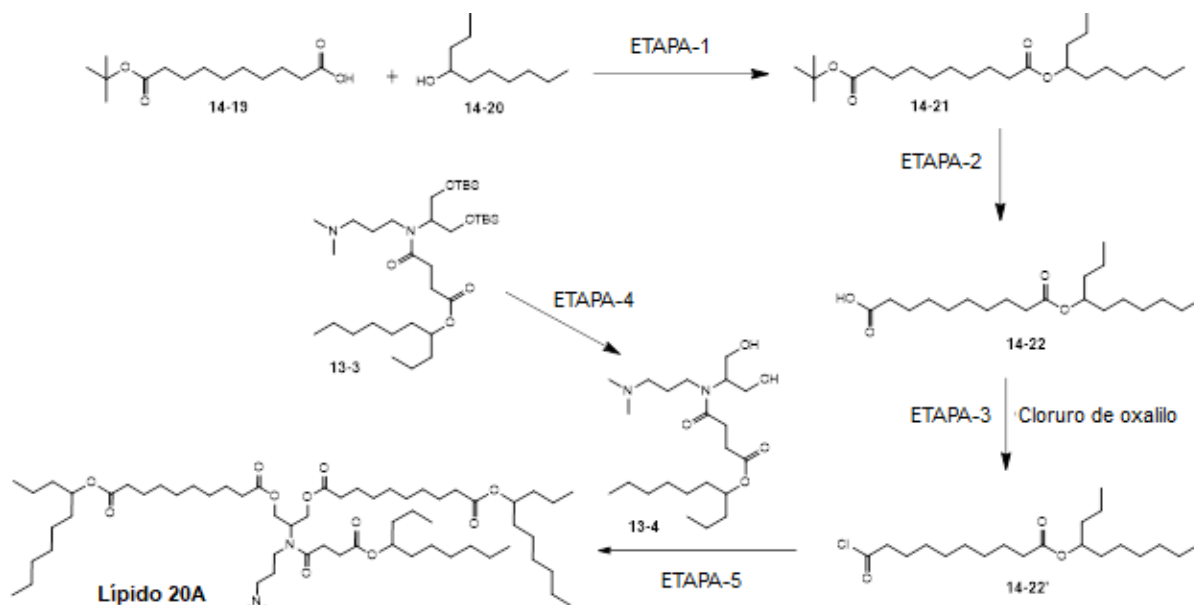
Véanse la FIG. 4Q-1 para el espectro de RMN del Lípido 20, la FIG. 4Q-2 para el cromatograma LC-ELSD de fase inversa del Lípido 20 y la Tabla 5 para la masa del producto.



Esquema 23. Síntesis del Lípido 20

Síntesis del Lípido 20A

El material de partida ácido sebácico protegido con butilo terciario 14-19 (15.5 mmoles, 4.0 g, 1 eq.) se esterificó usando 4-hidroxidecanol **14-20** (23.25 mmoles, 3.7 g, 1.5 eq) y EDCI (23.25 mmoles, 4.5 g, 1.5 eq), DMAP (7.75 mmoles, 0.95 g, 0.5 eq) y DIPEA (23.25 mmoles, 4 mL, 1.5 eq.) en 20 mL de diclorometano a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 4.1 g (66 %) de éster del intermedio protegido **14-21**. El intermedio **14-21** (10.3 mmoles, 4.1 g, 1.0 eq.) se desprotegió usando HCl 4N en 15 mL de dioxano a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 2.7 g (77 %) de intermedio ácido **14-22**.



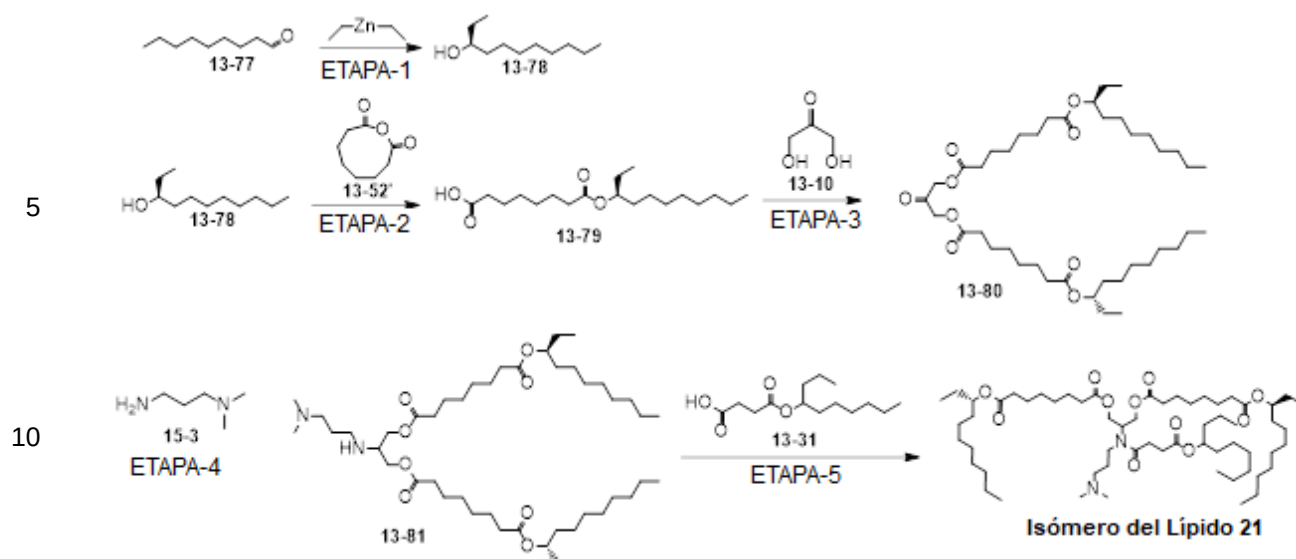
Esquema 23-1. Síntesis del Lípido 20A

El intermedio **13-3** protegido (400 mg, 0.62 mmoles, 1 eq.) se trató con fluoruro de hidrógeno/piridina (15.5 mmoles, 1.11 mL, 25.0 eq.) en 6.0 mL de THF a temperatura ambiente durante 2 horas y la desprotección se confirmó por TLC y espectrometría de masa. El intermedio ácido **14-22** (3.72 mmoles, 1.27 g, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente **14-22'** usando cloruro de oxalilo (12.6 mmoles, 1.1 mL, 3.4 eq.) y DMF (40 μ L, cantidad catalítica) en 5.0 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas y conversión a intermedio cloruro por TLC.

El intermedio di-hidroxi bruto **13-4** (258 mg, 0.62 mmoles, 1 eq.) y el cloruro de ácido bruto **14-22'** (3.72 mmoles, 1.34 g, 6.0 eq.) se combinaron con TEA (6.2 mmoles, 0.87 mL, 10.0 eq) en 5 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto bruto se purificó en cromatografía en columna ISCO en columna de sílice eluyendo con DCM y MeOH al 10 % en DCM rindiendo 300 mg de Lípido 20A con una pureza del 96 % (HPLC-CAD) (véanse la FIG. 4AJ-1 y la FIG. 4AJ-2 para la caracterización por RMN de protón, espectrometría de masa y pureza por LC-CAD).

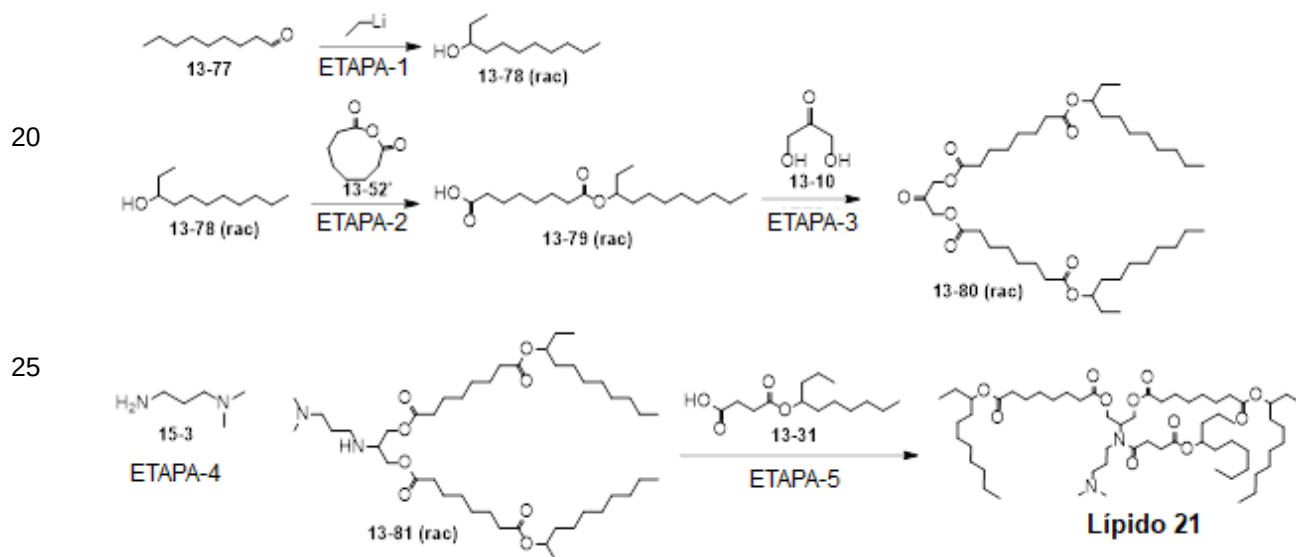
Síntesis del Lípido 21 y su isómero

Se sintetizó un isómero del Lípido 21 como se proporciona en el esquema 24-1 a continuación. Brevemente, se accedió al alcohol **13-78** por adición nucleofílica al aldehído **13-77** usando dietilcinc (Etapa 1) y posteriormente se usó en la adición de apertura de anillo al anhídrido cíclico **13-52** para acceder al intermedio **13-79**. La O-acilación de la dihidroxiacetona con el intermedio **13-79** usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 17 rindió la cetona **13-80**. La aminación reductora de **13-80** con la amina **15-3** usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 17 rindió el intermedio **13-81**. La posterior N-acilación del intermedio **13-81** con el ácido **13-31** usando condiciones análogas a las usadas en la síntesis del Lípido 9 rindió el Lípido 21.



Esquema 24-1. Síntesis del isómero del Lípido 21

15 El Lípido 21 como mezcla racémica se sintetizó como se proporciona en el esquema 24-2 a continuación. Brevemente, se accedió al Lípido 21 (racemato) usando métodos análogos a los descritos para el isómero del Lípido 21, excepto usando litio etílico para acceder al alcohol racémico en la Etapa 1.

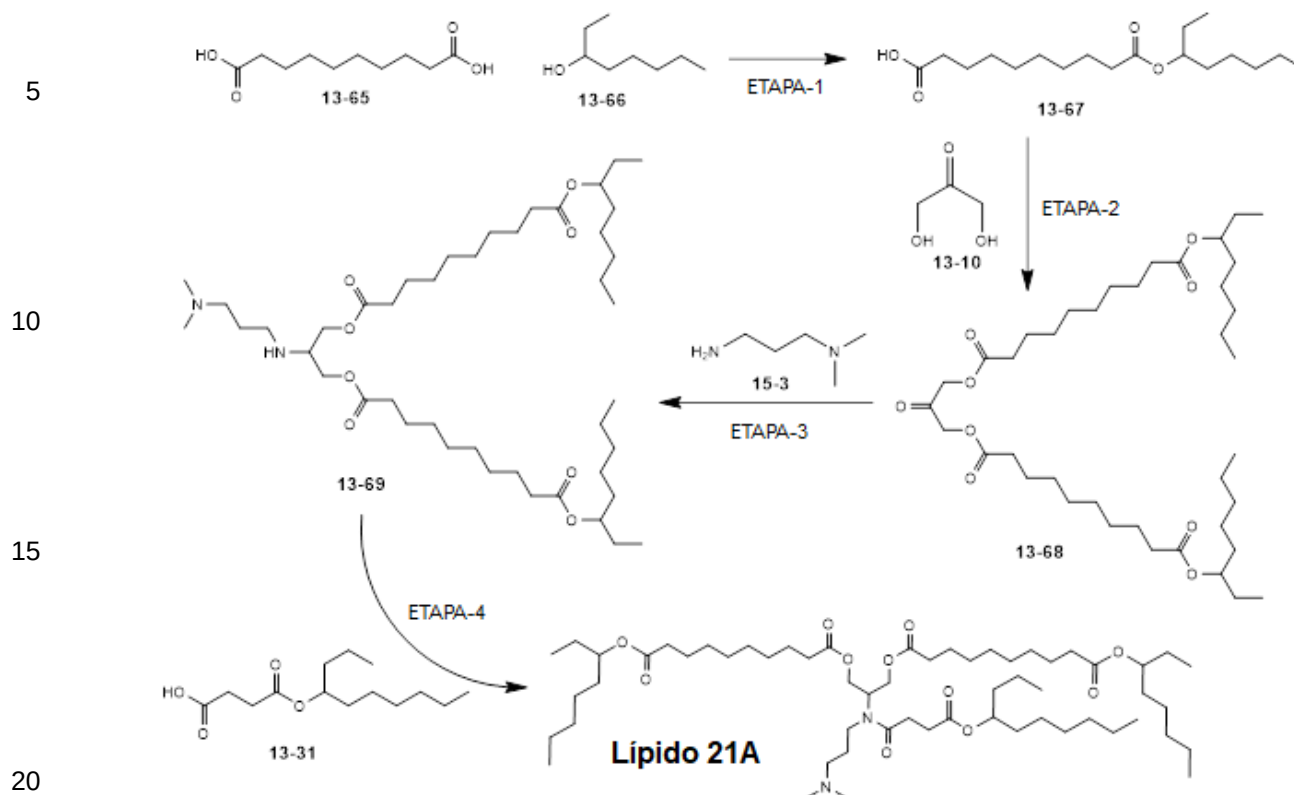


Esquema 24-2. Síntesis del Lípido 21

Síntesis del Lípido 21A

35 El material de partida 3-hidroxiocetanol, **13-66** (12.4 mmoles, 1.61 g, 1 eq.) se aciló con ácido sebácico **13-65** (24.8 mmoles, 5.0 g, 2.0 eq.) usando EDCI (14.9 mmoles, 2.83 g, 1.2 eq.), DMAP (1.5 mmoles, 183 mg, 0.12 eq.) y TEA (62.0 mmoles, 8.6 mL, 5.0 eq.) en una mezcla de 25 mL de DCM y 25 mL de DMF a temperatura ambiente, RT, toda la noche para obtener 2.2 g (56 %) de intermedio ácido, **13-67**. El material de partida, 1,3-dihidroxiacetona, **13-10** (3.2 mmoles, 286 mg, 1.0 eq.) se diaciló con el Intermedio ácido **13-67** (7.0 mmoles, 2.2 g, 2.2 eq.) usando EDCI (7.0 mmoles, 1.33 g, 2.2 eq.), DIPEA

(7.0 mmoles, 1.22 mL, 2.2 eq.) y DMAP (1.6 mmoles, 197 mg, 0.5 eq.) en 10 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche para obtener 1.4 g (65 %) del intermedio cetona **13-68**.

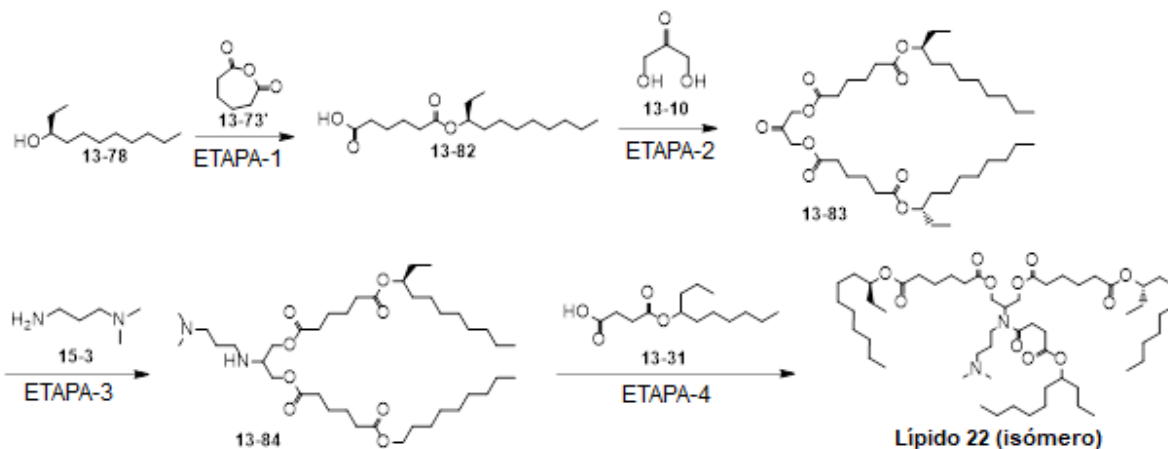


Esquema 24-3. Síntesis del Lípido 21A

El intermedio 13-68 (2.05 mmoles, 1.4 g, 1.0 eq.) se convirtió en el intermedio diamina 13-69 por aminación reductora con N,N-dimetilamino-3-aminopropano, 15-3 (514 μ L, 2.0 eq, 4.10 mmoles) usando Na(OAc)₃BH (10 mg, 1.2 eq, 2.46 mmoles), ácido acético (236 μ L, 2.0 eq, 4.10 mmoles) en 5 mL de DCM a temperatura ambiente durante 3 horas. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna de sílice (MeOH al 10 % en DCM, NH₄OH al 1 %) rindió 480 mg (32 %) de Intermedio 13-69 purificado. El Intermedio ácido 13-31 (1.86 mmoles, 484 mg, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente 13-31' usando cloruro de oxalilo (540 μ L, 3.4 eq, 6.38 mmoles) y DMF (20 μ L, cantidad catalítica) en 3 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas y se usó cloruro de ácido bruto 13-31', (518 mg, 3.0 eq, 1.88 mmoles), TEA, tolueno (3.0 mL), RT, toda la noche para la N-acilación del intermedio diamina 13-69 (0.3 mmoles, 0.2 g, 1 eq.) usando TEA (435 μ L, 5.0 eq, 3.13 mmoles) y en 3 mL de tolueno a temperatura ambiente toda la noche para rendir el Lípido 21A. El producto bruto se purificó 2X por cromatografía en columna (Hexanos y EtAc, después DCM:MeOH al 10 % en DCM en sílice) para obtener 51 mg de Lípido 21A puro (>99 % por HPLC-UV y 95 % por HPLC-CAD) y se caracterizó por RMN de protón y espectrometría de masa (FIG. 4Y-1 y FIG 4Y-2 para RMN de protón y HPLC-CAD y Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

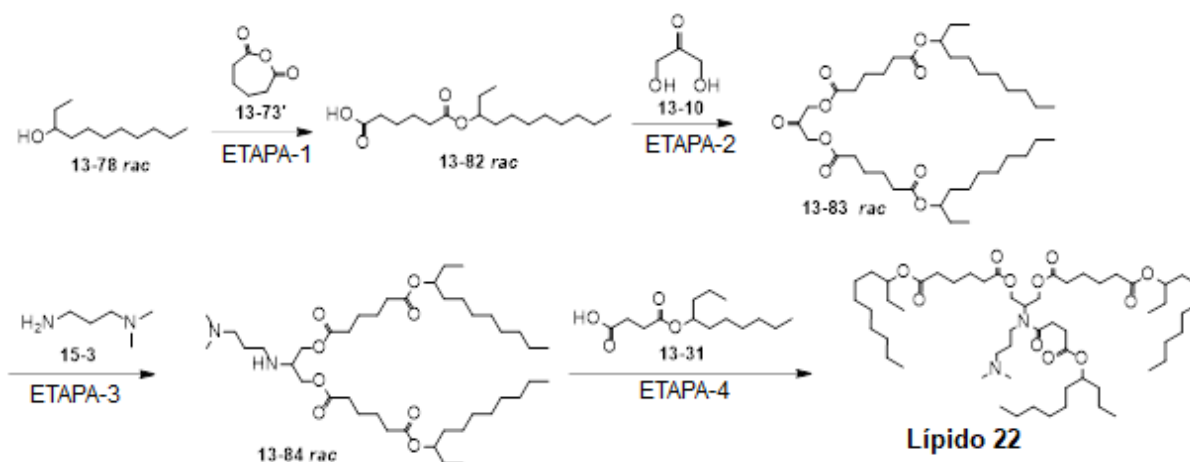
Síntesis del Lípido 22 y su isómero

Se sintetizó un isómero del Lípido 22 como se proporciona en el esquema 25-1 a continuación. Brevemente, el alcohol 13-78 (al que se accedió como se ha descrito anteriormente para la síntesis del Lípido 21) se usó en la adición de apertura de anillo al anhídrido cíclico 13-73' para acceder al intermedio 13-82. La O-acilación de la dihidroxiacetona con el intermedio 13-82 usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 17 rindió la cetona 13-83. La aminación reductora de 13-83 con la amina 15-3 usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 17 rindió el intermedio 13-84. La posterior N-acilación del intermedio 13-84 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las usadas para la síntesis del Lípido 9 rindió el isómero del Lípido 22.



Esquema 25-1. Síntesis del isómero del Lípido 22

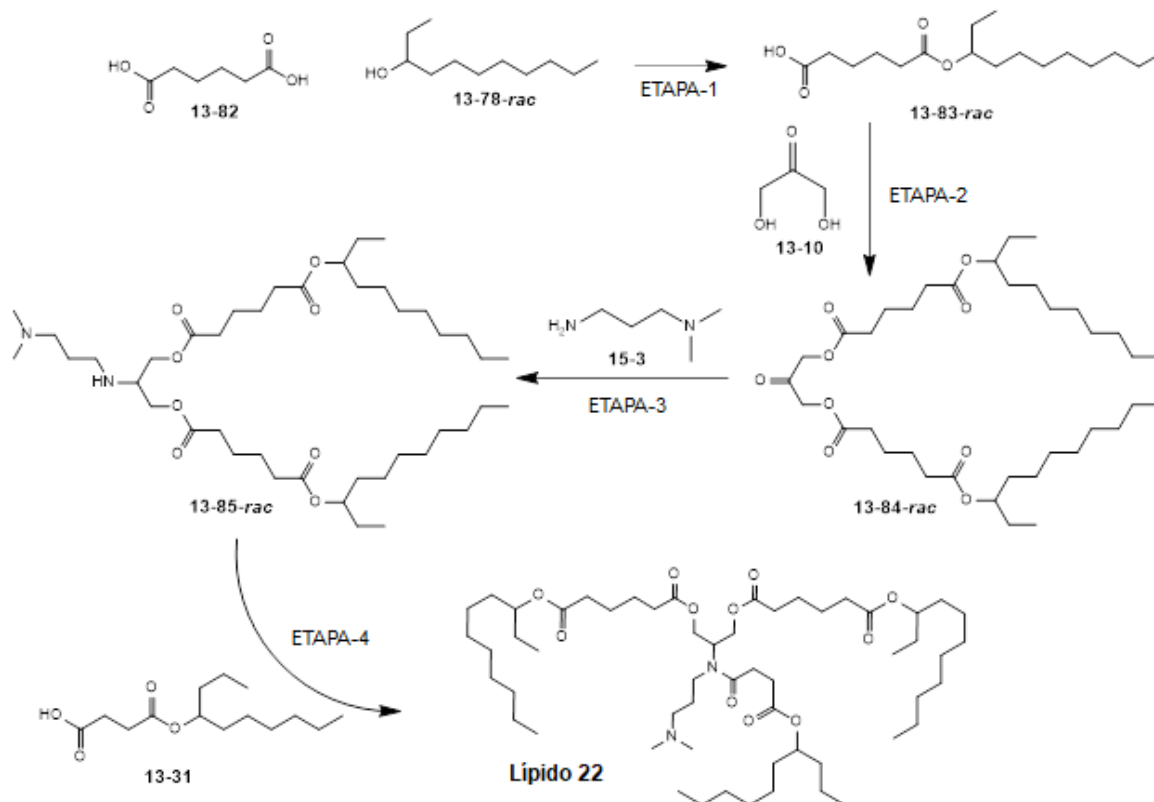
El Lípido 22 como mezcla racémica se sintetizó como se proporciona en el esquema 25-2 a continuación. Se accedió al Lípido 22 usando los métodos descritos anteriormente para el isómero del Lípido 22 reemplazando el isómero de alcohol 13-78 por el alcohol racémico 13-78 *rac*.



Esquema 25-2. Síntesis del Lípido 22

Alternativamente, el material de partida 3-undecanol, **13-78-racémico** (31.6 mmoles, 5 g, 1 eq.) se aciló con ácido adípico, **13-82** (9.8 mmoles, 1.68 g, 2.0 eq.) usando EDCI (2.26 g, 1.2 eq, 11.8 mmoles), DMAP (143 mg, 0.12 eq, 1.2 mmoles) y TEA (6.8 mL, 5.0 eq, 49.0 mmoles) en una mezcla de

20 mL de DCM y 20 mL de DMF a temperatura ambiente, toda la noche para obtener 1.35 g (46 %) de intermedio ácido, **13-83 rac**. El material de partida, 1,3-dihidroxiacetona, **13-10** (2.05 mmoles, 184 mg, 1.0 eq.) se diaciló con el Intermedio ácido **13-83-rac** (1.35 g, 2.2 eq, 4.5 mmoles) usando EDCI (856 mg, 2.2 eq, 4.5 mmoles), DIPEA (782 μ L, 2.2 eq, 4.5 mmoles), y DMAP (127 mg, 0.5 eq, 1.03 mmoles) en 6 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche para obtener 610 mg (46 %) del intermedio cetona **13-84-rac**.

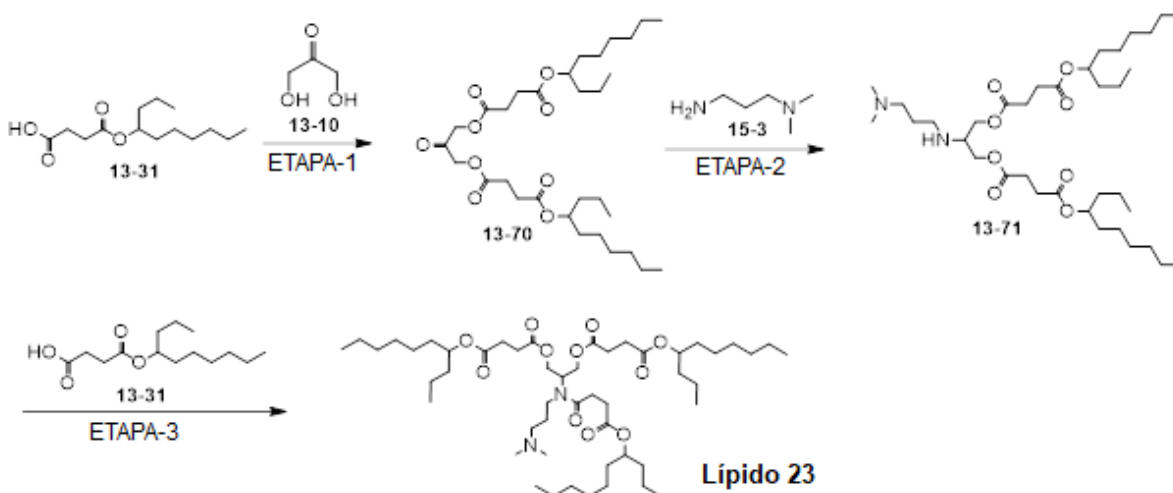


Esquema 25-3. Síntesis Alternativa del Lípido 22

El intermedio **13-84-rac** (0.93 mmoles, 610 mg, 1.0 eq.) se convirtió en el intermedio diamina **13-85-rac** por aminación reductora con N,N-dimetilamino-3-aminopropano, **15-3** (1.86 mmoles, 233 μ L, 2.0 eq.) usando $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ (1.2 mmoles, 249 mg, 1.2 eq.), ácido acético (1.86 mmoles, 107 μ L, 2.0 eq.) en 3 mL de DCM a temperatura ambiente durante 3 horas. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna de sílice (MeOH al 10 % en DCM) rindió 210 mg de Intermedio **13-85-rac** purificado. Se usó cloruro de ácido **13-31'** (0.85 mmoles, 233 mg, 3.0 eq.) de un lote previo para la N-acilación del intermedio diamina **13-85-rac** (0.28 mmoles, 210 mg, 1 eq.) usando TEA (1.4 mmoles, 197 μ L, 5.0 eq.) en 3 mL de tolueno a temperatura ambiente toda la noche para rendir el **Lípido 22**. El producto bruto se purificó 2X por cromatografía en columna (DCM:MeOH al 10 % en DCM) para obtener 56 mg (60 %) de **Lípido 22** puro (>99 % por HPLC-CAD) y se caracterizó por RMN de protón y espectrometría de masa (FIG. 4Z-1 and FIG. 4Z-2 para RMN de protón y HPLC-CAD y la Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa A,B,C).

Síntesis del Lípido 23

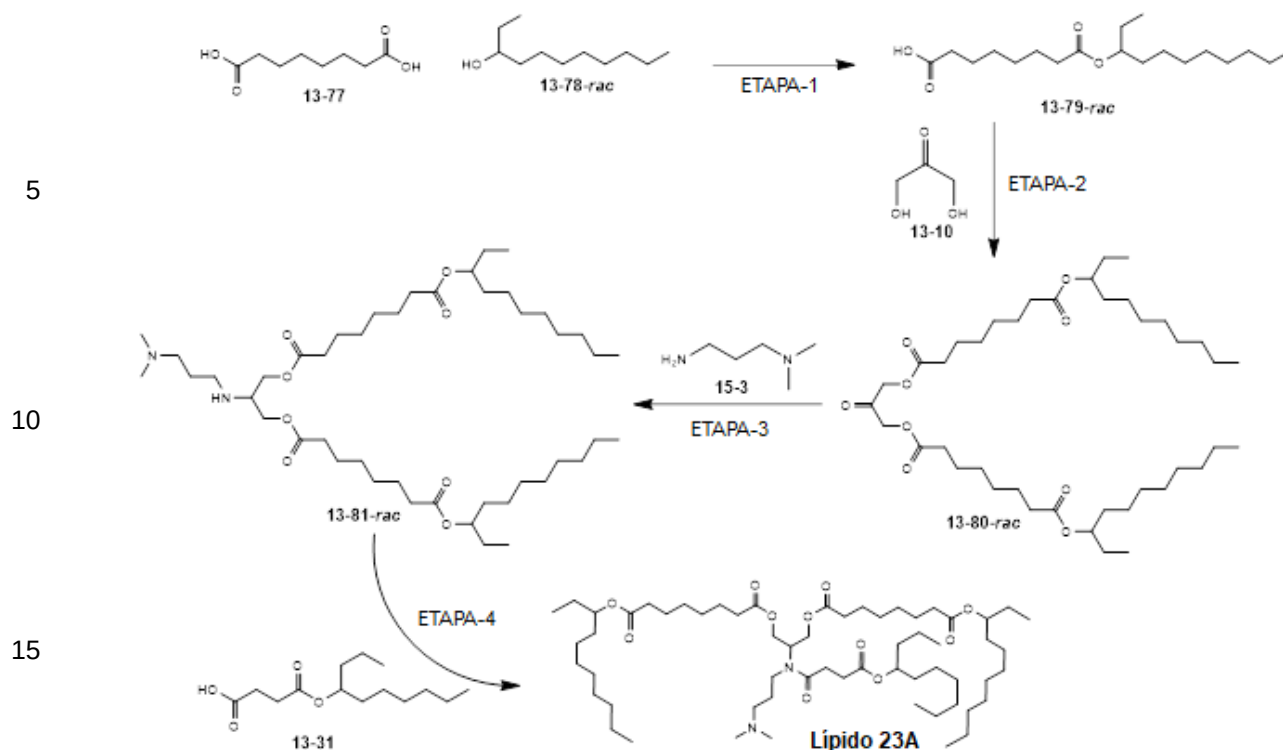
El Lípido 23 se sintetizó como se proporciona en el esquema 26. Brevemente, la O-acilación de la dihidroxiacetona con el ácido 13-31 usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 9 rindió la cetona 13-70. La aminación reductora de 13-70 con la amina 15-3 usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 9 rindió el intermedio 13-71. La posterior N-acilación del intermedio 13-71 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las usadas para la síntesis del Lípido 9 rindió el Lípido 23.



Esquema 26-1. Síntesis del Lípido 23

Síntesis del Lípido 23A

El material de partida 3-undecanol, **13-78-racémico** (14.4 mmoles, 2.47 g, 1 eq.) se aciló con ácido subérico, **13-77** (5.0 g, 2.0 eq, 82.7 mmoles) usando EDCI (3.3 g, 1.2 eq, 17.3 mmoles), DMAP (211 mg, 0.12 eq, 1.73 mmoles) y TEA (10.0 mL, 5.0 eq, 72.0 mmoles) en una mezcla de 20 mL de DCM y 20 mL de DMF a temperatura ambiente toda la noche para obtener 2 g (43 %) de intermedio ácido, 13-879-rac. El material de partida, 1,3-dihidroxiacetona, 13-10 (2.8 mmoles, 250 mg, 1.0 eq.) se diaciló con el Intermedio ácido **13-79-rac** (2.0 g, 2.2 eq, 6.1 mmoles) usando EDCI (1.16 g, 2.2 eq, 6.1 mmoles), DIPEA (1.06 mL, 2.2 eq, 6.1 mmoles), y DMAP (172 mg, 0.5 eq, 1.4 mmoles) en 8 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche para obtener 690 mg (35 %) de intermedio cetona **13-80-rac**.



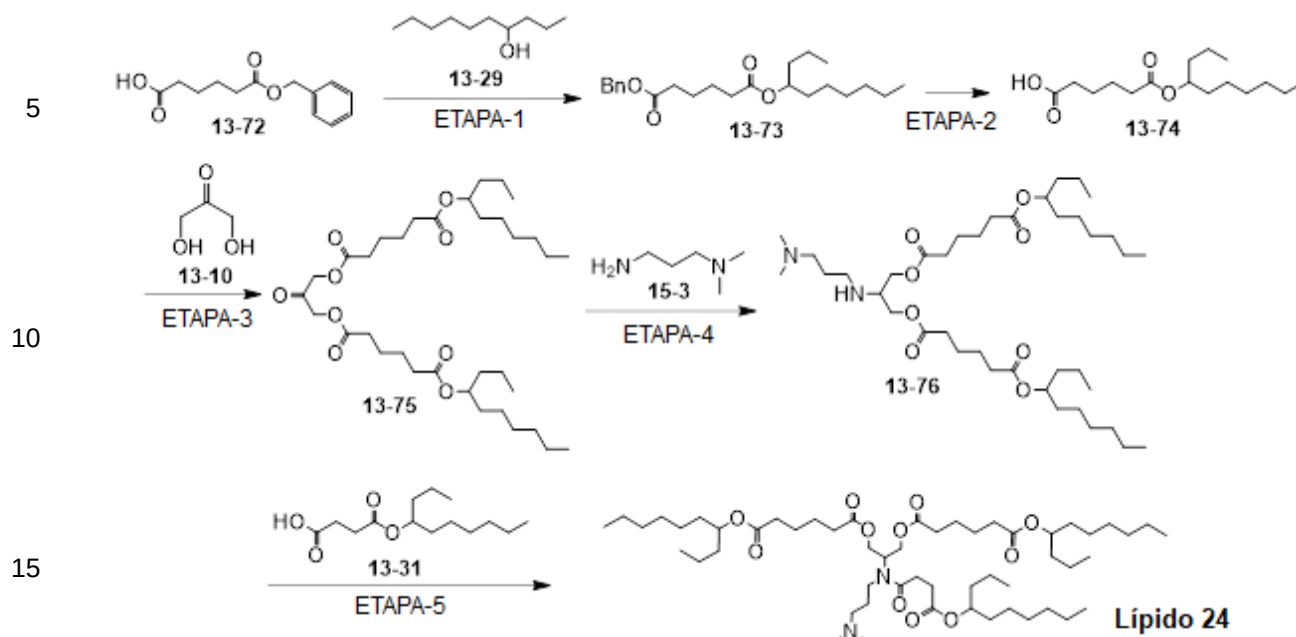
Esquema 26-2. Síntesis del Lípido 23A

El intermedio **13-80-rac** (0.97 mmoles, 690 mg, 1.0 eq.) se convirtió en el intermedio diamina **13-81-rac** por aminación reductora con N,N-dimetilamino-3-aminopropano, **15-3** (1.94 mmoles, 243 μ L, 2.0 eq.) usando $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ (1.2 mmoles, 249 mg, 1.2 eq.), ácido acético (1.94 mmoles, 112 μ L, 2.0 eq.) en 3 mL de DCM a temperatura ambiente durante 3 horas. La purificación del producto bruto por cromatografía en columna de sílice (MeOH al 10 % en DCM) rindió 520 mg de Intermedio **13-81-rac** purificado. Se usó cloruro de ácido **13-31'** (1.63 mmoles, 447 mg, 2.5 eq.) de un lote previo para la N-acilación del intermedio diamina **13-81-rac** (0.65 mmoles, 520 mg, 1 eq.) usando TEA (3.25 mmoles, 458 μ L, 5.0 eq.) en 4 mL de tolueno a temperatura ambiente toda la noche para rendir el **Lípido 23A**. El producto bruto se purificó 2X por cromatografía en columna (DCM:MeOH al 10 % en DCM) para obtener 230 mg (31 %) de **Lípido 23A** puro (>99 % por HPLC-UV y 96 % por HPLC-CAD) y se caracterizó por RMN de protón y espectrometría de masa (FIG. 4AA-1 y FIG. 4AA-2 para RMN de protón y HPLC-CAD y la Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

Síntesis del Lípido 24

El Lípido 24 se sintetizó como se proporciona en el esquema 27 a continuación. Brevemente, se accedió al ácido 13-34 por O-acilación del diácido mono-prottegido 13-72 con alcohol 13-29 y posterior desprotección del intermedio 13-73 para rendir el ácido 13-74. La O-acilación de la dihidroxiacetona con el intermedio 13-74 usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 17 rindió la cetona 13-75. La aminación reductora de 13-75 con la amina 15-3 usando las condiciones descritas en la síntesis del

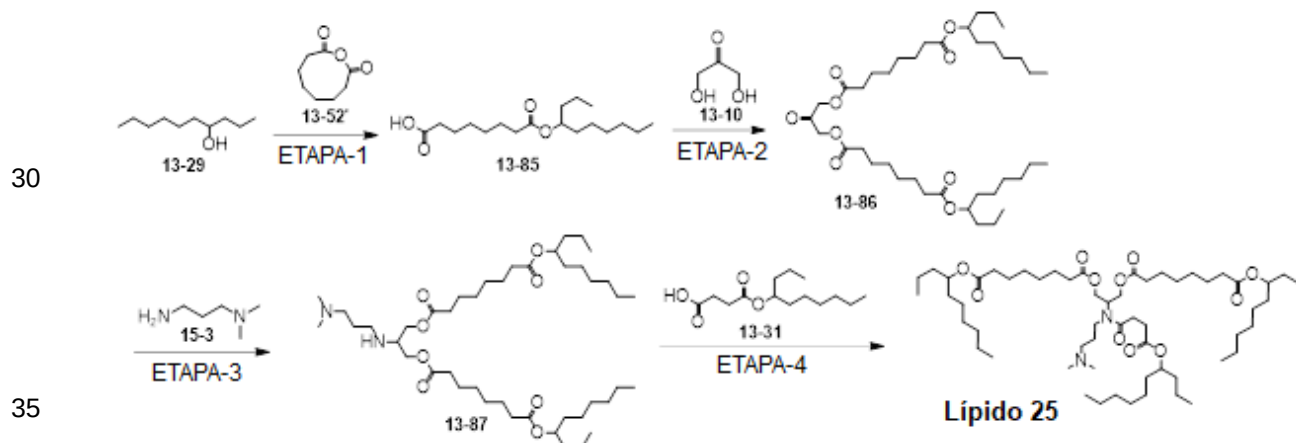
Lípido 17 rindió el intermedio 13-76. La posterior N-acilación del intermedio 13-76 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las usadas para la síntesis del Lípido 9 rindió el Lípido 24.



Esquema 27. Síntesis del Lípido 24

Síntesis del Lípido 25

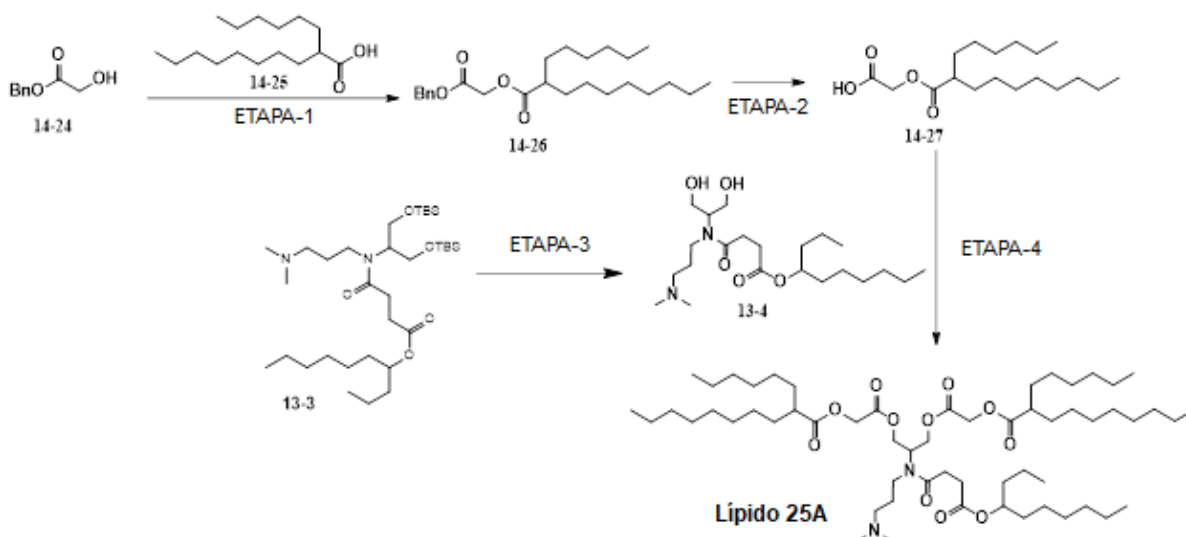
El Lípido 25 se sintetizó como se proporciona en el esquema 28. Brevemente, la adición de apertura de anillo del alcohol 13-29 al anhídrido cíclico 13-52' rindió el intermedio ácido 13-85. La O-acilación de la dihidroxiacetona con el intermedio 13-85 usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 17 rindió la cetona 13-86. La aminación reductora de 13-86 con la amina 15-3 usando las condiciones descritas en la síntesis del Lípido 17 rindió el intermedio 13-87. La posterior N-acilación del intermedio 13-87 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las usadas para la síntesis del Lípido 9 rindió el Lípido 25.



Esquema 28-1. Síntesis del Lípido 25

Síntesis del Lípido 25A

El material de partida ácido glicólico protegido con bencilo 14-24 (15.4 mmoles, 2.61 g, 1 eq.) se aciló con ácido 2-hexildecanoico **14-25** (6.10 g, 96 %, 1.48 eq, 22.84 mmoles) usando EDCI (5.80 g, 1.97 eq, 30.26 mmoles), DMAP (0.40 g, 0.21 eq, 3.27 mmoles) y DIPEA (5.4 mL g, 1.97 eq, 30.33 mmoles) en 60 mL de diclorometano a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 2.75 g (49 %) de éster de intermedio **14-26** protegido. El intermedio **14-26** (10.3 mmoles, 4.1 g, 1.0 eq.) se desprotegió usando **Pd/C** (930 mg, 32 % p/p), EtOAc (35 mL) a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 1.72 g (82 %) de intermedio ácido **14-27**.



Esquema 28-2. Síntesis del Lípido 25A

El intermedio **13-3** protegido (600 mg, 0.9 mmoles, 1 eq.) se trató con fluoruro de hidrógeno/piridina (0.92 g, 10.0 eq, 9.3 mmoles) en 4.0 mL de THF a temperatura ambiente durante 2 horas rindiendo el intermedio dihidroxilo **13-4**. La desprotección se confirmó por TLC y espectrometría de masa. El intermedio ácido **14-27** (5.4 mmoles, 1.72 g, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente **14-27'** usando cloruro de oxalilo (2.36 g, 3.4 eq, 18.59 mmoles) y DMF (100 μ L, cantidad catalítica) en 5.0 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas y la conversión a intermedio cloruro se confirmó por TLC.

El intermedio di-hidroxi **13-4** bruto (350 mg, 0.84 mmoles, 1 eq.) y cloruro de ácido **14-27'** bruto (1.58 g, 6.0 eq, 5.04 mmoles) se combinaron con TEA (0.85 g, 10.0 eq, 8.4 mmoles) en 9 mL de tolueno a temperatura ambiente, toda la noche. El producto bruto se purificó en cromatografía en columna ISCO en una columna de sílice eluyendo con DCM y MeOH al 10 % en DCM rindiendo 240 mg (85 %) de Lípido 25A con una pureza del 99 % (HPLC-CAD). (véanse la FIG. 4AC-1 y FIG. 4AC-2 para la caracterización por RMN de protón y pureza por LC-CAD y la Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

Síntesis del Lípido 27

El Lípido 27 se sintetizó como se proporciona en el esquema 29 a continuación y como sigue. La apertura del anillo del material de partida caprolactona 14-30 (2 g, 17.5 mmoles) usando 5 mL de NaOH 0.5 M a temperatura ambiente durante 2 horas rindió ácido 6-hidroxihexanoico 14-31 (1.8 g, 78 %). Se

produjo 14-31 adicional en una segunda reacción de hidrólisis de caprolactona a escala de 2 g usando condiciones idénticas para obtener 1.9 g (82 %) de 14-31. El ácido 6-hidroxihexanoico 14-31 (1 g, 7.5 mmoles) se protegió con bencilo usando DBU (1.38 g, 1.2 eq, 9 mmoles), bromuro de bencilo (1.68 g, 1.3 eq, 9.8 mmoles) en 6 mL de MeOH y 10 mL de DMF a 0 °C hasta temperatura ambiente, toda la noche
5 rindiendo el intermedio 14-32 protegido (1.3 g, 77 %). Se desprotegió 14-31 adicional (2 g, 15.1 mmoles) usando DBU (2.76 g, 1.2 eq, 18.1 mmoles), bromuro de bencilo (3.36 g, 1.3 eq, 19.6 mmoles) en 12 mL de MeOH y 20 mL de DMF a 0 °C hasta temperatura ambiente, toda la noche rindiendo el intermedio 14-32 protegido (2.65 g, 79 %).

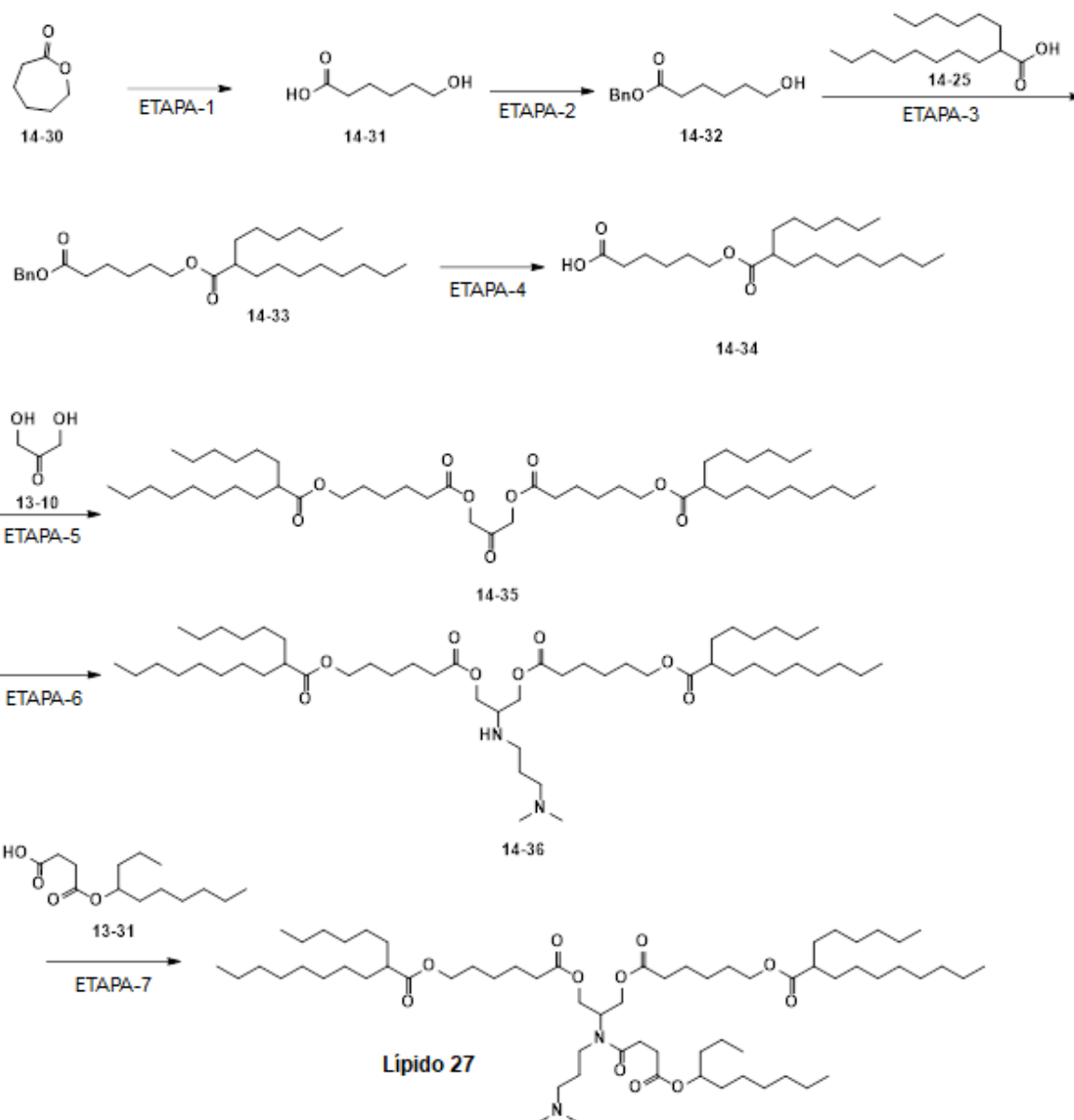
El intermedio 14-32 (2.45 g, 1 eq, 11 mmoles) se usó para acilar el ácido 14-25 (2.59 g, 1.5 eq, 10
10 mmoles) usando EDCI (2.58 g, 2 eq, 13.4 mmoles), DIPEA (1.74 g, 2 eq, 13.4 mmoles) y DMAP (0.16 g, 0.2 eq, 1.3 mmoles) en 20.0 mL de DCM a temperatura ambiente toda la noche. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) rindiendo 4.8 g (94 %) de intermedio 14-33 protegido puro. La desprotección posterior de 14-33 (4.8 g, 22 mmoles) por hidrogenación en Pd/C/hidrógeno gas (0.6 g, 20 % p/p) en 30 mL de acetato de etilo rindió 3.68 g (95 %) del ácido libre 14-34 del material purificado en
15 columna.

20

25

30

35



Esquema 29. Síntesis del Lípido 27

El intermedio ácido 14-34 (1.74 g, 2.5 eq, 5.5 mmoles) se usó para acilar dihidroxiacetona, 13-10 (200 mg, 1.0 eq, 6 mmoles), EDCI (1.06 g, 2.5 eq, 5.5 mmoles), DIPEA (0.71 g, 2.5 eq, 5.5 mmoles), y DMAP (54 mg, 0.2 eq, 0.4 mmoles) en 10.0 mL de DCM a temperatura ambiente, toda la noche para obtener la cetona 14-35. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para obtener 1.27 mg (76 %) de 14-35 puro. La aminación reductora de 14-35 (1.26 mg, 1.0 eq, 1.5 mmoles) con amina 15-3 (0.32 g, 2.0 eq, 3.1 mmoles) usando ácido acético (0.19 g, 2.0 eq, 3.1 mmoles) y $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ (0.50 g, 1.5 eq, 2.3 mmoles) en 15 mL de DCM a temperatura ambiente durante 3 horas rindió el intermedio 14-36 (330 mg, 34 %).

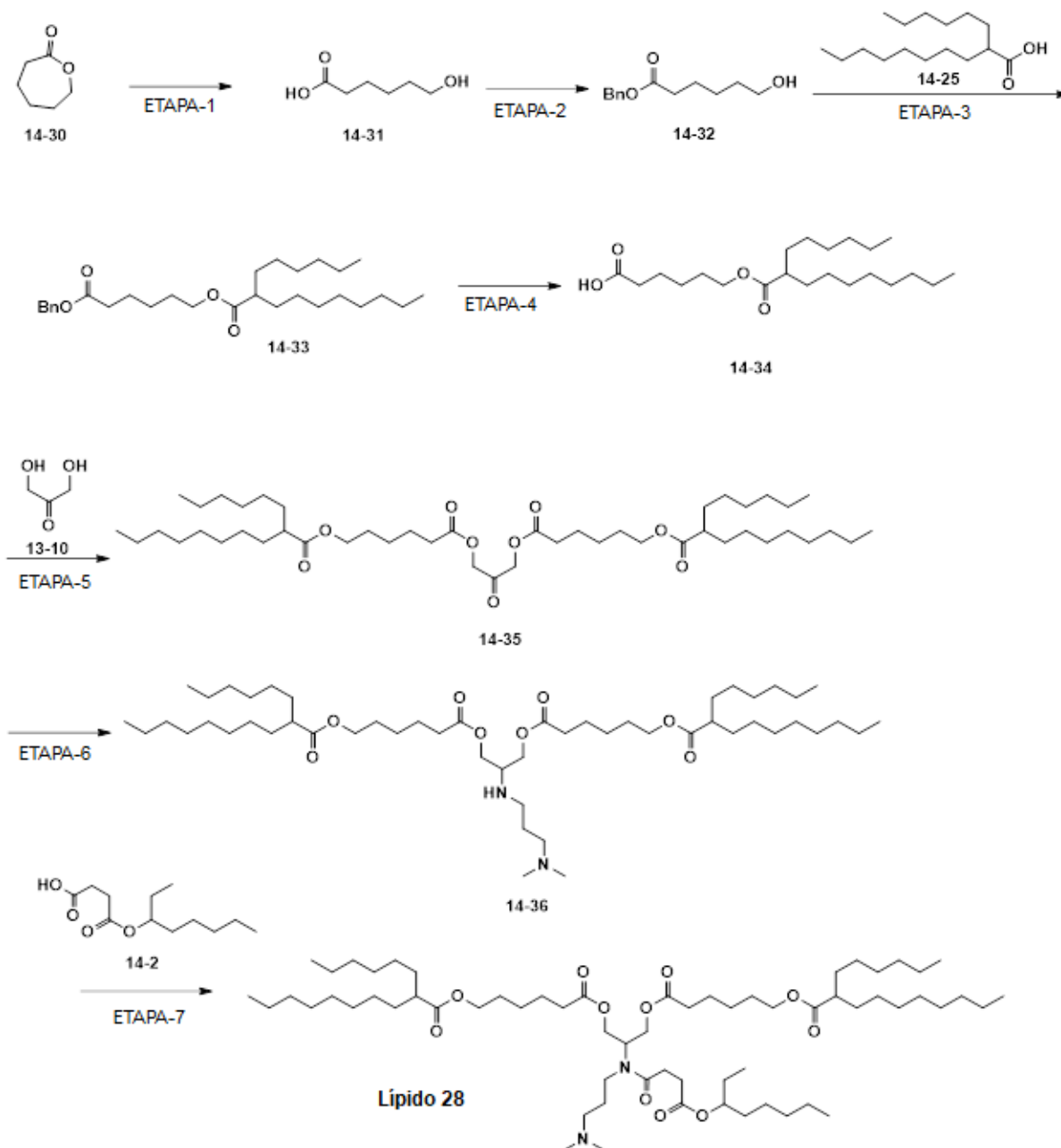
El compuesto 13-31 (290 mg, 1.1 mmoles) de un lote previo se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente 13-31' usando cloruro de oxalilo (0.48 g, 3.4 eq, 3.8 mmoles) y DMF (20 μL , cantidad

catalítica) en 4 mL de tolueno durante 2 horas a temperatura ambiente. Se usó 13-31' bruto (0.29 g, 3.0 eq, 1.1 mmoles) para la N-acilación de 14-36 (330 mg, 1.0 eq, 0.3 mmoles) usando TEA (0.26 mL, 5.0 eq, 1.8 mmoles) 5 mL tolueno a temperatura ambiente, toda la noche para obtener el Lípido 20 purificado en columna (180 mg, 43 %) con una pureza >98 % (HPLC-CAD).

Véanse la FIG. 4AE-1 y FIG. 4AE-2 para el espectro de RMN del Lípido 27, y cromatograma de LC-CAD en fase inversa, y la Tabla 5 para la masa del producto.

Síntesis del Lípido 28

El Lípido 28 se sintetizó como se proporciona en el esquema 30 a continuación y como sigue. El intermedio 14-36 se produjo como se ha descrito anteriormente (véase la Síntesis del Lípido 27).



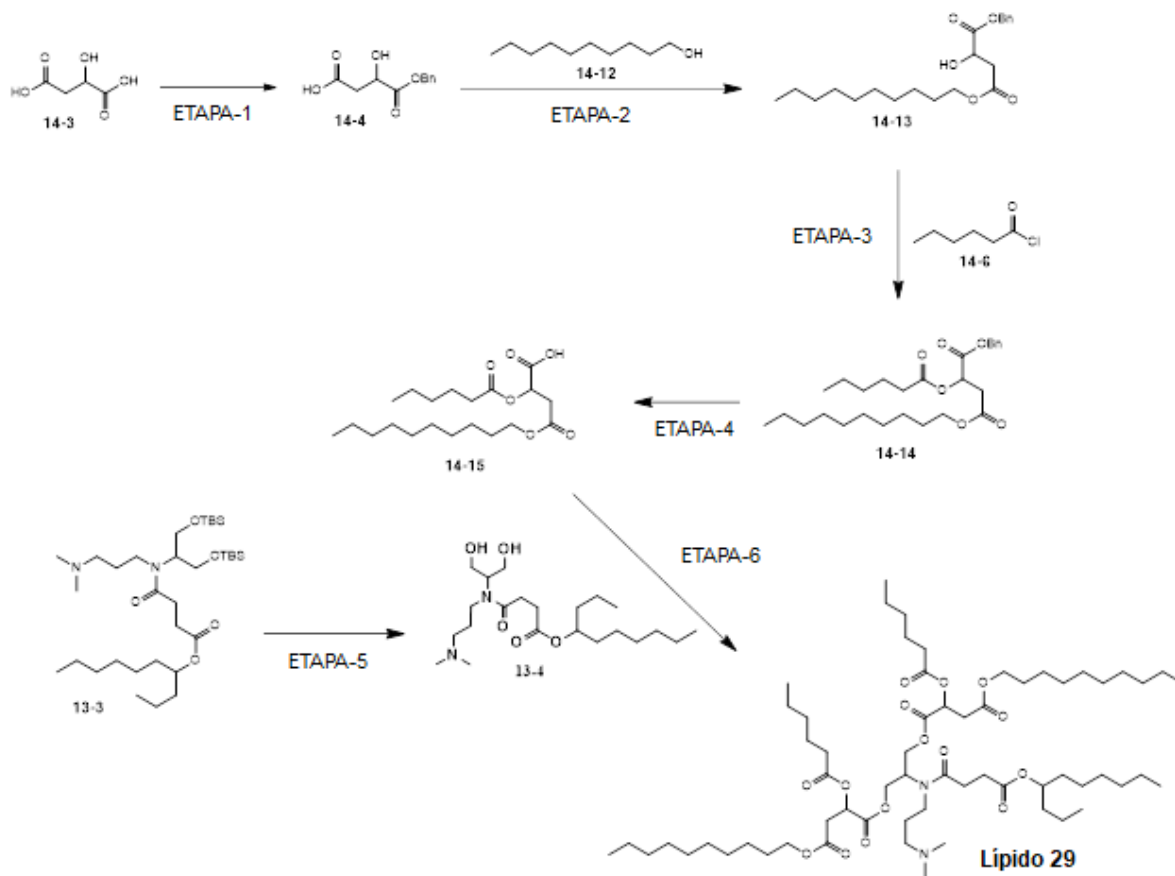
Esquema 30. Síntesis del Lípido 28

El intermedio ácido 14-2 se produjo por acilación del material de partida 3-hidroxiocetanol 14-1 con ácido succínico usando **13-30** (1.53 g, 2.0 eq, 15.3 mmoles) y DMAP (0.93 g, 1.0 eq, 7.6 mmoles) y 2 mL de piridina en una mezcla de 2 mL de THF y 5 mL de DCM para obtener 1.1 g (64 %) de 14-2. Se convirtió 14-2 (348 mg, 1.51 mmoles) en el cloruro de ácido correspondiente 14-2" usando cloruro de oxalilo (0.651 g, 5.13 mmoles, 3.4 eq) y DMF (40 µL, cantidad catalítica) en 3 mL de tolueno durante 2 horas a temperatura ambiente. Se usó 14-2' bruto (0.348 g, 1.51 mmoles, 3.1 eq.) para la N-acilación de 14-36 (430 mg, 1.51) usando TEA (0.41 mL, 2.94 mmoles, 6.02 eq) en 6 mL de tolueno y 2.5 mL de DCM a temperatura ambiente, toda la noche para obtener el Lípido 20 purificado en columna (eluyendo con metanol al 10 % en DCM) (148 mg, 28 %) con una pureza del 85 % (HPLC-CAD). Una segunda purificación en columna (eluyendo con metanol al 5 % en DCM) rindió 115 mg con una pureza del 94 % (HPLC-CAD).

Véase la FIG. 4AF-1 para el espectro de RMN del Lípido 27, la FIG. x4AF-2 para el cromatograma de LC-CAD en fase inversa del Lípido 28, y la Tabla 5 para la masa del producto.

Síntesis del Lípido 29

Se aciló ácido málico protegido con bencilo 14-4 (14.1 mmoles, 3.18 g, 1 eq.) con ácido *N*-decanoico **14-12** (3.86 g, 1.5 eq, 21.2 mmoles) usando HATU (8.1 g, 1.5 eq, 21.2 mmoles), DBU (4.3 g, 2.0 eq, 28.3 mmoles) en 30 mL de DMF a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 1.9 g (36 %) de éster del intermedio **14-13** protegido. El intermedio **14-13** (5.2 mmoles, 1.9 g, 1 eq.) se aciló con cloruro de hexanoilo **14-6**, (2.8 g, 4.0 eq, 20.8 mmoles), TEA (2.63 g, 5.0 eq, 26.0 mmoles), DMAP (127 mg, 0.2 eq, 1.0 mmol) en 20 mL de tolueno a temperatura ambiente, toda la noche para obtener el intermedio **14-14** (630 mg, 26 %). El intermedio **14-14** (2.8 mmoles, 1.3 g, 1.0 eq.) se desprotegió usando **Pd/C** (260 mg, 32 % p/p) en 15 mL de acetato de etilo a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 1.025 g (98 %) de intermedio ácido **14-15**.



Esquema 31. Síntesis del Lípido 29

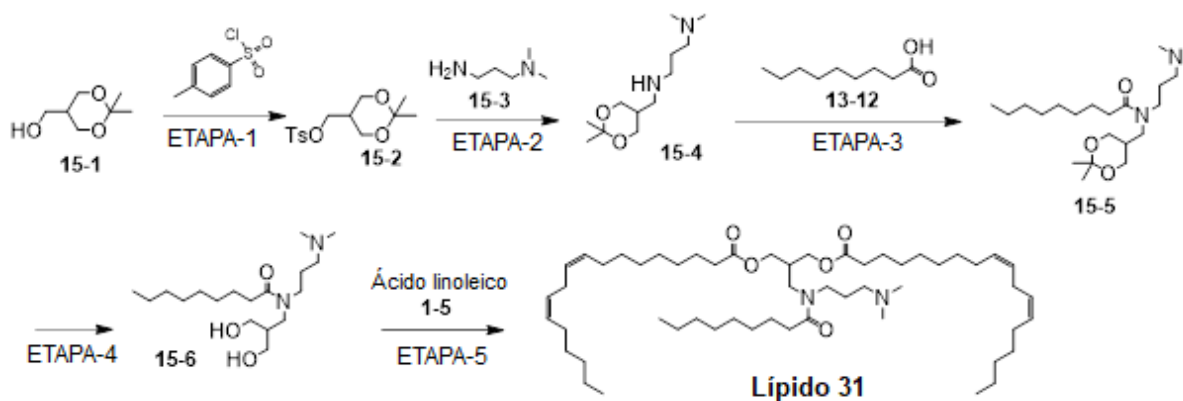
El intermedio ácido **14-15** (2.6 mmoles, 1.0 g, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente **14-15'** usando cloruro de oxalilo (0.82 mL, 3.4 eq, 9.1) y DMF (100 μ L, cantidad catalítica) en 6.0 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas y la conversión a intermedio cloruro se confirmó por TLC.

El intermedio 13-3 se protegió (0.72 mmoles, 300 mg) usando HF-piridina, (0.71 mL, 10.0 eq, 7.2 mmoles) en 4.0 mL de THF a temperatura ambiente, toda la noche y se combinaron el intermedio dihidroxi **13-4** bruto (195 mg, 0.46 mmoles, 1 eq.) y cloruro de ácido **14-15'** bruto (1.097 g, 6.0 eq, 2.7 mmoles) con TEA (0.64 mL, 10.0 eq, 4.6 mmoles) en 5 mL de tolueno a temperatura ambiente, toda la noche. El producto bruto se purificó en cromatografía en columna ISCO en una columna de sílice eluyendo con DCM y MeOH al 10 % en DCM rindiendo para obtener 270 mg (51 %) de Lípido 29 con una pureza >99 % (HPLC-CAD). (véanse la FIG. 4AG-1 y FIG. 4AG-2 para la caracterización por RMN de protón y pureza por LC-CAD, y la Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

Síntesis del Lípido 31

El Lípido 31 se sintetizó como se proporciona en el esquema 32 a continuación y como sigue. El material de partida 15-1 (68 mmoles, 10 g, 1 eq.) se trató con cloruro de p-tolueno sulfonilo (70 mmoles, 13.3 g, 1.03 eq.) usando piridina (80 mmoles, 10.1 mL, 1.2 eq.) en 150 mL de DCM para obtener el

intermedio protegido 15-2. El producto bruto se recrystalizó en acetato de etilo y hexano rindiendo 20.4 g (99 %) del intermedio 15-2 puro. Se accedió al intermedio 15-4 por reacción de 15-2 (16.5 mmoles, 5 g, 1.2 eq.) y la diamina 15-3 (33 mmoles, 3.35 g, 2 eq.) en 40 mL de dioxano en condiciones de reflujo. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para obtener 3.5 g (91 %) de intermedio puro 15-4. La N-acilación de 15-4 (108 mg, 0.268 mmoles) usando ácido nonanoico 13-12 (0.67 mmoles, 106 mg, 2.5 eq.) usando EDCI (0.67 mmoles, 128 mg, 2.5 eq.) y DIEA (0.67 mmoles, 86 mg, 2.5 eq.) y DMAP (3 mg) en 10 mL de DCM rindió la amina 15-5. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para obtener 113 mg (65 %) de diamina 15-5 purificada. Se accedió al intermedio diol 15-6 por desprotección de 15-5 (113 mg) en 4 mL de HCl 1M y THF (1:3 v/v) a temperatura ambiente durante 8 horas en rendimiento cuantitativo (102 mg). El intermedio 15-6 (0.3 mmoles, 100 mg, 1 eq) se aciló con el ácido linoleico 1-5 (0.9 mmoles, 250 mg, 3 eq) usando EDCI (0.9 mmoles, 172 mg, 3 eq), DIPEA (0.9 mmoles, 116 mg) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) para obtener el Lípido 31. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna rindiendo 120 mg (46 %) de Lípido 31 puro (>99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4R-1 para el espectro de RMN del Lípido 31, la FIG. 4R-2 para LC-MS del Lípido 31, y la Tabla 5 para la masa del producto).

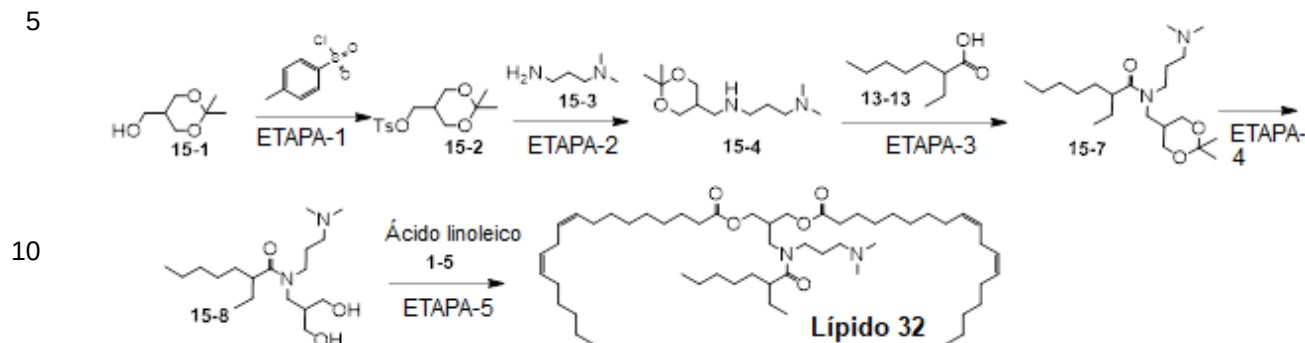


Esquema 32. Síntesis del Lípido 31

Síntesis del Lípido 32

El Lípido 32 se sintetizó como se proporciona en el esquema 33 a continuación y como sigue. El intermedio 15-4 se produjo como se ha descrito anteriormente para el Lípido 31 (etapas 1 y 2, Esquema 30). La N-acilación de 15-4 (4.34 mmoles, 1 g, 1.0 eq) con ácido 2-etil heptanoico 13-13 (10.85 mmoles, 1.71 g, 2.5 eq) usando EDCI (10.85 mmoles, 2.07 g, 2.5 eq), DIEA (10.85 mmoles, 1.40 g, 2.5 eq) y DMAP (10 mg) en 100 mL de DCM rindió la amina 15-7. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna para obtener 724 mg (52 %) de diamina 15-7 purificada. Se accedió al intermedio diol 15-8 por desprotección de 15-7 (714 mg) en 3 mL de HCl 1M y 7 mL de THF a temperatura ambiente durante 1 hora en rendimiento cuantitativo. El intermedio 15-8 (1.9 mmoles, 630 mg, 1 eq) se aciló con ácido linoleico 1-5 (6.49 mmoles, 1.82 g, 3.4 eq) usando EDCI (6.49 mmoles, 1.23 g, 3.4 eq), DIPEA (6.49 mmoles, 830 mg, 3.4 eq) y DMAP (20 mg, cantidad catalítica) para obtener el Lípido 32. El producto bruto

se purificó por cromatografía en columna (4X) rindiendo 27 mg de fracción pura (>98 % de pureza por LC-ELSD) de Lípido 32 y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4S-1 para el espectro de RMN de Lípido 32, la FIG. 4S-2 para LC-MS de Lípido 32, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 33. Síntesis del Lípido 32

Síntesis del Lípido 33

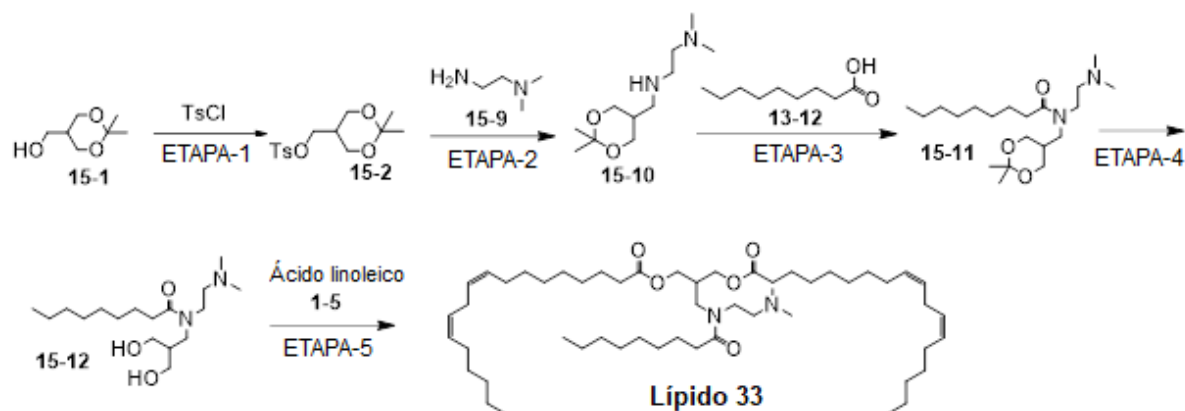
15 El Lípido 33 se sintetizó como se proporciona en el esquema 34 a continuación y como sigue. El material de partida 15-1 (34.3 mmoles, 5 g, 1 eq.) se tosiloó usando cloruro de p-tolueno sulfonilo, TsCl (6.52 g, 1 eq, 34.3 mmoles) usando TEA (19.01 mL, 4 eq, 137 mmoles) y DMAP (30 mg) en 200 mL de DCM. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 10.2 g (98 %) del intermedio reactivo 15-2. El desplazamiento nucleofílico de 15-2 (10.0 mmoles, 2.3 g, 1 eq.) con la diamina 15-9 (9.24 mmoles, 1.0 mL, 1.2 eq.) en 10 mL de dioxano (10 mL) rindió 1.6 g (97 %) del compuesto 15-10. La reacción de desplazamiento nucleofílico se repitió usando 15-2 adicional (8.3 mmoles, 2.5 g, 1 eq.) y diamina 15-9 (9.9 mmoles, 1.1 mL, 1.2 eq.) en 50 mL de dioxano para obtener una cantidad adicional del compuesto 15-10. Los productos brutos de las dos reacciones se purificaron por cromatografía en columna para obtener un total de 1.7 g (~50 %) de 15-10 puro. La N-acilación de 15-10 (4.05 mmoles, 875 mg, 1 eq.) con ácido nonanoico 13-12 (7.1 mmoles, 1.24 mL, 1.8 eq.) usando EDCI (1.4 g, 1.8 eq, 7.1 mmoles), DIPEA (1.3 mL, 1.8 eq, 7.1 mmoles) y DMAP (90 mg, 0.2 eq, 0.81 mmoles) en 8 mL de DCM rindió el intermedio 15-11. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) para obtener 230 mg (16 %) de intermedio 15-11 puro. La desprotección de 15-11 (0.64 mmoles, 230 mg, 1 eq.) en 5 mL de HCl 4M en dioxano rindió el intermedio 15-12. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (1X) para obtener 74 mg (37 %) del intermedio 15-12 puro. El intermedio 15-12 (0.24 mmoles, 74 mg, 1 eq.) se aciló con ácido linoleico 1-5 (169 mg, 2.5 eq, 0.58 mmoles) usando EDCI (120 mg, 2.5 eq, 0.58 mmoles), DIPEA (102 µL, 2.5 eq, 0.58 mmoles) y DMAP (6 mg, 0.2 eq, 0.048 mmoles) en 5 mL de DCM para obtener el Lípido 33. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) para obtener 64 mg (32 %) de Lípido 33 puro (>99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4T-1 para el espectro de RMN del Lípido 33, la FIG. 4T-2 para LC-MS del Lípido 33, y la Tabla 5 para la masa del producto).

20

25

30

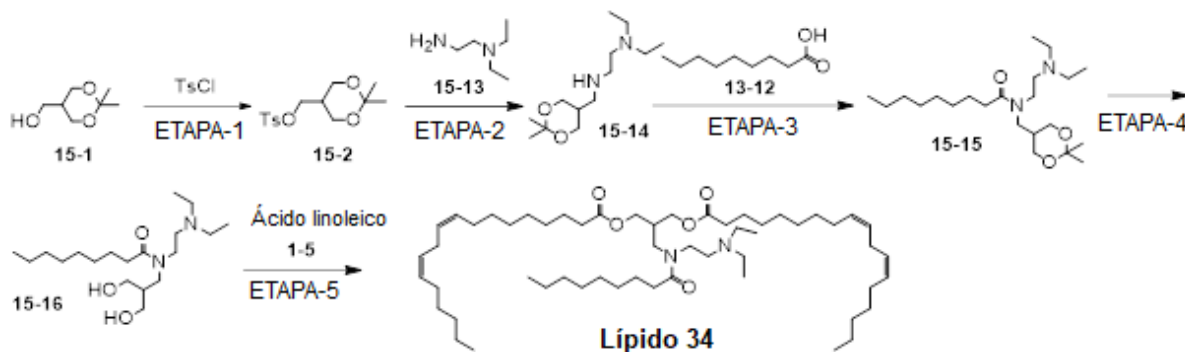
35



Esquema 34. Síntesis del Lípido 33

Síntesis del Lípido 34

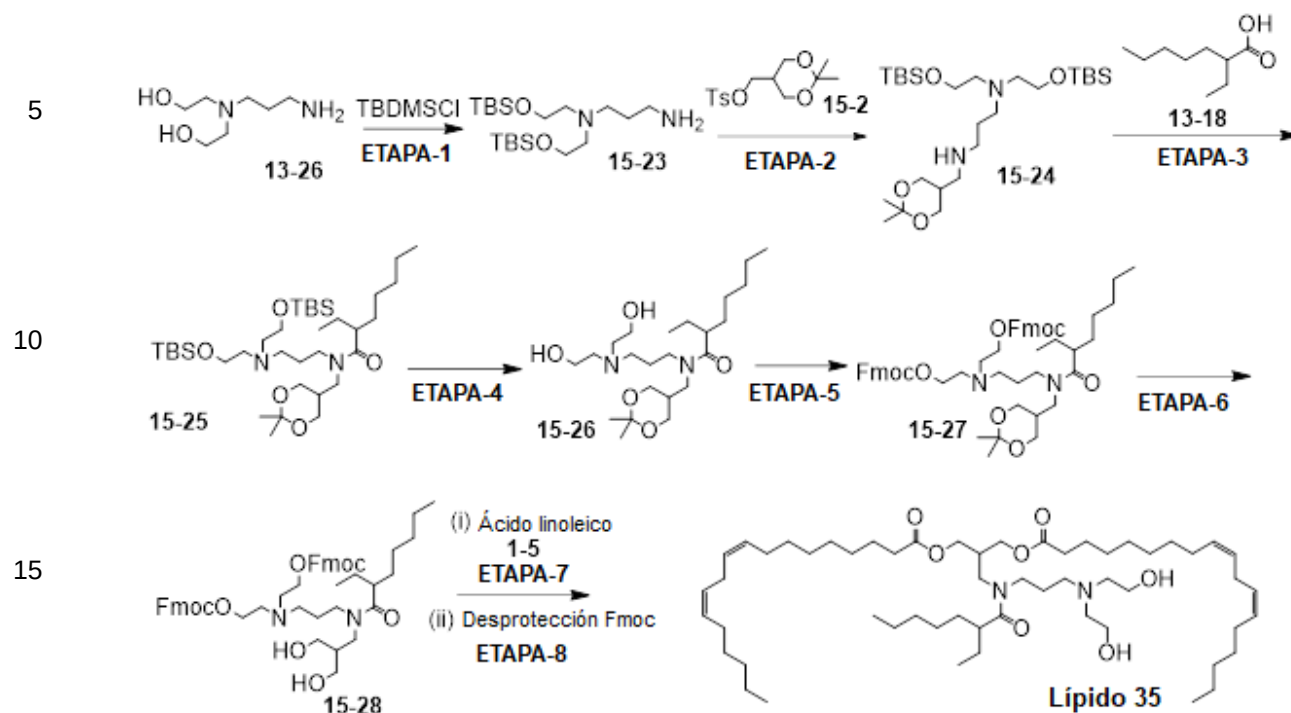
El Lípido 34 se sintetizó como se proporciona en el esquema 35 a continuación y como sigue. Se accedió al intermedio 15-2 como se describe para el Lípido 33. El desplazamiento nucleofílico de 15-2 (3.3 mmoles, 1 g, 1 eq.) con diamina 15-13 (3.9 mmoles, 0.46 mL, 1.2 eq.) en 6 mL de dioxano (10 mL) rindió 520 mg (64 %) del compuesto 15-14. Se repitió la reacción para acceder a 400 mg adicionales del compuesto 15-14 puro. La N-acilación de 15-14 (2.6 mmoles, 620 mg, 1 eq.) con ácido nonanoico 13-12 (5.3 mmoles, 915 μ L, 2.0 eq.) usando EDCI (5.3 mmoles, 1.06 g, 2.0 eq.), DIPEA (923 μ L, 2.0 eq, 5.3 mmoles) y DMAP (58 mg, 0.2 eq, 0.05 mmoles) en 10 mL de DCM rindió el intermedio 15-15. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) para obtener 355 mg (35 %) de intermedio 15-15 puro. La desprotección de 15-15 (1.03 mmoles, 355 mg, 1 eq.) en 7 mL de HCl 4M en dioxano rindió el intermedio 15-16. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) para obtener 40 mg (13 %) del intermedio 15-16 puro. El intermedio 15-16 (0.116 mmoles, 40 mg, 1 eq.) se aciló con ácido linoleico 1-5 (81 mg, 2.5 eq, 0.29 mmoles) usando EDCI (55 mg, 2.5 eq, 0.29 mmol), DIPEA (3.2 μ L, 2.5 eq, 0.29 mmoles) y DMAP (2 mg, 0.2 eq, 0.05 mmoles) en 10 mL de DCM para obtener el Lípido 34. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (2X) para obtener 73 mg (73 %) de Lípido 34 puro (>99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véanse la FIG. 4U-1 para el espectro de RMN del Lípido 34, la FIG. 4U-2 para LC-MS del Lípido 34, y la Tabla 5 para la masa del producto).



Esquema 35. Síntesis del Lípido 34

Síntesis del Lípido 35

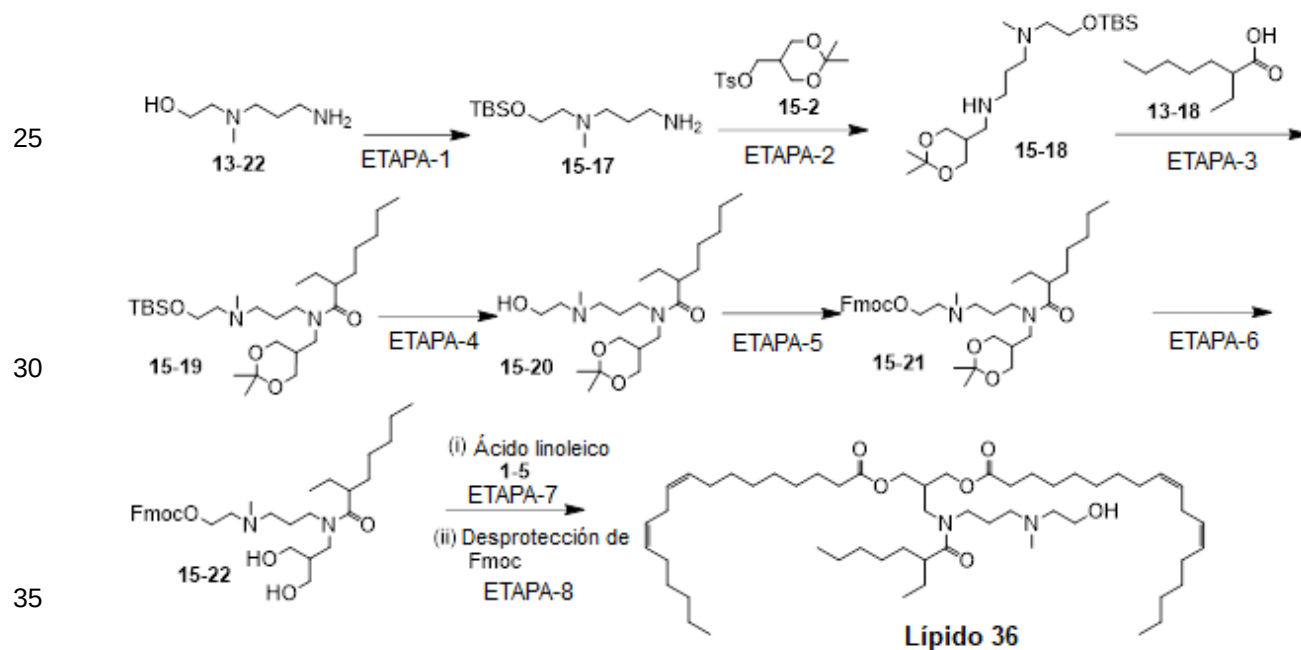
El Lípido 35 se sintetizó como se proporciona en el esquema 36 a continuación.



Esquema 36. Síntesis del Lípido 35

Síntesis del Lípido 36

El Lípido 36 se sintetizó como se proporciona en el esquema 37 a continuación.

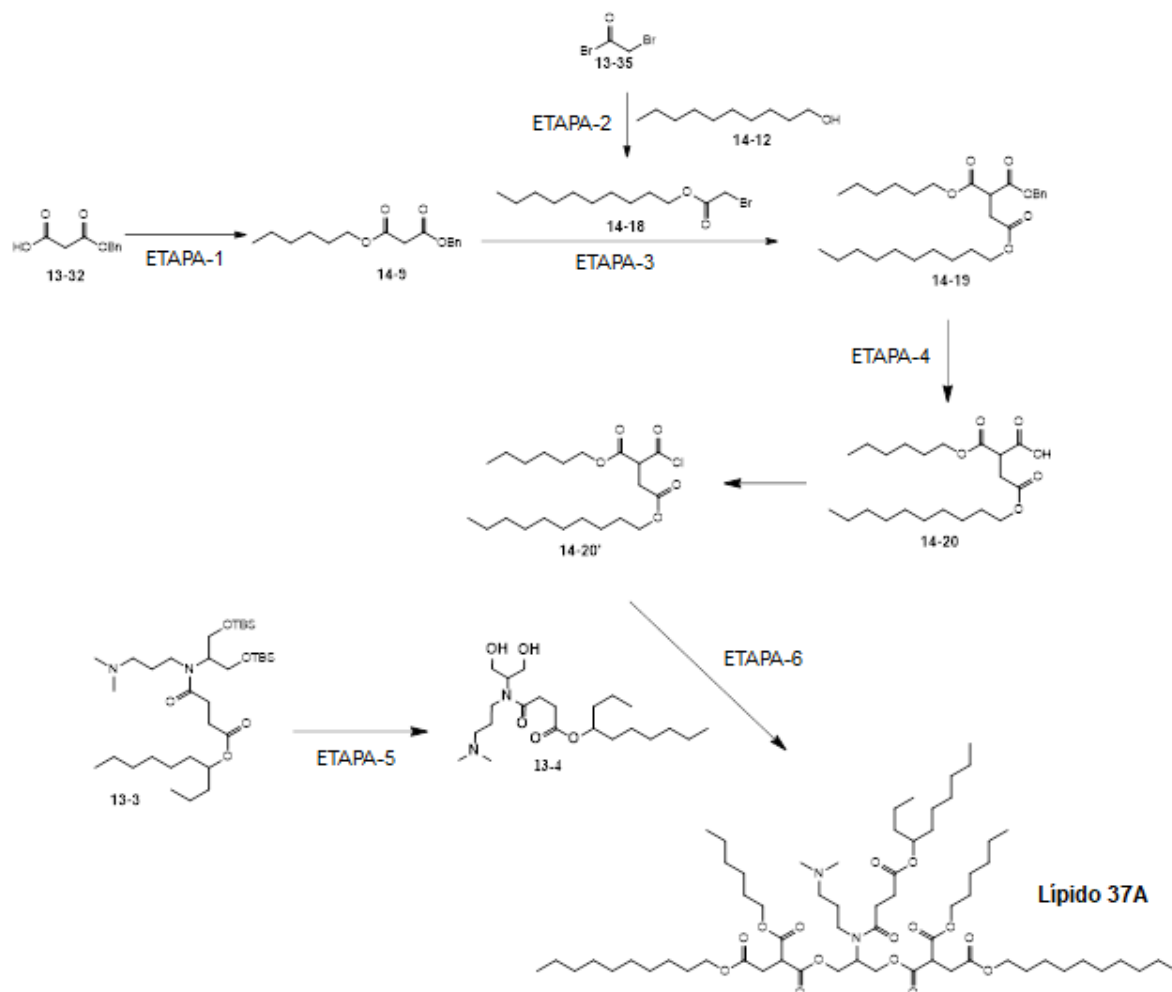


Esquema 37. Síntesis del Lípido 36

Síntesis del Lípido 37A

Se esterificó ácido malónico protegido con bencilo 13-32 (5.1 mmoles, 1.0 g, 1 eq.) con *N*-hexanol (0.78 g, 1.5 eq, 7.7 mmoles) usando HATU (2.93 g, 1.5 eq, 7.7 mmoles) y DBU (1.56 g, 2.0 eq, 10.3 mmoles) en 8 mL de DMF durante 16 horas a temperatura ambiente rindiendo 0.5 g (35 %) de éster de intermedio **14-9** protegido. Un segundo lote de escala 5 g usando las mismas condiciones de reacción y estereoquímica de reactivos rindió 6 g adicionales (84 %) de intermedio 14-9. El intermedio 14-18 se produjo mediante acilación de bromuro de bromoacetilo 13-35 con *N*-decanol.

El intermedio **14-9** (21.6 mmoles, 6 g, 1 eq.) se alquiló con **14-18** (7.2 g, 1.2 eq, 26.0 mmoles) usando hidruro de sodio NaH (1.0 g, 1.2 eq, 26.0 mmoles) en 40 mL de DMF a temperatura ambiente toda la noche para obtener el intermedio **14-19** protegido (2.5 g, 25 %). El intermedio **14-19** (2.5 g, 1.0 eq.) se desprotegió usando **Pd/C** (500 mg, 32 % p/p) en 30 mL de acetato de etilo a temperatura ambiente toda la noche rindiendo 2.02 g (99 %) de intermedio ácido **14-20**.



Esquema 38. Síntesis del Lípido 37A

El intermedio ácido **14-20** (2.7 mmoles, 1.05 g, 1 eq.) se convirtió en el cloruro de ácido correspondiente **14-20'** usando cloruro de oxalilo (0.79 mL, 3.4 eq, 9.2 mmoles) y DMF (100 μ L, cantidad

catalítica) en 6.0 mL de tolueno a temperatura ambiente durante 2 horas y la conversión a intermedio cloruro de confirmó por TLC.

El intermedio 13-4 (1.57 mmoles, 195 mg) se hizo reaccionar con 14-20' bruto (2.83 g, 6.0 eq, 9.4 mmoles) usando TEA (2.18 mL, 10.0 eq, 15.7 mmoles) en 16.0 mL de tolueno a temperatura ambiente toda la noche. El producto bruto se purificó en cromatografía en columna ISCO en una columna de sílice eluyendo con DCM y MeOH al 10 % en DCM dos veces para obtener 205 mg (38 %) de Lípido 37A con una pureza >99 % (HPLC-CAD). (véanse la FIG. 4AH-1 y FIG. 4AH-2 para caracterización por RMN de protón y pureza por LC-CAD, y la Tabla 5 para los datos de espectrometría de masa).

EJEMPLO 2. PREPARACIÓN DE LNP POR MEZCLADO MICROFLUÍDICO USANDO LÍPIDOS IONIZABLES EJEMPLARES

Se produjeron LNP ejemplares usando el Lípido catiónico 9 y el Lípido catiónico 15 sintetizados en el Ejemplo 1.

Las LNP que encapsulaban una carga útil de ARNm se prepararon mezclando una solución acuosa de ARNm y una solución etanólica de mezcla de lípidos (que contenía lípidos ionizables, DSPC, DPG-PEG y colesterol en las relaciones de lípidos mostradas en la Tabla 6) usando un proceso de mezclado microfluídico en línea. La solución madre de ARNm (ARNm que codificaba eGFP, TriLink Biotechnologies, California, EE. UU.) (1 mg/mL) se diluyó en tampón de acetato de pH 4 (rindiendo una solución de 133 µg/mL de ARNm) en tampón de acetato 21.7 mM pH 4. Los componentes lipídicos se disolvieron en etanol anhidro en las relaciones relativas mostradas en la TABLA 6 a continuación.

TABLA 6

Lípido	Fuente	Relación de Lípido a ARNm (nmoles de lípido/100 µg de ARNm)	Concentración en la Solución Lipídica (mM)	Composición Lipídica Teórica de la LNP (% en moles)
Lípido catiónico ionizable	-	1.500	6	49.2
Colesterol	Dishman Países Bajos	1.200	4.8	39.4
DSPC	Avanti Polar Lipids, Alabama, EE. UU.	300	1.2	9.8
DPG-PEG(2000)	NOF America, Nueva York, EE.	46	0.18	1.5

	UU.			
DiIC18(5)-DS	Invitrogen, Massachusetts, EE. UU.	1.8	0.007	0.06

Las soluciones de ARNm y lípidos se mezclaron usando un dispositivo de mezclado microfluídico NanoAssemblr Ignite (no. de parte NIN0001) y un cartucho de mezclado NxGen (no. de parte NIN0002) de Precision Nanosystems Inc. (British Columbia, CA). Brevemente, las soluciones de ARNm y lípidos se cargaron en jeringas de polipropileno separadas. Se insertó un cartucho de mezclado en el NanoAssemblr Ignite, y las jeringas se dirigieron montadas en los puertos luer del cartucho de mezclado. A continuación, las dos soluciones se mezclaron en una relación 3:1 v/v de solución de ARNm (1.5 mL) a solución de lípidos (0.5 mL) a un caudal total de 9 mL/min usando el NanoAssemblr Ignite. La suspensión resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante un mínimo de 5 minutos antes de proceder a la eliminación del etanol y al intercambio de tampón.

Después del mezclado, se procedió a la eliminación del etanol y al intercambio de tampón en la suspensión de LNP resultante usando un proceso de diafiltración discontinua. Un dispositivo de ultrafiltración centrífuga con membrana de celulosa regenerada de 100.000 kDa MWCO (Amicon Ultra-15, MilliporeSigma, Massachusetts, EE. UU.) se desinfectó con una solución de etanol al 70 % y luego se lavó dos veces con tampón de intercambio HBS (tampón HEPES 25 mM pH 7.4 con NaCl 150 mM). A continuación, se cargó la suspensión de LNP (2 mL) en el dispositivo y se centrifugó a 500 RCF hasta que el volumen se redujo a la mitad (1 mL). A continuación, la suspensión se diluyó con tampón de intercambio (1 mL, tampón HEPES 25 mM pH 7.4) para devolver la suspensión al volumen original. Este proceso de concentración doble y dilución doble se repitió cinco veces más para un total de seis etapas de diafiltración discontinua. A continuación, la suspensión de LNP se cambió a MBS (tampón MES 25 mM pH 6.5 con NaCl 150 mL) diluyendo diez veces con MBS y centrifugando a 500 RCF hasta que el volumen se redujo una décima parte. Esta dilución de diez veces con MBS y la etapa de concentración de diez veces se repitieron una vez más. El retentado que contenía las LNP en MBS se recuperó del dispositivo de ultrafiltración centrífuga y se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

EJEMPLO 3. CARACTERIZACIÓN DE LAS LNP

En este Ejemplo se describe la caracterización de las LNP producidas en el Ejemplo 2.

Se caracterizaron muestras de las LNP producidas en el Ejemplo 2 para determinar el diámetro hidrodinámico promedio, el potencial zeta y el contenido de ARNm (ARNm total y accesible al colorante). El diámetro hidrodinámico se determinó por dispersión de luz dinámica (DLS) usando un Zetasizer modelo ZEN3600 (Malvern Pananalytical, Reino Unido). El potencial zeta se midió en tampón MES 5 mM pH 5.5 y en tampón HEPES 5 mM pH 7.4 por electroforesis Doppler por láser usando el Zetasizer.

El contenido de ARN de las nanopartículas se mide usando el kit de ensayo de ARN Thermo Fisher Quant-iT RiboGreen. El ARN accesible al colorante, que incluye tanto el ARN no encapsulado

como el ARN accesible en la superficie de la LNP, se mide diluyendo las nanopartículas hasta aproximadamente 1 µg/mL de ARNm usando solución salina tamponada con HEPES, y añadiendo después el reactivo Quant-iT a la mezcla. El contenido total de ARN se mide disruptiendo una suspensión de nanopartículas por dilución del lote de LNP madre (típicamente a ≥ 40 µg/mL de ARN) en solución de Tritón al 0.5 % en solución salina tamponada con HEPES para obtener una solución de ARN de 1 µg/mL (concentración nominal final basada en los valores de entrada de la formulación) y posterior calentamiento a 60 °C durante 30 minutos seguido de la adición del reactivo Quant-It. El ARN se cuantifica midiendo la fluorescencia a 485/535 nm, y la concentración se determina en relación con una curva estándar de ARN realizada simultáneamente. Los resultados se muestran en la TABLA 7.

TABLA 7

No. de Formulaci ón	Lípido Ionizable	Diámetro DLS Z-Prom. (nm)	PDI DLS	Potencial Zeta a pH 5.5 (mV)	Potencial Zeta a pH 7.4 (mV)	ARNm Accesible al Colorante (%)
1	Lípido Catiónico 9	95	0.07	17	0.0	5
2	Lípido Catiónico 15	98	0.06	20	0.3	5

EJEMPLO 4. PREPARACIÓN DE CONJUGADOS FAB PARA PERMITIR EL DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS T

Este Ejemplo describe la producción de un conjugado lípido-grupo de direccionamiento a células inmunes ejemplar.

Se conjugó un Fab anti-CD3 (hSP34 con lambda de ratón y lambda humana) (véanse las secuencias de aminoácidos más abajo) con DSPE-PEG(2k)-maleimida mediante acoplamiento covalente entre el grupo maleimida y una cisteína C-terminal de la cadena pesada (HC). También se conjugaron el clon Fab anti-CD3 Hu291, clon Fab anti-CD8 TRX2, clon Fab anti-CD8 OKT8, un OKT8 mutado no funcional (mutOKT8), Fab anti-CD4 de la secuencia Ibalizumab, clon Fab anti-CD5 He3, clon Fab anti-CD7 TH-69, clon Fab anti-CD2 TS2/18.1, clon Fab anti-CD2 9.6, clon Fab anti-CD2 9-1 con kappas humanas usando métodos similares descritos en la presente memoria. La proteína (3-4 mg/mL), después del intercambio de tampón a tampón fosfato pH 7 libre de oxígeno, se redujo en TCEP 2 mM en tampón fosfato pH 7 libre de oxígeno durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína reducida se aisló usando una columna SEC de 7 kDa para eliminar el TCEP y se intercambió el tampón a tampón fosfato de pH 7 libre de oxígeno fresco.

La reacción de conjugación se inició añadiendo una suspensión micelar de 10 mg/mL de DSPE-PEG-maleimida (Avanti Polar Lipids, Alabama, EE. UU.) y 30 mg/mL de DSPE-PEG-OCH₃ (Avanti Polar Lipids, Alabama, EE. UU.) (se usa una relación en peso de 1:1 a 1:3 dependiendo de la proteína) en tampón citrato de pH 5.7 libre de oxígeno (Citrato 1 mM). La solución de proteína se concentra a 3 - 4

mg/mL usando una Membrana de Celulosa Regenerada de 10 kDa y posteriormente se intercambia el tampón a tampón fosfato de pH 7 libre de oxígeno usando una Columna de Exclusión por Tamaño de 40 kDa. La reacción de conjugación se lleva a cabo usando 2 - 4 mg/mL de proteína y un exceso de 3.5 molar de maleimida a 37 °C durante 2 horas, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 12 - 16 horas adicionales.

La producción del conjugado resultante se monitorizó por HPLC y la reacción se inactivó en cisteína 2 mM. El conjugado resultante (DSPE-PEG(2k)-Fab anti-hSP34) se aisló usando filtración con membrana de celulosa regenerada Millipore de 100 kDa usando tampón salino HEPES pH 7.4 (HEPES 25 mM, NaCl 150 mM) y se almacenó a 4 °C antes de su uso. Después de la inactivación, la composición micelar final consiste en una mezcla de DSPE-PEG-Fab, DSPE-PEG-maleimida (terminado en cisteína) y DSPE-PEG-OCH₃. La relación de los tres componentes es DSPE-PEG-Fab: DSPE-PEG-maleimida (terminado en cisteína): DSPE-PEG-OCH₃ = 1: 2.45: 3.45 -10.35 (en moles)).

El conjugado resultante presentó una unión a CD3 épsilon recombinante de Rhesus comparable a la del Fab anti-CD3 no conjugado por ensayo ELISA.

Secuencia de hSP34-Fab anti-CD3:

HC de hSP34 (SEQ ID NO: 1):
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de hSP34-mlam (lambda de ratón) (SEQ ID NO: 2):
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEETNKATLVCTITDFYPGVTVTDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADSS

LC de SP34-hlam (lambda humana) (SEQ ID NO: 3):
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAFTVAWKADGSPVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAESS

Secuencia de TRX2-Fab anti-CD8:

HC de TRX2 (SEQ ID NO: 6):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDFGMNWVRQAPGKGLEWVALIYYDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHYDGYHFFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de TRX2 (SEQ ID NO: 7):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKGSQDINNYLAWYQQKPGKAPKLLIYNTDILHTGVPSRFSGSG
SGTDFTFTISLQPEDATYYCYQYNNGYTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGES

5 Secuencia de OKT8-Fab anti-CD8:

HC de OKT8 (SEQ ID NO: 8):

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDNTLYASK
FQGRVTITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRGYGYVFDHWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICN
10 VNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de OKT8 (SEQ ID NO: 9):

DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSRISQYLAWYQEKPAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHNENPLTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
15 TKSFNRGES

Secuencia de mutOKT8-Fab:

HC de mutOKT8 (SEQ ID NO: 22):

QVQLVQSGAEDKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANDNTLYASK
FQGRVTITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRGAGAYVFDHWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
20 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTC

LC de mutOKT8 (SEQ ID NO: 23):

DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSRISAAALAWYQEKPAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHNENPLTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
25 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
KSFNRGES

EJEMPLO 5. PREPARACIÓN DE LNP QUE CONTIENEN UN GRUPO DE DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS T

Este Ejemplo describe la incorporación de un conjugado de direccionamiento a células inmunes
30 en una LNP preformada.

Las LNP del Ejemplo 2 y los conjugados (conjugados anti-CD3 (hSP34) y anti-CD8 (TRX-2)) se
prepararon usando los métodos descritos en el Ejemplo 4, se combinaron como se muestra en la Tabla 8
en un tubo Eppendorf y se agitaron con vórtex durante 10 segundos a 2.500 rpm. Los tubos Eppendorf se
colocaron en el ThermoMixer a 37 °C a 300 rpm durante 4 horas. La suspensión de LNP de
35 direccionamiento resultante se almacenó posteriormente a 4 °C hasta su uso o, alternativamente, se
almacenó congelada tras su reconstitución en medio de sacarosa a una concentración final de sacarosa
del 9.6 % en peso por dilución usando el volumen apropiado de una solución madre de sacarosa al 50 %

en peso (en solución salina tamponada con HEPES; HEPES 25 mM, NaCl 150 mM)) y se almacenó congelada a -80 °C.

TABLA 8

	Densidad de FAb diana en la LNO dirigida g (Fab/mol de lípido)	FAb mg/mg de ARN	Conc. de ARN En LNP (mg/mL)	Conc. del Conjugado FAb (mg/mL)	Fab mg/mL de LNP	LNP mL/mL de Fab
30.460	9	0.274	0.45	1.46	0.123	11.8
30.460	3	0.091	0.45	1.46	0.041	35.5

EJEMPLO 6. PREPARACIÓN DE LNP POR MEZCLADO EN LÍNEA MICROFLUÍDICO Y FILTRACIÓN DE FLUJO TANGENCIAL USANDO UN LÍPIDO IONIZABLE EJEMPLAR

En este ejemplo se describe la preparación de las LNP usando operaciones unitarias escalables, a saber, mezclado microfluídico en línea seguida de filtración de flujo tangencial (TFF) para la eliminación del etanol y el intercambio de tampón. Se prepararon lotes separados de LNP usando bien DLin-KC3-DMA o el Lípido 15 como el lípido ionizable.

Se prepararon LNP que encapsulaban una carga útil de ARNm mezclando una solución acuosa de ARNm y una solución etanólica de mezcla lipídica usando un proceso de mezclado microfluídico en línea. Se diluyó la solución madre de ARNm (ARNm que codificaba eGFP o mCherry, TriLink Biotechnologies, California, EE. UU.) en tampón acetato pH 4 (rindiendo una solución de 400 µg/mL de ARNm) en tampón acetato 65 mM pH 4. Los componentes lipídicos se disolvieron en etanol anhidro a las relaciones relativas mostradas en la TABLA 9.1 a continuación.

TABLA 9.1

Lípido	Fuente	Relación de Lípido a ARNm (nmol de lípido/100 µg de ARNm)	Concentración en la Solución Lipídica (mM)	Composición Lipídica Teórica en la LNP (% en moles)
Lípido Catiónico Ionizable	-	1.500	18.0	49.2
Colesterol	Dishman Países Bajos	1.200	14.4	39.4

	DSPC	Avanti Polar Lipids, Alabama, EE. UU.	300	3.6	9.8
5	DPG-PEG(2000)	NOF America, Nueva York, EE. UU.	46	0.55	1.5

Las soluciones de ARNm y lípidos se mezclaron usando un dispositivo de mezclado microfluídico NanoAssemblr Ignite (No. de parte NIN0001) y cartucho de mezclado NxGen (no. de parte NIN0002) de Precision Nanosystems Inc. (British Columbia, CA). Brevemente, las soluciones de ARNm y lípidos se cargaron cada una en jeringas separadas de polipropileno. Se insertó un cartucho de mezclado en el NanoAssemblr Ignite, y las jeringas se montaron directamente en los puertos luer del cartucho de mezclado. Las dos soluciones se mezclaron entonces a una relación 3:1 v/v de solución de ARNm a solución de lípidos a una velocidad de flujo total de 9 mL/min usando el NanoAssemblr Ignite. La suspensión resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante un mínimo de 5 minutos antes de proceder a la eliminación del etanol y al intercambio de tampón. La eliminación del etanol y al intercambio de tampón se realizaron posteriormente usando filtración de flujo tangencial (TFF) de volumen constante.

Después del mezclado, se realizó la eliminación del etanol y el intercambio de tampón de la suspensión de LNP resultante usando un módulo TFF de fibra hueca (membrana mPES con 300 KDa MWCO, Repligen, EE. UU.). Brevemente, el módulo TFF se enjuagó con agua DI y se bombeó en seco antes de su uso. El tampón seleccionado para uso como el tampón de diafiltración dependió del lípido ionizable en la formulación de LNP. Para las LNP de DLin-KC3-DMA se usó tampón HEPES 25 mM pH 7.4 con NaCl 150 mM (HBS) como tampón de diafiltración. Para las LNP del Lípido 15, se usó tampón MES 25 mM pH 6.5 con NaCl 150 mM (MBS) como tampón de diafiltración. La mezcla de LNP en solución de etanol/agua se añadió al reservorio, el módulo TFF se cebó y se inició entonces la diafiltración aumentando la velocidad de la bomba peristáltica hasta el caudal diana y ajustando la válvula de material retenido hasta alcanzar la presión transmembrana (TMP) diana. Una vez iniciada la diafiltración, los parámetros de funcionamiento diana del sistema fueron una tasa de cizallamiento de 8.000 s^{-1} y una TMP de 3.5 psi. A lo largo del proceso de diafiltración, la TMP se mantuvo constante ajustando la válvula de material retenido. Se monitorizó el flujo de permeado y fue $> 20\text{ LMH}$ a lo largo de la diafiltración. Se realizaron seis volúmenes de intercambio de diafiltración, reservando muestras al final de cada volumen de diafiltración para seguir posteriormente el proceso de intercambio de tampón. El contenido final de etanol fue $\leq 0.1\%$, según las mediciones del índice de refracción en las muestras de permeado, y las mediciones del pH confirmaron el intercambio de tampón en el tampón de diafiltración deseado. Una vez completadas los seis volúmenes de diafiltración, se realizó posteriormente una concentración de la suspensión de LNP resultante.

La concentración de la suspensión de LNP se realizó hasta una concentración total de ARNm diana de ~0.8 mg/mL usando el mismo módulo de TFF que se usó durante el proceso de intercambio de tampón. Se mantuvieron la TMP y el caudal durante el proceso de intercambio de tampón y se dejó que la suspensión se concentrara deteniendo la adición del tampón de diafiltración al depósito de material retenido. La suspensión de LNP resultante se recogió y filtró con un filtro de jeringa de 0.2 µm. Se tomaron muestras de la suspensión con fines analíticos y se almacenaron entonces a 4 °C hasta su uso posterior.

Usando el proceso de caracterización de LNP del Ejemplo 3, se caracterizó el lote de LNP para determinar el diámetro hidrodinámico promedio y el contenido de ARNm (total y accesible al tinte); mostrado en la Tabla 9 a continuación. Como se observa en la Tabla 9, el proceso de mezclado microfluídico con eliminación de etanol e intercambio de tampón por TFF da como resultado partículas de menos de 100 nm que presentan una polidispersidad estrecha y una buena encapsulación de ARNm (<20 % de ARN accesible al colorante).

TABLA 9.2

ID de la Muestra/Número de Lote	Descripción	Diámetro DLS Z-Prom. (nm)	PDI DLS	Contenido Total de ARNm (µg/mL)	Contenido de ARNm Accesible al Colorante (µg/mL)	ARNm Accesible al Colorante (%)
EXP22001562-NF40	LNP de DLin-KC3-DMA después de 6 DV en HBS	85	0.07	846	115	14
EXP22007940-NU400	LNP del Lípido 15 después de 6 DV en MBS	69	0.14	990	161	16

EJEMPLO 7. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PKA APARENTE DE LA LNP USANDO LA Sonda FLUORESCENTE DE SULFONATO DE TOLUIDINIL-NAFTELENO (TNS)

Este ejemplo describe el método basado en un colorante fluorescente usado para medir la pK_a aparente de las nanopartículas lipídicas. La pK_a aparente determina la carga superficial de la nanopartícula en condiciones de pH fisiológico, típicamente un valor de pK_a en el rango de pH endosomal (6 - 7.4) da lugar a LNP que son neutras o ligeramente cargadas en el plasma o el espacio extracelular (pH 7.4) y se vuelven fuertemente positivas en entornos endosomales ácidos. Esta carga superficial positiva impulsa la fusión de la superficie de la LNP con las membranas endosomales cargadas negativamente, lo que provoca la desestabilización y ruptura del compartimento endosomal y el escape

de la LNP al compartimento citosólico, una etapa crítica en la administración citosólica del ARNm y la expresión de proteínas a través de la participación de la maquinaria ribosomal de las células.

La pK_a aparente de las LNP se determina midiendo la fluorescencia del ácido 6-(p-toluidino)-2-naftalenosulfónico (TNS) en tampones acuosos que cubren un rango de valores de pH (pH 4 - pH 10). El colorante TNS no es fluorescente cuando está libre en solución, pero emite una fuerte fluorescencia cuando se asocia a una nanopartícula lipídica cargada positivamente. A valores de pH inferiores a la pK_a de la nanopartícula, la carga superficial positiva de la LNP provoca el reclutamiento del colorante en la interfaz de la partícula, lo que da lugar a la fluorescencia del TNS. A valores de pH superiores al pK_a de la LNP, la carga superficial de la LNP se neutraliza y el colorante TNS se disocia de la interfaz de la partícula, lo que provoca la pérdida de la señal de fluorescencia. La pK_a aparente de la LNP se indica como el pH al que la fluorescencia alcanza el 50 % de su máximo, determinado mediante un ajuste de curva logística de cuatro puntos.

EJEMPLO 8. METODOLOGÍA GENERAL DE FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS LNP QUE ENCAPSULAN ARNM BASADAS EN LOS LÍPIDOS 1-8, 9-15 Y 31-34

Las nanopartículas lipídicas (LNP) portadoras de un ácido nucleico (ARN informador o ARN CAR) se formularon mediante un proceso de mezclado microfluídico usando las composiciones de lípidos y disolventes descritas en los Ejemplos 2 y 6 anteriores y se sometieron a intercambio de tampón en solución salina tamponada con HEPES pH 7.4 (lo que dio lugar a la eliminación del etanol y el ajuste del pH) usando dispositivos de filtro de membrana de ultrafiltración centrífuga o un proceso de filtración de flujo tangencial (TFF); y se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el tamaño hidrodinámico (diámetro, nm), la polidispersidad (PDI) y la carga a pH 5.5 y pH 7.4 (potencial zeta, mV). La eficiencia de encapsulación del ARNm (porcentaje de ARN accesible al colorante) y el contenido total de ARNm (ug/mL de ARN en la suspensión de LNP) se determinaron usando los métodos descritos en el Ejemplo 3. Las LNP formuladas se sometieron posteriormente a intercambio de tampón en solución salina tamponada con MES pH 6.5 y la distribución de tamaño se volvió a caracterizar mediante DLS antes de mezclarlas con la cantidad deseada de conjugado de anticuerpo de direccionamiento (véase la Tabla 8, Ejemplo 5) y se incubaron a 37 °C durante 4 horas para facilitar la inserción del anticuerpo (usando el proceso descrito en el Ejemplo 5) rindiendo como resultado las LNP dirigidas por anticuerpo finales. Las LNP dirigidas obtenidas se filtraron estérilmente y se caracterizaron mediante DLS (tamaño (nm) y PDI) usando los métodos descritos en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 9. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN CON CONJUGADO FAB HSP34 α CD3) DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) DE ARN GFP BASADAS EN LOS LÍPIDOS 1 - 8

Las LNP basadas en los lípidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 que encapsulan GFP-ARNm (TriLink Biotechnologies Inc.) o CAR-ARN (hecho a medida por TriLink Biotechnologies Inc.) se prepararon y caracterizaron usando los métodos descritos en los Ejemplos 5 a 8. Los valores medidos de la LNP de tamaño, PDI, carga y contenido de ARN para LNP basadas en los Lípidos 1 - 8 y LNPs preparadas

usando lípidos ionizables de comparación (incluyendo MC3, KC2, SM-102 y ALC-0315) se resumen en la Tabla 10 a Tabla 12. Como se observa en la FIG. 5A, la etapa de mezclado inicial y el posterior intercambio de tampón en HBS dieron como resultado LNP basadas en los Lípidos 1 - 8 de tamaños en el rango 80 - 120 nm. Todos los lípidos dieron como resultado una alta eficiencia de encapsulación (<15 % de ARN accesible al colorante) y >70 % de recuperación de ARN. Las LNP basadas en los lípidos 2, 3, 6, 7 y 8 toleraron bien el subsiguiente intercambio de tampón en tampón MES pH 6.5 y el proceso de inserción de anticuerpo (37 °C, 4 horas), lo que dio lugar a LNP dirigidas con diámetros inferiores a 140 nm y PDI < 0.2. Las LNP basadas en los lípidos 1 y 4 mostraron un desplazamiento de tamaño relativamente mayor, dando lugar a LNP dirigidas finales con un diámetro en el rango 140 - 160 nm; sin embargo, las distribuciones de tamaño de las partículas siguieron siendo estrechas y monomodales para todos los lípidos ensayados. Las LNP basadas en el lípido 5 mostraron el mayor desplazamiento de tamaño, con LNP dirigidas finales que presentaban un diámetro >160 nm. Los lípidos 1, 2, 6, 7 y 8 no mostraron cambios significativos de tamaño y polidispersidad después de un ciclo de congelación-descongelación, sin embargo, se observaron cambios moderados con las LNP basadas en los lípidos 3, 4 y 5. En resumen, todos los lípidos ensayados dieron lugar a una encapsulación viable de ARNm y a una estabilidad de congelación-descongelación, así como a diámetros finales de LNP dirigidas <200 nm. La capacidad de las LNP basadas en los lípidos 1 -8 para inducir la transfección de proteínas in vitro en células T humanas primarias mediada por el direccionamiento a receptores de células T α CD3 o α CD8 se evaluó como se describe en los Ejemplos 16 y 17.

Tabla 10. Tamaño, datos de polidispersidad (DLS) en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5 y posterior a la inserción de conjugado de Fab de anticuerpo (hSP34) α CD3 de LNP basadas en los Lípidos 1 - 8 y Lípidos comparativos

Lípido Ionizable, no. de LNP	Z-Tamaño Prom. (nm); HBS	Z-Tamaño Prom. (nm); MBS	Z-Tamaño Prom. (nm); después de inserción; MBS	Z-Tamaño Prom. (nm); Después de F/T	Polidispersidad (DLS); HBS	Polidispersidad (DLS); MBS	Polidispersidad (DLS); Después de inserción; MBS	Polidispersidad (DLS); Después de F/T
Lípido 1, DPG-PEG; EXP22001910-NL	98.78	124.3	146.2	145.5	0.08	0.128	0.11	0.14
Lípido 2, DMG-PEG; EXP21002182-N3	105.4	103.95	116.5	110.5	0.136	0.142	0.133	0.15

5	Lípido 2, DPG-PEG; EXP2100218 2-N4	107	105	115.2	115.1	0.104	0.072	0.112	0.1
10	Lípido 2, DPG-PEG; EXP2100234 0-N5	94	101.3	114.7	114.8	0.07	0.07	0.16	0.127
15	Lípido 3, DMG-PEG; EXP2100347 1-N5	98.1	107.8	111.8		0.11	0.1	0.095	
20	Lípido 3, DPG-PEG; EXP2100347 1-N4	85.3	93.7	110.4		0.07	0.08	0.16	
25	Lípido 3, DPG-PEG; EXP2100234 0-N6	100.7	120.5	131.3	133.3	0.07	0.07	0.08	0.09
30	Lípido 3, DPG-PEG; EXP2200191 0-NC	101.5	110.8	123.6	150.2	0.08	0.09	0.127	0.2
35	Lípido 4, DPG-PEG; EXP2100365 1-N6	79.5	96.3	116.8	128.5	0.04	0.11	0.105	0.18
	Lípido 4, DPG-PEG; EXP2200191 0-NI	95.5	120.6	155.4	170.3	0.09	0.13	0.137	0.17

Tabla 11. Carga, Potencial Zeta, ZP (DLS, mV) en MES pH 5.5 y HBS pH 7.4 de LNP Basadas en los Lípidos 1 - 8

Lípido Ionizable, no, de LNP	Carga (ZP, mV); pH 5.5	Carga (ZP, mV); pH 7.4
Lípido 1, DPG-PEG; EXP22001910-NL	19.9	-0.212
Lípido 2, DMG-PEG; EXP21002182-N3	25.3	3.64

5	Lípido 2, DPG-PEG; EXP21002182-N4	23.1	2.03
	Lípido 2, DPG-PEG; EXP21002340-N5	22.8	1.29
	Lípido 3, DMG-PEG; EXP21003471-N5	21.7	1.18
	Lípido 3, DPG-PEG; EXP21003471-N4	17.9	0.776
	Lípido 3, DPG-PEG; EXP21002340-N6	19.6	-2.01
10	Lípido 3, DPG-PEG; EXP22001910-NC	23.9	3.99
	Lípido 4, DPG-PEG; EXP21003651-N6	19	-0.508
	Lípido 4, DPG-PEG; EXP22001910-NI	21.6	1.16
	Lípido 5, DPG-PEG; EXP22001910-NM	19.1	-0.742
	Lípido 6, DPG-PEG; EXP21003651-N7	13.5	-1.9
15	Lípido 7, DPG-PEG; EXP21003651-N8	10.8	-4.31
	Lípido 8, DPG-PEG; EXP22002705-NO	20.6	0.051
	SM-102, DPG-PEG; EXP21003651-N3	12.8	-2.25
	ALC-0315, DPG-PEG; EXP21003651-N4	4.25	-2.95
	MC-3, DPG-PEG; EXP21003651-N2	12.7	-0.43
	KC-2, DPG-PEG; EXP21003651-N1	22.7	1.41

Tabla 12. Contenido de ARN Accesible al Colorante y ARN total de LNP Basadas en los Lípidos 1 - 8 y Lípidos comparativos

20	Lípido ionizable, no. de LNP	Conc. Nominal de ARNm (µg/mL)	ARNm Total Medido (µg/mL)	ARNm accesible al colorante (µg/mL)	Recuperación de ARNm total (%)	ARNm accesible al colorante (%)
25	Lípido 1, DPG-PEG; EXP22001910-NL	100	75.5	8.9	75.5	11.8
	Lípido 2, DMG-PEG; EXP21002182-N3	100	134.7	11.1	134.7	8.2
	Lípido 2, DPG-PEG; EXP21002182-N4	100	136.9	9.4	136.9	6.9
30	Lípido 2, DPG-PEG; EXP21002340-N5	100	71.8	7.8	71.8	10.9
35	Lípido 3, DMG-PEG; EXP21003471-N5	100	83.2	8.1	83.2	9.8
	Lípido 3, DPG-PEG; EXP21003471-N4	100	85.7	6.6	85.7	7.7
	Lípido 3, DPG-PEG; EXP21002340-N6	100	93.5	10.3	93.5	11.0

5	Lípido 3, DPG-PEG; EXP22001910-NC	100	74.9	6.5	74.9	8.7
	Lípido 4, DPG-PEG; EXP21003651-N6	50	37.1	4.3	74.2	11.5
	Lípido 4, DPG-PEG; EXP22001910-NI	100	77.6	9	77.6	11.6
	Lípido 5, DPG-PEG; EXP22001910-NM	100	73.4	11.8	73.4	16.1
10	Lípido 6, DPG-PEG; EXP21003651-N7	50	34.7	3.3	69.4	9.5
	Lípido 7, DPG-PEG; EXP21003651-N8	50	38.9	4.3	77.8	11.1
15	Lípido 8, DPG-PEG; EXP22002705-NO	100	85.9	8.4	85.9	9.8
	SM-102, DPG-PEG; EXP21003651-N3	50	28.7	4.3	57.4	15.0
	ALC-0315, DPG-PEG; EXP21003651-N4	50	38.1	4.8	76.2	12.6
20	MC-3, DPG-PEG; EXP21003651-N2	50	36.8	1.8	73.6	4.9
	KC-2, DPG-PEG; EXP21003651-N1	50	43	3.6	86	8.4

EJEMPLO 10. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN CON CONJUGADO FAB HSP34 α CD3) DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) DE ARN GFP BASADAS EN LOS LÍPIDOS 9, 10, 11 Y 15

Se prepararon y caracterizaron LNP basadas en los lípidos 9, 10, 11 y 15 que encapsulaban GFP-ARNm (TriLink Biotechnologies Inc.) o CAR-ARN (hecho a medida por TriLink Biotechnologies Inc.) usando los métodos descritos en los Ejemplos 5 a 8. Los valores medidos de la LNP de tamaño, PDI, carga y contenido de ARN de las LNP resultantes y de las preparadas usando lípidos ionizables de comparación (incluyendo MC3, KC2, SM-102 y ALC-0315) se resumen en la Tabla 13 a Tabla 15. Como se observa en la FIG. 6A, la etapa de mezclado inicial y el posterior intercambio de tampón en HBS dieron como resultado LNP de tamaños ≤ 100 nm con los Lípidos 9, 10, 11 y 15. Todos los lípidos dieron como resultado una alta eficiencia de encapsulación (<15 % de ARN accesible al colorante) y >70 % de recuperación de ARN. El posterior intercambio de tampón en tampón MES pH 6.5 y el proceso de inserción de anticuerpo (37C, 4 horas) fue bien tolerado por las LNP basadas en los lípidos 9, 10 y 15, dando como resultado diámetros finales de las LNP dirigidas inferiores a 140 nm y PDI < 0.2 . Las LNP basadas en el lípido 11 mostraron el mayor desplazamiento de tamaño tras el intercambio de tampón en

tampón MES pH 6.5, y un desplazamiento de tamaño moderadamente mayor tras la inserción de anticuerpo en relación con los otros lípidos ensayados. Las cuatro LNP lipídicas ensayadas fueron estables a un ciclo de congelación-descongelación sin que se observaran desplazamientos significativos en el diámetro o la polidispersidad de las LNP. En resumen, los cuatro lípidos ensayados produjeron una encapsulación viable de ARNm y estabilidad a la congelación-descongelación, así como diámetros finales de LNP dirigidas <200 nm. La capacidad de las LNP basadas en los lípidos 9, 10, 11 y 15 para inducir la transfección de proteínas in vitro en células T humanas primarias mediada por el direccionamiento al receptor de células T α CD3 o α CD8 se evaluó como se describe en los Ejemplos 16 y 17.

Tabla 13. Tamaño, datos de polidispersidad (DLS) en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5 y posterior a la inserción de conjugado de Fab de anticuerpo (hSP34) α CD3 de LNP basadas en los Lípidos 9, 10, 11, 15 y Lípidos comparativos

Lípido ionizable, no. de LNP	Z-Tamaño Prom. (nm); HBS	Z-Tamaño Prom. (nm); MBS	Z-Tamaño Prom. (nm); después de la inserción; MBS	Z-Tamaño Prom. (nm); Después de F/T	PDI (DLS); HBS	PDI (DLS); MBS	PDI (DLS); Después de la inserción; MBS	PDI (DLS); Después de F/T
Lípido 9; EXP21004287-N2	87.6	102.4	118.9	125.3	0.09	0.11	0.11	0.15
Lípido 9; EXP22001910-NE	83.9	94.8	105.1	115.1	0.08	0.07	0.12	0.13
Lípido 10; EXP22002705-NQ	98.6	110.6	119.9	121.5	0.1	0.11	0.12	0.11
Lípido 11; EXP22002705-NN	101.9	154.6	174.5	162.9	0.14	0.14	0.11	0.12
Lípido 15; EXP22001910-NP	91.55	97.65	114.8	118.3	0.07	0.06	0.13	0.17
SM-102; EXP21003651-N3	68.4	102.9	125.7	125.6	0.06	0.11	0.13	0.12
ALC-0315; EXP21003651-N4	76.5	103.9	116.7	152.2	0.06	0.09	0.17	0.18

5	DLin-MC3-DMA; EXP21003651- N2	72.2	92.6	124.8	123.65	0.07	0.07	0.16	0.15
	DLin-KC2-DMA; EXP21003651- N1	68.8		93.5	116.8	0.06		0.18	0.36

Tabla 14. Carga, Potencial Zeta, ZP (DLS, mV) en MES pH 5.5 y HBS pH 7.4 de LNP basadas en los

Lípidos 9, 10, 11, 15 y Lípido comparativo

Lípido ionizable, no. de LNP	Carga de la LNP (ZP, mV); pH 5.5	Carga de la LNP (ZP, mV); pH 7.4
Lípido 9; EXP21004287-N2	10.1	-2.34
Lípido 9; EXP22001910-NE	17.2	0.0437
Lípido 10; EXP22002705-NQ	21	-0.137
Lípido 11; EXP22002705-NN	16.5	-1.01
Lípido 15; EXP22001910-NP	19.7	-0.322
SM-102; EXP21003651-N3	12.8	-2.25
ALC-0315; EXP21003651-N4	4.25	-2.95
DiLn-MC3-DMA; EXP21003651-N2	12.7	-0.43
DLin-KC2-DMA; EXP21003651-N1	22.7	1.41

Tabla 15. Contenido de ARN Accesible al Colorante y ARN total de LNP Basadas en los Lípidos 9,

10, 11, 15 y Lípidos comparativos

Lípido ionizable, no. de LNP	Conc. Nominal de ARNm (µg/mL)	ARNm Total Medido (µg/mL)	ARNm accesible al colorante (µg/mL)	Recuperación de ARNm total (%)	ARNm accesible al colorante (%)
Lípido 9; EXP21004287-N2	100	72.3	7.5	72.3	10.4
Lípido 9; EXP22001910-NE	100	84.4	5.4	84.4	6.4
Lípido 10; EXP22002705-NQ	100	80.2	6.6	80.2	8.2
Lípido 11; EXP22002705-NN	100	85.6	13.6	85.6	15.9
Lípido 15; EXP22001910-NP	100	74.9	5.1	74.9	6.8

EJEMPLO 11. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN CON CONJUGADO FAB HSP34 α CD3) DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) DE ARN GFP BASADAS EN LOS LÍPIDOS 31 - 34

Las LNP basadas en los Lípidos 31, 32, 33 y 34 que encapsulan GFP-ARNm (TriLink Biotechnologies Inc.) o CAR-ARN (hecho a medida por TriLink Biotechnologies Inc.) se prepararon y caracterizaron usando los métodos descritos en los Ejemplos 5 a 8. Los valores medidos de las LNP de tamaño, PDI, carga y contenido de ARN se resumen en la Tabla 16 a Tabla 18. Como se observa en la FIG. 7A, la etapa de mezclado inicial y el subsiguiente intercambio de tampón en HBS dieron lugar a tamaños de LNP ≤ 110 nm con los Lípidos 31, 32, 33 y 34. Todas las LNP mostraron una eficiencia de encapsulación de moderada a alta (<20 % de ARN accesible al colorante) y una recuperación de ARN >70 %. El subsiguiente intercambio de tampón en tampón MES pH 6.5 y el proceso de inserción de anticuerpo (37°C, 4 horas) dieron como resultado diámetros finales de las LNP dirigidas en el rango de 120 nm a 160 nm y PDI en el rango de 0.1 - 0.25, lo que indica un control del tamaño de partícula relativamente más pobre en las LNP basadas en los lípidos 31 a 34. Las LNP basadas en los lípidos 31, 32 y 34 mostraron aumentos de tamaño moderados después de un ciclo de congelación-descongelación; sin embargo, se observó un desplazamiento de tamaño notablemente mayor con las LNP basadas en el lípido 34. En resumen, los cuatro lípidos ensayados produjeron una encapsulación viable de ARNm y estabilidad a la congelación-descongelación, así como diámetros finales de las LNP de <200 nm. Se evaluó la capacidad de las LNP basadas en los lípidos 31, 32, 33, 34 para inducir la transfección de proteínas in vitro en células T humanas primarias mediada por el direccionamiento al receptor de células T α CD3 o α CD8 como se describe en los Ejemplos 16 y 17.

Tabla 16. Tamaño, datos de polidispersidad (DLS) en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5 y posterior a la inserción de conjugado de Fab de anticuerpo (hSP34) α CD3 de LNP basadas en los Lípidos 31, 32, 33, 34 y Lípidos comparativos

Lípido Ionizable, no. de LNP	Z- Tamaño Prom. (nm); HBS	Z- Tamaño Prom. (nm); MBS	Z- Tamaño Prom. (nm); después de la inserción ; MBS	Z- Tamaño Prom. (nm); Después de F/T	Polidispersidad (DLS); HBS	Polidispersidad (DLS); MBS	Polidispersidad (DLS); Después de la inserción; MBS	Polidispersidad (DLS); Después de F/T
Lípido 31, DMG-PEG; EXP21002 002-N15B	77.1	75.2	159.8	171.7	0.14	0.12	0.21	0.25
Lípido 31,	79.23	94.3	108.3	**	0.22	0.18	0.17	

	DMG-PEG; EXP21002 179-N15B							
5	Lípido 32, DMG-PEG; EXP21002 179-N15C	78.3	101.4	149.9	**	0.26	0.17	0.23
10	Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004 287-N3	94.74	103.9	134.8	167.8	0.14	0.09	0.09
15	Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004 781-N6	92.2	94.1	98.085	125.3	0.21	0.1	0.10
20	Lípido 34, DPG-PEG; EXP21004 287-N4	97.31	113.3	155.1	207.5	0.093	0.07	0.13

** No medido.

Tabla 17. Carga, Potencial Zeta, ZP (DLS, mV) en MES pH 5.5 y HBS pH 7.4 de LNP basadas en los Lípidos 31, 32, 33, 34 y Lípido comparativo

	Lípido Ionizable, no. de LNP	Carga (ZP, mV); pH 5.5	Carga (ZP, mV); pH 7.4
25	Lípido 31, DMG-PEG; EXP21002002-N15B	20.5	-0.138
	Lípido 31, DMG-PEG; EXP21002179-N15B		
	Lípido 32, DMG-PEG; EXP21002179-N15C		
	Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004287-N3	19.7	-0.867
30	Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004781-N6	19.6	1.5
	Lípido 34, DPG-PEG; EXP21004287-N4	15	-1.79

Tabla 18. Contenido de ARN Accesible al Colorante y ARN total de LNP Basadas en los Lípidos 31, 32, 33, 34 y Lípidos comparativos

35	Lípido Ionizable, no. de LNP	Conc. Nominal de ARNm (µg/mL)	ARNm Total Medido (µg/mL)	ARNm accesible al colorante (µg/mL)	Recuperación de ARNm Total (%)	ARNm accesible al colorante (%)
----	------------------------------	-------------------------------	---------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	---------------------------------

5 10	Lípido 31, DMG-PEG; EXP21002002-N15B	50	42.7	3.7	85.4	8.7
	Lípido 31, DMG-PEG; EXP21002179-N15B	50	52.13	2.2	104.26	4.2
	Lípido 32, DMG-PEG; EXP21002179-N15C	50	53.02	7.5	106.04	14.1
	Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004287-N3	100	81.2	14.3	81.2	17.6
	Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004781-N6	150	116.4	12.8	77.6	110
	Lípido 34, DPG-PEG; EXP21004287-N4	100	70	10.5	70	15

EJEMPLO 12. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN CON LOS CONJUGADOS FAB TRX-2 Y 15C01 α CD8) DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) QUE CONTIENEN ARN GFP BASADAS EN LOS LÍPIDOS 1, 3, 4, 5, 9 Y 15

Las LNP basadas en los Lípidos 1, 3, 4, 5, 9 y 15 que encapsulan GFP-ARN (hechas a medida por TriLink Biotechnologies Inc.) se prepararon y caracterizaron usando los métodos descritos en los Ejemplos 5 a 8. El tamaño medido de las LNP, y el PDI, de las LNP basadas en los lípidos 1, 3, 4, 5, 9 y 15 tanto antes como después de la inserción con conjugados Fab α CD8 (TRX-1 y 15C01) se resumen en la Tabla 19. Como se observa en la FIG. 8A, la etapa de mezclado inicial y el posterior intercambio de tampón en HBS dieron lugar a tamaños de LNP ≤ 120 nm con las LNP basadas en los Lípidos 3, 9 y 15, mientras que las LNP basadas en el Lípido 5 exhibieron un diámetro >150 nm tras el intercambio de tampón en MBS pH 6.5. Las LNP basadas en los Lípidos 9 y 15 mostraron los tamaños más pequeños (≤ 120 nm) tras la inserción del conjugado de ambos anticuerpos α CD8 (TRX-2 y 15C01) y tras un ciclo de congelación-descongelación. De forma similar, la polidispersidad de todas las LNP finales dirigidas a α CD8 permaneció < 0.2 tanto antes como después de la congelación-descongelación (FIG. 8B). Se evaluó la capacidad de las LNP basadas en los lípidos 1, 3, 4, 5, 9 y 15 para inducir la transfección de proteínas in vitro en células T humanas primarias mediada por anticuerpos dirigidos al receptor de células T α CD8 (TRX-2 y 15C01) como se describe en los Ejemplos 18 y 19.

Tabla 19. Tamaño de las LNP basadas en los lípidos 1, 3, 4, 5, 9 y 15 y PDI antes y después de la inserción con el conjugado Fab dirigido a α CD8 (TRX-1 y 15C01)

Lípido Ionizable, no. de LNP	Z- Tamaño Prom. (nm); HBS	Z- Tamaño Prom. (nm); MBS	Z- Tamaño Prom. (nm); después de la	Z- Tamaño Prom. (nm); después de la	PDI (DLS); HBS	PDI (DLS); MBS	PDI (DLS); Después de la inserción de TRX-	PDI (DLS); Después de la inserción de 15C01;
------------------------------	---------------------------	---------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	----------------	----------------	--	--

			inserción de TRX- 2; MBS	inserción de 15C01; MBS			2; MBS	MBS
Lípido 3, DPG- PEG, TRX-2; EXP22001910- NC	101.5	110.8	117.4	131.0	0.08	0.09	0.116	0.166
Lípido 9, DPG- PEG, TRX-2; EXP22001910- NE	83.9	94.8	102.5	108.1	0.08	0.07	0.1255	0.143
Lípido 4, DPG- PEG, TRX-2; EXP22001910- NI	95.5	120.6	127.8	133.7	0.09	0.13	0.1325	0.114
Lípido 1, DPG- PEG, TRX-2; EXP22001910- NL	98.78	124.25	130.2	133.7	0.08	0.128	0.108	0.123
Lípido 5, DPG- PEG, TRX-2; EXP22001910- NM	102.4	161.2	162.3	161.3	0.09	0.13	0.1335	0.095
Lípido 15; DPG- PEG, TRX-2; EXP22001910- NP	91.55	97.65	106.0	115.1	0.07	0.06	0.1415	0.164

EJEMPLO 13. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN CON EL CONJUGADO FAB α CD8 (TRX-2) FAB) DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) QUE CONTIENEN ARN GFP BASADAS EN LOS LÍPIDOS 1, 8, 9, 10, 11 Y 15

Las LNP basadas en los Lípidos 1, 8, 9, 10, 11 y 15 que encapsulan GFP-ARN (hechas a medida por TriLink Biotechnologies Inc.) se prepararon y caracterizaron usando los métodos descritos en los Ejemplos 5 a 8. El tamaño medido de las LNP, y la PDI, de las LNP basadas en los lípidos 1, 8, 9, 10, 11 y 15 tanto antes como después de la inserción con el conjugado Fab α CD8 (TRX-2) se resumen en la Tabla 20. Como se observa en la FIG. 9A, la etapa de mezclado inicial y el posterior intercambio de tampón en HBS dieron lugar a tamaños de LNP <130 nm con los Lípidos 8, 9, 10, 11 y 15, mientras que

las LNP basadas en el Lípido 1 exhibieron un diámetro >150 nm tras el intercambio de tampón en MBS pH 6.5. Las LNP basadas en los Lípidos 8, 9, 10 y 15 mostraron los tamaños más pequeños (≤ 130 nm) tras la inserción de ambos conjugados de anticuerpos α CD8 (TRX-2 y 15C01) y tras un ciclo de congelación-descongelación. La polidispersidad de todas las LNP finales dirigidas a α CD8 permaneció < 0.2 tanto antes como después de la congelación-descongelación (FIG. 9B). Se evaluó la capacidad de las LNP basadas en los lípidos 1, 8, 9, 10, 11 y 15 para inducir la transfección de proteínas in vitro en células T humanas primarias mediada por anticuerpos dirigidos al receptor de células T α CD8 (TRX-2 y 15C01) como se describe en los Ejemplos 16 y 17.

Tabla 20. Tamaño de las LNP basadas en los lípidos 1, 8, 9, 10, 11 y 15 y PDI antes y después de la inserción con el conjugado Fab dirigido a α CD8 (TRX-1)

Lípido Ionizable, no. de LNP	Z-Tamaño Prom. (nm); HBS	Z-Tamaño Prom. (nm); MBS	Z-Tamaño Prom. (nm); después de la inserción de TRX-2; MBS	PDI (DLS); HBS	PDI (DLS); MBS	PDI (DLS); Después de la inserción de TRX-2; MBS
Lípido 11, DPG-PEG, TRX-2; EXP22002705-NN	101.5	110.8	155.45	0.08	0.09	0.13
Lípido 8, DPG-PEG, TRX-2; EXP22002705-NO	83.9	94.8	110	0.08	0.07	0.13
Lípido 10, DPG-PEG, TRX-2; EXP22002705-NQ	95.5	120.6	120.65	0.09	0.13	0.13
Lípido 9, DPG-PEG, TRX-2; EXP22001910-NE	98.78	124.25	114.45	0.08	0.128	0.14
Lípido 1, DPG-PEG, TRX-2 DPG-PEG; EXP22001910-NL	102.4	161.2	142.75	0.09	0.13	0.14
Lípido 15, DPG-PEG, TRX-2; EXP22001910-NP	91.55	97.65	114.45	0.07	0.06	0.14

Ejemplo 14. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN CON CONJUGADO FAB α CD8 T8) DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) DE ARN CAR(TTR-023) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4, 33 Y 34

Propiedades físicoquímicas (antes y después de la inserción con conjugado Fab α CD8 T8) de las nanopartículas lipídicas (LNP) de ARN CAR(TTR-023) basadas en los Lípidos 3, 4, 33 y 34

Las LNP basadas en los lípidos 3, 4, 33 y 34 que encapsulan ARN CAR (TTR-023) (hechas a medida por TriLink Biotechnologies Inc.) se prepararon y caracterizaron usando los métodos descritos en los Ejemplos 5 a 8. Los valores medidos de las LNP de tamaño, PDI, carga y contenido de ARN se resumen en las Tabla 21, Tabla 22 y Tabla 23. Como se observa en la FIG. 10A, la etapa de mezclado inicial y los subsiguientes intercambios de tampón en HBS y después en MBS dieron como resultado

tamaños de LNP ≤ 125 nm con los Lípidos 3 y 4, y ≤ 100 nm con los Lípidos 33 y 34. Todas las LNP mostraron una eficiencia de encapsulación de moderada a alta (<15 % de ARN accesible al colorante) y una recuperación de ARN >70 %, con los Lípidos 33 y 34 tendiendo a ser mejores en términos de recuperación y menores en términos de ARN accesible al colorante (FIG. 10D). El posterior intercambio de tampón en tampón MES pH 6.5 y el proceso de inserción de anticuerpo (37°C, 4 horas) dieron lugar a diámetros de LNP basadas en los Lípidos 3 y 4 en el rango de 120 nm a 135 nm, mientras que los Lípidos 33 y 34 produjeron diámetros inferiores a 100 nm. De forma similar, la PDI de las LNP basadas en los Lípidos 3 y 4 tendieron a ser ligeramente superiores en el rango de 0.15 a 0.21, mientras que las de los Lípidos 33 y 34 dieron una PDI ≤ 0.11 , lo que indica unas propiedades de distribución del tamaño ligeramente mejores. Las LNP basadas en los Lípidos 4 y 34 mostraron aumentos de tamaño moderados tras un ciclo de congelación-descongelación, sin embargo, se observaron desplazamientos de tamaño notablemente mayores con las LNP basadas en los lípidos 3 y 33. En resumen, los cuatro lípidos ensayados produjeron una encapsulación viable de ARNm de CAR y estabilidad a la congelación-descongelación, así como diámetros de las LNP finales dirigidas <150 nm. Se evaluó la capacidad de las LNP basadas en lípidos 3, 4, 33 y 34 para inducir in vitro la expresión de la proteína CAR en células T humanas primarias mediada por el direccionamiento al receptor de células T α CD3 o α CD8 como se describe en los Ejemplos 16 y 17.

Tabla 21. Tamaño, datos de polidispersidad (DLS) en HBS pH 7.4, MBS pH 6.5 y posterior a la inserción de conjugado de Fab de anticuerpo α CD3 (hSP34) de las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 33, 34

Lípido Ionizable, no. de LNP	Z-Tamaño Prom. (nm); HBS	Z-Tamaño Prom. (nm); MBS	Z-Tamaño Prom. después de inserción; MBS	Z-Tamaño Prom. después de F/T	Polidispersidad (DLS); HBS	Polidispersidad (DLS); MBS	Polidispersidad (DLS); Después de inserción; MBS	Polidispersidad (DLS); Después de F/T
Lípido 3, DPG-PEG; EXP2100478 1-N3	108.6	121.5	131.8	135.5	0.19	0.16	0.15	0.17
Lípido 4, DPG-PEG; EXP2100478 1-N5	92.8	110.2	121.7	127.1	0.15	0.17	0.16	0.21
Lípido 33, DPG-PEG; EXP2100478 1-N3	92.2	94.1	97.5	116.9	0.21	0.1	0.10	0.18

DPG-PEG; EXP2100478 1-N6								
Lípido 34, DPG-PEG; EXP2100478 1-N4	86.3	87.8	93.4	103	0.18	0.09	0.11	0.14

Tabla 22. Carga, Potencial Zeta, ZP (DLS, mV) en MES de pH 5.5 y HBS pH 7.4 de las LNP basadas en los lípidos 3, 4, 33, 34

Lípido Ionizable, no. de LNP	Carga (ZP, mV); pH 5.5	Carga (ZP, mV); pH 7.4
Lípido 3, DPG-PEG; EXP21004781-N3	15.7	0.786
Lípido 4, DPG-PEG; EXP21004781-N5	11.1	-1.23
Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004781-N6	17.4	1.01
Lípido 34, DPG-PEG; EXP21004781-N4	19.6	1.5

Tabla 23. Contenido de ARN Accesible al Colorante y ARN total de LNP Basadas en los Lípidos 3, 4, 33, 34

Lípido Ionizable, no. de LNP	Conc. Nominal de ARNm (µg/mL)	ARNm Total Medido (µg/mL)	ARNm accesible al colorante (µg/mL)	Recuperación de ARNm Total (%)	ARNm accesible al colorante (%)
Lípido 3, DPG-PEG; EXP21004781-N3	150	107.1	15.5	71.4	14.5
Lípido 4, DPG-PEG; EXP21004781-N5	150	110.7	14.4	73.8	13.0
Lípido 33, DPG-PEG; EXP21004781-N6	150	116.4	12.8	77.6	11.0
Lípido 34, DPG-PEG; EXP21004781-N4	150	119.9	8.2	79.9	6.8

EJEMPLO 15. MÉTODO PARA EL PROCESO DE CONGELACIÓN (Y DESCONGELACIÓN) DE LA SUSPENSIÓN DE LNP Y CARACTERIZACIÓN DE LA LNP DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN.

La suspensión de LNP se mezcló con una solución de sacarosa al 49 % en peso en agua y tampón de almacenamiento adicional (si era necesario) para conseguir una muestra final que contuviera LNP a aproximadamente 45 µg/mL y sacarosa a aproximadamente 9.6 % en peso. A continuación, se prepararon alícuotas de aproximadamente 0.05 mL en tubos de centrifuga de 1.5 mL a partir de la muestra final de LNP que contenía sacarosa. Las alícuotas se pusieron entonces en un congelador a -80 °C durante al menos 2 h para congelar las muestras. Tras la congelación, se descongeló una alícuota poniéndola a temperatura ambiente durante al menos 10 min. A continuación, se mezcló la alícuota

agitándola con vórtex a 2.500 rpm durante aproximadamente 5 s. A continuación, se analizó el tamaño del material descongelado por DLS, como se describe en el Ejemplo 3.

Ejemplo 16. MÉTODO PARA LA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS CON LNPS MARCADAS CON DII-C18-5DS

Las células T CD3+ se aislaron a partir de células mononucleares de sangre periférica congeladas usando un kit de aislamiento de células T humanas EasySep en un sistema automatizado de aislamiento celular RoboSep de STEMCELL. Las células T se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en un medio de cultivo celular RPMI suplementado con glutamax, suero bovino fetal al 10 %, pen-estrep y 40 ng/mL de IL-2. Se sembraron 100 µL de suspensión celular por pocillo a una densidad de 1M de células T/mL (100K células T/pocillo). Las células se dejaron reposar durante dos horas en un incubador a 37 °C, y luego se transfectaron añadiendo suavemente 10 µL de una suspensión de nanopartículas de 22 µg/mL (por ARNm), lo que dio como resultado una concentración final de ARNm de 2 µg/mL (a no ser que se indique otra cosa). Las células se mezclaron suavemente con una pipeta y luego se incubaron durante 24 horas en un incubador a 37 °C. Tras la incubación, las células se diluyeron con tampón FACS (BD 554657) y se analizaron usando un citómetro de flujo BD Fortessa. Los datos se analizaron con el software FlowJo de BD biosciences.

Ejemplo 17. PROTOCOLO DE TINCIÓN DE CD4 Y CD69 TRAS LA TRANSFECCIÓN DE LAS LNP

Después de 24 horas, las células se transfirieron a una placa de polipropileno de fondo cónico de 96 pocillos y se centrifugaron a 350 × g durante 5 minutos. Se retiraron los sobrenadantes y se transfirieron a una nueva placa de polipropileno de fondo cónico para su posterior análisis. Las células se lavaron añadiendo 200 µL de tampón FACS (BD 554657), centrifugando a 350 × g durante 5 min y aspirando después el sobrenadante de cada pocillo. Los anticuerpos BV421 anti-CD69 humano (BioLegend 310930 clon FN50) y BV711 anti-CD4 humano (BioLegend 344648 clon SK3) se diluyeron 100× añadiendo 100 µL de cada anticuerpo a 10 mL de tampón FACS. Se añadieron 100 µL de la solución de anticuerpo diluida a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se lavaron las placas centrifugando a 350 × g durante 5 min, eliminando el sobrenadante, resuspendiendo en 200 µL de tampón FACS, centrifugando a 350 × g durante 5 min y aspirando el sobrenadante de cada pocillo. Tras el lavado, las células se resuspendieron en 100 µL de formaldehído al 1.6 % y se almacenaron a 4 °C hasta el análisis FACS. El análisis FACS se realizó usando un BD Fortessa equipado con un muestreador de alto rendimiento.

Ejemplo 18. MÉTODO ELISA PARA IFN-γ HUMANO

El IFN-γ se analizó usando un kit de ELISA de IL-2 DuoSet de R&D, PN DY285B. Brevemente: se recubrió una placa de 96 pocillos Immulon 2HB (Thermo X1506319) añadiendo 100 µL de una solución de 2 µg/mL del anticuerpo de captura de IL-2 de R&D a cada pocillo y luego incubando la placa toda la noche a 4 °C. Se lavó la placa tres veces con tampón de lavado 0.05 TWEEN-20 en solución salina tamponada con TRIS pH 7.4, Thermo 28360), se bloqueó con diluyente de reactivo (BSA al 0.1 % en tampón de lavado) durante una hora a temperatura ambiente y, a continuación, se lavó otras tres veces con tampón de lavado. Los sobrenadantes se diluyeron tres veces en diluyente de reactivo y luego se

añadieron 100 μ L de sobrenadante diluido a cada pocillo. Se prepararon estándares de IFN- γ en la misma placa mediante dilución en serie. Las placas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 μ L de anticuerpo de detección diluido en diluyente de reactivo, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y después se lavó la placa tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 μ L de Estreptavidina-HRP, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se lavó la placa tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 μ L de solución de sustrato (Thermo N301), se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se inactivó la reacción añadiendo 100 μ L de solución de parada (Invitrogen SS04). La densidad óptica a 450 nm se leyó en un lector de placas SpectraMax M5. La concentración de IFN- γ se cuantificó en relación con una curva estándar basada en estándares de IFN- γ analizados simultáneamente.

Ejemplo 19. PROTOCOLO DE TINCIÓN DE CAR TTR-023 (M1)

Las células se transfirieron a una placa de fondo cónico de 96 pocillos y se lavaron mediante centrifugación a 350 x g durante 5 minutos, seguida de resuspensión en tampón FACS (BD 554657). La proteína CAR TTR-023, que contiene una etiqueta FLAG, se detectó mediante tinción con anticuerpo M1 anti-Flag (Sigma Aldrich F3040) conjugado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen A3750) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras la tinción, las células se lavaron dos veces mediante centrifugación a 350 x g durante 5 minutos, seguida de resuspensión en tampón FACS. Las células se analizaron mediante FACS usando un citómetro de flujo BD Fortessa (BD Biosciences).

Procedimiento de síntesis y purificación del conjugado anticuerpo M1 anti-Flag - Alexa Fluor 488: El anticuerpo M1 anti-FLAG se sometió a intercambio de tampón a bicarbonato sódico pH 8.3 usando una columna de centrifugación Zeba 40K MWCO. A continuación, se añadió una solución de 8 mg/mL de éster Alexa Fluor 488 TFP (Invitrogen A37570) en DMSO hasta alcanzar una relación final AB:masa de colorante de 10:1 y se dejó reaccionar la mezcla durante 1 hora con agitación suave. El M1 conjugado con fluoróforo se purificó y se sometió a intercambio de tampón a PBS pH 7.4 haciendo pasar la mezcla de reacción a través de dos columnas de centrifugación Zeba secuenciales. El contenido de proteínas y el grado de marcaje se evaluaron mediante espectroscopia UV-Vis.

Ejemplo 20. TRANSFECCIÓN IN VITRO DE CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS CON LNP CAR Y COCULTIVO CON RAJI (CÉLULAS B) PARA LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T.

Las células T CD3+ o CD8+ se aislaron a partir de PBMC humanas usando el kit de aislamiento de células T CD8+ humanas EasySep (no. de catálogo 17953) y el kit de aislamiento de células T humanas EasySep (no. de catálogo 17951) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células T aisladas se dejaron reposar toda la noche en medio para células T (RPMI+Glutamax, Gibco, no. de catálogo 61870-036) con suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor (HI-FBS, Gibco, no. de catálogo 16140-071) suplementado con 100UI de IL-2 humana (Miltenyi, no. de catálogo 130-097-748) a una densidad de 500.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. A continuación, las células T se transfectaron con LNP a una concentración de ARNm de 2 μ g/ml. La expresión de CAR se detectó 18 h

después de la transfección de LNP usando citometría de flujo. Antes del cocultivo con células B Raji, las células T transfectadas se lavaron dos veces con medio para células T. Las células B Raji se tiñeron con violeta de rastreo celular (CTV, Thermo Fisher, no. de C34571) y se cocultivaron con diferentes relaciones de efector a diana (E: T) de células T en un formato de placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 72 horas. 72 horas después del cocultivo, las células se tiñeron con la tinción vivo/muerto (colorante de viabilidad fijable de eBioscience eFluor 780, Invitrogen no. de catálogo 2290917) y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se analizaron con FlowJo y Graph Pad prism.

Ejemplo 21. PROTOCOLO EXPERIMENTAL IN VITRO PARA LA TRANSFECCIÓN DE SANGRE COMPLETA

Este Ejemplo describe el método usado para transfectar células inmunes en sangre completa usando LNP de ARNm dirigidas por Fab.

La sangre venosa de voluntarios sanos se anticoaguló en tubos de heparina (BD Biosciences no. 367526) y se sembró a 50 µL en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. La transfección de la sangre completa se llevó a cabo simplemente añadiendo nanopartículas que contenían 5 µg/mL de ARNm a las células y cocultivando a 37 °C hasta el momento del análisis. Para evaluar la eficiencia de la transfección, se analizaron las células 24 horas después de la transfección mediante citometría de flujo. Las LNP se usaron (con y sin dianas insertadas posteriormente) a 2.5 µg/mL:RDM073.23. Las células obtenidas de sangre humana se analizaron por citometría de flujo. Antes del análisis de la eficiencia de transfección de sangre completa, los eritrocitos se lisaron dos veces con solución de lisado VersaLyse (Beckman Coulter no. A09777) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios aplicados en el análisis por citometría de flujo de la sangre completa fueron los siguientes: CD4-FITC (1:200) (BD Biosciences no. 555346), CD19-BUV395 (1:400) (BD Biosciences no. 563551), CD56-BUV737 (1:400) (BD Biosciences no. 741842). Para evaluar la viabilidad de todas las muestras se utilizó el colorante fijador de viabilidad eFluor780 (eBiosciences no. 65-0865-14). Para el análisis de flujo, 1×10^5 células se bloquearon en Fc (BD Biosciences no. 564219) durante 5 minutos en hielo, seguido del marcaje de las células muertas con colorante de viabilidad fijable eFluor780 y tinción de superficie durante 30 minutos en hielo con anticuerpos específicos.

La compensación para cada fluorocromo se realizó en los paneles de flujo multicolor usando perlas de compensación positivas y negativas. Se incluyeron muestras de fluorescencia menos uno (FMO) y controles sin tinción para determinar el nivel de fluorescencia de fondo y establecer las ventanas de análisis para las poblaciones celulares negativas frente a las poblaciones celulares positivas.

Todas las muestras se adquirieron en un BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) con el software FACSDIVA (Becton Dickinson). Todos los datos recogidos se analizaron usando el software FlowJo 10.7.1 y GraphPad Prism versión 9.0.

Ejemplo 22. PROTOCOLO PARA LA REPROGRAMACIÓN IN VIVO DE CÉLULAS T (USANDO LA PROTEÍNA INFORMADORA GFP) EN RATONES NSG INJERTADOS CON CÉLULAS T HUMANAS.

A continuación, se describe un procedimiento estándar para la reprogramación in vivo de células inmunes con LNP Dil que expresan GFP.

Cepas de Ratones y Humanización

El modelo de ratón NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) se adquirió en Jax Laboratories. Se injertaron en ratones machos de 6-8 semanas de edad 10 millones de PBMC de donante cualificado en PBS estéril mediante inyección en la vena de la cola. Se monitorizó el peso corporal individual dos veces por semana y se recogieron muestras de sangre en intervalos apropiados para evaluar el injerto de células inmunes humanas.

Evaluación del Injerto de Células T Humanas en Ratones Inmunodeficientes

Se extrajeron 50 µl de sangre de la vena de la cola de cada ratón. Los glóbulos rojos se lisaron usando Versalyse, solución de lisis de RBC, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Beckman Coulter A09777). Las células se tiñeron con hCD45 y hCD3 para determinar el injerto de células T humanas. Después de 15 días de la inyección de PBMC, los ratones tenían entre un 30-60 % de huCD45+. Estos ratones humanizados fueron evaluados para la reprogramación de las células inmunes por las LNP que expresan colorante Dil y GFP.

Reprogramación de Células Inmunes

En el tiempo cero, se inyectaron a los ratones (n=4 por grupo) las LNP que expresaban GFP Dil (por *i.v.* con el tampón apropiado). En cada punto temporal, 24 o 48h dependiendo del ejemplo los ratones tratados con LNP o tampón fueron sacrificados. Se procedió a la extracción de sangre y tejidos terminales para determinar la expresión de Dil y GFP en diferentes órganos y células inmunes como se indica a continuación.

Recogida de muestras de tejido y sangre

En los puntos de tiempo especificados anteriormente, los ratones fueron anestesiados con CO₂ antes de la recogida de muestras. Para la extracción de sangre, se abrió el tórax para exponer el corazón. Se extrajeron hasta 300 µl de sangre del ventrículo izquierdo y se dispensaron en un minitubo de recogida K₃EDTA (Greiner Bio-One). A continuación, se usó una nueva jeringa para extraer el resto de la sangre del corazón en la medida de lo posible. Se aislaron todos los órganos inmunes: bazo, médula ósea, junto con hígado y pulmón. Se aislaron las células inmunes del bazo mediante frotis y trituración a través de una jeringa y se filtró la suspensión celular a través de un colador celular de 70 µm y se lavó con PBS. Se lavó la médula ósea con una aguja para recoger todas las células inmunes. Se trituró suavemente un trozo de tejido hepático y pulmonar con un homogeneizador de tejidos, se homogeneizó y se aislaron las células usando el kit de disociación hepática Miltenyi (Miltenyi Biotec, No. de Catálogo 130-105-807) y el kit de disociación pulmonar (Miltenyi Biotec, No. de Catálogo 130-0950927) y se siguieron las instrucciones según las instrucciones de fabricación.

Análisis de Inmunofenotipado

Las células inmunes de la sangre y de todos los órganos anteriores se procesaron con Versalyse, tampón de lisis de RBC según las instrucciones de fabricación. Las células inmunes se tiñeron con colorante fijable vivo/muerto y marcadores de superficie con protocolo de análisis de flujo estándar, como se muestra en la Tabla 24. Se usó el citómetro de flujo BD symphony para determinar la población positiva.

Tabla 24

Antígeno	Fluoróforo	Clon	Empresa	No. de Catálogo
Dil	APC	NA	NA	NA
GFP	ARNm	NA	NA	NA
Anti-CD45	BUV395	HI30	BD Biosciences	563792
Anti-CD3	BUV805	UCHT1	BD Biosciences	612895
Anti-CD4	BV711	SK3	BioLegend	344648
Anti-CD8	BV421	RPA-TB	BD Biosciences	562428
Anti-CD45	BB700	30-F11	BD Biosciences	566439
Anti-CD11b	BV785	M1/70	BioLegend	101243
Anti-F4/80	PE Dazzle	BM8	BioLegend	123146
Anti-CD31	BUV737	MEC 13.3	BD Biosciences	612802
Bloqueador de Monocitos TruStain	NA	NA	BioLegend	462103
Perlas Arc Amine Comp	NA	NA	NA	01-3333-42
Perlas electrónicas UltraComp	NA	NA	Invitrogen	01-3333-42
Tinción Rojo lejano VIVO/MUERTO	NA	NA	Invitrogen	L34974
TruStain Fc X	NA	NA	Invitrogen	422302

EJEMPLO 23. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 6, 7 Y LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-MC3-DMA Y ALC-0315) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE UN CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 6 y 7 con las LNP fabricadas usando los lípidos comparativos DLin-MC3-DMA y ALC-0315. Las nanopartículas portadoras de ARNm codificante de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpos usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador.

Las LNP basadas en el Lípido 3 y ALC-0315 dieron lugar a niveles similares de expresión de la proteína GFP, como indican el % similar de células T GFP+ y la intensidad media de fluorescencia (MFI)

similar de las células T transfectadas (véanse las FIG. 11A, FIG. 11B (%GFP+) y FIG. 11C y FIG. 11D (MFI de GFP). Esto sugiere que la captación impulsada por anticuerpos fue igualmente efectiva con ambos lípidos ionizables y se alcanzaron niveles similares de eficiencias de escape endosomal impulsadas por lípidos ionizables. El Lípido 7 y los lípidos DLin-MC3-DMA dieron lugar a niveles similares y más bajos de expresión de la proteína GFP. Las LNP basadas en el Lípido 6 mostraron un nivel intermedio de expresión de la proteína GFP. Los niveles de expresión de la proteína sugieren que el sustituyente N-acilo de 9 carbonos (lípido 3) mejora el rendimiento respecto a los sustituyentes N-acilo de 11 carbonos (de los Lípidos 6 y 7). Los niveles de rendimiento y el orden relativo de la eficiencia de las LNP se conservaron en todas las formulaciones de nanopartículas lipídicas ensayadas después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C), como ilustra la comparación de los valores de % de células GFP+ y MFI de GFP antes y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 11A frente a FIG. 11B y FIG. 11C frente a FIG. 11D). Aunque todas las formulaciones lipídicas ensayadas fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 11E); se observó cierta pérdida dependiente de la dosis en la viabilidad de las células T con los Lípidos 7 y DLin-MC3-DMA.

EJEMPLO 24. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4 Y LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-KC2-DMA Y SM-102) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3 y 4 con las LNP fabricadas usando los lípidos comparativos DLin-KC2-DMA y SM-102. Las nanopartículas portadoras de ARNm que codifica GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. A una dosis ≥ 0.1 ug/mL, se transfectó un número similar de células T con las LNP basadas en SM-102 y Lípido 4, sin embargo, a dosis inferiores a 0.1 ug/mL, una fracción mayor de células T eran GFP+ en comparación con las LNP basadas en SM-102 y los valores de MFI de GFP fueron consistentemente aproximadamente 2 veces superiores a todas las dosis, lo que sugiere un acceso citosólico/liberación citosólica más eficiente del ARNm de GFP encapsulado en relación con las LNP basadas en el Lípido 4. Las LNP basadas en el Lípido 3 y DLin-KC2-DMA se comportaron de forma similar en cuanto a la fracción de células T a las que se accedió, así como en cuanto a las copias de proteína GFP expresadas por célula, y se situaron en niveles 2 veces inferiores en relación con las LNP basadas en el Lípido 4. Esta tendencia indica que los grupos oleoilo de cola Lípido 4 dieron lugar a un acceso citosólico/liberación citosólica más eficiente del ARNm de GFP encapsulado en relación con los grupos linoleilo de cola del Lípido 3. Los niveles de rendimiento y el orden relativo de la eficiencia de las LNP se conservaron bien en todas las formulaciones de nanopartículas lipídicas ensayadas después de 1

ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C), como se ilustra por la comparación de los valores de % de células GFP+ y MFI de GFP antes y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 12A frente a FIG. 12B y FIG. 12C frente a FIG. 12D). Las LNP basadas en los Lípidos 3, 4 y SM-102 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 12E); sin embargo, se observó una pérdida ligeramente mayor de la viabilidad de las células T con las LNP basadas en DLin-KC2-DMA a las dosis más altas de 0.3 y 1 ug/mL.

EJEMPLO 25. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 1, 3, 8 Y LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-KC2-DMA) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 1, 3 y 5 con las LNP fabricadas usando el lípido comparativo DLin-KC2-DMA. Las nanopartículas portadoras de ARNm codificador de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. En todos los niveles de dosis, las LNP basadas en el Lípido 1 y DLin-KC2-DMA se comportaron de forma similar tanto en términos de fracción de células T GFP+ (reflejadas por el % de células GFP+) como de copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por los valores de MFI de GFP). Las LNP basadas en el Lípido 3 dieron lugar a una fracción aproximadamente 3 veces mayor de células T GFP+ en relación con las LNP basadas en el Lípido 1, y los valores de MFI de GFP fueron consistentemente aproximadamente 3 veces mayores en todas las dosis, lo que sugiere un acceso citosólico/liberación citosólica más eficiente del ARNm de GFP encapsulado con las LNP basadas en el Lípido 3 en relación con el Lípido 1, lo que indica que el sustituyente N-acilo de 9 carbonos (del Lípido 3) es favorable para un acceso citosólico/liberación citosólica eficientes del ARNm de GFP encapsulado en relación con el sustituyente N-acilo de 10 carbonos (del Lípido 1). La mayor expresión de la proteína GFP se observó con las LNP basadas en el Lípido 5, como indican los valores más altos de %GFP+ y MFI de GFP en todos los niveles de dosis. Esto indica que la reducción adicional del número de carbonos del sustituyente N-acilo a un esqueleto de 8 carbonos mejora aún más la eficiencia de la administración del ARNm. Sin embargo, como se observó en el Ejemplo 9, las LNP basadas en el Lípido 5 mostraron mayores desplazamientos de tamaño en las etapas de intercambio de tampón e inserción de conjugado de anticuerpo, lo que dio lugar a diámetros hidrodinámicos finales de LNP >150 nm, lo que indica que el esqueleto de sustitución N-acilo de 9 carbonos resulta óptimo para el tamaño de la LNP (para permitir la filtración estéril de 0.2 micrómetros), así como la capacidad de inducir la expresión del gen informador. Los niveles de rendimiento y el orden relativo de la eficiencia de las LNP se conservaron bien en todas las formulaciones ensayadas después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento

posterior a -80 °C), como se ilustra por la comparación de los valores de % de células GFP+ y MFI de GFP antes y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 13A frente a FIG. 13B y FIG. 13C frente a FIG. 13D). Las LNP basadas en los Lípidos 1, 3, 5 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 13E).

EJEMPLO 26. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 1, 8 Y LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-KC2-DMA) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 1 y 8. Las nanopartículas portadoras de ARNm codificador de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. En todos los niveles de dosis, tanto el Lípido 1 como las LNP dieron lugar a una fracción similar de células T GFP+ (reflejadas por el % de células GFP+), sin embargo, las LNP basadas en el Lípido 8 superaron a las LNP basadas en el Lípido 1 por un factor de 3 en términos de copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por valores MFI de GFP). Esto indica que el sustituyente β -etil octanoil N-acilo (del Lípido 8) mejora el acceso citosólico/liberación citosólica del ARNm de GFP encapsulado en relación con el sustituyente α -etil octanoil N-acilo (del Lípido 1). El efecto global de la sustitución β -etilo es mejores propiedades de distribución del tamaño de la LNP (en relación con el Lípido 1, como se ilustra en el Ejemplo 9) y una ganancia en la eficiencia de la administración del ARNm, lo que resulta en una mejora de 2 veces en los niveles de expresión del gen informador a pesar del patrón de sustitución N-acilo de 10 carbonos. Esto indica que tanto las propiedades de la LNP como la eficiencia de la administración son ajustables a través del tamaño (número de carbonos) y la geometría (β -etil octanoilo frente a α -etil octanoilo) del sustituyente N-acilo. El rendimiento de las LNP basadas en el Lípido 8 se conservó bien después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C), como lo ilustra la comparación del % de células GFP+ y los valores de MFI de GFP antes y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 14A y FIG. 14B). Las LNP basadas tanto en los Lípidos 1 como 8 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 14C).

EJEMPLO 27. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 8, 9, 10 Y LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-KC3-DMA) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 8, 9, 10 y las LNP de lípidos comparativos DLin-KC2-DMA. Las nanopartículas portadoras de

ARNm codificador de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab de α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. Como se muestra en las FIG. 15A y 15C, en todos los niveles de dosis, las LNP basadas en el Lípido 8 y 9 se comportaron de forma similar tanto en términos de fracción de células T GFP+ (reflejadas por el % de células GFP+) como de copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por valores MFI de GFP). Así, el sustituyente N-acilo de 14 carbonos derivado del ácido succínico (en el Lípido 9) da como resultado una eficiencia similar de acceso citosólico/liberación citosólica de la carga útil de ARNm en relación con el sustituyente N-acilo de 10 carbonos (del Lípido 8), lo que indica que la introducción de un éster de carboxilato (y polaridad añadida de los átomos O) en el sustituyente N-acilo equilibra y contrarresta la pérdida de eficiencia lipídica observada con los Lípidos 6 y 7 (que presentan ambos un sustituyente N-acilo de 11 carbonos). Como se ilustra en el Ejemplo 10, las LNP basadas en el Lípido 9 presentan propiedades de distribución de tamaño comparables a las de los Lípidos 6, 7 y 8, lo que sugiere que pueden introducirse enlaces éster biodegradables (como en el Lípido 9) en el sustituyente N-acilo sin pérdida de las propiedades de distribución de tamaño de las LNP. Las LNP basadas en el lípido 10 superaron a las LNP basadas en el Lípido 9 tanto en términos de fracción de células T GFP+ (reflejadas por el % de células GFP+) como en las copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por los valores MFI de GFP) por un factor de 1.5. Lo que sugiere que la reducción del recuento total de carbonos a 12 (en el Lípido 10) frente a 14 (en el Lípido 9) mejoró aún más la eficiencia del lípido. Así, de forma análoga a las tendencias observadas con las LNP basadas en los Lípidos 3, 5, 6, 7 y 8, la actividad de los sustituyentes N-acilo biodegradables derivados del ácido succínico en los Lípidos 9 y 10 también es ajustable. El rendimiento de las LNP basadas en el Lípido 10 se conservó bien después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C), como se ilustra por la comparación de los valores de % de células GFP+ y MFI de GFP antes y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 15A frente a FIG. 15B y FIG. 15C frente a FIG. 15D). Las LNP basadas en los Lípidos 9 y 10 fueron bien toleradas por células T humanas primarias (FIG. 15E y FIG. 15F).

EJEMPLO 28. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4, 9, 15 Y LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-KC2-DMA) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 4, 9, 15 y las LNP fabricadas usando el lípido comparativo DLin-KC2-DMA. Las nanopartículas portadoras de ARNm codificante de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio

de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. En todos los niveles de dosis, se observaron mejoras en el rendimiento (tanto en términos de fracción de células T GFP+ reflejadas por el % de células GFP+ como de copias de proteína GFP producidas por célula reflejadas por los valores MFI de GFP) entre el lípido 3 frente al lípido 4 y entre el lípido 9 frente al lípido 15, lo que indica que los grupos de cola de oleilo (en los Lípidos 4 y 15) dan lugar a un mejor rendimiento sobre los correspondientes grupos de cola de linoleilo (en los Lípidos 3 y 9). Así, las ganancias en la estabilidad oxidativa de los lípidos a través de una menor insaturación de la cola lipídica (con ácido oleico monoinsaturado) sin pérdida de eficiencia de la LNP se observan típicamente con la menor fluidez de la membrana lipídica. Además, en contraste con el Lípido 4, en el que se observaron propiedades de distribución del tamaño de las LNP más pobres (en relación con el Lípido 3), las LNP basadas en el Lípido 15 mostraron propiedades de distribución del tamaño similares a las observadas con las LNP basadas en el Lípido 9, lo que indica que el sustituyente N-acilo desempeña un papel más significativo en la determinación de las propiedades de distribución del tamaño de las LNP en comparación con el papel de los grupos de cola lipídica. Los niveles de rendimiento y el orden relativo de la eficiencia de las LNP se conservaron bien en todas las formulaciones ensayadas después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C), como se ilustra por la comparación de los valores del % de células GFP+ y MFI de GFP antes y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 16 A frente a FIG. 16B y FIG. 16C frente a FIG. 16D). Las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 9 y 15 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 16E).

EJEMPLO 29. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD8 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4, 9, 15 (TRX-2) Y LAS CORRESPONDIENTES LNP PARENTALES NO DIRIGIDAS (AMBAS ALMACENADAS A 4 °C).

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 4, 9, 15 y las correspondientes LNP parentales no dirigidas. Las nanopartículas portadoras de ARNm codificante de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (DiI-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab de α CD8, TRX2, a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD8 humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. Además, se ensayaron las LNP parentales (sin ningún conjugado Fab de direccionamiento incorporado en la corona de la LNP) para comprobar cualquier captación no específica en la población de células T CD8. Como se observa en las FIG. 17A y FIG. 17B, los Lípidos 9 y 15 dieron lugar a niveles similares de expresión de proteína GFP en la población de células T CD8 (tanto en términos de fracción de células T GFP+ como se refleja por el % de células GFP+ como en las copias de proteína GFP producidas por célula como se refleja en los valores de MFI de GFP). Las FIG. 17C y FIG.

17D, muestran el % de células T Dil+ (colorante) y la MFI de Dil que refleja los niveles relativos de LNP marcadas con colorante Dil captadas por la población de células T CD8. En particular, se observaron porcentajes similares de células T Dil+ en todas las formulaciones dirigidas, mientras que se observaron niveles de colorante similares a los de control (valores de MFI de Dil, FIG. 17 D) en las formulaciones parentales (no dirigidas), lo que confirma el papel del Fab dirigido por TRX2 en la asociación y captación por las células T CD8. Como era de esperar, no se observó expresión de la proteína GFP en las formulaciones de LNP parentales no dirigidas, lo que indica que la química lipídica no desempeñó un papel en este mecanismo de captación celular mediado por TRX2. Las LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en los Lípidos 3, 4, 9 y 15 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 17E), con una viabilidad celular que tendía a ser sensiblemente inferior en las formulaciones basadas en el Lípido 9 y Lípido 15, posiblemente debido a los niveles superiores de expresión de la proteína GFP observados con estos lípidos (como indican los valores superiores de MFI de GFP observados en la FIG. 17B).

EJEMPLO 30. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD8 (T8) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4, 9, 15 Y LAS CORRESPONDIENTES LNP PARENTALES NO DIRIGIDAS (AMBAS ALMACENADAS A 4 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 4, 9 y 15 y las correspondientes LNP parentales no dirigidas (ambas después de un ciclo de congelación-descongelación). Las nanopartículas portadoras de ARNm codificante de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab de α CD8, T8, a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD8 humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. Además, se ensayaron las LNP parentales (sin ningún conjugado Fab de direccionamiento incorporado en la corona de la LNP) para comprobar cualquier captación no específica en la población de células T CD8. Como se observa en las FIG. 18A y FIG. 18B, con esta estrategia de direccionamiento a α CD8 T8, las LNP basadas en el Lípido 15 superaron a las LNP basadas en el Lípido 9 con una expresión del gen informador observada 2 - 3 veces superior (tanto en términos de fracción de células T GFP+ como se refleja en el % de células GFP+ como en las copias de proteína GFP producidas por célula como se refleja en los valores de MFI de GFP). Las FIG. 18C y FIG. 18D, muestran el % de células T Dil+ (colorante) y la MFI de Dil que refleja los niveles relativos de LNP marcadas con colorante Dil captadas por la población de células T CD8. En particular, se observaron % similares de células T Dil+ en todas las formulaciones dirigidas, mientras que se observaron niveles de colorante similares a los de control (valores de MFI de Dil, FIG. 18 D) en las formulaciones parentales (no dirigidas), lo que confirma el papel del Fab con direccionamiento T8 en la asociación y captación por las células T CD8. Como era de esperar, no se observó expresión de la proteína GFP con las formulaciones de LNP parentales no dirigidas, lo que indica que la química lipídica

no desempeñó un papel en este mecanismo de captación celular mediado por T8. Las LNP dirigidas a α CD8 (T8) basadas en los Lípidos 3, 4, 9 y 15 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 18E) con una viabilidad celular que tendía a ser significativamente menor en las formulaciones basadas en el Lípido 9 y Lípido 15, posiblemente debido a los niveles más altos de expresión de la proteína GFP observados con estos lípidos (como indican los valores superiores de MFI de GFP observados en la FIG. 18B).

EJEMPLO 31. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LAS LNP DIRIGIDAS A α CD3 (HSP34) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 2, 3, 31 Y 32 Y EL LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-KC2-DMA) ALMACENADAS A 4 °C

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 2, 3, 31 y 32 con las LNP fabricadas usando el lípido comparativo Dlin-KC2-DMA. Las nanopartículas portadoras de ARNm codificador de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. En todos los niveles de dosis, las LNP basadas en el Lípido 2 y 3 superaron a las basadas en el Lípido 31, 32 y Dlin-KC2-DMA tanto en términos de fracción de células T GFP+ (reflejadas por el % de células GFP+) como de copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por los valores de MFI de GFP) (FIG. 19A y FIG. 19B). Esto es consistente con un mayor pKa aparente de las LNP basadas en el Lípido 31 y Lípido 32 en relación con las LNP basadas en el Lípido 2 y 3 y un cambio menos pronunciado en el estado de carga de la LNP en condiciones de pH endosomal ácido (como se describe en el Ejemplo 13) y, en consecuencia, menores niveles de acceso citosólico esperados con los Lípidos 31 y 32. Las LNP basadas en los Lípidos 2, 3, 31 y 32 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 19C).

EJEMPLO 32. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 33 Y 34 Y LÍPIDO COMPARATIVO (DLIN-KC2-DMA) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C) Y LNP DIRIGIDAS POR ANTICUERPOS SIN UNIÓN (OKT8 MUTADO)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 31, 32 y las LNP fabricadas usando el lípido comparativo Dlin-KC2-DMA. Las nanopartículas portadoras de ARNm codificador de GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigidas por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Además, se produjeron LNP con direccionamiento simulado mediante la incorporación de un conjugado

Fab de anticuerpo mutado sin unión (mut-OKT8) en las LNP parentales usando el método de inserción de conjugado de anticuerpo descrito en el Ejemplo 4. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3⁺ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. En todos los niveles de dosis, las LNP basadas en el Lípido 3 y 33 superaron a las basadas en el Lípido 34 y DLin-KC2-DMA tanto en términos de fracción de células T GFP⁺ (reflejadas por el % de células GFP⁺) como de copias de la proteína GFP producidas por célula (reflejadas por los valores de MFI de GFP). Además, las LNP funcionales mut-OKT8 basadas en el Lípido 33 y Lípido 34 no dieron lugar a ninguna expresión proteica, lo que confirma el papel del anticuerpo de α CD3 (hSP34) en el mecanismo de captación celular observado con estas formulaciones lipídicas. Los niveles de rendimiento y el orden relativo de la eficiencia de las LNP se conservaron bien en todas las formulaciones ensayadas después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C) como se ilustra por la comparación de los valores de % de células GFP⁺ y MFI de GFP antes y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 20A frente a FIG. 20B y FIG. 20C frente a FIG. 20D). Las LNP basadas en los Lípidos 3, 33 y 34 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 20E).

EJEMPLO 33. EXPRESIÓN IN VITRO DE LA PROTEÍNA CAR (DOMINIO EXTRACELULAR MARCADO M1) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DE CAR-ARN DIRIGIDAS A α CD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4, 9 Y 34, ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína CAR α CD20 (TTR-023) resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 4, 9 y 33. Las nanopartículas portadoras de un ARNm que codifica CAR α CD20 (TTR-023) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab de α CD3 (hSP34) a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3⁺ humanas primarias para evaluar la expresión de CAR mediante la detección de una etiqueta M1 en el dominio extracelular de la proteína CAR transmembrana TTR-023. En todos los niveles de dosis ensayados, se detectaron mayores niveles de CAR con los lípidos 3 y 4 en relación con los lípidos 9 y 33, siendo el Lípido 4 el que mejor funcionó en esta vía de direccionamiento a α CD3. Los niveles relativos de expresión de CAR son consistentes con el grupo de cola de oleoil de los Lípidos 3 y 4, que da lugar a un mejor rendimiento sobre el correspondiente grupo de cola de linoleoil de los Lípidos 9 y 33, observado con la expresión del gen informador (GFP) en los Ejemplos 28, 29 y 30. Además, esto ilustra que este orden relativo de eficiencia lipídica se conserva entre un gen informador (GFP) y una carga terapéutica (proteína CAR TTR-023) en este mecanismo de direccionamiento y captación celular mediado por α CD3. Los niveles de rendimiento y el orden relativo de la eficiencia de las LNP se conservaron bien en las LNP basadas en el Lípido 3, 4 y 9 después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C). Por el contrario, se detectó un descenso en la expresión de CAR en todas las dosis de LNP basadas en el Lípido 33, como ilustra la comparación de los valores de % de células M1⁺ y MFI de M1 antes

(almacenamiento a 4 °C) y después del almacenamiento a -80 °C (FIG. 21A frente a FIG. 21B y FIG. 21C frente a FIG. 21D). Las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 9 y 33 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 21E y FIG. 21F).

EJEMPLO 34. EXPRESIÓN IN VITRO DE LA PROTEÍNA CAR (DOMINIO EXTRACELULAR MARCADO M1) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LAS LNP DE ARN DE CAR α CD20 DIRIGIDAS A α CD8 (T8) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4, 9 Y 34 ALMACENADAS A 4 °C

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína CAR α CD20 (TTR-023) resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 4, 9 y 33. Las nanopartículas portadoras de un ARNm que codifica CAR α CD20 (TTR-023) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab de α CD8 (T8) a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión de CAR mediante la detección de una etiqueta M1 en el dominio extracelular de la proteína CAR transmembrana TTR-023. Las células transfectadas se agruparon como CD4+ (población CD4) y CD4- (población CD8) y se monitorizó la expresión de CAR (como % de M1+ y MFI de M1) en las dos poblaciones para evaluar la especificidad en la población CD8 con la estrategia de direccionamiento a α CD8 (T8). En todos los niveles de dosis ensayados, se detectaron niveles más altos de CAR en la población CD4- (células CD8, como ilustran los valores de % de M1 y MFI de M1 en las FIG. 22A y FIG. 22B) con los lípidos 4 y 9 en relación con los lípidos 3 y 33, con los Lípidos 4 y 9 funcionando igual de bien en esta vía de direccionamiento de CD8. Se detectaron niveles de CAR similares al control de tampón (PBS) en la población CD4+ (células CD4, como ilustran los valores % de M1 y MFI de M1 en las FIG. 22C y FIG. 22D) confirmando que un anticuerpo T8 permite la captación mediada por receptor específicamente en células T CD8. Las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 9 y 33 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 22E).

EJEMPLO 35. EXPRESIÓN IN VITRO DE LA PROTEÍNA CAR (DOMINIO EXTRACELULAR MARCADO M1) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LAS LNP DE ARN DE CAR α CD20 DIRIGIDAS A α CD8 (T8) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 3, 4, 9 Y 34 DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C).

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína CAR α CD20 (TTR-023) resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 3, 4, 9 y 33 después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C). Las nanopartículas portadoras de un ARNm que codifica CAR α CD20 (TTR-023) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab de α CD8 (T8) a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se sometieron a 1 ciclo de congelación-descongelación y después se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión de CAR mediante la detección de una etiqueta M1 en el dominio extracelular de la proteína CAR transmembrana TTR-023.

Las células T transfectadas se clasificaron como CD4+ (población CD4) y CD4- (población CD8) y se monitorizó la expresión de CAR (como % de M1+ y MFI de M1) en las dos poblaciones para evaluar la especificidad en la población CD8 con la estrategia de direccionamiento a α CD8 (T8). En todos los niveles de dosis ensayados, se detectaron niveles más altos de CAR en la población CD4- (células CD8, como ilustran los valores de % de M1+ y MFI de M1 en las FIG. 23A y FIG. 23B) con los lípidos 4 y 9 en relación con los lípidos 3 y 33, mientras que los Lípidos 4 y 9 funcionaron igual de bien en esta vía de direccionamiento a CD8. Se detectaron niveles de CAR similares al control de tampón (PBS) en la población CD4+ (células CD4, como ilustran los valores de % de M1+ y MFI de M1 en las FIG. 23C y FIG. 23D) confirmando que un anticuerpo T8 permite la captación mediada por receptor específicamente en células T CD8. Tanto los niveles de expresión de CAR como la especificidad para las células T CD8 se observaron con partículas que se habían sometido a 1 ciclo de congelación-descongelación, lo que confirma que se preservaron la integridad y la función de las formulaciones. Las LNP basadas en los Lípidos 3, 4, 9 y 33 fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 23E).

EJEMPLO 36. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GFP Y ASOCIACIÓN DE LNP (MEDIDA COMO FLUORESCENCIA DEL COLORANTE DII) EN CÉLULAS T CD8 Y CD4 CON LNP DIRIGIDAS A α CD3 (HSP34) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 9, 15, DLIN-KC3-DMA EN SANGRE COMPLETA HUMANA.

Las LNP de ARNm de GFP dirigidas a α CD3 y α CD8 (y un anticuerpo sin unión, mutOKT8, como control negativo) basadas en el lípido 9, 15 y DLin-KC3-DMA se dosificaron a sangre completa venosa humana, se incubaron durante 24 horas y se analizaron usando el protocolo descrito en el Ejemplo 21 para transfecciones de sangre completa. Como se observa en las FIG. 24A, FIG. 24B, FIG. 24C y FIG. 24D, las LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) dieron lugar a la expresión de GFP en células T tanto CD4 como CD8, mientras que las LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) dieron lugar a la expresión de GFP selectiva solo en células T CD8, como era de esperar. Además, la LNP de control sin unión (mutOKT8) no produjo expresión de GFP en ninguno de los dos tipos celulares. Las LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en el Lípido 9 y 15 mostraron niveles similares de expresión de GFP, lo que indica que los dos lípidos son igualmente eficientes en esta vía de captación celular. Sin embargo, en la vía de unión a CD8 y captación, las LNP basadas en el Lípido 15 dirigidas a α CD8 (TRX2) superaron a las LNP basadas en el Lípido 9 correspondientes transfectando tanto una mayor fracción de células T CD8 (expresada como % de células GFP+) como más copias de proteína GFP por célula (expresada como MFI de GFP). Como se observa en las FIG. 24E, FIG. 24F, FIG. 24G y FIG. 24H, las LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) se unieron a células T tanto CD4 como CD8, mientras que las LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) se unieron selectivamente solo a células T CD8 (medido como % de colorante DiI e MFI en las dos poblaciones celulares). Además, las LNP de control sin unión (mutOKT8) no produjeron una unión significativa a ninguno de los dos tipos de células T, como era de esperar. Las LNP basadas en el Lípido 9 y 15 se unieron a fracciones similares de células T CD4 y CD8, como indica el % similar de células DiI+ en ambas poblaciones. Sin embargo, se observó una unión ligeramente superior con las LNP basadas en el

Lípido 15 en la de unión a CD8 y la vía de captación en relación con las LNP basadas en el Lípido 9, como indica la mayor intensidad de fluorescencia del colorante (valores MFI de DiI) por célula.

EJEMPLO 37. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GFP EN CÉLULAS NK, GRANULOCITOS Y CÉLULAS B, CON LNP DIRIGIDAS A α CD3 (HSP34) BASADAS EN EL LÍPIDO 9, 15, DLIN-KC3-DMA EN SANGRE COMPLETA HUMANA

Las muestras de sangre completa transfectadas con LNP de ARNm de GFP dirigidas a α CD3 y α CD8 (y un anticuerpo sin unión, mutOKT8, como control negativo) basadas en el Lípido 9, 15 y DLin-KC3-DMA (del Ejemplo 38) también se analizaron para la determinar la expresión de GFP en células NK, granulocitos y células B usando el protocolo descrito en el Ejemplo 21 para transfecciones de sangre completa. Como se observa en las FIG. 25A y FIG. 25B, tanto las LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) como las LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) dieron lugar a expresión de GFP en células NK como se esperaba. Además, no se observó expresión de GFP en las células NK con la LNP de control sin unión (mutOKT8). Las LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) basadas en el Lípido 9 y 15 mostraron niveles similares de expresión de GFP en las células NK, lo que indica que los dos lípidos son igualmente eficientes en esta vía de captación celular. Sin embargo, en la vía de unión a CD8 y captación, las LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) basadas en el Lípido 15 superaron a las LNP basadas en el Lípido 9 correspondientes transfectando tanto una mayor fracción de células NK (expresada como % de células GFP+) como más copias de proteína GFP por célula (expresada como MFI de GFP). Como se observa en las FIG. 25C, FIG. 25D, FIG. 25E y FIG. 25F, ninguna de las modalidades de direccionamiento dio lugar a ninguna expresión significativa de GFP en granulocitos y células B.

EJEMPLO 38. ASOCIACIÓN DE LNP (MEDIDA COMO FLUORESCENCIA DEL COLORANTE DI) EN CÉLULAS NK, GRANULOCITOS Y CÉLULAS B CON LNP DIRIGIDAS A α CD3 (HSP34) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 9, 15, DLIN-KC3-DMA EN SANGRE COMPLETA HUMANA

Las muestras de sangre completa transfectadas con LNP de ARNm de GFP dirigidas a α CD3 y α CD8 (y un anticuerpo sin unión, mutOKT8, como control negativo) basadas en el Lípido 9, 15 y DLin-KC3-DMA (del Ejemplo 36) también se analizaron para determinar la unión a células NK, granulocitos y células B usando el protocolo descrito en el Ejemplo 23 para transfecciones de sangre completa. Como se observa en las FIG. 26A y FIG. 26B, tanto las LNP dirigidas a α CD3 (hSP34) como las LNP dirigidas a α CD8 (TRX2) se unieron a las células NK como era de esperar. Además, la LNP de control sin unión (mutOKT8) no produjo ninguna unión significativa a las células NK, como era de esperar. Como se observa en las FIG. 26C, FIG. 26D, FIG. 26E y FIG. 26F, ambas modalidades de direccionamiento produjeron una unión no específica a granulocitos y células B; sin embargo, como se informó en el Ejemplo 39 anterior, no se observó expresión de GFP, lo que indica que el ARN no se administró al citosol de ninguno de los dos tipos de células.

EJEMPLO 39. EXPRESIÓN IN VITRO DE CAR(TTR-023) Y MCHERRY EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS TRANSFECTADAS CON LNP BASADAS EN EL LÍPIDO 9 Y DLIN-KC3-DMA DIRIGIDAS A α CD8 (TRX2)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína informadora (mCherry) y de la proteína CAR α CD20 (TTR-023) resultante de las LNP derivadas del Lípido 9 con el lípido comparativo Dlin-KC3-DMA. Las nanopartículas portadoras de ARNm de mCherry o de un ARNm que codifica CAR α CD20 (TTR-023) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Se incorporó un conjugado Fab α CD8 (TRX2) a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión de proteínas (mCherry o CAR) mediante fluorescencia de mCherry o detección de una etiqueta M1 en el dominio extracelular de la proteína CAR transmembrana TTR-023, respectivamente. Las células transfectadas se clasificaron como CD4+ (población CD4) y CD4- (población CD8) y los niveles de expresión proteica se monitorizaron (como % de M1+ y MFI de M1 para la expresión CAR o fluorescencia de la proteína informadora para la expresión mCherry) en las dos poblaciones se usaron para evaluar la especificidad en la población CD8 con esta estrategia de direccionamiento a α CD8 (TRX2). La expresión de la proteína se observó selectivamente en la población CD4- (células CD8, como ilustran los valores de % de M1 y MFI de M1 en las FIG. 27B y FIG. 27C frente a F y G o los valores de % de mCherry y MFI de mCherry en las FIG. 27D y FIG. 27E frente a las FIG. 27G y FIG. 27H) tanto con las formulaciones de lípido 9 como con el lípido comparativo Dlin-KC3-DMA, lo que confirma que el anticuerpo TRX2 permite la captación mediada por receptor específicamente en células T CD8. Las LNP basadas en el Lípido 9 superaron a las LNP basadas en Dlin-KC3-DMA en los niveles de expresión de CAR, mientras que las LNP basadas en Dlin-KC3-DMA superaron a las LNP basadas en el Lípido 9 en los niveles de expresión de mCherry, lo que sugiere que pueden ser necesarias diferentes composiciones óptimas de lípidos para la expresión de proteínas intracelulares frente a proteínas unidas a la membrana. Ambas formulaciones lipídicas dirigidas por TRX2 con cargas útiles CAR o mCherry fueron bien toleradas por las células T humanas primarias en el nivel de dosis de 1 μ g/mL por 500.000 células T (FIG. 27A).

EJEMPLO 40. FUNCIÓN IN VITRO DE CÉLULAS CAR-T MEDIANTE COCULTIVO DE RAJI (CÉLULAS B) CON CÉLULAS T QUE EXPRESAN CAR α CD20 (TTR-023) DERIVADAS POR TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS (DEL EJEMPLO 27) CON LNP DIRIGIDAS A α CD8 (TRX2) BASADAS EN EL LÍPIDO 9 Y DLIN-KC3-DMA QUE PORTAN ARNM DE CAR O ARNM DE MCHERRY (COMO CONTROL NEGATIVO).

Las células CAR-T producidas en el Ejemplo 39 se cocultivaron con Raji (células B) en relaciones efector:diana (E:T) (células T:células B) de 1:1, 4:1, y 8:1 durante un periodo de 24 horas y se midió la fracción de células B y células T vivas usando el protocolo descrito en el Ejemplo 20. Como se observa en la FIG. 28A, la fracción de células B muertas aumentó en relaciones E:T más altas de forma dependiente de la dosis. Además, las células T que expresan la proteína CAR TTR-023 mostraron una

citotoxicidad significativamente mayor hacia las células B en relación con las células T transfectadas con mCherry, como indica un % 4 veces mayor de células Raji muertas en las tres relaciones E:T ensayadas. Esto sugiere que el acoplamiento de CAR al receptor CD20 de la célula diana y la vía apoptótica de la granzima perforina específica de la diana aguas abajo desempeña un papel importante en la actividad de las células T observada, mientras que la activación de las células T (posiblemente como resultado del acoplamiento del receptor CD8 por el anticuerpo TRX2) por encima de los niveles de fondo de la citotoxicidad de las células T hacia las células B es un contribuyente menor en la actividad global de las células CAR-T observada aquí. Tanto las formulaciones de LNP basadas en el Lípido 9 como las basadas en DLin-KC3-DMA fueron igualmente citotóxicas hacia las células B y ambas formulaciones fueron bien toleradas por las células T CD4 y CD8 en el experimento de cocultivo con los valores de viabilidad de las células T que permanecieron ligeramente por debajo (células CD4) o ligeramente por encima (células T CD4-, CD8) de los controles no transfectados como se observa en las FIG. 28B y FIG. 28C, respectivamente.

EJEMPLO 41. EXPRESIÓN IN VITRO DE CAR(TTR-023) Y MCHERRY EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS TRANSFECTADAS CON LNP DIRIGIDAS A α CD8 (TRX2) BASADAS EN EL LÍPIDO 15 Y DLIN-KC3-DMA

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína informadora (mCherry) y de la proteína CAR α CD20 (TTR-023) resultante de las LNP derivadas del Lípido 15 con el lípido comparativo DLin-KC3-DMA. Las nanopartículas portadoras de ARNm de mCherry o de un ARNm que codifica CAR α CD20 (TTR-023) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en los Ejemplos 2 y 6. Se incorporó un conjugado Fab de α CD8 (TRX2) a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión de proteínas (mCherry o CAR) mediante fluorescencia de mCherry o detección de una etiqueta M1 en el dominio extracelular de la proteína CAR transmembrana TTR-023, respectivamente. Las células transfectadas se clasificaron como CD4+ (población CD4) y CD4- (población CD8) y se monitorizaron los niveles de expresión de la proteína (como % de M1+ y MFI de M1 para la expresión de CAR o fluorescencia de la proteína informadora para la expresión de mCherry) en las dos poblaciones. Las LNP basadas en el Lípido 15 superaron a las LNP basadas en DLin-KC3-DMA en los niveles de expresión de CAR (FIG. 29B y FIG. 29C), mientras que las LNP basadas en DLin-KC3-DMA superaron a las LNP basadas en el Lípido 15 en los niveles de expresión de mCherry (FIG. 29D y FIG. 29E), lo que sugiere que pueden requerirse diferentes composiciones óptimas de lípidos para la expresión de proteínas intracelulares frente a proteínas unidas a membrana. Ambas formulaciones lipídicas dirigidas por TRX2 con cargas útiles de CAR o mCherry fueron bien toleradas por las células T humanas primarias (FIG. 29A).

EJEMPLO 42. FUNCIÓN IN VITRO DE CÉLULAS CAR-T MEDIANTE COCULTIVO DE RAJI (CÉLULAS B) CON CÉLULAS T QUE EXPRESAN CAR α CD20 (TTR-023) DERIVADAS POR

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS (DEL EJEMPLO 29) CON LNP DIRIGIDAS A α CD8 (TRX2) BASADAS EN EL LÍPIDO 15 Y DLIN-KC3-DMA QUE PORTAN ARNM DE CAR O ARNM DE MCHERRY (COMO CONTROL NEGATIVO), BITE (COMO CONTROL POSITIVO)

Las células CAR-T producidas en el Ejemplo 40 se cocultivaron con Raji (células B) en relaciones efector:diana (E:T) (célula T:célula B) de 0.31:1, 1:1, 3.16:1, 10:1 y 31.6:1 durante un periodo de 24 horas y se midió la fracción de células B y células T vivas usando el protocolo descrito en el Ejemplo 20. Como se observa en la FIG. 30A, la fracción de células B muertas aumentó a mayores relaciones E:T de forma dependiente de la dosis hasta una E:T de 3.16:1 y se estabilizó a relaciones E:T que indicaban una fuerte actividad citotóxica a una E:T de 3.16:1. Además, las células T que expresaban la proteína CAR TTR-023 mostraron una citotoxicidad significativamente mayor hacia las células B en relación con las células T transfectadas con mCherry, como indica un % 4 veces mayor de células Raji muertas para relaciones E:T de 3.16 e inferiores. Esto sugiere que la unión de CAR al receptor CD20 de la célula diana y la vía apoptótica de la granzima perforina específica de la diana aguas abajo desempeña un papel importante en la actividad de las células T observada, mientras que la activación de las células T (posiblemente como resultado de la unión al receptor CD8 del anticuerpo TRX2) por encima de los niveles de fondo de la citotoxicidad de las células T hacia las células B es un contribuyente menor en la actividad global de las células CAR-T observada. Tanto las formulaciones de LNP basadas en el Lípido 15 como basadas en DLin-KC3-DMA fueron igualmente citotóxicas hacia las células B mostrando una actividad similar al control positivo de unión a células B biespecífico (BiTE, anticuerpo biespecífico) como se observa en la FIG. 30A. Tanto las formulaciones basadas en el Lípido 15 como en DLin-KC3-DMA se toleraron bien hasta una relación E:T de 3.16:1 con valores de viabilidad de células T inferiores observados en la población de células T CD8 en las relaciones E:T superiores de 10:1 y 31.6:1 como se observa en la FIG. 30B y FIG. 30C, respectivamente.

EJEMPLO 43. EXPRESIÓN IN VITRO DE PROTEÍNAS (GFP) Y ASOCIACIÓN DE LNP (MEDIDA COMO FLUORESCENCIA DEL COLORANTE DII) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LNP DIRIGIDAS A ACD3 BASADAS EN LOS LÍPIDOS 15, 9, 10 Y 13 Y COMPARATIVO (DLIN-KC3-DMA) ALMACENADAS A 4 °C Y DESPUÉS DE 1 CICLO DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN (ALMACENAMIENTO POSTERIOR A -80 °C)

En este ejemplo se compara la expresión de la proteína GFP resultante de las LNP derivadas de los Lípidos 15, 9, 10 y las LNP del lípido comparativo DLin-KC2-DMA. Las nanopartículas que portan ARNm que codifica GFP (y opcionalmente una etiqueta de colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en los Ejemplos 2 y 6. Se incorporó un conjugado Fab α CD3 a las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron in vitro en células T CD3+ humanas primarias para evaluar la expresión del gen informador. Como se muestra en las FIG. 32A y FIG. 32B, en todos los niveles de dosis, las LNP basadas en el Lípido 15 y 10 tuvieron un rendimiento similar tanto en términos de fracción de células T GFP+

(reflejadas por el % de células GFP+) como de copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por valores de MFI de GFP) y significativamente mejor en relación con las LNP basadas en el Lípido 9 con respecto a las copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por valores de MFI de GFP) particularmente en los niveles de dosis más bajos. Por lo tanto, las mejoras sobre el rendimiento del lípido 9 podrían lograrse mediante la modificación del sustituyente O-acilo (del linoleoilo del Lípido 9 a oleoilo del Lípido 15) o mediante la modificación del sustituyente N-acilo (del sustituyente N-acilo de 14 carbonos derivado del ácido succínico del Lípido 9 al sustituyente N-acilo de 12 carbonos derivado del ácido succínico del Lípido 10). Además, como se observa en las FIG. 32C y D, las LNP basadas en el Lípido 9 y Lípido 13 mostraron niveles similares de asociación celular (tanto en términos de fracción de células Dil+ como en términos de copias de LNP asociadas a células reflejadas por los valores de MFI de Dil mostrados en las FIG. 32C y FIG. 32D) en todos los niveles de dosis, sin embargo, el Lípido 9 superó a las LNP basadas en el Lípido 13 en términos de expresión de proteínas tanto en términos de fracción de células T GFP+ (reflejadas por el % de células GFP+) como de copias de proteína GFP producidas por célula (reflejadas por valores de MFI de GFP), lo que sugiere una capacidad de escape endosomal inferior de las LNP basadas en el Lípido 13 en relación con las LNP basadas en el Lípido 9. El rendimiento de las LNP basadas en los Lípidos 10 y 13 se conservó bien después de 1 ciclo de congelación-descongelación (almacenamiento posterior a -80 °C), como lo ilustra la comparación de los valores de % de células GFP+ y MFI de GFP antes (almacenamiento a 4 °C) y después del almacenamiento a -80 °C, como se observa en las FIG. 32A y FIG. 32B.

EJEMPLO 44. REPROGRAMACIÓN IN VIVO DE CÉLULAS T USANDO LA PROTEÍNA INFORMADORA GFP Y LNPS DIRIGIDAS A A-CD8 (TRX-2) BASADAS EN LOS LÍPIDOS 9, 15 Y EL LÍPIDO COMPARATIVO DLIN-KC3-DMA (Y FORMULADAS CON 1.5 % EN MOLES DE DPG-PEG) EN RATONES NSG INJERTADOS CON CÉLULAS T HUMANAS

Los ratones NSG se dosificaron usando los protocolos descritos en el Ejemplo 22. Se extrajeron muestras de plasma inmediatamente antes de sacrificar a los animales y se recogieron muestras de bazo e hígado para su análisis 24 horas después de la inyección, siguiendo el diseño del estudio que se muestra en la Tabla 25.

TABLA 25. Diseño del estudio de reprogramación de células T con GFP en ratones NSG

Grupos	No. de Ratones	Formulación Dosificada	Carga Útil	Anticuerpo de Direccionamiento
1	2	Control de Tampón	NA	NA
2	4	Lípido 15; 1.5 % DPG-PEG; marcado con colorante Dil	GFP-ARNm	TRX-2
3	4	DLin-KC3-DMA; 1.5 % DPG-PEG; No se usa marcaje con colorante	GFP-ARNm	TRX-2
4	3	Lípido 9; 1.5 % DPG-PEG;	GFP-ARNm	TRX-2

		marcado con colorante Dil		
--	--	---------------------------	--	--

Las células T CD4 y CD8 se tiñeron y clasificaron (por FACS) en muestras de sangre, bazo e hígado, las muestras de hígado se tiñeron y clasificaron además para hepatocitos, células endoteliales, células de Kupffer, macrófagos de ratón y células mieloides de ratón usando el Panel de Flujo descrito en la Tabla 26 y la Tabla 27. La fluorescencia de la GFP y la fluorescencia del colorante Dil se usaron para cuantificar la expresión de la proteína GFP (expresada como % de Células GFP+ e Intensidad Media de Fluorescencia (IFM) de las Células GFP+) y la asociación de la LNP (a través de la fluorescencia de la etiqueta Dil, expresada como % de células Dil+ y MFI de Dil de las Células Dil+) en los tipos celulares de interés indicados.

Tabla 26. Marcadores Celulares (Muerta-Viva, LNP, Proteína, HuCD45, huCD3, huCD4) y Fluoróforos usados

Marcadores	Tinción muerta viva	LNP (colorante Dil)	GFP Proteína	huCD45	huCD3	huCD4
Fluoróforo	e-flour780	APC	Fluorescencia Verde	BUV395	BUV805	BV711

Tabla 27. Marcadores celulares (Muerta-Viva, huCD8, muCD45, hu/muCD11b, muCD31, F4/80) y Fluoróforos usados

Marcadores	Tinción muerta viva	huCD8	muCD45	Hu/muCD11b+	muCD31	F4/80
Fluoróforo	e-flour780	BV421	BB700	BV785	BUV737	PE Dazzle

Como se observa en las FIG. 33A, 33B y 33C, se detectaron 7 - 25 % de células GFP+ en la población de células T CD8 en muestras de sangre, bazo e hígado, mientras que < 3 % de las células T CD4+ eran GFP+, lo que confirma la reprogramación diferencial in vivo de la población de células T CD8+ y el direccionamiento de la LNP usando el anticuerpo TRX-2 de α CD8. Como se observa en las FIG. 34A, 34B y 34C, la asociación de la LNP fue específica para la población de células T CD8 en las muestras de sangre y bazo, sin embargo, en las muestras de hígado se observaron niveles significativos de asociación a la población CD4, así como a células endoteliales, células de Kupffer y macrófagos de ratón. En particular, a pesar de la asociación inespecífica de LNP, no se detectó proteína GFP (FIG. 33C), lo que indica que la asociación de LNP fuera de diana no da lugar a la administración de ARNm y expresión de proteína fuera de diana.

EJEMPLO 45. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IN VITRO (GFP) Y ASOCIACIÓN DE LNP (MEDIDA COMO FLUORESCENCIA DEL COLORANTE DII) EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE FAB DIRIGIDOS A ACD2, ACD4, ACD7, CD28, TCR, Y SIN UNIÓN (OKT8 MUTADO) Y TITULACIÓN DE ARNM DE NANOCUERPOS JUNTO CON LNP DIRIGIDAS POR ANTICUERPOS CONTRA ACD8 (TRX2 Y 15C01) Y ACD3(HSP34) EN COMPARACIÓN CON LOS LÍPIDOS 15 Y DLIN-KC3-DMA

Este ejemplo compara la expresión de la proteína GFP resultante de LNP derivadas de los Lípidos 15, y LNP del lípido Dlin-KC3-DMA con aCD2, aCD4, aCD7, aCD28, TCR, y sin unión (OKT8 mutado) en comparación con la diana aCD8 y aCD3.

Se produjeron nanopartículas que portaban ARNm que codificaba GFP y un marcador colorante fluorescente (Dil-C18-5DS) usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Los conjugados Fab-lípido se generaron a partir de los métodos descritos en el Ejemplo 4 mientras la generación de Nb-conjugado difirió en el uso de 1:1:4 Nb:DSPE-3,4K PEG-maleimida:DSPE-2K PEG-OCH₃ y una membrana UF de 50 kD para la separación del Nb-conjugado del Nb libre. El Fab-conjugado y Nb-conjugado se incorporaron en LNP parentales sobre la base de la densidad óptima de Fab y Nb (Tabla 28) para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron in vitro en células T CD3⁺ humanas primarias para valorar la expresión génica reportada a aproximadamente 2.5 ug/mL, 0.5 ug/mL, y 0.1 ug/mL de ARNm durante aproximadamente 24 horas. Los niveles de transfección de las células tanto CD8 como CD4 se midieron por citometría de flujo.

Tabla 28. Condiciones de la Inserción de Anticuerpos

ID de la Muestra	Diana	Clon	Densidad de Inserción del Conjugado (g de Ab/mol de lípido)	Lípido Ionizable	Condición de la Inserción
221101EYS-1-1	aCD2	Fab 9.6 NoDS	3	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-4	aCD2	Fab TS2/18.1 NoDS	3	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-7	TCR	Nb T017000700	2.7	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-10	aCD4	Fab Ibalizumab NoDS	18.4	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-13	aCD4	Fab hBF5 bDS	1.5	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-16	aCD4	Nb T023200008	0.93	Lípido 15	37 °C durante 4

5

10

15

20

25

30

35

					horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-19	aCD7	Nb V1	2.8	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-22	aCD28	Fab Hz511.A1 bDS	1.5	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-25	aCD28	Nb 28CD065G01	0.9	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-28	aCD8	Nb T0347015C01	2	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-31	aCD8	Nb A044300805_V8	5.5	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-34	aCD3	Fab hSP34 NoDS	9	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-37	aCD8	Fab TRX2 bDS	9	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-1-40	Control Negativo	Fab mutOKT8 NoDS	9	Lípido 15	37 °C durante 4 horas en MBS pH 6.5
221101EYS-2-1	aCD2	Fab 9.6 NoDS	3	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-4	aCD2	Fab TS2/18.1 NoDS	3	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-7	TCR	Nb T017000700	2.7	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-10	aCD4	Fab Ibalizumab	18.4	DLIN-KC3-	60 °C durante 1

		NoDS		DMA	hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-13	aCD4	Fab hBF5 bDS	1.5	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-16	aCD4	Nb T023200008	0.93	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-19	aCD7	Nb V1	2.8	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-22	aCD28	Fab Hz511.A1 bDS	1.5	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-25	aCD28	Nb 28CD065G01	0.9	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-28	aCD8	Nb T0347015C01	2	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-31	aCD8	Nb A044300805_V8	5.5	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-34	aCD3	Fab hSP34 NoDS	9	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-37	aCD8	Fab TRX2 bDS	9	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4
221101EYS-2-40	Control Negativo	Fab mutOKT8 NoDS	9	DLIN-KC3-DMA	60 °C durante 1 hora en HBS pH 7.4

Todos los clones evaluados mediaron algún nivel de transfección y los niveles de expresión de GFP en relación con el control de LNP mutOKT8 para el direccionamiento tanto al subconjunto de células T CD8 como CD4 T simultáneamente con la comparación de LNP del Lípido 15 (FIG. 35A, 35B, 35E, 35F) y DLIN-KC3-DMA (FIG. 35C, 35D, 35G, y 35H). dirigidas a aCD3, aCD7, y TCR dio lugar a la expresión de GFP tanto en células T CD4 como CD8 mientras que las LNP dirigidas a aCD8 y aCD4

dieron lugar a la expresión de GFP selectiva solo en sus correspondientes subconjuntos, como se esperaba. Además, La LNP control sin unión (mutOKT8) dio lugar a ausencia de expresión de GFP en ninguno de los tipos celulares independientemente del Lípido. A todos los niveles de dosis, Las LNP de Lípido 15 y DLin-KC3-DMAaCD2, dirigidas a aCD4, aCD7, aCD28, y TCR mostraron niveles similares de expresión de GFP lo que indica que los dos lípidos son igualmente eficientes en esta ruta de captación celular no solo con LNP dirigidas a aCD3 y aCD8. Ambos Fab dirigidos a aCD2 mostraron niveles menores de la población de transfección de células T CD8 y CD4 (ambos en términos de fracción de células T GFP+ como se refleja por el % de células GFP+ y las copias de proteína GFP producidas por célula como se refleja por los valores de MFI de GFP) y la asociación de LNP medida como % de células T Dil+ (colorante) y el MFI de Dil que refleja los niveles relativos de LNP marcadas con el colorante Dil captadas por la población de células T CD8 y CD4 en comparación con Fab y nanocuerpos de aCD3 o aCD8 en ambas LNP de Lípido 15 y DLin-KC3-DMA (FIG. 36A, 36B, 36C, 36D, 36E, 36F, 36G, y 36H). Entre los Fab y nanocuerpo dirigidos a CD4, Ibalizumab medió un mayor % de transfección y niveles de expresión de GFP en las células CD4+, sin embargo, fue menor que los Fab hSP34 de aCD3 en ambas LNP de Lípido 15 y DLin-LC3-DMA. Para el direccionamiento a ambos subconjuntos de células T, CD8 y CD4, simultáneamente, el clon aCD7 y anti-TCR mostraron mayor transfección y asociación de LNP entre ambos subconjuntos celulares a una dosis mayor de ARNm que la de las LNP de mutOKT8 con inserción posterior del Lípido 15 y DLin-KC3-DMA. Sin embargo, ambos fueron menores que Fab hSP34 aCD3. El Fab y Nanocuerpo con direccionamiento a aCD28 mostraron niveles de transfección y expresión de GFP en las células T CD8 y CD4 solo ligeramente mayores que los de partículas con inserción posterior de mutOKT8 tanto en LNP de Lípido 15 como DLin-KC3-DMA.

Estos datos indican que a lo largo de diferentes Fab o Nanocuerpos con direccionamiento como a aCD2, aCD4, aCD7, aCD28 y TCR, las LNP tanto del Lípido 15 como de DLin-KC3-DMA son igualmente eficientes y muestran un efecto muy relativo en la transfección.

EJEMPLO 46. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS LNP DE LOS LÍPIDOS 10, 15, 16, 24A, Y 26 Y LÍPIDO COMPARATIVO ALC-0315

Las LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315 que encapsulaban ARNm de GFP (TriLink Biotechnologies Inc.) se prepararon y caracterizaron usando los métodos descritos en los Ejemplos 5 a 8. El tamaño medido de la LNP, PDI, carga y valores de contenido de ARN de las LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315 se resumen en la Tabla 29, Tabla 30, Tabla 31, y FIG. 37A a 37D. Como se observa en la FIG. 37A, todos los lípidos dieron lugar a tamaños de LNP <100 nm en tampón MES pH 6.5. Las LNP del Lípido 10 y ALC-0315 presentaron un notable aumento de tamaño después de congelación-descongelación (con sacarosa al 10 % en tampón MES pH 6.5), sin embargo, las LNP de los Lípidos 15, 16, 24A, y 26 presentaron mejor estabilidad después de congelación-descongelación con un impacto mínimo en el diámetro de las partículas. Se observó un ligero aumento en el diámetro de las LNP después de la inserción del anticuerpo de direccionamiento (en MES pH 6.5 usando una incubación a 37 °C durante 4 horas) para los Lípidos 15, 16, 24A, y 26, mientras que se observó un mayor aumento en el diámetro para las LNP del Lípido 10 y ALC-0315, y se observó una

tendencia similar de estabilidad después de la congelación-descongelación para las LNP dirigidas. Todas las LNP presentaron una eficiencia de encapsulación de moderada a alta (<15 % de ARN accesible al colorante) excepto las LNP de ALC-0315 en las que se observó mayor ARN accesible al colorante. Las LNP del Lípido 10, 15 y 16 presentaron una carga fuertemente positiva en pH ácido (5.5), mientras que presentaban una carga casi neutra en pH fisiológico (7.4). Por el contrario, las LNP de los Lípidos 24A, 26 an ALC-0315 presentaron una carga positiva relativamente débil en pH ácido (5.5) y una carga ligeramente negativa en pH fisiológico (7.4) lo que sugiere el papel de la química de la cola del lípido que da lugar a dicha presentación interfacial del grupo de cabeza ionizable que disminuye el pK_a aparente de la LNP. En resumen, todos los lípidos ensayados dieron lugar a una encapsulación de ARNm de GFP viable y estabilidad después de congelación-descongelación, así como diámetros <150 nm de las LNP finales dirigidas, excepto la LNP del Lípido 10 que presentó un diámetro promedio de la LNP dirigida ~ 200 nm después de congelación-descongelación. La capacidad de las LNP de los lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315 para inducir la expresión de la proteína GFP in vitro en células T humanas primarias mediada por el direccionamiento al receptor de células T α CD8 se evaluó como se describe en los Ejemplos 12 y 13.

Tabla 29. Datos de Tamaño, Polidispersidad (DLS) de las LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315 en MBS pH 6.5 MBS e inserción posterior del conjugado de direccionamiento a α CD8 (T8)

Lípido ionizable, no. de LNP	Tamaño Z-Prom. (nm); MBS	Tamaño Z-Prom. (nm); después de la inserción; MBS	Tamaño Z-Prom. (nm); Después de F/T	Polidispersidad (DLS); MBS	Polidispersidad (DLS); Después de la inserción; MBS	Polidispersidad (DLS); Después de F/T
Lípido 10, DPG-PEG; EXP22008471-3q	90	131	208	0.21	0.22	0.18
Lípido 15, DPG-PEG; EXP22001312-3p	86	90	94	0.11	0.12	0.11
Lípido 16, DPG-PEG; EXP22008471-4a	92	106	109	0.17	0.20	0.17

5	Lípido 24A, DPG-PEG; EXP22008471-3t	82	91	94	0.10	0.12	0.16
	Lípido 26, DPG-PEG; EXP22008471-3u	83	87	93	0.07	0.07	0.09
	ALC-0315, DPG-PEG; EXP22008471-ALC	93	111	136	0.12	0.13	0.14

Tabla 30. Potencial Zeta (DLS) de las LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315 a pH 5.5 y pH 7.4

Lípido ionizable, no. de LNP	Carga (ZP, mV); pH 5.5	Carga (ZP, mV); pH 7.4
Lípido 10, DPG-PEG; EXP22008471-3q	25.8	0.8
Lípido 15, DPG-PEG; EXP22001312-3p	18.4	-0.2
Lípido 16, DPG-PEG; EXP22008471-4a	24.5	-0.6
Lípido 24A, DPG-PEG; EXP22008471-3t	-0.7	-5.9
Lípido 26, DPG-PEG; EXP22008471-3u	4.3	-5.2
ALC-0315, DPG-PEG; EXP22008471-ALC	4.4	-10.5

Tabla 31. ARN Accesible al Colorante y contenido de ARN total de las LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26

Lípido ionizable, no. de LNP	Conc. de ARNm Nominal (µg/mL)	ARNm Total Medido (µg/mL)	ARNm accesible al colorante (%)
Lípido 10, DPG-PEG; EXP22008471-3q	150	124.30	10.9
Lípido 15, DPG-PEG; EXP22001312-3p	150	117.60	10.3
Lípido 16, DPG-PEG; EXP22008471-4a	150	109.90	9.40
Lípido 24A, DPG-PEG; EXP22008471-3t	150	134.90	26.4
Lípido 26, DPG-PEG; EXP22008471-3u	150	124.40	≤ 6 (5.5)
ALC-0315, DPG-PEG; EXP22008471-ALC	150	88.50	14.70

EJEMPLO 47. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS (GFP) IN VITRO EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS DE LAS LNP DE LOS LÍPIDOS 10, 15, 16, 24A, 26, Y ALC-0315 DIRIGIDAS A α CD8 (T8) (TANTO ALMACENADAS A 4 °C COMO DESPUÉS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN)

Este ejemplo compara la expresión de la proteína GFP que resulta de las LNP derivadas de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315 (tanto antes como después de un ciclo de congelación-descongelación). Las nanopartículas que portaban ARNm que codificaba GFP (y, opcionalmente, un marcador colorante fluorescente (Dil-C18-5DS)) se produjeron usando los procesos de mezclado microfluídico e intercambio de tampón descritos en el Ejemplo 2. Un Fab-conjugado de α CD8, T8, se incorporó en las LNP parentales para obtener la formulación final de LNP dirigida por anticuerpo usando el proceso descrito en el Ejemplo 5. Las partículas así producidas se ensayaron *in vitro* en células T CD8 humanas primarias para valorar la expresión génica reportada. Como se observa en la FIG. 38C y FIG. 38D, con esta estrategia de direccionamiento a α CD8 con T8, todas las LNP ensayadas mostraron niveles altos similares de % de células T Dil+ (colorante) y MFI de Dil lo que refleja una asociación de LNP igualmente eficiente con la población T CD8. Sin embargo, se observaron diferencias notables en los niveles de expresión de la proteína GFP (como se refleja por el % de células GFP+ y las copias de proteína GFP producidas por célula como reflejan los valores de MFI de GFP) (FIG. 38A y FIG. 38B). Las LNP del Lípido 15 superaron a los otros Lípidos en el grupo, con los Lípidos 16, 26, y ALC-0315 permitiendo niveles similares y relativamente altos de expresión de proteínas. Es destacable que los valores del Potencial Zeta de las LNP del Lípido 15 y Lípido 16 a pH 5.5 y pH 7.4 sugieren un gran desplazamiento en la carga y consecuentemente una fuerte capacidad para la fusión con las membranas endosomales (y disrupción endosomal/escape endosomal) después de la acidificación del compartimento endosomal. Sin embargo, los valores del Potencial Zeta de las LNP del Lípido 26 y ALC-0315 sugieren un desplazamiento de carga relativamente pequeño bajo la acidificación endosomal. Por tanto, a pesar de una menor capacidad potencial para la desestabilización de la membrana endosomal dirigida por la carga, como evidencian niveles de expresión de proteínas altos, las LNP del Lípido 26 y ALC-0315 permiten una administración citosólica potente de la carga útil de ARN de GFP. Esto sugiere un papel potencial de la estructura del grupo de cola del Lípido ramificada hacia a una mayor fluidez de membrana y una forma del grupo de cola más pronunciada en forma de “cono”, contribuyendo hacia una mayor fusión de la membrana endosomal, desestabilización de la membrana y escape endosomal eficiente de la carga útil de ARN. Las LNP de los Lípidos 10, 15, 16, 24A, 26, y ALC-0315, dirigidas a α CD8 (T8) se toleraron bien por las células T humanas primarias (FIG. 38E).

EJEMPLO 48. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN) DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) QUE CONTIENEN DLIN-KC3-DMA GFP Y BITE

Se prepararon LNP de Dlin-KC3-DMA que encapsulaban ARN de GFP (preparadas personalizadas por TriLink Biotechnologies Inc.) o ARNm de BiTE (preparadas personalizadas por Vernal Biosciences) usando los métodos descritos en el Ejemplo 6 y se caracterizaron usando los métodos descritos en el Ejemplo 8. El tamaño medido de las LNP y PDI, potencial zeta, y recuperación de ARNm

de las LNP de DLin-KC3-DMA antes de la inserción y LNP y PDI después de la inserción se resumen en la Tabla 32 y en las FIG. 39A a 39D. Como se observa en la FIG. 39B, la preparación de LNP de GFP y BiTE con DLin-KC3-DMA dio lugar a tamaños de las LNP <100 nm. De manera similar, la polidispersidad de ambas LNP permaneció <0.2. Ambas LNP presentaron una eficiencia de encapsulación de moderada a alta (<15 % de ARN accesible al colorante) y >80 % de recuperación de ARN (FIG. 39C). Como se observa en la FIG. 39D, la inserción de anti-CD3 y anti-CD8 en LNP de BiTE con DLin-KC3-DMA dio lugar a tamaños de las LNP <140 nm y polidispersidad ≤0.2.

Tabla 32. Tamaño de las LNP de DLin-KC3-DMA y PDI, potencial zeta, y recuperación de ARNm antes de la inserción y tamaño y PDI después de la inserción.

Lípido Ionizable, no. de LNP	Tamaño Z-Prom. (nm);	PDI (DLS);	Carga (ZP, mV); pH 5.5	Carga (ZP, mV); pH 7.4	Recuperación de ARNm (%);	Accesible al colorante (%);
DLin-KC3-DMA, GFP;	91.53	0.08	21.4	3.32	86.9	9.4
DLin-KC3-DMA, BiTE;	91.33	0.10	18.1	2.97	83.3	10.6
CD3/CD8, DLin-KC3-DMA, BiTE;	137.6	0.22	-	-	-	-

EJEMPLO 49. VIABILIDAD, ASOCIACIÓN DE LNP (MEDIDA COMO FLUORESCENCIA DEL COLORANTE DiI), Y EXPRESIÓN DE GFP EN CÉLULAS T MURINAS TRANSFECTADAS CON LNP DE DLIN-KC3-DMA DIRIGIDAS A α CD3 (500A2), α CD4 (GK1.5), Y α CD8 (YTS156.7.7)

Las partículas producidas se ensayaron in vitro en células T CD3⁺ murinas primarias para valorar la viabilidad de las células T, la asociación de LNP (fluorescencia de DiI), y la expresión de la proteína GFP. Después de eutanasia por dislocación cervical, se recogieron los bazo de ratones Balb/c hembra de 6–8 semanas de edad, se cortaron en pequeños fragmentos, y se pasaron a través de un colador celular de 70 μ m. Después de lavar en PBS frío, los esplenocitos se contaron y los linfocitos T CD3⁺ se purificaron usando aislamiento magnético negativo directo siguiendo las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Las células T CD3⁺ murinas aisladas se sembraron en placas de seis pocillos a una concentración de 1x10⁶ células/mL en RPMI-1640, suplementado con FBS al 10 %, 1X ITS, 2-Mercaptoetanol 55 μ M, y 20 ng/mL de IL-2 murina recombinante, y 5 ng/mL de IL-7 murina recombinante. Las células se dejaron reposar durante al menos 2 horas a 37 °C antes del tratamiento.

Todas las formulaciones lipídicas dirigidas con cargas útiles de GFP fueron bien toleradas por las células T murinas primarias al nivel de dosis de 1 μ g/mL por 100.000 células T (FIG. 40A). La asociación de las LNP a subconjuntos específicos de células T se valoró evaluando la señal del colorante DiI incorporado. 24 horas después de la transfección, se observó una señal aumentada de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de DiI en el subconjunto de células T correspondiente al resto de

direccionamiento específico (FIG. 40B, FIG. 40C, FIG. 40D, FIG. 40E). Para evaluar la transfección de ARNm se valoró la capacidad de las LNP dirigidas para administrar ARNm que codificaba la proteína informadora, proteína verde fluorescente (GFP) aumentada a las células T primarias murinas. De manera análoga a los datos de asociación de partículas, se observó una expresión aumentada de GFP en los subconjuntos de células T diana sobre los subconjuntos negativos para el resto de direccionamiento específico (FIG. 40F, FIG. 40G, FIG. 40H, FIG. 40I). Además, para investigar si el direccionamiento conjunto a CD3 y CD8 podría funcionar en sinergia y así aumentar la eficiencia de la administración del ARNm sobre el direccionamiento único a CD3 y CD8, las células T murinas se trataron con LNP con inserción posterior de Fab tanto anti-CD3 como anti-CD8. El direccionamiento conjunto demostró aumentar la expresión de GFP en células T CD4 en comparación con el direccionamiento único a CD3 y el direccionamiento único a CD8, respectivamente (FIG. 40H).

EJEMPLO 50. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS T MURINAS CON DIFERENTES DENSIDADES DE DIRECCIONAMIENTO A α CD3, α TCR, α CD4, Y α CD8 EN LNP DE DLIN-KC3-DMA

Este ejemplo compara la transfección de células T murinas con diferentes densidades de direccionamiento a α CD3, α TCR, α CD4, y α CD8 insertadas en LNP de DLin-KC3-DMA (FIG. 41A a 41H). Las partículas producidas se ensayaron in vitro en células T CD3+ murinas primarias para valorar la asociación de las LNP (Dil) y la expresión de la proteína informadora (GFP). Se observó que la densidad de 30 Fab/LNP proporcionaba una eficiencia de transfección aumentada (GFP) para los restos de direccionamiento a CD8 y CD4 (FIG. 41B y FIG. 41F). Se observó que la densidad de 15 Fab por LNP (Fab/Partícula) proporcionaba una eficiencia de transfección aumentada (GFP) para los restos de direccionamiento a CD3 y TCR (FIG. 41D).

EJEMPLO 51. ANÁLISIS DE ACTIVACIÓN, LIBERACIÓN DE CITOQUINAS, FENOTIPADO, Y EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS T MURINAS TRANSFECTADAS CON LNP DE DLIN-KC3-DMA DIRIGIDAS A α CD3 (500A2) Y α CD8 (YTS156.7.7)

Este ejemplo compara la activación, liberación de citoquinas, fenotipado, y perfiles de expresión génica en células T murinas transfectadas con LNP de DLin-KC3-DMA dirigidas a CD3 con las transfectadas con LNP de DLin-KC3-DMA dirigidas a CD8. Se valoraron los perfiles de expresión génica de las células T CD8+ transfectadas con LNP usando el panel de Perfilado Inmune nCounter Mouse PanCancer (NanoString Technologies, Washington, EE. UU.), caracterizando 770 genes murinos relacionados con inmunología y cáncer. Brevemente, las células T CD8+ murinas se aislaron y transfectaron como se ha descrito anteriormente. Las células se lisaron usando Tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) y los lisados celulares se trataron con Proteinasa K (Thermo Fisher, Massachusetts, EE. UU.) antes de la hibridación siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se observó una regulación al alza del marcador de activación temprana, CD69, por citometría de flujo en los grupos con direccionamiento a CD3 y CD3/CD8, pero no en el grupo con direccionamiento a CD8 (FIG. 42A). Además, se observaron niveles aumentados de IFN-gamma y TNF-alfa en los sobrenadantes de células T tratadas con LNP dirigidas a CD3 (FIG. 42B y FIG. 42C). Cuando se

evaluaron los fenotipos de las células T 48 horas después del tratamiento con LNP, se observó un desplazamiento desde los subconjuntos sin tratamiento previo hacia los subconjuntos de memoria en los grupos tratados con LNP dirigidas a CD3 (FIG. 42D). Los perfiles de expresión génica de las células T tratadas se evaluaron usando el Panel d Perfilado Inmune nCounter Mouse PanCancer de NanoString Technologies. Apoyando los datos de activación de CD69, se observó una regulación al alza de genes asociados con la activación de las células T en los grupos tratados con LNP dirigidas a CD3 o CD3/CD8 en comparación con el grupo con LNP dirigidas a CD8 y el grupo no tratado (FIG. 42E).

EJEMPLO 52. REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS T IN VIVO USANDO LA PROTEÍNA INFORMADORA MCHERRY Y LA FLUORESCENCIA DEL COLORANTE DII CON LNP DE DLIN-KC3-DMA DIRIGIDAS A α CD3 (500A2), α CD4 (GK1.5), Y α CD8 (YTS156.7.7) EN RATONES BALB/C SINGÉNICOS

Este ejemplo compara la asociación de LNP (Dil) y la expresión de mCherry en ratones Balb/c de tipo salvaje tratados con LNP de DLin-KC3-DMA dirigidas a α CD3 (500A2), α CD4 (GK1.5), y α CD8 (YTS156.7.7) con un comparativo de LNP de DLin-KC3-DMA no dirigida. Las LNP se inyectaron por vía intravenosa en ratones BALB/c de tipo salvaje a través de la vena de la cola a 0.3 mg/kg y 1 mg/kg. Los ratones se sometieron a eutanasia 24 horas después de la inyección y los tejidos seleccionados (sangre, bazo, e hígado) se recogieron, procesaron, y tiñeron para el análisis por Citometría de Flujo. ~78 % de células T CD3⁺CD8⁺ en la sangre mostraron asociación de LNP cuando se tomaron como diana con anti-CD8 en comparación con LNP no dirigidas mostrando <2 % en la misma población celular (FIG. 43A). De manera similar, ~67 % de la población de células CD3⁺CD4⁺ fueron positivas para Dil en ratones tratados con LNP dirigidas con anti-CD4 a diferencia de ~2 % en el grupo tratado con una dosis igual de LNP no dirigidas (FIG. 43B). En el bazo, se observó una tendencia de asociación celular específica dependiente de la diana para todos los grupos tratados con LNP dirigidas sobre las LNP no dirigidas (FIG. 43E y FIG. 43F). En contraste, los subconjuntos de células T en el hígado mostraron niveles mayores de asociación de LNP no específica (FIG. 43I y FIG. 43J).

La eficiencia de transfección del ARNm se evaluó valorando los niveles de la expresión de la proteína mCherry codificada en el ARNm encapsulado. La expresión de mCherry se observó en los grupos tratados con LNP dirigidas con anti-CD3 y anti-CD3/CD8 en todos los tejidos analizados (FIG. 43C, FIG. 43D, FIG. 43G, FIG. 43H, FIG. 43K, y FIG. 43L).

EJEMPLO 53. CITOTOXICIDAD IN VITRO USANDO ARNM DE BITE Y LNP DIRIGIDAS A α CD3/ α CD8 BASADAS EN EL LÍPIDO DLIN-KC3-DMA

Se usó el reactivo IncuCyte NucLight Red Lentivirus (Sartorius, Gottingen, Alemania) para transducir células CT26 siguiendo el protocolo del fabricante. Las células transducidas positivas para NucLight Red se seleccionaron usando puromicina y se confirmó una pureza >95 % por citometría de flujo antes de los ensayos de cocultivo. Las células T CD3⁺ murinas se transfectaron con LNP de DLin-KC3-DMA con ARNm de *BiTE* dirigidas a α CD3, α CD4, α CD8, o α CD3/ α CD8, LNP de DLin-KC3-DMA sin ARNm de *BiTE* dirigidas a α CD3, α CD4, α CD8, o α CD3/ α CD8 como un control, o proteína BiTE

recombinante. Las LNP no unidas se eliminaron por lavado en PBS 4 horas después de la transfección. Las células T transfectadas se cocultivaron entonces con células CT26 transducidas con NucLight Red Lentivirus a diferentes relaciones efector a célula diana en medio de células T (RPMI-1640, FBS al 10 %, 1X ITS, 2-Mercaptoetanol 55 μ M, 20 ng/mL de IL-2 murina recombinante, y 5 ng/mL de IL-7 murina recombinante) en una placa de fondo plano de 96 pocillos. La muerte de las células cancerosas se monitorizó en el SX5 IncuCyte cada 3 horas. El nivel de citotoxicidad se cuantificó normalizando el recuento de células rojas respecto al punto de tiempo inicial.

Como se observa en la FIG. 44A, FIG. 44B, FIG. 44C, y FIG. 44D, las LNP con ARNm de BiTE dirigidas a α CD3, α CD4, α CD8, o α CD3/ α CD8 dieron lugar a una citotoxicidad aumentada de manera estadísticamente significativa en comparación con los controles de LNP sin ARNm de BiTE dirigidas a α CD3, α CD4, α CD8, o α CD3/ α CD8.

EJEMPLO 54. EFICACIA IN VIVO USANDO ARNM DE BITE Y LNP DIRIGIDAS A α CD3/ α CD8 BASADAS EN EL LÍPIDO DLIN-KC3-DMA

Se inocularon por vía subcutánea a ratones Balb/c hembra de 6–8 semanas de edad (n=4 por grupo) 2.5×10^5 células CT26 en el flanco derecho 7 días antes del inicio del tratamiento (FIG. 45A). Los ratones se aleatorizaron y se agruparon según el tamaño del tumor. Se administró por vía intraperitoneal anti-PD-1 d ratón (clon RMP1-14) dos veces a la semana para un total de seis dosis a 10 mg/kg. Se administraron LNP de DLin-KC3-DMA con ARNm de BiTE dirigidas a α CD3/ α CD8, una LNP sin ARNm de BiTE como un control negativo, y BiTE recombinante anti-EphA2 x CD3 por inyección intravenosa en la vena de la cola una vez a la semana para un total de tres dosis a 0.2 mg/kg. Los pesos corporales y los tamaños tumorales se monitorizaron tres veces a la semana a lo largo del periodo del estudio.

Como se observa en la FIG. 45B, FIG. 45C, FIG. 45D, FIG. 45E, FIG. 45F, FIG. 45G, y FIG. 45H las LNP con ARNm de BiTE dirigidas a α CD3/ α CD8 dieron lugar a una carga tumoral reducida y supervivencia aumentada en comparación con el control de LNP sin ARNm de BiTE dirigida. Además, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia entre el grupo tratado con BiTE recombinante y el control de vehículo a la dosis ensayada.

Detalles sobre los BiTE y los restos de direccionamiento usados:

El ARNm fue producido por Vernal Biosciences (Vermont, EE.UU.). Brevemente, los ARNm que codificaban acoplador biespecífico de células T (BiTE) de GFP, Fluc y anti-EphA2 x CD3 se transcribieron in vitro, se introdujo una cola poli-A, y una caperuza (Cap1). Las secuencias de aminoácidos para scFv anti-CD3 de ratón y EphA2 se derivaron de fuentes públicas (500A2 Genbank AAB81028.1, AAB81027.1; KT3 Genbank AVW80143.1; 2C11 EF063578.1; EphA2 Uniprot P29317). Los ARNm de BiTE se diseñaron con un péptido señal derivado de la cadena kappa de ratón, un enlazador 3x(G4S) entre el dominio VH y VL de cada agente d unión, un enlazador 4x(G4S) entre los dos agentes de unión, y una etiqueta FLAG (Secuencia: DYKDDDDK) en el extremo 5' de la región de unión.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable para los clones anti-CD3, TCR, CD8 y CD4 de ratón se derivaron de fuentes públicas (500A2 Genbank AAB81028.1, AAB81027.1;

KT3 Genbank AVW80143.1; 2C11 EF063578.1; H57 PDB 1NFD, YTS105.18.10 PDB 2ARJ; YTS169.4.2.1, YTS156.7.7 y 2.43 AB030195; GK1.5 Genbank AAA51349.1, PMID 16901500). Los Fab se produjeron en HEK, se purificaron por IMAC, y se formularon en PBS por Biointron (Taizhou, China).

EJEMPLO 55. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS (ANTES Y DESPUÉS DE LA INSERCIÓN) DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (LNP) DE LÍPIDO 15 QUE CONTIENEN MCHERRY Y CAR

Las LNP del Lípido 15 que encapsulaban ARN de mCherry (preparadas personalizadas por TriLink Biotechnologies Inc.) o ARNm de CAR (preparadas personalizadas por Vernal Biosciences) se prepararon usando los métodos descritos en el Ejemplo 5 y se caracterizaron usando los métodos descritos en el Ejemplo 8. El tamaño y PDI medidos de las LNP, potencial zeta, y recuperación de ARNm de las LNP del Lípido 15 antes de la inserción se resumen en la Tabla 33 y en las FIG. 46A a 46D. Como se observa en la FIG. 46B, la preparación de LNP de mCherry y CAR con el Lípido 15 dio lugar a tamaños de LNP <120 nm. De manera similar, la polidispersidad de ambas LNP permaneció <0.2. Ambas LNP presentaron una eficiencia de encapsulación de moderada a alta (<20 % de ARN accesible al colorante) y >90 % de recuperación de ARN (FIG. 46C). El tamaño y PDI medidos de las LNP de LNP con Lípido 15 insertado se resumen en la Tabla 34. Como se observa en la FIG. 46D, la preparación de LNP de mCherry y CAR con inserción de anti-CD4 y/o anti-CD8 con Lípido 15 dio lugar a tamaños de LNP <140 nm. De manera similar, la polidispersidad de todas las LNP con inserción permaneció ≤0.2.

Tabla 33. Tamaño y PDI de las LNP con Lípido 15, potencial zeta, y recuperación de ARNm antes de la inserción.

Lípido Ionizable, no. de LNP	Tamaño Z-Prom. (nm);	PDI (DLS);	Carga (ZP, mV); pH 5.5	Carga (ZP, mV); pH 7.4	Recuperación de ARNm (%);	Accesible al colorante (%);
Lípido 15, mCherry;	95.15	0.115	21.8	0.619	106	12
Lípido 15, CAR;	112.35	0.129	21.9	0.935	113	17

Tabla 34. Tamaño y PDI de las LNP con Lípido 15 después de la inserción.

Lípido Ionizable, no. de LNP, ARNm, Resto de direccionamiento	Tamaño Z-Prom. (nm);	PDI (DLS);
Lípido 15, mCherry, TRX2	128.6	0.24
Lípido 15, mCherry, Ibalizumab	138.3	0.20
Lípido 15, mCherry, TRX2/Ibalizumab (Densidad 1)	134.2	0.17
Lípido 15, mCherry, TRX2/Ibalizumab (Densidad 2)	130.1	0.18
Lípido 15, CAR, TRX2	125.2	0.15
Lípido 15, CAR, Ibalizumab	132.4	0.21
Lípido 15, CAR, TRX2/Ibalizumab (Densidad 1)	127.4	0.16
Lípido 15, CAR, TRX2/Ibalizumab (Densidad 2)	130.1	0.18

EJEMPLO 56. VIABILIDAD, EXPRESIÓN DE MCHERRY, Y CAR EN CÉLULAS T HUMANAS PRIMARIAS CD3⁺, CD4⁺, Y CD8⁺ TRANSFECTADAS CON LNP DEL LÍPIDO 15 DIRIGIDAS A α CD4 (IBALIZUMAB) Y α CD8 (TRX2)

Este ejemplo compara la expresión de la proteína CAR y mCherry que resulta de LNP con el Lípido 15 dirigidas bien con conjugados de Fab frente a CD4 (Ibalizumab) o CD8 (TRX2) con las dirigidas frente a ambos CD4 (Ibalizumab) y CD8 (TRX2). Se insertaron Ibalizumab y TRX2 a 30 Fab/LNP y 5 Fab/LNP, respectivamente, para las LNP con direccionamiento único. En las LNP con direccionamiento doble se insertaron 15 Fab por LNP de Ibalizumab y 5 Fab por LNP de TRX2 (Densidad 1) o 15 Fab por LNP de Ibalizumab y 15 Fab por LNP de TRX2 (Densidad 2). Las partículas producidas se ensayaron *in vitro* en células T humanas primarias CD3⁺, CD4⁺, y CD8⁺ para valorar la viabilidad de las células T y la expresión de mCherry y CAR, respectivamente. Tanto las LNP con direccionamiento único como doble fueron bien toleradas por los subconjuntos de células T CD3, CD4, y CD8 en el experimento *in vitro* siendo los valores de viabilidad de las células T para las muestras tratadas comparables a los controles no tratados como se observa en la FIG. 47A. Las LNP con direccionamiento único y doble se comportaron de manera similar tanto en términos de fracción de células T mCherry⁺ o CAR⁺ como en las copias de la proteína mCherry o CAR producidas por célula (reflejado por los valores de MFI) en los subconjuntos respectivos diana de células T (CD3⁺, CD4⁺, y CD8⁺) (FIG. 47B, FIG. 47C, FIG. 47D, y FIG. 47E).

EJEMPLO 57. PREPARACIÓN DE CONJUGADOS FAB-LÍPIDO PARA PERMITIR EL DIRECCIONAMIENTO IN VIVO

Este Ejemplo describe un método para la producción de conjugados con grupo de direccionamiento para incorporar LNP (p. ej., LNP que comprenden un lípido catiónico ionizable, donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o Lípido 15) en células diana.

Se conjugaron Fab que se unen a dianas específicas de un tipo celular preferido con DSPE-PEG-maleimida mediante acoplamiento covalente entre el grupo maleimida y una cisteína C-terminal en la cadena pesada (HC), después de la reducción inicial del Fab. La proteína se reconstituyó con agua de grado de biología molecular a 10 mg/mL en solución salina tamponada con fosfato (fosfato 10 mM, NaCl 140 mM pH 7.4) y se diluyó adicionalmente hasta 5 mg/mL en tampón de reducción que contenía una concentración final de fosfato 50 mM, citrato 10 mM, NaCl 75 mM, EDTA 5 mM pH 6.0 con agente reductor de L-cisteína 20 mM y se incubó durante 1 hr a 25 °C con agitación bajo una atmósfera de argón. Inmediatamente, se cambió el tampón de la proteína reducida al 99.9 % a tampón de conjugación citrato 5 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM pH 6.0 con una membrana de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular de 10 kDa en una placa de filtración de polipropileno de 24 pocillos a temperatura ambiente usando intercambio de tampón por ultrafiltración/diafiltración automatizado (Unchained Labs, California, EE. UU.) equipado con un sistema de filtración de aire HEPA. Se midió el contenido de sulfhidrilo libre después de la reducción y el intercambio de tampón y era <1.1 por molécula de Fab después de la reducción y el intercambio de tampón usando el Reactivo de Ellman (5,5'-ditio-bis-

[ácido 2-nitrobenzoico]] según el protocolo del fabricante (Thermo Fisher Scientific Peirce Biotechnology, Illinois, EE. UU.).

Tan pronto como fue posible en 1 hr después del intercambio de tampón, se inició la reacción de conjugación por adición de una suspensión micelar con 12 mg/mL de DSPE-PEG-OCH₃ (NOF América, Nueva York, EE. UU.) y 8 mg/mL de DSPE-PEG-maleimida (NOF América, Nueva York, EE. UU.) en aguade grado de biología molecular. La reacción de conjugación se llevó a cabo con una concentración final de 3.8 mg/mL de Fab y un exceso de 8.25 molar de maleimida durante 4 hr a 25 °C con agitación bajo una atmósfera de argón. La producción del conjugado resultante se monitorizó por HPLC y SDS-PAGE. La reacción se inactivó en L-cisteína 1.0 mM a temperatura ambiente durante 10 min y se almacenó a 4 °C durante 12 – 16 hr. La reacción del conjugado crudo resultante que contenía DSPE-PEG-Fab se purificó simultáneamente de Fab libre y se intercambió el tampón al 99.9 % a citrato 10 mM, sacarosa al 10 % (p/p) pH 7.0 con una membrana de celulosa regenerada con un punto de corte de peso molecular de 100 kDa en una placa de filtración de polipropileno 24 pocillos a temperatura ambiente usando intercambio de tampón por ultrafiltración/diafiltración automatizado (Unchained Labs, California, EE. UU.) equipado con un sistema de filtración de aire HEPA. La pureza del conjugado final se valoró por HPLC y por SDS-PAGE. Después de la inactivación, la composición final de la micela consiste en una mezcla f DSPE-PEG-Fab, DSPE-PEG-maleimida (terminada en cisteína), y DSPE-PEG-OCH₃.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos de la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse cualesquiera métodos y materiales, similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, en la presente memoria se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones, artículos científicos, patentes y publicaciones de patentes citadas se incorporan por referencia en la presente memoria en su totalidad a todos los efectos.

Las publicaciones mencionadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo expuesto en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de una invención anterior.

EQUIVALENTES

La invención se puede plasmar en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o de las características esenciales de la misma. Por lo tanto, las realizaciones anteriores deben considerarse en todos los aspectos ilustrativas en lugar de limitativas de la invención descrita en la presente memoria. El alcance de la invención se indica, por tanto, mediante las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la descripción anterior, y se pretende que todos los cambios que entran dentro del significado y el rango de equivalencia de las reivindicaciones estén abarcados en las mismas. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es susceptible de modificaciones adicionales y que esta solicitud pretende abarcar cualquier variación, uso o adaptación de la invención

siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación que entren dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y que puedan aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

10

15

20

25

30

35