

NANOPARTÍCULAS LIPIDAS CONJUGADAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE CMH Y USOS
DE LAS MISMAS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 63/443.223, presentada el 3 de febrero de 2023, de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 63/463.252, presentada el 1 de mayo de 2023 y de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 63/467.282, presentada el 17 de mayo de 2023, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad por referencia en el presente documento.

REFERENCIA A UN LISTADO ELECTRÓNICO DE SECUENCIAS

El contenido del listado electrónico de secuencias (183952035040SEQLIST.xml; tamaño: 57.069 bytes; y fecha de creación: 30 de enero de 2024) se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

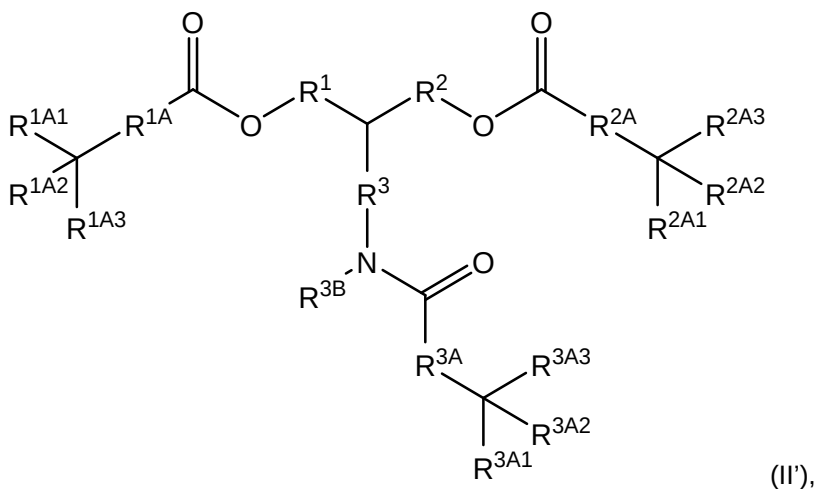
La invención proporciona nanopartículas lipídicas para el suministro de ácidos nucleicos a células madre hematopoyéticas, métodos de fabricación y uso.

ANTECEDENTES

Existe la necesidad de contar con métodos seguros y eficaces *in vivo* para la edición genética dirigida en células madre hematopoyéticas (CMH).

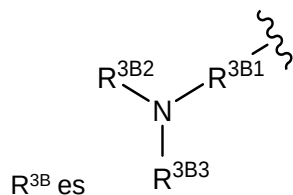
COMPENDIO

en la presente memoria se proporciona una nanopartícula lipídica (NPL) para el suministro dirigido de un ácido nucleico a una célula madre hematopoyética (CMH), comprendiendo la NPL un conjugado de lípido-anticuerpo que comprende el compuesto de Fórmula (I): [Lípido] – [conector opcional] – [anticuerpo], en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117; un lípido catiónico ionizable que comprende: (i) un compuesto de Fórmula (II'):

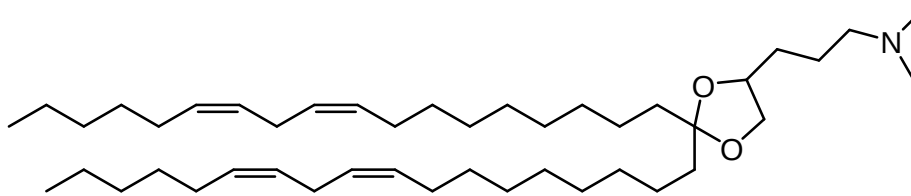


o una de sus sales, en donde: R^1 , R^2 y R^3 son cada uno de forma independiente un enlace o alquileo C_{1-3} ; R^{1A} , R^{2A} y R^{3A} son cada uno de forma independiente un enlace o alquileo C_{1-10} ; R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno de forma independiente H, alquilo C_{1-20} , alqueno 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 de forma independiente alquilo C_{1-20} o alqueno C_{1-20} ;



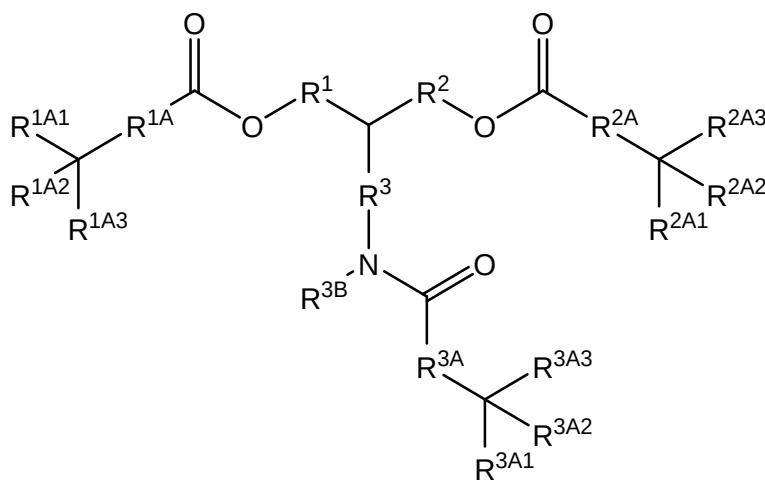
R^{3B} es ; R^{3B1} es alqueno C_{1-6} ; y R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, cada uno seleccionado de forma independiente del grupo que consiste en $-OH$ y $-O-(alquilo\ C_{1-6})$; o (ii) un compuesto que tiene la siguiente estructura:



o una de sus sales;

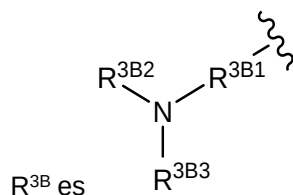
y uno o más ácidos nucleicos dispuestos en la NPL.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (II') es un compuesto de Fórmula (II):



(II),

o una de sus sales, en donde: R^1 , R^2 y R^3 son cada uno de forma independiente un enlace o alqueno C_{1-3} ; R^{1A} , R^{2A} y R^{3A} son cada uno de forma independiente un enlace o alqueno 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 de forma independiente H, alquilo C_{1-20} , alqueno 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 de forma independiente alquilo C_{1-20} o alqueno C_{1-20} ;



R^{3B} es ; R^{3B1} es alqueno C_{1-6} ; y R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente H o alquilo C_{1-6} .

En algunas realizaciones, la NPL comprende dos conjugados de lípido-anticuerpo que comprenden el compuesto de Fórmula (I), en donde el primer conjugado de lípido-anticuerpo y el segundo conjugado de lípido-anticuerpo son iguales o diferentes.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL que se une a CD105 y/o CD117 comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD117, donde la VH comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSNYAMS (SEQ ID NO: 1), una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de AKGPPTYHTNYYYMDV (SEQ ID NO: 3), y la VL comprende CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 4), una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASSLQS (SEQ ID NO: 5) y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQTNSFPYT (SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD117, donde la VH comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSDADMD (SEQ ID NO: 10), una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RTRNKAGSYTTEYAASVKG (SEQ ID NO: 11) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de AREPKYWIDFDL (SEQ ID NO: 12), y la VL comprende CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 13), una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASSLQS (SEQ ID NO: 14) y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSYIAPYT (SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD105, donde VH comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DAWMD (SEQ ID NO: 19), una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIRSKASNHATYYAESVKG (SEQ ID NO: 20) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de WRRFFDS (SEQ ID NO: 21), y VL comprende CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASSSVSYM (SEQ ID NO: 22), una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ATSNLAS (SEQ ID NO: 23) y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 24).

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL se une a CD117 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde la VH comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSNYAMS (SEQ ID NO: 1), una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de AKGPPTYHTNYYYMDV (SEQ ID NO: 3), y la VL comprende CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 4), una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASSLQS (SEQ ID NO: 5) y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQTNSFPYT (SEQ ID NO: 6).

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL se une a CD117 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde la VH comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSDADMD (SEQ ID NO: 10), una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de RTRNKAGSYTTEYAASVKG (SEQ ID NO: 11) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de AREPKYWIDFDL (SEQ ID NO: 12).

12), y la VL comprende CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 13), una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AASSLQS (SEQ ID NO: 14) y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSYIAPYT (SEQ ID NO: 15).

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL se une a CD105 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde VH comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DAWMD (SEQ ID NO: 19), una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIRSKASNHATYYAESVKG (SEQ ID NO: 20) y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de WRRFFDS (SEQ ID NO: 21), y VL comprende CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASSSVSYM (SEQ ID NO: 22),
10 una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de ATSNLAS (SEQ ID NO: 23) y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQWSSNPLT (SEQ ID NO: 24).

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde el anticuerpo se une a CD117, y en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde el anticuerpo se une a CD117, y en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada
20 (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde el anticuerpo se une a CD105, y en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL se une a CD117 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde
25 la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL se une a CD117 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y la VL comprende la secuencia de
30 aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL se une a CD105 y comprende una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo y una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, en donde la VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL que se une a CD105 y/o CD117 comprende un Fab, F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, fragmento scFv o dominio variable único de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un Fab. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio Fc.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un Fab que comprende un dominio de cadena pesada y un dominio de cadena ligera. En algunas realizaciones, los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 9 y 38 o tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 9 y 38. En algunas realizaciones, los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 18 y 39 o tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 18 y 39. En algunas realizaciones, los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 27 y 40 o tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 27 y 40.

En algunas realizaciones, el Fab carece del enlace disulfuro intercatenario natural en el extremo C. En algunas realizaciones, el Fab está diseñado para reemplazar una o ambas cisteínas en la cadena ligera constante natural y la cadena pesada constante natural que forman el disulfuro intercatenario natural con un aminoácido distinto de cisteína, para eliminar de este modo el enlace disulfuro intercatenario natural en el Fab. 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 Fab tiene un enlace disulfuro intercatenario no natural. En algunas realizaciones, el Fab tiene un enlace disulfuro intercatenario interno diseñado.

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 Fab 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 anticuerpo comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISV). En algunas realizaciones, el dominio ISV es un dominio ISV de Nanobody®. En algunas realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina comprende una cisteína en el extremo C.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende dos o más dominios VHH.

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, los dos o más dominios VHH están unidos por un espaciador aminoacídico. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un primer dominio VHH unido a un dominio CH1 de anticuerpo y un segundo dominio VHH unido a un dominio constante de la cadena ligera de anticuerpo

En algunas realizaciones, el dominio CH1 del anticuerpo y el dominio constante de cadena ligera del anticuerpo están unidos por uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, 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.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un espaciador o conector de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de AAA o con una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 45-60.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la NPL que se une a CD105 y/o CD117 comprende un anticuerpo biespecífico.

En algunas realizaciones, se proporciona en la presente memoria una NPL, donde el o los ácidos nucleicos son ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ARN es un ARNm.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la NPL comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida. En algunas realizaciones, la nucleasa dirigida es una nucleasa asociada a CRISPR (Cas), una nucleasa de dedos de zinc (ZFN), una nucleasa efectora de tipo activador transcripcional (TALEN) o una megaTAL. En algunas realizaciones, la nucleasa dirigida es una nucleasa Cas, ZFN, TALEN o megaTAL que comprende una secuencia de aminoácidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la NPL comprenden un ARNm que codifica una nucleasa asociada a CRISPR (Cas) o un editor de bases químicas; y un ARN guía (ARNg) que comprende una secuencia de nucleótidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la NPL comprenden un ARNm que codifica un editor de calidad; y un ARN guía de edición de calidad (ARNgec) que comprende una secuencia de nucleótidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es una enzima Cas de tipo II o de tipo V, o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es una enzima Cas9, una enzima Cas12, una enzima CasX, una enzima Cas14 o una variante de las mismas.

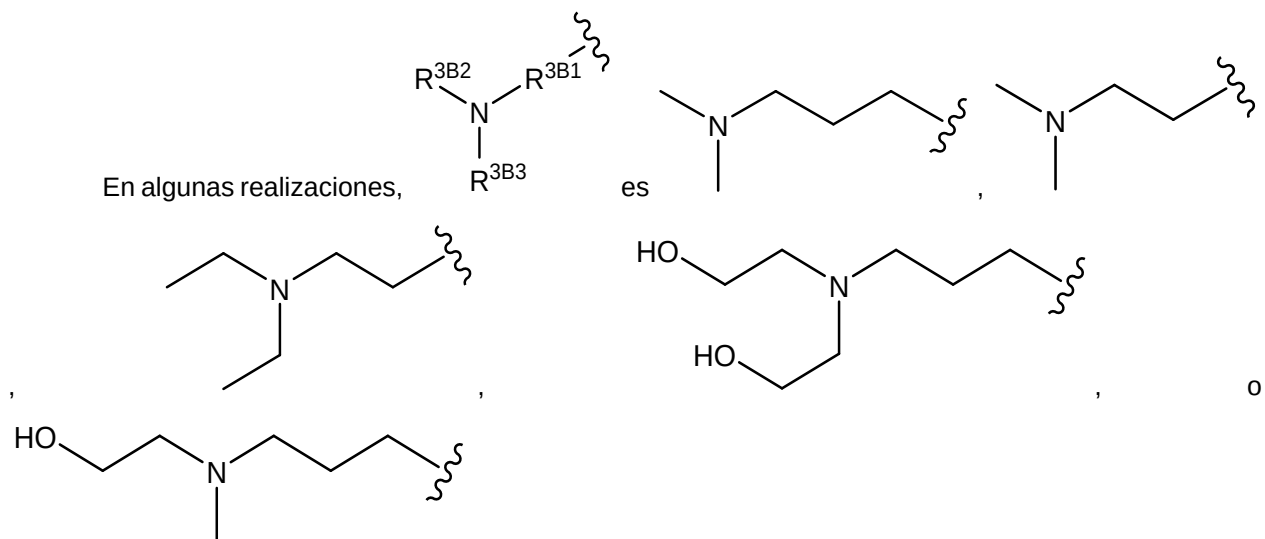
En algunas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la NPL comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la NPL comprenden además un ácido nucleico molde donante que comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana.

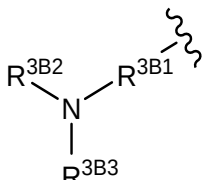
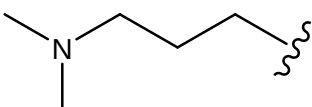
En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos y está ubicada dentro de una región codificante de un gen, una región intrónica asociada a un gen, una región exónica asociada a un gen, una región 5' no traducible asociada a un gen o una región 3' no traducible asociada a un gen, en donde el gen se selecciona del grupo que consiste en un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTX*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*,

AICDA, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C.

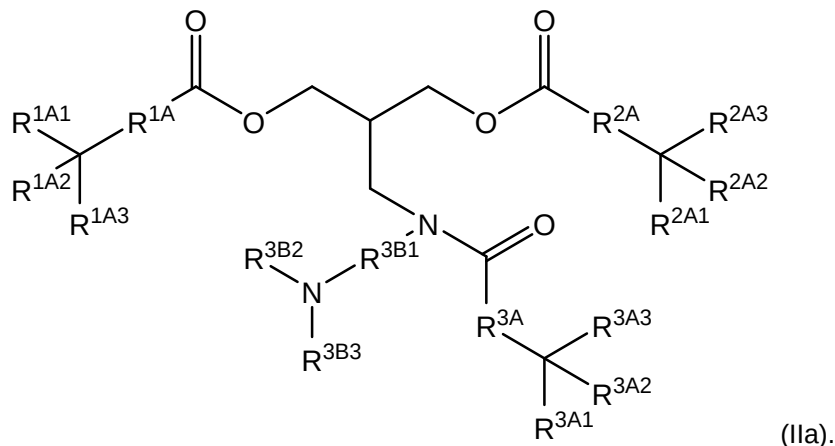
En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una región reguladora, opcionalmente una región potenciadora o una región represora, de un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLRE1C*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTk*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*, *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable de la NPL comprende un compuesto de Fórmula (II'). En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable de la NPL comprende un compuesto de Fórmula (II). En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente H o alquilo C_{1-6} , opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, cada uno seleccionado de forma independiente del grupo que consiste en -OH y -O-(alquilo C_{1-6}). En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente metilo o etilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno o más -OH. En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno metilo sin sustituir.



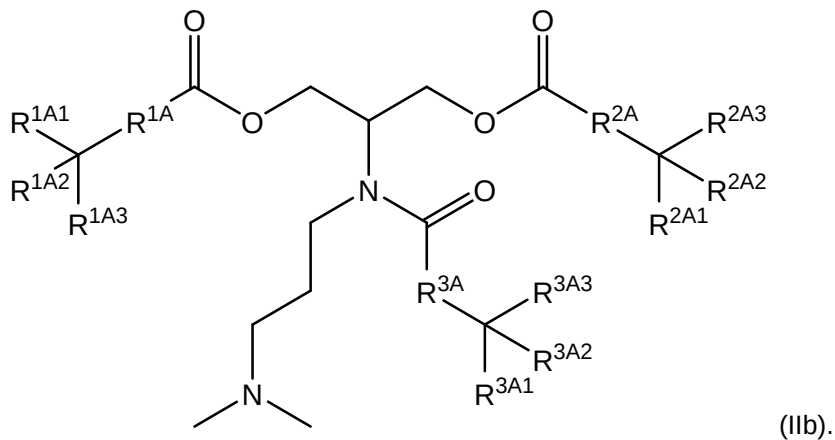
En algunas realizaciones,  es . En algunas realizaciones, R¹, R² y R³ son cada uno de forma independiente un enlace o metileno. En algunas realizaciones, R¹ y R² son cada uno metileno y R³ es un enlace.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable de la NPL es un compuesto de Fórmula (IIa):



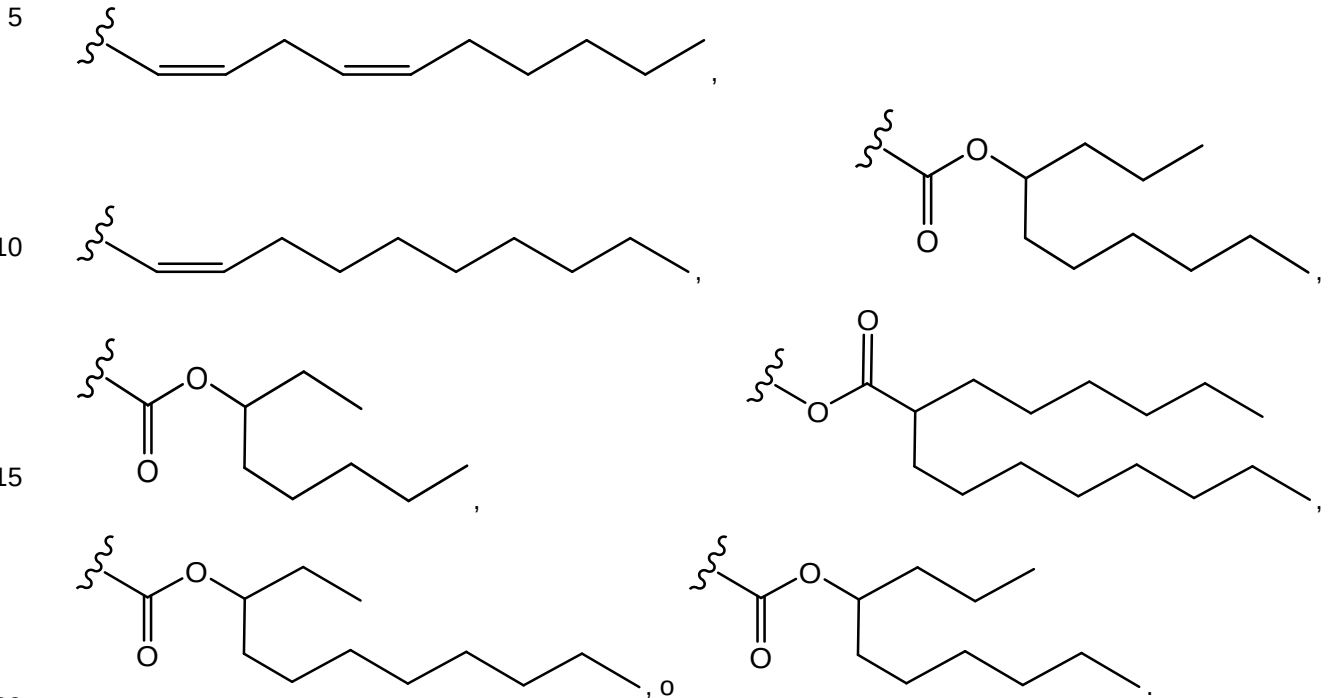
en donde R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{1A1}, R^{1A2}, R^{1A3}, R^{2A1}, R^{2A2}, R^{2A3}, R^{3A1}, R^{3A2}, R^{3A3}, R^{3B1}, R^{3B2} y R^{3B3} son como se ha definido para la Fórmula (I'), Fórmula (II) o cualquier variación o realización de las mismas.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable de la NPL es un compuesto de Fórmula (IIb):

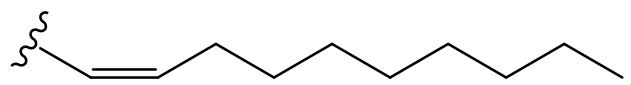


En algunas realizaciones, R^{1A}, R^{2A} y R^{3A} son cada uno de forma independiente un enlace o -(CH₂)₁₋₁₀-. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno de forma independiente un enlace, -CH₂-, -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅-, -(CH₂)₆-, -(CH₂)₇- o -(CH₂)₈-. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno de forma independiente un enlace, -(CH₂)₂-, -(CH₂)₄-, -(CH₂)₆-, -(CH₂)₇- o -(CH₂)₈-. En algunas realizaciones, R^{3A} es un enlace, -CH₂-, -(CH₂)₂- o -(CH₂)₇-. En algunas realizaciones, R^{1A1}, R^{1A2}, R^{1A3}, R^{2A1}, R^{2A2} y R^{2A3} son cada uno de forma independiente H, alquilo C₁₋₁₅, -CH=CH-(alquilo C₁₋₁₅), -CH=CH-CH₂-CH=CH-(alquilo C₁₋₁₀), -(CH₂)₀₋₄C(O)OCH(alquilo C₁₋₁₀)(alquilo C₁₋₁₅), -(CH₂)₀₋₄OC(O)CH(alquilo C₁₋₁₀)(alquilo C₁₋₁₅),

$-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-15})$ o $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-15})$. En algunas realizaciones, $\text{R}^{1\text{A}1}$ y $\text{R}^{2\text{A}1}$ son cada uno de forma independiente $-\text{CH}=\text{CH}-(\text{alquilo } \text{C}_{1-15})$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{alquilo } \text{C}_{1-10})$, $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{alquilo } \text{C}_{1-10})(\text{alquilo } \text{C}_{1-15})$ o $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{alquilo } \text{C}_{1-10})(\text{alquilo } \text{C}_{1-15})$; y $\text{R}^{1\text{A}2}$, $\text{R}^{1\text{A}3}$, $\text{R}^{2\text{A}2}$ y $\text{R}^{2\text{A}3}$ son cada uno H. En algunas realizaciones, $\text{R}^{1\text{A}1}$ y $\text{R}^{2\text{A}1}$ son cada uno



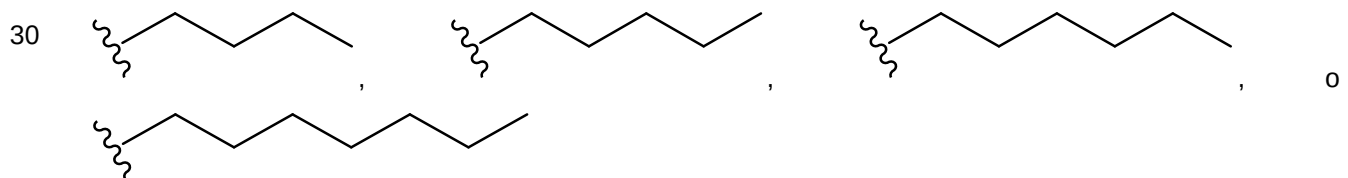
En algunas realizaciones, $\text{R}^{1\text{A}1}$ y $\text{R}^{2\text{A}1}$ son cada uno



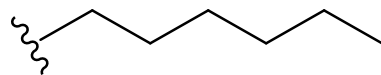
En algunas realizaciones, $\text{R}^{3\text{A}1}$, $\text{R}^{3\text{A}2}$ y $\text{R}^{3\text{A}3}$ son cada uno de forma independiente H, alquilo C_{1-15} , $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OCH}(\text{alquilo } \text{C}_{1-5})(\text{alquilo } \text{C}_{1-10})$, $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{alquilo } \text{C}_{1-5})(\text{alquilo } \text{C}_{1-10})$, $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-10})$ o $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2(\text{alquilo } \text{C}_{1-10})$.

En algunas realizaciones, $\text{R}^{3\text{A}1}$ y $\text{R}^{3\text{A}2}$ son cada uno de forma independiente alquilo C_{1-15} ; y $\text{R}^{3\text{A}3}$ es H.

En algunas realizaciones, $\text{R}^{3\text{A}1}$ y $\text{R}^{3\text{A}2}$ son cada uno de forma independiente etilo, propilo,

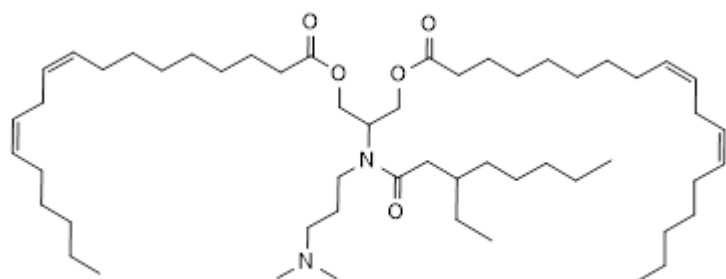


En algunas realizaciones, $\text{R}^{3\text{A}1}$ es propilo y $\text{R}^{3\text{A}2}$ es



En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable de la NPL es

5

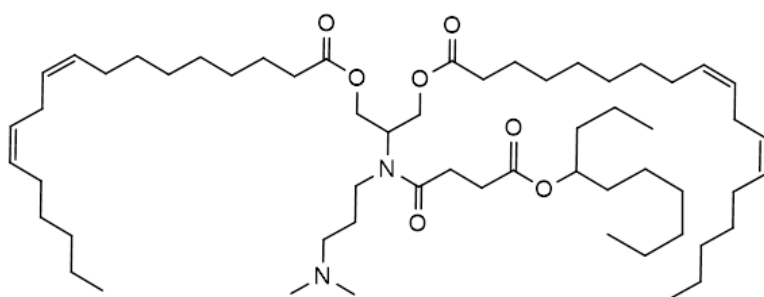


Lípido 8

10

En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable de la NPL es

15

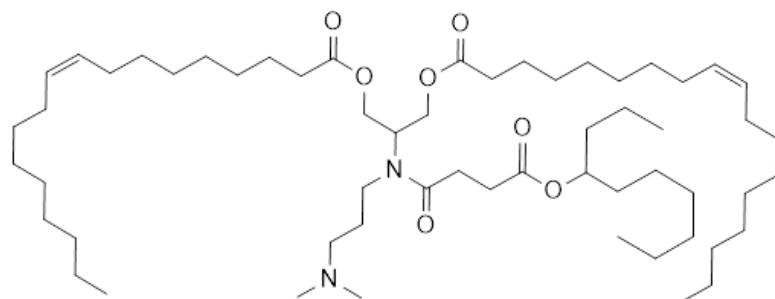


Lípido 9

20

En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable de la NPL es

25

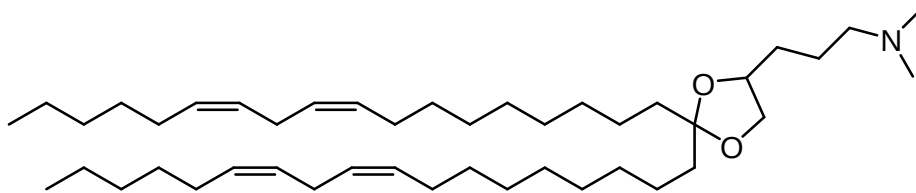


Lípido 15

30

En el lípido catiónico ionizable comprende el compuesto que tiene la estructura

35



En algún aspecto, en la presente memoria se proporciona una NPL donde el anticuerpo está acoplado covalentemente a un lípido en la NPL a través de un conector que contiene polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117 se acopla covalentemente a un lípido en la NPL mediante un conector que contiene polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el lípido acoplado covalentemente al anticuerpo a través de un conector que contiene PEG es diestearoilglicerol (DSG), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE),
 5 diestearoil-glicero-fosfoglicerol (DSPG), dimiristoil-glicerol (DMG), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil-glicerol (DPG) o ceramida. En algunas realizaciones, el PEG es PEG 2000 o PEG 3400.

En algunas realizaciones, el conjugado de lípido-anticuerpo está presente en la NPL en un intervalo de 0.001 a 0.5 por ciento molar. En algunas realizaciones, el conjugado de lípido-anticuerpo está presente en la NPL en un intervalo de 0.002-0.2 por ciento molar.

10 En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable está presente en la NPL en un intervalo de 30-70 por ciento molar. En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable está presente en la NPL en un intervalo de 40-60 por ciento molar.

En algunas realizaciones, la NPL comprende además uno o más de un lípido estructural, un fosfolípido neutro y un PEG-lípido libre. En algunas realizaciones, el lípido estructural es un estero. En
 15 algunas realizaciones, el estero es colesterol. En algunas realizaciones, el estero está presente en la NPL en un intervalo de 20 a 70 por ciento molar. En algunas realizaciones, el estero está presente en la NPL en un intervalo de 30 a 50 por ciento molar. En algunas realizaciones, el estero comprende colesterol y está presente en la NPL a una concentración de aproximadamente 40 por ciento molar.

En algunas realizaciones, el fosfolípido neutro se selecciona del grupo que consiste en
 20 fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, diestearoil-snglicero-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. En algunas realizaciones, el fosfolípido neutro está presente en la NPL en un intervalo de 5 a 15 por ciento molar. En algunas realizaciones, la concentración del fosfolípido neutro en la NPL es de aproximadamente 10 por ciento molar. En algunas realizaciones, el fosfolípido
 25 neutro es DSPC y la concentración de DSPC en la NPL es de aproximadamente 10 por ciento molar.

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 dialquilgliceroles modificados con PEG. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende PEG-
 30 dioleoilglicerol (PEG-DOG), PEG-dimiristoil-glicerol (PEG-DMG), PEG-dipalmitoilglicerol (PEG-DPG), PEG-dilinoleoil-glicero-fosfatidil etanolamina (PEG-DLPE), PEG-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DMPE), PEG-dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PEG-DPPE), PEG-diestearoilglicerol (PEG-DSG), N-palmitoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi(polietilenglicol)] (PEG-ceramida), PEG-diestearoil-glicero-fosfoglicerol (PEG-DSPG), PEG-dioleoil-glicero-fosfoetanolamina (PEG-DOPE), 2-[(polietilenglicol)-2000]-
 35 N,Nditetradecilacetamida, PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) o un derivado de los mismos. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende una diacilfosfatidiletanolamina que comprende una cadena de dipalmitoílo (C16) o una cadena de diestearoílo (C18) y opcionalmente el PEG-lípido libre comprende PEG-DPG y PEG-DMG. En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre está presente en la NPL

en un intervalo de 1 a 4 por ciento molar. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es DPG-PEG que comprende PEG que tiene un peso molecular de 2000 daltons y el lípido DPG-PEG está presente en la NPL a una concentración de aproximadamente 1.5 por ciento molar.

5 En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido que el del conjugado de lípido-anticuerpo o uno diferente.

En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende un PEG que tiene un peso molecular de al menos 2000 daltons. En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3000 a 5000 daltons.

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

15 En algunas realizaciones, la NPL comprende el lípido catiónico ionizable, el conjugado de lípido-anticuerpo que comprende el compuesto de la siguiente fórmula: [Lípido] - [conector opcional] - [anticuerpo], en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117, un esteroide u otro lípido estructural, un fosfolípido neutro, un lípido con polietilenglicol (PEG) libre y el ácido nucleico.

20 en la presente memoria también se proporciona un método para dirigir el suministro de un ácido nucleico a una célula madre hematopoyética (CMH), opcionalmente *ex vivo* o *in vivo* en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde la NPL comprende el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

25 En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto un agente de movilización de CMH y en donde la NPL se administra al sujeto por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes, durante o antes y durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor y G-CSF.

30 en la presente memoria también se proporciona un método para modificar genéticamente una célula madre hematopoyética (CMH), opcionalmente *ex vivo* o *in vivo* en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el o los ácidos nucleicos dispuestos en la NPL comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico.

35 También se proporciona en la presente memoria un método para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el o los ácidos nucleicos dispuestos en la NPL comprenden una

secuencia, opcionalmente un ARNm, que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al sujeto un agente de movilización de CMH y en donde la NPL se administra al sujeto por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes, durante o antes y durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor y G-CSF.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una hemopatía. En algunas realizaciones, la enfermedad es una hemoglobinopatía, una inmunodeficiencia primaria (IDP), una citopenia congénita, una hemofilia, una trombofilia, una metabolopatía congénita, una neuropatía o una enfermedad vírica. En algunas realizaciones, la enfermedad es una α -hemoglobinopatía o una β -hemoglobinopatía. En algunas realizaciones, la β -hemoglobinopatía es β -talasemia o enfermedad de células falciformes.

En algunas realizaciones, la administración de las NPL da lugar a uno o más de (i) una inserción de un transgén *HBB*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; (ii) aumento de la expresión de β -globina en el sujeto; (iii) una mayor cantidad de hemoglobina $\alpha_2\beta_2$ de los adultos (HbA) en el sujeto; (iv) inserción de un transgén *HBB1*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; (v) inserción de un transgén *HBB2*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; (vi) aumento de la expresión de γ -globina en el sujeto; (vii) una mayor cantidad de hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$ fetal (HbF) en el sujeto; (viii) alteración del gen *HBA1*, el gen *HBA2*, o una combinación de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ix) disminución de la expresión de α -globina en el sujeto; y (x) una menor cantidad de heterotetrámeros de α -globina α_4 en el sujeto.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una IDP. En algunas realizaciones, la IDP es una inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad granulomatosa crónica, inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X (IPEX), un síndrome de hiperIgM o agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.

En algunas realizaciones, la IDP es una IDCG. En algunas realizaciones, la IDCG es Artemis-IDCG (ART-IDCG), IDCG con gen activador de recombinación (RAG-IDCG), IDCG ligada al cromosoma X (X-IDCG), IDCG con deficiencia de adenosina desaminasa, IDCG con deficiencia del receptor de interleucina 7 o JAK3 IDCG. En algunas realizaciones, la IDCG es ART-IDCG, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *DCLRE1C*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de la proteína Artemis funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IDCG es RAG-IDCG, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *RAG1* o un transgén *RAG2*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de proteína RAG1 funcional o proteína RAG2 en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IDCG es X-IDCG, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *IL2RG*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH

del sujeto; aumento de la expresión de la proteína IL2RG funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la IDP es el síndrome de Wiskott-Aldrich. En algunas realizaciones, la IDP es el síndrome de Wiskott-Aldrich, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *WAS*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de la proteína WASP funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la IDP es una enfermedad granulomatosa crónica.

En algunas realizaciones, la IDP es una enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X.

En algunas realizaciones, la IDP es una enfermedad granulomatosa crónica, y en donde la administración de la NPL da lugar a uno o más de (i) inserción de un transgén *CYBA*, un transgén *CYBB*, un transgén *NCF1*, transgén *FNC2* o un transgén *NCF4*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) introducción de una mutación puntual 676C>T en el gen *CYBB* de al menos una CMH en el sujeto; (iii) aumento de la expresión de la proteína *CYBA* funcional, proteína *CYBB*, proteína *NCF1*, proteína *NCF2* o proteína *NCF4* en el sujeto; y (v) un aumento de la cantidad de complejo enzimático de NADPH oxidasa funcional en el sujeto.

En algunas realizaciones, la IDP es IPEX. En algunas realizaciones, la IDP es IPEX, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *FOXP3*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de la proteína *FOXP3* funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la IDP es el síndrome de hiperIgM. En algunas realizaciones, la IDP es un síndrome de hiperIgM, y en donde la administración de NPL da lugar a uno o más de (i) inserción de un transgén *AICDA*, un transgén *UNG*, transgén *CD40* o un transgén *CD40LG*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) aumento de la expresión de la proteína *AICDA* funcional, proteína *UNG*, proteína *CD40* o proteína *CD40LG* en el sujeto; (iii) una reducción de la cantidad de anticuerpos IgM en el sujeto; y (iv) un aumento de la cantidad de anticuerpos IgG, IgA o IgE en el sujeto.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una citopenia congénita. En algunas realizaciones, la citopenia congénita es anemia de Fanconia, síndrome de Shwachman-Diamond, anemia de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, trombocitopenia amegacariocítica congénita o disgenesia reticular. En algunas realizaciones, la citopenia congénita es anemia de Fanconia, y en donde la administración de NPL da lugar a la inserción de uno o más genes *FANC*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH en el sujeto; aumento de la expresión de una o más proteínas *FANC* funcionales en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la citopenia congénita es anemia de Fanconia, y en donde la administración de la NPL da inserción de un transgén *FANCA*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de *FANCA* funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una hemofilia. En algunas realizaciones, la hemofilia es la hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una hemofilia, y en donde la administración de NPL da lugar a (i) la inserción de un transgén *F8*, un transgén *F9* o un *F11*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) aumento de la expresión de la proteína del factor VIII funcional, proteína del factor IX o proteína del factor XI en el sujeto; y (iii) aumento de la coagulación sanguínea en el sujeto.

5 En algunas realizaciones, la enfermedad es una trombofilia. En algunas realizaciones, la trombofilia es trombocitopenia amegacariocítica o deficiencia de factor X.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una trombofilia, y en donde la administración de NPL da lugar a uno o más de (i) la inserción de un transgén *F5*, un transgén *F2*, un transgén que codifica antitrombina III, un transgén que codifica la proteína C o un transgén que codifica la proteína S, o un
10 fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) aumento de la expresión de la proteína del factor V funcional, proteína del factor II, proteína antitrombina III, proteína C o proteína S en el sujeto; y (iii) reducción de la coagulación sanguínea en el sujeto.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una metabolopatía congénita. En algunas realizaciones, la metabolopatía congénita es la fenilcetonuria, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de
15 cadena media (MCAD), una enfermedad de almacenamiento lisosómico, un trastorno de almacenamiento del glucógeno, un trastorno peroxisómico, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurler, síndrome de Hunter, enfermedad de Wolman o deficiencia de piruvato cinasa. En algunas realizaciones, el trastorno peroxisómico es la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X. En algunas realizaciones, la enfermedad por almacenamiento lisosómico es la leucodistrofia metacromática,
20 mucopolisacaridosis I o mucopolisacaridosis II.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una neuropatía. En algunas realizaciones, la neuropatía es la ataxia de Friedrich.

En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad vírica. En algunas realizaciones, la enfermedad vírica es el VIH/SIDA. En algunas realizaciones, la enfermedad vírica es VIH/SIDA, y en donde
25 la administración de la NPL previene la infección por VIH, progresión del VIH/SIDA, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos del método de tratamiento dispuestos en la NPL comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida. En algunas realizaciones, la nucleasa dirigida es una nucleasa asociada a CRISPR (Cas), una nucleasa de dedos de zinc (ZFN), una nucleasa efectora
30 de tipo activador transcripcional (TALEN) o una megaTAL. En algunas realizaciones, la nucleasa dirigida es una nucleasa Cas, ZFN, TALEN o megaTAL que comprende una secuencia de aminoácidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos del método de tratamiento dispuestos en la NPL comprenden (i) un ARNm que codifica una nucleasa asociada a CRISPR (Cas) o un editor de bases
35 químicas; y (ii) un ARN guía (ARNg) que comprende una secuencia de nucleótidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos dispuestos en la NPL comprenden (i) un ARNm que codifica un editor de calidad; y (ii) un ARN guía de edición de calidad (ARNgec) que comprende una secuencia de nucleótidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos

diana. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es una enzima Cas de tipo II o de tipo V, o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es una enzima Cas9, una enzima Cas12, una enzima CasX o una enzima Cas 14, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNg_{ec} comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos del método de tratamiento dispuestos en la NPL comprenden además un ácido nucleico molde donante que comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana del método de tratamiento comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos y está ubicada dentro de una región codificante de un gen, una región intrónica asociada a un gen, una región exónica asociada a un gen, una región 5' no traducible asociada a un gen o una región 3' no traducible asociada a un gen, en donde el gen se selecciona del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTX*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*, *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una región reguladora, opcionalmente una región potenciadora o una región represora, de un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTX*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*, *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, el sujeto de los métodos proporcionados en este documento es un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La presente solicitud puede entenderse haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con las figuras adjuntas.

La **FIG. 1** representa una estrategia terapéutica ilustrativa para la edición por CRISPR *in vivo* de células madre hematopoyéticas (CMH) con nanopartículas lipídicas dirigidas (NPL).

La **FIG. 2** representa el espectro de RMN de protones del intermedio 13-11.

La **FIG. 3A** representa el espectro de RMN de protones del intermedio 13-11a; la **FIG. 3B** representa el espectro de RMN de protones del intermedio 13-11b; y la **FIG. 3C** representa LC-ELSD del intermedio 13-11b.

La **FIG. 4A** representa el espectro de RMN de protones del intermedio 13-10; la **FIG. 4B** representa el cromatograma de LC-CAD del intermedio 13-10.

La **FIG. 5A-1** representa el espectro de RMN de protones para el lípido 1; la **FIG. 5A-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 1.

5 La **FIG. 5B-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 3; la **FIG. 5B-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 3.

La **FIG. 5C-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 4; la **FIG. 5C-2** representa el cromatograma L de LC-CAD del lípido 4.

10 La **FIG. 5D-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 5; la **FIG. 5D-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 5.

La **FIG. 5E-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 6; la **FIG. 5E-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 6.

La **FIG. 5F-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 7; la **FIG. 5F-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 7.

15 La **FIG. 5G-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 2; la **FIG. 5G-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 2;

la **FIG. 5H-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 8; la **FIG. 5H-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 8.

20 La **FIG. 5I-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 9; la **FIG. 5I-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 9.

La **FIG. 5J-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 10; la **FIG. 5J-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 10.

La **FIG. 5K-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 11; la **FIG. 5K-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 11.

25 La **FIG. 5L-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 12; la **FIG. 5L-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 12.

La **FIG. 5M-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 13; la **FIG. 5M-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 13.

30 La **FIG. 5N-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 15; la **FIG. 5N-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 15.

La **FIG. 5O-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 16; la **FIG. 5O-2** representa el LC-CAD del lípido 16.

La **FIG. 5P-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 19; la **FIG. 5P-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 19.

35 La **FIG. 5Q-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 20; la **FIG. 5Q-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 20.

La **FIG. 5R-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 31; la **FIG. 5R-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 31.

La **FIG. 5S-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 32; la **FIG. 5S-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 32.

La **FIG. 5T-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 33; la **FIG. 5T-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 33.

5 La **FIG. 5U-1** representa el espectro de RMN de protones del lípido 34; la **FIG. 5U-2** representa el cromatograma de LC-CAD del lípido 34.

Las **FIGS. 6A-6D** representan los resultados del experimento para detectar la unión a CMH de conjugados de NPL-Fab y NPL-anticuerpo de longitud completa. Los conjugados de NPL-Fab y NPL-anticuerpo se formularon con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (Dil) y se usaron para tratar las CMH *in vitro*. La fluorescencia de Dil se muestra como una medida del direccionamiento de la NPL, ya que la unión del conjugado NPL-Fab a las CMH da lugar a que las CMH tengan fluorescencia de Dil. El Fab o anticuerpo específico de cada conjugado de NPL-Fab o NPL-anticuerpo se muestra en la parte superior de cada panel. Cada columna muestra la fluorescencia de Dil de las CMH tratadas con el conjugado de NPL-Fab o NPL-anticuerpo indicado preparado en diversas densidades de Fab/anticuerpo, como se indica en la leyenda detallada del esquema. Se utilizaron NPL no conjugadas y NPL conjugadas con el anticuerpo anti-CD8 mutOKT8 como controles negativos para el direccionamiento a CMH, ya que el CD8 no se expresa en las CMH. También se utilizó la solución salina equilibrada de Hanks (HBS) como control de tampón sin NPL. La **FIG. 6A** representa un primer experimento para detectar el direccionamiento a CMH de un primer conjunto de conjugados de NPL-Fab. La **FIG. 6B** representa un segundo experimento para detectar el direccionamiento a CMH de un primer conjunto de conjugados de NPL-Fab. La **FIG. 6C** representa un primer experimento para detectar el direccionamiento a CMH de un segundo conjunto de conjugados de NPL-anticuerpo. La **FIG. 6D** representa un segundo experimento para detectar el direccionamiento a CMH de un segundo conjunto de conjugados de NPL-anticuerpo.

25 Las **FIGS. 7A-7D** representan los resultados del experimento para detectar la transfección de CMH de conjugados de NPL-Fab y NPL-anticuerpo de longitud completa. Se formularon conjugados de NPL-Fab y NPL-anticuerpo con Dil y un ARNm que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) y se usaron para tratar CMH *in vitro*. Se muestra una combinación de fluorescencia de Dil y fluorescencia de GFP como medida de la transfección de NPL, ya que la unión del conjugado de NPL-Fab o NPL-anticuerpo a las CMH da lugar a que las CMH tengan fluorescencia de Dil y ya que la transcripción del ARNm en GFP requiere que el ARNm entre en la célula y escape del endosoma. El Fab o anticuerpo específico de cada conjugado de NPL-Fab o NPL-anticuerpo se muestra en la parte superior de cada panel. Cada columna muestra la fluorescencia doble de Dil y GFP de las CMH tratadas con el conjugado de NPL-Fab o conjugado de NPL-anticuerpo indicado preparado en diversas densidades de Fab/anticuerpo, como se indica en la leyenda detallada del esquema. Se utilizaron NPL no conjugadas y NPL conjugadas con el anticuerpo anti-CD8 mutOKT8 como controles negativos para el direccionamiento a CMH, ya que el CD8 no se expresa en las CMH. También se utilizó la solución salina equilibrada de Hanks (HBS) como control de tampón sin NPL. La **FIG. 7A** representa un primer experimento para detectar la transfección de CMH de un primer conjunto

de conjugados de NPL-Fab. La **FIG. 7B** representa un segundo experimento para detectar la transfección de CMH de un primer conjunto de conjugados de NPL-Fab. La **FIG. 7C** representa un primer experimento para detectar la transfección de CMH de un segundo conjunto de conjugados de NPL-anticuerpo. La **FIG. 7D** representa un segundo experimento para detectar la transfección de CMH de un segundo conjunto de conjugados de NPL-anticuerpo.

La **FIG. 8** representa la transfección de CMH mediante NPL conjugadas con el Fab Ab1 anti-CD117. La fluorescencia de Dil indica la unión del conjugado de (Ab1)-NPL a las CMH y la fluorescencia de GFP indican una transfección exitosa de las CMH con ARNm de GFP.

Las **FIGS. 9A-9B** representan la edición *in vitro* de CMH mediante el tratamiento con NPL KC3 conjugadas con el Fab Ab1 anti-CD117. Se usaron formulaciones de NPL KC3 conjugadas con o sin Ab1 para encapsular el ARNm de Cas9 modificado químicamente con N1-metil-pseudo-uridina con un ARNg específico para CD45. Las CMH humanas primarias se trataron con estas NPL en un intervalo de dosis de 100 a 800 ng de ARN total durante 7 días, después de lo cual las CMH se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra CD34 y CD117 para definir las poblaciones de células CMH y un anticuerpo fluorescente contra CD45 para detectar la inactivación de CD45. La **FIG. 9A** representa la fluorescencia de CD34 y CD45 de CMH tratadas con las NPL KC3 conjugadas con Ab1 e ilustra una reducción de las CMH que expresan CD45 con cantidades crecientes de carga de ARN. La **FIG. 9B** representa el porcentaje de inactivación de CD45 en CMH tratadas con NPL conjugadas con Ab1 (KC3-Ab1) y no conjugadas (KC3).

Las **FIGS. 10A-10B** representan la edición *in vitro* de CMH mediante el tratamiento con NPL de lípido 15 conjugadas con el Fab Ab1 anti-CD117. Se usaron formulaciones de NPL de lípido 15 conjugadas con o sin Ab1 para encapsular el ARNm de Cas9 modificado químicamente con N1-metil-pseudo-uridina con un ARNg específico para CD45. Las CMH humanas primarias se trataron con estas NPL en un intervalo de dosis de 100 a 800 ng de ARN total durante 7 días, después de lo cual las CMH se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra CD34 y CD117 para definir las poblaciones de células CMH y un anticuerpo fluorescente contra CD45 para detectar la inactivación de CD45. La **FIG. 10A** representa la fluorescencia de CD34 y CD45 de CMH tratadas con las NPL de lípido 15 conjugadas con Ab1 e ilustra una reducción de las CMH que expresan CD45 con cantidades crecientes de carga de ARN. La **FIG. 10B** representa el porcentaje de inactivación de CD45 en CMH tratadas con NPL conjugadas con Ab1 (Ab1 lípido 15) y no conjugadas (lípido 15).

La **FIG. 11** representa un gráfico del porcentaje de inactivación de CD45 en CMH tratadas con NPL medido tanto por fenotipo (expresión de CD45) como por genotipo (indeles detectados mediante análisis de secuenciación). Cada punto individual representa una única réplica técnica (es decir, un pocillo único de CMH). El % de fenotipo KO es la frecuencia de células sin proteína CD45. El % de genotipo KO es el porcentaje de lecturas que contienen indeles fuera del marco en el sitio de corte diana.

La **FIG. 12** representa estructuras de diversos híbridos de Fab, VHH (Nb), ScFv, Fab-ScFv y Fab-VHH.

La **FIG. 13** representa la transfección *in vitro* de CMH con NPL conjugadas con Ab1 y que encapsulan ARNm de mCherry a diferentes densidades de Fab.

Las **FIGS. 14A-14C** representan la edición *in vitro* de genes de CMH utilizando NPL conjugadas con Ab1 y que portan ARN para la maquinaria de edición génica. Las CMH primarias se cultivaron *in vitro* y se trataron con NPL que encapsulaba ARNm de CRISPR y guías de beta-2-microglobulina (B2M). El efecto de la edición génica se midió mediante citometría de flujo dirigida al marcador de superficie celular B2M. La **FIG. 14A** muestra resultados ilustrativos de citometría de flujo de NPL conjugadas con Ab1 (Ab de unión), que reconocen células madre hematopoyéticas a largo plazo (CMH-LP). La **FIG. 14B** muestra resultados ilustrativos de citometría de flujo de NPL conjugada con Ab1 mutado (mutAb1, Ab^m sin unión). La **FIG. 14C** muestra el porcentaje promedio de células que presentaron una inactivación de la expresión de la proteína B2M en muestras tratadas con NPL conjugadas con Ab1 y mutAb1 sin unión.

Las **FIGS. 15A-15F** representan la transfección *in vivo* de CMH a largo plazo (CMH-LP) humanas injertadas en ratones NSGTM. La **FIG. 15A** muestra resultados ilustrativos de citometría de flujo que ilustran la estrategia de selección de citometría de flujo para identificar CMH-LP utilizando los marcadores CD34 y CD117 (CD34 es un marcador de CMH ubicuo y CD117 es un marcador de CMH a largo plazo). La eficiencia de la transfección se evaluó midiendo el porcentaje de células positivas para mCherry. Las células se seleccionaron inicialmente utilizando anticuerpos contra células CD45⁺ humanas y de ratón, para diferenciar las CMH humanas de la mezcla con CMH de ratón. La **FIG. 15B** representa un resultado de citometría de flujo ilustrativo adicional que muestra la expresión de mCherry en células seleccionadas usando la estrategia de selección ilustrada en la **FIG. 15A**. La **FIG. 15C** muestra el porcentaje promedio de CMH-LP positivas para mCherry de ratones tratados con NPL de lípido 15 recubiertas con Fab Ab1, Fab mutAb1 no dirigido o NPL sin recubrimiento (desnudas) que encapsulan el ARNm de mCherry. La **FIG. 15D** muestra el porcentaje promedio de CMH-LP positivas para mCherry de ratones tratados con NPL K3 recubiertas con Fab Ab1 o el Fab mutAb1 no dirigido que encapsulan ARNm de mCherry. La **FIG. 15E** muestra la cantidad de proteína mCherry normalizada por la proteína total detectada en tejidos hepáticos de ratones tratados con NPL de lípido 15 recubiertas con el Fab Ab1, el Fab mutAb1 no dirigido o NPL sin recubrimiento (desnudas) que encapsulan el ARNm de mCherry. La **FIG. 15F** muestra la cantidad de proteína mCherry normalizada por la proteína total detectada en tejidos hepáticos de ratones tratados con NPL KC3 recubiertas con el Fab Ab1, el Fab mutAb1 no dirigido o NPL sin recubrimiento (desnudas) que encapsulan el ARNm de mCherry. En las **FIGS. 15B-E**, el tamaño de la muestra fue de 2 a 9 ratones para cada condición de tratamiento. Los gráficos de barras muestran datos como valores medios $\pm$ DE; **** indica $P < 0.0001$; * indica $P < 0.05$; "ns" indica no significativo.

La **FIG. 16** representa la transfección *in vivo* de CMH-LP humanas injertadas en ratones NSGTM, que muestran el porcentaje promedio de CMH-LP que son positivas para mCherry de ratones tratados con NPL de lípido 15 recubiertas con el Fab Ab1 que encapsula ARNm de mCherry y de ratones sin tratar.

La **FIG. 17** representa la transfección *in vivo* de CMH de macaco cangrejero con NPL recubiertas con el Fab Ab1. Se aislaron CMH-LP de médula ósea de macaco cangrejero y se identificaron usando los marcadores CD34 y CD117. Se muestra el porcentaje promedio de CMH-LP que eran positivas para mCherry para muestras tratadas con NPL de lípido 15 que estaban recubiertas con el Fab Ab1, recubiertas con el Fab mutAb1 sin direccionamiento o no estaban recubiertas.

La **FIG. 18** representa resultados ilustrativos de citometría de flujo que ilustran la estrategia de selección de citometría de flujo para identificar CMH-LP de macaco cangrejero usando los marcadores CD34 y CD117 de macaco cangrejero (CD34 es un marcador de CMH ubicuo y CD117 es un marcador de CMH a largo plazo). La eficiencia de transfección se evaluó midiendo el porcentaje de células positivas para mCherry.

Las **FIGS. 19A-19B** representan la transfección *in vivo* de CMH-LP en macacos cangrejeros. Los macacos cangrejeros se trataron en primer lugar por vía intramuscular con difenhidramina a una dosis de 2 mg/kg y, 30 minutos después, se trataron por vía intravenosa con NPL dirigidas a CMH a diversas dosis como se muestra en el eje x. Se recogieron muestras de la médula ósea 24 h después del tratamiento mediante aspiración de la cresta ilíaca y se analizaron mediante citometría de flujo usando indicador mCherry. La **FIG. 19A** muestra el porcentaje promedio de CMH-LP que son positivas para mCherry de macacos cangrejeros tratados con NPL de lípido 15 recubiertas con el Fab Ab1 que encapsulan ARNm de mCherry. La **FIG. 19B** muestra el porcentaje promedio de CMH-LP positivas para mCherry de macacos cangrejeros tratados con NPL KC3 recubiertas con el Fab Ab1 que encapsulan ARNm de mCherry. Las NPL se administraron por vía intravenosa a diversas dosis, como se muestra en los ejes horizontales. Cada punto de datos marcado representa un único macaco cangrejero, con uno o dos macacos cangrejeros ensayados por cada combinación de NPL y dosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona nanopartículas lipídicas (NPL) que se dirigen específicamente a las células madre hematopoyéticas (CMH) y suministran ácidos nucleicos encapsulados en las NPL a las CMH. En algunos aspectos, la NPL para suministro dirigido comprende (a) un conjugado de lípido-anticuerpo que comprende el compuesto de fórmula (I): [Lípido]-[conector opcional]-[anticuerpo] (I); y (b) un lípido catiónico ionizable; y (c) uno o más ácidos nucleicos dispuestos en la NPL. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a CD105 y/o CD117. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos comprenden un ARNm que codifica una nucleasa y un ARN guía asociado. También se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden la NPL y métodos para elaborar y usar la NPL para la edición génica en CMH.

La práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química orgánica, farmacología, biología celular y bioquímica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía, tal como en "Síntesis Orgánica Integral" (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. A continuación se exponen diversos aspectos de la invención 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 varios términos y expresiones.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria tienen su significado convencional dentro de la técnica química y biológica. Las estructuras y fórmulas químicas establecidas en la presente memoria deben interpretarse según las normas convencionales de valencia química conocidas en la técnica química. Además, cuando un grupo químico es un dirradical, por ejemplo, se entiende que los grupos químicos pueden unirse a sus átomos adyacentes en el resto de la estructura en una o ambas orientaciones, por ejemplo, $-\text{OC}(\text{O})-$ es intercambiable con $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ u $-\text{OC}(\text{S})-$ es intercambiable con $-\text{C}(\text{S})\text{O}-$.

Los términos "un" y "una" como se emplean en esta memoria significan "uno o más" e incluyen el plural a menos que el contexto sea inadecuado. 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.

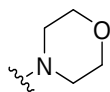
El término "alquilo", como se emplea en esta memoria, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado, tal como un grupo lineal o ramificado de 1-12, 1-10 o 1-6 átomos de carbono, denominado en la presente memoria alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{12}$, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, respectivamente. En algunas realizaciones, el alquilo está opcionalmente sustituido. Los grupos alquilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, 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 "alquileo" se refiere a un dirradical de un grupo alquilo. En algunas realizaciones, el alquileo está opcionalmente sustituido. Un grupo alquileo ilustrativo es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo que está sustituido con al menos un halógeno. Por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{FQ}_3$ y similares.

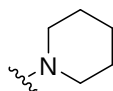
El término "oxo" está reconocido en la técnica y se refiere a un sustituyente $=\text{O}$. Por ejemplo, un ciclopentano sustituido con un grupo oxo es ciclopentanona.

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", ya sea precedido o no por el término "opcionalmente", significa que uno o más hidrógenos del resto designado se reemplazan con un sustituyente adecuado. salvo que se indique lo contrario, 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 estar sustituida con más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas en esta invención son preferiblemente las que dan lugar a la formación de compuestos estables o químicamente viables. En algunas realizaciones, "opcionalmente sustituido" equivale a "sin sustituir o sustituido". En algunas realizaciones, "opcionalmente sustituido" indica que el átomo o grupo designado está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre 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 de forma independiente 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, -CF₂FQ₃ y similares.

El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado monovalente cíclico, bicíclico, cíclico con puentes (p. ej., adamantilo) o espirocíclico de 3-12, 3-10, 3-8, 4-8 o 4-6 carbonos, mencionado en la presente memoria, p. ej., como "cicloalquilo C₄₋₈", derivado de un cicloalcano. En algunas realizaciones, el cicloalquilo está opcionalmente sustituido. Los grupos cicloalquilo ilustrativos incluyen, pero sin limitación, ciclohexanos, ciclopentanos, ciclobutanos y ciclopropanos. A menos que se especifique lo contrario, los grupos cicloalquilo están opcionalmente sustituidos en una o más posiciones del anillo con, por ejemplo, alcanoílo, 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, está sin sustituir.

Las expresiones "heterociclilo" y "grupo heterocíclico" son reconocidos en la técnica y se refieren a estructuras de anillos saturadas, parcialmente insaturadas o aromáticas de 3 a 10 miembros, como alternativa, anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen entre uno y cuatro heteroátomos, tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunas realizaciones, el heterociclilo está opcionalmente sustituido. El número de átomos del anillo en el grupo heterociclilo se puede especificar usando la nomenclatura C_x-C_x donde x es un número entero que especifica el número de átomos del anillo. Por ejemplo, un grupo heterociclilo C₃-C₇ se refiere a una estructura de anillo saturada o parcialmente

insaturada de 3 a 7 miembros que contiene entre uno y cuatro heteroátomos, tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. La designación "C₃-C₇" indica que el anillo heterocíclico contiene un total de 3 a 7 átomos en el anillo, incluido cualquier heteroátomo que ocupe una posición de átomo en el anillo. Un ejemplo de heterociclilo C₃ es aziridinilo. Los heterociclos pueden ser, por ejemplo, sistemas de anillos monocíclicos, 5 bicíclicos u otros multicíclicos (p. ej., bicíclico fusionado, espiro, con puentes). Un heterociclo puede estar fusionado con uno o más anillos de arilo, 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, 10 pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolidin-2-onilo, pirrolinilo, tetrahidrofurilo, tetrahidroisoquinolilo, tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolilo, tiazolidinilo, tiolanilo, tiomorfolinilo, tiopiranilo, xantenilo, lactonas, lactamas tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas y similares. A menos que se especifique lo contrario, el anillo heterocíclico está opcionalmente sustituido en una o más posiciones con sustituyentes tales como alcanolilo, alcoxi, alquilo, alquenilo, alquinilo, amido, amidino, amino, arilo, arilalquilo, azido, carbamato, 15 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, está sin sustituir.

El término "arilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un grupo aromático carbocíclico. En 20 algunas realizaciones, el arilo está opcionalmente sustituido. Los grupos arilo representativos incluyen fenilo, naftilo, antraceno 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 contiguos (los anillos son "anillos fusionados") en donde al menos uno de los anillos es aromático y, p. ej., el o los otros anillos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos y/o arilos. A menos que se especifique lo contrario, el anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones del anillo con, por ejemplo, 25 restos de halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, 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. En determinadas realizaciones, el anillo aromático está sustituido en una o más posiciones del anillo con 30 halógeno, alquilo, hidroxilo o alcoxi. En ciertas otras realizaciones, el anillo aromático no está sustituido, es decir, está sin sustituir. En determinadas realizaciones, el grupo arilo es una estructura de anillo de 6 a 10 miembros. En algunas realizaciones, el grupo arilo es un arilo C₆-C₁₄.

El término "heteroarilo" se reconoce 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. 35 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 menos que se especifique lo contrario, 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 carbocíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos (los anillos son "anillos fusionados") en donde al menos uno de los anillos es heteroaromático y, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos y/o arilos. En determinadas 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, está sin sustituir. En determinadas realizaciones, el grupo heteroarilo es una estructura de anillo de 5 a 10 miembros, como alternativa 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" se reconocen en la técnica y se refieren tanto a aminas sin sustituir como sustituidas, p. ej., un resto representado por la fórmula general -N(R¹⁰)(R¹¹), en donde R¹⁰ y R¹¹ representan cada uno de forma independiente 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 del anillo; R¹² representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclo o un policiclo; y m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8. En determinadas realizaciones, R¹⁰ y R¹¹ representan cada uno de forma independiente hidrógeno, alquilo, alquenilo o -(CH₂)_m-R¹².

Los términos "alcoxilo" o "alcoxi" se reconocen en la técnica y se refieren a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical de oxígeno unido al mismo. En algunas realizaciones, el alcoxilo está opcionalmente sustituido. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, *tert*-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 estar representado por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo, O-alquinilo, -O-(CH₂)_m-R¹², donde m y R¹² se han descrito 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 determinadas realizaciones, el haloalcoxilo es un grupo alcoxilo que está sustituido con al menos un grupo fluoro. En determinadas realizaciones, el haloalcoxilo es un grupo alcoxilo que está sustituido con 1-6, 1-5, 1-4, 2-4 o 3 grupos fluoro.

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

Los compuestos de la descripción pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por lo tanto, existen como estereoisómeros, tales como isómeros geométricos, enantiómeros o diastereómeros. El término "estereoisómeros", cuando se utiliza 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 diversos estereoisómeros de estos compuestos y mezclas de

los mismos. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros y diastereómeros. Las mezclas de enantiómeros o diastereómeros pueden denominarse "(±)" en la nomenclatura, pero el experto reconocerá que una estructura puede indicar implícitamente un centro quiral. Se entiende que las representaciones gráficas de las estructuras químicas, p. ej., estructuras químicas genéricas, abarcan todas las formas estereoisoméricas de los compuestos especificados, salvo que se indique lo contrario.

Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la presente invención se pueden preparar sintéticamente a partir de materiales de partida disponibles en el mercado que contienen centros asimétricos o estereogénicos, o mediante la preparación de mezclas racémicas seguidas de métodos de resolución bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos de resolución se ilustran mediante (1) unión de una mezcla de enantiómeros a un auxiliar quiral, separación de la mezcla resultante de diastereómeros mediante recristalización o cromatografía y liberación del producto ópticamente puro del auxiliar, (2) formación de sal 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 se pueden resolver en los estereoisómeros que las componen mediante métodos bien conocidos, tales como la cromatografía de gases en fase quiral, cromatografía de líquidos de alta resolución en fase quiral, cristalización del compuesto como un complejo de sal quiral o cristalización del compuesto en un disolvente quiral. Además, los enantiómeros se pueden separar usando técnicas de cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) descritas en la bibliografía. Adicionalmente, los estereoisómeros se pueden obtener a partir de intermedios estereoméricamente puros, reactivos y catalizadores mediante métodos sintéticos asimétricos bien conocidos.

También pueden existir isómeros geométricos en los compuestos de la presente invención. El símbolo " " indica un enlace que puede ser sencillo, 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 sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono o la disposición de sustituyentes alrededor de un anillo carbocíclico. Se designa que los sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono están en la configuración "Z" o "E" en donde los términos "Z" y "E" se utilizan de acuerdo con las normas de la IUPAC. Salvo que se especifique lo contrario, las estructuras que representan dobles enlaces abarcan los isómeros tanto "E" como "Z".

Como alternativa, los sustituyentes alrededor de un doble enlace carbono-carbono pueden denominarse "*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 denomina "*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 en el mismo lado y en lados opuestos del plano del anillo se denominan "*cis/trans*".

La invención también abarca compuestos de la invención marcados isotópicamente que son idénticos a los mencionados en la presente memoria, excepto por que 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 más habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en 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.

Determinados compuestos descritos marcados isotópicamente (p. ej., los marcados con ^3H y ^{14}C) son útiles en ensayos de distribución de compuestos y/o sustratos en tejidos. 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 proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica (p. ej., mayor semivida *in vivo* o menores requisitos de dosificación) y, por lo tanto, puede 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 no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente.

Como se emplea en esta memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a organismos que se van a tratar mediante los métodos de la presente invención. Dichos organismos son preferiblemente mamíferos (p. ej., murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares) y más preferiblemente seres humanos.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "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*.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (p. ej., tales como emulsión de aceite/agua o de agua/aceite) y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes, véase Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams y Wilkins, Baltimore, MD, 2006.

Como conocen los expertos en la técnica, las "sales" de los compuestos de la presente invención pueden derivar de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos incluyen, pero sin limitación, ácido 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, bencenosulfónico y similares. Otros ácidos, tales como el oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, se puede emplear en la preparación de sales útiles como intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables.

Los ejemplos de bases incluyen, pero sin limitación, 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 sin limitación: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato,

digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, 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 los aniones de los compuestos de la presente invención combinados 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 utilizadas en esta 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-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), cloruro de tetrabutildimetilsililo (TBDMS-Cl), fluoruro de hidrógeno (HF), fenilo (Ph), bis(trimetilsilil)amina (HMDS), dimetilformamida (DMF); cloruro de metileno (DCM); tetrahidrofurano (THF); cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); espectrometría de masas (MS), detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), electronebulización (ES)); espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

Como se emplea en esta memoria, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto (p. ej., un ácido nucleico, p. ej., un ARNm) suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que se limite a una formulación o vía de administración particular. Se puede considerar que la expresión cantidad eficaz incluye cantidades terapéutica y/o profilácticamente eficaces de un compuesto.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se emplea en esta 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 eficaz 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) con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

La expresión "cantidad profilácticamente eficaz", como se emplea en esta 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 eficaz 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) al reducir, minimizar o eliminar el riesgo de contraer una afección o reducir o minimizar la gravedad de una afección con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Como se emplea en esta memoria, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" incluyen cualquier efecto, p. ej., disminución, reducción, modulación, mejora o eliminación, que dé lugar a la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares, o mejora de un síntoma de los mismos.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que sean, dentro del alcance del

buen criterio 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, en línea con una relación beneficio/riesgo razonable.

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

Además, debe entenderse que los elementos y/o características de una composición o un método descrito en la presente memoria se pueden combinar de diversas maneras sin desviarse del espíritu y alcance de la presente invención, ya sea explícito o implícito en la presente memoria. Por ejemplo, cuando se hace referencia a un compuesto particular, ese compuesto se puede usar en diversas realizaciones de composiciones de la presente invención y/o en métodos de la presente invención, a menos que se entienda lo contrario por el contexto. En otras palabras, dentro de la presente solicitud, las realizaciones se han descrito y representado de una manera que permita escribir y dibujar una solicitud clara y concisa, pero se pretende y se apreciará que las realizaciones se pueden combinar o separar de diversas formas sin desviarse de las presentes enseñanzas e invenciones. Por ejemplo, se apreciará que todas las características descritas y representadas en la presente memoria pueden ser aplicables a todos los aspectos de la invención o invenciones descritas y representadas en la presente memoria.

Debe entenderse que la expresión "al menos uno de" incluye individualmente cada uno de los objetos enumerados después de la expresión y las diversas combinaciones de dos o más de los objetos enumerados, a menos que se entienda lo contrario por el contexto y el uso. Se debe entender que la expresión "y/o" en relación con tres o más objetos enumerados tiene el mismo significado a menos que se entienda lo contrario por el contexto.

El uso del término "incluir", "incluye", "incluyendo", "tener", "tiene", "teniendo", "contener", "contiene" o "conteniendo", incluidos equivalentes gramaticales de los mismos, debe entenderse en general como abierto y no limitante, por ejemplo, sin excluir elementos o etapas adicionales no mencionados, a menos que se indique específicamente o se entienda lo contrario por el contexto.

Cuando el uso de la expresión "aproximadamente" esté delante de un valor cuantitativo, la presente invención también incluye el valor cuantitativo específico en sí, a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se emplea en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a una variación de $\pm 10\%$ del valor nominal a menos que se indique o infiera lo contrario.

Como se emplea en esta memoria, salvo que se indique lo contrario, el término "anticuerpo" significa cualquier molécula o complejo molecular de unión a antígeno que comprenda al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se una específicamente a un antígeno particular o interactúe con él. 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, fragmento de unión a

antígeno del mismo o fragmento Fc que se haya modificado o diseñado. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla (p. ej., scFv), minicuerpos y diacuerpos. Los ejemplos de anticuerpos que se han modificado o diseñado 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}).

Los anticuerpos de origen natural normalmente comprenden un tetrámero. Cada uno de dichos tetrámeros se compone normalmente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" de longitud completa (que normalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (que normalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las expresiones "cadena pesada" y "cadena ligera" como se emplean en esta memoria, se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tenga una secuencia de dominio variable suficiente para conferir especificidad por un antígeno diana. La parte amino terminal de cada cadena ligera y pesada normalmente incluye un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que normalmente es responsable del reconocimiento de antígenos. La parte carboxilo terminal de cada cadena normalmente define un dominio constante responsable de la función efectora. Por lo tanto, en un anticuerpo de origen natural, un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada de longitud completa incluye un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}), en donde el dominio V_H está en el extremo amino del polipéptido y el dominio C_{H3} está en el extremo carboxilo, y un polipéptido de inmunoglobulina de cadena ligera de longitud completa incluye un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L), en donde el dominio V_L está en el extremo amino del polipéptido y el dominio C_L está en el extremo carboxilo.

Las cadenas ligeras humanas se clasifican normalmente como cadenas ligeras kappa y lambda, y las cadenas pesadas humanas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, que incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases que incluyen, pero sin limitación, IgM1 e IgM2. IgA se subdivide de manera similar en subclases que incluyen, pero sin limitación, IgA1 e IgA2. Dentro de cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, los dominios variables y constantes normalmente están unidos por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, p. ej., FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2ª ed., 1989), que se incorpora por referencia en su totalidad para todos los fines. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada normalmente forman un sitio de unión a antígeno. Los dominios variables de anticuerpos de origen natural presentan normalmente la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par normalmente están alineadas por las regiones marco conservadas, lo que puede permitir la unión con un epítipo específico. Desde el extremo amino al extremo

carboxilo, los dominios variables de cadena tanto ligera como pesada normalmente comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

La expresión "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres CDR que aparecen en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente según diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de restos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de restos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-17; Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342: 877-83) descubrieron que determinadas subpartes dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad en el nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subpartes se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que solapan con CDR de Kabat. Se han descrito otros límites que definen las CDR que solapan con las CDR de Kabat en Padlan, 1995, *FASEB J.* 9: 133-39; MacCallum, 1996, *J. Mol. Biol.* 262(5): 732-45; y Lefranc, 2003, *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77. Otras definiciones más de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas descritos en esta memoria, pero, no obstante, solaparán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de la predicción o los hallazgos experimentales de que restos o grupos de restos particulares o incluso CDR completos no influyen significativamente en la unión al antígeno. Los métodos empleados en esta memoria pueden utilizar CDR definidas según cualquiera de estos sistemas, aunque determinadas realizaciones usan CDR definidas por Kabat o Chothia. La identificación de CDR predichas usando la secuencia de aminoácidos es bien conocida en el campo, tal como en Martin, A.C. "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains", *In Antibody Engineering*, Vol. 2. Kontermann R., Dübel S., eds. Springer-Verlag, Berlín, págs. 33–51 (2010). La secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera también puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR mediante otros métodos convencionales, p. ej., por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Las secuencias numeradas pueden alinearse a simple vista o empleando un programa de alineación tal como uno de los programas del paquete CLUSTAL, como se describe en Thompson, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-80. Se usan de manera convencional modelos moleculares para delinear correctamente las regiones marco conservadas y CDR y, por tanto, corregir las asignaciones basadas en secuencias.

El término "Fc" como se emplea en esta memoria se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento que no se une a antígeno resultante de la digestión de un anticuerpo o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de bisagra. La fuente original de inmunoglobulina del Fc nativo es preferiblemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Las moléculas Fc están

compuestas de polipéptidos monoméricos que pueden unirse en formas diméricas o multiméricas por asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas varía de 1 a 4 según la clase (p. ej., IgG, IgA e IgE) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 y IgGA2). Un ejemplo de un Fc es un dímero unido por enlaces disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG. La expresión "Fc nativo" como se emplea en esta memoria es genérica para las formas monoméricas, diméricas y multiméricas.

Un fragmento F(ab) normalmente incluye una cadena ligera y los dominios V_H y C_{H1} de una cadena pesada, en donde la parte de cadena pesada V_H - C_{H1} del fragmento F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otro polipéptido de cadena pesada. Como se emplea en esta memoria, un fragmento F(ab) también puede incluir una cadena ligera que contiene dos dominios variables separados por un conector de aminoácidos y una cadena pesada que contiene dos dominios variables separados por un conector de aminoácidos y un dominio C_{H1} .

Un fragmento F(ab') normalmente incluye una cadena ligera y una parte de una cadena pesada que contiene más de la región constante (entre los dominios C_{H1} y C_{H2}), de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula de F(ab')₂.

Como se emplea en esta memoria, 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.

Como se emplea en esta memoria, un "enlace disulfuro interno intercatenario" o un "enlace disulfuro intercatenario interno" se refiere a un enlace disulfuro en un polipéptido que no es fácilmente accesible a agentes reductores hidrosolubles o que está efectivamente "interno" en las regiones hidrófobas del polipéptido, de modo que no está disponible ni para agentes reductores ni para conjugación con otros PEG hidrófilos. Los enlaces disulfuro internos intercatenarios se describen con más detalle en el documento WO2017096361A1, que se incorpora por referencia en su totalidad.

Como se emplea en esta memoria, la especificidad del suministro dirigido por una NPL se define por la relación entre el % de células madre hematopoyéticas (CMH) que reciben el ácido nucleico suministrado (p. ej., suministro específico) y el % de un tipo celular no deseado o que no es diana, que no se pretende que sea el destino del suministro, pero recibe el ácido nucleico suministrado (p. ej., suministro inespecífico). Por ejemplo, la especificidad es mayor cuando más CMH reciben el ácido nucleico suministrado y/o cuando menos células de otros tipos reciben el ácido nucleico suministrado. La especificidad del suministro dirigido por una NPL también puede definirse por la relación entre la cantidad de ácido nucleico que se suministra a las CMH (p. ej., suministro específico) y la cantidad de ácido nucleico que se suministra a células de otros tipos (p. ej., suministro inespecífico). La especificidad del suministro se puede determinar usando cualquier método adecuado. Como ejemplo no limitante, el nivel de expresión del ácido nucleico en las CMH se puede medir y comparar con el de otro tipo de célula que no se pretende que sea el destino del suministro.

Como se emplea en esta memoria, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo de origen total o parcialmente no humano y cuya secuencia proteica se ha modificado para sustituir determinados

aminoácidos, por ejemplo, que se produce en la(s) posición(es) correspondiente(s) en las regiones marco conservadas de los dominios VH y VL en una secuencia de anticuerpo de un ser humano, para aumentar su similitud con los anticuerpos producidos de forma natural en seres humanos, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmunitaria en seres humanos. Por ejemplo, utilizando técnicas de ingeniería genética, los dominios variables de anticuerpos no humanos 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.

Como se emplea en esta memoria, el término "espaciador" o "conector" indica un péptido que fusiona dos o más polipéptidos o proteínas en una sola molécula. El uso de espaciadores para conectar dos o más (poli)péptidos es bien conocido en la técnica. En la tabla C se muestran otros espaciadores peptídicos ilustrativos. Una clase de espaciador peptídico utilizada con frecuencia se conoce como espaciadores "Gly-Ser" o "GS". Estos son espaciadores que consisten esencialmente en restos de glicina (G) y serina (S), y normalmente comprenden una o más repeticiones de un motivo peptídico tal como el motivo GGGGS (SEQ ID NO: 45) (por ejemplo, que tiene la fórmula (Gly -Gly-Gly-Gly-Ser)_n en la que n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más). Algunos ejemplos utilizados frecuentemente de dichos espaciadores GS son los espaciadores 9GS (GGGSGGGGS, SEQ ID NO: 48), espaciadores 15GS (n=3) y espaciadores 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).

Como se emplea en esta memoria, la expresión "lípidos estructurales" se refiere a esteroides y también a lípidos que contienen restos de esteroides.

Debe entenderse que el orden de las etapas o el orden para realizar determinadas acciones es irrelevante mientras la presente invención siga siendo operativa. Por otra parte, se podrán realizar dos o más etapas o acciones simultáneamente.

En diversos lugares de la presente memoria descriptiva, los sustituyentes se describen en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que la descripción incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos e intervalos. Por ejemplo, la expresión "alquilo C₁₋₆" está destinada específicamente a desvelar 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 intervalo de 0 a 40 está destinado específicamente a desvelar 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 intervalo de 1 a 20 está destinado específicamente a desvelar 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 expresiones ilustrativas en esta memoria, por ejemplo, "tales como" o "incluidos", está destinado simplemente a ilustrar mejor la presente invención y no supone una limitación del alcance de la invención salvo que se reivindique. Ningún lenguaje de la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de que algún elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la presente invención.

A lo largo de la descripción, cuando se describe que las composiciones y kits tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, o cuando se describe que los procesos y métodos tienen, incluyen o comprenden etapas específicas, se contempla que, adicionalmente, existen composiciones y kits de la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes enumerados, y que existen procesos y métodos según la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento enumeradas.

Como norma general, las composiciones que especifican un porcentaje son en peso salvo que se especifique lo contrario. Además, si una variable no va acompañada de una definición, tiene prevalencia la definición anterior de la variable.

II. COMPOSICIONES DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

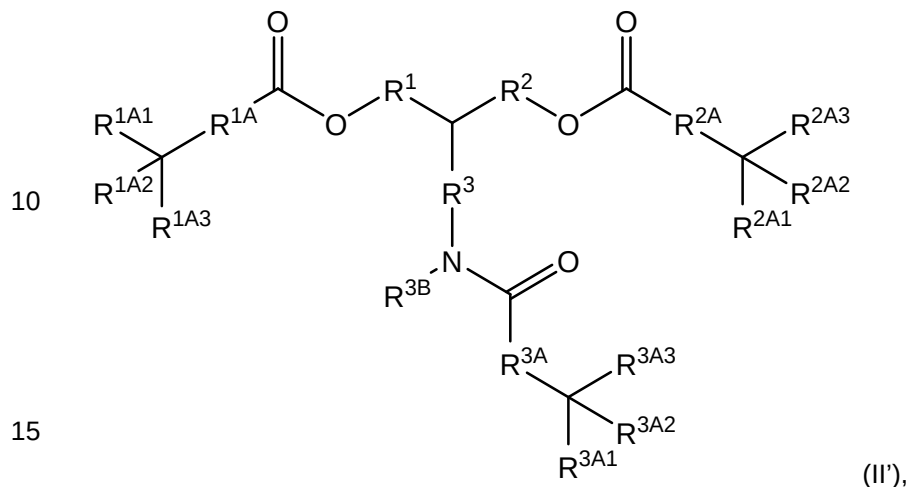
La invención proporciona una composición de nanopartículas lipídicas (NPL) que comprende un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria y/o un conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugado de lípido-anticuerpo) descrito en la presente memoria. En determinadas realizaciones, la NPL puede comprender un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria y uno o más de un esteroles, un fosfolípido neutro, un PEG-lípido y un conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a células inmunitarias. En algunas realizaciones, la NPL comprende una mezcla de lípidos que comprende el lípido catiónico ionizable y uno o más de un esteroles, un fosfolípido neutro, un PEG-lípido y un conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugado de lípido-anticuerpo).

(a) Lípidos catiónicos ionizables

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable. Cuando se usan en una composición de nanopartículas lipídicas, dichos lípidos catiónicos ionizables pueden facilitar el suministro de una carga útil (p. ej., un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN, tal como un ARNm) dispuesta en los mismos a células, p. ej., células de mamíferos, p. ej., células madre hematopoyéticas (CMH). Dichos 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 se degradan 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 de los lípidos ionizables, los grupos hidrófobos de "cola de acilo" y los conectores que conectan el grupo de cabeza y los grupos de cola de acilo. Normalmente, la pK_a del grupo de cabeza de amina ionizable está diseñada para estar en el intervalo de 6-8, tal como entre 6.2 y 7.4 o entre 6.7 y 7.2, de modo que permanezca fuertemente catiónica en condiciones de formulación ácidas (p. ej., pH 4 – pH 5.5), neutra o ligeramente aniónica en pH fisiológico (7.4) y catiónica en los compartimentos endosómicos temprano y tardío (p. ej., pH 5.5 – pH 7). Los grupos de cola de acilo desempeñan una función clave en la fusión de la nanopartícula lipídica con las membranas endosómicas y la desestabilización de la membrana mediante alteraciones estructurales. Se cree que la estructura tridimensional de la cola de acilo (determinada por su longitud y el grado y sitio de insaturación) junto con los tamaños relativos del grupo de cabeza y del grupo de cola participan en la promoción de la fusión de membranas y, por lo tanto, en el escape endosómico de las nanopartículas lipídicas (un requisito

clave para el suministro citosólico de una carga útil de ácido nucleico). El conector que conecta el grupo de cabeza y los grupos de cola de acilo está diseñado para ser degradado por enzimas fisiológicamente prevalentes (p. ej., esterasas o proteasas) o por hidrólisis catalizada por ácidos.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable representado por la Fórmula (II'):



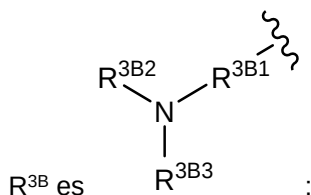
o una de sus sales, en donde:

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

R^{1A} , R^{2A} y R^{3A} son cada uno de forma independiente 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 de forma independiente 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 de forma independiente 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 de forma independiente H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, cada uno seleccionado de forma independiente 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 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 de forma independiente 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} ,

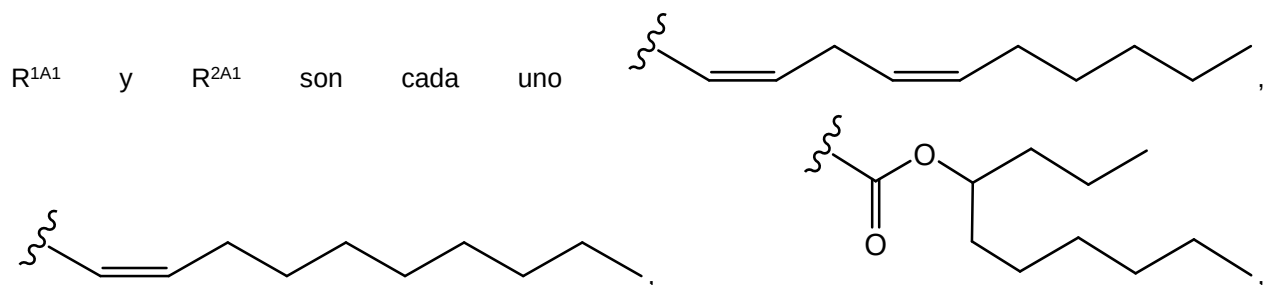
R^{s11} , R^{s12} , R^{s13} , R^{s14} y R^{s15} son cada uno de forma independiente H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-10} , arilo C_{6-14} , heteroarilo de 5 a 10 miembros, o heterociclilo de 3 a 10 miembros, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido.

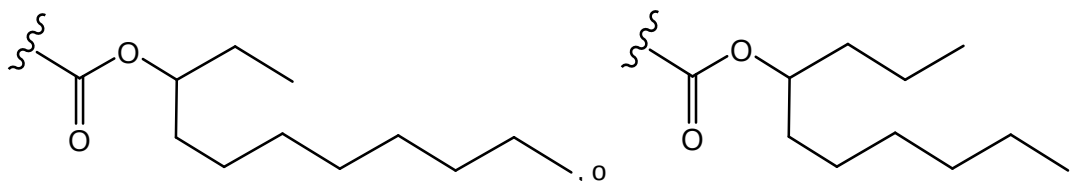
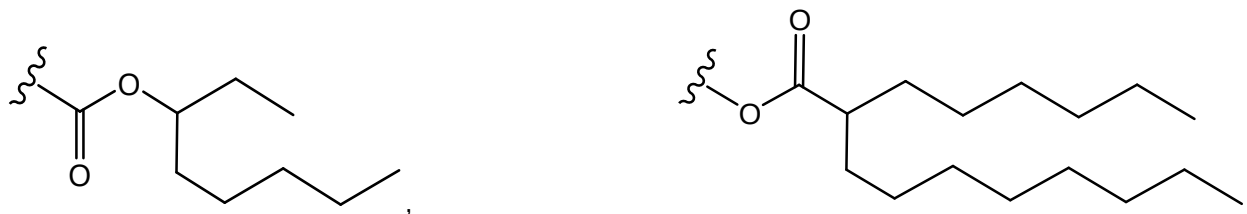
En algunas realizaciones, R^1 , R^2 y R^3 son cada uno de forma independiente un enlace o alquileo C_{1-3} . En algunas realizaciones, R^1 , R^2 y R^3 son cada uno de forma independiente un enlace o metileno. En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son cada uno metileno y R^3 es un enlace. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 y R^3 son cada uno metileno. En algunas realizaciones, R^1 , R^2 y R^3 están cada uno de forma independiente sustituidos o sin sustituir.

En algunas realizaciones, R^{1A} , R^{2A} y R^{3A} son cada uno de forma independiente un enlace o alquileo C_{1-10} . En algunas realizaciones, R^{1A} , R^{2A} y R^{3A} son cada uno de forma independiente un enlace o $-(CH_2)_{1-10}-$. En algunas realizaciones, R^{1A} y R^{2A} son cada uno de forma independiente 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 uno de forma independiente 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 de forma independiente sustituidos o sin sustituir.

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 de forma independiente H, alquilo C_{1-20} , alquileo C_{1-20} , $-(CH_2)_{0-10}C(O)OR^{a1}$ o $-(CH_2)_{0-10}C(O)R^{a2}$. 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 de forma independiente H, alquilo C_{1-15} , $-\text{CH}=\text{CH}-(\text{alquilo } C_{1-15})$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{alquilo } C_{1-10})$, $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$, $-(CH_2)_{0-4}C(O)CH(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$, $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-15})$ o $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2(\text{alquilo } C_{1-15})$. 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 de forma independiente sustituidos o sin sustituir.

En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno de forma independiente $-\text{CH}=\text{CH}-(\text{alquilo } C_{1-15})$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{alquilo } C_{1-10})$, $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$ o $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH(\text{alquilo } C_{1-10})(\text{alquilo } C_{1-15})$; y R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A2} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones,

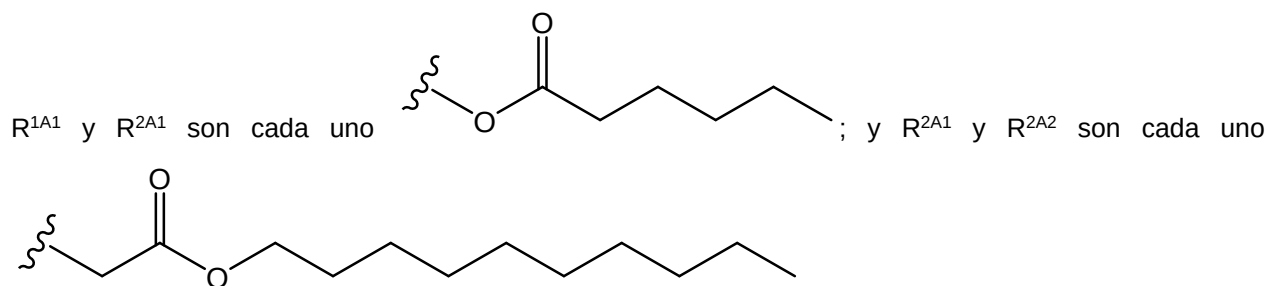




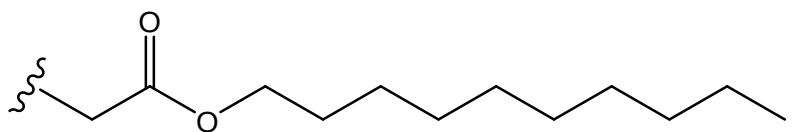
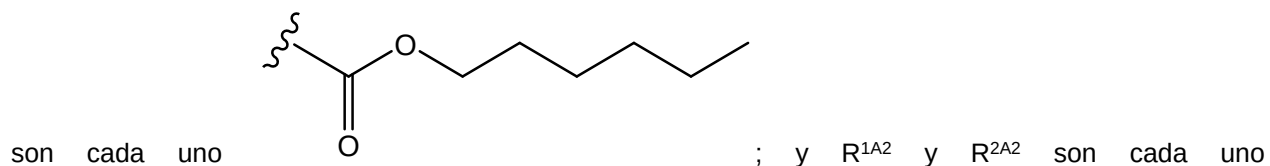
En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno alquilo C_{1-15} ; R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno alquilo C_{1-15} ; y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno

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

En algunas realizaciones, R^{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,



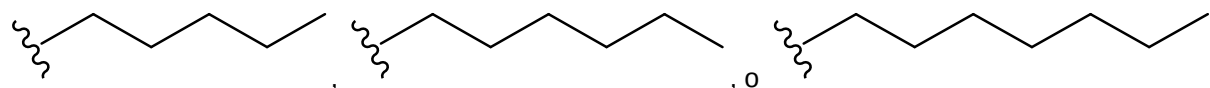
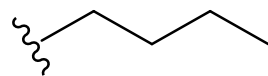
En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1} son cada uno $-C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-15}); R^{1A2} y R^{2A2} son cada uno $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2$ (alquilo C_{1-15}); y R^{1A3} y R^{2A3} son cada uno H. En algunas realizaciones, R^{1A1} y R^{2A1}



En algunas realizaciones, R^{3A1} , R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno de forma independiente 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}).

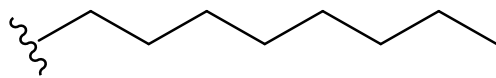
En algunas realizaciones, R^{3A1} y R^{3A2} son cada uno de forma independiente alquilo C_{1-15} ; y R^{3A3} es

H. En algunas realizaciones, R^{3A1} y R^{3A2} son cada uno de forma independiente etilo,



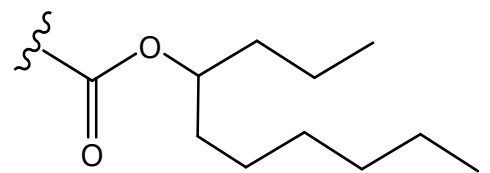
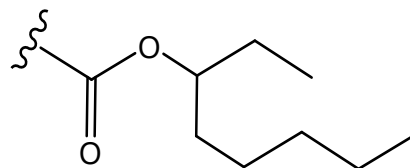
En algunas realizaciones, R^{3A1} es alquilo C_{1-15} ; y R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno H. En algunas

realizaciones, R^{3A1} es

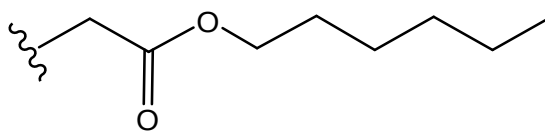
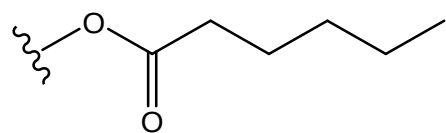
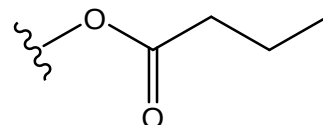


En algunas realizaciones, R^{3A1} es $-C(O)OCH(\text{alquilo } C_{1-5})(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno

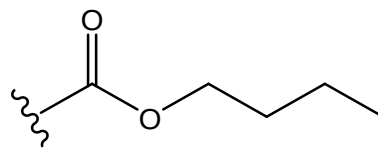
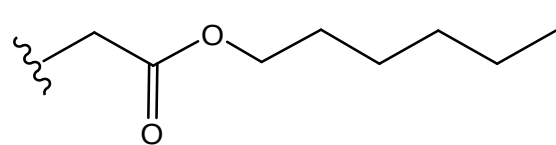
H. En algunas realizaciones, R^{3A1} es



En algunas realizaciones, R^{3A1} es $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; R^{3A2} es $-(CH_2)_{0-4}OC(O)CH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A1} es

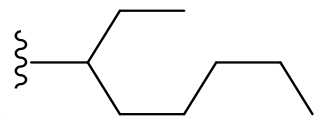


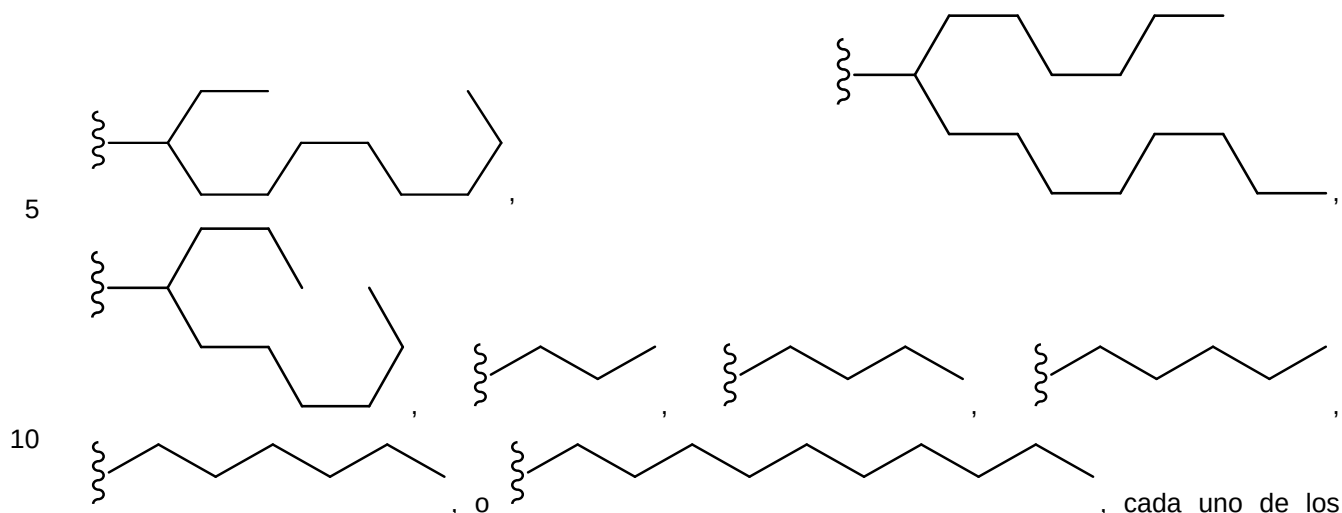
En algunas realizaciones, R^{3A1} es $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; R^{3A2} es $-(CH_2)_{0-4}C(O)OCH_2(\text{alquilo } C_{1-10})$; y R^{3A3} es H. En algunas realizaciones, R^{3A1} es



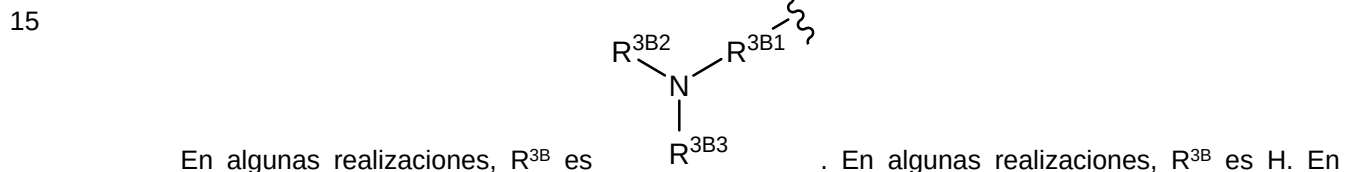
En algunas realizaciones, R^{3A1} , R^{3A2} y R^{3A3} son cada uno H.

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





cuales está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^{a1} y R^{a2} están cada uno de forma independiente sustituidos o sin sustituir.

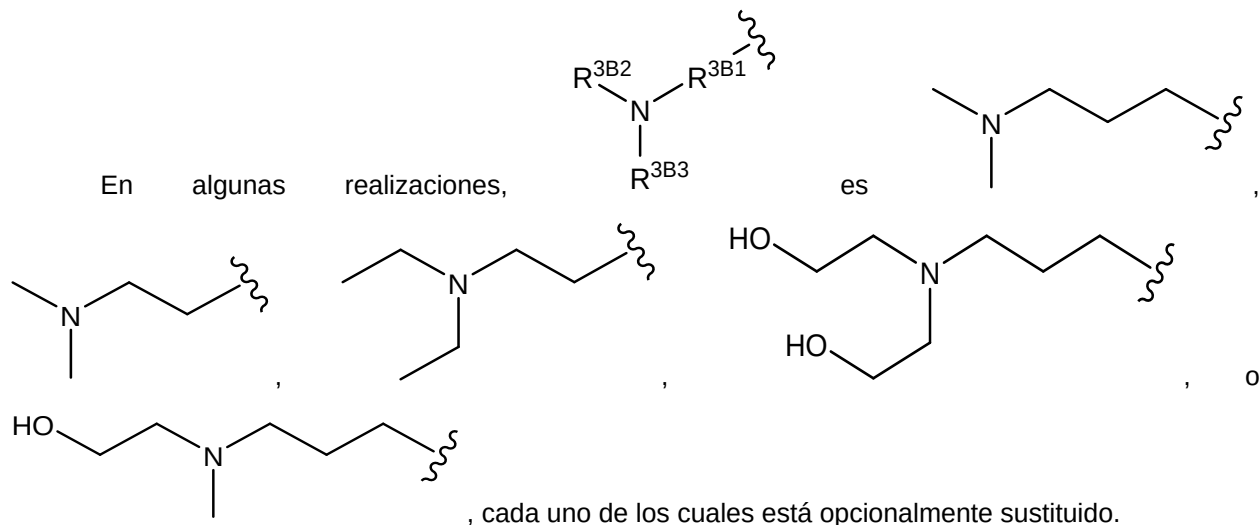


algunas realizaciones, R^{3B} está sustituido o sin sustituir.

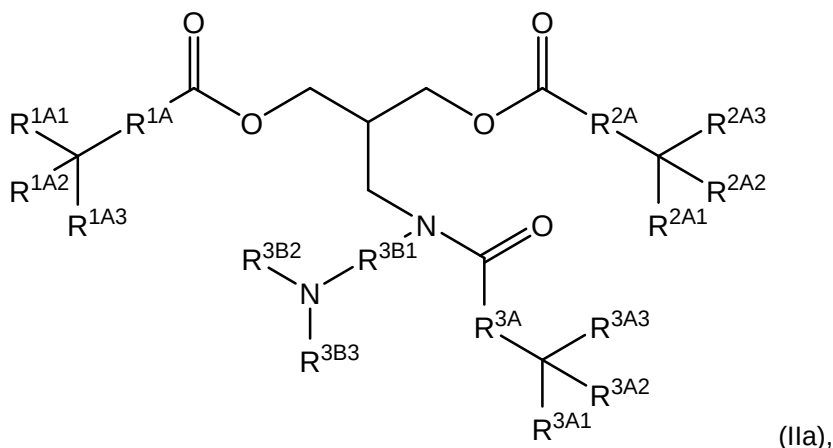
20 En algunas realizaciones, R^{3B1} es alquileo C_{1-6} . En algunas realizaciones, R^{3B1} es etileno o propileno. En algunas realizaciones, R^{3B1} está sustituido o sin sustituir. En algunas realizaciones, R^{3B1} está opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} están cada uno de forma independiente y opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, cada uno seleccionado de forma independiente del grupo que consiste en -OH y -O-(alquilo C_{1-6}). En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente H o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados de forma independiente 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 de forma independiente 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^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente H, metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, cada uno seleccionado de forma independiente del grupo que consiste en -OH y -O-(alquilo C_{1-6}). En algunas realizaciones, R^{3B2} y R^{3B3} son cada uno de forma independiente 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 sin sustituir.

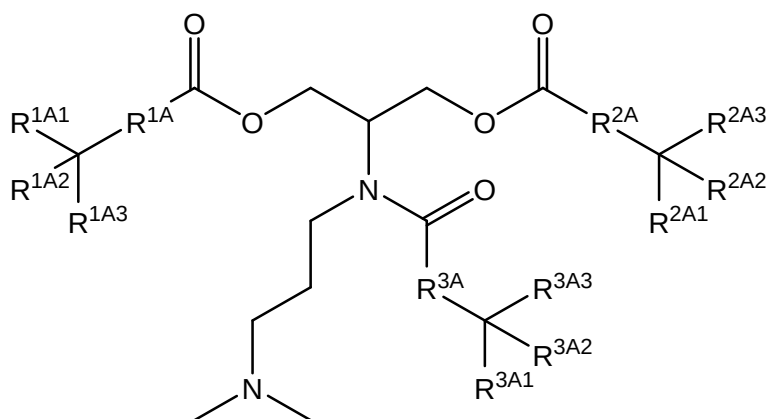


En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable representado por la Fórmula (IIa):



o una de sus sales, 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 ha definido para la Fórmula (II'), Fórmula (II) o cualquier variación o realización de las mismas.

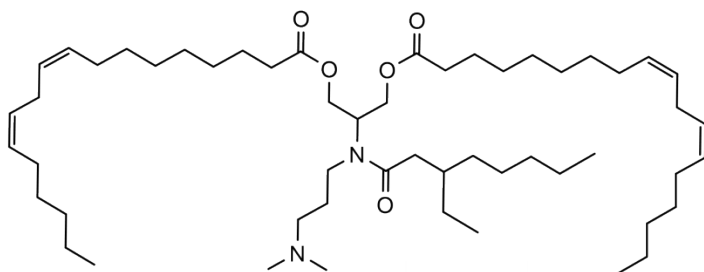
En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable representado por la Fórmula (IIb):



(IIb),

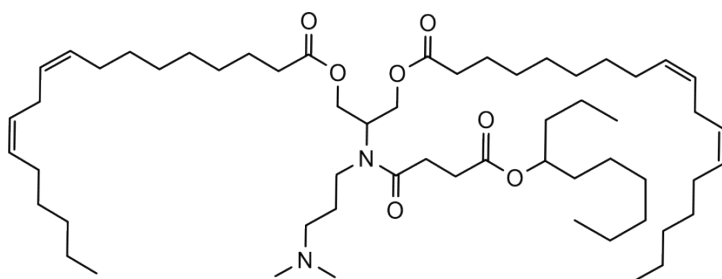
o una de sus sales, en donde R^{1A} , R^{2A} , R^{3A} , R^{1A1} , R^{1A2} , R^{1A3} , R^{2A1} , R^{2A2} , R^{2A3} , R^{3A1} , R^{3A2} y R^{3A3} son como se ha definido para la Fórmula (II'), Fórmula (II) o cualquier variación o realización de las mismas.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



o una de sus sales.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



o una de sus sales.

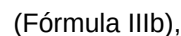
En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable representado por la Fórmula IIIa o la Fórmula IIIb:



20



25

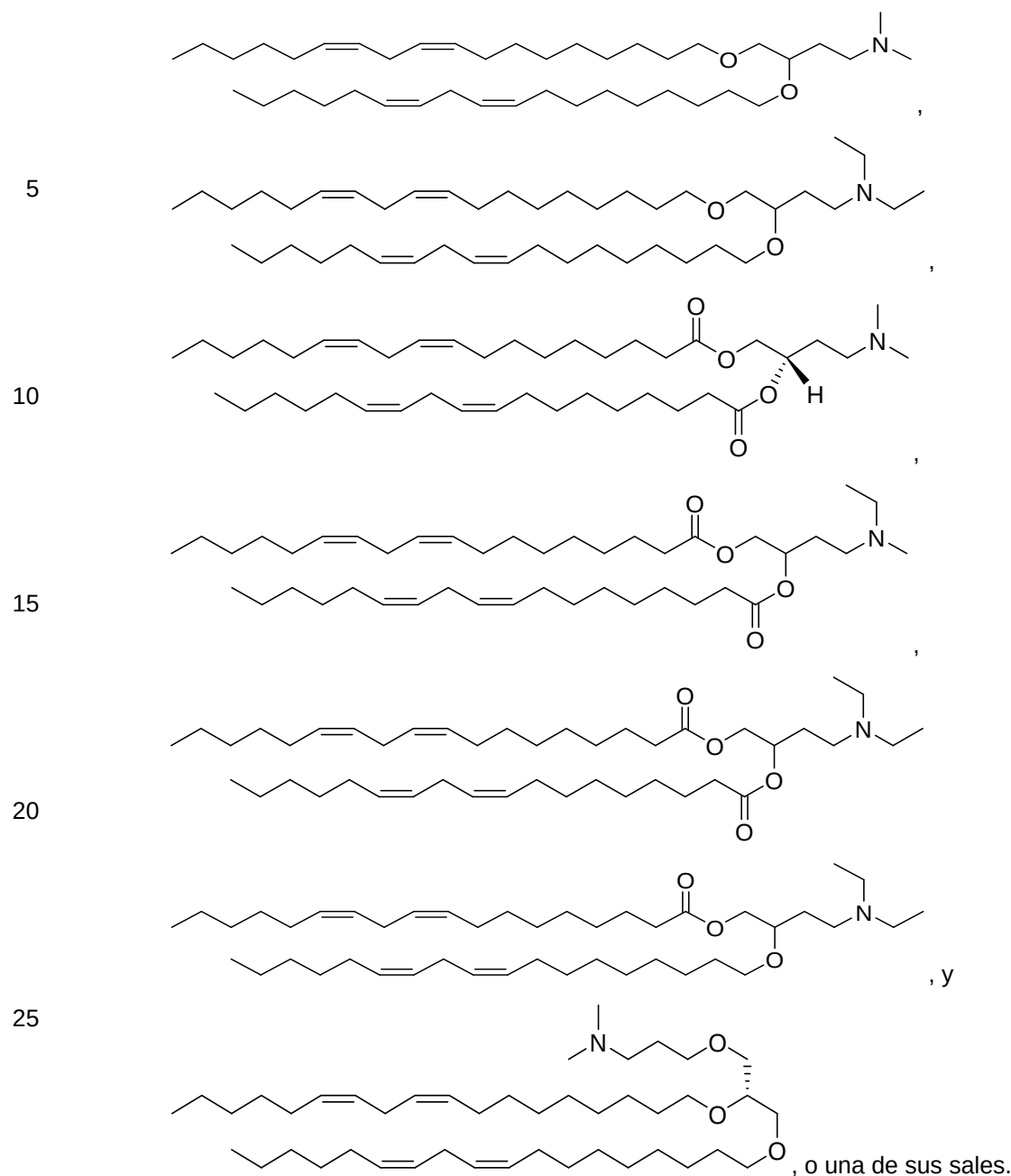
Y se selecciona del grupo que consiste en -O-, -OC(O)-, -OC(S)- y -CH₂-;

30

o y p son de forma independiente un número entero seleccionado de 2 a 6.

35

En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula IIIa no es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



En determinadas realizaciones, o y p pueden ser 2. En determinadas realizaciones, o y p pueden ser 3. En otras realizaciones, o y p pueden ser 4. En algunas realizaciones, o y p pueden ser 5. En otras realizaciones, o y p pueden ser 6.

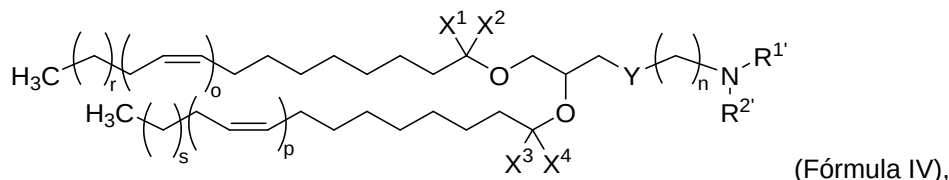
En determinadas realizaciones, X^1 y X^2 pueden tomarse juntos para formar un oxo y X^3 y X^4 se toman juntos para formar un oxo. En otras realizaciones, X^1 , X^2 , X^3 y X^4 pueden ser hidrógeno.

En determinadas realizaciones, Y puede seleccionarse del grupo que consiste en -O-, -OC(O)-, OC(S)- y -CH₂-. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, Y puede ser -O-. En determinadas realizaciones, Y puede ser -OC(O)-. En determinadas realizaciones, Y puede ser -CH₂-. En determinadas realizaciones, Y puede ser -OC(S)-.

En determinadas realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ pueden ser de forma independiente alquilo C_{1-3} . En otras realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ pueden ser $-CH_3$. En determinadas realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ son $-CH_2CH_3$. En determinadas realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ son alquilo C_3 .

En determinadas realizaciones, n puede ser 0. En otras realizaciones, n puede ser 3.

También se proporciona en esta memoria, en parte, un compuesto representado por la Fórmula IV:



o una de sus sales, en donde:

$R^{1'}$ y $R^{2'}$ son de forma independiente alquilo C_{1-3} , o $R^{1'}$ y $R^{2'}$ se toman junto con el átomo de nitrógeno para formar un piperidinilo o morfolinilo opcionalmente sustituido;

Y se selecciona del grupo que consiste en $-O-$, $-OC(O)-$, $-OC(S)-$ y $-CH_2-$;

X^1 , X^2 , X^3 y X^4 son hidrógeno o X^1 y X^2 o X^3 y X^4 se toman juntos para formar un oxo;

n es 0-4;

o es 1 y r es un número entero seleccionado de 3 a 8 u o es 2 y r es un número entero seleccionado de 1 a 8,

p es 1 y s es un número entero seleccionado de 3 a 8 o p es 2 y s es un número entero seleccionado de 1 a 8,

en donde,

cuando o y p son ambos 1, r y s son de forma independiente 4, 5, 7 u 8, y

cuando o y p son ambos 2, r y s son de forma independiente 1, 2, 4 o 5.

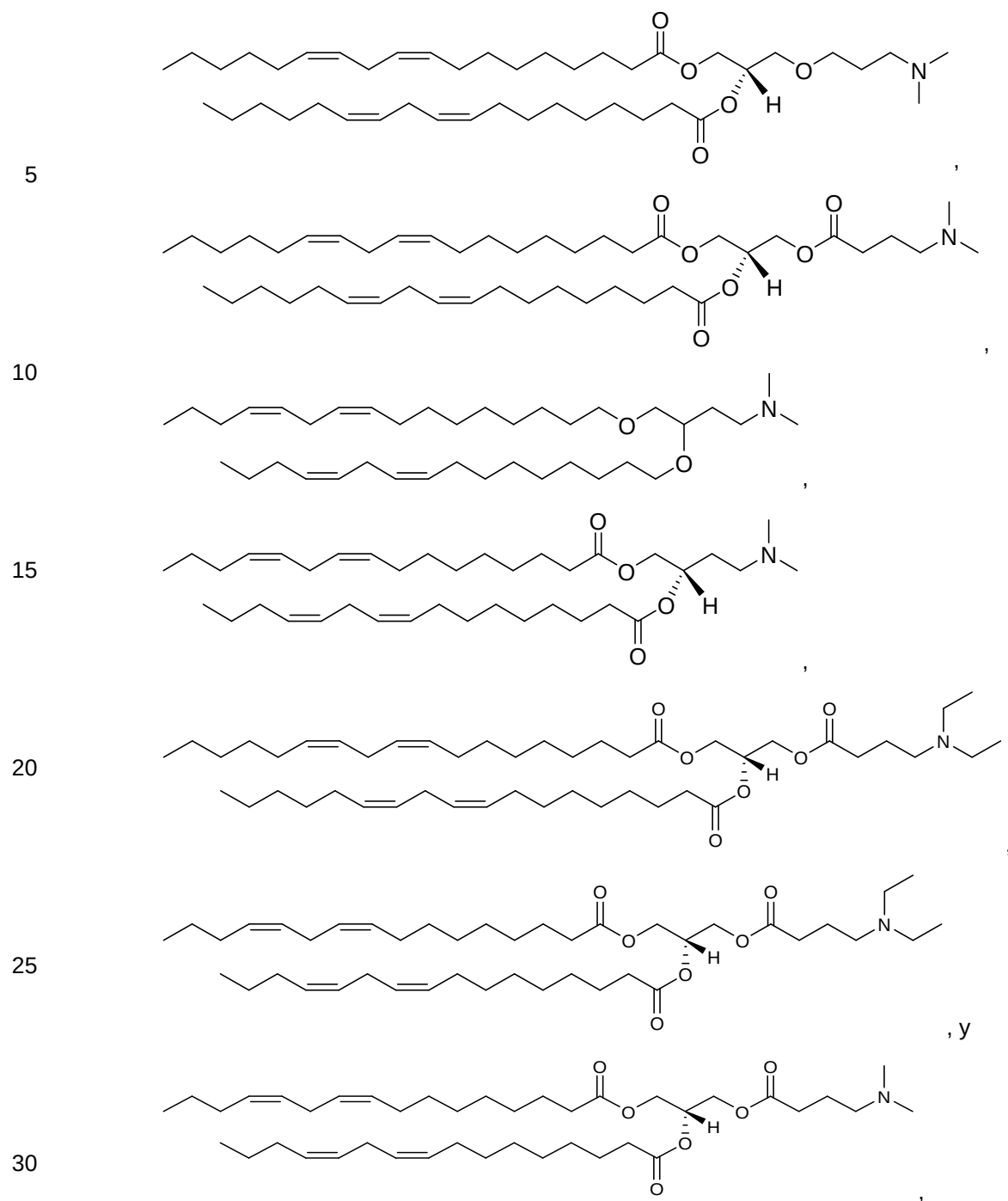
En determinadas realizaciones, X^1 y X^2 pueden tomarse juntos para formar un oxo y X^3 y X^4 pueden tomarse juntos para formar un oxo. En otras realizaciones, X^1 , X^2 , X^3 y X^4 pueden ser hidrógeno.

En determinadas realizaciones, Y puede seleccionarse del grupo que consiste en $-O-$, $-OC(O)-$ y $-CH_2-$. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, Y puede ser $-O-$. En determinadas realizaciones, Y puede ser $-OC(O)-$. En determinadas realizaciones, Y puede ser $-CH_2-$. En determinadas realizaciones, Y puede ser $-OC(S)-$.

En determinadas realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ pueden ser de forma independiente alquilo C_{1-3} . En otras realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ pueden ser $-CH_3$. En determinadas realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ pueden ser $-CH_2CH_3$. En algunas realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ pueden ser alquilo C_3 . En determinadas realizaciones, $R^{1'}$ y $R^{2'}$ se toman junto con el átomo de nitrógeno para formar un piperidinilo opcionalmente sustituido.

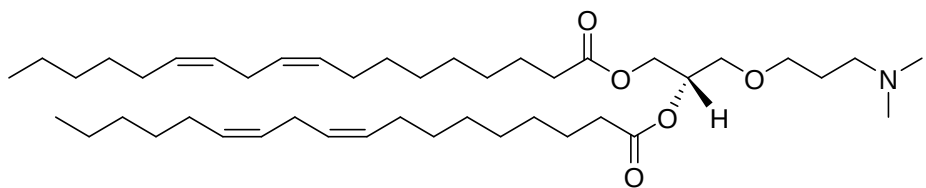
En determinadas realizaciones, n puede ser 0. En otras realizaciones, n puede ser 3.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable seleccionado del grupo que consiste en:



o una de sus sales.

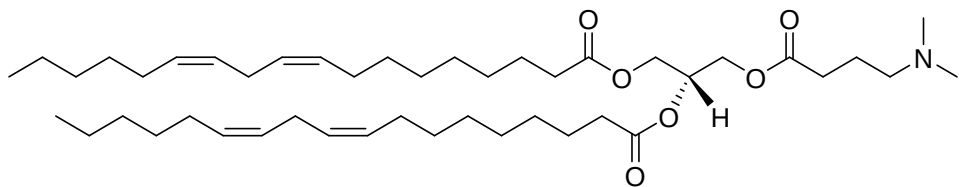
En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



5

o una de sus sales.

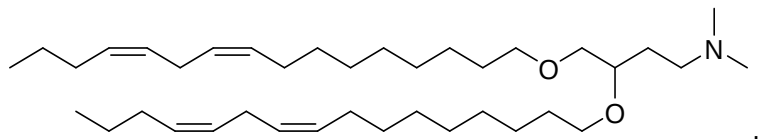
En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



10

o una de sus sales.

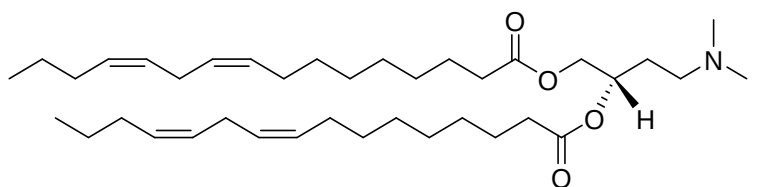
En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



20

o una de sus sales.

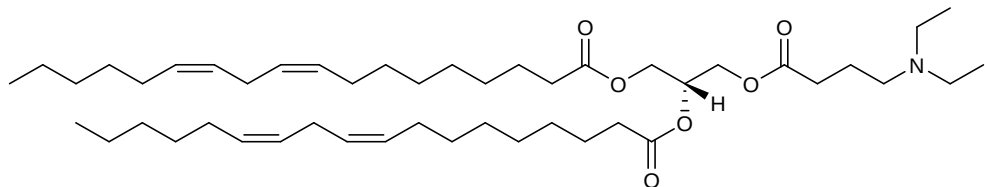
En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



25

o una de sus sales.

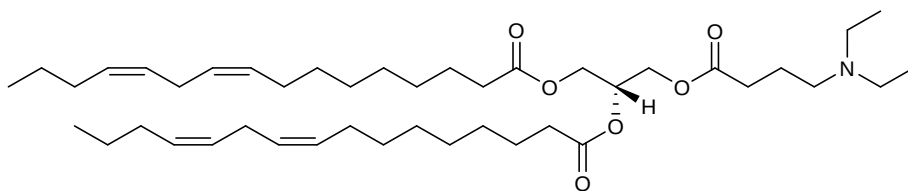
En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



35

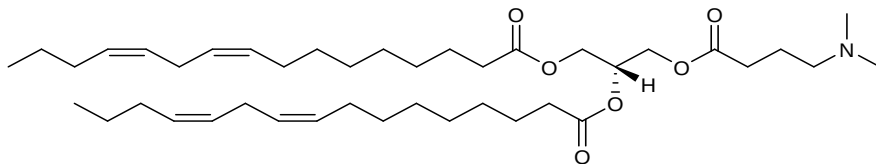
o una de sus sales.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



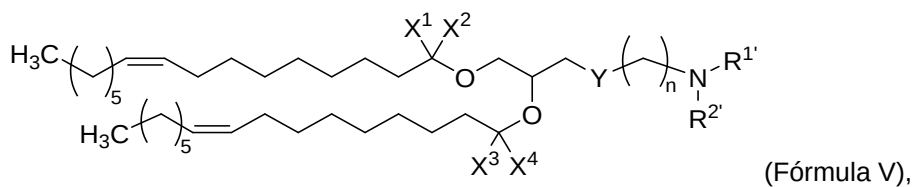
o una de sus sales.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de fórmula:



o una de sus sales.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de Fórmula V:



o una de sus sales, en donde:

R^1 y R^2 son de forma independiente alquilo C_{1-3} , o R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno para formar un piperidinilo o morfolinilo opcionalmente sustituido;

Y se selecciona del grupo que consiste en -O-, -OC(O)-, -OC(S)- y -CH₂-;

X^1 , X^2 , X^3 y X^4 son hidrógeno o X^1 y X^2 o X^3 y X^4 se toman juntos para formar un oxo; y

n es un número entero seleccionado de 0 a 4.

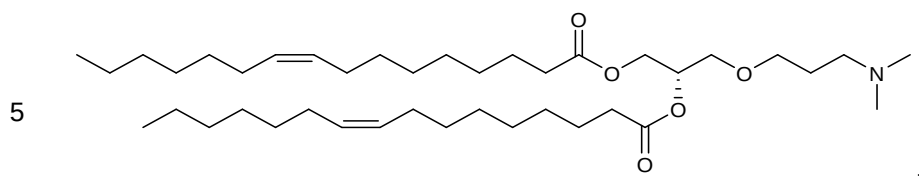
En determinadas realizaciones, X^1 y X^2 pueden tomarse juntos para formar un oxo y X^3 y X^4 pueden tomarse juntos para formar un oxo. En otras realizaciones, X^1 , X^2 , X^3 y X^4 pueden ser hidrógeno.

En determinadas realizaciones, Y puede seleccionarse del grupo que consiste en -O-, -OC(O)- y -CH₂-. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, Y puede ser -O-. En determinadas realizaciones, Y puede ser -OC(O)-. En determinadas realizaciones, Y puede ser -CH₂-. En determinadas realizaciones, Y puede ser -OC(S)-.

En determinadas realizaciones, R^1 y R^2 pueden ser de forma independiente alquilo C_{1-3} . En otras realizaciones, R^1 y R^2 pueden ser -CH₃. En determinadas realizaciones, R^1 y R^2 pueden ser -CH₂CH₃. En algunas realizaciones, R^1 y R^2 pueden ser alquilo C_3 . En determinadas realizaciones, R^1 y R^2 se toman junto con el átomo de nitrógeno para formar un piperidinilo opcionalmente sustituido.

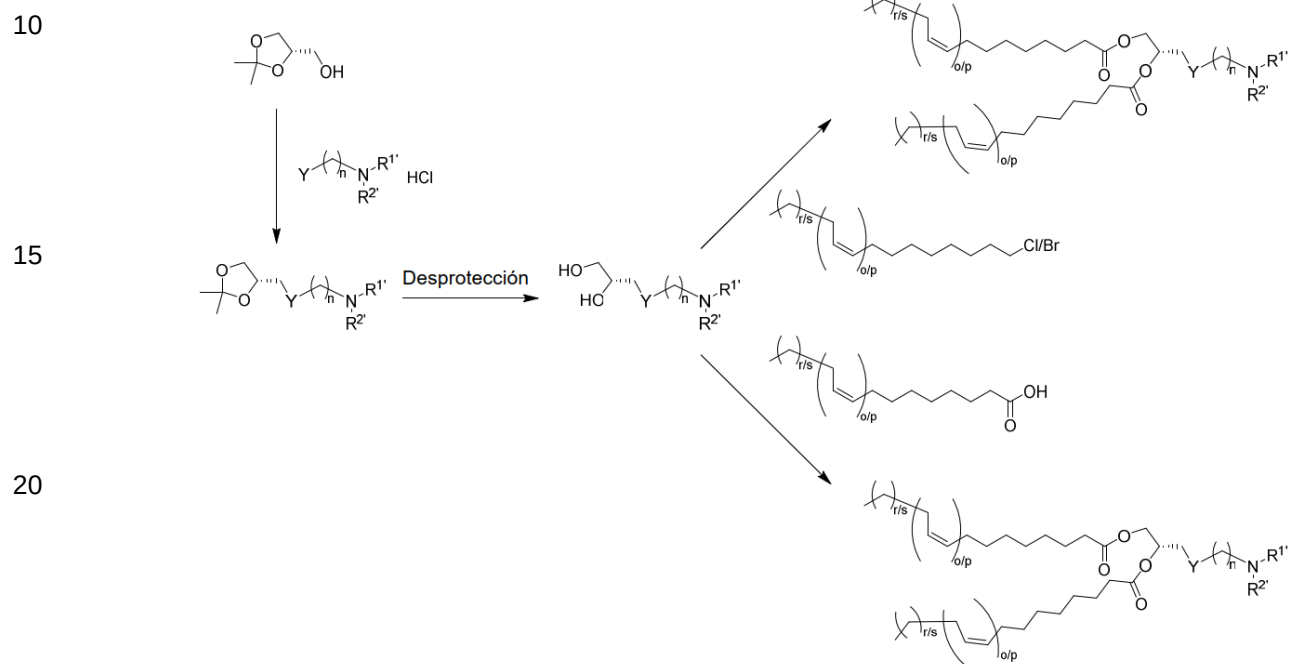
En determinadas realizaciones, n puede ser 0. En otras realizaciones, n puede ser 3.

En algunas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en la presente memoria comprenden un lípido catiónico ionizable de la fórmula:

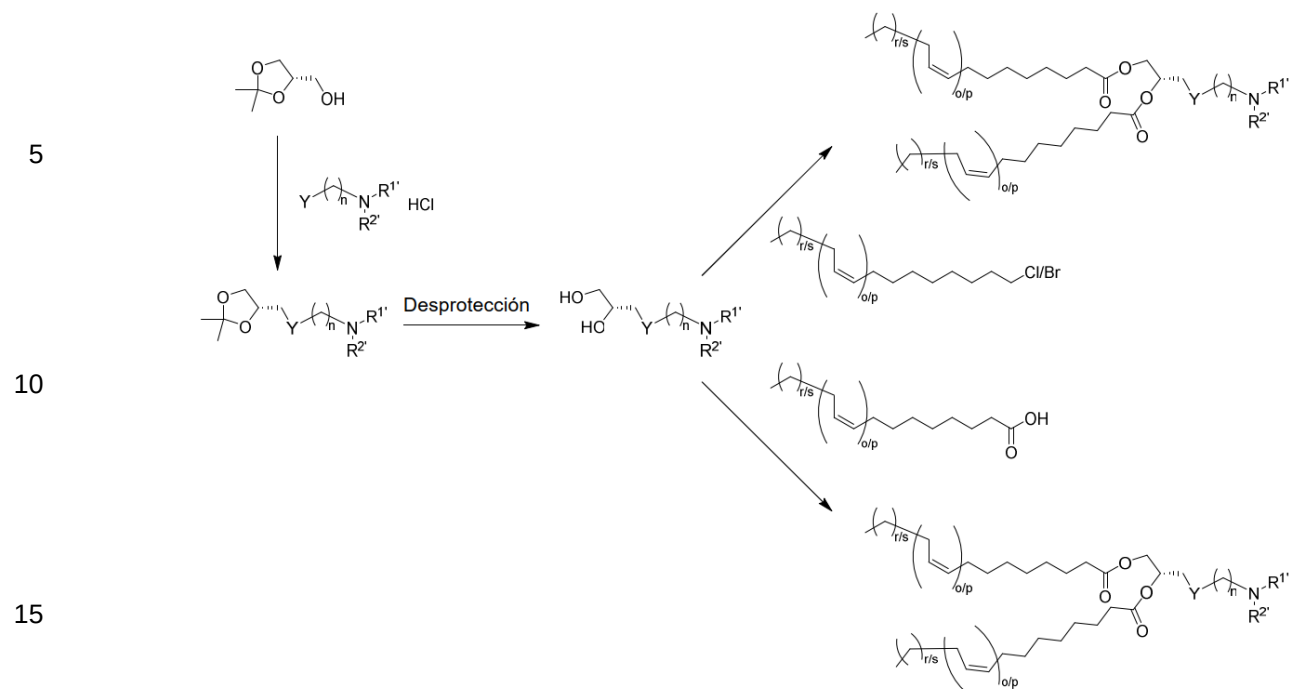


o una de sus sales.

ESQUEMA S1 - Esquema sintético para preparar un lípido de Fórmula (IIIa)

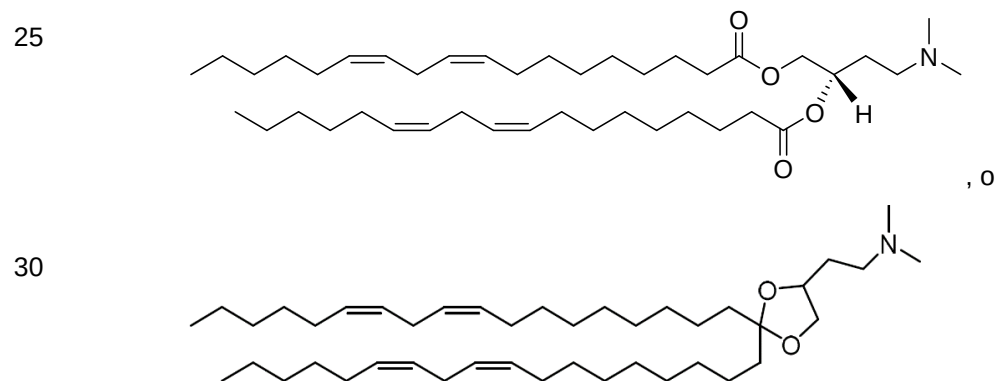


Puede prepararse un compuesto de Fórmula IIIa, p. ej., según el esquema S1. Un propanodiol protegido con funcionalidad hidroxí se convierte en el correspondiente éter con función dimetilamino ($Y = \text{oxo}$) o éster ($Y = \text{O-C(O)}$). La formación del enlace de éter resulta de una reacción del haluro de alquilo con alcohol en presencia de yoduro de butilamonio terciario/NaOH en THF a 80 °C. La formación del enlace de éster utiliza el tratamiento de una dimetilamina funcional ácida con alcohol bajo activación de carbodiimida (DCM, EDC, DIEPA, DMAP). La desprotección del diol produce un intermedio de diol vecinal que posteriormente se convierte en los correspondientes lípidos diácilo unidos por éter o éster mediante tratamiento con TBAI/NaOH y bromoacilo o mediante activación de ácido carboxílico mediada por carbodiimida para la formación de enlaces de éster, respectivamente.

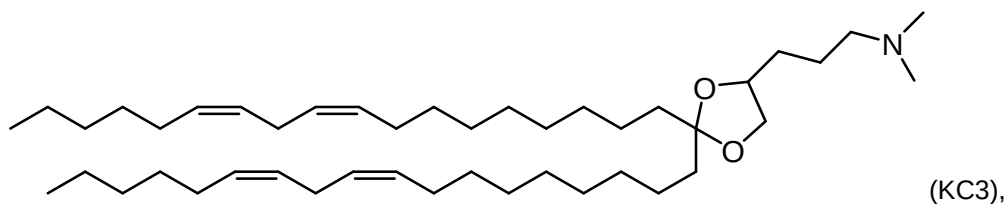
ESQUEMA S2 - Esquema sintético para preparar una composición lipídica de Fórmula (IV)

Puede prepararse un compuesto de Fórmula IV, p. ej., según el esquema S2. El procedimiento sintético es el descrito anteriormente para el esquema S1; sin embargo, en el esquema S2, se pueden emplear grupos acilo bis-insaturados o grupos acilo mono-insaturados para obtener un lípido de Fórmula IV.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable usado en las NPL de la presente descripción se selecciona de los lípidos de la **tabla A**, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable es:



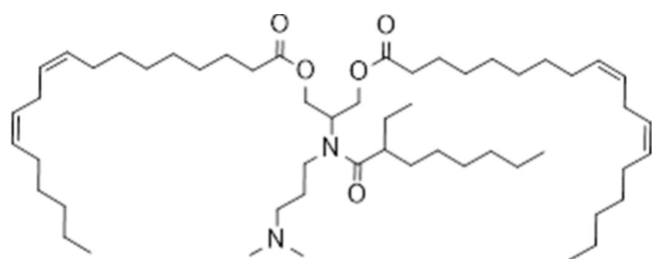
En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable usado en las NPL de la presente descripción es un compuesto de Fórmula (KC3):



o una de sus sales. Las referencias a "KC3" o "lípidio KC3" en la presente memoria se refieren a un compuesto de Fórmula (KC3), o una de sus sales. Las referencias a "NPL KC3" en la presente memoria se refieren a nanopartículas lipídicas que comprenden un compuesto de Fórmula (KC3), o una de sus sales.

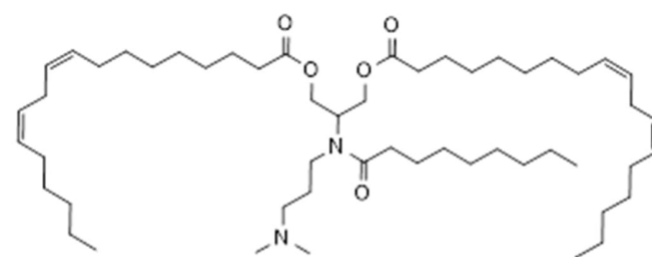
Tabla A: Lípidos catiónicos ionizables ilustrativos.

(Lípido 1)



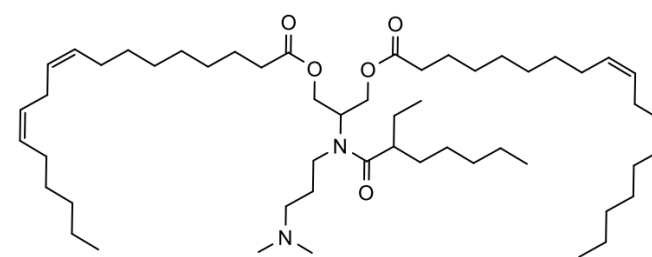
Lípido 1

(Lípido 2)



Lípido 2

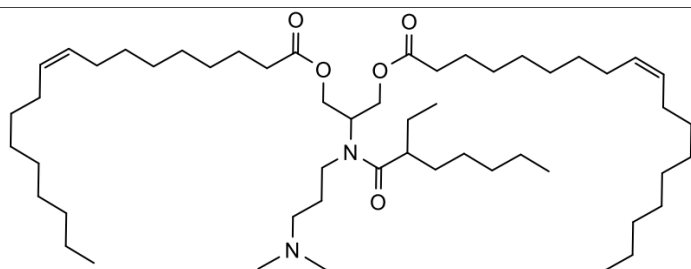
(Lípido 3)



Lípido 3

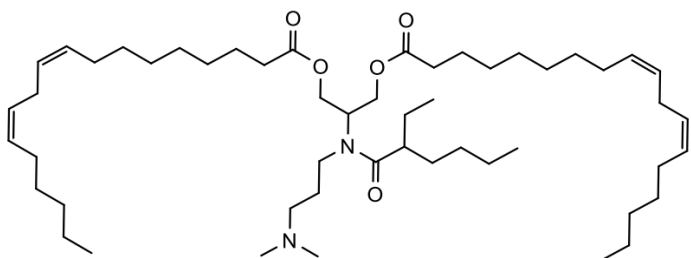
(Lípido 4)

5

**Lípido 4**

(Lípido 5)

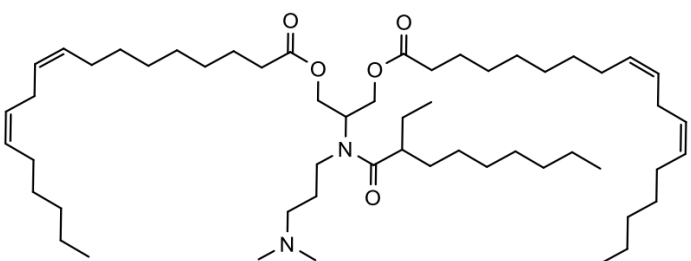
10

**Lípido 5**

15

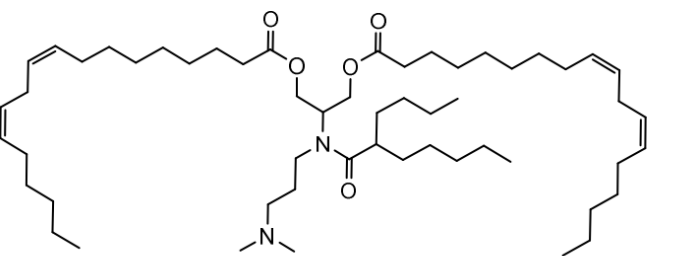
(Lípido 6)

20

**Lípido 6**

(Lípido 7)

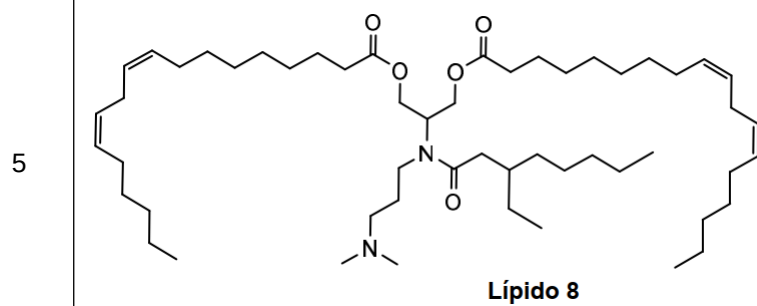
25

**Lípido 7**

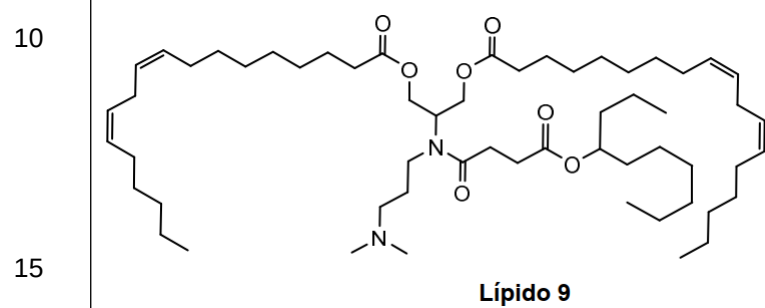
30

35

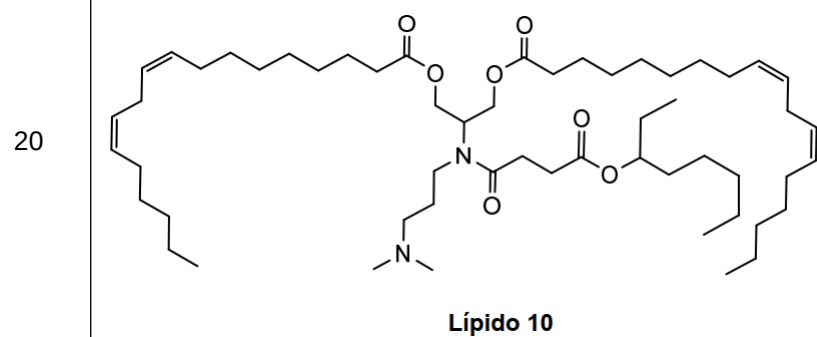
(Lípido 8)



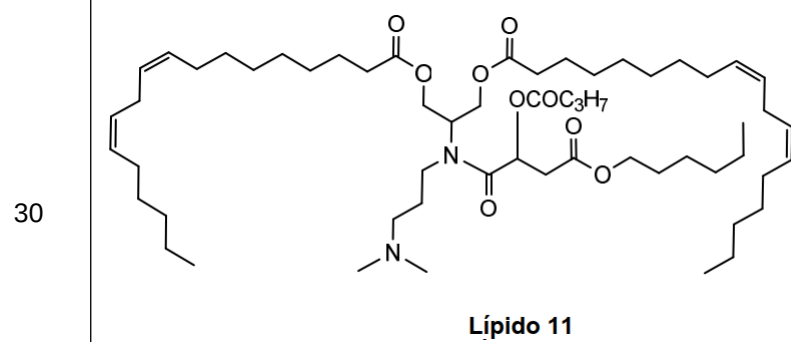
(Lípido 9)



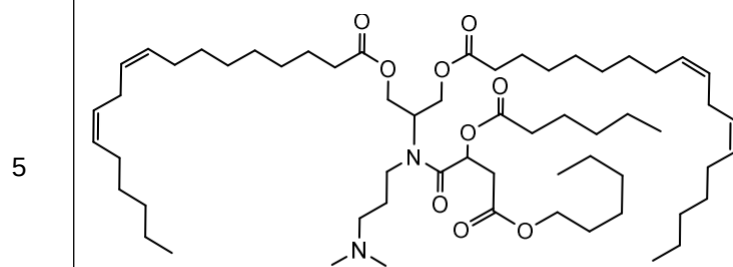
(Lípido 10)



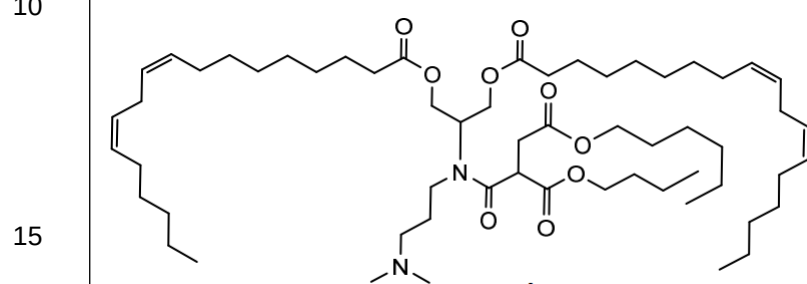
(Lípido 11)



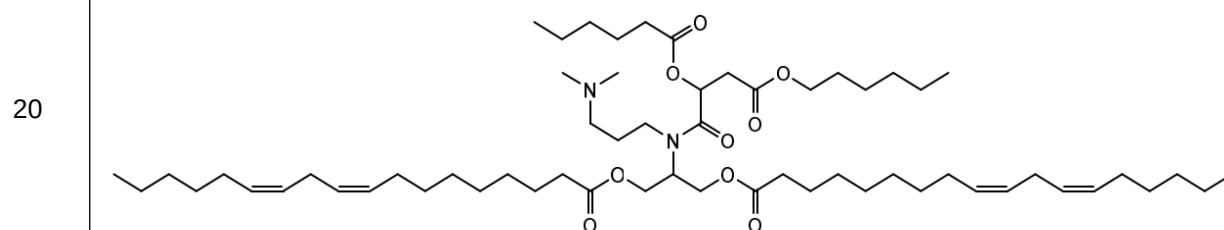
(Lípido 12)

**Lípido 12**

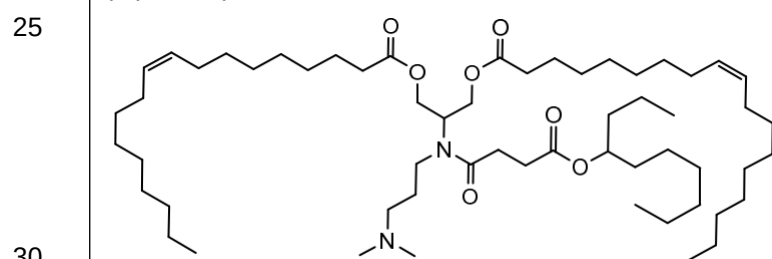
(Lípido 13)

**Lípido 13**

(Lípido 14)

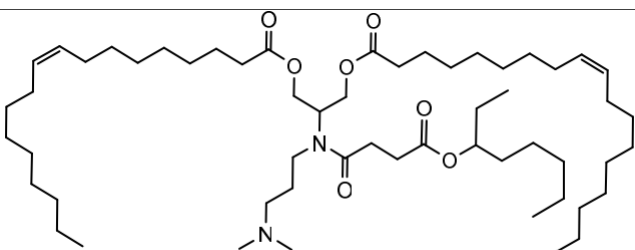
**Lípido 14**

(Lípido 15)

**Lípido 15**

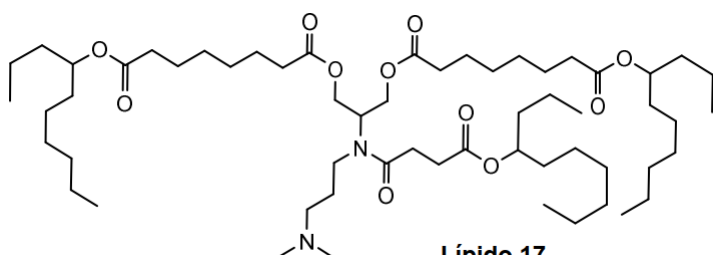
(Lípido 16)

5

**Lípido 16**

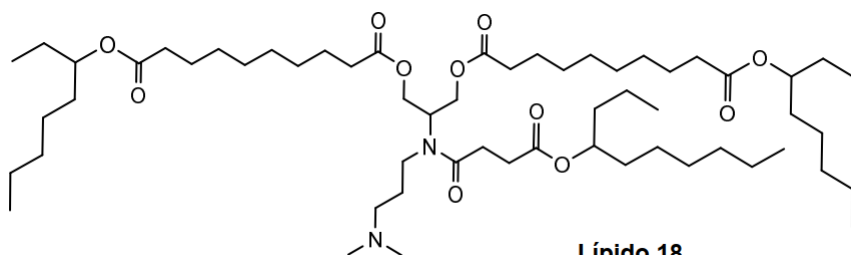
(Lípido 17)

10

**Lípido 17**

(Lípido 18)

15

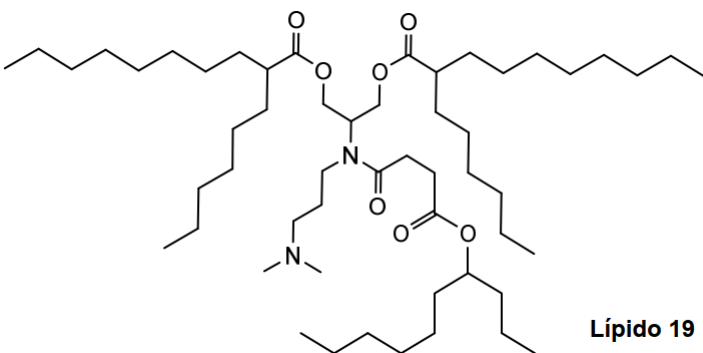


20

Lípido 18

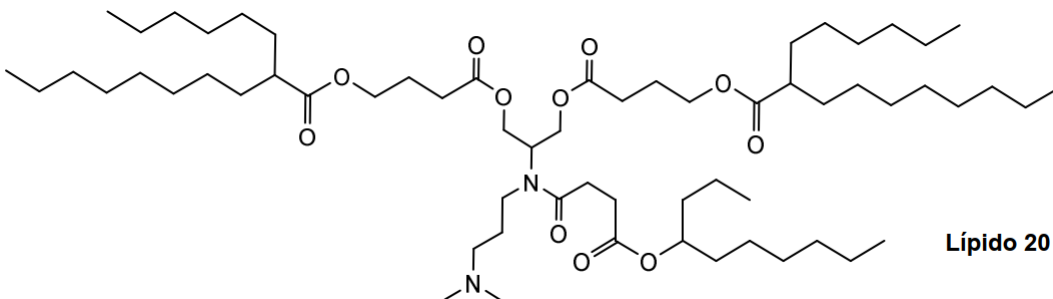
(Lípido 19)

25

**Lípido 19**

(Lípido 20)

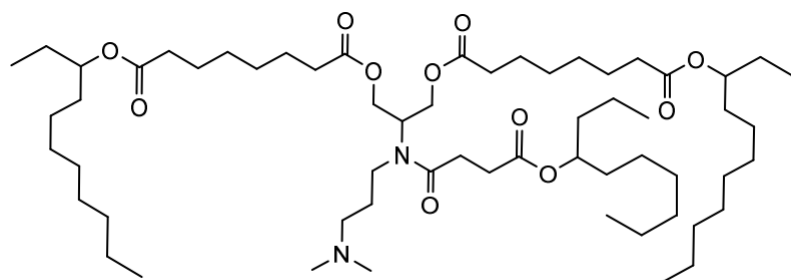
30



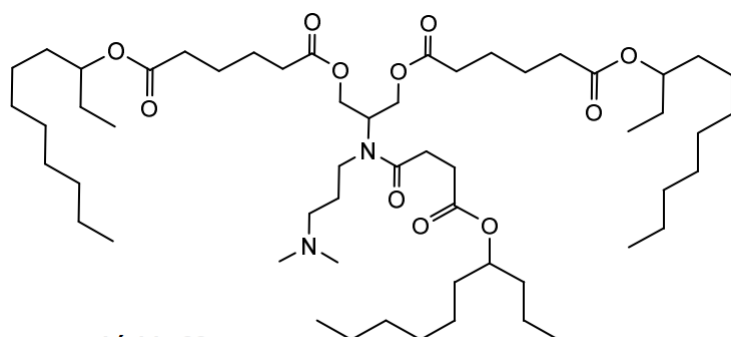
35

Lípido 20

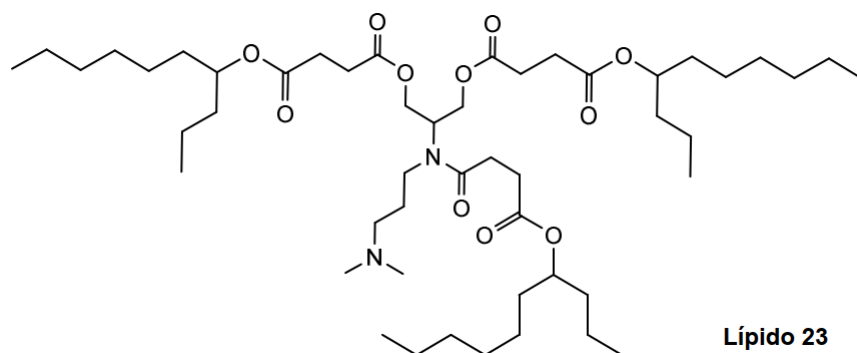
(Lípido 21)

**Lípido 21**

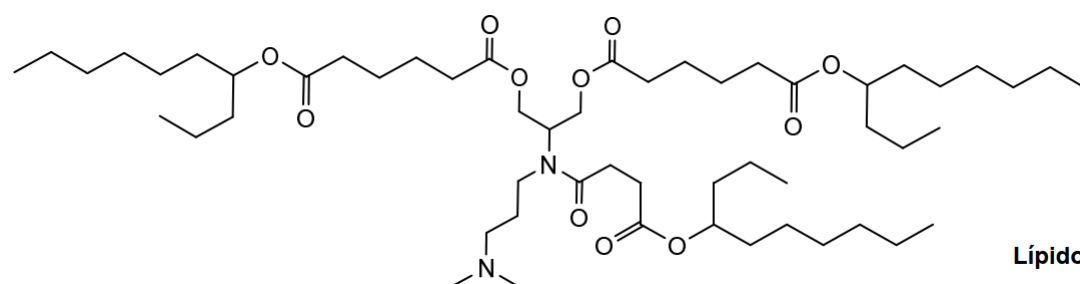
(Lípido 22)

**Lípido 22**

(Lípido 23)

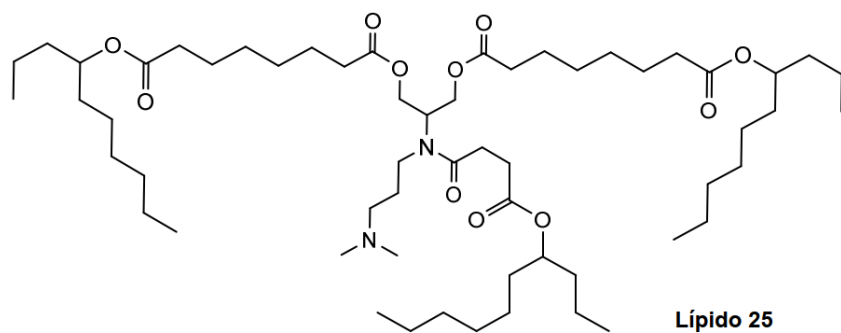
**Lípido 23**

(Lípido 24)

**Lípido 24**

(Lípido 25)

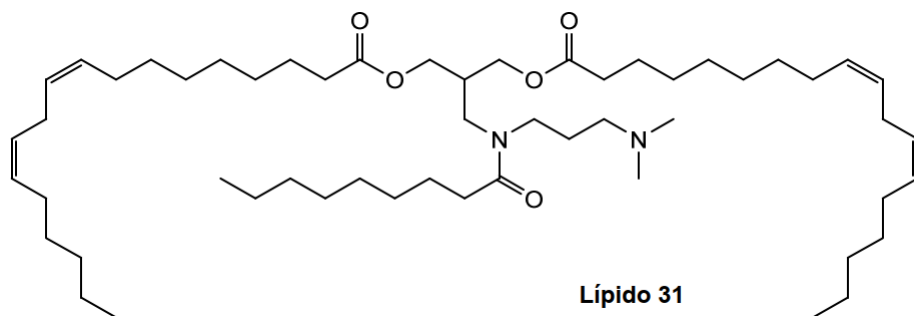
5



(Lípido 31)

10

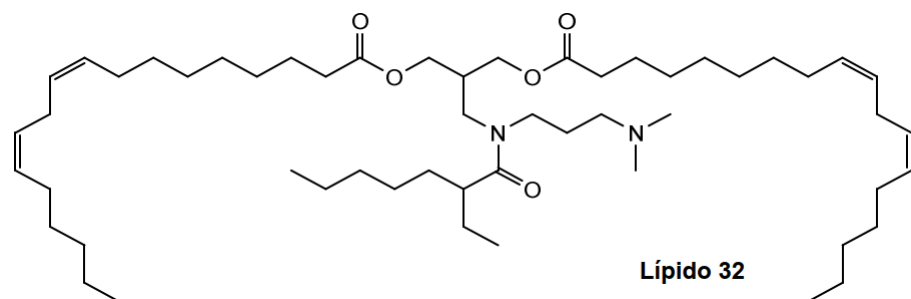
15



(Lípido 32)

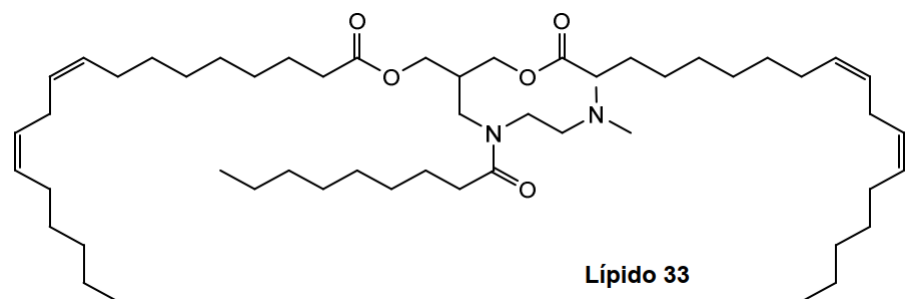
20

25



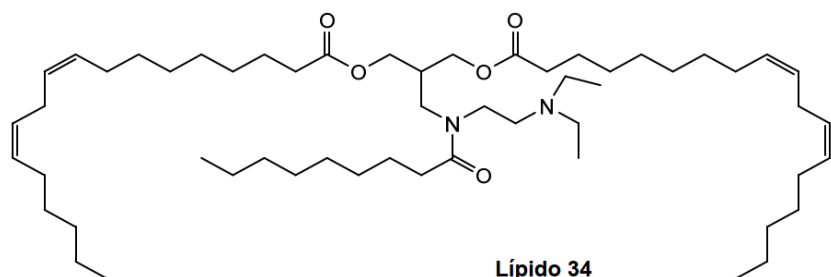
(Lípido 33)

30

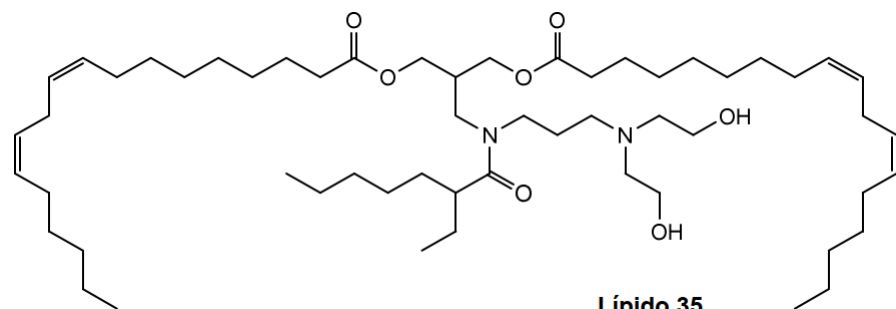


35

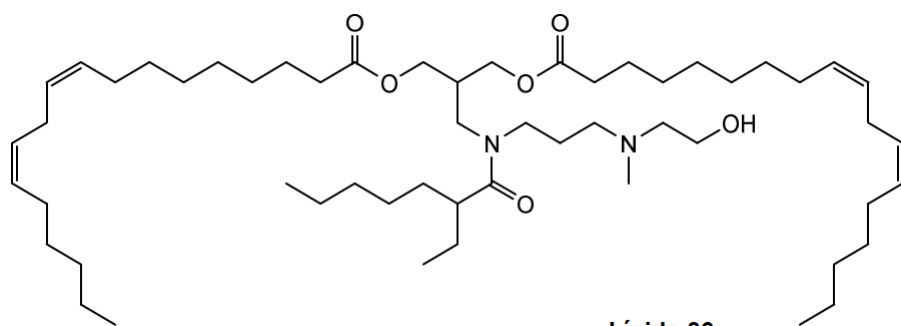
(Lípido 34)

**Lípido 34**

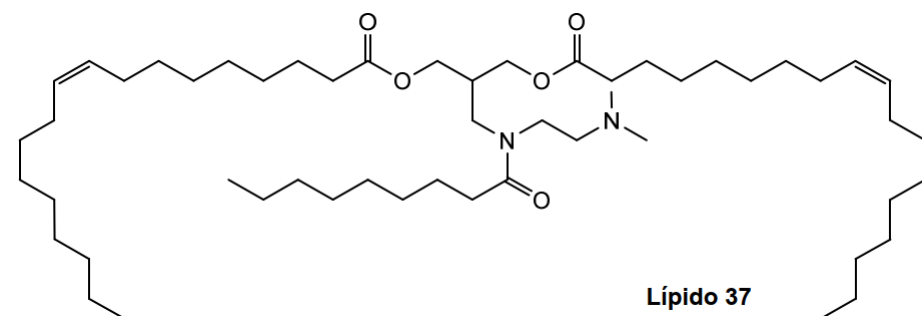
(Lípido 35)

**Lípido 35**

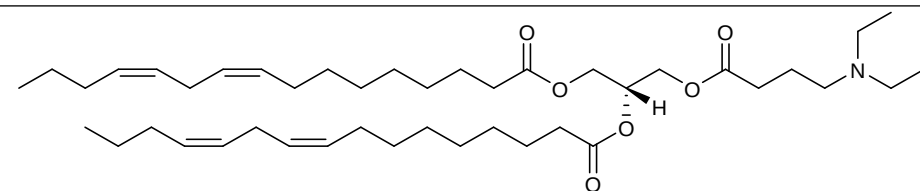
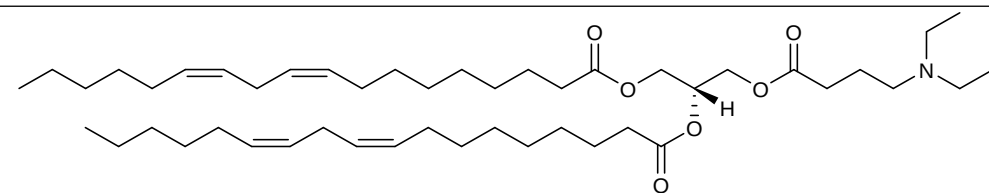
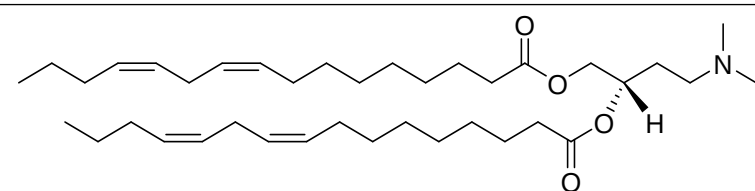
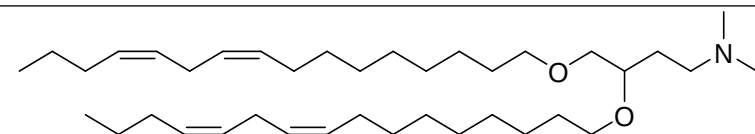
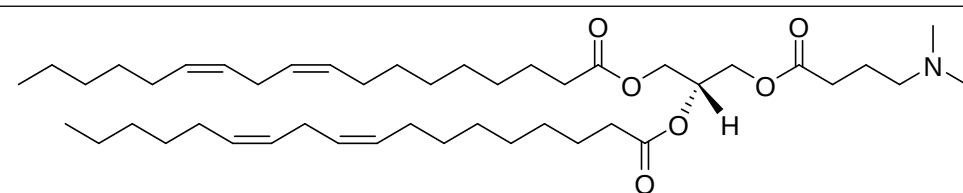
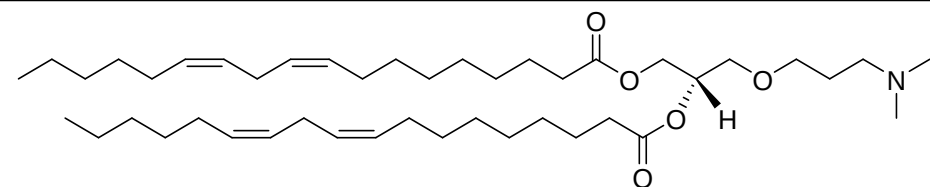
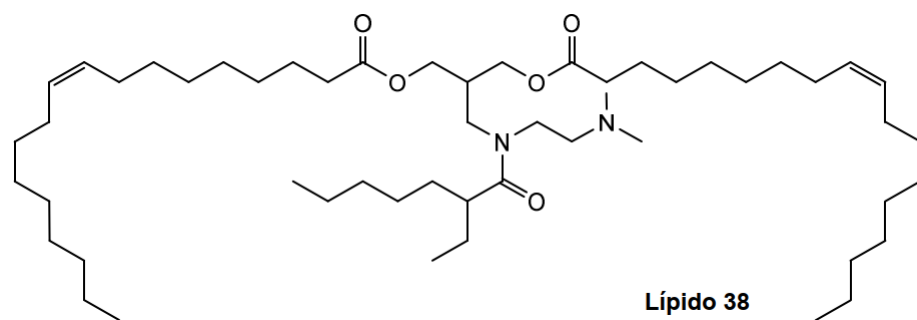
(Lípido 36)

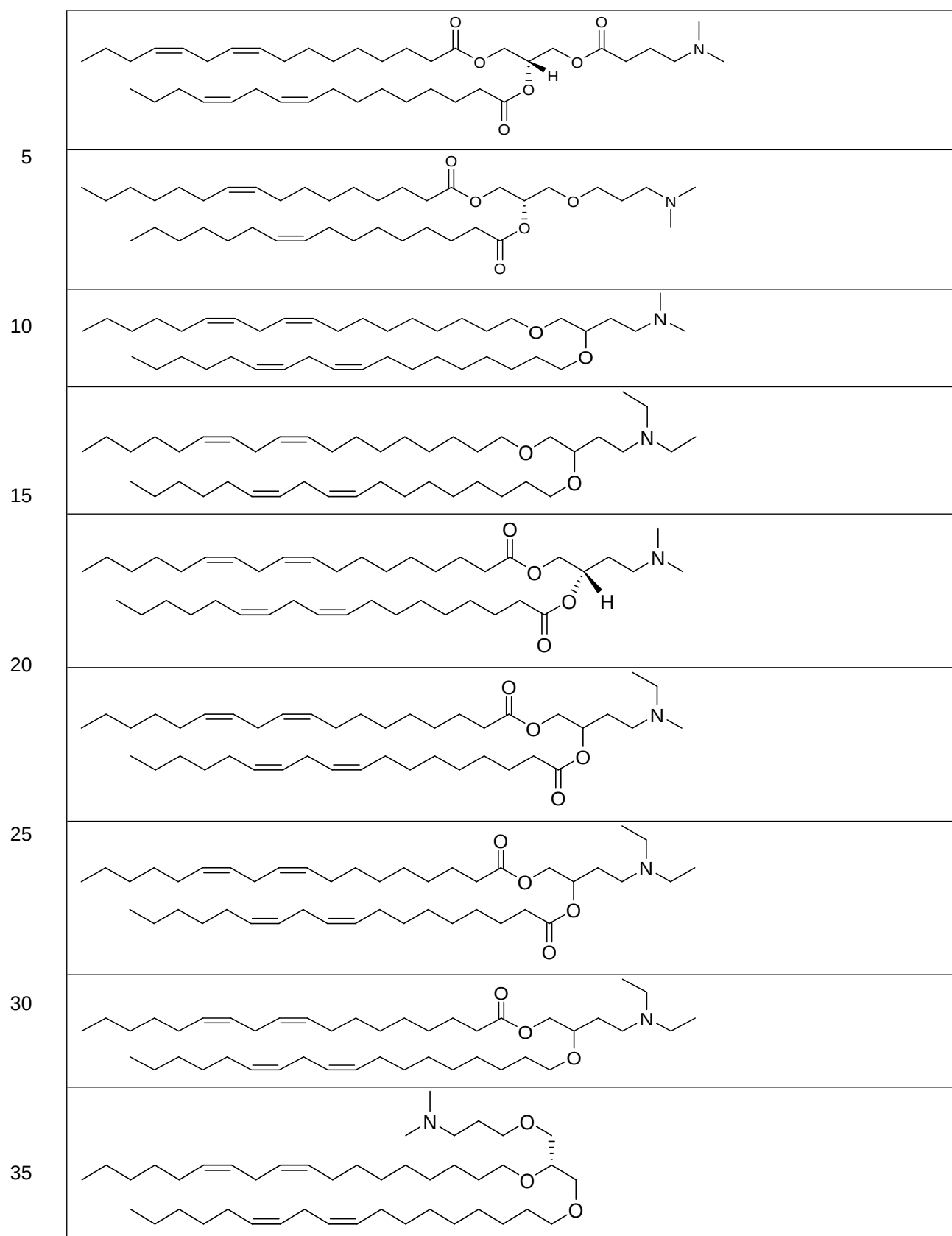
**Lípido 36**

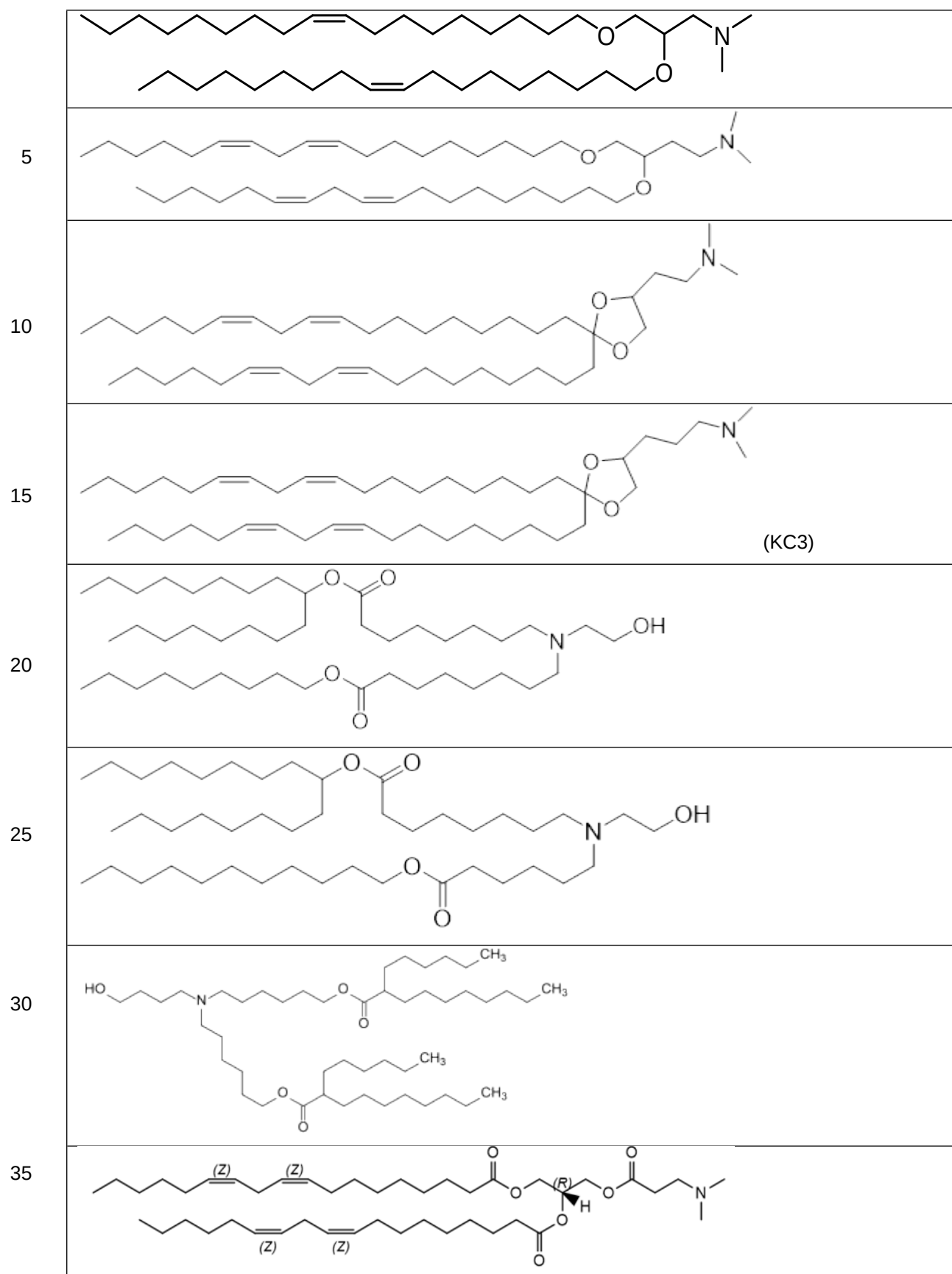
(Lípido 37)

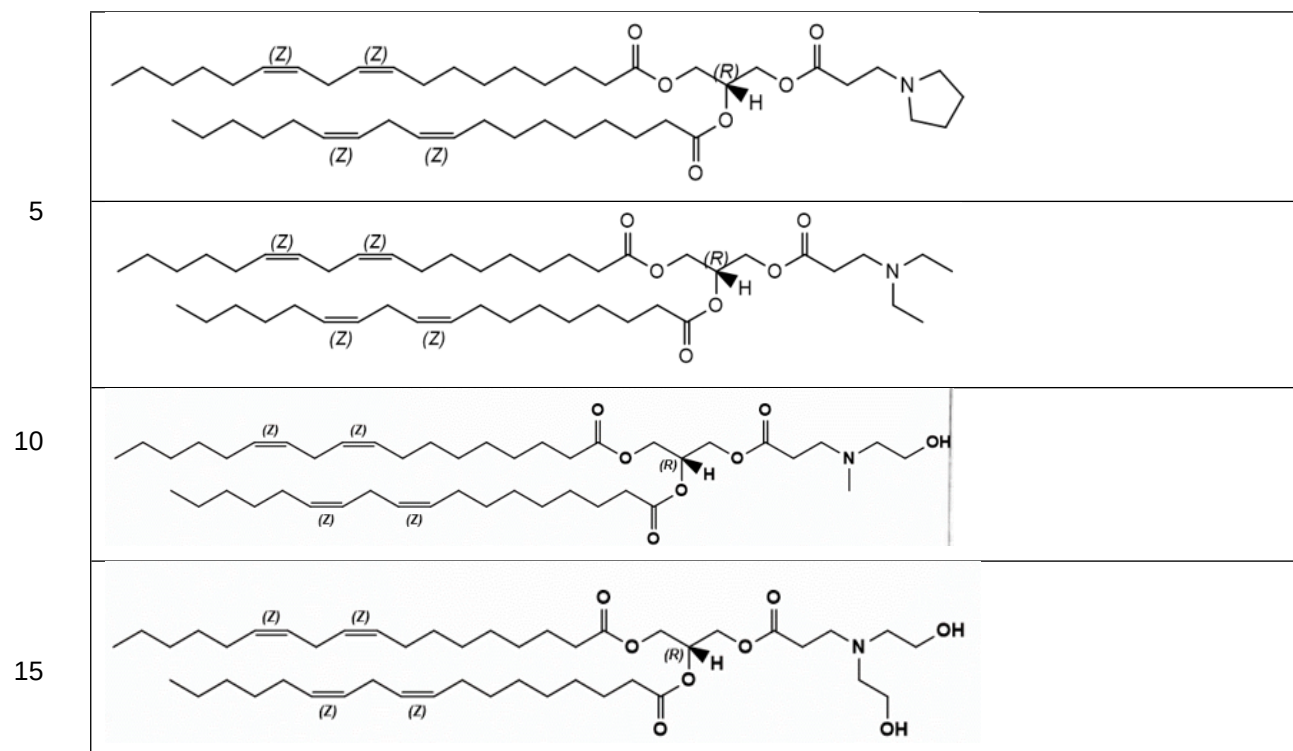
**Lípido 37**

(Lípido 38)









En algunas realizaciones, el lípido catiónico ionizable no es Dlin-MC3-DMA.

En determinadas realizaciones, el lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria puede estar presente en la NPL o la mezcla de lípidos en un intervalo de 30-70 por ciento molar, 30-60 por ciento molar 30-50 por ciento molar, 40-70 por ciento molar, 40-60 por ciento molar, 40-50 por ciento molar, 50-70 por ciento molar, 50-60 por ciento molar o de aproximadamente 30 por ciento molar, aproximadamente 35 por ciento molar, aproximadamente 40 por ciento molar, aproximadamente 45 por ciento molar, aproximadamente 50 por ciento molar, aproximadamente 55 por ciento molar, aproximadamente 60 por ciento molar, aproximadamente 65 por ciento molar o aproximadamente 70 por ciento molar.

(b) Esterol

En determinadas realizaciones, la NPL o mezcla de lípidos puede comprender un componente de esterol que puede comprender, por ejemplo, colesterol, fecosterol, β -sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, estigmastanol o brasicasterol. En determinadas realizaciones, el esterol es colesterol.

El esterol (p. ej., colesterol) puede estar presente en la NPL o la mezcla de lípidos en un intervalo de 20-70 por ciento molar, 20-60 por ciento molar, 20-50 por ciento molar, 30-70 por ciento molar, 30-60 por ciento molar, 30-50 por ciento molar, 40-70 por ciento molar, 40-60 por ciento molar, 40-50 por ciento molar, 50-70 por ciento molar, 50-60 por ciento molar o aproximadamente 20 por ciento molar, aproximadamente 25 por ciento molar, aproximadamente 30 por ciento molar, aproximadamente 35 por ciento molar, aproximadamente 40 por ciento molar, aproximadamente 45 por ciento molar, aproximadamente 50 por ciento molar, aproximadamente 55 por ciento molar, aproximadamente 60 por ciento molar o aproximadamente 65 por ciento molar.

(c) Fosfolípido neutro

En algunas realizaciones, la NPL o la mezcla de lípidos pueden comprender uno o más fosfolípidos neutros descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el o los fosfolípidos neutros pueden comprender, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), esfingomielina (SM).

Los fosfolípidos neutros incluyen, por ejemplo, diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), distearoil-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, didocosaheptaenoil-glicero-fosfocolina o esfingomielina.

El fosfolípido neutro puede estar presente en la NPL o en la mezcla de lípidos en un intervalo de 1-10 por ciento molar, 1-15 por ciento molar, 1-12 por ciento molar, 1-10 por ciento molar, 3-15 por ciento molar, 3-12 por ciento molar, 3-10 por ciento molar, 4-15 por ciento molar, 4-12 por ciento molar, 4-10 por ciento molar, 4-8 por ciento molar, 5-15 por ciento molar, 5-12 por ciento molar, 5-10 por ciento molar, 6-15 por ciento molar, 6-12 por ciento molar, 6-10 por ciento molar o aproximadamente 1 por ciento molar, aproximadamente 2 por ciento molar, aproximadamente 3 por ciento molar, aproximadamente 4 por ciento molar, aproximadamente 5 por ciento molar, aproximadamente 6 por ciento molar, aproximadamente 7 por ciento molar, aproximadamente 8 por ciento molar, aproximadamente 9 por ciento molar, aproximadamente 10 por ciento molar, aproximadamente 11 por ciento molar, aproximadamente 12 por ciento molar, aproximadamente 13 por ciento molar, aproximadamente 14 por ciento molar o aproximadamente 15 por ciento molar.

(d) PEG-lípido

La NPL o la mezcla de lípidos pueden incluir uno o más polietilenglicol (PEG) o lípidos modificados con PEG. Estas especies pueden denominarse, como alternativa, lípidos PEGilados. Un lípido de PEG es un lípido modificado con polietilenglicol. Como se ha indicado anteriormente, se pueden incluir PEG-lípidos libres en la NPL o en la mezcla de lípidos para reducir o eliminar la unión inespecífica a través de un grupo de direccionamiento cuando se incluye un conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugado de anticuerpo) en la NPL o mezcla de lípidos.

El o los lípidos de PEG pueden comprender, por ejemplo, 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 de PEG 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 de PEG-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE).

En determinadas realizaciones, la NPL o la mezcla de lípidos pueden contener uno o más PEG-lípidos libres que pueden comprender, por ejemplo, PEG-diestearoilglicerol (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 de dipalmitoil (C16) o una cadena de diestearoil (C18).

El PEG-lípido puede estar presente en la NPL o en la mezcla de lípidos en un intervalo de 1-10 por ciento molar, 1-8 por ciento molar, 1-7 por ciento molar, 1-6 por ciento molar, 1-5 por ciento molar, 1-4 por ciento molar, 1-3 por ciento molar, 2-8 por ciento molar, 2-7 por ciento molar, 2-6 por ciento molar, 2-5 por ciento molar, 2-4 por ciento molar, 2-3 por ciento molar o aproximadamente 1 por ciento molar, aproximadamente 2 por ciento molar, aproximadamente 3 por ciento molar, aproximadamente 4 por ciento molar o aproximadamente 5 por ciento molar. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es un PEG-lípido libre.

En algunas realizaciones, el PEG-lípido puede estar presente en la NPL o la mezcla de lípidos en el intervalo de 0.01-10 por ciento molar, 0.01-5 por ciento molar, 0.01-4 por ciento molar, 0.01-3 por ciento molar, 0.01-2 por ciento molar, 0.01-1 por ciento molar, 0.1-10 por ciento molar, 0.1-5 por ciento molar, 0.1-4 por ciento molar, 0.1-3 por ciento molar, 0.1-2 por ciento molar, 0.1-1 por ciento molar, 0.5-10 por ciento molar, 0.5-5 por ciento molar, 0.5-4 por ciento molar, 0.5-3 por ciento molar, 0.5-2 por ciento molar, 0.5-1 por ciento molar, 1-2 por ciento molar, 3-4 por ciento molar, 4-5 por ciento molar, 5-6 por ciento molar o 1.25-1.75 por ciento molar. En algunas realizaciones, el PET-lípido puede ser aproximadamente 0.5 por ciento molar, aproximadamente 1 por ciento molar, aproximadamente 1.5 por ciento molar, aproximadamente 2 por ciento molar, aproximadamente 2.5 por ciento molar, aproximadamente 3 por ciento molar, aproximadamente 3.5 por ciento molar, aproximadamente 4 por ciento molar, aproximadamente 4.5 por ciento molar, aproximadamente 5 por ciento molar o aproximadamente 5.5 por ciento molar de la mezcla de lípidos. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es un PEG-lípido libre.

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, la cadena principal o el grupo de cabeza del PEG-lípido es diacilglicerol o fosfoetanolamina. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es un PEG-lípido libre.

Una NPL de la presente descripción puede comprender uno o más PEG-lípidos libres que no están conjugados con un grupo de direccionamiento de CMH (p. ej., un anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) y un PEG-lípido que se conjuga con un grupo de direccionamiento de CMH (p. ej., un anticuerpo

que se une a CD105 y/o CD117). En algunas realizaciones, el PEG-lípido libre comprende el mismo lípido que el del conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH o uno diferente (p. ej., conjugado de lípido-anticuerpo).

(e) Grupo de direccionamiento a CMH

5 Como se analiza en la presente memoria, las NPL pueden estar dirigidas a un tipo celular particular, p. ej., una célula madre hematopoyética (CMH). Esto se puede lograr usando uno o más de los lípidos descritos en la presente memoria. Asimismo, el direccionamiento se puede mejorar incluyendo un grupo de direccionamiento a CMH en una superficie accesible al disolvente de una partícula de NPL. Por ejemplo, los grupos de direccionamiento a CMH pueden incluir un miembro de un par de unión específico, p. ej., un
10 par de anticuerpo-antígeno, un par de ligando-receptor, etc. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une a un antígeno de superficie de CMH, tal como CD105 (también conocido como endoglina) y/o CD117 (también conocido como c-kit, tirosina-proteína cinasa KIT o receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre (SCFR)). El direccionamiento se puede implementar, por ejemplo, mediante el uso de conjugados
15 de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugados de lípido-anticuerpo) descritos en la presente memoria.

Opcionalmente, el grupo de direccionamiento a CMH es un fragmento de anticuerpo (p. ej., un fragmento de anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) sin un componente de Fc. Los fragmentos scFv, Fab o VHH también se pueden conjugar directamente con PEG-lípidos activados para formar conjugados
20 insertables. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH es un conjugado de fragmento de anticuerpo-lípido que comprende un scFv, Fab o fragmentos VHH. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo del conjugado se conjuga directamente con un PEG-lípido activado.

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

En determinadas realizaciones, un grupo de direccionamiento a CMH puede ser un anticuerpo
25 unido a la superficie o un fragmento de unión a antígeno unido a la superficie del mismo, lo que puede permitir el ajuste de la especificidad del direccionamiento celular. Esto es especialmente útil ya que se pueden generar anticuerpos muy específicos contra un epítipo de interés para el sitio de direccionamiento deseado. En una realización, se pueden incorporar y presentar múltiples anticuerpos diferentes en la superficie de una NPL, donde cada anticuerpo se une a diferentes epítipos en el mismo antígeno o a
30 diferentes epítipos en diferentes antígenos. Dichos enfoques pueden aumentar la avidéz y la especificidad de las interacciones de direccionamiento a una célula diana particular.

En algunas realizaciones, el direccionamiento se puede implementar, por ejemplo, mediante el uso de conjugados de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugados de lípido-anticuerpo) descritos en la presente memoria. Los conjugados ilustrativos de lípido-grupo de direccionamiento a CMH
35 (p. ej., conjugados de lípido-anticuerpo) pueden incluir compuestos de Fórmula (VI),

[Lípido] – [conector opcional] – [grupo de direccionamiento a CMH, p. ej., anticuerpo que se une a un antígeno de superficie CMH, p. ej., un anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117]

(Fórmula VI).

En determinadas realizaciones, el direccionamiento se puede implementar, por ejemplo, mediante el uso de conjugados de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugados de lípido-anticuerpo) descritos en la presente memoria. Los conjugados ilustrativos de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugados de lípido-anticuerpo) pueden incluir compuestos de Fórmula (I),

5 [Lípido] – [conector opcional] – [anticuerpo], (I), en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117 (Fórmula I).

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende un polipéptido y el lípido del conjugado (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo) se conjuga con el extremo N, el extremo C o cualquier lugar de la parte media del polipéptido. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a
10 CMH comprende un polipéptido y el lípido del conjugado está conjugado con el extremo N del polipéptido. En algunas realizaciones, el lípido se conjuga con el extremo N del polipéptido. En algunas realizaciones, el lípido se conjuga con el polipéptido en una posición entre el extremo N y el extremo C. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugado con el lípido en el extremo N, el extremo C o cualquier posición entre el
15 extremo N y el extremo C del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugado con el lípido, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo del conjugado de lípido-anticuerpo se une a CD105 y/o CD117.

Los anticuerpos anti-CD105 ilustrativos incluyen, por ejemplo, TRC105 (patente de los Estados
20 Unidos n.º US20180311359A1), muRH105 (solicitud de PCT n.º WO2012149412A3), 43A3 (Biolegend), 166707 (Novus Biologicals), MEM-229 (Abcam), MJ7/18 (Ge A.Z *et al.*, "Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF- β ligand" *Gene* 1994;138(1-2):201-206), OT18A1 (OriGene), EPR19911-220 (Sigma Aldrich), 3A9 (Abcam), MAB1320 (R&D Systems), GTX100508 (GeneTex), SN6 (<https://doi.org/10.1002/ijc.11551>), MEM-226 (Thermo Fisher), 10862-1-AP (Proteintech),
25 JE60-59 (Thermo Fisher), 103 (Invitrogen), ARC0446 (Invitrogen), PA5-111623 (Invitrogen), PA5-29555 (Invitrogen), PA5-80582 (Invitrogen), PA5-27205 (Invitrogen), PA5-117933 (Invitrogen), PA5-29554 (Invitrogen), 2D5E8 (Proteintech), OT13H5 (OriGene), OT19E5 (OriGene), 4C11 (Thermo Fisher), 1E5 (Abnova), OT16G8 (OriGene), QA19A14 (Biolegend), 43A4E1 (Miltenyi Biotec), REA794 (Miltenyi Biotec), D50G1 (Cell Signaling), AF1097 (Novus Biologicals), 001 (Novus Biologicals), EPR10145-12 (Abcam),
30 EPR10145-10 (Abcam), EPR19911 (Abcam), ENG/3269 (Abcam), P3D1 (Santa Cruz), P4A4 (Santa Cruz), 2Q1707 (Santa Cruz), RM0030-6J9 (Santa Cruz), A-8 (Santa Cruz), 8E11 (Santa Cruz) y fragmento de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD105 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 EPR19911-220, GTX100508, PA5-111623, PA5-29555, PA5-
35 80582, PA5-27205, PA5-117933, PA5-29554, AF1097, EPR10145-12, EPR10145-10, EPR19911 y 10862-1-AP. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD105 comprende la CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena pesada y la CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena ligera, determinadas según Kabat (véase Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación de NIH n.º 91-3242, Bethesda), Chotia

(véase, p. ej., Choth, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase MacCallum RM *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 1-10) o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias de V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en EPR19911-220, GTX100508, AF1097, PA5-111623, PA5-29555, PA5-80582, PA5-27205, PA5-117933, PA5-29554, EPR10145-12, EPR10145-10, EPR19911 y 10862-1-AP. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD105 comprende la CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena pesada y la CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD105 descritos en la presente memoria, u otros anticuerpos anti-CD105 conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-CD117 ilustrativos incluyen, por ejemplo, Ab58 (publicación PCT n.º WO2019084067A1), Ab67 (publicación PCT n.º WO2019084067A1), Ab55 (publicación PCT n.º WO2019084067A1), CK6 (patente de los Estados Unidos n.º US8552157B2), hSR-1 (patente de los Estados Unidos n.º US7915391B2), 6LUN1, 104D2 (Biolegend), A3C6E2 (patente europea n.º EP0787743), OTI3F9 (OriGene), BA7.3C.9 (ATCC), B-K15 (OriGene), 2B8 (patente de los Estados Unidos n.º US20160324982A1), ACK2 (Invitrogen), K45 (Blechmen J. *et al.*, J Biol Chem 25 de feb de 1993;268(6):4399-406), YB5.B8 (Ashman L.K. *et al.*, "Epitope mapping and functional studies with three monoclonal antibodies to the c-kit receptor tyrosine kinase, YB5.B8, 17F11, and SR-1" J Cell Physiol 1994;158(3):545-554), 1C5 (Thermo Fisher), 34-8800 (Invitrogen), PA5-14694 (Invitrogen), PA5-16458 (Invitrogen), PA5-16770 (Invitrogen), 18696-1-AP (Proteintech), HC34LC14 (Thermo Fisher), ST04-99 (Invitrogen), MA5-44656 (Invitrogen), YR145 (Abcam), EPR25707-134 (Abcam), YR145 (Abcam), D13A2 (Cell Signaling), Ab81 (Cell Signaling), 2C11 (Sigmaaldrich), S18022G (Biolegend), QA18A19 (Biolegend), W18195C (Biolegend), A3C6E2 (Biolegend), AF1356 (R&D Systems), AF332 (R&D Systems), MAB332 (R&D Systems), AF3267 (R&D Systems), E-3 (Santa-Cruz), E-1 (Santa-Cruz), H-10 (Santa-Cruz), 3C11 (Santa-Cruz), 3H1825 (Santa-Cruz), C-14 (Santa-Cruz), 47233 (Novus Biologicals), NBP2-45508 (Novus Biologicals), NBP2-52975 (Novus Biologicals), AF3267 (Novus Biologicals), NBP2-34487 (Novus Biologicals), NBP1-85593 (Novus Biologicals) y fragmento de unión a antígeno de los mismos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD117 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 PA5-14694, PA5-16458, PA5-16770, 18696-1-AP, HC34LC14, ST04-99, MA5-44656, EPR25707-134, AF1356, AF332, MAB332, AF3267, NBP2-45508, NBP2-52975, AF3267, NBP2-34487, 34-8800 y NBP1-85593. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD117 comprende la CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena pesada y la CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena ligera, determinadas según Kabat (véase Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación de NIH n.º 91-3242, Bethesda), Chotia (véase, p. ej., Choth, (1987), J. MOL. BIOL. 196: 901-917), MacCallum (véase MacCallum RM *et al.*, (1996) J. MOL. BIOL. 262: 1-10) o cualquier otro método de determinación de CDR conocido en la técnica, de las secuencias de V_H y V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PA5-14694, PA5-16458, PA5-16770, 18696-1-AP, HC34LC14, ST04-99, MA5-44656, EPR25707-134, AF1356, AF332, MAB332, AF3267, NBP2-45508, NBP2-52975, AF3267, NBP2-34487, 34-8800 y NBP1-85593. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD117 comprende la CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena pesada y la

CDR₁, CDR₂ y CDR₃ de cadena ligera de uno cualquiera de los anticuerpos anti-CD117 descritos en la presente memoria, u otros anticuerpos anti-CD117 conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende un fragmento Fc de anticuerpo. El isotipo de inmunoglobulina más común en seres humanos es IgG, que está compuesta por dos polipéptidos idénticos de cadena pesada y dos polipéptidos idénticos de cadena ligera. Los enlaces disulfuro unen ambos polipéptidos de cadena pesada entre sí. Además, un enlace disulfuro también une cada polipéptido de cadena ligera a un polipéptido de cadena pesada. Los polipéptidos de cadena pesada contienen cuatro dominios distintos, que incluyen los dominios variable pesado (VH), pesado constante 1 (CH1), pesado constante 2 (CH2) y pesado constante 3 (CH3). Cada cadena ligera contiene un dominio ligero variable (VL) y un dominio pesado variable (VH). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera proporcionan al anticuerpo actividad de unión a antígeno y son responsables de la diversidad y especificidad de las inmunoglobulinas. De manera significativa, los dominios constantes de cadena pesada, principalmente CH2 y CH3, participan en funciones distintas de la unión a antígenos de los anticuerpos y constituyen la región Fc. La región Fc es capaz de unirse al complemento, lo que puede desencadenar la fagocitosis o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Además, la región Fc también puede unirse a los receptores de Fc, lo que puede desencadenar la fagocitosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Por otra parte, se sabe que la región Fc mejora el mantenimiento del anticuerpo durante la circulación.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo 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 CMH comprende un Fab o un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un nanocuerpo.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende un Fab que no comprende un enlace disulfuro intercatenario natural. 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 CMH comprende un Fab que comprende uno o más enlaces disulfuro intercatenarios no naturales. En algunas realizaciones, los enlaces disulfuro intercatenarios están entre dos restos de cisteína no naturales 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 las sustituciones F174C y C233S y/o un fragmento de cadena ligera que comprende sustituciones las S176C y C214S, numeración según Kabat. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende un resto de cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH 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 de 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 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 intercatenarios, y en donde el grupo de direccionamiento a CMH comprende además un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) unido al extremo C del dominio constante de cadena ligera por un conector de aminoácidos. En algunas realizaciones, el anticuerpo Fab es un Fab DS, un Fab NoDS, un Fab bDS, un Fab-ScFv bDS, como se demuestra en la **FIG. 12**.

En algunas realizaciones, el conjugado (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo) comprende un Fab, en donde el Fab comprende un fragmento de cadena pesada y uno de cadena ligera. En algunas realizaciones, el fragmento de cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio CH1 de anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada es un VH de IgG1. En algunas realizaciones, el dominio CH1 de anticuerpo es un dominio CH1 de IgG. En algunas realizaciones, el fragmento de cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera unido a un dominio constante de cadena ligera de anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena ligera es un dominio VL Kappa. En algunas realizaciones, el dominio constante de cadena ligera del anticuerpo es un dominio CL Kappa. En algunas realizaciones, el dominio CH1 y el dominio constante de cadena ligera están unidos por uno o más enlaces disulfuro intercatenarios.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) 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.

Un grupo de direccionamiento a CMH ilustrativo (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) puede comprender una o más secuencias de aminoácidos como se describe para los anticuerpos establecidos en la **tabla B**. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende las secuencias de aminoácidos descritas para Ab1 como se establece en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende las secuencias de aminoácidos descritas para Ab2 como se establece en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende las secuencias de aminoácidos descritas para Ab3 como se establece en la tabla B.

Tabla B. Anticuerpos dirigidos a CMH ilustrativos.

<u>Anticuerpo</u>	<u>Diana</u>	<u>Nombre de la secuencia</u>	<u>SEQ ID NO</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
<u>Ab1</u>	<u>CD117</u>	<u>CDR-H1</u>	<u>1</u>	<u>FTFSNYAMS</u>
		<u>CDR-H2</u>	<u>2</u>	<u>AISGSGGSTYYADSVKG</u>
		<u>CDR-H3</u>	<u>3</u>	<u>AKGPPTYHTNYYYMDV</u>

	<u>Anticuerpo</u>	<u>Diana</u>	<u>Nombre de la secuencia</u>	<u>SEQ ID NO</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
5			<u>CDR-L1</u>	<u>4</u>	<u>RASQGISSWLA</u>
			<u>CDR-L2</u>	<u>5</u>	<u>AASSLQS</u>
			<u>CDR-L3</u>	<u>6</u>	<u>QQTNSFPYT</u>
10			<u>VH</u>	<u>7</u>	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN</u> <u>YAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAKGPPTYHTNYYYMDVWGKGTTVTVSS</u>
			<u>VL</u>	<u>8</u>	<u>DIQMTQSPSSVSASVGDRV TITCRASQGISSW</u> <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS</u> <u>GSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTNSFP</u> <u>YTFGGG TKVEIK</u>
15			<u>Cadena pesada</u>	<u>9</u>	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN</u> <u>YAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAKGPPTYHTNYYYMDVWGKGTTVTVSS</u> <u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY</u> <u>FPEPVT VSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH</u>
20			<u>Cadena ligera</u>	<u>38</u>	<u>DIQMTQSPSSVSASVGDRV TITCRASQGISSW</u> <u>LAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS</u> <u>GSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTNSFP</u> <u>YTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS</u> <u>GTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGN</u> <u>SQESVTEQDSKDSYSLCSTLTLSKADYEKHK</u> <u>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES</u>
25	<u>Ab2</u>	<u>CD117</u>	<u>CDR-H1</u>	<u>10</u>	<u>FTFSDADMD</u>
			<u>CDR-H2</u>	<u>11</u>	<u>RTRNKAGSYTTEYAASVKG</u>
			<u>CDR-H3</u>	<u>12</u>	<u>AREPKYWIDFDL</u>
			<u>CDR-L1</u>	<u>13</u>	<u>RASQSISSYLN</u>
			<u>CDR-L2</u>	<u>14</u>	<u>AASSLQS</u>
30			<u>CDR-L3</u>	<u>15</u>	<u>QQSYIAPYT</u>
35			<u>VH</u>	<u>16</u>	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS</u> <u>DADMDWVRQAPGKGLEWVG RTRNKAGSYTT</u>

	<u>Anticuerpo</u>	<u>Diana</u>	<u>Nombre de la secuencia</u>	<u>SEQ ID NO</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
5					<u>EYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTED</u> <u>TAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLTVSS</u>
			<u>VL</u>	<u>17</u>	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSY</u> <u>LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS</u> <u>GSFGSDFTLTISLQPEDFATYYCQSYIAP</u> <u>YTFGGGTKVEIK</u>
10			<u>Cadena pesada</u>	<u>18</u>	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD</u> <u>ADMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKAGSYTT</u> <u>EYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTED</u> <u>TAVYYCAREPKYWIDFDLWGRGTLTVSSAS</u> <u>TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP</u> <u>EPVTVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSSDKTHTCGGHHHHHH</u>
15			<u>Cadena ligera</u>	<u>39</u>	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSY</u> <u>LNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS</u> <u>GSFGSDFTLTISLQPEDFATYYCQSYIAP</u> <u>YTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS</u> <u>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN</u> <u>SQESVTEQDSKSTYSLCSTLTLSKADYEKHK</u> <u>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES</u>
20					
25	<u>Ab3</u>	<u>CD105</u>	<u>CDR-H1</u>	<u>19</u>	<u>DAWMD</u>
			<u>CDR-H2</u>	<u>20</u>	<u>EIRSKASNHATYYAESVKG</u>
			<u>CDR-H3</u>	<u>21</u>	<u>WRRFFDS</u>
			<u>CDR-L1</u>	<u>22</u>	<u>RASSSVSYM</u>
30			<u>CDR-L2</u>	<u>23</u>	<u>ATSNLAS</u>
			<u>CDR-L3</u>	<u>24</u>	<u>QQWSSNPLT</u>
			<u>VH</u>	<u>25</u>	<u>EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSD</u> <u>AWMDWVRQSPKGLEWVAEIRSKASNHATY</u> <u>YAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAED</u> <u>TGIYYCTRWRRFFDSWGQGTTLTVSS</u>
35			<u>VL</u>	<u>26</u>	<u>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRF</u>

	<u>Anticuerpo</u>	<u>Diana</u>	<u>Nombre de la secuencia</u>	<u>SEQ ID NO</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
5					<u>GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSN</u> <u>PLTFGAGTKLELK</u>
10			<u>Cadena pesada</u>	<u>27</u>	<u>EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSD</u> <u>AWMDWVRQSPEGLEWVAEIRSKASNHATY</u> <u>YAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAED</u> <u>TGIYYCTRWRRFFDSWGQGTTLTVSSASTKG</u> <u>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV</u> <u>TVSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP</u> <u>KSSDKTHTCGGHHHHHH</u>
15			<u>Cadena ligera</u>	<u>40</u>	<u>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFS</u> <u>GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSN</u> <u>PLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS</u> <u>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN</u> <u>SQESVTEQDSKDYSLCSTLTLSKADYEKHK</u> <u>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES</u>
20	<u>mutAb1</u> <u>(control</u> <u>negativ</u> <u>o sin</u> <u>unión</u> <u>para</u> <u>Ab1)</u>		<u>CDR-H1</u>	<u>28</u>	<u>FAAANYAMS</u>
25			<u>CDR-H2</u>	<u>29</u>	<u>AISGAAASTYYADSVKG</u>
			<u>CDR-H3</u>	<u>30</u>	<u>AKGPPTYAAAYYYMDV</u>
			<u>CDR-L1</u>	<u>31</u>	<u>RASQAAASWLA</u>
30			<u>CDR-L2</u>	<u>32</u>	<u>AAASLQS</u>
			<u>CDR-L3</u>	<u>33</u>	<u>QQTAAAPYT</u>
			<u>VH</u>	<u>34</u>	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAAAN</u> <u>YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGAAASTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCAKGPPTYAAAYYYMDVWGKGTTTVTVSS</u>
35			<u>VL</u>	<u>35</u>	<u>DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQAAAS</u> <u>WLAWYQQKPGKAPKLLIYAAASLQSGVPSRF</u> <u>SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTAAA</u> <u>PYTFGGGTKVEIK</u>
			<u>Cadena pesada</u>	<u>36</u>	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAAAN</u> <u>YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGAAASTYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u>

	<u>Anticuerpo</u>	<u>Diana</u>	<u>Nombre de la secuencia</u>	<u>SEQ ID NO</u>	<u>Secuencia de aminoácidos</u>
5					<u>YYCAKGPPTYAAAYYYMDVWVGKGTDTVSS</u> <u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY</u> <u>FPEPVTWSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KKVEPKSSDKTHTCGGHHHHHH</u>
10			<u>Cadena ligera</u>	<u>37</u>	<u>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQAAAS</u> <u>WLAWYQQKPGKAPKLLIYAAASLQSGVPSRF</u> <u>SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTAAA</u> <u>PYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS</u> <u>GTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGN</u> <u>SQESVTEQDSKSTYSLCSTLTLSKADYEKHK</u> <u>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRRGES</u>
15	<u>NP</u>	<u>NP</u>	<u>Cadena pesada de dominio constante (CH1 IgG1)</u>	<u>41</u>	<u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY</u> <u>FPEPVTWSWNSGALTSGVHTCPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u> <u>KKV</u>
20	<u>NP</u>	<u>NP</u>	<u>Secuencia C-terminal</u>	<u>42</u>	<u>EPKSSDKTHTCGGHHHHHH</u>
25	<u>NP</u>	<u>NP</u>	<u>Cadena ligera de dominio constante (CL Kappa)</u>	<u>43</u>	<u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFP</u> <u>YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYSLCSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL</u> <u>SSPVTKSFNRRGES</u>

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende un espaciador y/o conector de aminoácidos. En algunas realizaciones, el espaciador está entre dos dominios del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el espaciador está entre el dominio V_{HH} y la cisteína C-terminal. En algunas realizaciones, el espaciador está entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y el lípido. En algunas realizaciones, el espaciador está entre el dominio variable único de unión a antígeno y el lípido. En algunas realizaciones, el espaciador está entre el V_{HH} y el lípido. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende un espaciador de y/o conector aminoácidos expuesto en una cualquiera de las secuencias en la **tabla C**. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH

(p. ej., anticuerpo) comprende un espaciador y/o conector de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de AAA o una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 45-60.

Tabla C: Secuencias espaciadoras/conectoras

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
Espaciador 3A	N/P	AAA
Espaciador 5GS	45	GGGGS
Espaciador 7GS	46	SGGSGGS
Espaciador 8GS	47	GGGSGGS
Espaciador 9GS	48	GGGSGGGS
Espaciador 10GS	49	GGGSGGGGS
Espaciador 15GS	50	GGGSGGGGSGGGGS
Espaciador 18GS	51	GGGSGGGGSGGGGSGGS
Espaciador 20GS	52	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
Espaciador 25GS	53	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
Espaciador 30GS	54	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
Espaciador 35GS	55	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
Espaciador 40GS	56	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
Bisagra G1	57	EPKSCDKTHTCPPCP
Bisagra 9GS-G1	58	GGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
Región de bisagra larga superior de llama	59	EPKTPKPQAAA
Bisagra G3	60	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP

Los ejemplos de espaciadores de aminoácidos incluyen, pero sin limitación, los establecidos en las SEQ ID NO: 45-60 y la secuencia de aminoácidos AAA. Los espaciadores de la presente invención pueden comprender al menos 3, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 aminoácidos de longitud. Los espaciadores de la presente invención pueden comprender entre 3 y 50, 5 y 45, 7 y 40, 10 y 35, 12 y 30 o 15 y 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, el espaciador tiene 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 o más aminoácidos de longitud. El espaciador del monómero de proteína de fusión descrito en la presente memoria puede ser un espaciador flexible o un espaciador rígido. El espaciador del grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) descrito en la presente memoria puede ser un espaciador corto o un espaciador largo. En algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la tabla C que comprende 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. En

algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la tabla C. Los espaciadores descritos en la presente memoria se pueden usar para unir dos o más dominios de aminoácidos entre sí.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende una o más secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las secuencias de CDR de anticuerpos convencionales son regiones muy variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos inmunoglobulinas que determinan la especificidad del antígeno y representan la ubicación donde estas moléculas se unen a su antígeno específico. En algunos casos, los dominios variables únicos de unión a antígeno (es decir, un V_{HH}), solo comprenden un conjunto de CDR, ubicadas en la parte N-terminal de la estructura. En la presente memoria se describen grupo de direccionamiento a CMH que comprenden un polipéptido que comprende una o más secuencias de CDR que poseen una longitud de aminoácidos entre 4 y 30, 6 y 28, 8 y 26, 10 y 24, 12 y 22, 14 y 20 o 16 y 18 restos. En algunas realizaciones, las secuencias de CDR son 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 o 30 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias de CDR tienen entre 4 y 20 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias de CDR tienen entre 5 y 15 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, las secuencias de CDR comprenden una secuencia de aminoácidos como expuesta en la tabla B que comprende 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. En algunas realizaciones, las secuencias de CDR comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en la tabla B.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) proporcionado en la presente memoria comprende un dominio pesado variable que comprende una secuencia de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y un dominio ligero variable que comprende una secuencia de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende una secuencia de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, cada una con una secuencia de aminoácidos expuesta en la tabla B, donde una o más secuencias de CDR comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde una o más secuencias de CDR comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, una CDR-L2 que tiene la secuencia

de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14 y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15, donde una o más secuencias de CDR comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11, una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14 y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23 y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24, donde una o más secuencias de CDR comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19, una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 20, una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21, una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22, una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 23 y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) proporcionado en la presente memoria comprende un dominio pesado variable (VH) que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y un dominio ligero variable (VL) que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde los dominios VH y VL tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos como se ha descrito para Ab1 en la

tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO:7 y un dominio VL que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde los dominios VH y VL tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos como se ha descrito para Ab2 en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO:16 y un dominio VL que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de la SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde los dominios VH y VL tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos como se ha descrito para Ab3 en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a

CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de la SEQ ID NO:25 y un dominio VL que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de la SEQ ID NO: 26.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) proporcionado en este documento comprende un Fab, en donde el Fab comprende un dominio pesado variable (VH) que comprende las secuencias CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y un dominio ligero variable (VL) que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos enumeradas para Ab1 como se ha establecido en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 7 y 8. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 7 y 8.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, en donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos enumeradas para Ab2 como se ha establecido en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 16 y 17. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 16 y 17.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, en donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos enumeradas para Ab3 como se ha establecido en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 25 y 26. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 25 y 26.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) proporcionado en este documento comprende un Fab, en donde el Fab comprende un dominio de cadena pesada y un dominio de cadena ligera. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos enumeradas para Ab1 como se ha establecido en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 9 y 38. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 9 y 38.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, en donde los dominios de cadena pesada y de cadena ligera del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos enumeradas para Ab2 como se ha establecido en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 18 y 39. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 18 y 39.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos enumeradas para Ab3 como se ha establecido en la tabla B. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 27 y 40. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios de cadena pesada y cadena ligera del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 27 y 40.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende dos o más dominios de unión a antígeno (p. ej., dos dominios V_{HH}). En algunas realizaciones, los dos o más dominios de unión a antígeno están unidos mediante un conector de aminoácidos. En algunas realizaciones, los dos o más dominios V_{HH} están unidos por un conector de aminoácidos. En algunas realizaciones, el conector de aminoácidos comprende uno o más restos de glicina

y/o serina (p. ej., una o más repeticiones de la secuencia GGGGS). En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH 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 mediante uno o más enlaces disulfuro (p. ej., enlaces disulfuro intercatenarios). En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende una 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 mediante uno o más enlaces disulfuro. En algunas realizaciones, 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. 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. 12**.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende un polipéptido que se une a un antígeno de superficie de CMH con alta afinidad de unión. En algunas realizaciones, la afinidad de unión del grupo de direccionamiento a CMH por el antígeno de superficie de CMH se mide como una constante de disociación en equilibrio (K_D). En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH se une a un antígeno de superficie de CMH con una afinidad de unión inferior a 500, 400, 300, 200, 100 o 1 nM. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 7 y 8. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 7 y 8. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 16 y 17. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 16 y 17. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab tienen al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 25 y 26. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH comprende un Fab, donde los dominios VH y VL del Fab comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 25 y 26.

En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) proporcionado en la presente memoria se dirige a un antígeno de superficie de CMH humano, que incluye, por ejemplo, cualquiera de los antígenos de superficie de CMH descritos en la

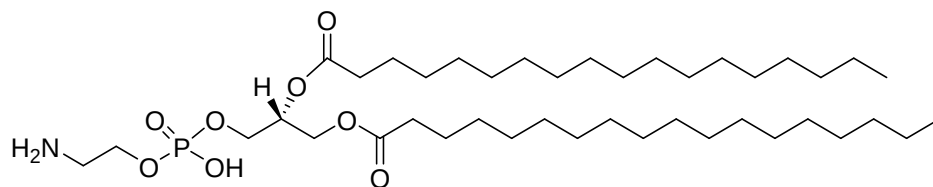
presente solicitud. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH se dirige a CD105 humano y/o CD117 humano. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH se dirige a más de un antígeno de superficie de CMH humano.

En algunas realizaciones, el conjugado (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo) que comprende un grupo de direccionamiento a CMH es capaz de unirse a un antígeno de superficie de CMH no humano. En algunas realizaciones, el conjugado (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo) que comprende un grupo de direccionamiento a CMH es capaz de unirse a un antígeno de superficie de CMH humano. En algunas realizaciones, el conjugado (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo) que comprende un grupo de direccionamiento a CMH es capaz de unirse a un antígeno de superficie de CMH no humano descrito en la presente memoria, por ejemplo, CD105 humano y/o CD117 humano.

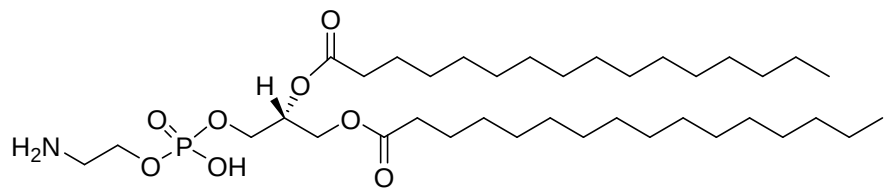
En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) comprende una secuencia polipeptídica como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento comprende las seis CDR de una secuencia polipeptídica (p. ej., una secuencia polipeptídica de anticuerpo, p. ej., una secuencia polipeptídica de Fab) como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) como se describe en la presente memoria. En realizaciones adicionales, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) se une al mismo epítipo en la molécula diana (p. ej., CD105 y/o CD117) al que se une una secuencia polipeptídica como se describe en la presente memoria. En realizaciones adicionales, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) compite con una secuencia polipeptídica como se describe en la presente memoria para unirse al mismo epítipo en la molécula diana.

En determinadas realizaciones, el grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) se puede acoplar covalentemente a un lípido mediante un conector que contiene polietilenglicol (PEG).

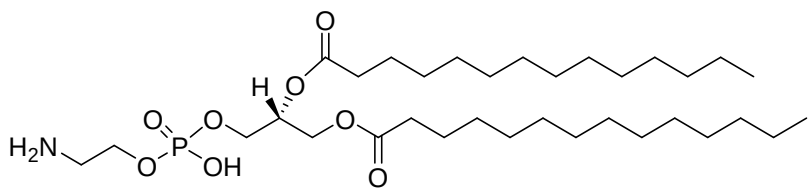
En otras realizaciones, el lípido utilizado para crear un conjugado (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo) se puede seleccionar entre diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE):



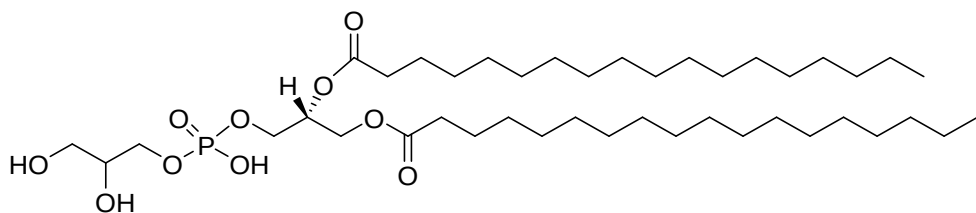
dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE):



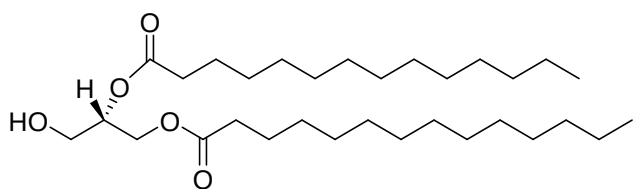
dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE):



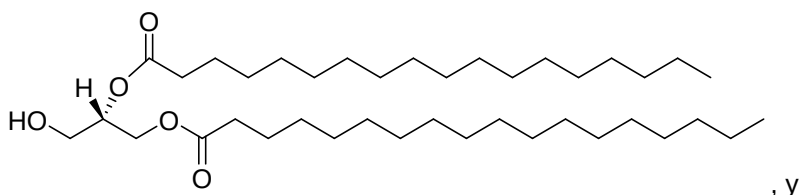
distearoil-glicero-fosfoglicerol (DSPG):



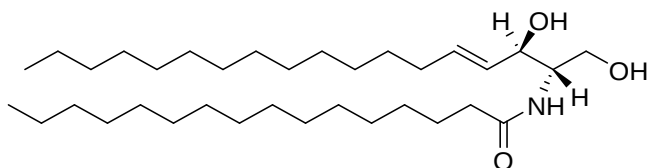
dimiristoil-glicerol (DMG):



diestearoilglicerol (DSG):



N-palmitoil-esfingosina (ceramida C16)



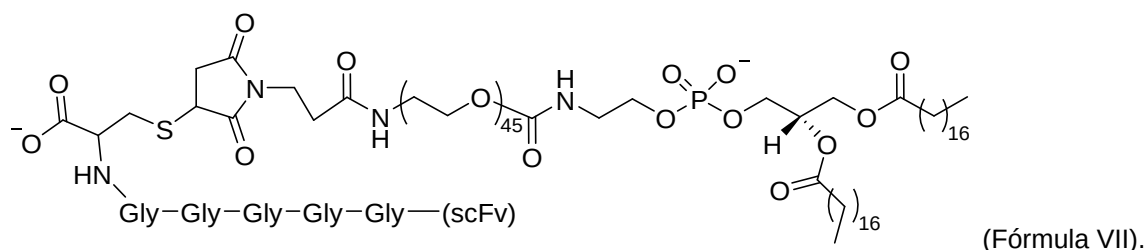
El grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117) puede acoplarse covalentemente a un lípido directamente o mediante un conector, por ejemplo, un conector que contiene polietilenglicol (PEG). En determinadas realizaciones, el PEG es PEG 1000, PEG 2000, PEG 3400, PEG 3000, PEG 3450, PEG 4000 o PEG 5000. En determinadas realizaciones, el PEG es PEG 2000.

En algunas realizaciones, el conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el conjugado de lípido-anticuerpo) está presente en la NPL en un intervalo de 0.001-0.5 por ciento molar, 0.001-0.3 por ciento molar, 0.002-0.2 por ciento molar, 0.01-0.1 por ciento molar, 0.1-0.3 por ciento molar o 0.1-0.2 por ciento molar.

En determinadas realizaciones, el conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el conjugado de lípido-anticuerpo) comprende DSPE, un componente de PEG y un anticuerpo dirigido. En determinadas realizaciones, el conjugado de grupo de direccionamiento a CMH es un anticuerpo que se une a un antígeno de superficie de CMH descrito en la presente memoria, p. ej., un anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117.

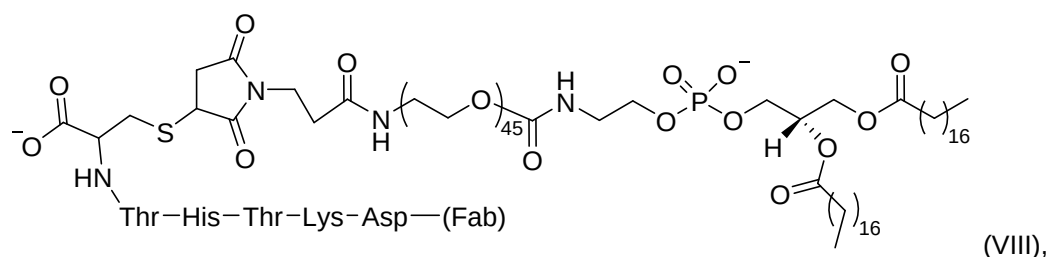
Un conjugado ilustrativo de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el conjugado de lípido-anticuerpo) comprende DSPE y PEG 2000, por ejemplo, como se describe en Nellis *et al.* (2005) BIOTECHNOL. PROG. 21, 205-220. Un conjugado ilustrativo comprende la estructura de Fórmula (VII), donde el scFv representa un sitio de unión de anticuerpo diseñado que se une a una diana de interés. En determinadas realizaciones, el sitio de unión del anticuerpo diseñado se une a cualquiera de las dianas descritas en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el sitio de unión del anticuerpo diseñado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD105 diseñado o un anticuerpo anti-CD117 diseñado.

Un ejemplo de un compuesto de Fórmula (VII) es el que se muestra a continuación:



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

Otro ejemplo de un compuesto de Fórmula (VIII) es el que se muestra a continuación:

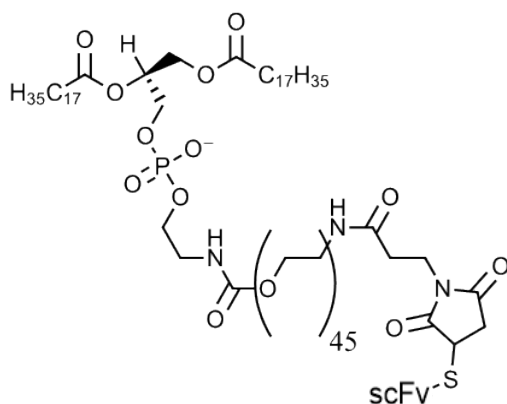


cuya producción se describe en Nellis *et al.* (2005) citado anteriormente o la patente de los Estados Unidos n.º 7.022.336. Se contempla que el Fab en la Fórmula (VIII) puede reemplazarse con un anticuerpo intacto o un fragmento de antígeno del mismo (p. ej., un fragmento (Fab')₂) o un sitio de unión de anticuerpo diseñado (p. ej., un scFv).

Se describen otros conjugados de lípido-anticuerpo, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 7.022.336, donde el grupo de direccionamiento (p. ej., anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede reemplazarse con un grupo de direccionamiento de interés, por ejemplo, un grupo de direccionamiento que se una a cualquier antígeno de superficie de CMH descrito en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, el componente lipídico de un conjugado ilustrativo de Fórmula (I) o Fórmula (VI) puede ser cualquiera de los lípidos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el componente lipídico de un conjugado de Fórmula (I) o Fórmula (VI) se basa en un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria, por ejemplo, un lípido catiónico ionizable de Fórmula (II'), Fórmula (II), Fórmula (IIa), Fórmula (IIb), Fórmula (IIIa), Fórmula (IIIb), Fórmula (IV) o Fórmula (V), o una de sus sales. Por ejemplo, un lípido catiónico ionizable ilustrativo se puede seleccionar de la tabla A, o una de sus sales.

En determinadas realizaciones, el conjugado (p. ej., conjugado de lípido-anticuerpo) basado en un lípido de la presente descripción puede incluir:



, donde scFv representa un sitio de unión de anticuerpo diseñado que se une a una diana (p. ej., un antígeno de superficie de CMH) descrita en la presente memoria, p. ej., CD105 y/o CD117.

En determinadas realizaciones, la NPL puede comprender además PEG-lípido libre para reducir la cantidad de unión inespecífica a través del grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117). El PEG-lípido libre puede ser igual o diferente al 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-(metilpolioxietileno oxicarbonil)-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, metoxipolietilenglicol (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 promedio 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 determinadas realizaciones, la composición de NPL comprende una mezcla de PEG-lípidos con cadenas de miristoílo y acilo esteárico. En determinadas realizaciones, la composición de NPL comprende una mezcla de PEG-lípidos con cadenas de palmitoílo y acilo de estearoílo.

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

El conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugado de lípido-anticuerpo) se pueden incorporar en NPL como se describe a continuación, por ejemplo, en NPL que contienen, por ejemplo, un lípido catiónico ionizable, un estero, un fosfolípido neutro y un PEG-lípido. Se contempla que, en determinadas realizaciones, las NPL que contienen el lípido-grupo de direccionamiento a CMH pueden

5 contener un lípido catiónico ionizable descrito en la presente memoria o un lípido catiónico descrito, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 10.221.127, 10.653.780 o la solicitud publicada de los Estados Unidos n.º US2018/0085474, US2016/0317676, publicación internacional n.º WO2009/086558 o Miao *et al.* (2019) NATURE BIOTECH 37:1174-1185 o Jayaraman *et al.* (2012) ANGEW CHEM INT. 51: 8529-8533.

10 En algunas realizaciones, el lípido catiónico se puede seleccionar entre un lípido catiónico ionizable expuesto en la tabla A, o una de sus sales. 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} proporcionado en la presente memoria se puede combinar 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 hubiera sido descrita individual y específicamente.

15 Las NPL se pueden formular utilizando los métodos y otros componentes que se describen a continuación en las siguientes secciones.

En determinadas realizaciones, la NPL o la mezcla de lípidos también pueden incluir un conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo) como se describe en la presente memoria.

El conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., el conjugado de lípido-anticuerpo) puede estar presente en la NPL o en la mezcla de lípidos en un intervalo de 0.001-0.5 por ciento molar, 0.001-0.1 por ciento molar, 0.01-0.5 por ciento molar, 0.05-0.5 por ciento molar, 0.1-0.5 por ciento molar, 0.1-0.3 por ciento molar, 0.1-0.2 por ciento molar, 0.2-0.3 por ciento molar, de aproximadamente 0.01 por ciento molar, aproximadamente 0.05 por ciento molar, aproximadamente 0.1 por ciento molar, aproximadamente 0.15 por ciento molar, aproximadamente 0.2 por ciento molar, aproximadamente 0.25 por ciento molar, aproximadamente 0.3 por ciento molar, aproximadamente 0.35 por ciento molar, aproximadamente 0.4 por ciento molar, aproximadamente 0.45 por ciento molar o aproximadamente 0.5

25 por ciento molar.

(f) Cargas útiles

Las composiciones de NPL pueden comprender un agente, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico para suministro a una célula (p. ej., una célula madre hematopoyética (CMH)) o tejido, por ejemplo, una célula (p. ej., una CMH) o tejido en un sujeto.

35 Las composiciones de NPL de la presente invención pueden incluir un ácido nucleico, por ejemplo, un ADN o ARN, tal como un ARNm, ARNt, microARN, ARNip, ARN guía (ARNg), ARN guía de edición de calidad (ARNgec), ARNcirc (ARN circular), ribozimas, ARN señuelo, ARNip del sustrato de dícer o ADN o ARN molde del donante. Las composiciones de NPL de la presente invención pueden incluir ADN

monocatenario (ADNmc), ADN bicatenario (ADNbc), ARN monocatenario (ARNmc) y/o ARN bicatenario (ARNbc). Se contempla que los ácidos nucleicos puedan 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 se puede sintetizar para contener modificaciones de bases, azúcares y conectores conocidas por los expertos en la técnica. Asimismo, los ácidos nucleicos pueden ser lineales o circulares o tener cualquier configuración deseada. Las composiciones de NPL pueden incluir múltiples moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, múltiples moléculas de ARN, que pueden ser iguales o diferentes.

En determinadas realizaciones, la carga útil es un ARNm. En determinadas realizaciones, una composición de NPL particular puede contener varias moléculas de ARNm que pueden ser iguales o diferentes. En determinadas realizaciones, se pueden combinar y/o poner en contacto simultáneamente una o más composiciones de NPL que incluyen uno o más ARNm diferentes, con una célula. Se contempla que un ARNm puede incluir uno o más de un tallo-bucle, un nucleósido terminador de cadena, una secuencia poliA, una señal de poliadenilación y/o una estructura de caperuza 5'. El ARNm puede codificar una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la carga útil comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida. En algunas realizaciones, la nucleasa dirigida es una nucleasa asociada a CRISPR (Cas), una nucleasa de dedos de zinc (ZFN), una nucleasa efectora de tipo activador transcripcional (TALEN) o una megaTAL. En algunas realizaciones, la nucleasa dirigida es una ZFN, TALEN o megaTAL que comprende una secuencia de aminoácidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la carga útil comprenden un ARNm que codifica una nucleasa asociada a CRISPR (Cas) o un editor de bases químicas; y un ARN guía (ARNg) que comprende una secuencia de nucleótidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la carga útil comprenden un ARNm que codifica un editor de calidad; y un ARN guía de edición de calidad (ARNgec) que comprende una secuencia de nucleótidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, la carga útil comprende un ARNg o ARNgec. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, la carga útil comprende un ARNg o ARNg_{ec}. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNg_{ec} de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos de la carga útil comprenden además un ácido nucleico molde donante que comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico molde donante de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico molde donante de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos consecutivos y está ubicada dentro de una región codificante de un gen, una región intrónica asociada a un gen, una región exónica asociada a un gen, una región 5' no traducible asociada a un gen o una región 3' no traducible asociada a un gen, en donde el gen se selecciona del grupo que consiste en un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTX*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*, *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una región reguladora de un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTX*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*, *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una región potenciadora o una región represora de un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTX*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*, *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica del potenciador eritroide de *BCL11A*. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo (en dirección 3') del punto de inicio de la transcripción

(TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, un polinucleótido de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o un polinucleótido de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana potenciadora comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +58 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de la región codificante de un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTk*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*, *TCIRG*, *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40LG*, *FOXP3*, *IL4*, *IL10*, *IL13*, *IL7R*, *PRF1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRACA2*, *FANCD2*, *MPL*, *CCR5*, *CXCR4*, *F5*, *F2*, antitrombina III y proteína C. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de la región 5' no traducible o la región 3' no traducible que rodea un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HBA1*, *HBA2*, *HBD*, *BCL11A*, *BACH2*, *KLF1*, *LRF*, *ADA*, *DCLREIC*, *IL2RG*, *RAG1*, *RAG2*, *JAK3*, *BTk*, *WAS*, *F8*, *F9*, *F11*, *F10*, *PKLR*, *RPS19*, *CYBA*, *CYBB*, *NCF1*, *NCF1B*, *NCF1C*, *NCF2*, *NCF4*, *ELANE*, *ABCD1*, *ARSA*, *FXN*, *GBA*, *IDS*, *IDUA*,

TCIRG, AICDA, UNG, CD40, CD40LG, FOXP3, IL4, IL10, IL13, IL7R, PRF1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRACA2, FANCD2, MPL, CCR5, CXCR4, F5, F2, antitrombina III y proteína C. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de una región intrónica o región exónica asociada con un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB, HBG1, HBG2, HBA1, HBA2, HBD, BCL11A, BACH2, KLF1, LRF, ADA, DCLREIC, IL2RG, RAG1, RAG2, JAK3, BTK, WAS, F8, F9, F11, F10, PKLR, RPS19, CYBA, CYBB, NCF1, NCF1B, NCF1C, NCF2, NCF4, ELANE, ABCD1, ARSA, FXN, GBA, IDS, IDUA, TCIRG, AICDA, UNG, CD40, CD40LG, FOXP3, IL4, IL10, IL13, IL7R, PRF1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRACA2, FANCD2, MPL, CCR5, CXCR4, F5, F2, antitrombina III y proteína C.* En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de una región reguladora asociada con un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB, HBG1, HBG2, HBA1, HBA2, HBD, BCL11A, BACH2, KLF1, LRF, ADA, DCLREIC, IL2RG, RAG1, RAG2, JAK3, BTK, WAS, F8, F9, F11, F10, PKLR, RPS19, CYBA, CYBB, NCF1, NCF1B, NCF1C, NCF2, NCF4, ELANE, ABCD1, ARSA, FXN, GBA, IDS, IDUA, TCIRG, AICDA, UNG, CD40, CD40LG, FOXP3, IL4, IL10, IL13, IL7R, PRF1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRACA2, FANCD2, MPL, CCR5, CXCR4, F5, F2, antitrombina III y proteína C.* En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de una región potenciadora asociada con un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB, HBG1, HBG2, HBA1, HBA2, HBD, BCL11A, BACH2, KLF1, LRF, ADA, DCLREIC, IL2RG, RAG1, RAG2, JAK3, BTK, WAS, F8, F9, F11, F10, PKLR, RPS19, CYBA, CYBB, NCF1, NCF1B, NCF1C, NCF2, NCF4, ELANE, ABCD1, ARSA, FXN, GBA, IDS, IDUA, TCIRG, AICDA, UNG, CD40, CD40LG, FOXP3, IL4, IL10, IL13, IL7R, PRF1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRACA2, FANCD2, MPL, CCR5, CXCR4, F5, F2, antitrombina III y proteína C.* En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos de una región represora asociada con un gen seleccionado del grupo que consiste en *HBB, HBG1, HBG2, HBA1, HBA2, HBD, BCL11A, BACH2, KLF1, LRF, ADA, DCLREIC, IL2RG, RAG1, RAG2, JAK3, BTK, WAS, F8, F9, F11, F10, PKLR, RPS19, CYBA, CYBB, NCF1, NCF1B, NCF1C, NCF2, NCF4, ELANE, ABCD1, ARSA, FXN, GBA, IDS, IDUA, TCIRG, AICDA, UNG, CD40, CD40LG, FOXP3, IL4, IL10, IL13, IL7R, PRF1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRACA2, FANCD2, MPL, CCR5, CXCR4, F5, F2, antitrombina III y proteína C.* En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende o está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende o está dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende o está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende o está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende o está dentro de una secuencia

polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos.

En algunas realizaciones, la carga útil comprende un ARNg o ARNgec que tiene al menos un 80 % de identidad o complementariedad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que comprende el potenciador eritroide de *BCL11A*. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad o complementariedad con al menos 15 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que comprende el potenciador eritroide de *BCL11A*. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad o complementariedad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que comprende el potenciador eritroide de *BCL11A*. En algunas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad o complementariedad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de un polinucleótido que comprende el potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad o complementariedad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia polinucleotídica en el intrón 2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad o complementariedad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el ARNg o ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad o complementariedad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el ARNg o

ARNgec de la carga útil comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad o complementariedad con al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos consecutivos de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del SST de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el ARNg comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos

En determinadas realizaciones, la composición de NPL puede incluir uno o más componentes que incluyen, pero sin limitación, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, moléculas pequeñas hidrófobas, agentes terapéuticos, carbohidratos, polímeros, moléculas potenciadoras de la permeabilidad y agentes modificadores de la superficie.

En algunas realizaciones, la relación p/p del componente lipídico con respecto a la carga útil (p. ej., ácido nucleico, p. ej., ARNm) en la composición de NPL resultante es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1. En determinadas realizaciones, la relación p/p del componente lipídico con respecto a la carga útil (p. ej., ácido nucleico, p. ej., ARNm) en la composición resultante es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 50:1. En determinadas realizaciones, la relación p/p es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 40:1. En determinadas realizaciones, la relación p/p es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1. En determinadas realizaciones, la relación p/p es de aproximadamente 15:1 a aproximadamente 25:1.

En determinadas realizaciones, la eficiencia de encapsulación de la carga útil (p. ej., ácido nucleico, p. ej., ARNm) en las nanopartículas lipídicas es de al menos el 50 %. En determinadas realizaciones, la eficiencia de encapsulación es de al menos el 80 %, al menos el 90 % o más del 90 %.

Se puede diseñar una composición lipídica para una o más aplicaciones o dianas específicas. Por ejemplo, se puede diseñar una composición de NPL para administrar ácidos nucleicos (p. ej., un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante) a una célula, tejidos, órgano, sistema o grupo particular de los mismos en el cuerpo de un mamífero. Las propiedades fisicoquímicas de las composiciones de NPL pueden alterarse para aumentar la selectividad para un sitio diana particular en un sujeto. Por ejemplo, los tamaños de partículas se pueden ajustar en función de los tamaños de las comunicaciones de diferentes órganos. Los ácidos nucleicos incluidos en una composición de NPL también pueden depender de la diana o dianas de administración deseadas. Por ejemplo, un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante pueden seleccionarse para una enfermedad particular y/o para el suministro a una célula, tejido, órgano o sistema particular o grupo de los mismos (p. ej., suministro localizado o específico).

La cantidad de ácidos nucleicos (p. ej., un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante) en una composición de NPL puede depender del tamaño, la secuencia y otras características de los ácidos nucleicos. La cantidad de ácidos nucleicos en un NPL también puede depender del tamaño, la composición, la diana deseada y otras características de la composición de NPL. Las cantidades relativas de ácidos nucleicos y otros elementos (p. ej., lípidos) también pueden variar. La cantidad de ácidos nucleicos en una

composición de NPL puede, por ejemplo, medirse mediante espectroscopia de absorción (p. ej., espectroscopia ultravioleta-visible).

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos (p. ej., un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante), lípidos y polímeros y cantidades de los mismos se pueden seleccionar para proporcionar una relación N:P específica (la relación de grupos de lípidos o aminos poliméricas (N = nitrógeno) con carga positiva con respecto a grupos fosfato (P) de ácido nucleico con carga negativa). La relación N:P de la composición se refiere a la relación molar de átomos de nitrógeno en uno o más lípidos con respecto al número de grupos fosfato en el ácido nucleico. En general, se prefiere una relación N:P más baja. Una relación N:P puede depender de un lípido específico y su pKa. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos (p. ej., un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante) y la composición de NPL, 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 determinadas 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 determinadas realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1. En determinadas realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 4:1. En otras realizaciones, la relación N:P es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 8:1. Por ejemplo, la relación N:P puede ser de 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 ácidos nucleicos (p. ej., un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante) en una composición de nanopartículas lipídicas puede depender del tamaño, la secuencia y otras características de los ácidos nucleicos. La cantidad de ácidos nucleicos en una composición de nanopartículas lipídicas también puede depender del tamaño, la composición, la diana deseada y otras características de la composición de nanopartículas. Las cantidades relativas de ácidos nucleicos y otros elementos (p. ej., lípidos) también pueden variar. En algunas realizaciones, la relación p/p del componente lipídico con respecto a un ácido nucleico (p. ej., un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante) en una composición de nanopartículas lipídicas 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 p/p del componente lipídico con respecto a un ARNm puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 40:1. La cantidad de ácido nucleico en una composición de nanopartículas puede, por ejemplo, medirse mediante espectroscopia de absorción (p. ej., espectroscopia ultravioleta-visible).

La eficacia de la encapsulación de un ácido nucleico (p. ej., un ARNm, un ARNg y/o un ácido nucleico molde donante) describe la cantidad de ácido nucleico que se encapsula o se asocia de otro modo con una composición lipídica después de la preparación, en relación con la cantidad inicial proporcionada. La eficiencia de encapsulación es convenientemente alta (p. ej., cercana al 100 %). La eficiencia de

encapsulación se puede medir, por ejemplo, comparando la cantidad de ácido nucleico en una solución que contiene la composición de NPL antes y después de descomponer la composición de NPL con uno o más disolventes o detergentes orgánicos. Se puede utilizar fluorescencia para medir la cantidad de ácidos nucleicos libres en una solución. Para las composiciones de NPL de la invención, la eficiencia de encapsulación de un ácido nucleico 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 determinadas realizaciones, la eficiencia de encapsulación puede ser de al menos el 80 %.

i. Carga útil de ARN

En determinadas realizaciones, la carga útil de ARN comprende un ARNm, un ARN guía (ARNg), un ARN guía de edición de calidad (ARNgec), un ARN de CRISPR (ARNcr), un ARN de CRISPR transactivador (ARNcrtra), a ARNt, un microARN y/o un ARNip.

En determinadas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas están optimizadas para el suministro de ARN, p. ej., un ARNm para la traducción dentro de la célula diana (p. ej., CMH) y/o un ARNg o ARNgec para formar complejos con una nucleasa dirigida (p. ej., nucleasa asociada a CRISPR (Cas) dentro de la célula diana (p. ej., CMH). Un ARNm puede ser un ARNm de origen natural o no natural. Un ARNm, ARNg o ARNgec puede incluir una o más nucleobases, nucleósidos o nucleótidos modificados.

Las nucleobases pueden seleccionarse del grupo no limitante 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 ARN (p. ej., un ARNm o ARNg) es un compuesto que incluye una molécula de azúcar (p. ej., un azúcar de 5 o 6 carbonos, tal como pentosa, ribosa, arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa o un derivado desoxi de las mismas) 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 de los mismos y puede incluir una o más sustituciones o modificaciones.

Un nucleótido de un ARN (p. ej., un ARNm o ARNg) 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., adenosina, guanosina, citidina, uridina, 5-metiluridina, desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina, desoxiuridina y monofosfatos de timidina) o un análogo de los mismos y puede incluir una o más sustituciones o modificaciones que incluyen, pero sin limitación, sustituciones de 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., trifosfato de guanosina, trifosfato de adenosina, trifosfato de citidina y trifosfato de uridina) puede referirse al nucleósido trifosfato canónico o un análogo o derivado del mismo y puede incluir una o más sustituciones o modificaciones como se describe en la presente memoria.

Un ARN (p. ej., un ARNm o ARNg) puede incluir cualquier número de pares de bases, incluyendo decenas, cientos o miles de pares de bases. Cualquier número (p. ej., todas, algunas o ninguna) de nucleobases, nucleósidos o nucleótidos pueden ser un análogo de una especie canónica, sustituida, modificad, o de otro modo no natural. En determinadas realizaciones, se pueden modificar todas las de un tipo particular de nucleobase. Por ejemplo, toda la citosina en un ARN (p. ej., un ARNm o ARNg) puede ser 5-metilcitosina. En determinadas realizaciones, una o más o todas las bases de uridina pueden ser N1-metilpseudouridinas. Un ARNm puede incluir una región 5' no traducible, una región 3' no traducible y/o una secuencia codificante o de traducción.

En determinadas realizaciones, un ARNm puede incluir una estructura de caperuza 5', un nucleótido terminador de cadena, un tallo-bucle, una secuencia poliA y/o una señal de poliadenilación.

Una estructura de caperuza o especie de caperuza es un compuesto que incluye dos restos nucleosídicos unidos por un conector y puede seleccionarse de una caperuza de origen natural, una caperuza de origen no natural o un análogo de caperuza. Una especie de caperuza puede incluir uno o más nucleósidos modificados y/o restos conectores. Por ejemplo, una caperuza de ARNm natural puede incluir un nucleótido de guanina y un nucleótido de guanina (G) metilado en la posición 7 unidos por un enlace trifosfato en sus posiciones 5', p. ej., m7G(5')ppp(5')G, habitualmente escrito como m7GpppG. Una especie de caperuza también puede ser un análogo de caperuza anti-inversa. Una lista no limitante de posibles especies de caperuzas incluye m7GpppG, m7Gpppm7G, m73'dGpppG, m7Gpppm7G, m73'dGpppG y m27 02'GppppG.

Como alternativa o además, un ARNm puede incluir un nucleósido terminador de cadena. Por ejemplo, un nucleósido terminador de cadena puede incluir los 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'-didesoxinucleósidos, tales como 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxiuridina, 2',3'-didesoxicitosina, 2',3'-didesoxiguanosina y 2',3'-didesoxitimina.

Como alternativa o además, 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 nucleotídicos. Por ejemplo, un tallo-bucle puede incluir 4, 5, 6, 7 u 8 pares de bases nucleotídicos. Un tallo-bucle puede estar ubicado en cualquier región de un ARNm. Por ejemplo, un tallo-bucle puede estar ubicado en, antes o después de una región no traducible (una región 5' no traducible o una región 3' no traducible), una región codificante o una secuencia o cola poliA.

Como alternativa o además, un ARNm puede incluir una secuencia poliA y/o una señal de poliadenilación. Una secuencia poliA puede estar compuesta total o principalmente por nucleótidos de adenina o análogos o derivados de los mismos. Una secuencia poliA puede ser una cola ubicada adyacente a una región 3' no traducible de un ARNm.

Un ARNm puede codificar cualquier polipéptido de interés, incluido cualquier polipéptido de origen natural o no natural o modificado de otro modo. Un polipéptido codificado por un ARNm puede ser de cualquier tamaño y puede tener cualquier estructura o actividad secundaria. 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, citocina, proteína vírica (p. ej., una proteína de la cápside vírica), antígeno, vacuna o receptor. En algunas realizaciones, el ARNm puede codificar uno o más polipéptidos capaces de editar una secuencia genómica dentro de las células diana (p. ej., dentro de las CMH). Por consiguiente, en algunas realizaciones, el ARNm codifica uno o más polipéptidos que actúan como parte de un sistema de edición génica. En determinadas realizaciones, el ARNm codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico. En determinadas realizaciones, la NPL comprende un ARNm que codifica una nucleasa asociada a CRISPR (Cas) o un editor de bases y comprende además un ARNg. En otras realizaciones, la NPL comprende un ARNm que codifica un editor de calidad y comprende además un editor de calidad y comprende además ARNgec.

En determinadas realizaciones, un ARNg o ARNgec puede comprender uno o más nucleótidos o nucleósidos modificados químicamente, lo que da lugar a una mayor estabilidad del ARNg, y una mayor eficiencia y menor edición inespecífica de un sistema de edición génica guiado por ARN (p. ej., un sistema de nucleasa Cas/ARNg, un sistema de editor de bases/ARNg o un sistema de editor de calidad/ARNgec). Por ejemplo, un ARNg puede incluir uno o más nucleótidos con una sustitución de 2'-ribosa, por ejemplo, una sustitución de 2'-O-metilo o una sustitución de 2'-fluoro. Adicionalmente, un ARNg puede incluir una o más modificaciones de enlace, tales como una modificación de fosforotioato, una modificación de fosfonoacetato o una modificación de tiofosfonoacetato. Normalmente, se combinan modificaciones de enlace y sustituciones de 2'-ribosa, por ejemplo, sustituciones de 2'-O-metilo y enlaces de fosforotioato, o sustituciones de 2'-O-metilo y enlaces de tiofosfonoacetato. En determinadas realizaciones, el ARNg comprende tanto sustituciones de 2'-O-metilo como enlaces de fosforotioato. En algunos casos, un ARNg puede incluir adicionalmente o como alternativa modificaciones que crean enlaces intramoleculares dentro del resto de azúcar del nucleótido, por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos nucleicos con puentes (BNA) con enlaces entre el oxígeno 2' y el carbono 4' de la ribosa. Se pueden incorporar LNA y BNA, por ejemplo, en la secuencia guía de 20 nucleótidos de un ARNg. Un ARNg también puede incluir uno o más nucleótidos de ADN. Dichas modificaciones pueden incorporarse en cualquier nucleótido o enlace dentro del ARNg, por ejemplo, en el resto o los restos 5' terminales o el resto o los restos 3' terminales del ARNg. Un ARNg puede comprender una modificación descrita en la presente memoria en uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez o más nucleótidos 5' terminales y/o nucleótidos 3' terminales de un ARNg.

Las modificaciones adicionales de ARN, incluidos ARNm y ARNg, son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Chen *et al.* ("Recent advances in chemical modifications of guide RNA, mRNA and donor template for CRISPR-mediated genome editing". *Advanced Drug Delivery Reviews* 168 (2021): 246-258) y en Qui *et al.* ("Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angptl3" *Proc Natl Acad Sci*, 2021; 118(10):e2020401118).

Además de los lípidos presentes en la NPL o en la mezcla de lípidos, las composiciones de NPL pueden comprender también una carga útil, por ejemplo, una carga útil descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la carga útil es un ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, por ejemplo, un

ARNm, ARN de transferencia (ARNt), un microARN o ARN de interferencia pequeño (ARNip). En determinadas realizaciones, la carga útil es un ARNm, por ejemplo, un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico como se describe en la presente memoria.

- 5 En determinadas realizaciones, el número de nucleótidos en el ácido nucleico es de aproximadamente 400 a aproximadamente 6000.

(g) Propiedades físicas de las nanopartículas lipídicas

- 10 Las características de una composición de NPL pueden depender de los componentes, sus cantidades absolutas o relativas, contenidos en una composición de nanopartículas lipídicas (NPL). Las características también pueden variar dependiendo del método y las condiciones de preparación de la composición de NPL.

- 15 Las propiedades fisicoquímicas de las composiciones de NPL pueden alterarse para aumentar la selectividad para un sitio diana particular en un sujeto. Por ejemplo, los tamaños de partículas se pueden ajustar en función de los tamaños de las comunicaciones de diferentes órganos. El ARN de ARNm (p. ej., ARNm y/o ARNg) incluidos en una composición de NPL también pueden depender de la diana o dianas de administración deseadas. Por ejemplo, un ARNm y/o ARNg pueden seleccionarse para una enfermedad particular y/o para el suministro a una célula, tejido, órgano o sistema particular o grupo de los mismos (p. ej., suministro localizado o específico).

- 20 La cantidad de ARN (p. ej., ARNm y/o ARNg) ARNm en una composición de NPL puede depender del tamaño, la secuencia y otras características del ARNm. La cantidad de ARN (p. ej., ARNm y/o ARNg) ARNm en una NPL también puede depender del tamaño, la composición, la diana deseada y otras características de la composición de NPL. Las cantidades relativas de ARN (p. ej., ARNm y/o ARNg) ARNm y otros elementos (p. ej., lípidos) también pueden variar. La cantidad de ARN (p. ej., ARNm y/o ARNg) ARNm en una composición de NPL puede, por ejemplo, medirse mediante espectroscopia de absorción (p. ej., espectroscopia ultravioleta-visible).

- 25 En algunas realizaciones, el o los ARNm, lípidos y polímeros y cantidades de los mismos se pueden seleccionar para proporcionar una relación N:P específica (la relación de grupos de lípidos o aminos poliméricos (N = nitrógeno) con carga positiva con respecto a grupos fosfato (P) de ácido nucleico con carga negativa). La relación N:P de la composición se refiere a la relación molar de átomos de nitrógeno en uno o más lípidos con respecto al número de grupos fosfato en un ARNm. En general, se prefiere una relación N:P más baja. Una relación N:P puede depender de un lípido específico y su pKa. En determinadas realizaciones, la composición de ARNm y NPL 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 determinadas 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 determinadas realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1. En determinadas realizaciones, la relación N:P puede ser de aproximadamente 4:1. En otras realizaciones, la relación N:P es de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 8:1. Por ejemplo, la relación N:P puede ser de 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.

5 Las composiciones de NPL pueden caracterizarse mediante diversos métodos. Por ejemplo, se puede utilizar microscopia (p. ej., microscopia electrónica de transmisión o microscopia electrónica de barrido) para examinar la morfología y la distribución de tamaños de una composición de NPL. Para medir los potenciales zeta se puede utilizar la dispersión dinámica de la luz o la potenciometría (p. ej., valoraciones potenciométricas). También se puede utilizar la dispersión dinámica de la luz para determinar
10 el tamaño de las partículas. Instrumentos tales como el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) también se pueden utilizar para medir múltiples características de una composición de NPL, tales como el tamaño de las partículas, índice de polidispersión y potencial zeta. La eficiencia del ARN encapsulado se determina mediante una combinación de métodos que se basan en colorantes de unión al ARN (ribogreen, cybergreen para determinar la fracción de ARN accesible al
15 colorante) y la deformulación de NPL seguida de un análisis por HPLC para determinar el contenido total de ARN.

En algunas realizaciones, la NPL puede tener un diámetro medio en el intervalo 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 determinadas realizaciones, las
20 composiciones de NPL 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
25 160 nm, aproximadamente 170 nm, aproximadamente 180 nm, aproximadamente 190 nm o aproximadamente 200 nm. En algunas realizaciones, la NPL tiene un diámetro medio de aproximadamente 100 nm.

Como alternativa o además, las composiciones de NPL pueden tener un índice de polidispersión en un intervalo 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,
30 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 determinadas realizaciones, el índice de polidispersión está en el intervalo 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.

Como alternativa o además, las composiciones de NPL pueden tener un potencial zeta de aproximadamente -30 mV a aproximadamente +30 mV. En determinadas realizaciones, la composición de
35 NPL tiene un potencial zeta de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +20 mV. El potencial zeta puede variar en función del pH. Como resultado, en determinadas realizaciones, las composiciones de NPL pueden tener un potencial zeta de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +30 mV o aproximadamente +10 mV a +30 mV o 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 aproximadamente -20 mV a aproximadamente +15 mV a pH 7.4.

En algunas realizaciones, la NPL proporcionada en la presente memoria comprende un lípido catiónico ionizable y uno o más de un estero, un fosfolípido neutro, un PEG-lípido y un conjugado de lípido-grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., conjugado de lípido-anticuerpo). En algunas realizaciones, la NPL comprende lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, la NPL comprende lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7 y un dominio VL que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la

secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se suministra a un sujeto con enfermedad para edición génica *in vivo* y tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se administra a un sujeto con enfermedad de células falciformes o beta-talasemia para edición génica *in vivo* y tratamiento del sujeto. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes en un sujeto es seguro y eficaz. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la beta-talasemia en un sujeto es seguro y eficaz.

III. MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

En algunas realizaciones, las NPL se producen mediante el uso de una mezcla rápida mediante un vórtex orbital o mediante una mezcla de microfluidos. La mezcla en vórtex orbital se logra mediante la adición rápida de una solución de lípidos en etanol a la solución acuosa de un ácido nucleico de interés, seguida inmediatamente por agitación en vórtex a 2500 rpm. En algunas realizaciones, las NPL se producen mediante una etapa de mezcla de microfluidos. En algunas realizaciones, la mezcla de microfluidos se logra mezclando las corrientes acuosas y orgánicas a caudales controlados en un canal de microfluidos usando, p. ej., un dispositivo NanoAssemblr y chips de microfluidos con una geometría de cámara de mezcla optimizada (Precision Nanosystems, Vancouver, BC). En algunas realizaciones, las NPL se producen utilizando una etapa de mezcla de microfluidos para mezclar rápidamente la solución lipídica etanólica y la solución acuosa de ácido nucleico, lo que da lugar a la encapsulación del ácido nucleico en las nanopartículas lipídicas sólidas. A continuación, la suspensión de nanopartículas se intercambia en un tampón totalmente acuoso utilizando el dispositivo de filtración de membrana elegido para la eliminación de etanol y la maduración de nanopartículas.

En determinadas realizaciones, las composiciones de NPL resultantes comprenden una mezcla de lípidos que contiene, por ejemplo, de aproximadamente 40 por ciento molar a aproximadamente 60 por

ciento molar de uno o más lípidos catiónicos ionizables descritos en la presente memoria, de aproximadamente 35 por ciento molar a aproximadamente 50 por ciento molar de uno o más esteroides, de aproximadamente 5 por ciento molar a aproximadamente 15 por ciento molar de uno o más lípidos neutros y de aproximadamente 0.5 por ciento molar a aproximadamente 5 por ciento molar de uno o más PEG-lípidos.

V. FORMULACIÓN Y MODO DE SUMINISTRO

Las composiciones de NPL de la invención pueden formularse total o parcialmente como una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además uno o más excipientes o ingredientes accesorios farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en la presente memoria.

Se encuentran disponibles directrices generales para la formulación y fabricación de composiciones y agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington's (2006) citado anteriormente. Se pueden usar excipientes e ingredientes accesorios convencionales en cualquier composición farmacéutica de la invención, excepto en la medida en que cualquier excipiente o ingrediente accesorio convencional pueda ser incompatible con uno o más componentes de una composición de NPL de la invención. Un excipiente o ingrediente accesorio puede ser incompatible con un componente de una composición de NPL si su combinación con el componente puede dar lugar a cualquier efecto biológico indeseable o efecto de otro modo nocivo.

En algunas realizaciones, uno o más excipientes o ingredientes accesorios pueden constituir más del 50 % de la masa o el volumen total de una composición farmacéutica que incluye una composición de NPL de la invención. Por ejemplo, uno o más excipientes o ingredientes accesorios pueden componer el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de una composición farmacéutica. En determinadas realizaciones, el excipiente está aprobado para usar en seres humanos y para uso veterinario, por ejemplo, por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos. En determinadas realizaciones, el excipiente es de uso farmacéutico. En determinadas 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 NPL, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño y/o la afección del sujeto tratado y dependiendo además de la vía por la que se administre la composición.

Las composiciones lipídicas y/o composiciones farmacéuticas que incluyen una o más composiciones de NPL se pueden administrar a cualquier sujeto, incluido un paciente humano que puede beneficiarse de un efecto terapéutico proporcionado por la administración de un ácido nucleico, p. ej., un ARN (p. ej., ARNm, ARNg, ARNt o ARNip) a una o más células, tejidos, órganos o sistemas particulares o grupos de los mismos, tales como el sistema renal. Aunque las descripciones proporcionadas en la presente memoria de composiciones de NPL y composiciones farmacéuticas que incluyen composiciones de NPL se dirigen principalmente a composiciones que son adecuadas para la administración a seres humanos, el experto entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para su

administración a cualquier otro mamífero. Se entiende la modificación de composiciones adecuadas para su administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para su administración a diversos animales.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción se puede preparar, envasar y/o vender a granel, como una dosis unitaria única y/o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Como se emplea en esta memoria, una "dosis unitaria" es una cantidad específica de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo (p. ej., la carga útil).

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar en diversas formas adecuadas para diversas vías y métodos de administración. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar en formas farmacéuticas líquidas (p. ej., emulsiones, microemulsiones, nanoemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires), formas inyectables, formas farmacéuticas sólidas (p. ej., cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos), formas farmacéuticas para administración tópica y/o transdérmica (p. ej., pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes y parches), suspensiones, polvos y otras formas.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral y parenteral incluyen, pero sin limitación, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, nanoemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires. Además de los principios activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden comprender diluyentes inertes utilizados habitualmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilen glicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites 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, aromatizantes y/o perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular 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 no tóxicos parenteralmente aceptables, por ejemplo, como 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 de sodio. Normalmente se emplean como disolvente o medio de suspensión aceites no volátiles estériles. A tal efecto, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluidos mono o diglicéridos estériles. Pueden usarse ácidos grasos, tales como el ácido oleico, en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias y/o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones

sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

(a) Otros componentes

Además, se contempla que las composiciones farmacéuticas puedan incluir uno o más componentes además de los descritos en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir una o más moléculas potenciadoras de la permeabilidad, carbohidratos, polímeros, agentes terapéuticos, agentes modificadores 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 los Estados Unidos n.º 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 modificador de la superficie, incluidos, por ejemplo, proteínas aniónicas (p. ej., seroalbúmina bovina), tensioactivos (p. ej., tensioactivos catiónicos tales como bromuro de dimetildiocetadecilamonio), azúcares o derivados de azúcares (p. ej., ciclodextrina), polímeros (p. ej., heparina, polietilenglicol y poloxámero), agentes mucolíticos (p. ej., acetilcisteína, artemisa, bromelaína, papaína, *Clerodendrum*, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, estepronina, tiopronina, gelsolina, timosina β 4, dornasa alfa, neltenexina y erdosteína) y DNasas (p. ej., rhDNasa). Se puede disponer un agente modificador 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 contiene una composición de NPL de la invención puede incluir cualquier sustancia útil en composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir uno o más excipientes o ingredientes accesorios farmacéuticamente aceptables tales como, pero sin limitación, uno o más disolventes, medios de dispersión, diluyentes, adyuvantes de dispersión, adyuvantes de suspensión, adyuvantes de granulación, disgregantes, cargas, emolientes, vehículos líquidos, aglutinantes, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, agentes tamponantes, agentes lubricantes, aceites, conservantes y otras especies. También se pueden incluir excipientes, tales como ceras, mantequillas, agentes colorantes, agentes de revestimiento, aromatizantes y agentes perfumantes. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Remington's (2006) citado anteriormente).

Los agentes dispersantes pueden seleccionarse de la lista no limitante que consiste en almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato sódico de almidón, arcillas, ácido algínico, 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 de calcio, 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 sin limitación, emulsionantes naturales (p. ej., goma arábica, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, *Chondrus*, colesterol, xantano, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, lanolina, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (p. ej., bentonita [silicato de aluminio] y VEEGUM® [silicato de magnesio y aluminio]), 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., carboxi polimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenina, derivados celulósicos (p. ej., carboximetilcelulosa sódica, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (p. ej., monolaurato de polioxietilensorbitán [TWEEN®20], polioxietilensorbitán [TWEEN® 60], monooleato de polioxietilensorbitán [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 de polioxietileno, 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., lauril éter de polioxietileno [BRIJ® 30]), poli(vinilpirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, laurilsulfato sódico, PLURONIC®F 68, POLOXAMER® 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de conservantes pueden incluir, pero sin limitación, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes alcohólicos, conservantes ácidos y/u otros conservantes. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero sin limitación, 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 monohidrato, 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 sin limitación, cloruro de benzalconio, 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 antimicóticos incluyen, pero sin limitación, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sórbico. Los ejemplos de conservantes alcohólicos incluyen, pero sin limitación, etanol, polietilenglicol, alcohol bencílico, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o

alcohol feniletílico. Los ejemplos de conservantes ácidos incluyen, pero sin limitación, vitamina A, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroascórbico, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero sin limitación, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT),
 5 etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLES), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio.

Los ejemplos de agentes tamponantes incluyen, pero sin limitación, soluciones de tampón de citrato, soluciones de tampón de acetato, soluciones de tampón de fosfato, cloruro amónico, carbonato cálcico, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio,
 10 ácido d-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, lactobionato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, fosfato de hidróxido de calcio, acetato potásico, cloruro de potasio, gluconato potásico, mezclas de potasio, fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio, mezclas de fosfato de potasio, acetato sódico, bicarbonato sódico, cloruro sódico, citrato sódico, lactato sódico, fosfato sódico dibásico, fosfato sódico
 15 monobásico, mezclas de fosfato sódico, trometamina, tampones de aminosulfonato (p. ej., HEPES), hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua apirógena, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico y/o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, las composiciones de nanopartículas lipídicas y sus formulaciones están adaptadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea,
 20 infusión intraósea, intraarterial, intratumoral o por inhalación. En determinadas realizaciones, a un sujeto se le administra una dosis de aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Las composiciones de acuerdo con la presente descripción se pueden formular en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de una composición de la presente descripción será decidido por un médico tratante dentro del alcance
 25 del buen criterio médico.

El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz, profilácticamente eficaz o de otro modo adecuado (p. ej., para captura de imágenes) para cualquier paciente en particular dependerá de diversos factores que incluyen la gravedad y la identificación de la enfermedad que se trata, si la hubiera; el o los ácidos nucleicos (p. ej., ARNm, ARNg y/o ácidos nucleicos molde donantes) empleados; la composición
 30 específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración y 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 la técnica médica.

VI. MÉTODOS PARA SUMINISTRAR ÁCIDOS NUCLEICOS A CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

La presente descripción proporciona métodos para administrar una carga útil a una célula o tejido
 35 diana, por ejemplo, una célula o tejido diana en un sujeto, y NPL o composiciones farmacéuticas que contienen las NPL para su uso en dichos métodos. Cualquier descripción en la presente memoria de un método para, p. ej., suministrar un ácido nucleico a una célula o, p. ej., expresar un polipéptido de interés

en una célula debe interpretarse también como una descripción de una NPL o una composición farmacéutica que comprende dicha NPL para su uso en tales métodos.

En algunos aspectos, se proporciona en la presente memoria un método para suministrar ácidos nucleicos a células madre hematopoyéticas (CMH). En determinadas realizaciones, el método comprende producir un polipéptido de interés (p. ej., una proteína de interés, p. ej., una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico) en una CMH de mamífero y NPL o composiciones farmacéuticas que contienen las NPL para su uso en tales métodos. Los métodos para producir polipéptidos en CMH implican poner en contacto una o más CMH con una composición de NPL que comprende un ARNm de interés (p. ej., un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico y, opcionalmente, un ARNg o un ARNgec). Al poner en contacto la CMH con la composición de NPL, el ARNm puede captarse y traducirse en la célula para producir el polipéptido de interés.

En general, se puede realizar la etapa de poner en contacto una CMH de mamífero con una composición de NPL que incluye un ARNm que codifica un polipéptido de interés *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La cantidad de una composición de NPL en contacto con una célula y/o la cantidad de ácido nucleico (p. ej., ARNm) en la misma, puede depender del tipo de CMH o tejido que se pone en contacto, los medios de administración, las características fisicoquímicas de la composición de NPL y el ARNm (p. ej., el tamaño, la carga y la composición química) en la misma, y otros factores. En general, una cantidad eficaz de la composición de NPL permitirá una producción eficiente de polipéptidos en las CMH. Los parámetros de eficiencia pueden incluir la traducción de polipéptidos (indicada por la expresión de polipéptidos), el nivel de degradación del ARNm e indicadores de la respuesta inmunitaria.

La etapa de poner en contacto una composición de NPL que incluye un ARNm con una célula puede implicar o provocar una transfección donde la composición de NPL puede fusionarse con la membrana de la célula para permitir el suministro del ARNm al interior de la célula. Tras su introducción en el citoplasma de la célula, el ARNm se traduce, a continuación, en una proteína o péptido mediante la maquinaria de síntesis de proteínas dentro del citoplasma de la célula.

La presente descripción proporciona métodos para suministrar un ácido nucleico (p. ej., un ARNm) a una CMH o tejido de mamífero, por ejemplo, una CMH o tejido de mamífero en un sujeto. El suministro de un ácido nucleico (p. ej., un ARNm) a dicha célula o tejido implica administrar una composición de NPL que incluye el ácido nucleico (p. ej., un ARNm) a un sujeto, por ejemplo, por inyección, p. ej., mediante inyección intramuscular o suministro intravascular en el sujeto. Después de la administración, la NPL puede dirigirse a una CMH y/o entrar en contacto con ella. Al poner en contacto la CMH con la composición de NPL, un ARNm traducible puede traducirse en la célula para producir un polipéptido de interés (p. ej., un polipéptido de un sistema de edición génica).

En determinadas realizaciones, una composición de NPL de la invención puede dirigirse a un tipo o clase particular de células, p. ej., CMH. Este direccionamiento puede facilitarse utilizando los lípidos descritos en la presente memoria para formar NPL, lo que también puede incluir un grupo de direccionamiento para dirigirse a células de interés. En determinadas realizaciones, el suministro específico

puede dar lugar a un aumento mayor de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces o 20 veces de la cantidad de ácido nucleico (p. ej., ARNm) al destino diana (p. ej., CMH que expresan niveles altos de determinados antígenos de superficie (p. ej., CD105 y/o CD117) que se unen al conjugado de anticuerpo-lípido de las NPL) en comparación con otros destinos (p. ej., células que no expresan o solo expresan niveles bajos de dichos antígenos de superficie).

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 objetivo del suministro son transfectadas por la NPL. En algunas realizaciones, las células que no están destinadas a ser el objetivo del suministro son cualquier célula excepto las células madre hematopoyéticas. 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 distintas de CMH que no están destinadas a ser el objetivo del suministro son transfectadas por la NPL. En algunas realizaciones, las células que no están destinadas a ser el objetivo del suministro son células a las que no se dirige el método. En algunas realizaciones, las células que no están destinadas a ser el objetivo del suministro son células del sujeto a las que no se dirige el método.

En algunas realizaciones, la semivida del ácido nucleico suministrado por la NPL descrita en la presente memoria a las CMH o un polipéptido codificado por el ácido nucleico suministrado por la NPL y expresado en las CMH 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 un 100 %, al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces más larga que la semivida del ácido nucleico suministrado por una NPL de referencia a las CMH o un polipéptido codificado por el ácido nucleico administrado por la NPL de referencia y expresado en las CMH.

En algunas realizaciones, la composición de la NPL difiere de la composición de la NPL de referencia en el tipo de lípido catiónico ionizable, la cantidad relativa de lípido catiónico ionizable, la longitud del anclaje lipídico en PEG-lípido, la cadena principal o el grupo de cabeza del PEG-lípido, la cantidad relativa de PEG-lípido o el tipo de grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., tipo de anticuerpo que se une a CD105 y/o CD117), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición de la NPL difiere de la composición de la NPL de referencia solo en el tipo de lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la composición de la NPL difiere de la composición de la NPL de referencia solo en la cantidad de PEG-lípido. En algunas realizaciones, la NPL de referencia comprende el lípido catiónico Dlin-KC3-DMA, pero por lo demás es igual que una NPL probada. En algunas realizaciones, la NPL de referencia comprende el lípido catiónico Dlin-KC2-DMA, pero por lo demás es igual que una NPL probada. En algunas realizaciones, la NPL de referencia comprende el lípido catiónico ALC-0315, pero por lo demás

es igual que una NPL probada. En algunas realizaciones, la NPL de referencia comprende el lípido catiónico SM-102, pero por lo demás es igual que una NPL probada. En algunas realizaciones, el PEG-lípido es un PEG-lípido libre.

En algunas realizaciones, 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 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % o más de las CMH son transfectadas por la NPL. En realizaciones, 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 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % o más de las CMH que están destinadas a ser el objetivo del suministro son transfectadas por la NPL. En algunas realizaciones, las CMH son las CMH de un sujeto. En algunas realizaciones, las CMH son CMH a las que se dirige el método (p. ej., una subpoblación de CMH a las que se dirige el método). En algunas realizaciones, las CMH son CMH de un sujeto a las que se dirige el método (p. ej., una subpoblación de las CMH del sujeto a las que se dirige el método).

En algunas realizaciones, el nivel de expresión del ácido nucleico suministrado por la NPL 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 1.5 veces, 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, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces mayor que el nivel de expresión del ácido nucleico en las mismas CMH suministradas por una NPL de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide y se compara con un método descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide por la proporción de CMH (p. ej., CMH transfectadas) 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 CMH. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide como intensidad de fluorescencia media. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide por la cantidad del polipéptido codificado u otros materiales secretados por las CMH.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporcionan métodos para dirigir el suministro de un ácido nucleico a una célula madre hematopoyética (CMH) de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la CMH con una nanopartícula lipídica (NPL). En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la NPL comprende un conjugado que comprende el compuesto de la siguiente fórmula: [Lípido] – [conector opcional] – [grupo de direccionamiento a CMH]. En determinadas realizaciones, la NPL comprende un conjugado de lípido-anticuerpo que comprende el compuesto de la siguiente fórmula: [Lípido] – [conector opcional] – [anticuerpo] en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117. En algunas realizaciones, el anticuerpo

que se une a CD117 comprende las secuencias de aminoácidos de Ab1 como se describen en la tabla B. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 comprende las secuencias de aminoácidos de Ab2 como se describen en la tabla B. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD105 comprende las secuencias de aminoácidos de Ab3 como se describen en la tabla B. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 es Ab1. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 es Ab2. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD105 es Ab3. En algunas realizaciones, la NPL comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la NPL comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido con polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la NPL comprende uno o más ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la NPL comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de una enfermedad (p. ej., enfermedad de células falciformes y beta-talasemia).

En algunas realizaciones, un aspecto de la descripción se refiere a una NPL o una composición farmacéutica que la contiene, como se describe en la presente memoria, para su uso en un método para dirigir el suministro de un ácido nucleico a una célula madre hematopoyética (CMH) de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad como se describe más adelante. En algunas realizaciones, un método como se describe en la presente memoria puede comprender poner en contacto *in vitro* o *ex vivo* la CMH de un sujeto con una nanopartícula lipídica (NPL). En una realización preferida, un método como se describe en la presente memoria puede comprender poner en contacto *in vivo* la CMH de un sujeto con una nanopartícula lipídica (NPL). En algunas realizaciones, la NPL es una NPL como se describe en la presente memoria en la presente descripción.

En algunas realizaciones, la NPL proporciona al menos uno de los siguientes beneficios:

(i) mayor especificidad del suministro dirigido a CMH en comparación con una NPL de referencia;
 (ii) mayor semivida del ácido nucleico o un polipéptido codificado por el ácido nucleico en las CMH en comparación con una NPL de referencia;

(iii) mayor tasa de transfección en comparación con una NPL de referencia; y

(iv) un nivel bajo de ácido nucleico accesible al colorante (p. ej., ARNm y/o ARNg; <15 %) y alta eficiencia de encapsulación de ácido nucleico (p. ej., ARNm y/o ARNg), en donde al menos el 80 % de ácido nucleico (p. ej., ARNm y/o ARNg) se recuperó en la formulación final con respecto al ácido nucleico total (p. ej., ARNm y/o ARNg) utilizado en la preparación del lote de NPL.

En algún aspecto, se proporcionan métodos para expresar un polipéptido de interés en una CMH diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la CMH con una nanopartícula lipídica (NPL). En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la NPL comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] – [conector opcional] – [grupo de direccionamiento a CMH]. En determinadas realizaciones, la NPL comprende un conjugado de lípido-anticuerpo que comprende el compuesto de la siguiente fórmula: [Lípido] – [conector opcional] – [anticuerpo], en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 comprende las secuencias de aminoácidos de Ab1 como

se describen en la tabla B. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 comprende las secuencias de aminoácidos de Ab2 como se describen en la tabla B. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD105 comprende las secuencias de aminoácidos de Ab3 como se describen en la tabla B. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 es Ab1. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 es Ab2. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD105 es Ab3. En algunas realizaciones, la NPL comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la NPL comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido con polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la NPL comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido. En algunas realizaciones, un aspecto de la descripción se refiere a una NPL o una composición farmacéutica que la contiene, como se describe en la presente memoria, para usar en un método de expresión de un polipéptido de interés en una CMH diana de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad como se describe más adelante. En algunas realizaciones, un método como se describe en la presente memoria puede comprender poner en contacto *in vitro* o *ex vivo* la CMH de un sujeto con una nanopartícula lipídica (NPL). En una realización preferida, un método como se describe en la presente memoria puede comprender poner en contacto *in vivo* la CMH de un sujeto con una nanopartícula lipídica (NPL).

En algunas realizaciones, la NPL proporciona al menos uno de los siguientes beneficios:

- (i) mayor nivel de expresión en la CMH en comparación con una NPL de referencia;
- (ii) mayor especificidad de expresión en la CMH en comparación con una NPL de referencia;
- (iii) mayor semivida del ácido nucleico o un polipéptido codificado por el ácido nucleico en las CMH en comparación con una NPL de referencia;
- (iv) mayor tasa de transfección en comparación con una NPL de referencia; y
- (v) un nivel bajo de ácido nucleico accesible al colorante (p. ej., ARNm y/o ARNg; <15 %) y alta eficiencia de encapsulación de ácido nucleico (p. ej., ARNm y/o ARNg), en donde al menos el 80 % de ácido nucleico (p. ej., ARNm y/o ARNg) se recuperó en la formulación final con respecto al ácido nucleico total (p. ej., ARNm y/o ARNg) utilizado en la preparación del lote de NPL. Las NPL descritas en la presente descripción y según se reivindican son adecuadas para los métodos descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, la NPL suministrada en los métodos proporcionados en la presente memoria comprende lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la

secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana

5 está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente

10 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En

15 algunas realizaciones, la NPL suministrada en los métodos proporcionados en la presente memoria comprende lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7 y un dominio VL que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL comprende la secuencia

20 de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una

25 secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia

30 polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de

35 la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas

realizaciones, el suministro de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se utiliza para editar células CMH *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se utiliza para editar células CMH *in vivo*. . En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se suministra a un sujeto con enfermedad para edición génica *in vivo* y tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se administra a un sujeto con enfermedad de células falciformes o beta-talasemia para edición génica *in vivo* y tratamiento del sujeto. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes en un sujeto es seguro y eficaz. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la beta-talasemia en un sujeto es seguro y eficaz.

VII. MÉTODOS DE EDICIÓN GÉNICA EN CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

La presente descripción proporciona métodos para suministrar una carga útil que codifica un sistema de edición génica (p. ej., una nucleasa dirigida y, opcionalmente, un ARN guía) a una célula o tejido diana, por ejemplo, una célula o tejido diana en un sujeto, y NPL o composiciones farmacéuticas que contienen las NPL para su uso en dichos métodos. La presente descripción proporciona además métodos para modificar genéticamente células madre hematopoyéticas (CMH), tanto *in vitro* como *in vivo* en un sujeto. Cualquier descripción en la presente memoria de un método para, p. ej., tratar una enfermedad o, p. ej., suministrar un ácido nucleico a una célula, p. ej., expresar un sistema de edición génica en una célula o, p. ej., modificar genéticamente una célula debe interpretarse también como una descripción de una NPL o una composición farmacéutica que comprende dicha NPL para su uso en dichos métodos.

(a) Sistemas y métodos de edición génica

En algunas realizaciones, las NPL descritas en la presente memoria pueden comprender uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de sistemas de edición génica. Los sistemas de edición génica están diseñados para reconocer específicamente una secuencia de ácido nucleico diana en una molécula de ADN y de este modo inducir una modificación en la molécula de ADN. La modificación puede comprender una modificación en la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN o puede comprender una modificación química de uno o más nucleótidos en la molécula de ADN (p. ej., metilación). Los sistemas de edición génica útiles en los métodos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, sistemas de edición génica de nucleasa dirigida, editores de bases químicas, editores de calidad y editores epigenómicos.

En realizaciones particulares, los métodos descritos en la presente memoria utilizan NPL que comprenden uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de sistemas de edición génica de nucleasa dirigida, p. ej., un ARNm que codifica una nucleasa dirigida. Las nucleasas dirigidas pueden generar una o más mellas de ADN monocatenario o cortes de ADN bicatenario (DSB) en una secuencia de nucleótidos diana. En algunos casos, se puede lograr un DSB en una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos diana mediante el uso de dos nucleasas que generan mellas monocatenarias (endonucleasas monocatenarias). Cada endonucleasa monocatenaria puede escindir una hebra del ADN y el uso de dos o más endonucleasas monocatenarias puede crear un DSB (p. ej., un DSB escalonado) en

una secuencia de nucleótidos diana. En realizaciones preferidas, las nucleasas dirigidas se utilizan en combinación con un ácido nucleico molde donante, que se introduce en la secuencia de nucleótidos diana en el sitio del ADN DSB mediante recombinación homóloga.

En algunas realizaciones, las NPL descritas en la presente memoria pueden comprender un ARNm que codifica una nucleasa dirigida. En los métodos descritos en la presente memoria, las nucleasas dirigidas pueden generar una o más mellas de ADN monocatenario o cortes de ADN bicatenario (DSB) en una secuencia de nucleótidos diana. En algunos casos, se puede lograr un DSB en una molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos diana mediante el uso de dos nucleasas que generan mellas monocatenarias (endonucleasas monocatenarias). Cada endonucleasa monocatenaria puede escindir una hebra del ADN y el uso de dos o más endonucleasas monocatenarias puede crear un DSB (p. ej., un DSB escalonado) en una secuencia de nucleótidos diana. En realizaciones preferidas, las nucleasas dirigidas se utilizan en combinación con un ácido nucleico molde donante, que se introduce en la secuencia de nucleótidos diana en el sitio del ADN DSB mediante recombinación homóloga.

Las nucleasas dirigidas pueden comprender uno o más dominios de unión a ADN y uno o más dominios de escisión de ADN (p. ej., uno o más dominios de endonucleasa y/o exonucleasa) y, opcionalmente, uno o más conectores polipeptídicos. La nucleasa dirigida puede diseñarse y/o modificarse a partir de una nucleasa dirigida de origen natural o de una nucleasa dirigida previamente diseñada. Las nucleasas dirigidas diseñadas pueden comprender además uno o más dominios funcionales adicionales, p. ej., un dominio enzimático de procesamiento de extremos de una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 5-3', endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasa independiente del molde.

Las NPL descritas en la presente memoria pueden comprender un ARNm que codifica cualquier nucleasa dirigida conocida, incluidas, por ejemplo, nucleasas asociadas a grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR) (Cas), nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional (TALEN), megaTAL y endonucleasas de asentamiento (meganucleasas). En algunos casos, una nucleasa dirigida es una nucleasa guiada por ARN y requiere una secuencia de ARN para dirigir la nucleasa a un sitio diana (p. ej., CRISPR/Cas). En otros casos, las nucleasas dirigidas comprenden uno o más dominios heterólogos de unión y escisión de ADN (p. ej., ZFN, TALEN, megaTAL). En otros casos más, el dominio de unión a ADN de una nucleasa natural puede alterarse para unirse a un sitio diana seleccionado (p. ej., una meganucleasa que se ha diseñado para unirse a un sitio diferente al sitio de unión afín).

i. Sistemas de edición génica CRISPR/Cas

En algunas realizaciones, la nucleasa dirigida es una nucleasa Cas. Los sistemas de nucleasas CRISPR (grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares)/Cas (asociadas a CRISPR) se pueden introducir en una célula y diseñarse para unirse e introducir mellas monocatenarias o cortes bicatenarios (DSB), en una secuencia de nucleótidos diana. Los sistemas de edición génica CRISPR/Cas se basan en un sistema bacteriano natural que se ha utilizado para la ingeniería genómica en mamíferos. Los sistemas CRISPR-Cas son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Jinek, ("A

programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity" *Science* 337.6096 (2012): 816-821); Jinek ("RNA-programmed genome editing in human cells" *Elife* 2 (2013): e00471); Mali ("RNA-guided human genome engineering via Cas9" *Science* 339.6121 (2013): 823-826); Qi ("Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression" *Cell* 152.5 (2013): 1173-1183); Ran ("Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system" *Nature protocols* 8.11 (2013): 2281-2308); Zetsche ("Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system" *Cell* 163.3 (2015): 759-771.).

En algunas realizaciones, la NPL comprende un ARNm que codifica una nucleasa Cas y uno o más ARN que confieren unión de la nucleasa Cas a la secuencia de nucleótidos diana, por ejemplo, un ARNc transactivador (ARNcrtra) y un ARN de CRISPR (ARNcr), o, más habitualmente, ARN guía (ARNg, también denominado ARN guía monocatenario (ARNgm)), en el que ARNcr y ARNcrtra se introducen en una molécula de ARN.

En algunos casos, la nucleasa Cas está diseñada como una endonucleasa de ADN bicatenario, una endonucleasa monocatenaria o una Cas catalíticamente muerta (dCas), y forma un complejo diana con un ARNg o ARNcr/ARNcrtra para el reconocimiento de ADN específico del sitio en la secuencia de nucleótidos diana. Los ARNg y los ARNc comprenden una secuencia protoespaciadora que comparte homología/complementariedad con la secuencia diana protoespaciadora de la secuencia de nucleótidos diana. El protoespaciador confiere la unión del complejo de Cas/ARNg a la secuencia de nucleótidos diana. La secuencia diana protoespaciadora linda con un motivo adyacente al protoespaciador corto (PAM), que desempeña una función en el reclutamiento de un complejo de Cas/ARN en el sitio diana. Los diferentes tipos de nucleasas Cas reconocen diferentes motivos PAM específicos. Se puede usar un sistema CRISPR/Cas para dirigirse a y escindir una secuencia de nucleótidos diana flanqueada por secuencias PAM 3' particulares específicas de la nucleasa Cas particular del sistema CRISPR/Cas. Son conocidos en la técnica en la técnica PAM para nucleasas Cas específicas y también pueden identificarse usando bioinformática o métodos experimentales descritos en la técnica, incluido, por ejemplo, en Esvelt ("Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing" *Nature methods* 10.11 (2013): 1116-1121).

En determinadas realizaciones, la nucleasa Cas puede comprender uno o más dominios de unión a ADN heterólogos, lo que puede aumentar la eficiencia y especificidad de la escisión del ADN en la secuencia de nucleótidos diana. Una nucleasa Cas puede comprender opcionalmente uno o más conectores y/o dominios funcionales adicionales, p. ej., un dominio enzimático de procesamiento de extremos de una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. En algunas realizaciones, se puede introducir una nucleasa Cas en una célula madre hematopoyética (CMH) con una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. La nucleasa Cas y la enzima de procesamiento 3' pueden introducirse por separado, p. ej., en diferentes vectores o ácidos nucleicos separados, o juntos,

p. ej., como una proteína de fusión, o en una construcción policistónica separada por un péptido vírico de autoescisión o un elemento IRES.

En diversas realizaciones, la nucleasa Cas es Cas9 o Cpf1.

Se puede obtener una nucleasa Cas9 adecuada para su uso en realizaciones particulares, por ejemplo, de especies bacterianas, incluidas, pero sin limitación: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus italicus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pseudoporcinus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pasteurianus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus downei*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria subflava*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium matruchotii*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema phagedenis* y *Treponema denticola*. En algunos casos, el nucleótido que codifica la nucleasa Cas9 comprende una parte de la secuencia de la nucleasa Cas9 de una cualquiera de las especies bacterianas descritas en la presente memoria.

De manera análoga, se puede obtener una nucleasa Cpf1 adecuada para su uso en realizaciones particulares de especies bacterianas que incluyen, pero sin limitación: *Francisella* spp., *Acidaminococcus* spp., *Prevotella* spp., *Lachnospiraceae* spp., entre otras. En algunos casos, el nucleótido que codifica la nucleasa Cpf1 comprende una parte de la secuencia de la nucleasa Cas9 de una cualquiera de las especies bacterianas descritas en la presente memoria.

Las regiones conservadas de los ortólogos de Cas9 incluyen un dominio de endonucleasa HNH central y un dominio dividido de RuvC/Rnasa H. Los ortólogos de Cpf1 poseen un dominio de RuvC/Rnasa H pero no poseen ningún dominio HNH discernible. Cada uno de los dominios de tipo HNH y RuvC son responsables de escindir una hebra de la secuencia diana de ADN bicatenario. El dominio HNH de la nucleasa Cas9 escinde la cadena de ADN complementaria del ARNcrtra:ARNcr o ARNgm. El dominio de tipo RuvC de la nucleasa Cas9 escinde la cadena de ADN que no es complementaria del ARNcrtra:ARNcr o ARNgm. Se predice que Cpf1 actuará como un dímero en donde cada dominio de tipo RuvC de Cpf1 escinde la cadena complementaria o no complementaria del sitio diana. En realizaciones particulares, se contempla una variante de nucleasa Cas9 (p. ej., endonucleasa monocatenaria Cas9) que comprende una o más adiciones, supresiones, mutaciones o sustituciones de aminoácidos en los dominios de endonucleasa de tipo HNH o RuvC que disminuye o elimina la actividad nucleasa del dominio variante.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden modificar la actividad de la nucleasa Cas9. En algunas realizaciones, la actividad de la nucleasa Cas9 disminuye o se elimina. Los ejemplos ilustrativos de mutaciones de Cas9 HNH que disminuyen o eliminan la actividad

nucleasa en el dominio incluyen, pero sin limitación: *S. pyogenes* (D10A); *S. thermophilis* (D9A); *T. denticola* (D13A); y *N. meningitidis* (D16A). Los ejemplos ilustrativos de mutaciones de dominio de tipo RuvC de Cas9 que disminuyen o eliminan la actividad nucleasa en el dominio incluyen, pero sin limitación: *S. pyogenes* (D839A, H840A o N863A); *S. thermophilis* (D598A, H599A o N622A); *T. denticola* (D878A, H879A o N902A); y *N. meningitidis* (D587A, H588A o N611A). En algunos casos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden disminuir la actividad y/o eficiencia de la nucleasa Cas9 hacia una diana biológica. En algunos casos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden disminuir la actividad y/o eficiencia de la nucleasa Cas9 hacia una enfermedad diana.

De manera similar, los equivalentes, variantes, homólogos, ortólogos o parálogos de Cas9, ya sea de origen natural o no natural (p. ej., diseñados o recombinantes) y un equivalente de Cas9 de cualquier sistema CRISPR de clase 2 (p. ej., tipo II y V), incluidos Cas12a (Cpf1), Cas12e (CasX), Cas12b1 (C2c1), Cas12b2 y Cas12c (C2c3) son adecuados para su uso en realizaciones particulares de la presente descripción. Otros equivalentes de Cas se describen en Makarova *et al.*, "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector", Science 2016; 353(6299) y Makarova *et al.*, "Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here?", The CRISPR Journal, vol. 1. n.º 5, 2018

CasX (Cas12e) es un equivalente de Cas9 que, según se informa, tiene la misma función que Cas9 pero que evolucionó por una evolución convergente. Por lo tanto, la proteína CasX (Cas12e) descrita en Liu *et al.*, "CasX enzymes comprises a distinct family of RNA-guided genome editors", Nature, 2019, vol. 566: 218-223, se contempla para su uso con el sistema de edición génica descrito en la presente memoria. Además, cualquier variante o modificación de CasX (Cas12e) es concebible y está dentro del alcance de la presente descripción.

En otras diversas realizaciones, la nucleasa Cas descrita en la presente memoria (p. ej., una Cas9, una Cas12a (Cpf1), una Cas12e (CasX), una Cas12d (CasY), una Cas12b1 (C2c1), una Cas12c (C2c3), una Cas12g, una Cas12h, una Cas14 o una variante de las mismas) es adecuada para su uso en realizaciones particulares de la presente descripción.

ii. Endonucleasas de asentamiento/meganucleasas

En diversas realizaciones, se introducen una pluralidad de endonucleasas de asentamiento o meganucleasas en una célula y se diseñan para unirse e introducir mellas monocatenarias o cortes bicatenarios (DSB) en una pluralidad de sitios diana del genoma que incluyen, pero sin limitación, genes que codifican proteínas asociadas a enfermedades específicas (p. ej., enfermedad de células falciformes). En algunas realizaciones, las endonucleasas de asentamiento o meganucleasas son adecuadas para su uso en realizaciones particulares de la presente descripción. Además, cualquier variante o modificación de endonucleasas o meganucleasas es concebible y está dentro del alcance de la presente descripción. "Endonucleasa de asentamiento" y "meganucleasa" se usan indistintamente y se refieren a nucleasas naturales o meganucleasas diseñadas que reconocen sitios de escisión de 12 a 45 pares de bases y habitualmente se agrupan en cinco familias en función de los motivos de secuencia y estructura: LAGLIDADG (SEQ ID NO: 61), GIY-YIG, HNH, secuencia His-Cys y PD-(D/E)XK.

Las HE diseñadas no existen en la naturaleza y pueden obtenerse mediante tecnología de ADN recombinante o mediante mutagénesis aleatoria. Las HE diseñadas pueden obtenerse realizando una o más alteraciones de aminoácidos, p. ej., mutando, sustituyendo, añadiendo o eliminando uno o más aminoácidos, en una HE de origen natural o HE diseñada previamente. En realizaciones particulares, una

HE diseñada comprende una o más alteraciones de aminoácidos en la interfaz de reconocimiento del ADN. Las HE diseñadas contempladas en realizaciones particulares pueden comprender además uno o más conectores y/o dominios funcionales adicionales, p. ej., un dominio enzimático de procesamiento de extremos de una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. En realizaciones particulares, las HE modificadas se introducen en un linfocito T con una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. La HE y la enzima de procesamiento 3' pueden introducirse por separado, p. ej., en diferentes vectores o ARNm separados, o juntas, p. ej., como una proteína de fusión, o en una construcción policistrónica separada por un péptido vírico de autoescisión o un elemento IRES.

Una "interfaz de reconocimiento de ADN" se refiere a los restos de aminoácidos de HE que interactúan con las bases diana de los ácidos nucleicos, así como a los restos que están adyacentes. Para cada HE, la interfaz de reconocimiento de ADN comprende una extensa red de contactos de cadena lateral con cadena lateral y de cadena lateral con ADN, la mayoría de los cuales son necesariamente únicos para reconocer una secuencia diana de ácido nucleico particular. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la interfaz de reconocimiento del ADN correspondiente a una secuencia de ácido nucleico particular varía significativamente y es una característica de cualquier HE natural o artificial. A modo de ejemplo no limitante, un HE diseñado contemplado en realizaciones particulares puede obtenerse mediante la construcción de bibliotecas de variantes de HE en las que se varían uno o más restos de aminoácidos localizados en la interfaz de reconocimiento de ADN de la HE natural (o una HE diseñada previamente). Las bibliotecas pueden examinarse para determinar la actividad de escisión diana frente a cada sitio diana predicho del locus TCR α usando ensayos de escisión (véase, p. ej., Jarjour *et al.*, 2009. *Nuc. Acids Res.* 37(20): 6871-6880).

Las endonucleasas de asentamiento LAGLIDADG (SEQ ID NO: 61) (LHE) son la familia de meganucleasas mejor estudiada, están codificadas principalmente en arqueas y en el ADN de orgánulos de algas verdes y hongos, y muestran la mayor especificidad general de reconocimiento de ADN. Las LHE comprenden uno o dos motivos catalíticos LAGLIDADG (SEQ ID NO: 61) por cadena proteica y actúan como homodímeros o monómeros monocatenarios, respectivamente. Los estudios estructurales de las proteínas LAGLIDADG (SEQ ID NO: 61) han identificado una estructura central muy conservada (Stoddard 2005), caracterizada por un pliegue $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$, con el motivo LAGLIDADG (SEQ ID NO: 61) perteneciente a la primera hélice de este pliegue. La escisión muy eficiente y específica de las LHE representa un almacén proteico para obtener nuevas endonucleasas muy específicas. Sin embargo, el diseño de LHE para unirse y escindir un sitio diana no natural o no canónico requiere la selección del almacén de LHE

adecuado, el examen del locus diana, la selección de posibles sitios diana y la alteración extensa de la LHE para alterar sus puntos de contacto con el ADN y la especificidad de escisión, en hasta dos tercios de las posiciones de los pares de bases en un sitio diana.

Los ejemplos ilustrativos de LHE a partir de las que se pueden diseñar LHE artificiales incluyen, pero sin limitación, I-AabMI, I-AaeMI, I-Anil, I-ApaMI, I-CapIII, I-CapIV, I-CkaMI, I-CpaMI, I-CpaMII, I-CpaMIII, I-CpaMIV, I-CpaMV, I-CpaV, I-CraMI, I-EjeMI, I-GpeMI, I-Gpil, I-GzeMI, I-GzeMII, I-GzeMIII, I-HjeMI, I-Ltrl, I-Ltrl, I-LtrlWI, I-MpeMI, I-MveMI, I-NcrII, I-NcrI, I-NcrMI, I-OheMI, I-Onul, I-OsoMI, I-OsoMII, I-OsoMIII, I-OsoMIV, I-PanMI, I-PanMII, I-PanMIII, I-PnoMI, I-ScuMI, I-SmaMI, I-SscMI e I-Vdi141I.

Otros ejemplos ilustrativos de LHE a partir de las que se pueden diseñar LHE artificiales incluyen, pero sin limitación, I-Crel e I-Scel.

En una realización, la LHE diseñada se selecciona del grupo que consiste en: I-CpaMI, I-HjeMI, I-Onul, I-PanMI y SmaMI.

En una realización, la LHE diseñada es I-Onul.

En una realización, se generaron LHE I-Onul diseñadas dirigidas al gen de TCR α humano a partir de una I-Onul natural. En una realización preferida, se generaron LHE I-Onul diseñadas dirigidas al gen de TCR α humano a partir de una I-Onul diseñada previamente.

En una realización particular, la LHE I-Onul diseñada comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la interfaz de reconocimiento del ADN. En realizaciones particulares, la LHE I-Onul comprende al menos un 70 %, al menos un 71 %, al menos un 72 %, al menos un 73 %, al menos un 74 %, al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la interfaz de reconocimiento de ADN de I-Onul (Taekuchi *et al.* 2011. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 9 de agosto de 2011; 108(32): 13077-13082) o una variante diseñada de I-Onul.

En una realización, la LHE I-Onul comprende al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 97 %, más preferiblemente al menos un 99 % de identidad de secuencia con la interfaz de reconocimiento de ADN de I-Onul (Taekuchi *et al.* 2011. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 9 de agosto de 2011; 108(32): 13077-13082) o una variante diseñada de I-Onul.

En una realización particular, una LHE I-Onul diseñada comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos en la interfaz de reconocimiento del ADN, particularmente en los subdominios situados entre las posiciones 24-50, 68 a 82, 180 a 203 y 223 a 240 de I-Onul.

En una realización, una LHE I-Onul diseñada comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos en posiciones adicionales situadas en cualquier lugar dentro de la secuencia completa de I-Onul. Los restos que pueden sustituirse y/o modificarse incluyen, pero sin limitación, aminoácidos que entran en contacto con la diana de ácido nucleico o que interactúan con la cadena principal del ácido

nucleico o con las bases de nucleótidos, directamente o a través de una molécula de agua. En un ejemplo no limitante, una LHE I-Onul diseñada contemplada en la presente memoria comprende una o más sustituciones y/o modificaciones, preferiblemente al menos 5, preferiblemente al menos 10, preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20, incluso más preferiblemente al menos 25 en al menos una posición seleccionada del grupo de posiciones que consiste en las posiciones: 19, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 68, 70, 72, 75, 76 77, 78, 80, 82, 168, 180, 182, 184, 186, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 223, 225, 227, 229, 231, 232, 234, 236, 238, 240 de I-Onul.

iii. MegaTAL

En diversas realizaciones, se introducen una pluralidad de megaTAL en una célula y se diseñan para unirse e introducir DSB en una pluralidad de sitios diana del genoma que incluyen. En algunas realizaciones, las megaTAL son adecuadas para su uso en realizaciones particulares de la presente descripción. Además, cualquier variante o modificación de megaTAL es concebible y está dentro del alcance de la presente descripción. Una "megaTAL" se refiere a una nucleasa diseñada que comprende un dominio de unión a ADN TALE diseñado y una meganucleasa diseñada, y opcionalmente comprende uno o más conectores y/o dominios funcionales adicionales, p. ej., un dominio enzimático de procesamiento de extremos de una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. En realizaciones particulares, se puede introducir una megaTAL en un linfocito T con una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. La megaTAL y la enzima de procesamiento 3' pueden introducirse por separado, p. ej., en diferentes vectores o ARNm separados, o juntas, p. ej., como una proteína de fusión, o en una construcción policistrónica separada por un péptido vírico de autoescisión o un elemento IRES.

Un "dominio de unión a ADN de TALE" es la parte de unión a ADN de las efectoras de tipo activador de la transcripción (TALE o efectoras TAL), que imita los activadores de la transcripción de las plantas para manipular el transcriptoma de las plantas (véase, p. ej., Kay *et al.*, 2007. Science 318:648-651). Los dominios de unión a ADN de TALE contemplados en realizaciones particulares se diseñan desde cero o a partir de TALE de origen natural, p. ej., AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas translucens*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas alfalfa*, *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas euvesicatoria* y *Xanthomonas oryzae* y brg11 y hpx17 de *Ralstonia solanacearum*. Se describen ejemplos ilustrativos de proteínas TALE para obtener y diseñar dominios de unión a ADN en las patentes de los Estados Unidos n.º 9.017.967, y referencias citadas en la misma, todas las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

En realizaciones particulares, una megaTAL comprende un dominio de unión a ADN de TALE que comprende una o más unidades repetidas que participan en la unión del dominio de unión a ADN de TALE a su correspondiente secuencia de ADN diana. Una sola "unidad de repetición" (también denominada "repetición") suele tener entre 33 y 35 aminoácidos de longitud. Cada unidad de repetición del dominio de

unión a ADN de TALE incluye 1 o 2 restos de unión a ADN que forman el doble resto variable repetido (RVD), normalmente en las posiciones 12 y/o 13 de la repetición. El código natural (canónico) para el reconocimiento de ADN de estos dominios de unión a ADN de TALE se ha determinado de manera que una secuencia HD en las posiciones 12 y 13 conduce a unión a la citosina I, NG se une a T, NI a A, NN se une a G o A y NG se une a T. En determinadas realizaciones, se contemplan RVD no canónicos (atípicos).

Los ejemplos ilustrativos de RVD no canónicos adecuados para su uso en megaTAL particulares contempladas en realizaciones particulares incluyen, pero sin limitación, HH, KH, NH, NK, NQ, RH, RN, SS, NN, SN, KN para el reconocimiento de guanina (G); NI, KI, RI, HI, SI para el reconocimiento de adenina (A); NG, HG, KG, RG para el reconocimiento de timina (T); RD, SD, HD, ND, KD, YG para el reconocimiento de citosina (C); NV, HN para el reconocimiento de A o G; y H*, HA, KA, N*, NA, NC, NS, RA, S* para el reconocimiento de A o T o G o C, en donde (*) significa que el aminoácido en la posición 13 está ausente. Los ejemplos ilustrativos adicionales de RVD adecuados para su uso en megaTAL particulares contemplados en realizaciones particulares incluyen además los descritos en las patentes de los Estados Unidos n.º 8.614.092, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

En realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN de TALE que comprende de 3 a 30 unidades repetidas. En determinadas realizaciones, una megaTAL comprende 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 o 30 unidades repetidas del dominio de unión a ADN de TALE. En una realización preferida, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN de TALE que comprende 5-16 unidades repetidas, más preferiblemente 7-15 unidades repetidas, más preferiblemente 9-12 patentes no son unidades repetidas evidentes y más preferiblemente 9, 10 u 11 unidades repetidas.

En realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN de TALE que comprende de 3 a 30 unidades repetidas y una única unidad repetida de TALE troncada adicional que comprende 20 aminoácidos ubicados en el extremo C de un conjunto de unidades repetidas de TALE, es decir, una unidad repetida del dominio de unión a ADN de medio TALE C-terminal adicional (aminoácidos -20 a -1 de la caperuza C descrita en otra parte del presente documento, más adelante). Por lo tanto, en realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN de TALE que comprende de 3.5 a 30.5 unidades repetidas.

En determinadas realizaciones, una megaTAL comprende 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, 15.5, 16.5, 17.5, 18.5, 19.5, 20.5, 21.5, 22.5, 23.5, 24.5, 25.5, 26.5, 27.5, 28.5, 29.5 o 30.5 unidades repetidas del dominio de unión a ADN de TALE. En una realización preferida, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN de TALE que comprende 5.5-13.5 unidades repetidas, más preferiblemente 7.5-12.5 unidades repetidas, más preferiblemente 9.5-11.5 unidades repetidas y más preferiblemente 9.5, 10.5 u 11.5 unidades repetidas.

En realizaciones particulares, una megaTAL comprende un polipéptido de "dominio N-terminal (DNT)", uno o más dominios/unidades repetidas de TALE, un polipéptido de "dominio C-terminal (DCT)" y una meganucleasa diseñada.

Como se emplea en esta memoria, la expresión polipéptido de "dominio N-terminal (DNT)" se refiere a la secuencia que flanquea la parte o el fragmento N-terminal de un dominio de unión a ADN de TALE de origen natural. La secuencia de DNT, si está presente, puede tener cualquier longitud siempre que las unidades repetidas del dominio de unión a ADN de TALE conserven la capacidad de unirse al ADN.

- 5 En realizaciones particulares, el polipéptido de DNT comprende al menos 120 a al menos 140 o más aminoácidos N-terminales con respecto al dominio de unión a ADN de TALE (0 es el aminoácido 1 de la unidad repetida más cercana al extremo N). En realizaciones particulares, el polipéptido de DNT comprende al menos aproximadamente 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 o al menos 140 aminoácidos N-terminales con respecto al dominio de unión a ADN
- 10 de TALE. En una realización, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un polipéptido de DNT de al menos aproximadamente los aminoácidos +1 a +122 a al menos aproximadamente +1 a +137 de una proteína de TALE de *Xanthomonas* (0 es el aminoácido 1 de la unidad repetida más cercana al extremo N). En realizaciones particulares, el polipéptido de DNT comprende al menos aproximadamente 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136 o 137
- 15 aminoácidos N-terminales con respecto al dominio de unión a ADN de TALE de una proteína de TALE de *Xanthomonas*. En una realización, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un polipéptido de DNT de al menos los aminoácidos +1 a +121 de una proteína de TALE de *Ralstonia* (0 es el aminoácido 1 de la unidad repetida más cercana al extremo N). En realizaciones particulares, el polipéptido de DNT comprende al menos aproximadamente 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131,
- 20 132, 133, 134, 135, 136 o 137 aminoácidos N-terminales con respecto al dominio de unión a ADN de TALE de una proteína de TALE de *Ralstonia*.

- Como se emplea en esta memoria, la expresión polipéptido de "dominio C-terminal (DCT)" se refiere a la secuencia que flanquea la parte o el fragmento C-terminal de un dominio de unión a ADN de TALE de origen natural. La secuencia de DCT, si está presente, puede tener cualquier longitud siempre
- 25 que las unidades repetidas del dominio de unión a ADN de TALE conserven la capacidad de unirse al ADN. En realizaciones particulares, el polipéptido de DCT comprende de al menos 20 a al menos 85 o más aminoácidos C-terminales con respecto a la última repetición completa del dominio de unión a ADN de TALE (los primeros 20 aminoácidos son la unidad de media repetición en sentido C-terminal con respecto a la última unidad de repetición completa C-terminal). En realizaciones particulares, el polipéptido de DCT
- 30 comprende al menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 o al menos 85 aminoácidos C-terminales con respecto a la última repetición completa del dominio de unión a ADN de TALE. En una
- 35 realización, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un polipéptido de DCT de al menos aproximadamente los aminoácidos -20 a -1 de una proteína de TALE de *Xanthomonas* (-20 es el aminoácido 1 de una unidad de media repetición en sentido C-terminal con respecto a la última unidad de repetición completa C-terminal). En realizaciones particulares, el polipéptido de DCT comprende al menos aproximadamente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos C-terminales

con respecto a la última repetición completa del dominio de unión a ADN de TALE de una proteína de TALE de *Xanthomonas*. En una realización, una megaTAL contemplada en la presente memoria comprende un polipéptido de DCT de al menos aproximadamente los aminoácidos -20 a -1 de una proteína de TALE de *Ralstonia* (-20 es el aminoácido 1 de una unidad de media repetición en sentido C-terminal con respecto a la última unidad de repetición completa C-terminal). En realizaciones particulares, el polipéptido de DCT comprende al menos aproximadamente 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos C-terminales con respecto a la última repetición completa del dominio de unión a ADN de TALE de una proteína de TALE de *Ralstonia*.

En realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria, comprende un polipéptido de fusión que comprende un dominio de unión a ADN de TALE diseñado para unirse a una secuencia diana, una meganucleasa diseñada para unirse y escindir una secuencia diana, y opcionalmente un polipéptido de DNT y/o DCT, opcionalmente unidos entre sí con uno o más polipéptidos conectores contemplados en otra parte del presente documento. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, se contempla que una megaTAL que comprende el dominio de unión a ADN de TALE y, opcionalmente, un polipéptido de DNT y/o DCT se fusione con un polipéptido conector que además se fusiona con una meganucleasa diseñada. Por lo tanto, el dominio de unión a ADN de TALE se une a una secuencia diana de ADN que se encuentra a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de la secuencia diana a la que se une el dominio de unión a ADN de la meganucleasa. De esta forma, las megaTAL contempladas en la presente memoria, aumentan la especificidad y eficiencia de la edición del genoma.

En realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria, comprende una o más unidades repetidas de unión a ADN de TALE y una LHE diseñada seleccionada del grupo que consiste en: I-AabMI, I-AaeMI, I-Anil, I-ApaMI, I-CapIII, I-CapIV, I-CkaMI, I-CpaMI, I-CpaMII, I-CpaMIII, I-CpaMIV, I-CpaMV, I-CpaV, I-CraMI, I-Crel, I-Scel, I-EjeMI, I-GpeMI, I-Gpil, I-GzeMI, I-GzeMII, I-GzeMIII, I-HjeMI, I-LtrII, I-Ltrl, I-LtrWI, I-MpeMI, I-MveMI, I-NcrII, I-Ncrl, I-NcrMI, I-OheMI, I-Onul, I-OsoMI, I-OsoMII, I-OsoMIII, I-OsoMIV, I-PanMII, I-PanMIII, I-PanMIII, I-PnoMI, I-ScuMI, I-SmaMI, I-SscMI e I-Vdi141I, o preferiblemente I-CpaMI, I-HjeMI, I-Onul, I-PanMI y SmaMI, o más preferiblemente I-Onul.

En realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria, comprende una DNT, una o más unidades repetidas de unión a ADN de TALE, una DCT y una LHE diseñada seleccionada del grupo que consiste en: I-AabMI, I-AaeMI, I-Anil, I-ApaMI, I-CapIII, I-CapIV, I-CkaMI, I-CpaMI, I-CpaMII, I-CpaMIII, I-CpaMIV, I-CpaMV, I-CpaV, I-CraMI, I-Crel, I-Scel, I-EjeMI, I-GpeMI, I-Gpil, I-GzeMI, I-GzeMII, I-GzeMIII, I-HjeMI, I-LtrII, I-Ltrl, I-LtrWI, I-MpeMI, I-MveMI, I-NcrII, I-Ncrl, I-NcrMI, I-OheMI, I-Onul, I-OsoMI, I-OsoMII, I-OsoMIII, I-OsoMIV, I-PanMI, I-PanMII, I-PanMIII, I-PnoMI, I-ScuMI, I-SmaMI, I-SscMI e I-Vdi141I, o preferiblemente I-CpaMI, I-HjeMI, I-Onul, I-PanMI y SmaMI, o más preferiblemente I-Onul.

En realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria, comprende una DNT, de aproximadamente 9.5 a aproximadamente 11.5 unidades repetidas de unión a ADN de TALE y una LHE I-Onul diseñada seleccionada del grupo que consiste en: I-AabMI, I-AaeMI, I-Anil, I-ApaMI, I-CapIII, I-CapIV, I-CkaMI, I-CpaMI, I-CpaMII, I-CpaMIII, I-CpaMIV, I-CpaMV, I-CpaV, I-CraMI, I-Crel, I-Scel,

I-EjeMI, I-GpeMI, I-Gpil, I-GzeMI, I-GzeMII, I-GzeMIII, I-HjeMI, I-LtrII, I-Ltrl, I-LtrWI, I-MpeMI, I-MveMI, I-NcrII, I-Ncrl, I-NcrMI, I-OheMI, I-Onul, I-OsoMI, I-OsoMII, I-OsoMIII, I-OsoMIV, I-PanMI, I-PanMII, I-PanMIII, I-PnoMI, I-ScuMI, I-SmaMI, I-SscMI e I-Vdi141I, o preferiblemente I-CpaMI, I-HjeMI, I-Onul, I-PanMI y SmaMI, o más preferiblemente I-Onul.

5 En realizaciones particulares, una megaTAL contemplada en la presente memoria, comprende una DNT de aproximadamente 122 aminoácidos a 137 aminoácidos, aproximadamente 9.5, aproximadamente 10.5 o aproximadamente 11.5 unidades repetidas de unión, una DCT de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 85 aminoácidos y una LHE I-Onul diseñada seleccionada del grupo que consiste en:
 10 I-AabMI, I-AaeMI, I-Anil, I-ApaMI, I-CapIII, I-CapIV, I-CkaMI, I-CpaMI, I-CpaMII, I-CpaMIII, I-CpaMIV, I-CpaMV, I-CpaV, I-CraMI, I-Crel, I-Scel, I-EjeMI, I-GpeMI, I-Gpil, I-GzeMI, I-GzeMII, I-GzeMIII, I-HjeMI, I-LtrII, I-Ltrl, I-LtrWI, I-MpeMI, I-MveMI, I-NcrII, I-Ncrl, I-NcrMI, I-OheMI, I-Onul, I-OsoMI, I-OsoMII, I-OsoMIII, I-OsoMIV, I-PanMI, I-PanMII, I-PanMIII, I-PnoMI, I-ScuMI, I-SmaMI, I-SscMI e I-Vdi141I, o preferiblemente I-CpaMI, I-HjeMI, I-Onul, I-PanMI y SmaMI, o más preferiblemente I-Onul.

15 Las MegaTal se describen con más detalle en, p. ej., Boisse" ("megaTALS: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineeri"ng", Nucleic Acids Research, 2013, 42(4):2591-2601).

iv. Talen

En diversas realizaciones, se introducen una pluralidad de endonucleasas efectoras de tipo activador transcripcional (TALEN) en una célula y se diseñan para unirse e introducir mellas monocatenarias o cortes bicatenarios (DSB) en una pluralidad de sitios diana del genoma. En algunas
 20 realizaciones, las TALEN son adecuadas para su uso en realizaciones particulares de la presente descripción. Además, cualquier variante o modificación de TALEN es concebible y está dentro del alcance de la presente descripción. Una "TALEN" se refiere a una nucleasa diseñada que comprende un dominio de unión a ADN de TALE diseñado contemplado en otra parte del presente documento y un dominio de endonucleasa (o medio dominio de endonucleasa del mismo), y opcionalmente comprende uno o más
 25 conectores y/o dominios funcionales adicionales, p. ej., un dominio enzimático de procesamiento de extremos de una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. En realizaciones particulares, se puede introducir una TALEN en un linfocito T con una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3',
 30 exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. La TALEN y la enzima de procesamiento 3' pueden introducirse por separado, p. ej., en diferentes vectores o ARNm separados, o juntas, p. ej., como una proteína de fusión, o en una construcción policistronica separada por un péptido vírico de autoescisión o un elemento IRES.

En una realización, la escisión bicatenaria dirigida se logra con dos TALEN, cada una de las cuales
 35 comprende un medio dominio de endonucleasa que se puede utilizar para reconstituir un dominio de escisión catalíticamente activo. En otra realización, la escisión bicatenaria dirigida se logra utilizando un único polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN de TALE y dos medios dominios de endonucleasa.

Las TALEN contempladas en realizaciones particulares comprenden un DNT, un dominio de unión a ADN de TALE que comprende aproximadamente de 3 a 30 unidades repetidas, p. ej., aproximadamente 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 o 30 unidades repetidas, y un dominio o medio dominio de endonucleasa.

5 Las TALEN contempladas en realizaciones particulares comprenden un DNT, un dominio de unión a ADN de TALE que comprende aproximadamente de 3.5 a 30.5 unidades repetidas, p. ej., aproximadamente 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, 15.5, 16.5, 17.5, 18.5, 19.5, 20.5, 21.5, 22.5, 23.5, 24.5, 25.5, 26.5, 27.5, 28.5, 29.5 o 30.5 unidades repetidas, un DCT y un dominio o medio dominio de endonucleasa.

10 Las TALEN contempladas en realizaciones particulares comprenden un DNT de aproximadamente 121 aminoácidos a aproximadamente 137 aminoácidos como se describe en otra parte del presente documento, un dominio de unión a ADN de TALE que comprende de aproximadamente 9.5 a aproximadamente 11.5 unidades repetidas (es decir, aproximadamente 9.5, aproximadamente 10.5 o aproximadamente 11.5 unidades repetidas), una DCT de aproximadamente 20 aminoácidos a
15 aproximadamente 85 aminoácidos y un dominio o medio dominio de endonucleasa.

En realizaciones particulares, una TALEN comprende un dominio de endonucleasa de una endonucleasa de tipo restricción. Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) están presentes en muchas especies y son capaces de unirse de forma específica a una secuencia al ADN (en un sitio de reconocimiento) y escindir el ADN en el sitio de unión o cerca de él. Determinadas enzimas de
20 restricción (p. ej., tipo IIS) escinden el ADN en sitios eliminados del sitio de reconocimiento y tienen dominios de unión y endonucleasa separables. En una realización, las TALEN comprenden el dominio de endonucleasa (o medio dominio de endonucleasa) de al menos una enzima de restricción de tipo IIS y uno o más dominios de unión a ADN de TALE contemplados en otra parte del presente documento.

Los ejemplos ilustrativos de dominios de endonucleasa de restricción de tipo IIS adecuados para su uso en TALEN contempladas en realizaciones particulares incluyen dominios de endonucleasa de al
25 menos 1633 endonucleasas de restricción de tipo IIS descritas en "rebase.neb.com/cgi-bin/sublist?S".

Los ejemplos ilustrativos adicionales de dominios de endonucleasa de restricción de tipo IIS adecuados para su uso en TALEN contempladas en realizaciones particulares incluyen los de endonucleasas seleccionadas del grupo que consiste en: Aar I, Ace III, Aci I, Alo I, Alw26 I, Bae I, Bbr7 I, Bbv I, Bbv II, BbvC I, Bcc I, Bce83 I, BceA I, Bcef I, Bcg I, BciV I, Bfi I, Bin I, Bmg I, Bpu10 I, BsaX I, Bsb I, BscA I, BscG I, BseR I, BseY I, Bsi I, Bsm I, BsmA I, BsmF I, Bsp24 I, BspG I, BspM I, BspNC I, Bsr I, BsrB I, BsrD I, BstF5 I, Btr I, Bts I, Cdi I, CjeP I, Drd II, EarI, Eci I, Eco31 I, Eco57 I, Eco57M I, Esp3 I, Fau I, Fin I, Fok I, Gdi II, Gsu I, Hga I, Hin4 II, Hph I, Ksp632 I, Mbo II, Mly I, Mme I, Mnl I, Pfl1108, I Ple I, Ppi I, Psr I, RleA I, Sap I, SfaN I, Sim I, SspD5 I, Sth132 I, Sts I, TspDT I, TspGW I, Tth111 II, UbaP I, Bsa I y BsmB I.

35 En una realización, una TALEN contemplada en la presente memoria comprende un dominio de endonucleasa de la endonucleasa de restricción Fok I de tipo-IIS.

En una realización, una TALEN contemplada en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN de TALE y un medio dominio de endonucleasa de al menos una endonucleasa de restricción

de tipo IIS para mejorar la especificidad de escisión, opcionalmente en donde el medio dominio de endonucleasa comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos que minimizan o previenen la homodimerización.

Los ejemplos ilustrativos de medios dominios de escisión adecuados para su uso en realizaciones particulares contempladas en realizaciones particulares incluyen los descritos en las publicaciones de patente de los Estados Unidos n.º 20050064474; 20060188987, 20080131962, 20090311787; 20090305346; 20110014616 y 20110201055, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Las TALEN se describen con más detalle en, p. ej., Christia" ("Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleas"s", Genetics. Octubre de 2010; 186(2):757-61).

v. Nucleasas con dedos de zinc

En diversas realizaciones, se introducen una pluralidad de endonucleasas de dedos de zinc (ZFN) y se diseñan para unirse e introducir mellas monocatenarias o cortes bicatenarios (DSB) en una pluralidad de sitios diana del genoma. En algunas realizaciones, las ZFN son adecuadas para su uso en realizaciones particulares de la presente descripción. Además, cualquier variante o modificación de ZFN es concebible y está dentro del alcance de la presente descripción. Una "ZFN" se refiere a una nucleasa diseñada que comprende uno o más dominios de unión a ADN con dedos de zinc y un dominio de endonucleasa (o medio dominio de endonucleasa del mismo), y opcionalmente comprende uno o más conectores y/o dominios funcionales adicionales, p. ej., un dominio enzimático de procesamiento de extremos de una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. En realizaciones particulares, se puede introducir una ZFN en un linfocito T con una enzima de procesamiento de extremos que presenta actividad exonucleasa 5-3', exonucleasa alcalina 5-3', exonucleasa 3-5' (p. ej., Trex2), endonucleasa flap 5', helicasa o ADN polimerasas independientes del molde. La ZFN y la enzima de procesamiento 3' pueden introducirse por separado, p. ej., en diferentes vectores o ARNm separados, o juntas, p. ej., como una proteína de fusión, o en una construcción policistónica separada por un péptido vírico de autoescisión o un elemento IRES.

En una realización, la escisión bicatenaria dirigida se logra usando dos ZFN, cada una de las cuales comprende un medio dominio de endonucleasa que se puede utilizar para reconstituir un dominio de escisión catalíticamente activo. En otra realización, la escisión bicatenaria dirigida se logra con un único polipéptido que comprende uno o más dominios de unión a ADN con dedos de zinc y dos medios dominios de endonucleasa.

En una realización, una ZNF comprende un dominio de unión a ADN de TALE contemplado en otra parte del presente documento, un dominio de unión a ADN con dedos de zinc y un dominio de endonucleasa (o medio dominio de endonucleasa) contemplado en otra parte del presente documento.

En una realización, una ZNF comprende un dominio de unión a ADN con dedos de zinc y una meganucleasa contemplada en otra parte del presente documento.

En realizaciones particulares, la ZFN comprende un dominio de unión a ADN con dedos de zinc que tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más motivos de dedos de zinc y un dominio de endonucleasa (o medio dominio de endonucleasa). Normalmente, un solo motivo de dedo de zinc tiene aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. Los motivos de dedos de zinc incluyen tanto dedos de zinc canónicos C_2H_2 como dedos de zinc no canónicos tales como, por ejemplo, dedos de zinc C_3H y dedos de zinc C_4 .

Los dominios de unión con dedos de zinc se pueden diseñar para unirse a cualquier secuencia de ADN. Se han identificado dominios de unión de ADN con dedos de zinc candidatos para una secuencia diana de ADN de 3 pb determinada y se han ideado estrategias de ensamblaje modular para unir una pluralidad de dominios a un péptido de múltiples dedos dirigido a la secuencia diana de ADN compuesta correspondiente. También se pueden usar otros métodos adecuados conocidos en la técnica para diseñar y construir ácidos nucleicos que codifiquen dominios de unión al ADN con dedos de zinc, p. ej., presentación en fagos, mutagénesis aleatoria, bibliotecas combinatorias, diseño informático/racional, selección de afinidad, PCR, clonación a partir de ADNc o bibliotecas genómicas, construcción sintética y similares. (Véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 5.786.538; Wu *et al.*, *PNAS* 92:344-348 (1995); Jamieson *et al.*, *Biochemistry* 33:5689-5695 (1994); Rebar y Pabo, *Science* 263:671-673 (1994); Choo y Klug, *PNAS* 91:11163-11167 (1994); Choo y Klug, *PNAS* 91: 11168-11172 (1994); Desjarlais y Berg, *PNAS* 90:2256-2260 (1993); Desjarlais y Berg, *PNAS* 89:7345-7349 (1992); Pomerantz *et al.*, *Science* 267:93-96 (1995); Pomerantz *et al.*, *PNAS* 92:9752-9756 (1995); Liu *et al.*, *PNAS* 94:5525-5530 (1997); Griesman y Pabo, *Science* 275:657-661 (1997); Desjarlais y Berg, *PNAS* 91:11-99-11103 (1994)).

Los motivos de dedos de zinc individuales se unen a una secuencia de tres o cuatro nucleótidos. Un dominio con dedos de zinc está diseñado para unirse a una secuencia (p. ej., una secuencia diana) cuya longitud determinará el número de motivos de dedos de zinc en un dominio de unión con dedos de zinc diseñado. Por ejemplo, para las ZFN en los que los motivos de dedos de zinc no se unen a subsitios solapantes, a una secuencia diana de seis nucleótidos se une un dominio de unión de dos dedos; a una secuencia diana de nueve nucleótidos se une un dominio de unión de tres dedos, etc. En realizaciones particulares, no es necesario que los sitios de unión a ADN para motivos de dedos de zinc individuales en un sitio diana sean contiguos, pero pueden estar separados por uno o varios nucleótidos, dependiendo de la longitud y la naturaleza de las secuencias conectoras entre los motivos de dedos de zinc en un dominio de unión de múltiples dedos.

En realizaciones particulares, las ZNF contempladas en la presente memoria comprenden, un dominio de unión a ADN con dedos de zinc que comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más motivos de dedos de zinc y un dominio o medio dominio de endonucleasa de al menos una enzima de restricción de tipo IIS y uno o más dominios de unión a ADN de TALE contemplados en otra parte del presente documento.

En realizaciones particulares, las ZNF contempladas en la presente memoria comprenden, un dominio de unión a ADN con dedos de zinc que comprende tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más

motivos de dedos de zinc y un dominio o medio dominio de endonucleasa de al menos una enzima de restricción de tipo IIS seleccionada del grupo que consiste en: Aar I, Ace III, Aci I, Alo I, Alw26 I, Bae I, Bbr7 I, Bbv I, Bbv II, BbvC I, Bcc I, Bce83 I, BceA I, Bcef I, Bcg I, BciV I, Bfi I, Bin I, Bmg I, Bpu10 I, BsaX I, Bsb I, BscA I, BscG I, BseR I, BseY I, Bsi I, Bsm I, BsmA I, BsmF I, Bsp24 I, BspG I, BspM I, BspNC I, Bsr I, BsrB I, BsrD I, BstF5 I, Btr I, Bts I, Cdi I, CjeP I, Drd II, Earl, Eci I, Eco31 I, Eco57 I, Eco57M I, Esp3 I, Fau I, Fin I, Fok I, Gdi II, Gsu I, Hga I, Hin4 II, Hph I, Ksp632 I, Mbo II, Mly I, Mme I, Mnl I, Pfl1108, I Ple I, Ppi I, Psr I, RleA I, Sap I, SfaN I, Sim I, SspD5 I, Sth132 I, Sts I, TspDT I, TspGW I, Tth111 II, UbaP I, Bsa I y BsmB I.

En realizaciones particulares, las ZNF contempladas en la presente memoria comprenden, un dominio de unión a ADN con dedos de zinc que comprende tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más motivos de dedos de zinc y un dominio o medio dominio de endonucleasa de la endonucleasa de restricción Fok I de tipo IIS.

En una realización, una ZFN contemplada en la presente memoria comprende un dominio de unión a ADN con dedos de zinc y un medio dominio de endonucleasa de al menos una endonucleasa de restricción de tipo IIS para mejorar la especificidad de escisión, opcionalmente en donde el medio dominio de endonucleasa comprende una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos que minimizan o previenen la homodimerización.

(b) Edición génica *in vitro* en células madre hematopoyéticas

En determinadas realizaciones, las composiciones de NPL descritas en la presente memoria se pueden usar para suministrar uno o más ácidos nucleicos que codifican un sistema de edición génica que se dirige a un locus (o loci) dentro de una célula. Por ejemplo, un ARNm incluido en una composición de NPL puede codificar un polipéptido y producir la edición del gen tras el contacto y/o la entrada (p. ej., transfección) en una célula. En determinadas realizaciones, un ARNm incluido en una composición de NPL de la invención puede codificar un polipéptido que puede mejorar la función o la salud de una célula al dirigirse a la secuencia de nucleótidos de una o más dianas de una proteína disfuncional o diana deseada descrita en la presente memoria.

En la presente memoria se proporciona un método para modificar genéticamente una célula madre hematopoyética (CMH) *in vitro* en una célula, comprendiendo el método administrar a la célula la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores. En alguna realización, el método comprende poner en contacto la célula con una NPL que comprende un conjugado de lípido-anticuerpo, un lípido catiónico ionizable y uno o más ácidos nucleicos dispuestos en la misma. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos dispuestos en la misma comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico.

En algunas realizaciones, las composiciones de NPL descritas en la presente memoria se dirigen a marcadores específicos de la superficie celular de las células madre hematopoyéticas (CMH). En alguna realización, la NPL comprende un grupo de direccionamiento a CMH (p. ej., un anticuerpo o conjugado de lípido-anticuerpo) que se dirige específicamente a un antígeno de superficie de CMH. En algunas realizaciones, la NPL comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se dirige

a CD105 y/o CD117. En algunas realizaciones, la NPL comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se dirige a CD117. En algunas realizaciones, la NPL comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se dirige a CD105.

En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos dispuestos en la misma codifican un sistema de edición génica dirigido a la secuencia de nucleótidos de una o más dianas descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos dispuestos en la misma comprenden un ARNm que codifica un sistema de edición génica dirigido a la secuencia de nucleótidos de una o más dianas descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, la diana es un locus (o loci) dentro de la célula asociado con una disfunción proteica en la célula y/o una enfermedad en un sujeto. En algunas realizaciones, la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores dirigida a un locus (o loci) dentro de la célula produce un aumento de la HbF. En algunas realizaciones, el uso de la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores para aumentar la HbF en una célula puede ser para tratar la enfermedad de células falciformes o la beta-talasemia en un sujeto.

En algunas realizaciones, el método comprende tratar las CMH con NPL descritas en la presente memoria, en donde la concentración de ARN permanece constante. En algunas realizaciones, la concentración de ARN suministrada por las NPL está entre aproximadamente 0.1 y 10 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de ARN suministrada por las NPL está entre aproximadamente 0.5 y 8 µg/ml, 0.6 y 7 µg/ml, 0.7 y 6 µg/ml, 0.8 y 5 µg/ml, 0.9 y 4 µg/ml o 1 y 3 µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de ARN suministrada por las NPL es 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más µg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de ARN suministrada por las NPL es de 1 µg/ml.

En algunas realizaciones, el método comprende incubar las CMH con las NPL descritas en la presente memoria, en donde las CMH se incuban con las NPL durante al menos 4 horas. En algunas realizaciones, las CMH se incuban con las NPL durante entre aproximadamente 4 y 96 horas. En algunas realizaciones, las CMH se incuban con las NPL durante entre aproximadamente 6 y 90 horas, 8 y 80 horas, 10 y 70 horas, 12 y 60 horas, 18 y 50 horas, 24 y 48 horas o 30 y 36 horas.

(c) Edición génica *in vivo* en células madre hematopoyéticas

En determinadas realizaciones, las composiciones de NPL descritas en la presente memoria se pueden usar para administrar agentes terapéuticos o profilácticos a un sujeto. Por ejemplo, un ARNm incluido en una composición de NPL puede codificar un polipéptido y producir el polipéptido terapéutico o profiláctico tras el contacto y/o la entrada (p. ej., transfección) en una célula. En determinadas realizaciones, un ARNm incluido en una composición de NPL de la invención puede codificar un polipéptido que puede mejorar la salud de un sujeto al dirigirse a la secuencia de nucleótidos de una o más dianas de las enfermedades descritas en la presente memoria.

En la presente memoria se proporciona un método para modificar genéticamente una célula madre hematopoyética (CMH) *in vivo* en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores. En alguna realización, el método comprende administrar al sujeto una NPL que comprende un conjugado de lípido-anticuerpo, un lípido catiónico ionizable y uno o

más ácidos nucleicos dispuestos en la misma. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos dispuestos en la misma comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico.

En algunos aspectos, el método de modificación genética de una célula madre hematopoyética (CMH) *in vivo* en un sujeto comprende además administrar al sujeto un agente de movilización de CMH. En algunas realizaciones, el método comprende administrar la NPL al sujeto por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes, durante o antes y durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes de la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes y durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor y G-CSF.

También se proporciona en el presente documento un método para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto la NPL de una cualquiera de las realizaciones anteriores. En alguna realización, el método comprende administrar al sujeto una NPL que comprende un conjugado de lípido-anticuerpo, un lípido catiónico ionizable y uno o más ácidos nucleicos dispuestos en la misma. En algunas realizaciones, el o los ácidos nucleicos dispuestos en la misma comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico.

En algunos aspectos, el método para tratar una enfermedad comprende además administrar al sujeto un agente de movilización de CMH. En algunas realizaciones, el método comprende administrar la NPL al sujeto por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes, durante o antes y durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes de la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH se administra al sujeto antes y durante la administración de la NPL. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente de movilización de CMH comprende plerixafor y G-CSF.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos para modular la función celular de una célula madre hematopoyética (CMH) diana de un sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (NPL). En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la NPL comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] – [conector opcional] – [anticuerpo]. En algunas realizaciones, la NPL comprende un

esterol u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la NPL comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido con polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la NPL comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modular la función celular de las CMH. En algunas realizaciones, un aspecto de la descripción se refiere a una NPL o una composición farmacéutica que la contiene, como se describe en la presente memoria, para su uso en un método para modular la función celular de una célula CMH diana de un sujeto. Dicho método puede ser para el tratamiento de una enfermedad como se describe más adelante. En algunas realizaciones, un método como se describe en la presente memoria puede comprender poner en contacto *in vitro* o *ex vivo* la célula CMH de un sujeto con una nanopartícula lipídica (NPL).

En algunas realizaciones, la NPL proporcionada en la presente memoria se utiliza en el método de edición de una CMH *in vivo*, en donde la NPL comprende lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, la NPL proporcionada en la presente memoria se utiliza en el método de edición de una CMH *in vivo*, en donde la NPL comprende lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3,

donde el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7 y un dominio VL que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se utiliza para editar células CMH *in vivo*. En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se suministra a un sujeto con enfermedad para edición génica *in vivo* y tratamiento de la enfermedad. En algunas realizaciones, la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se administra a un sujeto con enfermedad de células falciformes o beta-talasemia para edición génica *in vivo* y tratamiento del sujeto. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes en un sujeto es seguro y eficaz. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la beta-talasemia en un sujeto es seguro y eficaz.

Las composiciones terapéuticas y/o profilácticas descritas en la presente memoria se pueden administrar a un sujeto usando cualquier cantidad razonable y cualquier vía de administración eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar u obtener imágenes de una enfermedad y/o cualquier otro fin. La cantidad específica administrada a un sujeto determinado puede variar en función de la especie, la edad y el estado general del sujeto, el objeto de la administración, la composición particular, el modo de administración y similares. Las composiciones de acuerdo con la presente descripción se pueden formular en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. Se entenderá, sin

embargo, que el uso diario total de una composición de la presente descripción será decidido por un médico tratante dentro del alcance del buen criterio médico.

Una composición de NPL que incluye uno o más ARNm puede administrarse por diversas vías, por ejemplo, por vía oral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraarterial, por vía intramedular, por vía intratecal, por vía subcutánea, por vía intraventricular, por vía trans o intradérmica, por vía intradérmica, por vía rectal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica, por vía mucosa, por vía nasal, por vía intratumoral. En determinadas realizaciones, una composición de NPL se puede administrar por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intratumoral o por vía subcutánea. Sin embargo, la presente descripción abarca la administración de composiciones de NPL de la invención por cualquier vía adecuada teniendo en cuenta los probables avances en la ciencia de la administración de fármacos. En general, la vía de administración más adecuada dependerá de diversos factores, incluida la naturaleza de la composición de NPL que incluye uno o más ARNm (p. ej., su estabilidad en diversos entornos corporales tales como el torrente sanguíneo y el tubo digestivo), el estado del paciente (p. ej., si el paciente es capaz de tolerar determinadas vías de administración), etc.

Las composiciones de NPL que incluyen uno o más ARNm se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de imágenes adicionales. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para su administración juntos, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, se pueden administrar en combinación una o más composiciones de NPL que incluyen uno o más ARNm diferentes. Las composiciones se pueden administrar simultáneamente con, antes o después de, una o más terapias o procedimientos médicos deseados adicionales. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. En algunas realizaciones, la presente descripción abarca el suministro de composiciones de la invención, o composiciones de captura de imágenes, de diagnóstico o profilácticas de los mismos, en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del organismo.

Se apreciará además que los agentes activos terapéuticamente, profilácticamente, de diagnóstico o de captura de imágenes 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 en niveles que no superen los niveles en los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación pueden ser más bajos que los utilizados individualmente.

La combinación particular de terapias (medicamentos o procedimientos) que se va a emplear en un régimen combinado tendrá en cuenta la compatibilidad de los medicamentos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se debe lograr. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para la misma enfermedad (por ejemplo, una composición útil

para tratar el cáncer puede administrarse simultáneamente con un agente quimioterapéutico) o pueden lograr efectos diferentes (p. ej., control de cualquier efecto adverso).

VIII. MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS CON CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

La presente descripción proporciona métodos para tratar una enfermedad en un sujeto mediante la administración de una carga útil que codifica uno o más ácidos nucleicos (p. ej., un sistema de edición génica, p. ej., una nucleasa dirigida y, opcionalmente, un ARN guía) a CMH *in vivo* en un sujeto, tratando de este modo la enfermedad. En algunas realizaciones, el suministro de una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican una nucleasa dirigida a CMH *in vivo* en un sujeto puede dar lugar a la modificación de una diana biológica. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen el suministro de una carga útil que comprende además un ARN guía. En algunas realizaciones, el suministro de una carga útil puede dar lugar al silenciamiento de una diana biológica. La diana biológica puede estar asociada con una enfermedad que se va a tratar mediante los métodos descritos en la presente memoria. Cualquier descripción en la presente memoria de un método para tratar una enfermedad debe interpretarse también como una descripción de una NPL o una composición farmacéutica que comprende dicho NPL para su uso en dichos métodos.

En algunos aspectos, se proporcionan métodos de tratamiento, alivio o prevención de un síntoma de una enfermedad en un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (NPL) proporcionada en la presente memoria. Las composiciones de NPL de la invención pueden ser útiles para tratar una enfermedad caracterizada por actividad proteica o polipeptídica ausente o aberrante en CMH o células diferenciadas de CMH (p. ej., monocitos, neutrófilos, plaquetas, glóbulos rojos y células inmunitarias, tales como linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos B, linfocitos T y similares). Tras el suministro de uno o más ácidos nucleicos que codifican un sistema de edición génica a las CMH del sujeto, la expresión del sistema de edición génica puede inducir una modificación genética en las CMH, de modo que se reduce o elimina un problema causado por la ausencia de actividad o actividad aberrante causada por el polipéptido. La modificación genética puede modificar el gen que codifica la proteína ausente o aberrante, por ejemplo, para corregir una mutación en una secuencia codificante de proteínas del gen o para modificar una secuencia reguladora asociada con el gen para aumentar la expresión de la proteína funcional nativa. En algunos casos, la modificación genética puede reemplazar un gen que codifica la proteína ausente o aberrante, por ejemplo, insertando un transgén que codifica un gen que codifica la proteína nativa. Cualquier sistema de edición génica conocido en la técnica o descrito en la presente memoria puede usarse en los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria.

Las enfermedades caracterizadas por una actividad proteica o polipeptídica disfuncional o aberrante para las que se puede administrar una composición de la invención incluyen, pero sin limitación, una hemopatía, hemoglobinopatía, una inmunodeficiencia primaria (IDP), una citopenia congénita, una hemofilia, una trombofilia, una metabolopatía congénita o una neuropatía. En algunas realizaciones, la hemopatía es una α -hemoglobinopatía, una β -hemoglobinopatía (p. ej., β -talasemia) o enfermedad de células falciformes. En algunas realizaciones, la IDP puede comprender, por ejemplo, una

inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad granulomatosa crónica, inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X (IPEX), un síndrome de hiperIgM o agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. En algunas realizaciones, la IDCG es Artemis-IDCG (ART-IDCG), IDCG con gen activador de recombinación (RAG-IDCG), IDCG ligada al cromosoma X (X-IDCG), IDCG con deficiencia de adenosina desaminasa, IDCG con deficiencia del receptor de interleucina 7 o JAK3 IDCG. En algunas realizaciones, la citopenia congénita es anemia de Fanconia, síndrome de Shwachman-Diamond, anemia de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, trombocitopenia amegacariocítica congénita o disgenesia reticular. En algunas realizaciones, la hemofilia es la hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C. En algunas realizaciones, la trombofilia es trombocitopenia amegacariocítica o deficiencia de factor X. En algunas realizaciones, la metabopatía congénita es la fenilcetonuria, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), una enfermedad de almacenamiento lisosómico, un trastorno de almacenamiento del glucógeno, un trastorno peroxisómico, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurler, síndrome de Hunter, enfermedad de Wolman o deficiencia de piruvato cinasa. En algunas realizaciones, el trastorno peroxisómico es la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X. En algunas realizaciones, la enfermedad por almacenamiento lisosómico es la leucodistrofia metacromática, mucopolisacaridosis I o mucopolisacaridosis II. En algunas realizaciones, la neuropatía es la ataxia de Friedrich. En algunas realizaciones, la enfermedad vírica es el VIH/SIDA.

Múltiples enfermedades pueden caracterizarse por la ausencia (o disminución sustancial, de modo que no se produce una función proteica adecuada) de la actividad proteica. Estas proteínas pueden no estar presentes o pueden ser esencialmente no funcionales. En algunas realizaciones, la carga útil suministrada por la nanopartícula lipídica dirigida a las CMH comprende una nucleasa dirigida que da lugar al tratamiento de enfermedades humanas. Por ejemplo, las β -hemoglobinopatías, tales como la anemia de células falciformes y la β -talasemia, son causadas por mutaciones en el gen de β -globina (*HBB*) que da lugar a una hemoglobina HbA en adultos más baja de lo normal (un heterotetrámero formado por dos subunidades de α -globina y dos de β -globina) y/o la producción de hemoglobina anómala (p. ej., HbS, un heterotetrámero de dos subunidades de α -globina y dos de β -globina aberrantes). Una forma alternativa de hemoglobina es la hemoglobina fetal (HbF), un heterotetrámero compuesto por dos subunidades de α -globina y dos de γ -globina. A lo largo de la vida posnatal, la expresión de los genes *HBG* (*HBG1* y *HBG2*), que codifican la γ -globina, es suprimida por los factores silenciadores 11A de linfoma de linfocitos B (*BCL11A*), factor 1 de tipo Krüppel (*KLF1*) y *ZBTB7A*. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, las modificaciones genéticas que alteran o silencian el gen *BCL11A* en CMH puede dar lugar al desarrollo de eritrocitos que expresan los genes *HBG1* y/o *HBG2* que codifican γ -globina y producen HbF, restaurando de este modo la función de la hemoglobina en células que de otro modo podrían haber expresado β -globina aberrante y/o cantidades insuficientes de β -globina normal. Por ejemplo, la alteración de una o más de las secuencias potenciadoras intrónicas específicas de eritroides de *BCL11A* presentes en el intrón-2 del gen *BCL11A* (denominado en la presente memoria "el potenciador eritroide de *BCL11A*") puede dar lugar a una disminución de la expresión y actividad de la proteína *BCL11A* y, por tanto, un aumento de la expresión de

HbF en los glóbulos rojos. La expresión "potenciador eritroide de *BCL11A*" se refiere a un polinucleótido que comprende una o más de las secuencias potenciadoras de eritroides de *BCL11A* en el intrón-2, la región intrónica entre el exón 2 y el exón 3 del gen *BCL11A*. Las secuencias potenciadoras de eritroides de *BCL11A* incluyen, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos a distancias de aproximadamente +55 kilobases (kb) a aproximadamente +62 kb (p. ej., a aproximadamente +55 kb, aproximadamente +58 kb y/o aproximadamente +62 kb) nucleótidos corriente abajo (en la dirección 3') del sitio de inicio de la transcripción *BCL11A*. Se describen con más detalle secuencias potenciadoras de eritroides de *BCL11A*, por ejemplo, en Bauer *et al.* (2014. "An erythroid enhancer of *BCL11A* subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level". *Science* 342.6155: 253-257), Lettre y Bauer (2014. "Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies". *The Lancet* 387.10037: 2554-2564) y Antoniani *et al.* (2014. "Concise review: epigenetic regulation of hematopoiesis: biological insights and therapeutic applications". *Stem cells translational medicine* 6.12: 2106-2114).

El potenciador eritroide de *BCL11A* incluye secuencias de polinucleótidos en el intrón-2 del gen de *BCL11A*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo (en dirección 3') del punto de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, un polinucleótido de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o un polinucleótido de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En algunas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +58 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb,

600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, el potenciador eritroide de *BCL11A* comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos.

En algunas realizaciones, el suministro de nanopartículas lipídicas dirigidas a las CMH da lugar a una edición dirigida del potenciador eritroide de *BCL11A* (p. ej., edición de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*, p. ej., supresión, inserción o sustitución de uno o más polinucleótidos entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*, p. ej., supresión, inserción o sustitución de uno o más polinucleótidos entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, un polinucleótido de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o un polinucleótido de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o cualquier combinación de los mismos) para el tratamiento de β -hemoglobinopatías. En determinadas realizaciones, el suministro de nanopartículas lipídicas dirigidas a las CMH da lugar a la edición dirigida de una o más secuencias de nucleótidos de potenciadores eritroides de *BCL11A* en el intrón-2 del gen *BCL11A* (p. ej., supresión, inserción o sustitución de uno o más polinucleótidos entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*, p. ej., supresión, inserción o sustitución de uno o más polinucleótidos entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, un polinucleótido de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o un polinucleótido de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos), lo que da lugar a una disminución de la expresión del gen *BCL11A* (p. ej., una reducción de ARNm de *BCL11A* y/o proteína) y/o una reducción de la hemoglobina fetal.

La presente descripción proporciona un método para tratar dichas enfermedades en un sujeto mediante la administración de una composición de NPL que comprende un lípido catiónico ionizable, un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] – [conector opcional] – [grupo de direccionamiento a CMH] y uno o más ácidos nucleicos que codifican un sistema de edición génica (p. ej., un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico y, opcionalmente, un ARNg o un ARNgec), en donde el sistema de edición génica está configurado para dirigirse a una diana y modificar una secuencia de nucleótidos diana asociada con la enfermedad particular que se va a tratar.

Las composiciones terapéuticas y/o profilácticas descritas en la presente memoria se pueden administrar a un sujeto usando cualquier cantidad razonable y cualquier vía de administración eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar u obtener imágenes de una enfermedad y/o cualquier otro fin. La cantidad específica administrada a un sujeto determinado puede variar en función de la especie, la edad y el estado general del sujeto, el objeto de la administración, la composición particular, el modo de administración y similares. Las composiciones de acuerdo con la presente descripción se pueden formular en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. Se entenderá, sin

embargo, que el uso diario total de una composición de la presente descripción será decidido por un médico tratante dentro del alcance del buen criterio médico.

Una composición de NPL que incluye uno o más ácidos nucleicos puede administrarse por diversas vías, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraósea (en la médula ósea), por vía oral, por vía intramuscular, por vía intraarterial, por vía trans o intradérmica, por vía intradérmica, por vía rectal, por vía intraperitoneal o por vía mucosa. En algunas realizaciones, una composición de NPL se puede administrar por vía intravenosa, intraósea o intraarterial. En determinadas realizaciones, una composición de NPL se puede administrar por vía intravenosa o intraarterial durante o después de la administración de un agente de movilización de CMH (p. ej., plerixafor y/o G-CSF). Sin embargo, la presente descripción abarca la administración de composiciones de NPL de la invención por cualquier vía adecuada teniendo en cuenta los probables avances en la ciencia de la administración de fármacos. En general, la vía de administración más adecuada dependerá de diversos factores, incluida la naturaleza de la composición de NPL, la enfermedad que se va a tratar, el estado del paciente (p. ej., si el paciente es capaz de tolerar determinadas vías de administración), etc.

Las composiciones de NPL que incluyen uno o más ARNm se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de imágenes adicionales. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para su administración juntos, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, se pueden administrar en combinación una o más composiciones de NPL que incluyen uno o más ARNm diferentes. Las composiciones se pueden administrar simultáneamente con, antes o después de, una o más terapias o procedimientos médicos deseados adicionales. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. En algunas realizaciones, la presente descripción abarca el suministro de composiciones de la invención, o composiciones de captura de imágenes, de diagnóstico o profilácticas de los mismos, en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del organismo.

Se apreciará además que los agentes activos terapéuticamente, profilácticamente, de diagnóstico o de captura de imágenes 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 en niveles que no superen los niveles en los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación pueden ser más bajos que los utilizados individualmente.

La combinación particular de terapias (medicamentos o procedimientos) que se va a emplear en un régimen combinado tendrá en cuenta la compatibilidad de los medicamentos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se debe lograr. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para la misma enfermedad o pueden lograr efectos diferentes (p. ej., control de cualquier efecto adverso).

En algún aspecto, se proporcionan métodos de tratamiento, alivio o prevención de un síntoma de una enfermedad en un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una nanopartícula lipídica (NPL) para suministrar un ácido nucleico a una célula madre hematopoyética (CMH) *in vivo* en el sujeto. En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido catiónico ionizable. En algunas realizaciones, la NPL comprende un conjugado que comprende la siguiente estructura: [Lípido] – [conector opcional] – [grupo de direccionamiento a CMH]. En determinadas realizaciones, la NPL comprende un conjugado de lípido-anticuerpo que comprende la siguiente estructura: [Lípido] – [conector opcional] – [anticuerpo], en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 es Ab1. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD117 es Ab2. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a CD105 es Ab3. En algunas realizaciones, la NPL comprende un esteroide u otro lípido estructural. En algunas realizaciones, la NPL comprende un fosfolípido neutro. En algunas realizaciones, la NPL comprende un lípido con polietilenglicol (PEG) libre. En algunas realizaciones, la NPL comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican un sistema de edición génica. En determinadas realizaciones, el o los ácidos nucleicos comprenden un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico y, opcionalmente, un ARNg o un ARNgec. En una realización, el o los ácidos nucleicos comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARN guía.

En algunas realizaciones, el sistema de edición génica induce una modificación genética en uno o más genes dentro del CMH, tratando de este modo la enfermedad. En algunas realizaciones, un aspecto de la descripción se refiere a una NPL o una composición farmacéutica que la contiene, como se describe en la presente memoria, para su uso en un método de tratamiento, alivio o prevención de un síntoma de una enfermedad en un sujeto que lo necesite. Una enfermedad puede ser como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método como se describe en la presente memoria puede comprender poner en contacto una CMH *in vivo* en un sujeto con una NPL descrita en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la NPL proporciona al menos uno de los siguientes beneficios:

- (i) mayor especificidad de suministro del ácido nucleico en la CMH en comparación con una NPL de referencia;
- (ii) mayor tasa de transfección en comparación con una NPL de referencia;
- (iii) la NPL se puede administrar en una dosis más baja en comparación con una NPL de referencia para alcanzar la misma eficacia de tratamiento;
- (iv) un nivel bajo de ARNm accesible al colorante (<15 %) y altas eficiencias de encapsulación de ARN, en donde se recuperó al menos el 80 % del ARNm en la formulación final con respecto al ARN total usado en la preparación del lote de NPL; y
- (v) reducción de la aparición y/o la gravedad de un síntoma de la enfermedad en el sujeto.

Las NPL proporcionadas en la presente memoria son útiles para el tratamiento de cualquier enfermedad asociada a células madre hematopoyéticas (CMH) o para la que la terapia de reemplazo de CMH puede servir como un método de tratamiento viable. En algunas realizaciones, la enfermedad es una hemopatía. En determinadas realizaciones, la enfermedad es una hemoglobinopatía, una

inmunodeficiencia primaria (IDP), una citopenia congénita, una hemofilia, una trombofilia, una metabolopatía congénita o una neuropatía.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una α -hemoglobinopatía o una β -hemoglobinopatía. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una α -hemoglobinopatía. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una β -hemoglobinopatía. En determinadas realizaciones, la β -hemoglobinopatía es una β -talasemia. En determinadas realizaciones, la β -hemoglobinopatía es la enfermedad de células falciformes. En algunas realizaciones, la administración de las NPL da lugar a uno o más de: (v) inserción de un transgén de HBB, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; b) aumento de la expresión de β -globina en el sujeto; b) una mayor cantidad de hemoglobina $\alpha_2\beta_2$ de los adultos (HbA) en el sujeto; c) inserción de un transgén de HBG1, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; d) inserción de un transgén de HBG2, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; e) aumento de la expresión de γ -globina en el sujeto; f) una mayor cantidad de hemoglobina fetal (HbF) $\alpha_2\gamma_2$ en el sujeto; g) alteración del gen de HBA1, el gen de HBA2, o una combinación de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; h) disminución de la expresión de α -globina en el sujeto; e i) una menor cantidad de heterotetrámeros de α -globina α_4 en el sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende la administración de una NPL descrita en la presente memoria al sujeto, en donde la NPL comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican un sistema de edición génica configurado para inducir una modificación genética en una secuencia de nucleótidos diana en las CMH. En algunas realizaciones, la NPL comprende un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg que comprende una secuencia de nucleótidos que confiere unión a una secuencia de nucleótidos diana (p. ej., un ARNg que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % de identidad con al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos diana). En determinadas realizaciones en donde la enfermedad es β -talasemia o enfermedad de células falciformes, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos y está situada dentro de la región codificante del gen, la región intrónica asociada al gen, la región exónica asociada al gen, la región 5' no traducible asociada a un gen o la región 3' no traducible asociada al gen, en donde el gen es el gen *HBB*, el gen *HBG1*, el gen *HBG2*, el gen *HBA1*, el gen *HBA2*, el gen *HBD*, el gen *BCL11A*, el gen *BACH2*, el gen *KLF1* o el gen *LRF*. En determinadas realizaciones en donde la enfermedad es β -talasemia o enfermedad de células falciformes, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos y está situada dentro de la región reguladora del gen, en donde el gen es el gen *HBB*, el gen *HBG1*, el gen *HBG2*, el gen *HBA1*, el gen *HBA2*, el gen *HBD*, el gen *BCL11A*, el gen *BACH2*, el gen *KLF1* o el gen *LRF*. En determinadas realizaciones en donde la enfermedad es β -talasemia o enfermedad de células falciformes, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos y está situada dentro de la región potenciadora del gen o dentro de la región represora del gen, en donde el gen es el gen *HBB*,

el gen *HBG1*, el gen *HBG2*, el gen *HBA1*, el gen *HBA2*, el gen *HBD*, el gen *BCL11A*, el gen *BACH2*, el gen *KLF1* o el gen *LRF*. En determinadas realizaciones en donde la enfermedad es β -talasemia o enfermedad de células falciformes, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos dentro del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones en donde la enfermedad es β -talasemia o enfermedad de células falciformes, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos y está situada dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos y está situada dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos y está situada dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos consecutivos y está situada dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones en donde la enfermedad es β -talasemia o enfermedad de células falciformes, la secuencia de nucleótidos diana comprende al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o los 20 nucleótidos consecutivos situados dentro de la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62), o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar la enfermedad de células falciformes.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una enfermedad, donde la enfermedad es una IDP. En algunas realizaciones, la IDP es una inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad granulomatosa crónica, inmunodesregulación, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X (IPEX), un síndrome de hiperIgM o agammaglobulinemia ligada al cromosoma X. En algunas realizaciones, la IDP es una IDCG. En algunas realizaciones, la IDCG es Artemis-IDCG (ART-IDCG), IDCG con gen activador de recombinación (RAG-IDCG), IDCG ligada al cromosoma X (X-IDCG), IDCG con deficiencia de adenosina desaminasa, IDCG con deficiencia del receptor de interleucina 7 o JAK3 IDCG. En algunas realizaciones, la IDCG es ART-IDCG, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *DCLRE1C*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de la

proteína Artemis funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IDCG es RAG-IDCG, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *RAG1* o un transgén *RAG2*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de proteína RAG1 funcional o proteína RAG2 en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IDCG es X-IDCG, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *IL2RG*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de la proteína IL2RG funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IDP es el síndrome de Wiskott-Aldrich. En algunas realizaciones, la IDP es el síndrome de Wiskott-Aldrich, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *WAS*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de la proteína WASP funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IDP es una enfermedad granulomatosa crónica. En algunas realizaciones, la IDP es una enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X. En algunas realizaciones, la IDP es una enfermedad granulomatosa crónica, y en donde la administración de la NPL da lugar a uno o más de (i) inserción de un transgén *CYBA*, un transgén *CYBB*, un transgén *NCF1*, transgén *FNC2* o un transgén *NCF4*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) introducción de una mutación puntual 676C>T en el gen *CYBB* de al menos una CMH en el sujeto; (iii) aumento de la expresión de la proteína CYBA funcional, proteína CYBB, proteína NCF1, proteína NCF2 o proteína NCF4 en el sujeto; y (v) un aumento de la cantidad de complejo enzimático de NADPH oxidasa funcional en el sujeto. En algunas realizaciones, la IDP es IPEX. En algunas realizaciones, la IDP es IPEX, y en donde la administración de la NPL da lugar a la inserción de un transgén *FOXP3*, o un fragmento del mismo, en al menos una CMH del sujeto; aumento de la expresión de la proteína FOXP3 funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la IDP es el síndrome de hiperIgM. En algunas realizaciones, la IDP es un síndrome de hiperIgM, y en donde la administración de NPL da lugar a uno o más de (i) inserción de un transgén *AICDA*, un transgén *UNG*, transgén *CD40* o un transgén *CD40LG*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) aumento de la expresión de la proteína AICDA funcional, proteína UNG, proteína CD40 o proteína CD40LG en el sujeto; (iii) una reducción de la cantidad de anticuerpos IgM en el sujeto; y (iv) un aumento de la cantidad de anticuerpos IgG, IgA o IgE en el sujeto.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una enfermedad, donde la enfermedad es una citopenia congénita. En algunas realizaciones, la citopenia congénita es anemia de Fanconia, síndrome de Shwachman-Diamond, anemia de Blackfan-Diamond, disqueratosis congénita, trombocitopenia amegacariocítica congénita o disgenesia reticular. En algunas realizaciones, la citopenia congénita es anemia de Fanconia, y en donde la administración de NPL da lugar a la inserción de uno o más genes *FANC*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH en el sujeto; aumento de la expresión de una o más proteínas FANC funcionales en el sujeto; o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la citopenia congénita es anemia de Fanconia, y en donde la administración de la NPL da inserción de un transgén *FANCA*, o un fragmento del mismo, en al menos una

CMH del sujeto; aumento de la expresión de FANCA funcional en el sujeto; o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una enfermedad, donde la enfermedad es una hemofilia. En algunas realizaciones, la hemofilia es la hemofilia A, hemofilia B o hemofilia C. En algunas realizaciones, la enfermedad es una hemofilia, y en donde la administración de NPL da lugar a (i) la inserción de un transgén *F8*, un transgén *F9* o un *F11*, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) aumento de la expresión de la proteína del factor VIII funcional, proteína del factor IX o proteína del factor XI en el sujeto; y (iii) aumento de la coagulación sanguínea en el sujeto.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una enfermedad, donde la enfermedad es una trombofilia. En algunas realizaciones, la trombofilia es trombocitopenia amegacariocítica o deficiencia de factor X. En algunas realizaciones, la enfermedad es una trombofilia, y en donde la administración de NPL da lugar a uno o más de (i) la inserción de un transgén *F5*, un transgén *F2*, un transgén que codifica antitrombina III, un transgén que codifica la proteína C o un transgén que codifica la proteína S, o un fragmento de los mismos, en al menos una CMH del sujeto; (ii) aumento de la expresión de la proteína del factor V funcional, proteína del factor II, proteína antitrombina III, proteína C o proteína S en el sujeto; y (iii) reducción de la coagulación sanguínea en el sujeto.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una enfermedad, donde la enfermedad es una metabolopatía congénita. En algunas realizaciones, la metabolopatía congénita es la fenilcetonuria, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), una enfermedad de almacenamiento lisosómico, un trastorno de almacenamiento del glucógeno, un trastorno peroxisómico, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, síndrome de Hurler, síndrome de Hunter, enfermedad de Wolman o deficiencia de piruvato cinasa. En algunas realizaciones, el trastorno peroxisómico es la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X. En algunas realizaciones, la enfermedad por almacenamiento lisosómico es la leucodistrofia metacromática, mucopolisacaridosis I o mucopolisacaridosis II.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una enfermedad, donde la enfermedad es una neuropatía. En algunas realizaciones, la neuropatía es la ataxia de Friedrich.

En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una enfermedad, donde la enfermedad es una enfermedad vírica. En algunas realizaciones, la enfermedad vírica es el VIH/SIDA. En algunas realizaciones, la enfermedad vírica es VIH/SIDA, y en donde la administración de la NPL previene la infección por VIH, progresión del VIH/SIDA, o una combinación de los mismos.

Las NPL descritas en la presente descripción son adecuados para los métodos descritos.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria comprenden administrar una NPL que comprende lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de

CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 y un dominio VL que comprende las secuencias CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL tiene al menos un 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 99.5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la

5 SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia

10 polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre

15 aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del

20 nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria comprenden administrar una NPL que comprende

25 lípido 15, un grupo de direccionamiento a CMH que se une a un antígeno de superficie de CMH que comprende un dominio VH que comprende las secuencias de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7 y un dominio VL que comprende las secuencias de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una carga útil que comprende uno o más ácidos nucleicos

30 que codifican componentes de un sistema de edición génica dirigido a un locus (o loci) en donde la edición génica da lugar a un aumento de HbF para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro del potenciador eritroide de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica en el intrón-2 del gen *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de

35 nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *BCL11A*. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +54 kb y aproximadamente +56 kb, una secuencia

polinucleotídica de entre aproximadamente +57 kb y aproximadamente +59 kb o una secuencia polinucleotídica de entre aproximadamente +62 kb y aproximadamente +63 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana está dentro de una secuencia polinucleotídica a una distancia de aproximadamente 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.0 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb o 1.5 kb de la posición del nucleótido a +55 kb, +58 kb o +62 kb cadena abajo del TSS de *BCL11A*, o una combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos diana comprende la secuencia polinucleotídica de GTGATAAAAGCAACTGTTAG (SEQ ID NO: 62) o una variante de la misma que comprende hasta 10 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) sustituciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, el suministro de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria se utiliza para editar células CMH *in vivo* y tratar la enfermedad en un sujeto, en donde la enfermedad es enfermedad de células falciformes o beta-talasemia. En algunas realizaciones, la edición genética del potenciador eritroide de *BCL11A* mediante la administración de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria da lugar al tratamiento de las enfermedades de células falciformes en un sujeto. En algunos aspectos, el método para tratar una enfermedad comprende además administrar al sujeto un agente de movilización de CMH, en donde el agente de movilización de CMH comprende plerixafor y G-CSF. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes en un sujeto es seguro y eficaz. En algunas realizaciones, el uso de la NPL ilustrativa proporcionada en la presente memoria para el tratamiento de la beta-talasemia en un sujeto es seguro y eficaz.

IX. KITS PARA USO EN APLICACIONES MÉDICAS

Otro aspecto de la invención proporciona un kit para tratar una enfermedad. El kit puede comprender uno o más de: un lípido catiónico ionizable, un grupo de direccionamiento a CMH-lípido o un conjugado del mismo (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo, p. ej., en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117), una composición de nanopartículas lipídicas que comprende un lípido catiónico ionizable y/o un grupo de direccionamiento a CMH-lípido o un conjugado del mismo (p. ej., un conjugado de lípido-anticuerpo, p. ej., en donde el anticuerpo se une a CD105 y/o CD117) con o sin una carga útil encapsulada (p. ej., un ácido nucleico, p. ej., un ARNm que codifica una nucleasa dirigida, un editor de bases químicas, un editor de calidad o un editor epigenómico y, opcionalmente, un ARNg o un ARNgec) e instrucciones para tratar una enfermedad médica descrita en la presente memoria (p. ej., enfermedad de células falciformes).

EJEMPLOS

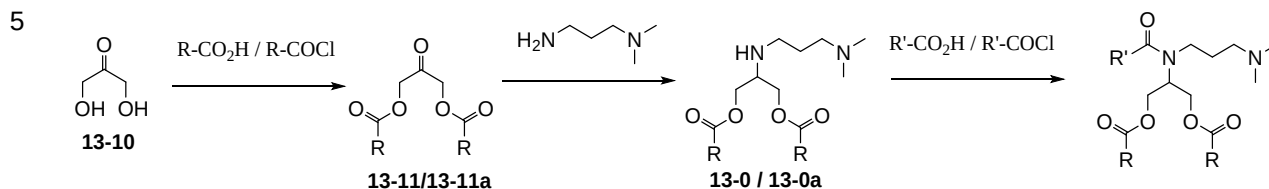
La materia objeto descrita en la presente se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan como ilustración de la invención y no a modo de limitación.

Ejemplo 1: Preparación de lípidos catiónicos ionizables

Este ejemplo describe la síntesis de diversos lípidos catiónicos

Esquema general para la síntesis de los lípidos 1 a 25

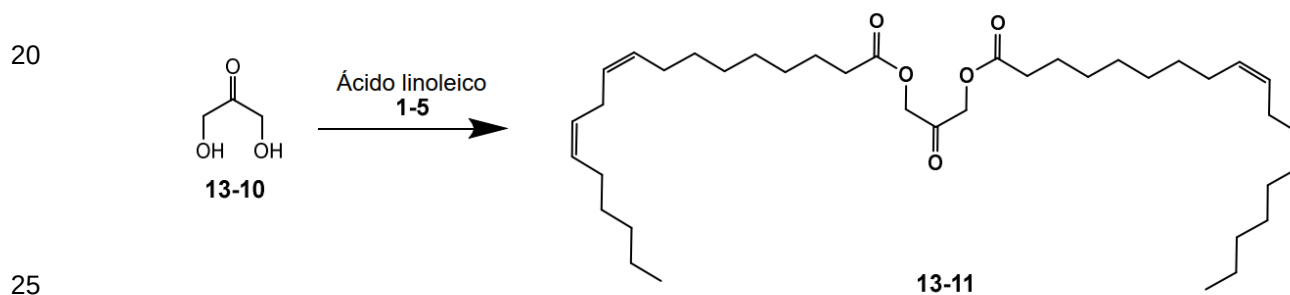
El esquema general para la síntesis de los lípidos 1 a 25 se proporciona en el esquema 1 a continuación. Los R y R' correspondientes para cada lípido se proporcionan en las **tablas 1 a 3** a continuación.



Esquema 1. Síntesis de los lípidos 1 a 16 mediante acilación y aminación reductora

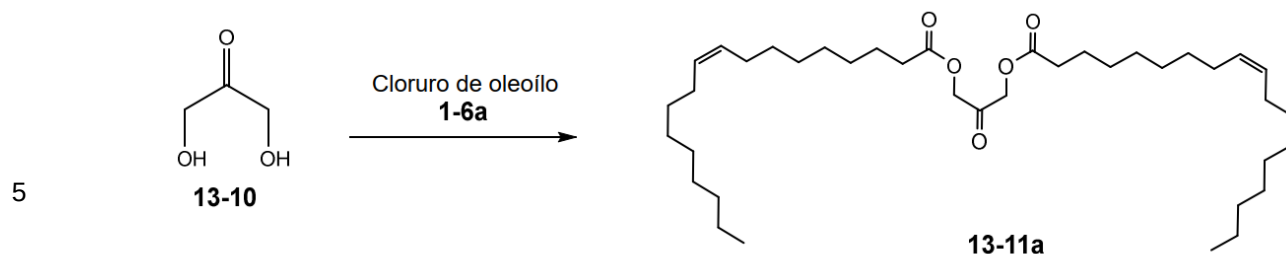
Síntesis de los intermedios 13-11 y 13-11a

El intermedio 13-11 (esquema 2) se sintetizó mediante acilación de dihidroxiacetona (13-10) con ácido linoleico. Se hizo reaccionar dihidroxiacetona (22 mmol, 2 g, 1 eq.) con ácido linoleico 1-5 (55 mmol, 15.4 g, 2.5 eq.) usando activación con EDCI (55 mmol, 10.5 g, 2.5 eq.) en 50 ml de DCM, en presencia de DIPEA (55 mmol, 9.6 ml, 2.5 eq.), DMAP (4.4 mmol, 540 mg, 0.2 eq.) a temperatura ambiente produciendo 11.1 g (79 %) de producto bruto. El producto purificado se obtuvo mediante cromatografía en columna y se caracterizó mediante espectroscopia de RMN de protones (**FIG. 2**).



Esquema 2. Síntesis del intermedio 13-11 utilizando O-acilación de ácido linoleico mediada por EDCI con dihidroxiacetona

Los intermedios 13-11a (esquema 3) se sintetizaron mediante acilación de dihidroxiacetona (13-10) con cloruro de oleoílo. Se hizo reaccionar dihidroxiacetona (44.4 mmol, 4 g, 1 eq.) con cloruro de oleoílo 1-6a (111 mmol, 36.7 ml, 2.5 eq.) en presencia de piridina (133.3 mmol, 11 ml, 3 eq.), DMAP (13.3 mmol, 1.63 g, 0.3 eq.) en 80 ml de DCM, a temperatura ambiente produciendo 14.9 g (54 %) de producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna y se caracterizó mediante espectroscopia de RMN de protones (**FIG. 3A**).

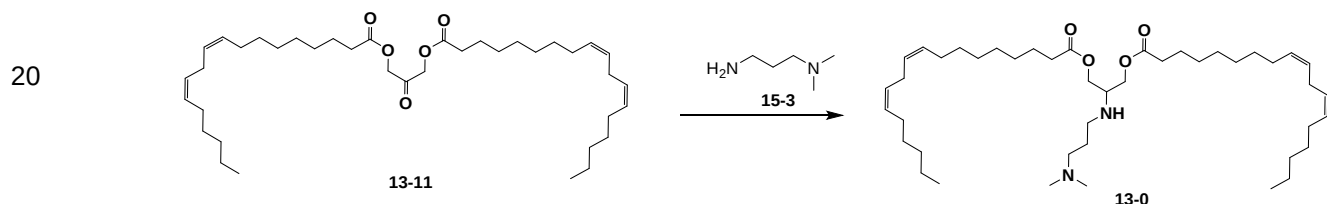


Esquema 3. Síntesis del intermedio 13-11a mediante O-acilación de cloruro de oleoilo con dihidroxiacetona

10 **Síntesis de los intermedios 13-0a y 13-11b**

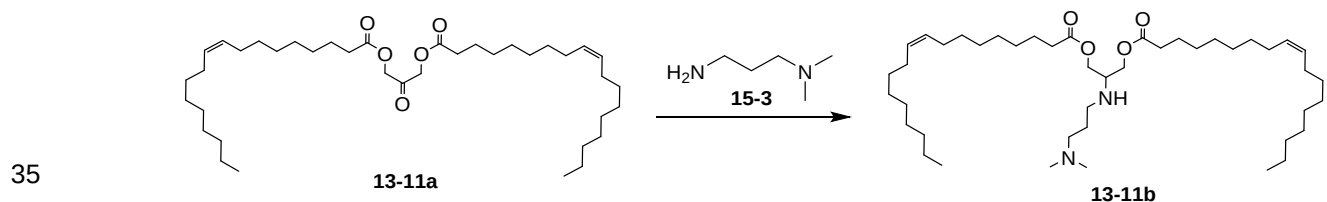
Los intermedios 13-0a y 13-11b se sintetizaron mediante aminación reductora de los intermedios 13-11 y 13-11a respectivamente

15 El intermedio 13-0 se produjo mediante aminación reductora (esquema 4) del intermedio 13-11 (13.1 mmol, 8.1 g, 1.0 eq) usando N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina 15-3 (26 mmol, 3.2 ml, 2.0 eq.) en DCM (10 ml) usando ácido acético (26.0 mmol, 1.50 ml, 2 eq.) y triacetato de borohidruro de sodio (4.32 mmol, 3.3 g, 1.2 eq.), produciendo 3.1 g (32 %) de producto bruto. La purificación en columna dio lugar a un producto puro (el espectro de RMN de protones y el cromatograma LC-CAD se muestran en FIG. 4A y FIG. 4B, respectivamente).



25 Esquema 4. Síntesis del intermedio 13-0 por aminación reductora del intermedio 13-11 con N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina

30 El intermedio 13-11b se produjo mediante aminación reductora (esquema 5) del intermedio 13-11a (24.2 mmol, 14.9 g, 1.0 eq) usando N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina 15-3 (48.4 mmol, 6.05 ml, 2.0 eq.) en DCM (60 ml) usando ácido acético (48.4 mmol, 2.8 ml, 2 eq.) y triacetato de borohidruro de sodio (29.1 mmol, 6.05 g, 1.2 eq.), produciendo 6 g (35 %) de producto bruto. La purificación en columna dio lugar a un producto purificado (el espectro de RMN de protones y el cromatograma LC-ELSD se muestran en FIG. 3B y FIG. 3C, respectivamente).



Esquema 5. Síntesis del intermedio 13-11b por aminación reductora del intermedio 13-11a con N1,N1-dimetilpropano-1,3-diamina

Tabla 1. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los lípidos 1 a 8

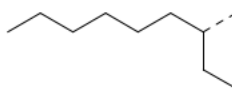
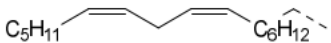
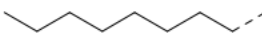
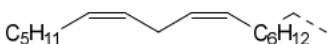
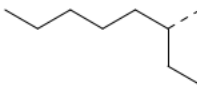
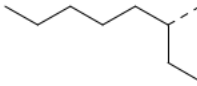
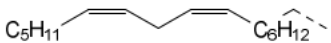
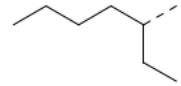
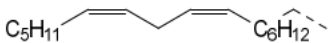
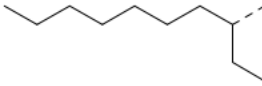
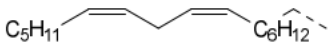
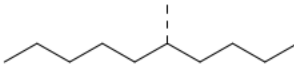
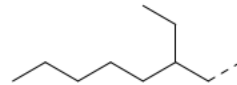
N.º de lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
5	Lípido 1 	
10	Lípido 2 	
15	Lípido 3 	
20	Lípido 4 	
25	Lípido 5 	
30	Lípido 6 	
35	Lípido 7 	
40	Lípido 8 	

Tabla 2. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los lípidos 9 a 16

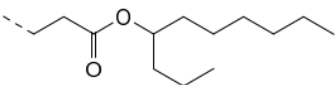
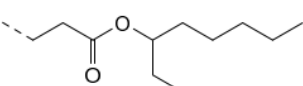
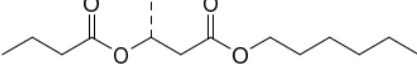
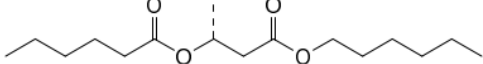
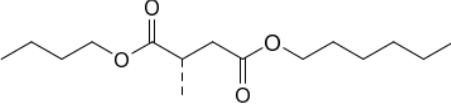
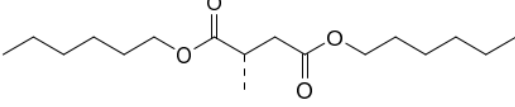
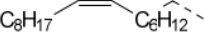
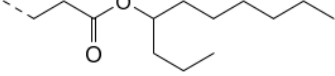
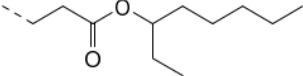
N.º de lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
Lípido 9		
Lípido 10		
Lípido 11		
Lípido 12		
Lípido 13		
Lípido 14		
Lípido 15		
Lípido 16		

Tabla 3. Grupos R (O-acilo) y R' (N-acilo) de los lípidos 17 a 25

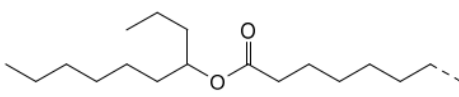
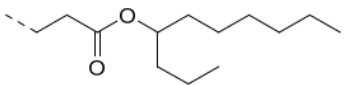
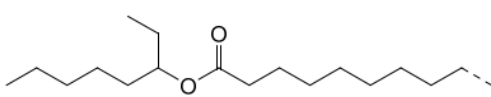
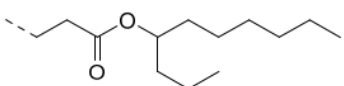
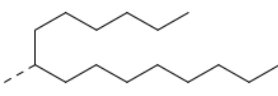
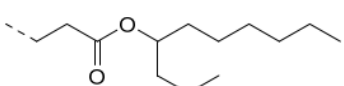
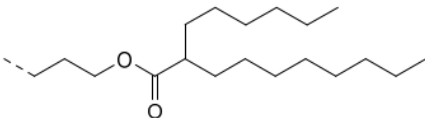
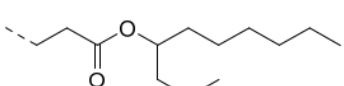
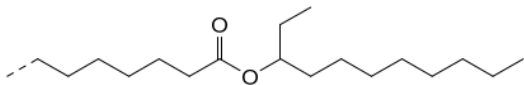
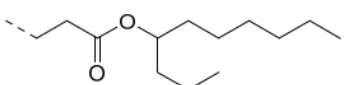
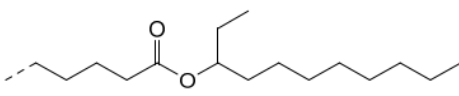
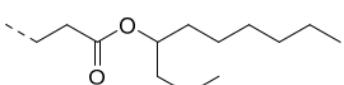
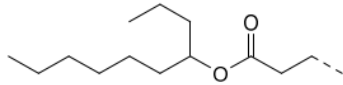
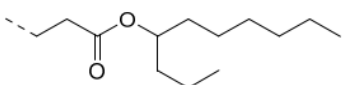
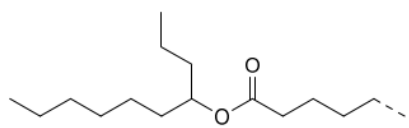
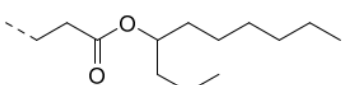
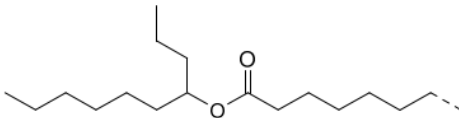
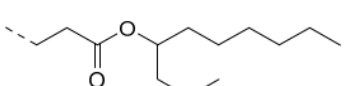
N.º de lípido	R (grupos O-acilo)	R' (grupo N-acilo)
5 Lípido 17		
Lípido 18		
10 Lípido 19		
15 Lípido 20		
Lípido 21		
20 Lípido 22		
25 Lípido 23		
Lípido 24		
30 Lípido 25		

Tabla 4. Masa esperada y observada (m/z) de lípidos ionizables nombrados

	Entrada	Código del compuesto	Masa esperada (g/mol)	Masa observada (m/z)
5	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)
10	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)
15	5	Isómero del lípido 5 (S)	827.33	827.7, 828.7, 829.7 (M, M+1, M+2)
	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)
20	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)
25	10	Isómero del lípido 10 (S)	912.75	913.7, 914.7, 915.7 (M+1, M+2, M+3)
	11	Isómero del lípido 11 (S)	970.76	971.7, 972.7, 973.7 (M+1, M+2, M+3)
	12	Lípido 12	999.51	999.0, 1001, 1002 (M+1, M+2, M+3)
30	13	Lípido 13	984.77	985.7, 986.7, 987.6 (M+1, M+2, M+3)
	15	Lípido 15	944.82	945.1, 946.1, 947.1 (M+1, M+2, M+3)
35	16	Lípido 16	916.78	917.2, 918.2, 919.2 (M+1, M+2, M+3)
	17	Lípido 19	892.78	893.7, 894.7, 895.7 (M+1, M+2, M+3)

18	Lípido 20	1064.86	1065.1, 1066.1, 1067.1, 1068.1 (M+1, M+2, M+3, M+4)
19	Lípido 31	854.75	855.1, 856.1, 857.1 (M+1, M+2, M+3)
20	Lípido 32	854.75	855.7, 856.7, 857.7 (M+1, M+2, M+3)
21	Lípido 33	840.73	841.7, 842.7, 843.7 (M+1, M+2, M+3)
22	Lípido 34	868.76	869.7, 870.7, 871.7 (M+1, M+2, M+3)
23	Lípido 35	884.76	

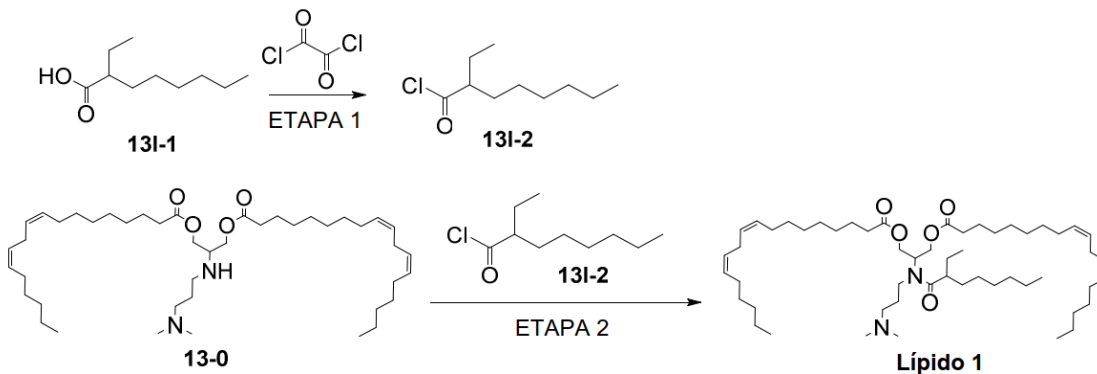
Síntesis de los lípidos del 1 a 24 mediante N-acilación de los intermedios 13-0 o 13-11b

N-acilación de los intermedios 13-0 y 13-11b con compuestos $R'CO_2H$ o $R'COCl$ (las estructuras R' mostradas en **tabla 1** a **tabla 3** produjeron los lípidos 1 a 24 como se describe en los ejemplos siguientes.

Síntesis de lípidos 1, 3, 4, 5, 6 y 7 mediante N-acilación del intermedio 13-0 utilizando los cloruros ácidos correspondientes

Síntesis del lípido 1

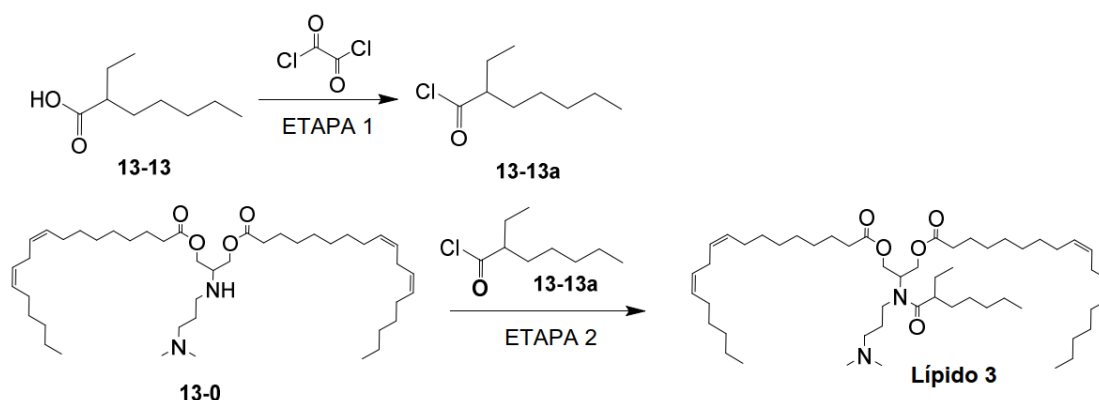
El lípido 1 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 6 a continuación y como sigue. El material de partida, 13I-1 (0.75 mmol, 130 mg, 1.0 eq) se convirtió en cloruro de ácido (etapa 1) usando cloruro de oxalilo (3.7 mmol, 320 μ l, 5 eq.) y DMF (10 μ l, catalítico) en 6 ml de benceno. El producto (143 mg, 98 %) mostró solo una mancha en 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 mmol, 250 mg, 1.0 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13I-1 (0.75 mmol, 143 mg, 1.7 eq.) usando TEA (240 μ l, 5 eq, 1.8 mmol) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) produciendo 124 mg (76 %) de lípido 1 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5A-1** para el espectro de RMN del lípido 1 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 6. Síntesis del lípido 1

Síntesis del lípido 3

El lípido 3 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 7 a continuación y como sigue. El material de partida, 13-13 (8.3 mmol, 1.30 g, 1.0 eq) se convirtió en el cloruro de ácido, 13-13a (etapa 1) usando cloruro de oxalilo (2.8 mmol, 2.4 ml, 5 eq.) y DMF (100 μ l, catalítico) en 60 ml de benceno. El producto (1.44 g, 98 %) mostró solo una mancha en 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 mmol, 3.78 g, 1.0 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-13a (1.44 g, 1.5 eq, 8.1 mmol) usando TEA (3.76 ml, 5 eq, 27 mmol) y DMAP (50 mg, cat, cantidad catalítica) en benceno (100 ml). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) produciendo 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. 5B-1** para el espectro de RMN del lípido 3, la **FIG. 5B-2** para la LC-MS del lípido 3 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 7. Síntesis del lípido 3

Síntesis del lípido 4

El lípido 4 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 7 a continuación y como sigue. El material de partida, 13-18 (0.95 mmol, 150 mg, 1 eq) se convirtió en el cloruro de ácido, 13-18' (etapa 1) usando cloruro de oxalilo (3.23 mmol, 227 μ l, 3.4 eq.) y DMF (10 μ l, catalítico) en 6 ml de benceno. El producto mostró solo una mancha en 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 mmol, 444 mg, 1.0 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-18' (167 mg, 1.5 eq, 0.95 mmol) usando TEA (445 μ l, 5.0 eq, 3.2 mmol) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en benceno (10 ml). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (5X) produciendo 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. 5C-1** para el espectro de RMN del lípido 4, la **FIG. 5C-2** para la LC-MS del lípido 4 y la **tabla 4** para la masa del producto).



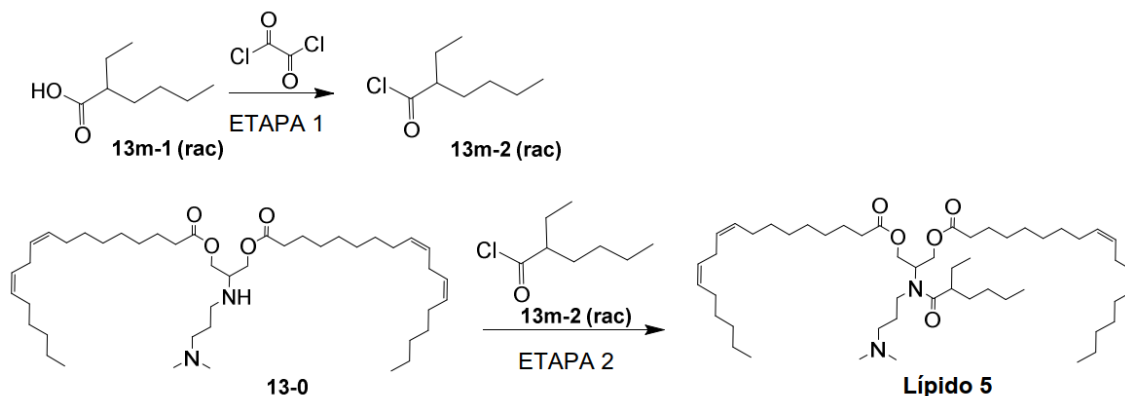
Síntesis del lípido 5 y su isómero (S)

15



30

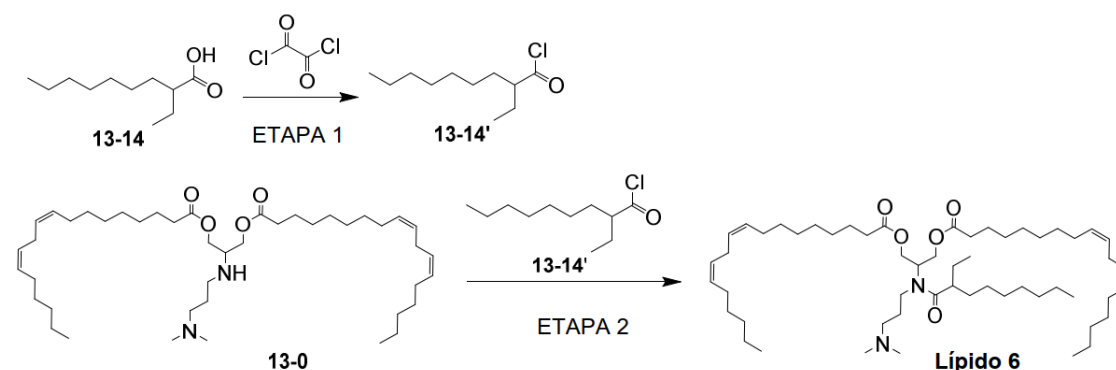
35



Esquema 9-2. Síntesis del lípido 5

Síntesis del lípido 6

El lípido 6 fue sintetizado 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 mmol, 1 eq.) se convirtió en cloruro de ácido, 13-14' (etapa 1) usando cloruro de oxalilo (207 μ l, 3.4 eq., 2.4 mmol) y DMF (10 μ l, cantidad catalítica) en 6 ml de benceno. El producto mostró solo una mancha en 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 mmol, 330 mg, 1 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-14' (145 mg, 1.5 eq, 0.7 mmol) usando TEA (327 μ l, 5.0 eq, 2.4 mmol) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 10 ml de benceno. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) produciendo 75 mg (18 %) de lípido 6 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5E-1** para el espectro de RMN del lípido 6, la **FIG. 5E-2** para la LC-MS del lípido 6 y la **tabla 4** para la masa del producto).

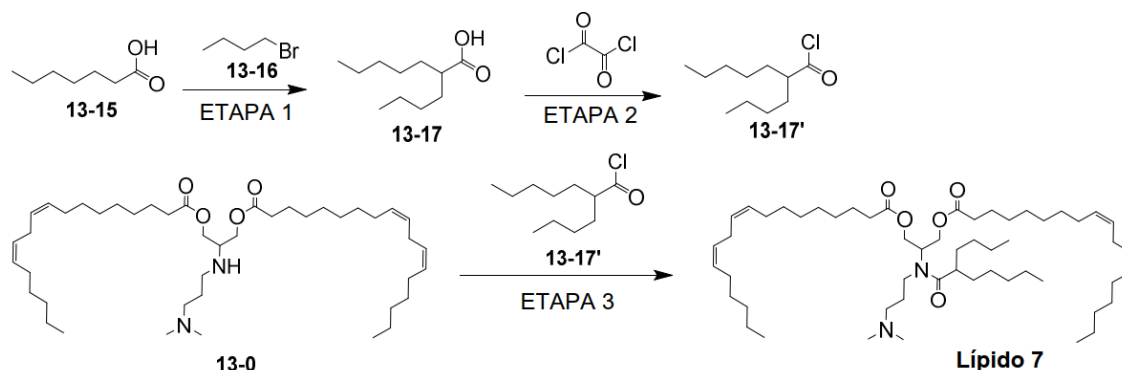


Esquema 10. Síntesis del lípido 6

Síntesis del lípido 7

El lípido 7 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 11 a continuación y como sigue. El material de partida, ácido heptanoico, 13-15 (23.1 mmol, 3.0 g, 1 eq.) se alquiló (etapa 1) con bromuro de n-butilo, 13-16 ((2.5 ml, 1.0 eq, 23.1 mmol) y n-butil litio 2.5 M en hexano (20.0 ml, 2.2 eq, 51 mmol) usando diisopropilamina (7.2 ml, 2.2 eq, 51 mmol) en HMPA (4.4 ml) y 30 ml de THF. 1.5 g (35 %) de ácido 2-butil heptanoico, 13-17, se aislaron de la mezcla de reacción mediante cromatografía ultrarrápida. El intermedio

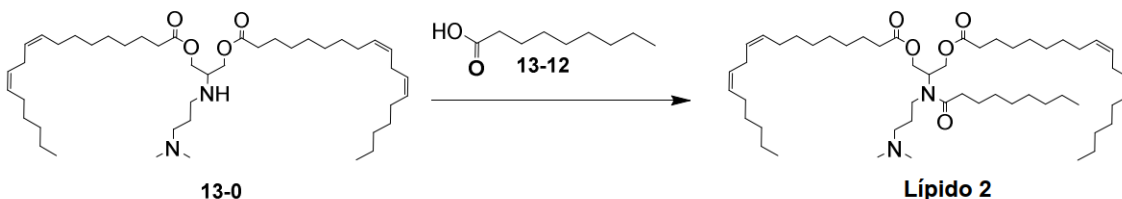
13-17 (360 mg, 0.94 mmol, 1 eq.) se convirtió en cloruro de ácido, 13-17' (etapa 2) usando cloruro de oxalilo (6.6 mmol, 568 μ l, 3.4 eq.) y DMF (5 μ l, catalítico) en 3 ml de benceno. El producto mostró solo una mancha en TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 3) del intermedio 13-0. El intermedio 13-0 (0.64 mmol, 450 mg, 1 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-17' (395 mg, 3.0 eq, 1.94 mmol), TEA (446 μ l, 5.0 eq, 3.2 mmol), DMAP (10 mg) en 10 ml de benceno. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) produciendo 228 mg (41 %) de lípido 7 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5F-1** para el espectro de RMN del lípido 7, la **FIG. 5F-2** para la LC-MS del lípido 7 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 11. Síntesis del lípido 7

Síntesis de lípidos 2, 8, 9 y 10 mediante N-acilación del intermedio 13-0 utilizando activación con carbodiimida de los ácidos carboxílicos correspondientes

El lípido 2 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 12 a continuación y como sigue. El intermedio 13-0 (0.14 mmol, 320 mg, 1.0 eq.) se aciló con ácido nonanoico 13-12 (1.15 mmol, 198 μ l, 2.5 eq.), EDCI (1.15 mmol, 221 mg, 2.5 eq.), DIPEA (1.15 mmol, 198 μ l, 2.5 eq.) y DMAP (0.05 mmol, 6.4 mg, 0.1 eq.) en 5 ml de DCM. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (3X) produciendo 107 mg (%) de lípido 2 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5G-1** para el espectro de RMN del lípido 2, la **FIG. 5G-2** para la LC-MS del lípido 2 y la **tabla 4** para la masa del producto).

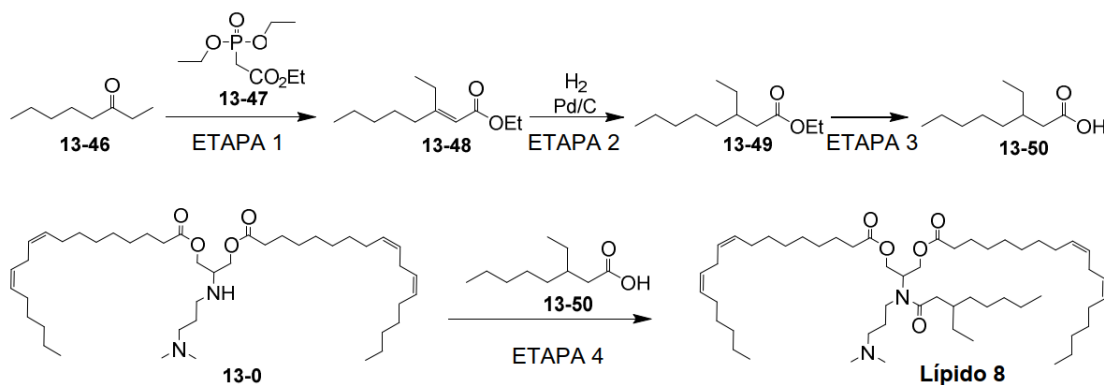


Esquema 12. Síntesis del lípido 2

Síntesis del lípido 8

El lípido 8 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 13 a continuación y como sigue. Se accedió al alqueno, 13-48 a través de la reacción HWE (etapa 1) de octan-3-ona, 13-46 (2 g, 15.6 mmol)

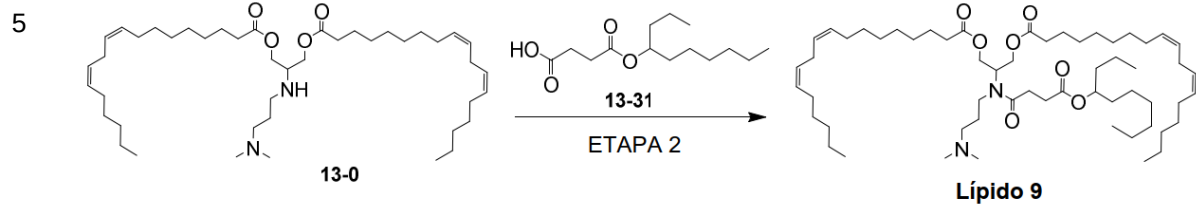
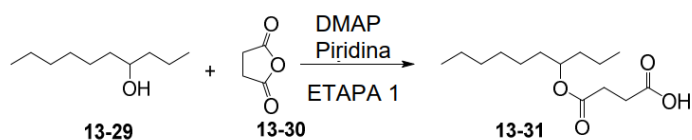
con 2-(dietoxifosforil)acetato de etilo, 13-47 (7.0 g, 2.0 eq, 31.2 mmol), NaHMDS 2 M en THF (15.6 ml, 2.0 eq, 31.2 mmol) y 9 ml de disolvente THF. El análisis de la reacción produjo 2.38 g (77 %) de 13-48 confirmado por RMN, masa del producto y mancha única de TLC. Se hidrogenó alqueno, 13-48 (5.1 mmol, 1 g, 1 eq.) (etapa 2) usando Pd/C (50 mg) en 8 ml de acetato de etilo, produciendo el intermedio 13-49 (958 mg, 77 %). La hidrólisis del éster (etapa 3) de 13-49 (5.1 mmol, 412 mg) usando THF/MeOH/LiOH 1 M (3.0/2.0/3.0 ml) produjo el intermedio de ácido carboxílico 13-50 (336 mg, 95 %). El intermedio 13-0 (0.33 mmol, 234 mg) se aciló con 13-50 (0.66 mmol, 115 mg, 2.0 eq.) usando EDCI (0.66 mmol, 102 mg, 2.0 eq.), DIPEA (0.66 mmol, 114 μ l, 2.0 eq.), DMAP (0.33 mmol, 41 mg, 1.0 eq.), en 2 ml de DCM produciendo 77 mg (27 %) de lípido 8 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5H-1** para el espectro de RMN del lípido 8, la **FIG. 5H-2** para la LC-MS del lípido 8 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 13. Síntesis del lípido 8

Síntesis del lípido 9

El lípido 9 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 14 a continuación y como sigue. El material de partida, decan-4-ol, 13-29 (32.0 mmol, 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 mmol) y piridina (5.0 ml) en 5 ml de THF. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para obtener 4.26 g (81 %) del intermedio ácido puro 13-31. El intermedio 13-0 (2.1 mmol, 1.5 g, 1 eq.) se aciló con 13-31 (2.13 mmol, 0.554 g, 1.1 eq), usando DIPEA (745 μ l, 4.26 mmol, 2.5 eq), EDCI (820 mg, 4.26 mmol, 2.5 eq) y DMAP (480 mg, 0.43 mmol, 0.25 eq), en 50 ml de DCM. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (3X) produciendo 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. 5I-1** para el espectro de RMN del lípido 9, la **FIG. 5I-2** para la LC-MS del lípido 9 y la **tabla 4** para la masa del producto).

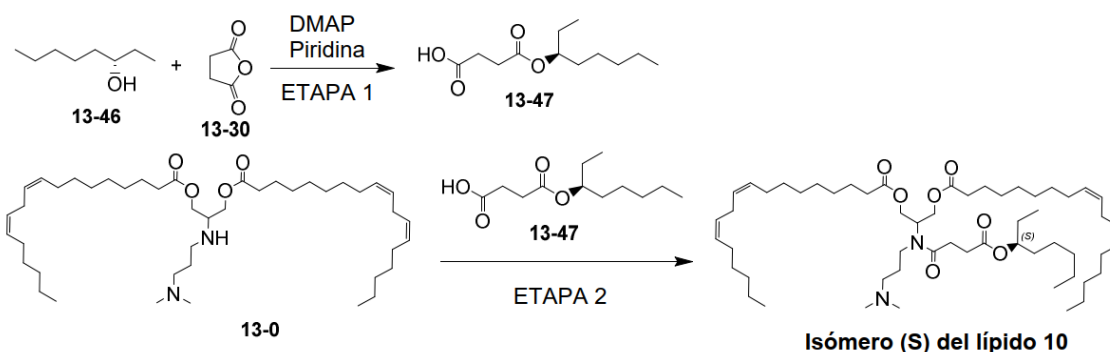


Esquema

14. Síntesis del lípido 9

Síntesis del lípido 10 y su isómero (S)

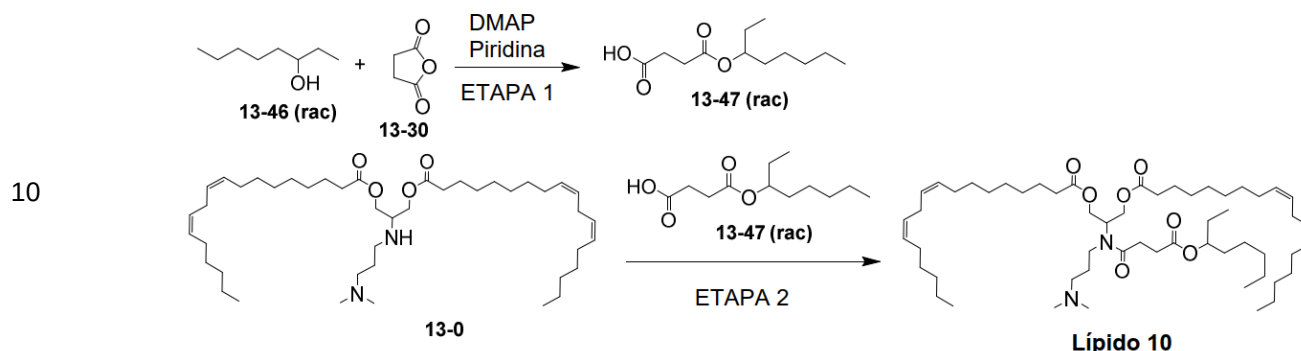
El isómero (S) del lípido 10 se sintetizó como se proporciona en el esquema 15-1 a continuación y como sigue. El material de partida, octan-3-ol, 13-46 (2.0 g, 1.0 eq, 15.3 mmol) se aciló con ácido succínico, 13-30 (3.1 g, 2.0 eq, 30.6 mmol) usando DMAP (1.72 g, 1.0 eq, 15.3 mmol) y piridina (2.0 ml) en 2 ml de THF y 6 ml de DCM. El producto bruto se purificó mediante 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 mmol) se aciló con 13-47 (123 mg, 1.5 eq, 0.53 mmol), usando EDCI (207 mg, 3.0 eq, 1.80 mmol), DIPEA (188 µl, 3.0 eq, 1.8 mmol) y DMAP (15.0 mg, 3.0 eq, 0.018 mmol), en 5 ml de DCM. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) produciendo 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. 5J-1** para el espectro de RMN del lípido 10, la **FIG. 5J-2** para la LC-MS del lípido 10 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 15-1. Síntesis del isómero (S) del lípido 10

El lípido 10 como una mezcla racémica se sintetizó de manera similar a como se proporciona en el esquema 15-2 a continuación. El material de partida, octan-3-ol, 13-46 (2.0 g, 1.0 eq, 15.3 mmol) se aciló con ácido succínico, 13-30 (3.1 g, 2.0 eq, 30.6 mmol) usando DMAP (1.72 g, 1.0 eq, 15.3 mmol) 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 mediante 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 mmol) con 13-38 (123 mg, 1.5 eq, 0.53 mmol), usando DIPEA (188 µl,

3.0 eq, 1.8 mmol), EDCI (207 mg, 3.0 eq, 1.80 mmol) y DMAP (15.0 mg, 3.0 eq, 0.018 mmol), en 5 ml de DCM. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) produciendo 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. 5J-1** para el espectro de RMN del lípido 10, la **FIG. 5J-2** para la LC-MS del lípido 10 y la **tabla 4** para la masa del producto).



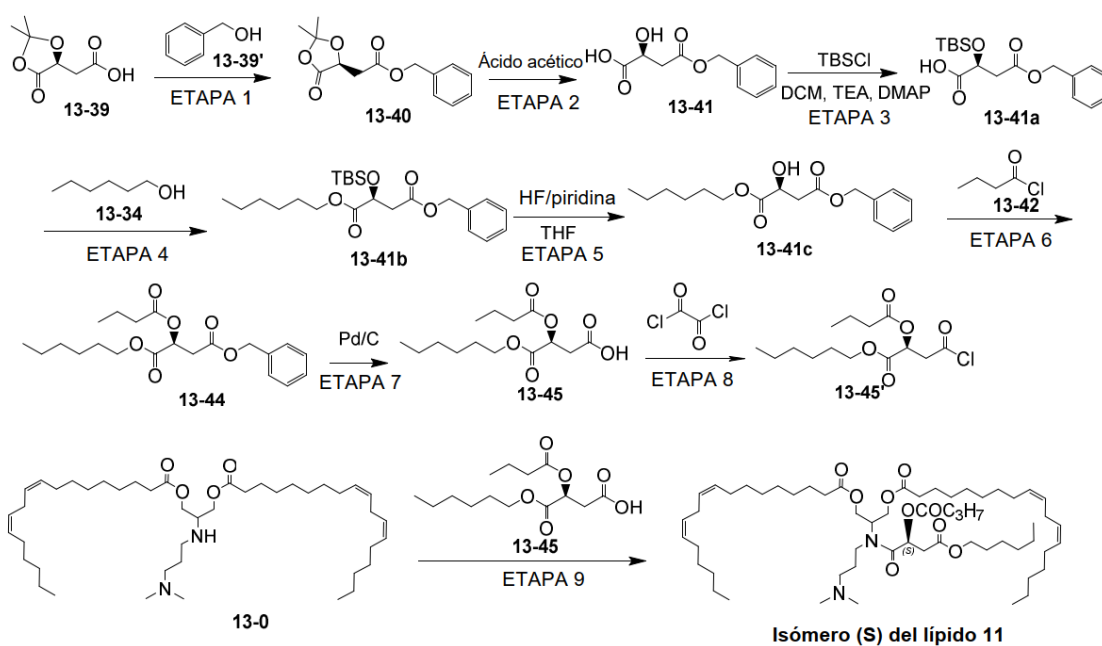
Esquema 15-2. Síntesis del lípido 10

Síntesis del lípido 11 mediante N-acilación del intermedio 13-0 utilizando el cloruro de ácido correspondiente

Síntesis del lípido 11 y su isómero (S)

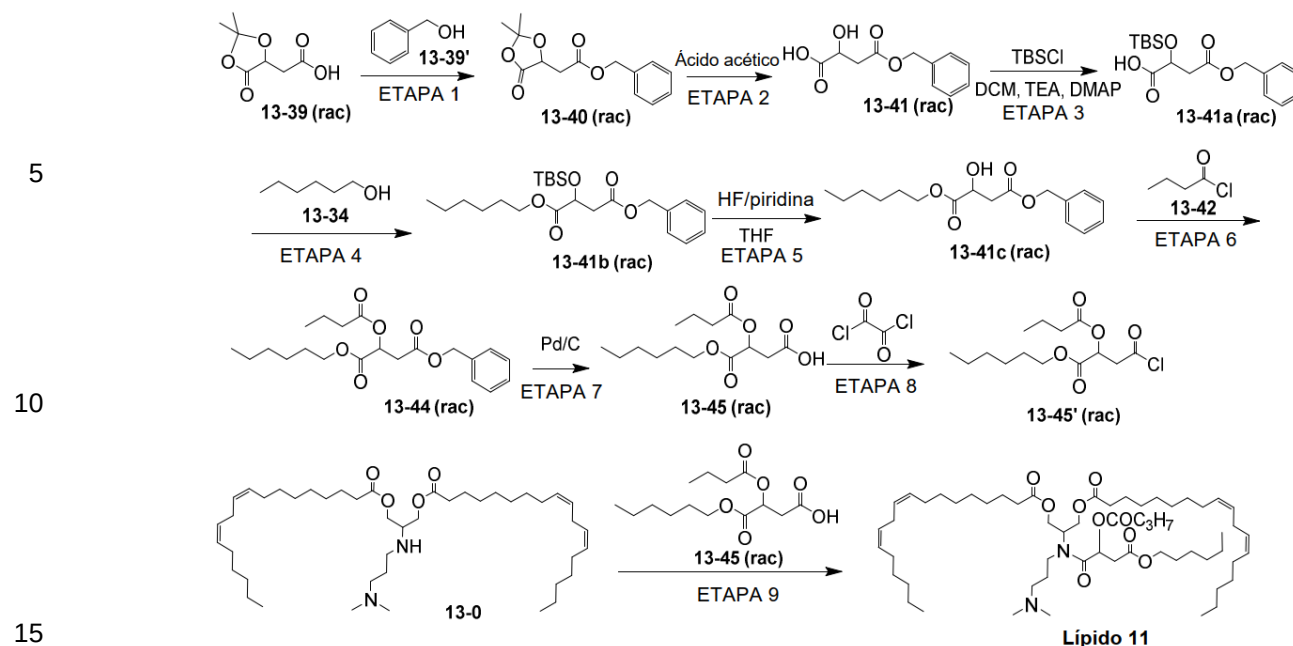
El isómero (S) del lípido 5 se sintetizó como se proporciona en el esquema 16-1 a continuación y como sigue. El material de partida, alcohol bencílico, 13-39' (18.5 mmol, 2 g) se usó para acilar el compuesto 13-39 (4.8 g, 1.5 eq, 27.8 mmol) usando EDCI (5.4 g, 1.5 eq, 27.8 mmol), DIPEA (4.6 ml, 1.5 eq, 27.8 mmol) y DMAP (463 mg, 0.2 eq, 3.7 mmol) produciendo 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 mmol, 1 eq.) se desprotegió en ácido acético para obtener el intermedio, 13-41 (~600 mg, la estructura cuantitativa y del producto se confirmó mediante espectrometría de masas y RMN de protones). Se generó una cantidad adicional de intermedio 13-41 y se protegieron selectivamente 1.68 g, 7.5 mmol de 13-41 en el grupo hidroxilo usando TBSCl. (1.7 g, 11.25 mmol, 1.5 eq), TEA (5.3 ml, 5.0 eq, 37.5 mmol) y DMAP (92 mg, 0.75 mmol, 0.1 eq), en 20 ml de DCM, produciendo el intermedio protegido 13-41a (~2.5 g, cuantitativo) (la masa del producto se confirmó mediante espectrometría de masas y RMN de protones). El intermedio 13-41a (1.61 g, 4.76 mmol) se esterificó con alcohol n-hexílico 13-34 (2.94 ml, 23.8 mmol, 5.0 eq) usando EDCI (2.76 g, 14.2 mmol, 3.0 eq), DIPEA (1.6 ml, 2.0 eq, 9.52 mmol) y DMAP (580 mg, 4.76 mmol, 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 mmol) usando HF-piridina (5.8 ml, 80.6 mmol, 25 eq.) en 30 ml de THF para obtener el intermedio 13-41c (837 mg, 84 %). El intermedio 13-41c (456 mg, 1.48 mmol) se aciló con cloruro de n-butanoílo, 13-42 (760 μ l, 7.4 mmol, 5.0 eq) en 4.0 ml de piridina (4.0 ml), produciendo el compuesto 13-44 (505 mg, 90 %). Se desprotegió el intermedio 13-44 (505 mg, 1.34 mmol) usando Pd/C (30 mg) en 3.0 ml de acetato de etilo dando el compuesto 13-45 (370 mg, 96 %). El compuesto 13-45 (188 mg, 0.65 mmol) se convirtió en el intermedio

de cloruro de ácido usando cloruro de oxalilo (190 μ g, 3.4 eq, 2.2 mmol) y DMF (10 μ l, cantidad catalítica), en 3 ml de benceno. El producto mostró solo una mancha en 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 mmol, 1 eq.) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-45' (200 mg, 3.0 eq, 0.65 mmol), TEA (152 μ l, 5.0 eq, 1.1 mmol), DMAP (10 mg) en 5 ml de benceno para obtener el lípido 11. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna para producir 77 mg (37 %) de lípido 11 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5K-1** para el espectro de RMN del lípido 11, la **FIG. 5K-2** para la LC-MS del lípido 11 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 16. Síntesis del isómero (S) del lípido 11

El lípido 11 como una mezcla racémica se sintetizó de manera similar a como se proporciona en el esquema 16-2 a continuación.

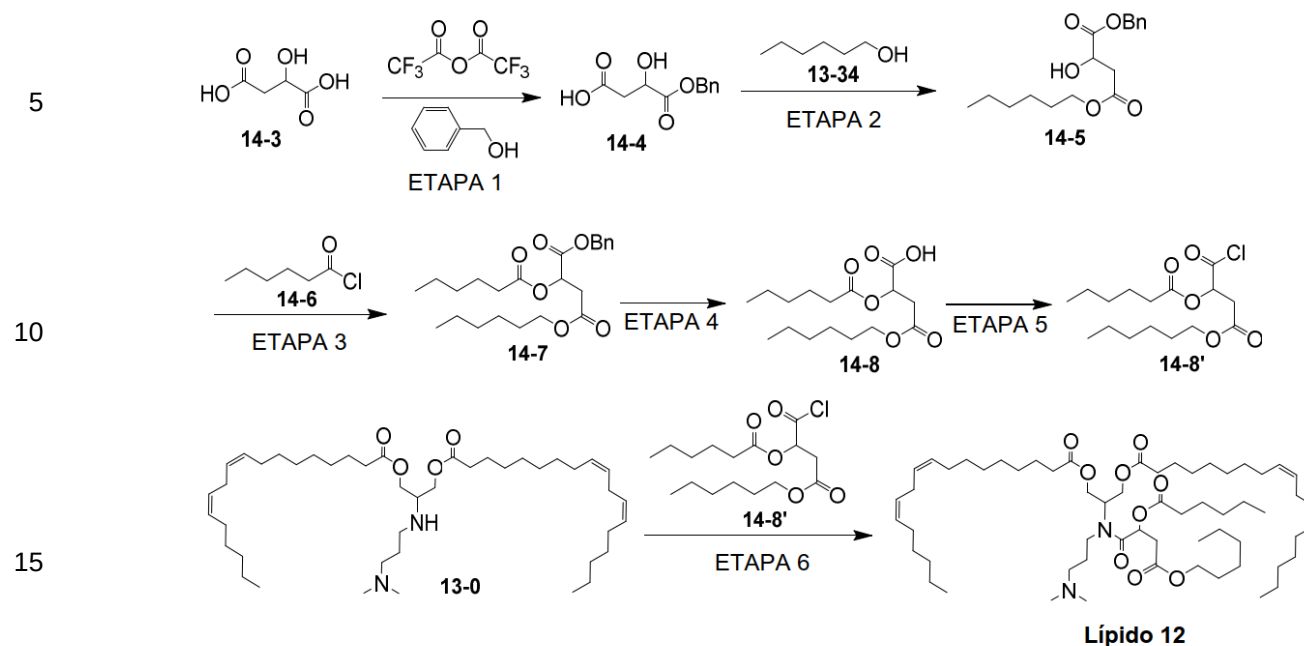


Esquema 16-2. Síntesis del lípido 11

Síntesis del lípido 12

El lípido 12 fue sintetizado 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 mmol) se protegió selectivamente en anhídrido trifluoroacético (11.27 g, 2.4 eq, 53.69 mmol) y alcohol bencílico (15 ml) a temperatura ambiente, durante una noche produciendo el intermedio **14-4**. El producto bruto se purificó mediante 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 mmol) con n-butanol, **13-34** (4.55 g, 10.0 eq, 44.60 mmol) usando EDCI (1.71 g, 2 eq, 8.92 mmol) y DMAP (1.089 g, 2 eq, 8.92 mmol) en 10 ml de DCM a TA, durante una noche produjo **14-5**. El producto bruto se purificó mediante 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 mmol) con cloruro de hexanoilo (1.39 g, 4.0 eq, 10.37 mmol) usando TEA (1.31 g, 5 eq, 12.97 mmol) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 10 ml de tolueno a temperatura ambiente, durante una noche produjo el intermedio **14-7**. La purificación del producto bruto mediante cromatografía en columna (1X) produjo 470 mg (46 %) de **14-7** purificado. El intermedio **14-7** (470 mg, 1 eq., 3.4 mmol) produjo 340 mg (93 %) de ácido libre **14-8**. Se convirtió **14-8** bruto (56 mg, 1 eq., 0.18 mmol) en el cloruro correspondiente, **1'-8'**, usando cloruro de oxalilo (50 μ l, 3.4 eq, 0.60 mmol) y DMF (0.2 μ l, cantidad catalítica) en 1 ml de tolueno a temperatura ambiente, durante una noche para producir 56 mg de cloruro bruto **1'-8'**. La N-acilación de **13-0** (42 mg, 1 eq., 0.059 mmol) con **1'-8'** (56.0 mg, 3.0 eq, 0.17 mmol) usando TEA (39.0 μ l, 5.0 eq, 0.29 mmol) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) en 3 ml de tolueno produjo el lípido 12. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para obtener el lípido 12 puro (23 mg, 39 %) (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de

protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5L-1** para el espectro de RMN del lípido 12, la **FIG. 5L-2** para el cromatograma de LC-ELSD del lípido 12 y la **tabla 4** para la masa del producto).

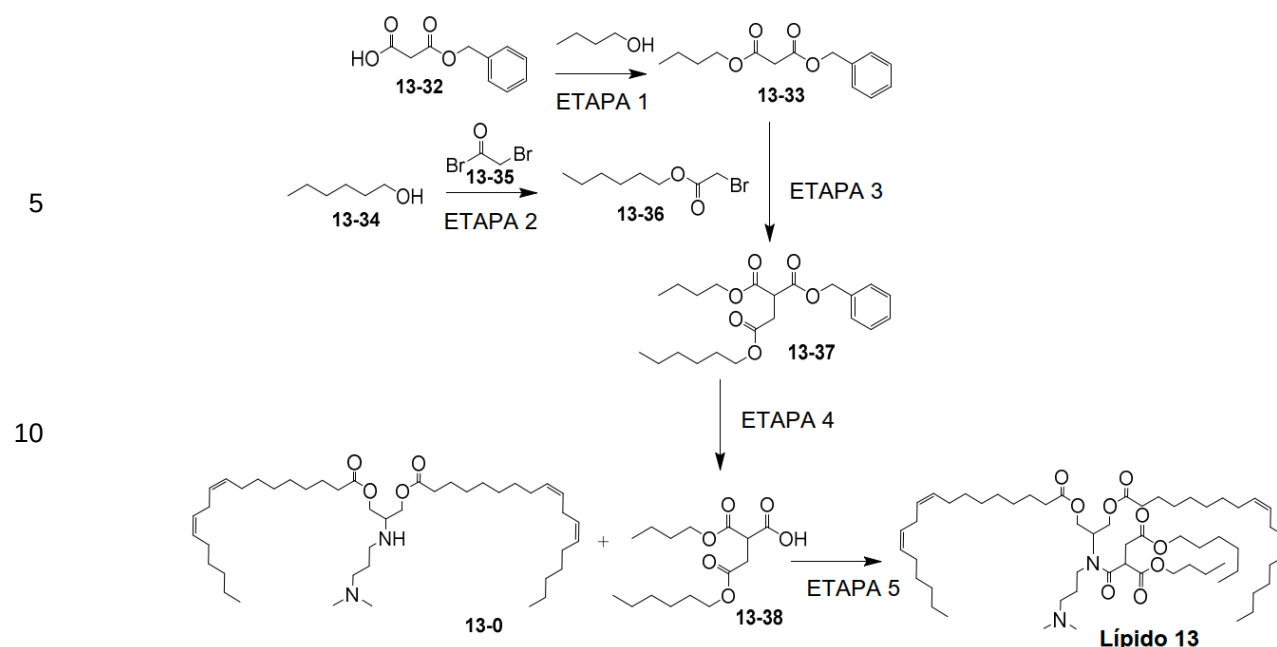


Esquema 34. Síntesis del lípido 12

Síntesis del lípido 13 mediante N-acilación del intermedio 13-0 por activación con carbodiimida del ácido carboxílico correspondiente

Síntesis del lípido 13

El lípido 13 fue sintetizado 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 mmol) se esterificó con 1-butanol (1.13 ml, 1 eq, 12.4 mmol) usando EDCI (4.8 g, 2 eq, 25.0 mmol), DIPEA (4.35 ml, 2 eq, 25.0 mmol) y DMAP (280 mg, 0.2 eq, 2.5 mmol) en 20 ml de DCM para obtener el intermedio 13-33. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 2.78 g (44 %) del intermedio puro 13-33. Se accedió al intermedio 13-36 mediante acilación de n-hexanol (2 g, 1.0 eq, 19.6 mmol) con bromuro de 2-bromoacetilo, 13-35 (5.05 g, 1.3 eq, 25.0 mmol) usando NaHCO_3 (3.95 g, 2.4 eq, 47.0 mmol) en 50 ml de acetonitrilo. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para obtener 4.32 g (97 %) del intermedio puro 13-36.



Esquema 17. Síntesis del lípido 13

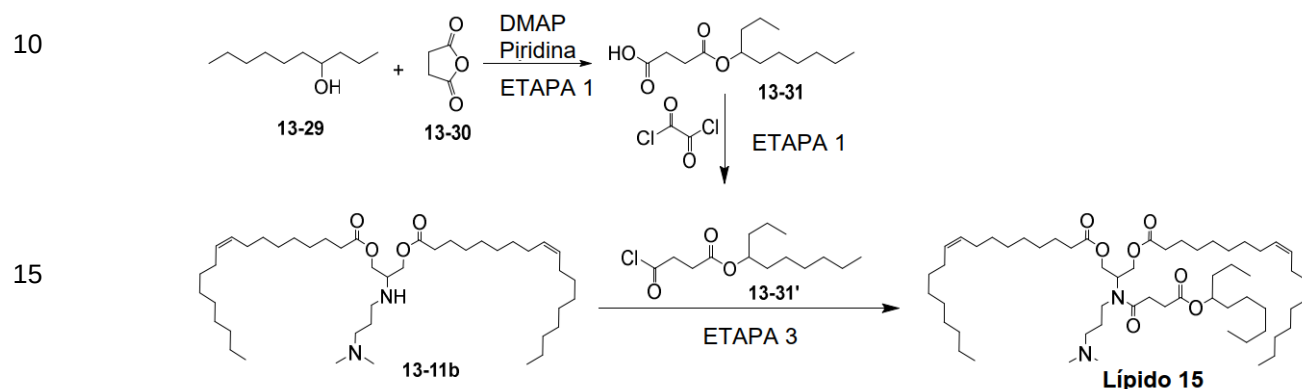
Se accedió al intermedio 13-37 mediante generación in situ del carbanión nucleófilo de 13-33 (1.25 g, 1.0 eq., 5.0 mmol) usando NaH (200 mg, 1.0 eq, 5.0 mmol) en 8 ml de DMF y reacción de desplazamiento con el intermedio. 13-36 (1.1 g, 1.0 eq, 5.0 mmol). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) a 1.15 g (58 %) del intermedio puro 13-37. El ácido libre intermedio 13-38 se obtuvo mediante desprotección (Pd/C, 230 mg de catalizador y gas hidrógeno en metanol) del intermedio 13-37 (1.15 g, 1.0 eq, 2.9 mmol). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (4X) para obtener 88 mg (9 %) del intermedio puro 13-38. Se aciló el intermedio 13-0 (105 mg, 1.0 eq, 0.04 mmol) con 13-38 (2.13 mmol, 0.554 g, 1.1 eq), usando DIPEA (78 μ l, 3.0 eq, 0.45 mmol), EDCI (87 mg, 3.0 eq, 0.45 mmol) y DMAP (5 mg, 0.3 eq, 0.04 mmol), en 2 ml de DCM. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (3X) produciendo 41 mg (27 %) de lípido 13 puro (≥ 99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5M-1** para el espectro de RMN del lípido 13, la **FIG. 5M-2** para la LC-MS del lípido 13 y la **tabla 4** para la masa del producto).

Síntesis del lípido 15 mediante N-acilación del intermedio 13-11a utilizando el cloruro de ácido correspondiente

Síntesis del lípido 15

El lípido 15 fue sintetizado 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 mmol) se aciló con ácido succínico, 13-30 (12.6 g, 126 mmol, 2.0 eq) usando DMAP (7.7 g, 63 mmol, 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 mediante cromatografía en columna (3X) para obtener 8.9 g (55 %) del intermedio ácido puro 13-31. El intermedio 13-31 (1.26 g, 4.9 mmol) se convirtió en el intermedio de cloruro de ácido 13-31' usando cloruro de oxalilo (1.43 ml, 3.4 eq, 16.66 mmol)

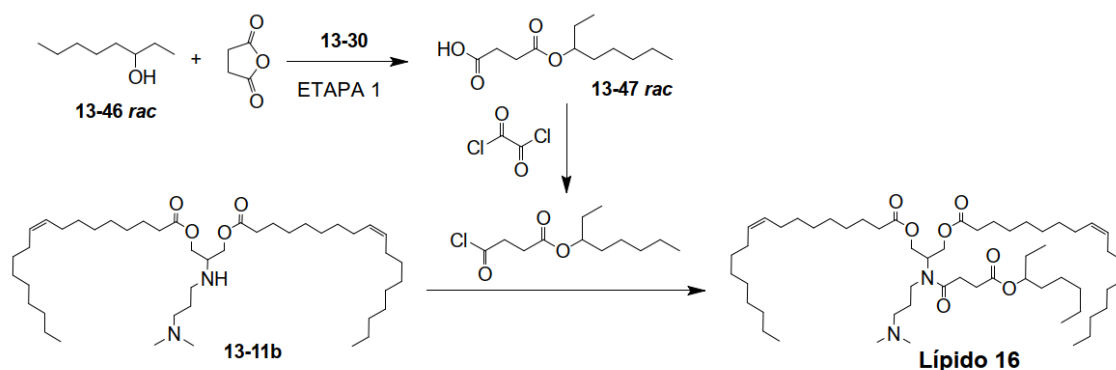
y DMF (50 μ l, cantidad catalítica), en 5 ml de benceno. El producto mostró solo una mancha en TLC (como éster metílico) y se usó sin purificación adicional para la acilación (etapa 3) del intermedio 13-11b. El intermedio 13-11b (275 mg, 0.39 mmol) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-31' (324 mg, 3.0 eq, 1.17 mmol), TEA (270 μ l, 5.0 eq, 1.95 mmol), DMAP (20 mg, cantidad catalítica) en 10 ml de benceno para obtener el lípido 15. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) para producir 230 mg (64 %) de lípido 15 puro (99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5N-1** para el espectro de RMN del lípido 15, la **FIG. 5N-2** para la LC-MS del lípido 15 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 18. Síntesis del lípido 15

Síntesis del lípido 16

El lípido 16 fue sintetizado 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 mmol) se aciló con ácido succínico, 13-30 (46.08 mmol, 4.61 g, 2.0 eq) usando DMAP (23.04 mmol, 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 mediante 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 mmol) se convirtió en el intermedio de cloruro de ácido 13-47' rac usando cloruro de oxalilo (0.38 ml, 4.4 mmol, 3.4 eq.) y DMF (2 μ l, cantidad catalítica). El producto mostró solo una mancha en 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 mmol) se aciló con cloruro de ácido bruto, 13-47' rac (0.42 mmol, 300 mg, 3.0 eq.), TEA (260 μ l, 5.0 eq, 1.9 mmol), DMAP (20 mg, cantidad catalítica) en 5 ml de tolueno para obtener el lípido 16. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para producir 165 mg (47 %) de lípido 16 puro (99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5O-1** para el espectro de RMN del lípido 16, la **FIG. 5O-2** para la LC-MS del lípido 16 y la **tabla 4** para la masa del producto).

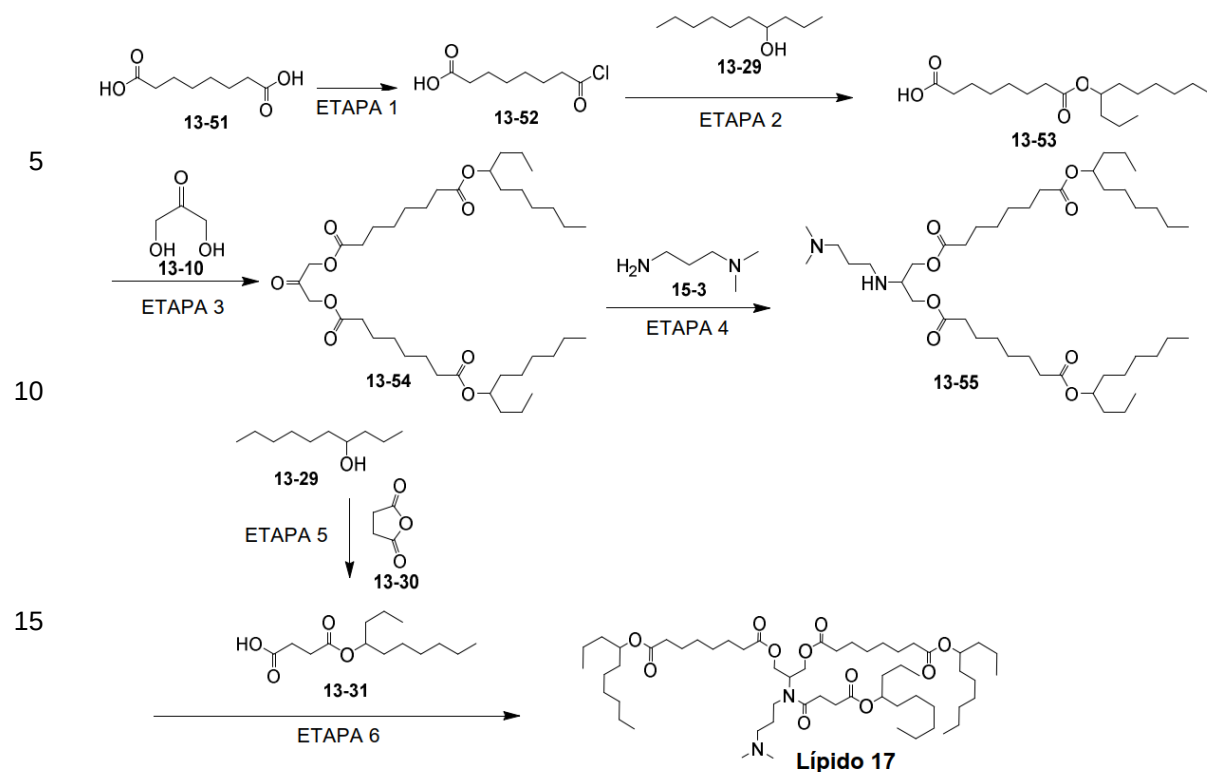


Esquema 19. Síntesis del lípido 16

Síntesis del lípido 17

El lípido 17 se sintetizó como se proporciona en el esquema 20 a continuación. Ácido octanodioico, 13-51 (5.0 g, 2.0 eq, 28.5 mmol) se monoaciló con decano-3-ol, 13-29 (2.75 ml, 1.0 eq, 14.3 mmol) usando EDCI (3.29 g, 1.2 eq, 17.2 mmol), DMAP (160 mg, 0.12 eq, 1.72 mmol) y TEA (9.96 ml, 5.0 eq, 71.5 mmol) en 50 ml de DCM/DMF (1:1 v/v) (50 ml) a temperatura ambiente durante una noche para obtener ácido libre 13-53. El producto bruto se purificó mediante 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 mmol) se hizo reaccionar con dihidroxiacetona (152 mg, 1.0 eq, 1.7 mmol) usando EDCI (816 mg, 2.5 eq, 4.25 mmol), DMAP (50 mg, 0.25 eq, 0.43 mmol) y DIPEA (740 μ l, 2.5 eq, 4.3 mmol) en 15 ml de DCM a temperatura ambiente durante una noche para obtener la cetona 13-54. El producto bruto se purificó mediante 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 mmol) con amina, 15-3 (327 μ l, 2.0 eq, 2.6 mmol) usando ácido acético (150 μ l, 2.0 eq, 2.6 mmol) y triacetato de borohidruro de sodio, Na(OAc)₃BH (331 mg, 1.2 eq, 1.5 mmol) en 20 ml de DCM (20 ml) a temperatura ambiente durante 3 horas produjo el intermedio 13-55. El producto bruto se purificó mediante 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 comunicadas para la N-acilación de la síntesis del lípido 15

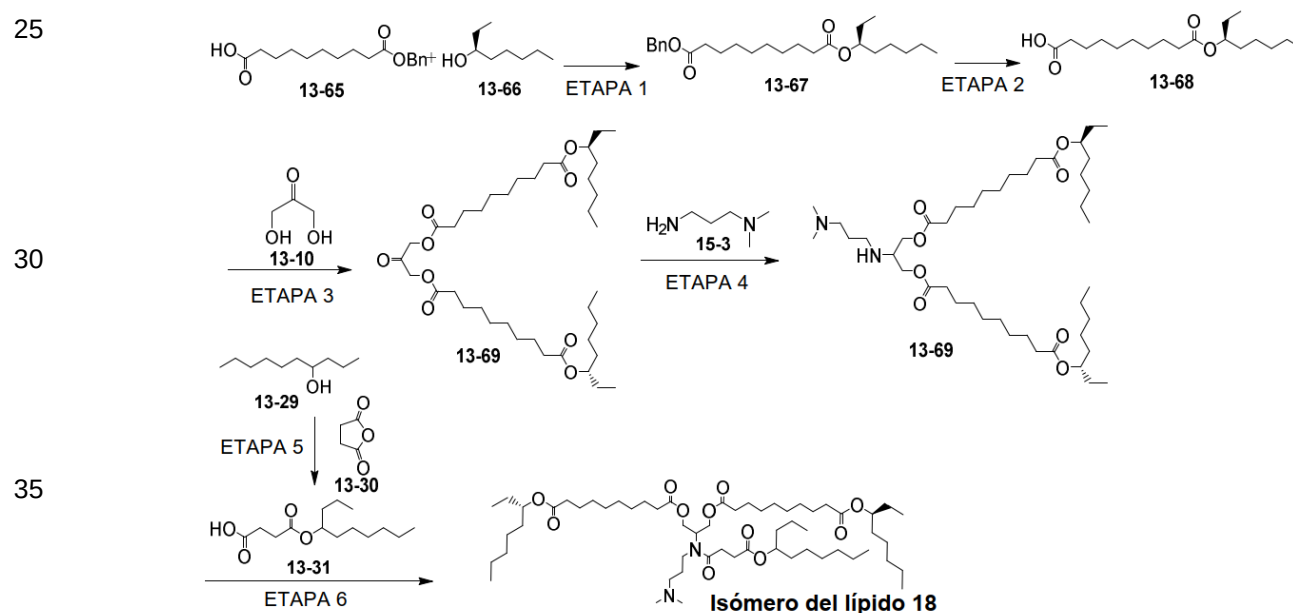
dieron lugar al lípido 17.



Esquema 20. Síntesis del lípido 17

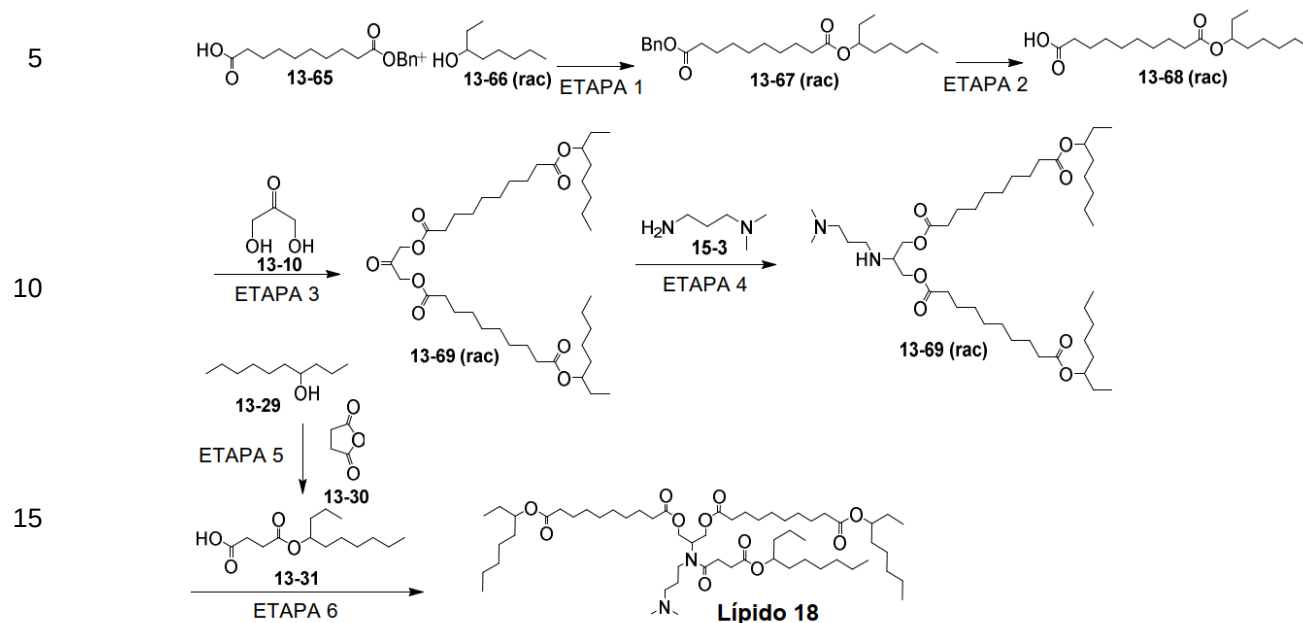
Síntesis del lípido 18 y su isómero

Se sintetizó un isómero del lípido 18 como se proporciona en el esquema 21-1 a continuación. El lípido 18 se sintetizó utilizando métodos análogos a los presentados para el lípido 17 reemplazando el decan-3-ol con octano-2-ol en la etapa 1.



Esquema 21-1. Síntesis del isómero del lípido 18

El lípido 18 como una mezcla racémica se sintetizó como se proporciona en el esquema 21-2 a continuación.

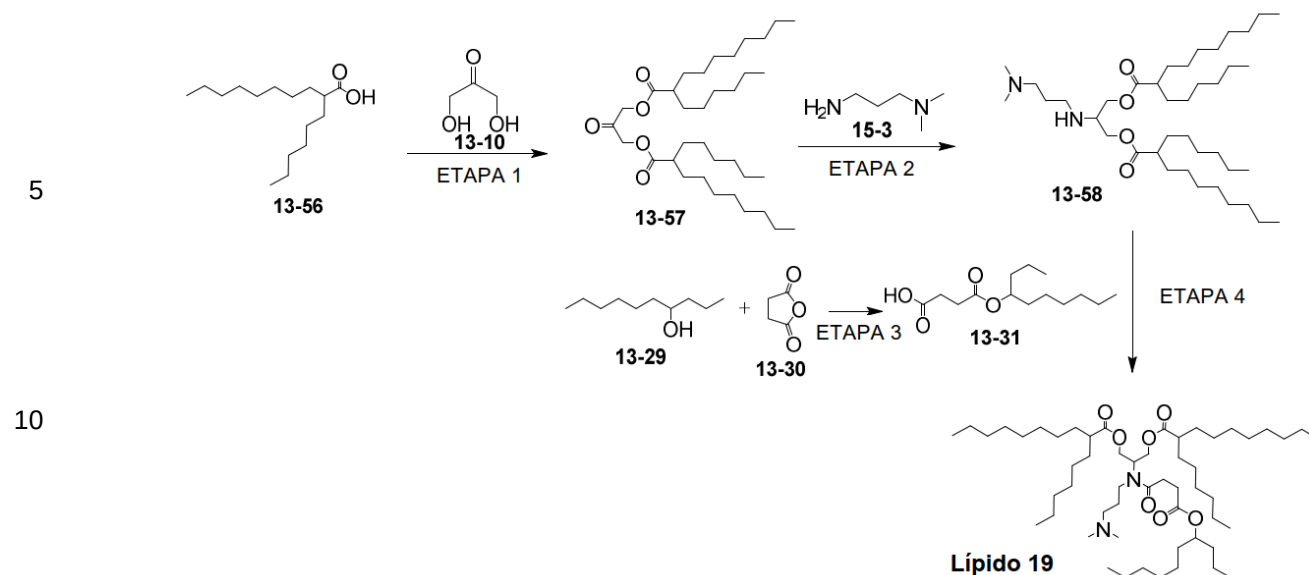


Esquema 21-2. Síntesis del lípido 18

Síntesis del lípido 19

El lípido 19 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 22 a continuación y como sigue. El material de partida dihidroxiacetona (422 mg, 4.7 mmol) se aciló con el compuesto 13-56 (3.0 g, 2.5 eq, 11.71 mmol) usando EDCI (2.24 g, 2.5 eq, 11.71 mmol), DIPEA (2.0 ml, 2.5 eq, 11.71 mmol) y DMAP (115 mg, 0.2 eq, 0.94 mmol) en 10 ml de DCM produciendo 2.1 g (79 %) del intermedio 13-57. Aminación reductora de 13-57 (2.1 g, 1.0 eq, 3.7 mmol) con la amina 15-3 (925 μ l, 2.0 eq, 7.4 mmol) usando ácido acético (430 μ l, 2.0 eq, 7.4 mmol), Na(OAc)3BH (923 mg, 1.2 eq, 4.44 mmol) en 10.0 ml de DCM, produciendo 1.55 g (65 %) del intermedio 13-58. El intermedio 13-31 se produjo como se ha descrito 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 mmol) con 13-31 (380 mg, 2.0 eq, 1.48 mmol) usando EDCI (291 mg, 2.0 eq, 1.48 mmol), DIPEA (247 μ l, 2.0 eq, 1.48 mmol) y DMAP (45 mg, 0.5 eq, 0.37 mmol) en 4.0 ml de DCM a temperatura ambiente, durante una noche produjo 423 mg (63 %) de lípido 19 puro (pureza >99 %).

Véase la **FIG. 5P-1** para el espectro de RMN del lípido 19, la **FIG. 5P-2** para el cromatograma de LC-ELSD de fase inversa del lípido 19 y la **tabla 4** para la masa del producto.

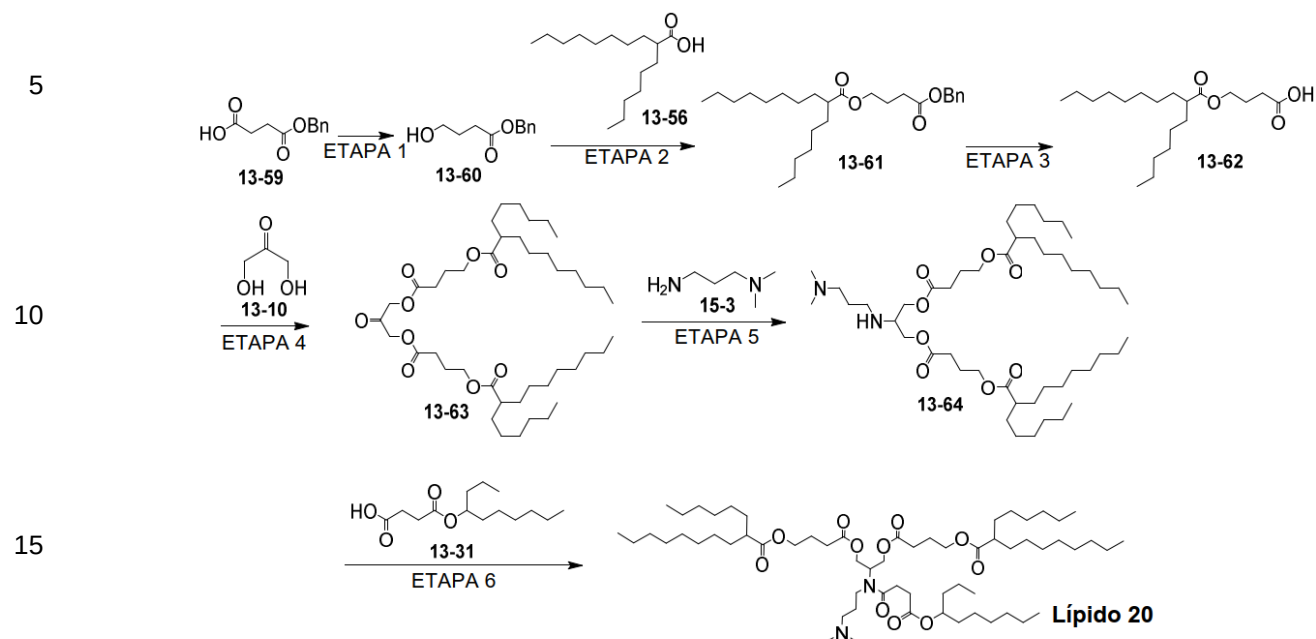


Esquema 22. Síntesis del lípido 19

Síntesis del lípido 20

El lípido 20 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 23 a continuación y como sigue. El ácido succínico monoprottegido, 13-59 (2.0 g, 1.0 eq, 9.65 mmol) se redujo al alcohol correspondiente usando sulfuro de borano-dimetilo (6.2 ml, 7.0 eq, 67.0 mmol) a 0-5 °C, 1 hora, seguido de reacción a temperatura ambiente durante una noche. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) produciendo 1.3 g (71 %) del compuesto puro 13-60. Se usó el intermedio 13-60 (1.3 g, 1.3 eq, 6.7 mmol) para acilar el ácido 13-56 (1.51 ml, 1.0 eq, 5.0 mmol), usando EDCI (1.63 g, 1.7 eq, 8.5 mmol), DIPEA (1.48 ml, 1.7 eq, 8.5 mmol) y DMAP (98 mg, 0.17 eq, 0.85 mmol) en 10.0 ml de DCM a temperatura ambiente durante una noche. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) produciendo 1.88 g (65 %) del intermedio puro 13-61. La desprotección posterior mediante hidrogenación sobre Pd/C/gas hidrógeno (400 mg) en metanol produjo 1.42 g de ácido libre 13-62 (99 %) de producto bruto. Se usó 13-62 bruto (1.32 g, 2.2 eq, 4.2 mmol) para acilar la dihidroxiacetona, 13-10 (172 mg, 1.0 eq, 1.9 mmol), EDCI (958 mg, 2.6 eq, 5.0 mmol), DIPEA (870 µl, 2.6 eq, 5.0 mmol) y DMAP (56 mg, 0.26 eq, 0.5 mmol) en 10.0 ml de DCM a temperatura ambiente, durante una noche para obtener la cetona 13-63. El producto bruto se purificó mediante 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 mmol) con la amina 15-3 (42 µl, 2.0 eq, 0.32 mmol) usando ácido acético (18 µl, 2.0 eq, 7.8 mmol) y Na(OAc)₃BH (41 mg, 1.2 eq, 0.19 mmol) en 3 ml de DCM a temperatura ambiente durante 3 horas produjo el intermedio 13-64. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para obtener 23 mg (17 %) del intermedio purificado 13-64. La N-acilación de 13-64 (23 mg, 1.0 eq, 0.028 mmol) con ácido 13-31 (8.7 mg, 1.2 eq, 0.034 mmol) usando EDCI (6.4 mg, 1.2 eq, 0.034 mmol), DIPEA (5.8 µl, 1.2 eq, 0.034 mmol) y DMAP (1 mg, cat) en 1.5 ml de DCM a temperatura ambiente durante una noche produjo el lípido 20. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para obtener 21 mg (70 %) del lípido puro 20 (99 %).

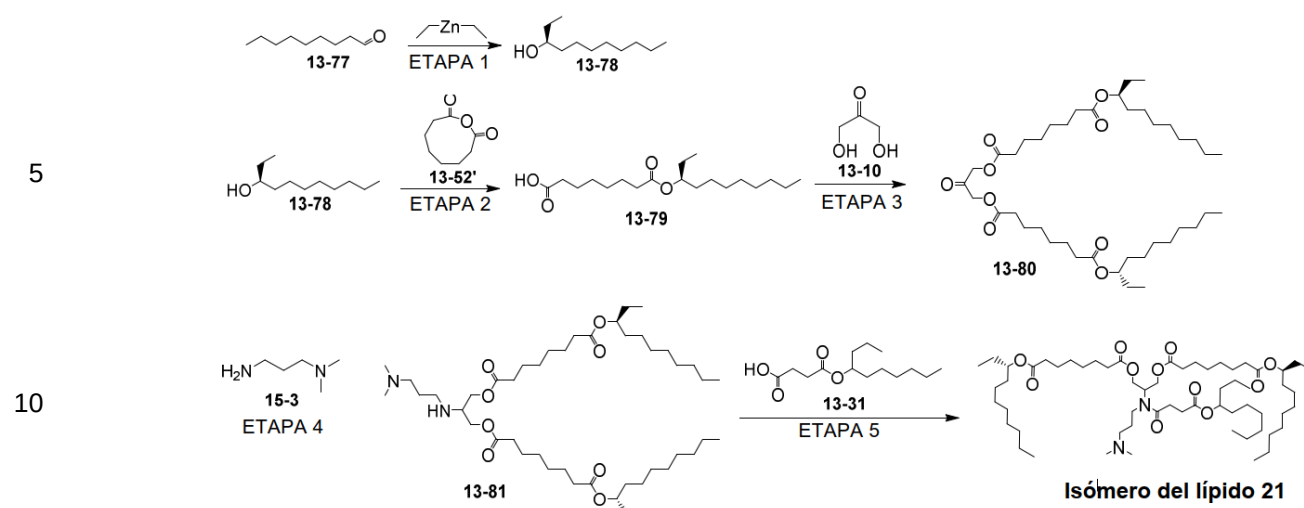
Véase la **FIG. 5Q-1** para el espectro de RMN del lípido 20, la **FIG. 5Q-2** para el cromatograma de LC-ELSD de fase inversa del lípido 20 y la **tabla 4** para la masa del producto.



Esquema 23. Síntesis del lípido 20

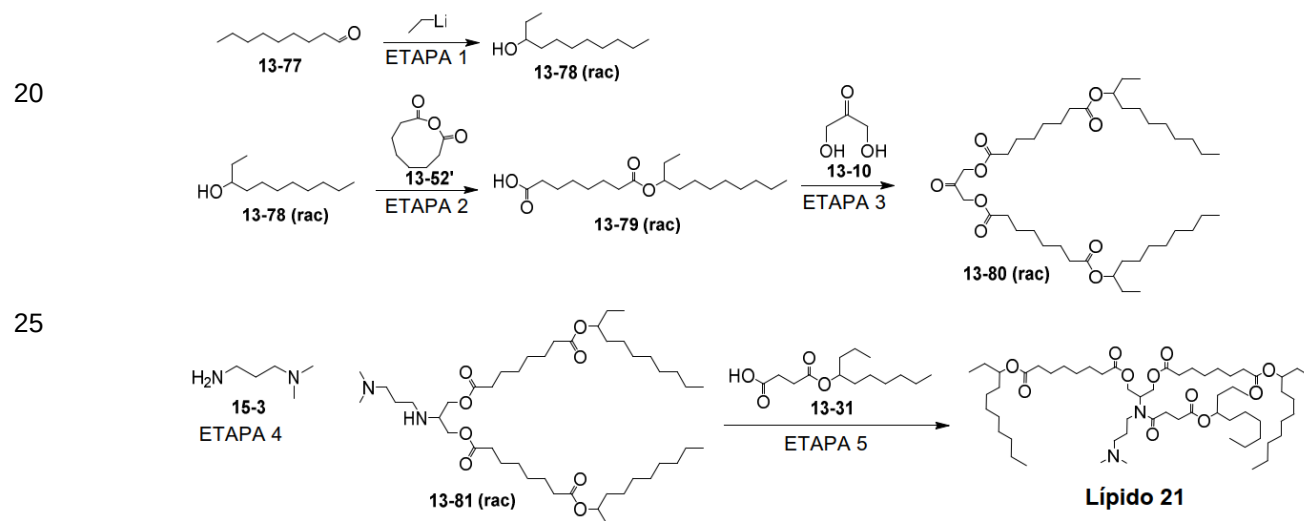
Síntesis del lípido 21 y su isómero

Se sintetizó un isómero del lípido 21 como se proporciona en el esquema 24-1 a continuación. En resumen, se accedió al alcohol 13-78 mediante adición nucleófila al aldehído 13-77 usando dietil zinc (etapa 1) y posteriormente se usó en la adición de apertura del anillo al anhídrido cíclico 13-52 para acceder al intermedio 13-79. La O-acilación de dihidroxiacetona con el intermedio 13-79 usando las condiciones descritas en la síntesis del lípido 17 produjo 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 produjo el intermedio 13-81. La N-acilación posterior del intermedio 13-81 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las utilizadas para la síntesis del lípido 9 proporcionó el lípido 21.



Esquema 24-1. Síntesis del isómero del lípido 21

El lípido 21 como una mezcla racémica se sintetizó como se proporciona en el esquema 24-2 a continuación. En resumen, se accedió al lípido 21 (racemato) utilizando métodos análogos a los descritos para el isómero del lípido 21, excepto que se utilizó etil-litio para acceder al alcohol racémico en la etapa 1.

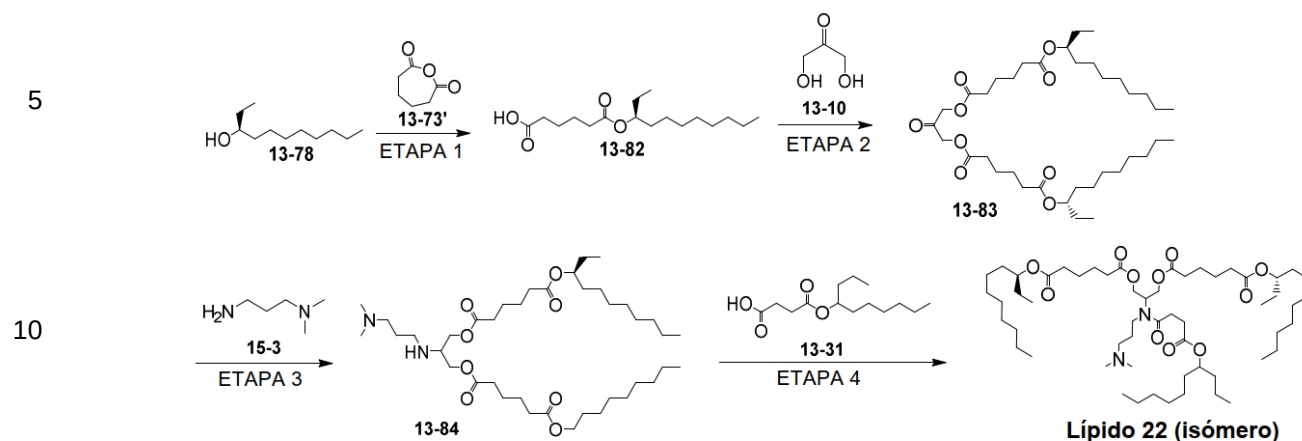


Esquema 24-2. Síntesis del lípido 21

Síntesis del lípido 22 y su isómero

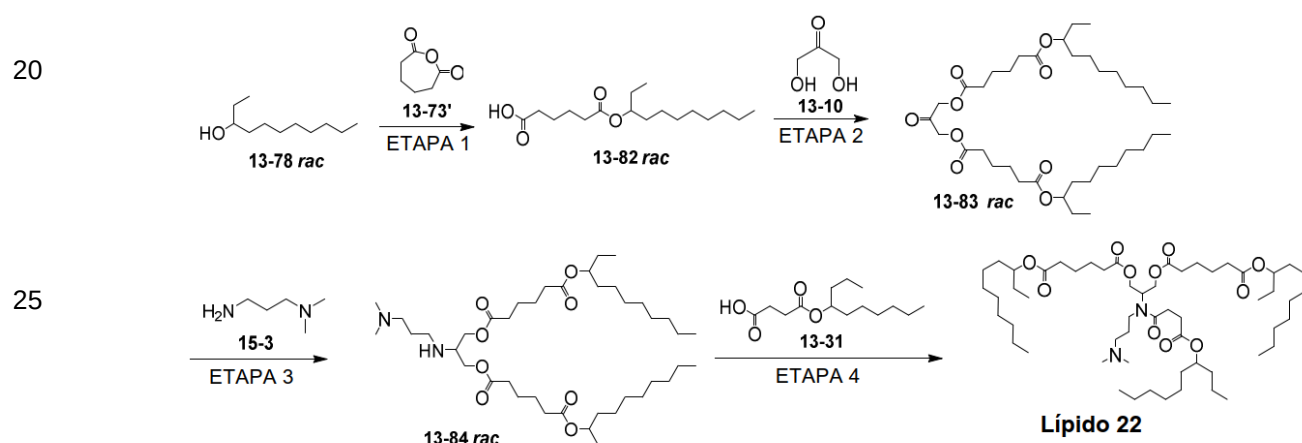
Se sintetizó un isómero del lípido 22 como se proporciona en el esquema 25-1 a continuación. En resumen, se usó el alcohol 13-78 (al que se accedió como se ha descrito anteriormente para la síntesis del lípido 21) en la adición de apertura del anillo al anhídrido cíclico 13-73' para acceder al intermedio 13-82. La O-acilación de dihidroxiacetona con el intermedio 13-82 usando las condiciones descritas en la síntesis del lípido 17 produjo 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 produjo el intermedio 13-84. La N-acilación posterior del

intermedio 13-84 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las utilizadas para la síntesis del lípido 9 proporcionó el isómero del lípido 22.



Esquema 25-1. Síntesis del isómero del lípido 22

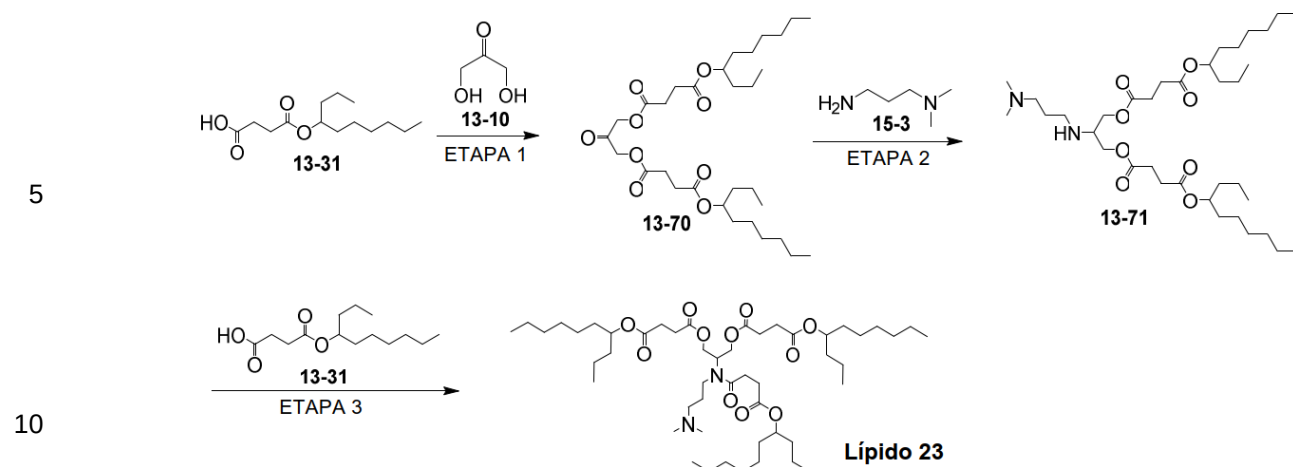
15 El lípido 22 como una mezcla racémica se sintetizó como se proporciona en el esquema 25-2 a continuación. Se accedió al lípido 22 utilizando los métodos descritos anteriormente para el isómero del lípido 22 reemplazando el isómero de alcohol 13-78 con alcohol racémico 13-78 *rac*.



Esquema 25-2. Síntesis del lípido 22

30 Síntesis del lípido 23

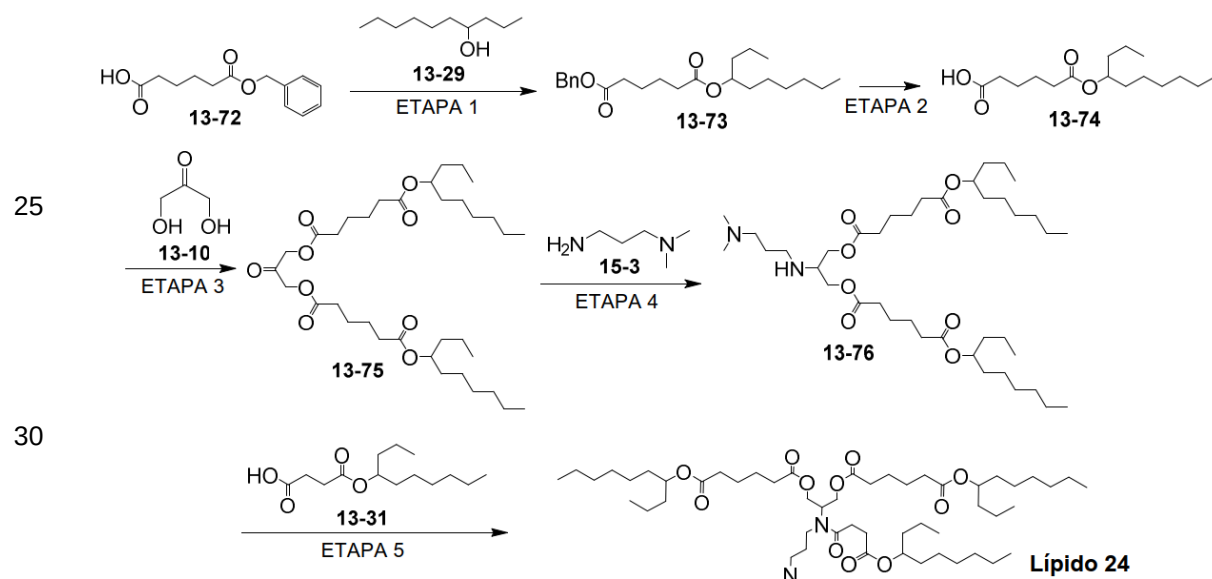
35 El lípido 23 se sintetizó como se proporciona en el esquema 26 a continuación. En resumen, La O-acilación de dihidroxiacetona con el ácido 13-31 usando las condiciones descritas en la síntesis del lípido 9 produjo la cetona 13-70. La aminación reductora de 13-70 con la amina 15-3 usando las condiciones descritas en la síntesis del lípido 9 produjo el intermedio 13-71. La N-acilación posterior del intermedio 13-71 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las utilizadas para la síntesis del lípido 9 proporcionó el lípido 23.



Esquema 26. Síntesis del lípido 23

Síntesis del lípido 24

15 El lípido 24 se sintetizó como se proporciona en el esquema 27 a continuación. En resumen, se accedió al ácido 13-34 mediante O-acilación del diácido monoprotectado 13-72 con el alcohol 13-29 y la posterior desprotección del intermedio 13-73 para producir ácido, 13-74. La O-acilación de dihidroxiacetona con el intermedio 13-74 usando las condiciones descritas en la síntesis del lípido 17 produjo 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 produjo el intermedio 13-76. La N-acilación posterior del intermedio 13-76 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las utilizadas para la síntesis del lípido 9 proporcionó el lípido 24.

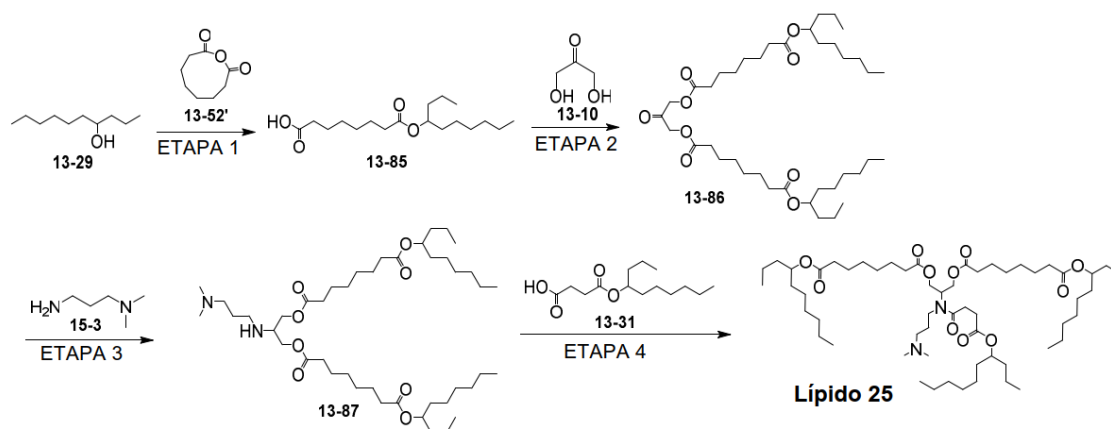


Esquema 27. Síntesis del lípido 24

Síntesis del lípido 25

35 El lípido 25 se sintetizó como se proporciona en el esquema 28 a continuación. En resumen, la adición de apertura del anillo del alcohol 13-29 al anhídrido cíclico 13-52' produjo el intermedio ácido 13-

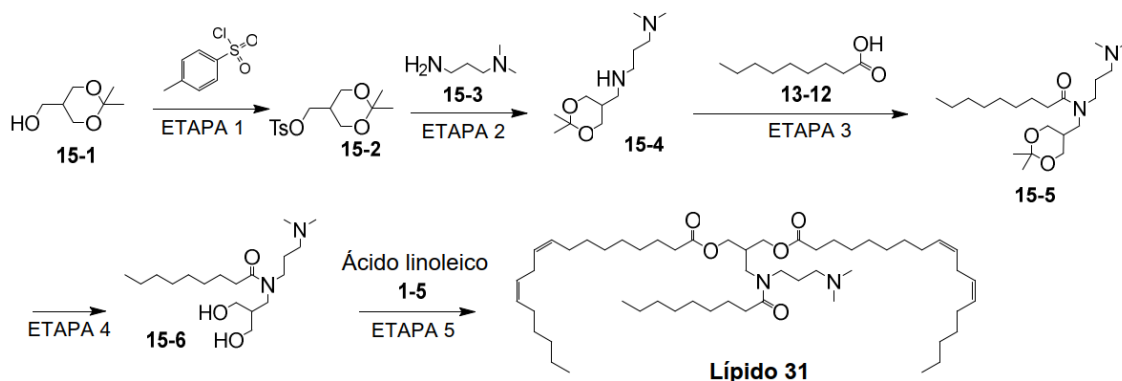
85. La O-acilación de dihidroxiacetona con el intermedio 13-85 usando las condiciones descritas en la síntesis del lípido 17 produjo la cetona 13-86. La aminación reductora de 13-86 con la amina 15-3 usando las condiciones descritas en la síntesis del lípido 17 produjo el intermedio 13-87. La N-acilación posterior del intermedio 13-87 con el ácido 13-31 usando condiciones análogas a las utilizadas para la síntesis del lípido 9 proporcionó el lípido 25.



Esquema 28. Síntesis del lípido 25

Síntesis del lípido 31

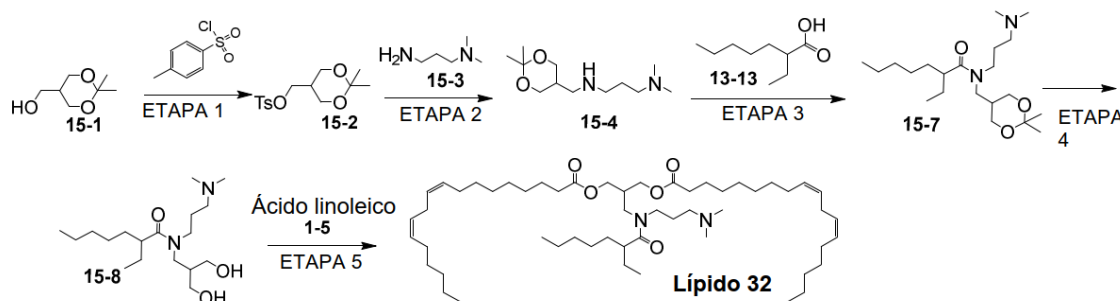
El lípido 31 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 29 a continuación y como sigue. El material de partida 15-1 (68 mmol, 10 g, 1 eq.) se trató con cloruro de p-toluenosulfonilo (70 mmol, 13.3 g, 1.03 eq.) usando piridina (80 mmol, 10.1 ml, 1.2 eq.) en 150 ml de DCM para obtener el intermedio protegido 15-2. El producto bruto se recrystalizó en acetato de etilo y hexano produciendo 20.4 g (99 %) del intermedio 15.2 puro. Se accedió al intermedio 15-4 mediante reacción de 15-2 (16.5 mmol, 5 g, 1.2 eq.) y diamina 15-3 (33 mmol, 3.35 g, 2 eq.) en 40 ml de dioxano en condiciones de reflujo. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 3.5 g (91 %) del intermedio puro 15-4. La N-acilación de 15-4 (108 mg, 0.268 mmol) usando ácido nonanoico 13-12 (0.67 mmol, 106 mg, 2.5 eq.) usando EDCI (0.67 mmol, 128 mg, 2.5 eq.) y DIEA (0.67 mmol, 86 mg, 2.5 eq.) y DMAP (3 mg) en 10 ml de DCM produjo la amina 15-5. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 113 mg (65 %) de diamina 15-5 purificada. Se accedió al intermedio diol 15-6 mediante desprotección de 15-5 (113 mg) en 4 ml de HCl 1 M y THF (1:3 v/v) a temperatura ambiente durante 8 horas con un rendimiento cuantitativo (102 mg). El intermedio 15-6 (0.3 mmol, 100 mg, 1 eq.) se aciló con ácido linoleico 1-5 (0.9 mmol, 250 mg, 3 eq.) usando EDCI (0.9 mmol, 172 mg, 3 eq.), DIPEA (0.9 mmol, 116 mg) y DMAP (10 mg, cantidad catalítica) para obtener el lípido 31. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna produciendo 120 mg (46 %) de lípido 31 puro (>99 % de pureza por LC-ELSD) y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la FIG. 5R-1 para el espectro de RMN del lípido 31, la FIG. 5R-2 para la LC-MS del lípido 31 y la tabla 4 para la masa del producto).



Esquema 29. Síntesis del lípido 31

Síntesis del lípido 32

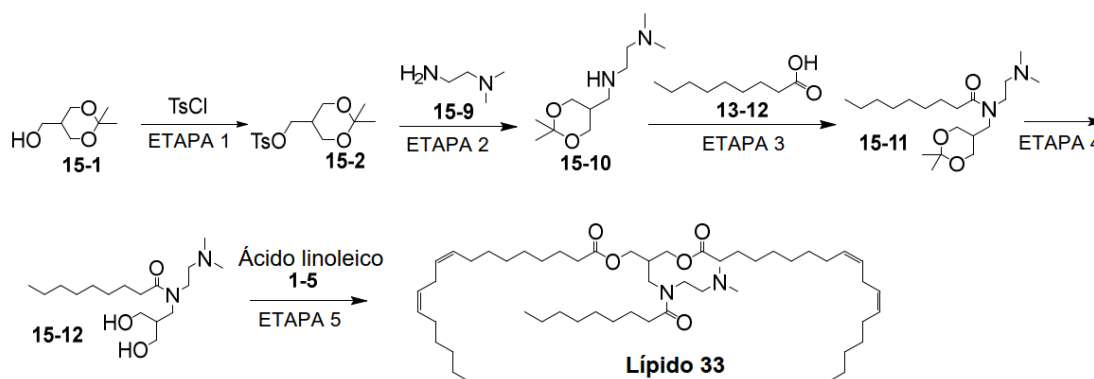
El lípido 32 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 30 a continuación y como sigue. El intermedio 15-4 se produjo como se describió anteriormente para el lípido 31 (etapas 1 y 2, esquema 30). La N-acilación de 15-4 (4.34 mmol, 1 g, 1.0 eq) usando ácido 2-etil heptanoico 13-13 (10.85 mmol, 1.71 g, 2.5 eq) usando EDCI (10.85 mmol, 2.07 g, 2.5 eq), DIEA (10.85 mmol, 1.40 g, 2.5 eq) y DMAP (10 mg) en 100 ml de DCM produjeron la amina 15-7. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna para obtener 724 mg (52 %) de diamina 15-7 purificada. Se accedió al intermedio diol 15-8 mediante desprotección de 15-7 (714 mg) en 3 ml de HCl 1 M y 7 ml de THF a temperatura ambiente durante 1 hora con un rendimiento cuantitativo. El intermedio 15-8 (1.9 mmol, 630 mg, 1 eq.) se aciló con ácido linoleico 1-5 (6.49 mmol, 1.82 g, 3.4 eq.) usando EDCI (6.49 mmol, 1.23 g, 3.4 eq.), DIPEA (6.49 mmol, 830 mg, 3.4 eq.) y DMAP (20 mg, cantidad catalítica) para obtener el lípido 32. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (4X) produciendo 27 mg de fracción pura (>98 % de pureza por LC-ELSD) del lípido 32 y se caracterizó por RMN de protones y espectrometría de masas (véase la **FIG. 5S-1** para el espectro de RMN del lípido 32, la **FIG. 5S-2** para la LC-MS del lípido 32 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 30. Síntesis del lípido 32

El lípido 33 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 31 a continuación y como sigue. Se tosiloó el material de partida 15-1 (34.3 mmol, 5 g, 1 eq.) usando cloruro de p-toluenosulfonilo, TsCl (6.52 g, 1 eq, 34.3 mmol) usando TEA (19.01 ml, 4 eq, 137 mmol) y DMAP (30 mg) en 200 ml de DCM. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para obtener 10.2 g (98 %) del

intermedio reactivo 15-2. El desplazamiento nucleófilo de 15-2 (10.0 mmol, 2.3 g, 1 eq.) con diamina 15-9 (9.24 mmol, 1.0 ml, 1.2 eq.) en 10 ml de dioxano (10 ml) produjo 1.6 g (97 %) del compuesto 15-10. La reacción de desplazamiento nucleófilo se repitió usando 15-2 (8.3 mmol, 2.5 g, 1 eq.) adicional y diamina 15-9 (9.9 mmol, 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 mediante cromatografía en columna para obtener un total de 1.7 g (~50 %) de 15-10 puro. La N-acilación de 15-10 (4.05 mmol, 875 mg, 1 eq.) con ácido nonanoico 13-12 (7.1 mmol, 1.24 ml, 1.8 eq.) usando EDCI (1.4 g, 1.8 eq, 7.1 mmol), DIPEA (1.3 ml, 1.8 eq, 7.1 mmol) y DMAP (90 mg, 0.2 eq, 0.81 mmol) en 8 ml de DCM produjo el intermedio 15-11. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) para obtener 230 mg (16 %) del intermedio puro 15-11. La desprotección de 15-11 (0.64 mmol, 230 mg, 1 eq.) en 5 ml de HCl 4 M en dioxano produjo el intermedio 15-12. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (1X) para obtener 74 mg (37 %) del intermedio puro 15-12. El intermedio 15-12 (0.24 mmol, 74 mg, 1 eq.) se aciló con ácido linoleico 1-5 (169 mg, 2.5 eq, 0.58 mmol) usando EDCI (120 mg, 2.5 eq, 0.58 mmol), DIPEA (102 µl, 2.5 eq, 0.58 mmol) y DMAP (6 mg, 0.2 eq, 0.048 mmol) en 5 ml de DCM para obtener el lípido 33. El producto bruto se purificó mediante 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 (véase la **FIG. 5T-1** para el espectro de RMN del lípido 33, la **FIG. 5T-2** para la LC-MS del lípido 33 y la **tabla 4** para la masa del producto).

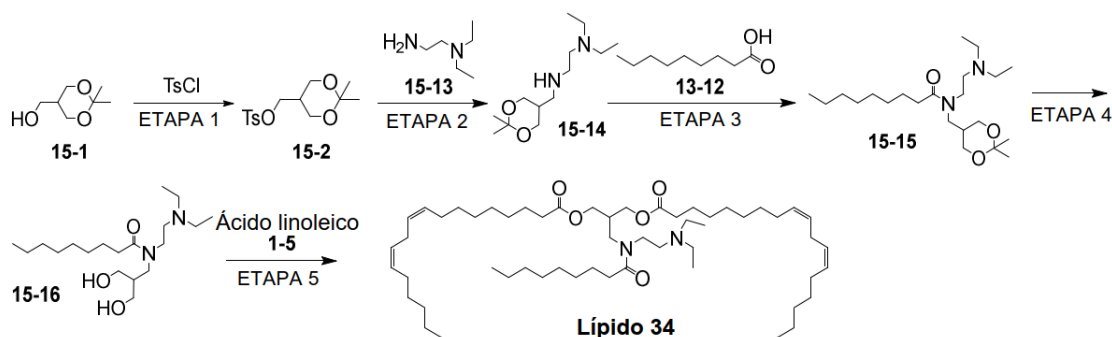


Esquema 31. Síntesis del lípido 33

Síntesis del lípido 34

El lípido 34 fue sintetizado como se proporciona en el esquema 32 a continuación y como sigue. Se accedió al Intermedio 15-2 como se ha descrito para el lípido 33. El desplazamiento nucleófilo de 15-2 (3.3 mmol, 1 g, 1 eq.) con diamina 15-13 (3.9 mmol, 0.46 ml, 1.2 eq.) en 6 ml de dioxano (10 ml) produjo 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 mmol, 620 mg, 1 eq.) con ácido nonanoico 13-12 (5.3 mmol, 915 µl, 2.0 eq.) usando EDCI (5.3 mmol, 1.06 g, 2.0 eq.), DIPEA (923 µl, 2.0 eq, 5.3 mmol) y DMAP (58 mg, 0.2 eq, 0.05 mmol) en 10 ml de DCM produjo el intermedio 15-15. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) para obtener 355 mg (35 %) del intermedio puro 15-15.

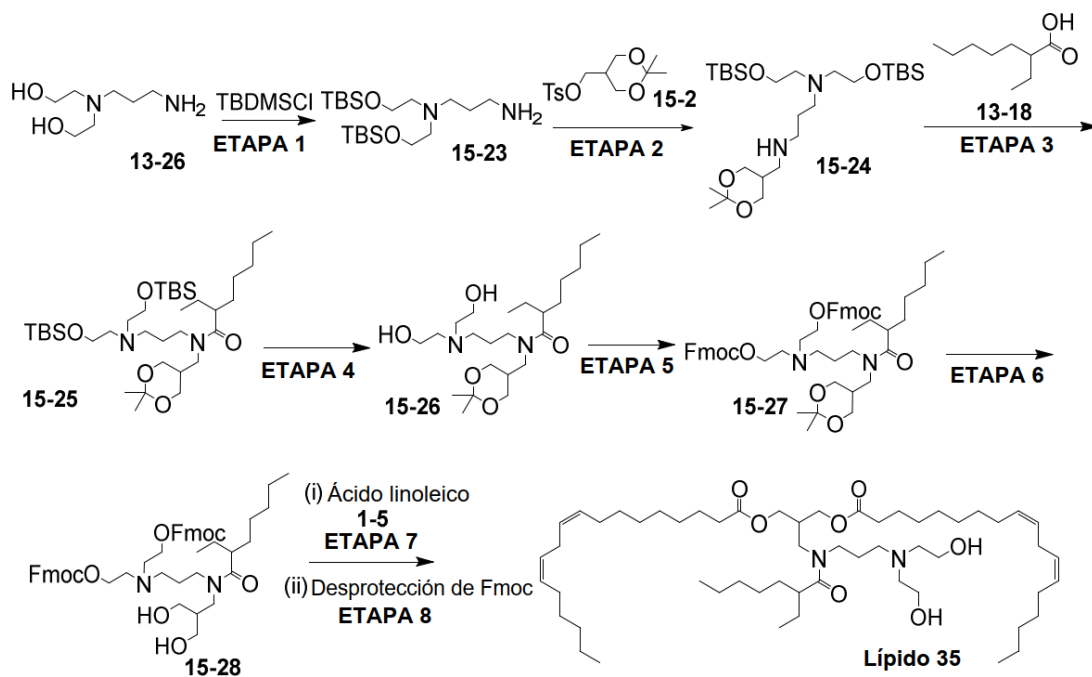
La desprotección de 15-15 (1.03 mmol, 355 mg, 1 eq.) en 7 ml de HCl 4 M en dioxano produjo el intermedio 15-16. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (2X) para obtener 40 mg (13 %) del intermedio puro 15-16. El intermedio 15-16 (0.116 mmol, 40 mg, 1 eq.) se aciló con ácido linoleico 1-5 (81 mg, 2.5 eq, 0.29 mmol) usando EDCI (55 mg, 2.5 eq, 0.29 mmol), DIPEA (3.2 μ l, 2.5 eq, 0.29 mmol) y DMAP (2 mg, 0.2 eq, 0.05 mmol) en 10 ml de DCM para obtener el lípido 34. El producto bruto se purificó mediante 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 (véase la **FIG. 5U-1** para el espectro de RMN del lípido 34, la **FIG. 5U-2** para la LC-MS del lípido 34 y la **tabla 4** para la masa del producto).



Esquema 32. Síntesis del lípido 34

Síntesis del lípido 35

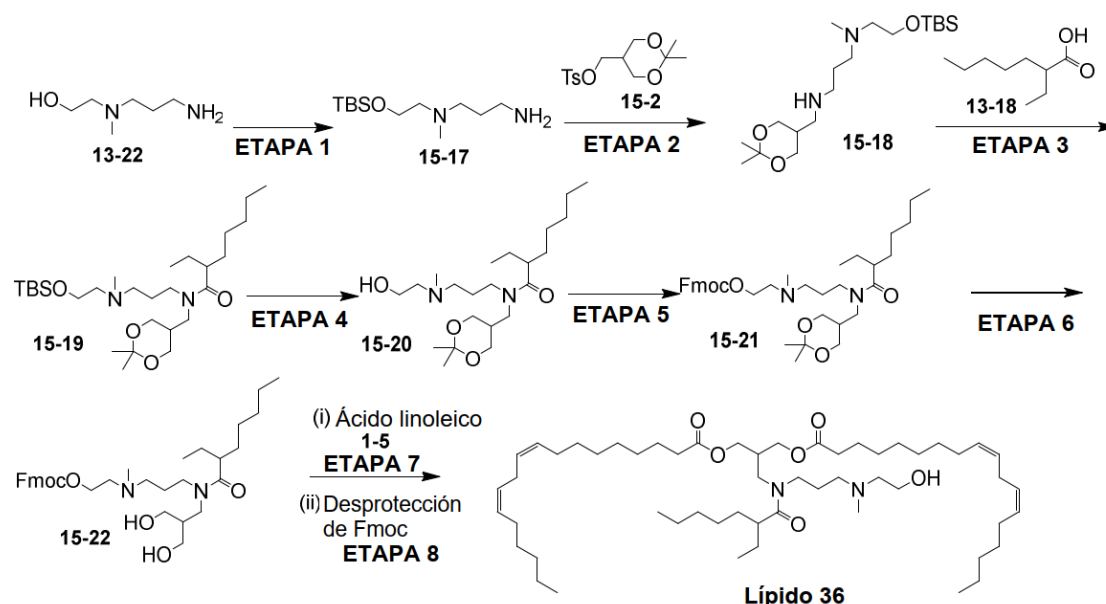
El lípido 35 se sintetizó como se proporciona en el esquema 35 a continuación.



Esquema 33. Síntesis del lípido 35

Síntesis del lípido 36

El lípido 36 se sintetizó como se proporciona en el esquema 36 a continuación.



Esquema 36. Síntesis del lípido 36

Ejemplo 2: Preparación de NPL mediante mezcla de microfluidos utilizando lípidos ionizables ilustrativos

Se produjeron NPL ilustrativas utilizando el lípido 9 catiónico y el lípido 15 catiónico como se han sintetizado en el ejemplo 1.

Las NPL que encapsulan una carga útil de ARNm se prepararon mezclando una solución acuosa de ARNm y una solución de mezcla etanólica de lípidos (que contiene lípido ionizable, DSPC, DPG-PEG y colesterol en las relaciones de lípidos que se muestran en **tabla 5**) utilizando un proceso de mezcla de microfluidos en línea. El ARNm (ARNm que codifica eGFP, TriLink Biotechnologies, California, EE. UU.) se diluyó en tampón de acetato de pH 4 (produciendo una solución de ARNm de 133 µg/ml) en tampón de acetato de pH 4 21.7 mM. Los componentes lipídicos se disolvieron en etanol anhidro en las relaciones relativas establecidas en la **tabla 5** a continuación.

Tabla 5. Relaciones de componentes lipídicos en NPL.

Lípido	Fuente	Relación de lípido con respecto a ARNm (nmol de lípidos/100 µg de ARNm)	Concentración en solución lipídica (mM)	Composición lipídica teórica de NPL (% molar)
Lípido catiónico ionizable	-	1500	6	49.2

Lípido	Fuente	Relación de lípido con respecto a ARNm (nmol de lípidos/100 µg de ARNm)	Concentración en solución lipídica (mM)	Composición lipídica teórica de NPL (% molar)
Colesterol	Dishman Netherlands	1200	4.8	39.4
DSPC	Avanti Polar Lipids, Alabama, EE. UU.	300	1.2	9.8
DPG-PEG(2000)	NOF America, Nueva York, EE. UU.	46	0.18	1.5
DiIc18(5)-DS	Invitrogen, Massachusetts, EE. UU.	1.8	0.007	0.06

Las soluciones de ARNm y lípidos se mezclaron utilizando un dispositivo de mezcla de microfluidos NanoAssemblr Ignite (n.º de pieza NIN0001) y un cartucho de mezcla NxGen (n.º de pieza NIN0002) de Precision Nanosystems Inc. (Columbia Británica, CA). En resumen, cada una de las soluciones de ARNm y lípidos se cargaron en jeringas de polipropileno separadas. Se insertó un cartucho de mezcla en el NanoAssemblr Ignite y las jeringas se montaron directamente en las boquillas Luer del cartucho de mezcla. A continuación, las dos soluciones se mezclaron en una relación 3:1 v/v de solución de ARNm con respecto a solución de lípidos 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 de mezclar, se realizaron la eliminación del etanol y el intercambio de tampón en la suspensión de NPL resultante mediante un proceso de diafiltración discontinuo. Un dispositivo de ultrafiltración centrífuga con membrana de celulosa regenerada con PCPM de 100.000 kDa (Amicon Ultra-15, MilliporeSigma, Massachusetts, EE. UU.) se desinfectó con una solución de etanol al 70 % y después 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 NPL en el dispositivo y se centrifugó a 500 FCR hasta que el volumen se redujo a la mitad. A continuación, la suspensión se diluyó con tampón de intercambio (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 discontinuas. A continuación, la suspensión de NPL se intercambi6 por MBS (tamp6n MES 25 mM, pH 6.5, con 150 ml de NaCl) diluyendo diez veces con MBS y centrifugando a 500 FCR hasta que el volumen se redujo en una d6cima parte. Esta etapa de diluci6n diez veces con MBS y concentraci6n diez veces se repiti6 una vez m6s. El retenido que contenía las NPL en MBS se recuper6 del dispositivo de ultrafiltraci6n centrífuga y se almacen6 a 4 °C hasta su uso posterior.

Ejemplo 3: Caracterizaci6n de NPL

Este ejemplo describe la caracterizaci6n de NPL (p. ej., NPL que comprenden un lípido cati6nico ionizable, donde el lípido cati6nico ionizable es KC3 o lípido 15) producido seg6n los m6todos descritos en el ejemplo 2.

Se caracterizaron muestras de las NPL 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 determin6 mediante dispersi6n dinámica de la luz (DLS) utilizando un Zetasizer modelo ZEN3600 (Malvern Pananalytical, Reino Unido). El potencial zeta se midi6 en tamp6n MES 5 mM pH 5.5 y tamp6n HEPES 5 mM pH 7.4 mediante electroforesis de láser Doppler utilizando el Zetasizer.

El contenido de ARN de las nanopartículas se mide utilizando el kit de ensayo de ARN Thermo Fisher Quant-iT RiboGreen. El ARN accesible al colorante, que incluye tanto ARN sin encapsular como ARN accesible en la superficie de las NPL, se mide diluyendo las nanopartículas a aproximadamente 1 µg/ml de ARNm usando soluci6n salina tamponada con HEPES y ańadiendo a continuaci6n reactivo Quant-iT a la mezcla. El contenido total de ARN se mide desestabilizando una suspensi6n de nanopartículas mediante diluci6n del lote de reserva de NPL (normalmente a ≥40 µg/ml de ARN) en una soluci6n de Triton al 0.5 % en soluci6n salina tamponada con HEPES para obtener una soluci6n de ARN de 1 µg/ml (concentraci6n nominal final basada en los valores de entrada de la formulaci6n) y posterior calentamiento a 60 °C durante 30 minutos seguido de la adici6n del reactivo Quant-It. El ARN se cuantifica midiendo la fluorescencia a 485/535 nm y la concentraci6n se determina en relaci6n con una curva patr6n de ARN procesada simultáneamente.

Ejemplo 4. Preparaci6n de conjugados para permitir el direccionamiento a células madre hematopoyéticas (CMH)

Este ejemplo describe un m6todo para la producci6n de conjugados de lípido-grupo de direccionamiento a CMH para su incorporaci6n en NPL dirigidas a CMH (p. ej., NPL que comprenden un lípido cati6nico ionizable, donde el lípido cati6nico ionizable es KC3 o lípido 15).

Se conjugaron Fab y anticuerpos de longitud completa que se unen a dianas específcas de CMH (CD117, CD105 y CD34) con DSPE-PEG(2k)-maleimida mediante acoplamiento covalente entre el grupo maleimida y una cisteína C-terminal en la cadena pesada (HC). La proteína (3-4 mg/ml), despu6s del intercambio de tamp6n a tamp6n fosfato de pH 7 sin oxígeno, se redujo en TCEP 0.2 mM en tamp6n fosfato de pH 7 sin oxígeno durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La proteína reducida se aisl6 usando una

columna de SEC de 40 kDa para eliminar TCEP y el tampón se intercambi6 por un tamp6n de fosfato de pH 7 sin ox6geno nuevo.

La reacci6n de conjugaci6n se inici6 mediante la adici6n de una suspensi6n micelar de 10 mg/ml de DSPE-PEG-maleimida (Avanti Polar Lipids, Alabama, EE. UU.) y 30 mg/ml de DSPE-PEG-OCH₃ (L6pidos polares Avanti, Alabama, EE. UU.) (se utiliza una relaci6n de peso de 1:1 a 1:3 dependiendo de la prote6na) en tamp6n de citrato de pH 5.7 sin ox6geno (citrato 1 mM). La soluci6n de prote6na se concentr6 a –3 - 4 mg/ml utilizando una membrana de celulosa regenerada de 10 kDa y posteriormente se intercambi6 el tamp6n por un tamp6n de fosfato de pH 7 sin ox6geno utilizando una columna de exclusi6n por tama6o de 40 kDa. La reacci6n de conjugaci6n se llev6 a cabo utilizando 2 – 4 mg/ml de prote6na y un exceso de 3.5 moles de maleimida a 37 °C durante 2 horas, seguido de incubaci6n a temperatura ambiente durante –2 a 16 horas adicionales.

La producci6n del conjugado resultante se control6 mediante HPLC y la reacci6n se detuvo en ciste6na 1.5 mM. El conjugado resultante (DSPE-PEG(2k)-Fab anti-hSP34) se aisl6 usando una filtraci6n por membrana de celulosa regenerada Millipore de 100 kDa usando tamp6n salino HEPES de pH 7.4 (HEPES 25 mM, NaCl 150 mM) y se almacen6 a 4 °C antes de su uso. Despu6s de la desactivaci6n, la composici6n micelar final consiste en una mezcla de DSPE-PEG-Fab, DSPE-PEG-maleimida (terminada en ciste6na) y DSPE-PEG-OCH₃. La relaci6n de los tres componentes fue DSPE-PEG-Fab: DSPE-PEG-maleimida (terminada en ciste6na): DSPE-PEG-OCH₃ = 1:2.45:3.45-10.35 (por mol)).

Ejemplo 5: Preparaci6n de NPL que contienen grupos de direccionamiento a CMH

Este ejemplo describe un m6todo ilustrativo para la incorporaci6n de un conjugado lip6dico del grupo de direccionamiento a CMH en una NPL preformada (p. ej., una NPL que comprende un l6pido cati6nico ionizable, en donde el l6pido cati6nico ionizable es KC3 o l6pido 15).

Las NPL del ejemplo 2 y los conjugados del grupo de direccionamiento a CMH preparados usando los m6todos descritos en el ejemplo 4 se combinaron en un tubo Eppendorf. Los tubos se agitaron en v6rtex durante 10 segundos a 2500 rpm. Los tubos Eppendorf se colocaron en el ThermoMixer a 60 °C a 300 rpm durante 1 hora. La suspensi6n de NPL dirigidas resultante se almacen6 posteriormente a 4 °C hasta su uso o, como alternativa, se almacen6 congelada despu6s de la reconstituci6n en medio de sacarosa a una concentraci6n final de sacarosa del 9.6 % en peso mediante diluci6n utilizando el volumen adecuado de una soluci6n madre de sacarosa al 50 % en peso (en soluci6n salina con tamp6n HEPES; HEPES 25 mM, NaCl 150 mM)) y se almacen6 congelada a -80 °C.

Ejemplo 6: Preparaci6n de NPL mediante mezcla en l6nea de microfluidos y filtraci6n de flujo tangencial utilizando un l6pido ionizable ilustrativo

Este ejemplo describe la preparaci6n de NPL (p. ej., NPL que comprenden un l6pido cati6nico ionizable, en donde el l6pido cati6nico ionizable es KC3 o l6pido 15) usando operaciones unitarias ampliables, concretamente, mezcla de microfluidos en l6nea seguida de filtraci6n de flujo tangencial (TFF) para la eliminaci6n de etanol y el intercambio de tamp6n.

Usando el proceso de mezcla del ejemplo 2, se produjo una mezcla de NPL con un total de 12 ml a una concentración de ARN de 300 µg/ml. Posteriormente se realizó la eliminación del etanol y el intercambio del tampón mediante filtración de flujo tangencial (TFF).

Después de mezclar, se realizaron la eliminación del etanol y el intercambio del tampón en la suspensión de NPL resultante utilizando un módulo de TFF de fibra hueca (Repligen, US P/N C02-E300-05-N). En resumen, el módulo de TFF se enjuagó con agua desionizada y se secó por bombeo antes de su uso. A continuación, se añadieron NPL al depósito y el tampón de intercambio (tampón HEPES 25 mM pH 7.4 con NaCl 150 mM) se usó como tampón de diafiltración. Se cebó el módulo de TFF y a continuación se iniciaron las diafiltraciones (DV) aumentando la bomba peristáltica hasta alcanzar el caudal objetivo y ajustando la válvula de retenido hasta alcanzar la presión transmembrana objetivo (PTM). Los parámetros operativos objetivo para el sistema una vez que se inició la diafiltración fueron un caudal de 35 ml/min y una PTM de 24.132 kPa (3.5 psi). Durante todo el proceso de diafiltración, la PTM se mantuvo constante ajustando la válvula de retenido. Se supervisó el caudal de permeado y este no disminuyó significativamente con el tiempo. Se realizaron seis diafiltraciones, con muestras reservadas al final de cada diafiltración para rastrear posteriormente el proceso de intercambio de tampón. El contenido final de etanol fue < 0.1 %, según lo medido mediante mediciones del índice de refracción en muestras de DV, y las mediciones de pH confirmaron el intercambio de tampón por el tampón de intercambio. Tras realizar seis diafiltraciones, se detuvo la bomba y posteriormente se realizó una concentración de la suspensión de NPL resultante.

La concentración de la suspensión de NPL se realizó utilizando el mismo módulo de TFF que se utilizó durante el proceso de intercambio de tampón. La PTM y el caudal (tras el aumento de la bomba) durante el proceso de intercambio de tampón se mantuvieron y se permitió que la suspensión se concentrara deteniendo la adición del depósito de retenido del tampón de diafiltración. La suspensión de NPL resultante se recogió y se filtró con un filtro de jeringa de 0.2 µm. Se tomaron muestras de la suspensión con fines analíticos y después se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

Utilizando el proceso de caracterización de NPL en el ejemplo 3, el lote de NPL se caracterizó para determinar el diámetro hidrodinámico promedio y el contenido de ARNm (total y accesible al colorante). El proceso de mezcla de microfluidos con eliminación de etanol e intercambio de tampón mediante TFF da lugar a partículas de menos de 100 nm que presentan una polidispersión limitada y una buena encapsulación de ARNm (<20 % de ARN accesible al colorante).

Ejemplo 7: Método para determinar la pKa aparente de NPL utilizando la sonda fluorescente de toluidinil-naftaleno sulfonato (TNS)

Este ejemplo describe el método basado en colorante fluorescente utilizado para medir la pK_a aparente de las nanopartículas lipídicas (p. ej., NPL que comprenden un lípido catiónico ionizable, en donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o lípido 15). La pK_a aparente determina la carga superficial de las nanopartículas en condiciones de pH fisiológico, normalmente un valor de pK_a en el intervalo de pH endosómico (6 – 7.4) da lugar a NPL que son neutras o ligeramente cargadas en el plasma o el espacio extracelular (pH 7.4) y se vuelven muy positivas en ambientes endosómicos ácidos. Esta carga superficial

positiva impulsa la fusión de la superficie de NPL con membranas endosómicas con carga negativa, lo que da lugar a la desestabilización y ruptura del compartimento endosómico y el escape de NPL hacia el compartimento citosólico, una etapa crítica en el suministro citosólico de ARNm y expresión de proteínas mediante la participación de la maquinaria ribosómica de las células.

La pK_a aparente de las NPL se determina mediante la medición de la fluorescencia del ácido 6-(p-toluidino)-2-naftalenosulfónico (TNS) en tampones acuosos que abarca un intervalo 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 con una nanopartícula lipídica con carga positiva. A valores de pH inferiores a la pK_a de la nanopartícula, la carga superficial positiva de NPL da lugar al reclutamiento de colorante en la interfaz de la partícula, lo que da lugar a fluorescencia de TNS. A valores de pH superiores a la pK_a de NPL, la carga superficial de las NPL se neutraliza y el colorante TNS se disocia de la interfaz de la partícula, lo que provoca pérdida de la señal de fluorescencia. La pK_a aparente de la NPL se comunica como el pH en el que la fluorescencia está al 50 % de su máximo, según lo determinado mediante un ajuste de curva logística de cuatro puntos.

Ejemplo 8: Metodología general de formulación y caracterización fisicoquímica para NPL que encapsulan ARNm basados en los lípidos 1-8, 9-15 y 31-34

Se formularon nanopartículas lipídicas (NPL) (p. ej., NPL que comprenden un lípido catiónico ionizable, en donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o lípido 15) que portan un ácido nucleico mediante un proceso de mezcla de microfluidos usando composiciones de lípidos y disolventes descritas en los ejemplos 2 y 6 anteriores y se intercambió el tampón por solución salina con tampón HEPES de pH 7.4 (lo que dio lugar a la eliminación de etanol y el ajuste del pH) utilizando dispositivos de filtro de membrana de ultrafiltración centrífuga o un proceso de filtración de flujo tangencial (TFF); y se caracterizaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) para tamaño hidrodinámico (diámetro, nm), polidispersión (PDI) y carga a pH 5.5 y pH 7.4 (potencial Zeta, mV). La eficacia de encapsulación de ARNm (porcentaje de ARN accesible al colorante) y el contenido total de ARNm (ug/ml de ARN en suspensión de NPL) se determinaron utilizando los métodos descritos en el ejemplo 3. Posteriormente se intercambió el tampón de las NPL formuladas con tampón en solución salina con tampón MES de pH 6.5 y la distribución de tamaño se volvió a caracterizar mediante DLS antes de mezclar con la cantidad deseada de conjugado de anticuerpo dirigido (véase el ejemplo 5) y se incubó a 37 °C durante 4 horas para facilitar la inserción de anticuerpos (usando el proceso descrito en el ejemplo 5) lo que dio lugar a NPL finales dirigidas por anticuerpos. Las NPL dirigidas obtenidas se esterilizaron por filtración y se caracterizaron por DLS (tamaño (nm) y PDI) utilizando los métodos descritos en el ejemplo 3.

Ejemplo 9: Preparación de NPL mediante mezcla en vórtex utilizando lípidos ionizables ilustrativos

Este ejemplo proporciona un método ilustrativo adicional para producir NPL usando lípidos catiónicos ionizables ilustrativos (p. ej., los sintetizados en el ejemplo 1 o lípidos catiónicos disponibles en el mercado, tales como KC3 o lípido 15).

Las NPL se crearon con una carga útil de ARNm encapsulado y una mezcla de lípidos mezclando en vórtex una solución acuosa de ARNm y una solución lipídica etanólica. El ARNm (una mezcla 9:1 p/p

de ARNm que codifica eGFP y ARNm de eGFP marcado con Cy5, TriLink Biotechnologies, California, EE. UU.) se mezcló con tampón de acetato de pH 4 para proporcionar una solución acuosa final de ARNm que contenía 133 µg/ml de ARNm y tampón de acetato 21.7 mM. Los componentes lipídicos se disolvieron en etanol anhidro en las relaciones relativas.

En resumen, la solución de ARNm (375 µl) se transfirió a un tubo de centrífuga de fondo cónico y la solución de lípidos (125 µl) se añadió rápidamente al tubo que contenía la solución de ARNm (relación 3:1 v/v de solución de ARNm con respecto a solución de lípidos). El tubo que contenía la mezcla se tapó inmediatamente y se agitó en vórtex durante 15 s a 2500 rpm, seguido de incubación a temperatura ambiente durante no menos de 5 minutos antes de proceder a la eliminación del etanol y al intercambio del tampón.

Después de mezclar, se realizaron la eliminación del etanol y el intercambio del tampón en la suspensión de NPL resultante usando una columna SEC empaquetada con resina Sephadex G-25 (PD MiniTrap G-25, Cytiva, Massachusetts, EE. UU.), por flujo de gravedad. En resumen, la columna SEC se enjuagó cinco veces con 2.5 ml de tampón de intercambio (tampón HEPES 25 mM pH 7.4 con NaCl 150 mM) antes de cargar 425 µl de suspensión de NPL. Una vez que la suspensión de NPL se trasladó completamente al lecho de resina, se aplicó un volumen de relleno de 75 µl de tampón de intercambio a la columna para lograr el volumen de carga objetivo especificado de la columna y maximizar la recuperación, según las especificaciones del fabricante. Después de introducirse el relleno completamente en el lecho de resina, la columna SEC se transfirió a un nuevo tubo de centrífuga y la suspensión de NPL se eluyó añadiendo 1.0 ml de tampón de intercambio a la columna. El eluato que contenía las NPL en el tampón de intercambio se recuperó y se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

EJEMPLO 10: CONSTRUCCIÓN Y DETECCIÓN DE NPL CONJUGADAS CON FAB PARA LA TRANSFECCIÓN DE CMH

En este ejemplo, se formularon nanopartículas lipídicas (NPL) (p. ej., NPL que comprenden un lípido catiónico ionizable, en donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o lípido 15), se conjugaron con 23 Fab diferentes dirigidos a células madre hematopoyéticas (CMH) y anticuerpos de longitud completa, y se analizaron para detectar la transfección de CMH. Tres de los conjugados de NPL-Fab transfectaron con éxito CMH primarias.

Métodos de crecimiento y descongelación de CMH

El medio de CMH se preparó utilizando medio SFEM II de StemCell™ Technologies como medio base. El medio SFEM II se complementó con el complemento de expansión CD34+ para realizar la formulación final del medio de CMH. Se descongelaron crioviales de 10 millones de CMH humanas primarias (aisladas de un leucopak de pacientes movilizados con G-CSF y Plerixaflor) utilizando medios de CMH. Después de descongelar, se añadió gota a gota 1 ml de medio al vial y se transfirió todo el volumen a un tubo cónico de 15 ml. Se añadieron 8 ml de medio adicional a la suspensión celular y se contó el número total de células usando un citómetro automático NC-202™. Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 1 millón de células por 1 ml de medio. Las células se cultivaron en el matraz adecuado durante 3 días. El día 3 del cultivo, las células se contaron de nuevo en el NC-202™. Se añadió medio de CMH nuevo al cultivo celular para devolver la concentración de CMH a 1 millón de

células por 1 ml de medio. El día 4 del cultivo, las CMH se recogieron para la transfección utilizando las NPL.

Métodos de tratamiento in vitro con NPL

El día del tratamiento con NPL, las CMH se recogieron y se resuspendieron en medio de CMH nuevo a una concentración de 75.000 células por 100 μ l. Se siembran 30.000 células en 40 μ l en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las NPL se añaden a las células en la dosis indicada. Después de añadir las NPL, se añadió medio de CMH a los pocillos para llevar el volumen total de los cultivos a 100 μ l.

El día del tratamiento con NPL, las CMH también se tiñeron para CD34 y CD117 (CD34 es un marcador de CMH ubicuo y CD117 es un marcador de CMH a largo plazo) para determinar la pureza del cultivo después de la expansión de CMH. Después de la tinción, las células se analizaron mediante citometría de flujo y se cuantificaron las células CD34+CD117+.

Formulación y conjugación de NPL

Las NPL se formularon como se ha descrito en el ejemplo 2 usando lípido catiónico ionizable DLin-KC3-DMA (KC3) disponible en el mercado, con la excepción de que las NPL se dejaron en HBS al omitir el intercambio a MBS descrito en el ejemplo 2. Las NPL de KC3 se formularon por primera vez con ARNm de GFP para identificar un anticuerpo que pudiera transfectar con éxito las CMH con ARNm. El ARNm de GFP se obtuvo de TriLink BioSciences y se modificó con N-1-metil pseudouridina. Las NPL resultantes se caracterizaron como se ha descrito en el ejemplo 3 y los resultados se proporcionan en la **tabla 6** a continuación.

Tabla 6. Resultados de la caracterización de NPL.

Número de lote	Z- Promedio de DLS Diámetro (nm)	DLS PDI	Potencial zeta a pH 5.5 (mV)	Potencial zeta a pH 7.4 (mV)	ARNm accesible al colorante (%)
EXP22002243-N01H	87	0.12	19.3	3.8	9.9

Usando los métodos descritos en los ejemplos 4 y 5, las NPL de KC3 que encapsulan el ARNm de GFP se conjugaron con 23 Fab y combinaciones de anticuerpos de longitud completa obtenidas comercialmente en 3 densidades de Fab/anticuerpo que se dirigen a marcadores específicos de la superficie celular de las CMH, incluidos CD34, CD105 y CD117 (**tabla 7**). Para conjugación con anticuerpos de longitud completa, las NPL se fusionaron con un resto de estreptavidina y los anticuerpos conjugados de tamaño completo se marcaron con biotina. De manera específica, los grupos lisina de la estreptavidina se hicieron reaccionar con el reactivo de Traut para unir covalentemente grupos tiol. A continuación, se conjugó la estreptavidina tiolada con DSPE-PEG(2k)-maleimida mediante acoplamiento covalente entre el grupo maleimida y los grupos tiol unidos a la estreptavidina. A continuación, se hizo reaccionar el lípido

fusionado con estreptavidina con el anticuerpo biotinilado. Finalmente, el conjugado lípido-estreptavidina-anticuerpo se insertó en la NPL mediante incubación a 60 °C durante 1 hora. Las NPL también incorporaron un colorante lipídico fluorescente, ácido ',1'-Dioctadecil-3,',3',3'-Tetrametilindocarbocianina-5,5'-Disulfónico (DiIC(18)5-DS). El ARNm de GFP se utilizó para medir la transfección, ya que el ARNm debe entrar en la célula y escapar del endosoma para transcribirse en proteína, lo que permite la fluorescencia. El DiIC(18)5-DS se utilizó como medida del direccionamiento de las NPL porque las células tendrán fluorescencia de Dil siempre que las NPL sean capaces de unirse a las CMH. Por lo tanto, la expresión de GFP proporcionó una medida de la transfección de NPL, mientras que los acontecimientos positivos de Dil fueron representativos de Fab que se dirigen a las CMH. Las CMH se trataron con las NPL a una concentración de ARN constante de 1 µg/ml. Las CMH se incubaron con las NPL durante 24 y 72 horas, después de lo cual se midieron la fluorescencia de GFP y la fluorescencia de Dil mediante citometría de flujo.

Tabla 7. Anticuerpos dirigidos a CMH probados en la exploración.

	Modalidad	Conjugado	Densidad de Fab
15	Fab	Fab Ab3 anti-HuCD105 bDS	5
	Fab	Fab Ab3 anti-HuCD105 bDS	15
	Fab	Fab VH2/VL2 muRH105 anti-HuCD105 bDS	5
	Fab	Fab VH2/VL2 muRH105 anti-HuCD105 bDS	15
20	Fab	Mezcla de Fab Ab3 anti-HuCD105 bDS y Fab VH2/VL2 muRH105 anti-HuCD105 bDS	5
	Fab	Mezcla de Fab Ab3 anti-HuCD105 bDS y Fab VH2/VL2 muRH105 anti-HuCD105 bDS	15
	Fab	Fab Ab2 anti-HuCD117 bDS	5
	Fab	Fab Ab2 anti-HuCD117 bDS	15
25	Fab	Fab Ab2 anti-HuCD117 bDS	45
	Fab	Fab Ab55 anti-HuCD117 bDS	5
	Fab	Fab Ab55 anti-HuCD117 bDS	15
	Fab	Fab Ab55 anti-HuCD117 bDS	45
30	Fab	Fab Ab1 anti-HuCD117 bDS	5
	Fab	Fab Ab1 anti-HuCD117 bDS	15
	Fab	Fab Ab1 anti-HuCD117 bDS	45
	Fab	Fab CK6 anti-HuCD117 bDS	5
35	Fab	Fab CK6 anti-HuCD117 bDS	15
	Fab	Fab CK6 anti-HuCD117 bDS	45
	Fab	Fab hSR-1 anti-HuCD117 bDS	5

	Modalidad	Conjugado	Densidad de Fab
5	Fab	Fab hSR-1 anti-HuCD117 bDS	15
	Fab	Fab hSR-1 anti-HuCD117 bDS	45
	Fab	Fab 6LUN1 anti-HuCD117 bDS	5
	Fab	Fab 6LUN1 anti-HuCD117 bDS	15
	Fab	Fab 6LUN1 anti-HuCD117 bDS	45
10	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon 581)	5
	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon 581)	15
	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon 581)	45
	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon QBEND/10)	5
	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon QBEND/10)	15
15	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon QBEND/10)	45
	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon 4H11)	5
	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon 4H11)	15
	Ig	Biotina anti-HuCD34 (Clon 4H11)	45
	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon 43A3)	5
20	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon 43A3)	15
	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon 43A3)	45
	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon 166707)	5
	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon 166707)	15
	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon 166707)	45
25	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon MEM-229)	5
	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon MEM-229)	15
	Ig	Biotina anti-HuCD105 (Clon MEM-229)	45
	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon 104D2)	5
	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon 104D2)	15
30	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon 104D2)	45
	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon A3C6E2)	5
	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon A3C6E2)	15
	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon A3C6E2)	45
	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon OTI3F9)	5
35	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon OTI3F9)	15
	Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon OTI3F9)	45

Modalidad	Conjugado	Densidad de Fab
Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon BA7.3C.9)	5
Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon BA7.3C.9)	15
Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon BA7.3C.9)	45
Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon B-K15)	5
Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon B-K15)	15
Ig	Biotina anti-HuCD117 (Clon B-K15)	45

Resultados

Múltiples combinaciones de Fab-NPL y anticuerpo-NPL se dirigieron a CMH (**FIGS. 6A-6D**), como lo indica la fluorescencia de Dil positiva. Sin embargo, solo tres Fab-NPL, i) Fab Ab1 anti-HuCD117 bDS, ii) Fab Ab2 anti-HuCD117 bDS y iii) Fab Ab3 anti-HuCD105 bDS, CMH primarias transfectadas con éxito con ARNm, como lo muestra la fluorescencia de GFP y Dil (**FIGS. 7A-7D**). Un único clon anti-CD117 tuvo la mayor eficiencia de transfección (Ab1) (**FIG. 8**).

EJEMPLO 11: MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CMH UTILIZANDO EL CONJUGADO NPL-FAB

En este ejemplo, se utilizaron conjugados de NPL-Fab dirigidos a CMH que encapsulaban un sistema de edición CRISPR-Cas para modificar genéticamente el gen de CD45 de las CMH. Se observó la inducción de cortes de doble cadena en los genes de CD45 y la supresión de la expresión de CD45.

Las formulaciones de NPL (p. ej., NPL que comprenden un lípido catiónico ionizable, en donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o lípido 15) conjugadas con o sin Ab1 se usaron para encapsular el ARNm de Cas9 con un ARNg específico para CD45 (un marcador de superficie celular de CMH sustituto que se puede medir de forma fiable mediante citometría de flujo). El ARNm de Cas9 se obtuvo de TriLink Biosciences y el ARNg se obtuvo de Integrated DNA Technologies (IDT). Las NPL se formularon y conjugaron con Ab1 usando los métodos descritos en los ejemplos 2 y 4-5. La relación de ARNm de Cas9 con respecto a ARNg dentro de las NPL fue de 1:1. Para optimizar el ARNg para edición por CRISPR basada en NPL, se utilizó un patrón de modificación química que incorpora enlaces fosforotioato y sustituciones 2'-O-metilo con el ARNm de Cas9 encapsulado. Se trataron CMH humanas primarias con estas NPL en un intervalo de dosis de 100 a 800 ng de ARN total durante 7 días usando los métodos descritos en el ejemplo 1.

El día 7 después de la transfección, las CMH se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra CD45, CD34 y CD117. La fluorescencia de cada proteína se cuantificó mediante citometría de flujo. Se utilizaron CD34 y CD117 para definir las poblaciones de CMH. Se utilizó la fluorescencia de CD45 para definir la inactivación de CD45. Mediante la incorporación de las estrategias anteriores para permitir el direccionamiento de NPL y la edición de ARNm CRISPR, la proteína CD45 se redujo en CMH humanas primarias siete días después de la dosificación de NPL dirigidas *in vitro*. Los resultados de KC3 se muestran en las **FIGS. 9A-9B** y los resultados del lípido 15 se muestran en las **FIGS. 10A-10B**.

Adicionalmente, el día 7 después de la transfección, las CMH se recogieron para la secuenciación de próxima generación (NGS) para cuantificar la tasa de indel en el locus genómico diana de Cas9 y el ARNg de CD45 mediante secuenciación de amplicones dirigida. Para la secuenciación de amplicones, los cebadores se diseñaron para abarcar una región de 300 pares de bases alrededor del sitio de corte específico del ARNg de CD45 utilizado. Después de la amplificación, las secuencias de 300 pares de bases se cuantificaron utilizando un Illumina MiSeq. El tratamiento con NPL CRISPR produjo indeles significativos en el locus diana, corroborando aún más la reducción de la proteína CD45 que observamos (**FIG. 11**).

EJEMPLO 12: ALTERACIÓN DEL POTENCIADOR ERITROIDE DE BCL11A EN CMH

Las NPL (p. ej., NPL que comprenden un lípido catiónico ionizable, en donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o lípido 15) que encapsulan un ARNg contra BCL11a y ARNm de Cas9 se formulan y conjugan con Ab1 y mutAb1 usando los métodos descritos en los ejemplos 2 y 4-5. Las NPL se utilizan para tratar las CMH humanas primarias *in vitro*. El MutAb1 es un Fab no dirigido derivado de Ab1 con mutaciones en alanina en cada uno de los bucles de CDR de la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo, como se muestra en la **tabla 8** a continuación.

Tabla 8. Secuencias de CDR de Ab1 y mutAb1.

Anticuerpo	Ab1	mutAb1
CDR-H1	FTF\$NYAMS (SEQ ID NO: 1)	FAAANYAMS (SEQ ID NO: 28)
CDR-H2	AISG\$GGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2)	AISGAAASTYYADSVKG (SEQ ID NO: 29)
CDR-H3	AKGPPTYHTNYYYMDV (SEQ ID NO: 3)	AKGPPTYAAAYYYMDV (SEQ ID NO: 30)
CDR-L1	RASQG\$SSWLA (SEQ ID NO: 4)	RASQAAASWLA (SEQ ID NO: 31)
CDR-L2	AA\$SLQS (SEQ ID NO: 5)	AAASLQS (SEQ ID NO: 32)
CDR-L3	QQTNSFPYT (SEQ ID NO: 6)	QQTAAAPYT (SEQ ID NO: 33)

Las CMH se recogen a los 3 y 7 días después del tratamiento, donde después se analizan para determinar la edición génica mediante secuenciación de amplicones dirigida.

EJEMPLO 13: DIRECCIONAMIENTO *IN VITRO* Y MODIFICACIÓN GENÉTICA ADICIONALES DE LAS CMH

13.1: Optimización de la detección de la densidad del conjugado de Fab en NPL para la transfección de CMH

En un experimento adicional para caracterizar las NPL conjugadas con Ab, se formularon nanopartículas lipídicas (NPL) con ARNm de mCherry usando lípido 15 y se intercambiaron directamente en MBS usando los métodos descritos en el ejemplo 2. El ARNm de mCherry se produjo mediante transcripción *in vitro* usando métodos descritos en la patente de los Estados Unidos n.º 10.143.758 (ejemplo

7), modificada con N-1-metil pseudouridina. Se prepararon conjugados de los Fab Ab1, Ab2 y MutAb1 como en el ejemplo 4. A continuación, se insertaron conjugados de Fab en las NPL formuladas en 10 densidades diferentes enumeradas en la **tabla 9** a continuación, usando métodos descritos en los Ejemplos 4-5, con la modificación de que la inserción se realizó a 37 °C durante 4 horas.

5 Las NPL se examinaron para detectar niveles de transfección con mCherry en CMH usando el método descrito en el ejemplo 11. De manera específica, las CMH se trataron con una dosis de 100 ug de ARNm/pocillo con 30.000 células por pocillo y se añadió medio a los pocillos para llevar el volumen total a 100 ul. A continuación, las CMH se incubaron con NPL durante 6 horas, después de lo cual los medios de cultivo que contenían NPL se reemplazaron por medios nuevos. Después de 24 horas, las CMH se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra CD34 y CD117. Las células se seleccionaron para la tinción con CD34+ y CD117+, y se determinó el porcentaje de células CD34+CD117+mCherry+. Se encontró que el intervalo óptimo de densidad de Fab era aproximadamente 3-9 g de Ab/mol de lípido para maximizar el direccionamiento a CMH y la transfección celular. Los resultados para una selección de densidades de Ab se muestran en la **FIG. 13**, que destaca el intervalo óptimo de densidad de Fab (3-9 g de Ab/mol de lípido).

15 **Tabla 9. Densidades de anticuerpos dirigidos a CMH probadas en la optimización.**

Modalidad	Conjugado	Densidad de Fab (g de Fab/mol de lípido)
NPL principal	Ninguno	0
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	1
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	3
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	6
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	9
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	12
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	15
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	18
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	21
Fab	Fab Ab1 anti-HuCD1117 bDS	27
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	1
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	3
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	6
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	9
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	12
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	15
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	18

Modalidad	Conjugado	Densidad de Fab (g de Fab/mol de lípido)
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	21
Fab	Fab Ab2 anti-HuCD1117 bDS	27
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	1
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	3
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	6
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	9
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	12
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	15
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	18
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	21
Fab	Fab MutAb1 anti-HuCD1117 bDS	27

13.2: Edición *in vitro* de CMH primarias en el locus de B2M

A continuación, se cultivaron CMH primarias *in vitro* y se trataron con NPL formuladas con lípido 15 y que encapsulan un ARNm de nucleasa Cas y un ARNg específico para el locus de beta-2-microglobulina (B2M). Las NPL se recubrieron con Ab1 o con mutAb1 sin unión. El efecto de la edición génica se cuantificó para la inactivación de la proteína B2M mediante citometría de flujo dirigida a la expresión de la proteína B2M. Como se muestra en las **FIGS. 14A-14C**, el locus de B2M se editó con éxito en CMH *in vitro* usando las NPL conjugadas con Ab1, mientras que las NPL conjugadas con mutAb1 no dieron lugar a edición.

EJEMPLO 14: MODIFICACIÓN GENÉTICA *IN VIVO* DE CMH

14.1: Transfección *in vivo* de células madre hematopoyéticas a largo plazo utilizando NPL dirigidas

Las NPL (p. ej., NPL que comprenden un lípido catiónico ionizable, en donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o lípido 15) se conjugan con Ab1 y mutAb1 usando los métodos descritos en los ejemplos 1 y 2. Se injertan en ratones NSG CMH humanas primarias para establecer un modelo murino mediante el cual se puede observar el direccionamiento a CMH humanas con NPL dirigidas *in vivo*. En un experimento inicial, se formulan NPL que encapsulan ARNm de mCherry o eGFP. A continuación, las NPL se inyectan por vía intravenosa en los ratones a través de la vena de la cola. A las 24 y 48 horas, los ratones se sacrifican y la médula ósea de los ratones se recoge y se analiza mediante citometría de flujo para analizar la fluorescencia de mCherry o eGFP en la población de CMH.

14.1.1: Transfección *in vivo* de células madre hematopoyéticas a largo plazo utilizando NPL dirigidas que portan ARNm de mCherry

Materiales y métodos

Ratones. El análisis de los ratones NSG™ con injerto de células madre hematopoyéticas CD34⁺ humanas se realizó mediante métodos rutinarios. Los experimentos se realizaron con ratones durante 12

semanas después del trasplante. Las NPL se administraron a 1 mg/kg (nucleótido total medido a partir del ARNm de mCherry) para todas las condiciones mediante inyección en la vena de la cola en forma de embolada. Los ratones fueron tratados con NPL dirigidas recubiertas con Fab Ab1, NPL sin direccionamiento recubiertas con el Fab mutAb1 sin unión o por la NPL parental sin Fab (sin recubrimiento/desnuda). Los ratones se sacrificaron 24 horas después del tratamiento y se recogieron diversos tejidos para analizarlos. Los ratones Hu-CD34⁺-NSGTM tratados se compararon con ratones Hu-CD34⁺-NSGTM no tratados.

Análisis de citometría de flujo. Se obtuvieron células de la médula ósea lavando tibias y fémures de ratones sacrificados con PBS frío que contenía suero bovino fetal (FBS) al 5 % y EDTA 2 mM (tampón FACS). Las células se recogieron en tampón FACS frío, se tiñeron con anticuerpos monoclonales contra CD45 humano (clon 2D1, Cat n.º 368542 de BiolegendTM), CD45 de ratón, CD34 humano (clon 561, Cat n.º 343614 de BiolegendTM) y CD117 humano (clon 104D2, Cat n.º 313206 de BiolegendTM) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y después se analizaron mediante citometría de flujo en un NovoCyte Penton (Agilent). Se utilizaron anticuerpos anti-CD45 de ratón y humano para identificar las células humanas de la médula ósea para diferenciar claramente las CMH humanas y de ratón en las poblaciones mixtas de células de la médula ósea. Las células se analizaron en función de la positividad para mCherry.

ELISA. Se homogeneizaron ~30 mg de tejidos hepáticos congelados de los ratones en 300 µl de tampón RIPA + cóctel de inhibidor de proteinasa (PI) HALT 1x (cat n.º 78441) usando un Tissuelyser (Qiagen) en una cámara fría (Programa P1: frecuencia 30, 5 min, 4 °C) y a continuación se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C durante 5 min. Se realizó ELISA de mCherry (Cat n.º ab221829 de Abcam) según las recomendaciones del fabricante. Las absorbancias del producto se midieron utilizando un lector de placas SpectraMax Plus a 450 nm (Molecular Devices, San José, CA).

Estadística. Se realizaron análisis estadísticos utilizando el software GraphPad Prism 9.0. Se utilizó la prueba de la *t* de Student bilateral para comparaciones individuales si tenían una distribución normal

Resultados

Los resultados de este análisis indicaron que las NPL dirigidas por anticuerpos diseñados pueden reconocer, unirse y transfectar LT-CMH (CD117⁺) para suministrar ARNm al citosol (**FIGS. 15A-15B**). Además, la eficiencia de transfección se evaluó como 30 % con NPL de lípido 15 recubierto con Fab Ab1, 5 % con NPL recubierta con el Fab mutAb1 no dirigido y 16 % con NPL sin recubrimiento de múltiples experimentos (**FIGS. 15A-15C**). Se midieron eficiencias de transfección similares, 25 % y 3 % con NPL KC3 recubiertas con Fab Ab1 y Fab mutAb1 respectivamente (**FIG. 15D**). Por otra parte, la NPL de lípido 15 recubierta con Fab tiene un tropismo menor para las células hepáticas que la NPL de lípido 15 sin recubrimiento, ya que el ELISA midió un 91 % menos de señal de mCherry después de la extracción de proteínas de 2 lóbulos hepáticos diferentes de múltiples animales tratados (**FIG. 15E**). Finalmente, se midió 3 veces menos señal de las células hepáticas tratadas con NPL de KC3 frente a lípido 15 (**FIGS. 15E-15F**).

14.1.2: Transfección in vivo adicional de células madre hematopoyéticas a largo plazo utilizando NPL que portan ARNm de mCherry

La transfección *in vivo* de CMH humanas en ratones con injerto de CMH CD34+ (n=12) se evaluó adicionalmente en un segundo experimento. Se trataron ratonas NSGTM Hu-CD34+ (laboratorio Jax; Hu-CD34+; ratones NSGTM, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl, estirpe n.º 005557) con NPL de lípido 15 recubiertas con Ab1 para transfectar CMH humanas en el entorno de la médula ósea. Las NPL se prepararon con aproximadamente 50 % de lípido 15, aproximadamente 40 % de colesterol, aproximadamente 10 % de DSPC y aproximadamente 1.5 % de PEG (DPG-PEG) que comprende PEG en un peso molecular de 2000 Da). Las NPL de lípido 15 se descongelaron a temperatura ambiente, se mezclaron con suavidad mediante inversión y, a continuación, se diluyeron en solución salina antes de dosificar a 1.0 mg/kg mediante inyección intravenosa (IV) como una inyección de una sola embolada. 24 horas después del tratamiento, se recogieron tejidos de médula ósea completa, hígado, bazo, pulmón y ovario y se analizaron mediante citometría de flujo, ELISA o IHC, usando el indicador de mCherry.

Se resuspendieron células de médula ósea recogidas, de la tibia y el fémur, como una única suspensión celular en DPBS complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS). Las células se tiñeron con hCD45, clon 2D1 (BiolegendTM); hCD117, clon 104D2 (de BiolegendTM); hCD34, clon 561 (BiolegendTM) y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la eficiencia de transfección. Como se muestra en la **FIG. 16**, un promedio de aproximadamente 20 % de CMH CD34+/CD117+ humanas fueron positivas para fluorescencia de mCherry, lo que demostró la transfección *in vivo* de CMH-LP por las NPL de lípido 15 recubiertas con Ab1.

Se homogeneizaron los tejidos de hígado, bazo y pulmón para extracción de proteínas (usando tampón RIPA complementado con cóctel inhibidor de proteinasa HALTTM 1x [Thermo Fisher cat n.º 78441]) y se analizaron mediante ELISA (kit de ab221829 mCherry SimpleStep ELISA®, de Abcam). Los tejidos ováricos se incluyeron, se cortaron y se analizaron mediante inmunohistoquímica (IHC) usando M11217 Ab (de Abcam). Los tejidos de IHC fueron analizados y clasificados con enmascaramiento por un patólogo certificado. Los resultados del análisis de tejido inespecífico se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Detección de proteína mCherry en tejidos inespecíficos.

Tejido	Proteína mCherry	Método de detección
Hígado	54 ng/mg	ELISA
Bazo	260 ng/mg	
Pulmón	3.5 ng/mg	
Ovario	Sin señal	IHC

14.2: Edición *in vivo* de CMH utilizando NPL que encapsulan ARNg y ARNm de nucleasa Cas

A continuación, se formulan NPL que encapsulan ARNg (p. ej., ARNg dirigido al potenciador eritroide de BCL11a) y ARNm que codifica una nucleasa Cas (p. ej., Cas9) y se inyectan en ratones NSG con injerto de CMH humanas primarias. 7 días después de la inyección, se sacrifica a los ratones y se extrae la médula ósea. Se aísla el ADN de las células de la médula ósea y se realiza la secuenciación de amplicones de NGS en las muestras para calcular la edición génica *in vivo*.

14.3: Transfección *in vivo* de células madre hematopoyéticas a largo plazo utilizando NPL dirigidas en primates no humanos (PNH)

Las NPL que encapsulan el ARNm de mCherry se formularon y se utilizaron para tratar primates no humanos (PNH), específicamente macacos cangrejeros originarios de Mauricio.

En primer lugar, se validó *in vitro* la capacidad de las NPL dirigidas a CMH para dirigirse a CMH de macaco cangrejero. Se usaron NPL de lípido 15 recubiertas con Ab1 y que encapsulaban ARNm de mCherry para tratar CMH aisladas de macacos cangrejeros. Se preparó medio de CMH de macaco cangrejero usando medio IMDM de ThermoFisher™ Technologies medio básico. El medio IMDM se complementó con FBS al 10 % (Gibco™), rhSCF 100 ng/ml (PeproTech™), trombopoyetina 100 ng/ml (PeproTech™), rhuFlt3-L 100 ng/ml (PeproTech™), interleucina-3 100 ng/ml (PeproTech™), interleucina-6 100 ng/ml (PeproTech™), G-CSF 100 ng/ml (PeproTech™) para preparar la formulación final de medio HSC. Se resuspendieron las células de la médula ósea como una suspensión de células individuales y se mezclaron en tampón de lisis de glóbulos rojos (RBC) (00-4333-57 de Invitrogen) para eliminar los eritrocitos. Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 1 millón de células por 1 ml de medio. Las células se cultivaron en el matraz adecuado durante 3 días. El día 3 de cultivo, las células se contaron de Nuevo en el NC-202™. Se añadió medio de CMH nuevo al cultivo celular para devolver la concentración de CMH a 1 millón de células por 1 ml de medio. El día 8 del cultivo, las CMH se recogieron para transfección usando las NPL y se analizaron al día siguiente. Las muestras se analizaron usando citometría de flujo para la expresión de mCherry para medir la transfección de CMH-LP. Las CMH-LP de macaco cangrejero se identificaron usando los marcadores CD34 y CD117. Como se muestra en la **FIG. 17**, aproximadamente el 65 % de CMH de macaco cangrejero se transfectaron con ARNm de mCherry en macacos cangrejeros tratados con NPL del lípido 15 recubiertas con Ab1, lo que confirmó que las NPL del lípido 15 recubiertas con Ab1 se pueden dirigir a CMH-LP de macaco cangrejero.

A continuación, se evaluó la transfección *in vivo* de CMH-LP en PNH. Se infundieron en macacos cangrejeros machos y hembras originarios de Mauricio diferentes pautas posológicas de NPL de lípido 15 o NPL KC3, cada una recubierta con Ab1 y con encapsulación de ARNm de mCherry para transfectar CMH en el entorno de la médula ósea. Las NPL se prepararon con aproximadamente un 40 % de colesterol, aproximadamente un 10 % de DSPC, aproximadamente un 1.5 % de PEG (DPG-PEG que comprende PEG a un peso molecular de 2000 Da) y aproximadamente un 50 % de lípido KC3 (para NPL KC3). Se pretrató a los PNH con 2 mg/kg de difenhidramina, por vía intramuscular, 30 min antes de la infusión de NPL. Las NPL de lípido 15 y las NPL KC3 se descongelaron a temperatura ambiente, se mezclaron suavemente por inversión y después se diluyeron en solución salina antes de dosificar mediante inyección intravenosa (IV) como una sola infusión lenta (mediante bomba a 5 ml/kg) durante un periodo de 1 hora. Las NPL de lípido 15 se dosificaron a 0.5 mg/kg y 0.2 mg/kg, y las NPL KC3 se dosificaron a 1.0 mg/kg, 0.5 mg/kg y 0.2 mg/kg. 24 horas después de inyectar las NPL a los PNH, se recogieron muestras de médula ósea completa 24 h después del tratamiento por aspiración de la cresta ilíaca. El diseño del estudio se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Diseño de estudio que evalúa la transfección *in vivo* de CMH-LP en macacos cangrejeros originarios de Mauricio.

Estudio	N.º de macacos	Tratamiento con ARNm/LNP	Dosis (mg/kg)	Ruta
23-01A	2	Ab1 lípido 15 con ARNm de mCherry	0.5	IV
	2	Ab1 lípido 15 con ARNm de mCherry	0.2	IV
	1	sin tratar	NP	NP
23-01B	1	Ab1 KC3 con ARNm de mCherry	1.0	IV
	1	Ab1 KC3 con ARNm de mCherry	0.5	IV
	2	Ab1 KC3 con ARNm de mCherry	0.2	IV
	1	sin tratar	NP	NP

Se utilizó citometría de flujo para analizar los aspirados de médula ósea en busca de CMH PNH que tengan fluorescencia mCherry. Se resuspendieron las células de la médula ósea como una suspensión de células individuales y se mezclaron en tampón de lisis de glóbulos rojos (RBC) (00-4333-57 de Invitrogen) para eliminar los eritrocitos. Las células se lavaron, se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) complementada con 10 % de suero de ternera fetal (FBS), se tiñeron con anticuerpos anti-CD34 (clon 561, cat n.º 343614 de Biolegend™) y anti-CD117 (clon 104D2, cat n.º 313206 de Biolegend™) y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la eficiencia de transfección. En la **FIG. 18** se muestran resultados ilustrativos de citometría de flujo que ilustran la estrategia de selección de citometría de flujo para identificar CMH-LP de macaco cangrejero.

Las **FIGS. 19A-19B** muestran el porcentaje promedio de CMH que son positivas para mCherry de macacos cangrejeros tratados con NPL de lípido 15 (**FIG. 19A**) o NPL KC3 (**FIG. 19B**) recubiertas con el Fab Ab1 que encapsulan ARNm de mCherry. Se transfectaron CMH positivas *in vivo* de forma dependiente de la dosis mediante ambas NPL probadas. Esto confirma que las NPL de CMH dirigidas a seres humanos pueden transfectar de forma eficiente CMH-LP de macaco cangrejero *in vivo*.

EJEMPLO 15: PREPARACIÓN DE CONJUGADOS DE FAB' PARA PERMITIR EL DIRECCIONAMIENTO A CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (CMH) *IN VIVO*

Este ejemplo describe un método para la producción de conjugados de lípido-grupo de direccionamiento a CMH para su incorporación en NPL dirigidas a CMH (p. ej., NPL que comprenden un lípido catiónico ionizable, donde el lípido catiónico ionizable es KC3 o lípido 15).

Se conjugaron Fab que se unen a dianas específicas de CMH (CD117, CD105) con DSPE-PEG(2k)-maleimida mediante acoplamiento covalente entre el grupo maleimida y una cisteína C-terminal en la cadena pesada (HC), tras la reducción inicial de la mezcla de Fab' y (Fab')₂. La proteína se reconstituyó con agua de uso en 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 a 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 hora a 25 °C con agitación en una atmósfera de argón. La proteína reducida se intercambió inmediatamente con tampón al 99.9 % en tampón de conjugación citrato 5 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, pH 6.0 con una membrana de celulosa regenerada con punto de corte de peso molecular de 10 kDa en una placa de filtración de polipropileno de 24 pocillos

a temperatura ambiente utilizando intercambio automático de tampón de ultrafiltración/diafiltración (Unchained Labs, California, EE. UU.) equipado con un sistema de filtración de aire HEPA. Se midió que el contenido de sulfhidrilo libre después de la reducción y el intercambio de tampón era <1.1 por molécula de Fab después de la reducción y el intercambio de tampón utilizando el reactivo de Ell'an (',5'-ditio-bis-
5 [ácido 2-nitrobenzoico]) según el protocolo del fabricante (Thermo Fisher Scientific Peirce Biotechnology, Illinois, EE. UU.).

Tan pronto como fue posible en la primera hora después del intercambio de tampón, se inició la reacción de conjugación mediante la adición de una suspensión micelar con 12 mg/ml de DSPE-PEG-OCH₃ (NOF America, Nueva York, EE. UU.) y DSPE-PEG-maleimida 8 mg/ml (NOF America, Nueva York, EE. UU.) en agua de uso en biología molecular. La reacción de conjugación se llevó a cabo con una
10 concentración final de 3.8 mg/ml de Fab y un exceso molar de maleimida de 8.25 durante 4 horas a 25 °C con agitación en atmósfera de argón. La producción del conjugado resultante se controló mediante HPLC y SDS-PAGE. La reacción se detuvo en L-cisteína 1.0 mM a temperatura ambiente durante 10 minutos y se almacenó a 4 °C durante 12 – 16 horas. La reacción conjugada bruta resultante que contenía DSPE-
15 PEG(2k)-Fab anti-hCD117 se purificó simultáneamente a partir de Fab libre y el tampón se intercambió al 99.9 % con citrato 10 mM, sacarosa al 10 % (p/v), pH 7.0 con una membrana de celulosa regenerada con punto de corte de peso molecular de 100 kDa en una placa de filtración de polipropileno de 24 pocillos a temperatura ambiente utilizando intercambio automático de tampón de ultrafiltración/diafiltración (Unchained Labs, California, EE. UU.) equipado con un sistema de filtración de aire HEPA. La pureza del
20 conjugado final se evaluó mediante HPLC y SDS-PAGE. Después de la desactivación, la composición micelar final consiste en una mezcla de DSPE-PEG-Fab, DSPE-PEG-maleimida (terminada en cisteína) y DSPE-PEG-OCH₃.

25

30

35