

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 428**

51 Int. Cl.:

C07C 233/36 (2006.01) **A61K 47/00** (2006.01)
C07C 237/12 (2006.01)
C07C 243/28 (2006.01)
C07C 251/76 (2006.01)
C07C 251/78 (2006.01)
C07C 259/14 (2006.01)
C07C 271/22 (2006.01)
C07C 311/06 (2006.01)
C07D 295/15 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2023** **PCT/IB2023/050811**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2023** **WO23144798**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2023** **E 23704424 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2025** **EP 4466250**

54 Título: **Lípidos catiónicos ionizables para nanopartículas lipídicas**

30 Prioridad:

31.01.2022 US 202263305181 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2025

73 Titular/es:

GENEVANT SCIENCES GMBH (100.00%)
Viaduktstrasse 8
4051 Basel, CH

72 Inventor/es:

HOLLAND, RICHARD J.;
LAM, KIEU MONG;
LOUIE, DAYNA;
HEYES, JAMES;
MARTIN, ALAN;
WOOD, MARK y
ZHANG, WENXUAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 017 428 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Lípidos catiónicos ionizables para nanopartículas lipídicas

5 Antecedentes

Los lípidos catiónicos ionizables son normalmente uno de los principales componentes lipídicos de las nanopartículas lipídicas (NPL). Están diseñados para tener carga neutra a pH fisiológico estándar (~7), pero adquieren carga positiva a pH más bajo (ácido). Esto ayuda a la encapsulación de la carga útil de ácido nucleico durante la formación de la NPL y a la liberación intracelular, ya que el paso de fusión endosomal requiere una carga positiva en el lípido ionizable.

Los lípidos ionizables tales como MC3 (utilizado en el producto de ARNip-NPL Onpattro, aprobado por la FDA) y el 3D-P-DMA han demostrado una excelente actividad y tolerabilidad en diversas aplicaciones. Sin embargo, no se metabolizan rápidamente y tardan varias semanas en desaparecer de los tejidos diana. Esto los hace menos atractivos para aplicaciones que requieren múltiples dosis, en especial, con intervalos de dosis cortos y/o indicaciones crónicas.

Los documentos US 2018/273467 y WO 2020/061367 describen composiciones de nanopartículas que comprenden lípidos, así como lípidos adicionales tales como fosfolípidos, lípidos estructurales y lípidos de PEG, que se dice que son útiles en la administración de agentes terapéuticos y/o profilácticos a células u órganos de mamíferos para, por ejemplo, regular el polipéptido, proteína o expresión génica.

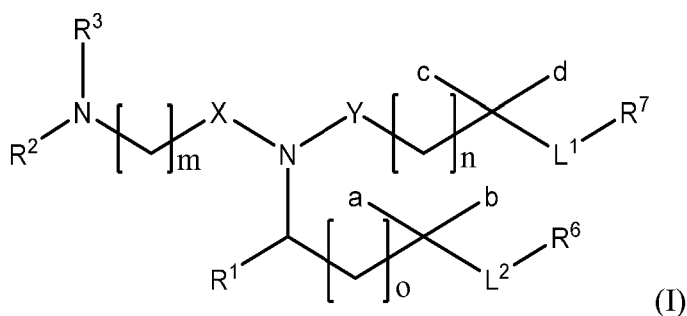
El documento WO 2019/152557 describe composiciones de nanopartículas lipídicas (LNP) para la administración a células inmunitarias que, según se afirma, permiten una administración mejorada de agentes, p. ej., ácidos nucleicos, tales como ARN terapéuticos y/o profilácticos, a células inmunitarias, en particular linfocitos T, así como linfocitos B, células dendríticas y monocitos. Las NPL comprenden una cantidad de un lípido potenciador de la administración en células inmunitarias de modo que se dice que la administración de un agente mediante una NPL de administración en células inmunitarias mejora en comparación con una NPL que carece del agente potenciador de administración en células inmunitarias. Métodos para usar las NPL de administración en células inmunitarias para la administración de agentes, p. ej., administración de ácido nucleico, para la expresión de proteínas, para modular la actividad de las células inmunitarias y modular las respuestas inmunitarias.

En la actualidad, existe la necesidad de lípidos ionizables que demuestren un mejor aclaramiento al tiempo que conservan una buena actividad en su capacidad de administrar ácidos nucleicos. También se necesitan lípidos ionizables que tengan una biodegradabilidad ventajosa o mejorada.

35 Sumario

La invención proporciona lípidos ionizables que tienen una biodegradabilidad y/o tasas de aclaramiento mejoradas.

40 En una realización, la invención proporciona un lípido ionizable, que es un compuesto de fórmula (I):



o una sal del mismo, en donde:

- 45 X es -CH₂-, -O-, -O(C=O)-; o -C(=O)-
 Y es -CH₂-, -O-, -SO₂- o -C(=O)-;
 R¹ es hidrocarbilo C₂-C₂₅;
 R² es alquilo C₁-C₃; y R³ es alquilo C₁-C₃; o R² y R³, tomados junto con el nitrógeno al que están unidos, forman
 50 un anillo aziridino, azetidino o pirrolidino;
 m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;
 n es 0-15;
 o es 0-15;
 L¹ está ausente, o es -(C=O)-O-, -(C=O)N(H)N(R⁴)-, -(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-, -(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)-, -(C=O)-O-
 55 CH₂-R² o -O(C=O)-R^W;

L^2 está ausente, o es $-(C=O)-O-$, $-(C=O)N(H)N(R^4)-$, $-(C=O)N(H)-N=C(R^4)-$, $-(C=O)N(H)N(H)C(R^4)(R^5)-$, $-(C=O)-O-CH_2-R^z$ o $-O(C=O)-R^x$

a es H o F;

b es H o F;

5 c es H o F; y d es H o F; o c y d, tomados junto con el carbono al que están unidos, forman $-C(=O)-$

R^4 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^5 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^4 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^5 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

10 R^6 es hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^7 es hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^w está ausente, o es $-C(F)H-$ o $-C(F)_2-$;

R^x está ausente, o es $-C(F)H-$ o $-C(F)_2-$;

R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo C_2-C_{10} ; y

15 R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo C_2-C_{10} .

La invención también proporciona una composición que comprende 1) un lípido ionizable de la invención y 2) un agente activo o un agente terapéutico.

20 La invención también proporciona una nanopartícula lipídica que comprende un lípido ionizable de la invención.

La invención también proporciona una nanopartícula lipídica que comprende: (a) uno o más agentes activos o terapéuticos; (b) un lípido ionizable de la invención; (c) un lípido no catiónico; y (d) un lípido conjugado. Normalmente, el uno o más agentes están encapsulados dentro de la nanopartícula lipídica.

25 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende, 1) un lípido ionizable de la invención y 2) uno o más agentes activos o agentes terapéuticos.

30 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula lipídica de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también encuentra uso en un método para administrar un agente activo o un agente terapéutico (p. ej. un ácido nucleico) a un animal, que comprende administrar al animal una nanopartícula de la invención.

35 La invención también encuentra uso en un método para introducir un ácido nucleico en una célula, comprendiendo el método, poner en contacto la célula *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con una partícula lipídica con ácido nucleico descrita en el presente documento.

40 La invención también encuentra uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula lipídica con ácido nucleico descrita en el presente documento.

La invención también proporciona procesos y productos intermedios divulgados en el presente documento que son útiles para fabricar los compuestos, formulaciones o nanopartículas de la invención.

45

Descripción detallada

Definiciones

50 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados asignados a menos que se especifique otra cosa.

El término "hidrocarbilo" como se describe en el presente documento describe un compuesto orgánico o radical que consiste en de aproximadamente 4 a aproximadamente 500 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. Ciertas moléculas de hidrocarburo específicas tienen el número de átomos de carbono designado, por ejemplo, un hidrocarbilo C_2-C_{25} es un hidrocarburo que tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 átomos de carbono y hasta 52 átomos de hidrógeno, dependiendo del nivel de insaturación. Las fracciones de hidrocarbilo incluyen, sin limitación, fracciones de alquilo ramificado o no ramificado, alquienilo ramificado o no ramificado, alquinilo ramificado o no ramificado, cicloalquilo y arilo. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 4 a aproximadamente 400 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 4 a aproximadamente 300 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 4 a aproximadamente 200 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 4 a aproximadamente 100 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 4 a aproximadamente 62 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 20 a aproximadamente 500 átomos seleccionados entre carbono e

hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 20 a aproximadamente 400 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 20 a aproximadamente 300 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 20 a aproximadamente 200 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 20 a aproximadamente 100 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 20 a aproximadamente 62 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 40 a aproximadamente 500 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 40 a aproximadamente 400 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 40 a aproximadamente 300 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 40 a aproximadamente 200 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 40 a aproximadamente 100 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en aproximadamente 40 a aproximadamente 62 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60 o al menos aproximadamente 80 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno. En una realización, el hidrocarbilo consiste en menos de aproximadamente 500, menos de aproximadamente 400, menos de aproximadamente 300, menos de aproximadamente 200 o menos de aproximadamente 100 átomos seleccionados entre carbono e hidrógeno.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, que tiene el número de átomos de carbono indicado (es decir, C₁₋₈ significa de uno a ocho carbonos). Los ejemplos incluyen alquilo (C₁-C₈), alquilo (C₂-C₈), alquilo (C₁-C₆), alquilo (C₂-C₆) y alquilo (C₃-C₆). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y homólogos e isómeros superiores.

El término "alquenilo" se refiere a un radical alquilo insaturado que tiene uno o más (p. ej., 1, 2, 3 o 4) dobles enlaces. Los ejemplos de dichos grupos alquilo insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo) y los homólogos e isómeros superiores.

El término "alquinilo" se refiere a un radical alquilo insaturado que tiene uno o más (p. ej., 1, 2, 3 o 4) triples enlaces. Algunos ejemplos de tales grupos alquilo insaturados son etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y homólogos e isómeros superiores.

El término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo unido al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno ("oxi").

El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo unido al resto de la molécula a través de un grupo tio.

El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo saturado o parcialmente insaturado (no aromático) totalmente de carbono que tiene de 3 a 8 átomos de carbono (es decir, (carbociclo C₃-C₈). El término también incluye sistemas de anillos múltiples condensados y saturados totalmente de carbono (p. ej., sistemas de anillos que comprenden 2, 3 o 4 anillos carbocíclicos). Por consiguiente, el término "carbociclo" incluye los carbociclos multicíclicos, tales como los carbociclos bicíclicos (p. ej., los carbociclos bicíclicos que tienen aproximadamente de 3 a 15 átomos de carbono, de aproximadamente 6 a 15 átomos de carbono, o de 6 a 12 átomos de carbono, tales como biciclo[3.1.0]hexano y el biciclo[2.1.1]hexano), y los carbociclos policíclicos (es decir, carbociclos tricíclicos y tetracíclicos con hasta aproximadamente 20 átomos de carbono). Los anillos del sistema de anillos condensados múltiples pueden conectarse entre sí mediante enlaces fusionados, espiro y con puente cuando lo permitan los requisitos de valencia. Por ejemplo, los carbociclos multicíclicos pueden conectarse entre sí a través de un único átomo de carbono para formar una conexión espiro (p. ej., espiropentano, espiro[4,5]decano, etc.), a través de dos átomos de carbono adyacentes para formar una conexión fusionada (p. ej., carbociclos tales como decahidronaftaleno, norsabinano, norcarano) o a través de dos átomos de carbono no adyacentes para formar una conexión de puente (p. ej., norbomano, biciclo[2.2.2]octano, etc.). Los ejemplos no limitativos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, biciclo[2.2.1]heptano, pinano y adamantano.

El término "arilo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anillo aromático simple totalmente de carbono o a un sistema de anillos múltiples condensados totalmente de carbono en donde al menos uno de los anillos es aromático. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un grupo arilo tiene de 6 a 20 átomos de carbono, de 6 a 14 átomos de carbono, de 6 a 12 átomos de carbono o de 6 a 10 átomos de carbono. El arilo incluye un radical fenilo. Los arilos también incluyen múltiples sistemas de anillos de carbono condensados (p. ej., sistemas de anillos que comprenden 2, 3 o 4 anillos) que tienen de aproximadamente 9 a 20 átomos de carbono, en los que al menos un anillo es aromático y en donde los demás anillos pueden ser aromáticos o no aromáticos (es decir, cicloalquilos). Los anillos del sistema de anillos condensados múltiples pueden conectarse entre sí mediante enlaces fusionados, espiro y con puente cuando lo permitan los requisitos de valencia. Debe entenderse que el punto de unión de un sistema de anillos condensados múltiples, como se ha definido anteriormente, puede estar en cualquier posición del sistema de anillos, incluyendo una porción aromática o carbociclo del anillo. Los ejemplos no limitativos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, indenilo, indanilo, naftilo, 1, 2, 3, 4-tetrahidronaftilo, antracenilo y similares.

La expresión "ARN de interferencia" o "ARNi" o "secuencia de ARN de interferencia" se refiere a ARN monocatenario (p. ej., miARN maduro) o bicatenario (p. ej., ARN dúplex tal como ARNip, ARNia o pre-miARN) que es capaz de reducir o inhibir la expresión de un gen o secuencia diana (p. ej., mediando la degradación o inhibiendo la traducción de ARNm que son complementarios a la secuencia de ARN de interferencia) cuando el ARN de interferencia está en la misma célula que el gen o secuencia diana. Así pues, el ARN de interferencia se refiere al ARN monocatenario que es complementario a una secuencia de ARNm diana o al ARN bicatenario formado por dos cadenas complementarias o por una sola cadena autocomplementaria. El ARN de interferencia puede tener una identidad sustancial o completa con el gen o la secuencia diana, o puede comprender una región de emparejamiento incorrecto (es decir, un motivo de emparejamiento incorrecto). La secuencia del ARN de interferencia puede corresponder al gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo.

El ARN de interferencia incluye el "ARN de interferencia pequeño" o "ARNip", p. ej., ARN de interferencia de aproximadamente 15-60, 15-50 o 15-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, más usualmente de aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25 (dúplex) nucleótidos de longitud, y es preferentemente de aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (es decir, cada secuencia complementaria del ARNip bicatenario es de 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud, y el ARNip bicatenario tiene aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 pares de bases de longitud, preferentemente de aproximadamente 18-22, 19-20 o 19-21 pares de bases de longitud). Los dúplex de ARNip pueden comprender protuberancias 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos y extremos de fosfato 5'. Entre los ejemplos de ARNip se incluyen, sin limitación, una molécula polinucleotídica bicatenaria ensamblada a partir de dos moléculas de cadena separadas, en donde una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido complementaria; una molécula polinucleotídica bicatenaria ensamblada a partir de una molécula monocatenaria, donde las regiones sentido y antisentido están unidas por un conector basado o no en ácido nucleico; una molécula polinucleotídica bicatenaria con una estructura secundaria en horquilla que tiene regiones sentido y antisentido autocomplementarias; y una molécula circular de polinucleótido monocatenario con dos o más estructuras de bucle y un tallo que tiene regiones autocomplementarias sentido y antisentido, donde el polinucleótido circular puede procesarse *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula activa de ARNip bicatenaria.

Preferentemente, los ARNip se sintetizan químicamente. Los ARNip también pueden generarse por escisión de ARNbc más largos (es decir, ARNbc de más de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud) con la ribonucleasa III de *E. coli* o Dicer. Estas enzimas transforman el ARNbc en ARNip biológicamente activo (véase, p. ej., Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 99:9942-9947 (2002); Calegari *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 99:14236 (2002); Byrom *et al.*, *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003); Knight *et al.*, *Science*, 293:2269-2271 (2001); y Robertson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968)). Preferentemente, los ARNbc tienen una longitud de al menos 50 nucleótidos a aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos. Un ARNbc puede tener una longitud de 1000, 1500, 2000, 5000 nucleótidos o más. El ARNbc puede codificar una transcripción génica completa o una transcripción génica parcial. En determinados casos, el ARNip puede estar codificado por un plásmido (p. ej., transcrito como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplex con bucles en horquilla).

Como se usa en el presente documento, la expresión "motivo de emparejamiento incorrecto" o "región de emparejamiento incorrecto" se refiere a una parte de un ARN de interferencia (p. ej., ARNip, ARNia, miARN) que no tiene una complementariedad del 100 % con su secuencia diana. Un ARN de interferencia puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones de emparejamiento incorrecto. Las regiones de emparejamiento incorrecto pueden ser contiguas o estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más nucleótidos. Los motivos o regiones de emparejamiento incorrecto pueden comprender un solo nucleótido o pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o más nucleótidos.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente activo o terapéutico tal como un ácido nucleico (p. ej., un ARN de interferencia o ARNm) es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, p. ej., una inhibición de la expresión de una secuencia diana en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia de un ARN de interferencia; o expresión dirigida por ARNm de una cantidad de una proteína que causa un efecto biológico deseable en el organismo dentro de del cual se expresa la proteína. La inhibición de la expresión de un gen diana o de una secuencia diana se consigue cuando el valor obtenido con un ARN de interferencia en relación con el control es de aproximadamente el 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 0 %. En otras realizaciones, la proteína expresada es una forma activa de una proteína que se expresa normalmente en un tipo celular dentro del cuerpo, y la cantidad terapéuticamente eficaz del ARNm es una cantidad que produce una cantidad de la proteína codificada que es al menos el 50 % (p. ej., al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, o al menos el 90 %) de la cantidad de la proteína que se expresa normalmente en el tipo celular de un individuo sano. Los ensayos adecuados para medir la expresión de un gen diana o secuencia diana incluyen, p. ej., el examen de los niveles de proteínas o ARN mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia, como las transferencias de puntos, transferencias Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la materia.

Por "disminución" "disminuir", "reducir" o "reducción" de una respuesta inmunitaria por un ARN de interferencia se

entiende una disminución detectable de una respuesta inmunitaria a un ARN de interferencia dado (p. ej., un ARN de interferencia modificado). La cantidad de disminución de una respuesta inmunitaria por un ARN de interferencia modificado puede determinarse en relación con el nivel de una respuesta inmunitaria en presencia de un ARN de interferencia no modificado. Una disminución detectable puede ser de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más inferior a la respuesta inmunitaria detectada en presencia del ARN de interferencia no modificado. La disminución de la respuesta inmunitaria hacia el ARN de interferencia se mide normalmente por la disminución de la producción de citocinas (p. ej., IFN γ , IFN α , TNF α , IL-6 o IL-12) por una célula respondedora *in vitro* o una disminución de la producción de citocinas en el suero de un mamífero tras la administración del ARN de interferencia.

Por "disminución" "disminuir", "reducir" o "reducción" de una respuesta inmunitaria por un ARNm se entiende una disminución detectable de una respuesta inmunitaria hacia un ARNm dado (p. ej., un ARNm modificado). La cantidad de disminución de una respuesta inmunitaria por un ARNm modificado puede determinarse en relación con el nivel de una respuesta inmunitaria en presencia de un ARNm no modificado. Una disminución detectable puede ser de aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más inferior a la respuesta inmunitaria detectada en presencia del ARNm no modificado. La disminución de la respuesta inmunitaria hacia ARNm se mide normalmente por la disminución de la producción de citocinas (es decir, IFN γ , IFN α , TNF α , IL-6 o IL-12) por una célula respondedora *in vitro* o una disminución de la producción de citocinas en el suero de un mamífero tras la administración del ARNm.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula respondedora" se refiere a una célula, preferentemente una célula de mamífero, que produce una respuesta inmunitaria detectable al entrar en contacto con un ARN de interferencia inmunoestimulante tal como un ARNip no modificado. Los ejemplos de células respondedoras incluyen, p. ej., células dendríticas, macrófagos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos y similares. Las respuestas inmunitarias detectables incluyen, p. ej., producción de citocinas o factores de crecimiento tales como TNF- α , IFN- α , IFA- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TGF y combinaciones de los mismos.

"Identidad sustancial" se refiere a una secuencia que se hibrida con una secuencia de referencia en condiciones estrictas, o a una secuencia que tiene un porcentaje especificado de identidad sobre una región especificada de una secuencia de referencia.

La expresión "condiciones estrictas de hibridación" se refiere a las condiciones en las que un ácido nucleico se hibridará con su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero a ninguna otra secuencia. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias distintas. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Se encuentra una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C inferiores al punto de fusión térmica (T_f) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La T_f es la temperatura (bajo fuerza iónica definida, pH y concentración nucleica) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_f , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo.

Un ejemplo de condiciones de hibridación estrictas puede ser el siguiente: 50 % de formamida, 5 $\times$ SSC y 1 % de SDS, incubando a 42 °C o 5 $\times$ SSC, 1 % de SDS, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2 $\times$ SSC y 0,1 % de SDS a 65 °C. Para la PCR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es típica para la amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32 °C y 48 °C, dependiendo de la longitud del cebador. Para la amplificación por PCR de alta rigurosidad, es típica una temperatura de aproximadamente 62 °C, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar entre aproximadamente 50 °C y aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud y la especificidad del cebador. Las condiciones de ciclo típicas para las amplificaciones de alta y baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90 °C-95 °C durante 30 s-2 min, una fase de hibridación de 30 s-2 min, y una fase de extensión de aproximadamente 72 °C durante 1-2 min. Se dispone de protocolos y directrices para reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad, p. ej., en Innis *et al.*, *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990).

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones de rigurosidad aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridan en condiciones de hibridación moderadamente estrictas. Las "condiciones de hibridación moderadamente estrictas" ilustrativas incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C, y un lavado en 1 $\times$ SSC a 45 °C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similares. Se proporcionan pautas adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*,

Ausubel *et al.*, eds.

Las expresiones "sustancialmente idénticos" o "identidad sustancial", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales (es decir, al menos aproximadamente 60 %, preferentemente al menos aproximadamente el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, o una identidad mayor en una región especificada), cuando se compara y alinea para correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada como medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Esta definición, cuando el contexto lo indique, también se refiere análogamente al complemento de una secuencia. Preferentemente, la identidad sustancial existe en una región que tiene al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, tomando como base los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de un número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 45, más habitualmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de manera óptima. Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. Para la comparación, la alineación óptima de las secuencias puede realizarse, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete del programa informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds. (1995, suplemento)).

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 (1977) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990), respectivamente. Se usan BLAST y BLAST 2.0, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos de la invención. El programa informático para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través del "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 90:5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01 y lo más preferentemente menos de aproximadamente 0,001.

La expresión "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria e incluye ADN y ARN. El ADN puede estar en forma de, p. ej., moléculas antisentido, ADN plasmídico, ADN precondensado, un producto de PCR, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico, o derivados y combinaciones de estos grupos. El ARN puede estar en forma de ARNip, ARN de interferencia asimétrico (ARNia), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARNt, ARN vírico (ARNv), ARN autoamplificador y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces modificados de la cadena principal, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, y que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos y ácidos péptidonucleicos (PNA). A menos que esté específicamente limitado, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye

con residuos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). Los "nucleótidos" contienen un azúcar desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), una base y un grupo fosfato. Los nucleótidos se unen entre sí a través de los grupos fosfato. Las "bases" incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen adicionalmente los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales, y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, pero sin limitación, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, pero sin limitación, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y alquilhalogenuros.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN) que comprende secuencias codificantes de longitud parcial o total necesarias para la producción de un polipéptido o polipéptido precursor.

"Producto génico", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto de un gen tal como una transcripción de ARN o un polipéptido.

El término "lípidos" se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que incluye, pero sin limitación, ésteres de ácidos grasos y se caracterizan por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos disolventes orgánicos. Suelen dividirse en al menos tres clases: (1) "lípidos simples", que incluyen grasas y aceites, así como ceras; (2) "lípidos compuestos", que incluyen fosfolípidos y glicolípidos; y (3) "lípidos derivados" tales como los esteroides.

Como se usa en el presente documento, el término "NPL" se refiere a una partícula lipídica con ácido nucleico o a una partícula lipídica con ácido nucleico (p. ej., una partícula lipídica con ácido nucleico estable). Una NPL representa una partícula hecha de lípidos (p. ej., un lípido ionizable de la invención, un lípido no catiónico y un lípido conjugado que impide la agregación de la partícula), y un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico (p. ej., ARNip, ARNia, miARN, ADNmc, ADNbc, ARNmc, ARN de horquilla corto (ARNhc), ARNbc, ARNm, ARN autoamplificante o un plásmido, incluidos los plásmidos a partir de los cuales se transcribe un ARN o ARNm de interferencia) está encapsulado dentro del lípido. En una realización, el ácido nucleico está encapsulado en el lípido al menos en un 50 %; en una realización, el ácido nucleico está encapsulado en el lípido al menos en un 75 %; en una realización, el ácido nucleico está encapsulado en el lípido al menos en un 90 %; y en una realización, el ácido nucleico está completamente encapsulado en el lípido. Normalmente, las NPL contienen un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un conjugado lipídico (p. ej., un conjugado de PEG-lípido). Las NPL son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que pueden presentar tiempos de circulación prolongados tras la inyección intravenosa (i.v.), pueden acumularse en sitios distales (p. ej., sitios físicamente separados del sitio de administración), y pueden mediar la expresión del gen transfectado o el silenciamiento de la expresión del gen diana en estos sitios distales.

Las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) tienen normalmente un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 80 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 70 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 60 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm. En una realización, las partículas lipídicas de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm. Las partículas lipídicas de la invención son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas lipídicas de la presente invención, son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas lipídicas con ácido nucleico y su método de preparación se divulgan en, p. ej., las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 20040142025 y 20070042031.

Como se usa en el presente documento, "encapsulado lipídico" puede referirse a una partícula lipídica que proporciona un agente activo o terapéutico, tal como un ácido nucleico (p. ej., un ARN de interferencia o ARNm), con encapsulación total, encapsulación parcial o ambas. En una realización preferida, el ácido nucleico está totalmente encapsulado en la partícula lipídica (p. ej., para formar una SPLP, pSPLP, NPL, u otra partícula lipídica con ácido nucleico).

La expresión "conjugado lipídico" se refiere a un lípido conjugado con un polímero que inhibe la agregación de partículas lipídicas. Dichos conjugados lipídicos incluyen, pero sin limitación, oligómeros de poliamida (p. ej., conjugados de ATTA-lípido), conjugados de polisarcosina-lípido, conjugados de polioxazolina (POZ)-lípido, conjugados de PEG-lípido, tal como PEG acoplado a dialquiloxypropilos, PEG acoplado a diacilglicerolos, PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas, PEG conjugado con ceramidas (véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 5.885.613), lípidos de PEG catiónicos y mezclas de los mismos. El PEG puede conjugarse directamente con el lípido o puede unirse al lípido mediante una fracción conectora. Puede usarse cualquier fracción de enlace adecuada para acoplar el PEG a un lípido, incluido, p. ej., fracciones conectoras que no contengan ésteres y fracciones conectoras que contienen ésteres. En realizaciones preferidas, se utilizan fracciones conectoras que no contienen éster.

La expresión "lípidio anfipático" se refiere, en parte, a cualquier material adecuado en donde la porción hidrófoba del material lipídico se oriente hacia una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas se derivan de la presencia de grupos polares o cargados, tales como los hidratos de carbono, fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo y otros grupos similares. La hidrofobicidad puede conferirse mediante la inclusión de grupos apolares que incluyen, pero sin limitación, grupos de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos sustituidos con uno o más aromáticos, grupo(s) cicloalifático(s) o heterocíclico(s). Entre los ejemplos de compuestos anfipáticos se incluyen, pero sin limitación, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos.

Algunos ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen, pero sin limitación, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos carentes de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilglicerol y β -aciloxiácidos, también están dentro del grupo designado como lípidos anfipáticos. De manera adicional, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente pueden mezclarse con otros lípidos, incluidos triglicéridos y esteroides.

La expresión "lípidio neutro" se refiere a cualquiera de una serie de especies lipídicas que existen en forma zwitteriónica no cargada o neutra a un pH seleccionado. A pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos y diacilglicerol.

La expresión "lípidio no catiónico" se refiere a cualquier lípidio anfipático, así como a cualquier otro lípidio neutro o lípidio aniónico.

La expresión "lípidio aniónico" se refiere a cualquier lípidio que esté cargado negativamente a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero sin limitación, fosfatidilglicerol, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoil fosfatidiletanolaminas, N-succinil fosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilglicerol, palmitoilolfosfatidilglicerol (POPG) y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

La expresión "lípidio catiónico" se refiere a los lípidos que pueden estar cargados positivamente. Entre estos lípidos se incluyen los que tienen uno o más grupos amina con carga positiva. Ciertos lípidos catiónicos son ionizables (y se denominan "lípidos ionizables") y pueden existir en estado de carga neutra o de carga positiva, en función del pH circundante.

En una realización, el lípidio catiónico es un compuesto de fórmula (I) como se describe en el presente documento que, en ciertas realizaciones, tiene una tasa de eliminación tal que queda <10 % del lípidio ionizable parental a los siete (7) días de la administración (p. ej., en el ensayo descrito en el Ejemplo 33).

La expresión "lípidio hidrófobo" se refiere a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, pero sin limitación, grupos de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga, y dichos grupos opcionalmente sustituidos con uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Los ejemplos adecuados incluyen, pero sin limitación, diacilglicerol, dialquilglicerol, N-N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

El término "fusogénico" se refiere a la capacidad de una partícula lipídica, tal como una NPL, para fusionarse con las membranas de una célula. Las membranas pueden ser la membrana plasmática o las membranas que rodean a los orgánulos, p. ej., endosoma, núcleo, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, agua.

Como se usa en el presente documento, la expresión "solución lipídica orgánica" se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, un disolvente orgánico que tiene un lípidio.

"Sitio distal", como se usa en el presente documento, se refiere a un lugar separado físicamente, que no se limita a un lecho capilar adyacente, sino que incluye lugares ampliamente distribuidos por todo un organismo.

"Estable en suero" en relación con partículas lipídicas con ácido nucleico como la NPL se refiere a que la partícula no se degrada significativamente tras la exposición a un suero o a un ensayo con nucleasas que degradarían significativamente el ADN o ARN libre. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo estándar en suero, un ensayo de desoxirribonucleasa o un ensayo de ribonucleasa.

"Administración sistémica", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de partículas lipídicas que conducen a una amplia biodistribución de un agente activo o terapéutico, tal como un ARN de interferencia o ARNm, dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden conducir a la administración sistémica de

determinados agentes, pero no otros. La administración sistémica significa que una cantidad útil, preferiblemente terapéutica, de un agente está expuesta a la mayor parte del organismo. Para obtener una amplia biodistribución generalmente se requiere un tiempo de vida en sangre tal que el agente no se degrade o elimine rápidamente (tal como por órganos de primer paso (hígado, pulmón, etc.) o por unión celular rápida e inespecífica) antes de alcanzar un foco de enfermedad distal al lugar de administración. La administración sistémica de partículas lipídicas puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica, incluye, por ejemplo, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal. En una realización preferida, la administración sistémica de partículas lipídicas se realiza por vía intravenosa.

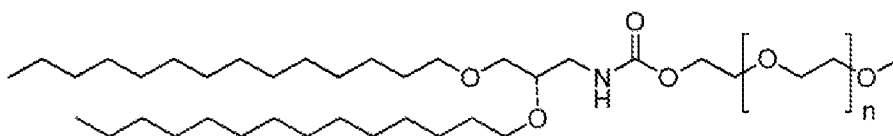
"Administración local", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de un agente activo o terapéutico, tal como un ARN de interferencia o ARNm, directamente a un lugar diana dentro de un organismo. Por ejemplo, un agente puede administrarse localmente mediante inyección directa en una zona de la enfermedad tal como un tumor u otra zona diana tal como una zona de inflamación o un órgano diana tal como el hígado, corazón, páncreas, riñón y similares.

El término "mamífero" se refiere a cualquier especie de mamífero tal como ser humano, ratón, rata, perro, gato, hámster, cobaya, conejo, ganado y similares.

El término "cáncer" se refiere a cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anómalas. El término incluye todos los cánceres y afecciones neoplásicas conocidos, ya se caractericen como malignos, benignos, de tejidos blandos o sólidos, y cánceres de todos los estadios y grados, incluidos los cánceres pre y post metastásicos. Algunos ejemplos de distintos tipos de cáncer son, pero sin limitación, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de apéndice, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer de próstata, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer del sistema nervioso central, glioblastoma, cáncer de piel, linfomas, coriocarcinomas, cánceres de cabeza y cuello, sarcomas osteogénicos y cánceres de la sangre. Entre los ejemplos no limitativos de tipos específicos de cáncer de hígado se incluye el carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de hígado secundario (es decir, causado por metástasis de algún otro tipo de célula cancerosa no hepática) y hepatoblastoma. Como se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

La expresión "grupo precursor aniónico" incluye grupos capaces de formar un ion a pH fisiológico. Por ejemplo, el término incluye los grupos $-CO_2H$, $-O-P(=O)(OH)_2$, $-OS(=O)_2(OH)$, $-O-S(=O)(OH)$ y $-B(OH)_2$. En una realización, el precursor aniónico es $-CO_2H$.

En una realización particular, El PEG-C-DMA tiene la siguiente estructura:



en donde n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 7500. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 6000. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 3000. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 1000 a aproximadamente 7500. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 1000 a aproximadamente 6000. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000. En una realización, n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000. En otra realización, n se selecciona de modo que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 2000. El PEG-C-DMA puede prepararse como se describe en Heyes *et al.*, "Synthesis and Characterization of Novel Poly (Ethylene Glycol)-lipid Conjugates Suitable for use in Drug Delivery", *Journal of Controlled Release*, 2006, y en la patente estadounidense número 8.936.942.

Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona partículas lipídicas novedosas, estables en suero, que comprenden uno o más agentes activos o terapéuticos. También se describen métodos de fabricación de las partículas lipídicas, y métodos de suministro y/o administración de las partículas lipídicas (p. ej., para el tratamiento de una enfermedad o trastorno).

En un aspecto, la presente invención proporciona partículas lipídicas que comprenden: (a) uno o más agentes activos o terapéuticos; (b) uno o más lípidos ionizables de la invención que comprenden de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden de aproximadamente el 0,1 % molar a aproximadamente el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En un aspecto, la presente invención proporciona partículas lipídicas que comprenden: (a) uno o más agentes activos o terapéuticos; (b) uno o más lípidos ionizables de la invención que comprenden de aproximadamente el 50 % molar a aproximadamente el 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden de aproximadamente el 0,5 % molar a aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En determinadas realizaciones, el agente activo o terapéutico está totalmente encapsulado dentro de la porción lipídica de la partícula lipídica de manera que el agente activo o terapéutico en la partícula lipídica es resistente en solución acuosa a la degradación enzimática, p. ej., por una nucleasa o proteasa. En otras realizaciones determinadas, las partículas lipídicas son sustancialmente no tóxicas para mamíferos tales como los seres humanos.

En algunas realizaciones, el agente activo o terapéutico comprende un ácido nucleico. En determinados casos, el ácido nucleico comprende una molécula de ARN de interferencia tal como, p. ej., un ARNip, ARNia, miARN o mezclas de los mismos. En otros ejemplos determinados, el ácido nucleico comprende ADN monocatenario o bicatenario, ARN, o un híbrido ADN/ARN tal como, p. ej., un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulante o mezclas de los mismos. En determinados casos, el ácido nucleico comprende una molécula de ARNm.

En otras realizaciones, el agente activo o terapéutico comprende un péptido o polipéptido. En determinados casos, el péptido o polipéptido comprende un anticuerpo tal como, p. ej., un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo; un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano recombinante, un anticuerpo Primatized™ o mezclas de los mismos. En otros casos, el péptido o polipéptido comprende una citocina, un factor de crecimiento, un factor apoptótico, un factor inductor de la diferenciación, un receptor de superficie celular, un ligando, una hormona, una molécula pequeña (p. ej., una molécula orgánica pequeña o un compuesto), o mezclas de los mismos.

En una realización, el agente activo o terapéutico comprende un ARNip. En una realización, la molécula de ARNip comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (p. ej., de aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, o de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud). Las moléculas de ARNip de la invención son capaces de silenciar la expresión de una secuencia diana *in vitro* y/o *in vivo*.

En algunas realizaciones, la molécula de ARNip comprende al menos un nucleótido modificado. En determinadas realizaciones preferidas, la molécula de ARNip comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más nucleótidos modificados en la región bicatenaria. En determinados casos, el ARNip comprende de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 100 % (p. ej., aproximadamente el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %) de nucleótidos modificados en la región bicatenaria. En realizaciones preferidas, menos de aproximadamente el 25 % (es decir, menos de aproximadamente el 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %) o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 25 % (p. ej., de aproximadamente el 1 %-25 %, 5 %-25 %, 10 %-25 %, 15 %-25 %, 20 %-25 % o 10 %-20 %) de los nucleótidos de la región bicatenaria comprenden nucleótidos modificados.

En otras realizaciones, la molécula de ARNip comprende nucleótidos modificados que comprenden, pero sin limitación, nucleótidos 2'-O-metilo (2'OMe), nucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F), nucleótidos 2'-desoxi, nucleótidos 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA, *Locked Nucleic Acid*) y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe (p. ej., nucleótidos 2'OMe de purina y/o pirimidina) tales como, por ejemplo, nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, nucleótidos 2'OMe-adenosina, nucleótidos 2'OMe-citosina y mezclas de los mismos. En determinados casos, el ARNip no comprende nucleótidos 2'OMe-citosina. En otras realizaciones, el ARNip comprende una estructura de bucle en horquilla.

El ARNip puede comprender nucleótidos modificados en una cadena (es decir, sentido o antisentido) o en ambas cadenas de la región bicatenaria de la molécula de ARNip. Preferentemente, los nucleótidos de uridina y/o guanosina se modifican en posiciones selectivas de la región bicatenaria del dúplex de ARNip. Con respecto a las modificaciones de los nucleótidos de uridina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los nucleótidos de uridina en la cadena sentido y/o antisentido pueden ser un nucleótido de uridina modificado tal como un nucleótido de 2'OMe-uridina. En algunas realizaciones, cada nucleótido de uridina en la cadena sentido y/o antisentido es un nucleótido de 2'OMe-uridina. Con respecto a las modificaciones de los nucleótidos de guanosina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los nucleótidos de guanosina en la cadena sentido y/o antisentido pueden ser un nucleótido de

guanosina modificado tal como un nucleótido de 2'OMe-guanosina. En algunas realizaciones, cada nucleótido de guanosina en la cadena sentido y/o antisentido es un nucleótido de 2'OMe-guanosina.

En determinadas realizaciones, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más motivos 5'-GU-3' en una secuencia de ARNip se pueden modificar, p. ej., introduciendo emparejamientos incorrectos para eliminar los motivos 5'-GU-3' y/o introduciendo nucleótidos modificados tales como nucleótidos 2'OMe. El motivo 5'-GU-3' puede estar en la cadena de sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas de la secuencia de ARNip. Los motivos 5'-GU-3' pueden ser adyacentes entre sí o, como alternativa, pueden estar separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más nucleótidos.

En algunas realizaciones preferidas, una molécula de ARNip modificada es menos inmunoestimulante que una secuencia correspondiente de ARNip no modificada. En dichas realizaciones, la molécula de ARNip modificada con propiedades inmunoestimulantes reducidas conserva ventajosamente la actividad de ARNi contra la secuencia diana. En otra realización, las propiedades inmunoestimulantes de la molécula de ARNip modificada y su capacidad para silenciar la expresión del gen diana pueden equilibrarse u optimizarse mediante la introducción de modificaciones 2'OMe mínimas y selectivas dentro de la secuencia de ARNip, tales como, p. ej., dentro de la región bicatenaria del dúplex de ARNip. En determinados casos, el ARNip modificado es de al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % menos inmunoestimulante que el correspondiente ARNip no modificado. Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que las propiedades inmunoestimulantes de la molécula de ARNip modificada y de la correspondiente molécula de ARNip no modificada pueden determinarse mediante, por ejemplo, la medición de los niveles de INF- α y/o IL-6 de aproximadamente dos a aproximadamente doce horas después de la administración sistémica en un mamífero o transfección de una célula respondedora de mamífero utilizando un sistema de administración apropiado basado en lípidos (como el sistema de administración de NPL divulgado en el presente documento).

En determinadas realizaciones, una molécula de ARNip modificado tiene una CI_{50} (es decir, concentración inhibidora semimáxima) inferior o igual a diez veces la del correspondiente ARNip no modificado (es decir, el ARNip modificado tiene una CI_{50} que es inferior o igual a diez veces la CI_{50} del correspondiente ARNip no modificado). En otras realizaciones, el ARNip modificado tiene una CI_{50} inferior o igual a tres veces la de la correspondiente secuencia de ARNip no modificada. En otras realizaciones más, el ARNip modificado tiene una CI_{50} inferior o igual a dos veces la del ARNip no modificado correspondiente. Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que puede generarse una curva DE dosis-respuesta y los valores de CI_{50} para el ARNip modificado y el correspondiente ARNip no modificado pueden determinarse fácilmente usando métodos conocidos por los expertos en la materia.

En otra realización más, una molécula de ARNip modificada es capaz de silenciar al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de la expresión de la secuencia diana en relación con la correspondiente secuencia de ARNip no modificada.

En algunas realizaciones, la molécula de ARNip no comprende modificaciones de la cadena principal de fosfato, p. ej., en la cadena sentido y/o antisentido de la región bicatenaria. En otras realizaciones, el ARNip comprende una, dos, tres, cuatro o más modificaciones de la cadena principal de fosfato, p. ej., en la cadena sentido y/o antisentido de la región bicatenaria. En realizaciones preferidas, el ARNip no comprende modificaciones de la cadena principal de fosfato.

En realizaciones adicionales, el ARNip no comprende nucleótidos 2'-desoxi, p. ej., en la cadena sentido y/o antisentido de la región bicatenaria. En otras realizaciones adicionales, el ARNip comprende una, dos, tres, cuatro o más nucleótidos 2'-desoxi, p. ej., en la cadena sentido y/o antisentido de la región bicatenaria. En realizaciones preferidas, el ARNip no comprende nucleótidos 2'-desoxi.

En determinados casos, el nucleótido en el extremo 3' de la región bicatenaria en la cadena sentido y/o antisentido no es un nucleótido modificado. En otros ejemplos determinados, los nucleótidos cercanos al extremo 3' (p. ej., dentro de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos del extremo 3') de la región bicatenaria en la cadena sentido y/o antisentido no son nucleótidos modificados.

Las moléculas de ARNip descritas en el presente documento pueden tener protuberancias 3' de uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos en uno o más lados de la región bicatenaria, o puede carecer de protuberancias (es decir, tener extremos romos) en uno o más lados de la región bicatenaria. Preferentemente, el ARNip tiene protuberancias 3' de dos nucleótidos a cada lado de la región bicatenaria. En determinados casos, la protuberancia 3' de la cadena antisentido tiene complementariedad con la secuencia diana y la protuberancia 3' de la cadena sentido tiene complementariedad con una cadena complementaria de la secuencia diana. Como alternativa, las protuberancias 3' no tienen complementariedad con la secuencia diana o la cadena complementaria de la misma. En algunas realizaciones, las protuberancias 3' comprenden uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos tales como nucleótidos 2'-desoxi (2'H). En determinadas realizaciones preferidas, las protuberancias 3' comprenden nucleótidos de desoxitimidina (dT) y/o uridina. En otras realizaciones, uno o más de los nucleótidos de las protuberancias 3' de uno o ambos lados de la región bicatenaria comprenden nucleótidos modificados. Los ejemplos no limitativos de

nucleótidos modificados se han descrito anteriormente e incluyen nucleótidos 2'OMe, nucleótidos 2'-desoxi-2'F, nucleótidos 2'-desoxi, nucleótidos 2'-O-2-MOE, nucleótidos LNA y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos en las protuberancias 3' presentes en la cadena sentido y/o antisentido del ARNip comprenden nucleótidos 2'OMe (p. ej., nucleótidos 2'OMe de purina y/o pirimidina) de manera que, por ejemplo, nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, nucleótidos 2'OMe-adenosina, nucleótidos 2'OMe-citosina y mezclas de los mismos.

El ARNip puede comprender al menos uno o un cóctel (p. ej., al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) de secuencias de ARNip no modificadas y/o modificadas que silencian la expresión del gen diana.

El cóctel de ARNip puede comprender secuencias dirigidas a la misma región o dominio (p. ej., un "punto caliente") y/o a diferentes regiones o dominios de uno o más genes diana. En determinados casos, una o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) ARNip modificados que silencian la expresión del gen diana están presentes en un cóctel. En otros ejemplos determinados, una o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) secuencias de ARNip no modificadas que silencian la expresión del gen diana están presentes en un cóctel.

En algunas realizaciones, la cadena antisentido de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es al menos de aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % complementaria a la secuencia diana o a una parte de la misma. En otras realizaciones, la cadena antisentido de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es un 100 % complementaria a la secuencia diana o a una parte de la misma. En realizaciones adicionales, la cadena antisentido de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que se hibrida específicamente con la secuencia diana o con una parte de la misma.

En realizaciones adicionales, la cadena sentido de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es al menos de aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia diana o a una parte de la misma. En realizaciones adicionales, la cadena sensitiva de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es un 100 % idéntica a la secuencia diana o a una parte de la misma.

En algunas realizaciones, el lípido ionizable de la invención puede comprender de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 90 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 85 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 80 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 75 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 70 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 65 % molar o de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 60 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En algunas realizaciones, el lípido ionizable de la invención puede comprender de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 90 % molar, de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 85 % molar, de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 80 % molar, de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 75 % molar, de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 70 % molar, de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 65 % molar, o de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 60 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En otras realizaciones, el lípido ionizable de la invención puede comprender de aproximadamente el 55 % molar a aproximadamente el 90 % molar, de aproximadamente el 55 % molar a aproximadamente el 85 % molar, de aproximadamente el 55 % molar a aproximadamente el 80 % molar, de aproximadamente el 55 % molar a aproximadamente el 75 % molar, de aproximadamente el 55 % molar a aproximadamente el 70 % molar, o de aproximadamente el 55 % molar a aproximadamente el 65 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En otras realizaciones más, el lípido ionizable de la invención puede comprender de aproximadamente el 60 % molar a aproximadamente el 90 % molar, de aproximadamente el 60 % molar a aproximadamente el 85 % molar, de aproximadamente el 60 % molar a aproximadamente el 80 % molar, de aproximadamente el 60 % molar a aproximadamente el 75 % molar o de aproximadamente el 60 % molar a aproximadamente el 70 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En otras realizaciones diferentes, el lípido ionizable de la invención puede comprender de aproximadamente el 65 % molar a aproximadamente el 90 % molar, de aproximadamente el 65 % molar a aproximadamente el 85 % molar, de aproximadamente el 65 % molar a aproximadamente el 80 % molar o de aproximadamente el 65 % molar a aproximadamente el 75 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En realizaciones adicionales, el lípido ionizable de la invención puede comprender de aproximadamente el 70 % molar a aproximadamente el 90 % molar, de aproximadamente el 70 % molar a aproximadamente el 85 % molar, de aproximadamente el 70 % molar a aproximadamente el 80 % molar, de aproximadamente el 75 % molar a aproximadamente el 90 % molar, de aproximadamente el 75 % molar a aproximadamente el 85 % molar o de aproximadamente el 80 % molar a aproximadamente el 90 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En realizaciones adicionales, el lípido ionizable de la invención puede comprender (al menos) aproximadamente el 30,

35, 40, 45, 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, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula.

5 En las partículas lipídicas de la invención, el lípido no catiónico puede comprender, p. ej., uno o más lípidos aniónicos y/o neutros. En realizaciones preferidas, el lípido no catiónico comprende uno de los siguientes componentes lipídicos neutros: (1) colesterol o un derivado del mismo, (2) un fosfolípido; o (3) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo.

10 Entre los ejemplos de derivados del colesterol se incluyen, pero sin limitación, colestanol, colestanona, colestenona, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietil éter, colesteryl-4'-hidroxibutiléter y mezclas de los mismos. En el presente documento se describe la síntesis del colesteryl-2'-hidroxietiléter.

15 El fosfolípido puede ser un lípido neutro que incluye, pero sin limitación, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleol-fosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometilfosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoilfosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleil-fosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de huevo (EPC) y mezclas de las mismas. En determinadas realizaciones
20 preferidas, el fosfolípido es DPPC, DSPC o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, el lípido no catiónico (p. ej., uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 70 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 70 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 70 % molar, de
25 aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 70 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 70 % molar, de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 55 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 55 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 55 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 55 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 55 % molar, de aproximadamente el 13 % molar a
30 aproximadamente el 50 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 50 % molar o de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 50 % molar del lípido total presente en la partícula. Cuando el lípido no catiónico es una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del colesterol, la mezcla puede comprender hasta aproximadamente el 40, 50 o 60 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

35 En otras realizaciones, el lípido no catiónico (p. ej., uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar, de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar, de
40 aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar o de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En otras realizaciones más, el lípido no catiónico (p. ej., uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de
45 aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 45 % molar o de aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 45 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

50 En otras realizaciones diferentes, el lípido no catiónico (p. ej., uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 40 % molar o de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar del total de
55 lípidos presentes en la partícula.

En realizaciones adicionales, el lípido no catiónico (p. ej., uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 35 % molar, de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 35 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 35 % molar, de
60 aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 35 % molar o de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 35 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En otras realizaciones adicionales, el lípido no catiónico (p. ej., uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de
65 aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 10 % molar a

aproximadamente el 25 % molar, de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 25 % molar o de aproximadamente 15 % molar a aproximadamente el 25 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En realizaciones adicionales, el lípido no catiónico (p. ej., uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender (al menos) aproximadamente el 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 % molar (o cualquier fracción de los mismos o el intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula.

En determinadas realizaciones preferidas, el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 31,5 % molar a aproximadamente 42,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula lipídica sin fosfolípidos de la presente invención puede comprender colesterol o un derivado del mismo en aproximadamente el 37 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. En otras realizaciones preferidas, una partícula lipídica sin fosfolípidos de la invención puede comprender colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 35 % molar, de aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 32 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 32 % molar a aproximadamente el 42 % molar, de aproximadamente el 32 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 34 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 34 % molar a aproximadamente el 42 % molar, de aproximadamente el 34 % molar a aproximadamente el 40 % molar o de aproximadamente el 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula.

En determinadas realizaciones preferidas diferentes, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula lipídica que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol puede comprender DPPC en aproximadamente el 7 % molar y colesterol en aproximadamente el 34 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. En otras realizaciones, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 3 % molar a aproximadamente el 15 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 15 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 12 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 8 % molar, de aproximadamente el 5 % molar a aproximadamente el 12 % molar, de aproximadamente el 5 % molar a aproximadamente el 9 % molar, de aproximadamente el 6 % molar a aproximadamente el 12 % molar, de aproximadamente el 6 % molar a aproximadamente el 6 % molar a aproximadamente el 10 % molar o de aproximadamente el 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 35 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 35 % molar, de aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 40 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 28 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 28 % molar a aproximadamente el 38 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 38 % molar, de aproximadamente el 32 % molar a aproximadamente el 36 % molar o de aproximadamente el 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula.

En realizaciones preferidas adicionales, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula lipídica que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol puede comprender DPPC en aproximadamente el 20 % molar y colesterol en aproximadamente el 20 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. En otras realizaciones, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 25 % molar, de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 20 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 25 % molar, de aproximadamente el 12 % molar a aproximadamente el 28 % molar, de aproximadamente el 14 % molar a aproximadamente el 26 % molar o de aproximadamente el 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 25 % molar, de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 20 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 25 % molar, de aproximadamente el 12 % molar a

aproximadamente el 28 % molar, de aproximadamente el 14 % molar a aproximadamente el 26 % molar o de aproximadamente el 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula.

5 Lípido conjugado

En las partículas lipídicas de la invención (p. ej., la NPL que comprende, p. ej., un ARN de interferencia tal como ARNip o ARNm), el lípido conjugado puede comprender, p. ej., uno o más de los siguientes: un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, un conjugado de poliamida (ATTA)-lípido o mezclas de los mismos. En una realización preferida, las partículas lipídicas con ácido nucleico comprenden un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido. Los lípidos conjugados pueden comprender un PEG-lípido incluido, p. ej., un PEG-dialciloalcohol (DAG), un PEG-dialquiloxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer) o mezclas de los mismos. El conjugado de PEG-DAA puede ser un PEG-dilauriloxipropilo (C12), un PEG-dimiristiloxipropilo (C14), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C16), un PEG-disteariloxipropilo (C18) o mezclas de los mismos.

Los conjugados de PEG-lípido adicionales adecuados para usar en la invención incluyen, pero sin limitación, mPEG2000-1,2-di-O-alkil-sn-3-carbomiloilglicérido (PEG-C-DOMG). La síntesis de PEG-C-DOMG se describe en la solicitud PCT n.º PCT/USO8/88676, presentada el 31 de diciembre de 2008. Adicionalmente, se incluyen conjugados de PEG-lípidos adecuados para usar en la invención, sin limitación, 1-[8'-(1,2-dimiristil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbomiloil-w-metil-poli(etilenglicol) (2 KPEG-DMG). La síntesis de 2 KPEG-DMG se describe en la patente de EE. UU. n.º 7.404.969.

La fracción de PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en el presente documento puede comprender un peso molecular promedio de aproximadamente 550 Da a aproximadamente 10.000 Da. En determinados casos, la fracción de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 5000 Da (p. ej., de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 5000 Da, de aproximadamente 1500 Da a aproximadamente 3000 Da, de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 3000 Da, de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 2000 Da, etc.). En realizaciones preferidas, la fracción de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 Da o de aproximadamente 750 Da.

En determinados casos, el lípido conjugado (p. ej., conjugado de PEG-lípido) puede comprender de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % (o cualquier fracción del mismo o intervalo del mismo) del total de lípidos presentes en la partícula. En determinados casos, el lípido conjugado (p. ej., conjugado de PEG-lípido) puede comprender de aproximadamente el 0,1 % molar a aproximadamente el 2 % molar, de aproximadamente el 0,5 % molar a aproximadamente el 2 % molar, de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 2 % molar, de aproximadamente el 0,6 % molar a aproximadamente el 1,9 % molar, de aproximadamente el 0,7 % molar a aproximadamente el 1,8 % molar, de aproximadamente el 0,8 % molar a aproximadamente el 1,7 % molar, de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 1,8 % molar, de aproximadamente el 1,2 % molar a aproximadamente el 1,8 % molar, de aproximadamente el 1,2 % molar a aproximadamente el 1,7 % molar, de aproximadamente el 1,3 % molar a aproximadamente el 1,6 % molar, de aproximadamente el 1,4 % molar a aproximadamente el 1,5 % molar o de aproximadamente el 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o 2 % molar (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) del total de lípidos presentes en la partícula.

En las partículas lipídicas de la invención, el agente activo o terapéutico puede estar totalmente encapsulado dentro de la porción lipídica de la partícula, protegiendo de este modo el agente activo o terapéutico de la degradación enzimática. En realizaciones preferidas, una NPL que comprende un ácido nucleico, tal como un ARN de interferencia (p. ej., ARNip) o ARNm, está totalmente encapsulado dentro de la porción lipídica de la partícula, protegiendo de este modo el ácido nucleico de la degradación por nucleasas. En determinados casos, el ácido nucleico en la NPL no se degrada sustancialmente tras la exposición de la partícula a una nucleasa a 37 °C. durante al menos aproximadamente 20, 30, 45 o 60 minutos. En otros ejemplos determinados, el ácido nucleico en la NPL no se degrada sustancialmente tras la incubación de la partícula en suero a 37 °C. durante al menos aproximadamente 30, 45 o 60 minutos o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 o 36 horas. En otras realizaciones, el agente activo o terapéutico (por ejemplo, un ácido nucleico como el ARNip) forma un complejo con la porción lipídica de la partícula. Uno de los beneficios de las formulaciones de la presente invención es que las composiciones de partículas lipídicas son sustancialmente no tóxicas para mamíferos tales como los seres humanos.

La expresión "totalmente encapsulado" indica que el agente activo o terapéutico de la partícula lipídica no se degrada significativamente tras la exposición al suero o a un ensayo con nucleasas o proteasas que degradarían significativamente el ADN libre, ARN o proteína. En un sistema totalmente encapsulado, preferentemente menos de aproximadamente el 25 % del agente activo o terapéutico en la partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría el 100 % del agente activo o terapéutico libre, más preferentemente menos de aproximadamente el 10 % y lo más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % del agente activo o terapéutico presente en la partícula se degrada. En el contexto de los agentes terapéuticos de ácidos nucleicos, la encapsulación completa puede determinarse mediante un ensayo Oligreen®. Oligreen® es una tinción fluorescente ultrasensible de ácidos nucleicos para cuantificar oligonucleótidos y ADN o ARN monocatenario en solución (disponible en Invitrogen Corporation; Carlsbad, Calif.). "Totalmente encapsulado" indica también que las partículas lipídicas son estables en

sueros, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus componentes tras la administración *in vivo*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición de partículas lipídicas (p. ej., NPL) que comprende una pluralidad de partículas lipídicas. En realizaciones preferidas, el agente activo o terapéutico (p. ej., ácido nucleico) está totalmente encapsulado dentro de la porción lipídica de las partículas lipídicas (p. ej., NPL), tal como de aproximadamente 30 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos) de las partículas lipídicas (p. ej., NPL) tienen el agente activo o terapéutico encapsulado en su interior.

Normalmente, las partículas lipídicas (p. ej., NPL) de la invención tienen una proporción de lípido:agente activo (p. ej., lípido:ácido nucleico) (proporción masa/masa) de aproximadamente 1 a aproximadamente 100. En algunos casos, la proporción de lípido:agente activo (p. ej., lípido-ácido nucleico) (proporción en masa/masa) varía de aproximadamente de 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 2 a aproximadamente 25, de aproximadamente 3 a aproximadamente 20, de aproximadamente 4 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10. En realizaciones preferidas, las partículas lipídicas de la invención tienen una proporción de lípido:agente activo (p. ej., ácido lipídico-nucleico) (proporción en masa/masa) de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, p. ej., aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos).

Normalmente, las partículas lipídicas (p. ej., NPL) de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm. En realizaciones preferidas, las partículas lipídicas (p. ej., NPL) de la invención tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, o menos de aproximadamente 150 nm, 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm u 80 nm (o cualquier fracción de los mismos o intervalo de los mismos).

En una realización específica de la invención, comprende la NPL: (a) una o más moléculas de ácido nucleico no modificadas y/o modificadas (es decir, ARN de interferencia que silencian la expresión del gen diana, tal como ARNip, ARNia, miARN; o ARNm que dan lugar a la expresión de la proteína diana); (b) un lípido ionizable de la invención que comprende de aproximadamente el 56,5 % molar a aproximadamente el 66,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 31,5 % molar a aproximadamente el 42,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Esta realización específica de la NPL se denomina generalmente en el presente documento formulación "1:62".

En otra realización específica de la invención, comprende la NPL: (a) una o más moléculas de ácido nucleico no modificadas y/o modificadas (es decir, ARN de interferencia que silencian la expresión del gen diana, tal como ARNip, ARNia, miARN; o ARNm que dan lugar a la expresión de la proteína diana); (b) un lípido ionizable de la invención que comprende de aproximadamente el 52 % molar a aproximadamente el 62 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 36 % molar a aproximadamente el 47 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Esta realización específica de la NPL se denomina generalmente en el presente documento formulación "1:57".

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula lipídica (p. ej., NPL) descrita en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención encuentra uso en un método para introducir uno o más agentes activos o terapéuticos (es decir, ácido nucleico) en una célula, que comprende poner en contacto de la célula con una partícula lipídica (p. ej., NPL) descrita en el presente documento. En una realización, la célula está en un mamífero y el mamífero es un ser humano. La presente invención también encuentra uso en un método para la administración *in vivo* de uno o más agentes

- 5 activos o agentes terapéuticos (p. ej., ácido nucleico), que comprende administrar a un sujeto mamífero una partícula lipídica (p. ej., NPL) descrita en el presente documento. En una realización preferida, el modo de administración incluye, pero sin limitación, oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea e intradérmica. Preferentemente, el sujeto mamífero es un ser humano.
- 10 En una realización, al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la dosis total inyectada de las partículas lipídicas (p. ej., NPL) está presente en el plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En otras realizaciones, más de aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 % y hasta aproximadamente el 60 %, 70 % u 80 % de la dosis total inyectada de las partículas lipídicas (p. ej., NPL) está presente en el plasma
- 15 aproximadamente 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En determinados casos, más de aproximadamente el 10 % de una pluralidad de las partículas está presente en el plasma de un mamífero aproximadamente 1 hora después de la administración. En otros ejemplos determinados, la presencia de las partículas lipídicas (p. ej., NPL) es detectable al menos aproximadamente 1 hora después de la administración de la partícula. En determinadas realizaciones, la presencia de un agente activo o terapéutico, tal como un ARN de interferencia (p. ej., ARNip) o ARNm es detectable en las células aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración (p.
- 20 ej., pulmón, hígado, tumor o en un foco de inflamación). En otras realizaciones, la regulación a la baja de la expresión de una secuencia diana por un agente activo o terapéutico, tal como un ARN de interferencia (p. ej., ARNip) es detectable aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de su administración. En otras realizaciones más, la regulación a la baja de la expresión de una secuencia diana por un agente activo o terapéutico tal como un ARN de interferencia (p. ej., ARNip) se produce preferentemente en células tumorales o en células de un foco de inflamación. En realizaciones adicionales, la presencia o el efecto de un agente activo o terapéutico tal como un ARN
- 25 de interferencia (p. ej., ARNip) en células en un sitio proximal o distal al sitio de administración o en células del pulmón, hígado o un tumor es detectable aproximadamente 12, 24, 48, 72 o 96 horas, o aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 o 28 días después de la administración. En otras realizaciones, el aumento de la expresión de una secuencia diana por un agente activo o terapéutico, tal como un ARNm o un ARN autoamplificable es detectable
- 30 aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras realizaciones más, la regulación de la expresión de una secuencia diana por un agente activo o terapéutico tal como un ARNm o un ARN autoamplificante se produce preferentemente en las células tumorales o en las células de un foco de inflamación. En realizaciones adicionales, la presencia o el efecto de un agente activo o terapéutico tal como un ARNm o un ARN autorreplicante en células en un sitio proximal o distal al sitio de administración o en células del pulmón, hígado o un
- 35 tumor es detectable aproximadamente 12, 24, 48, 72 o 96 horas, o aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 o 28 días después de la administración. En realizaciones adicionales, las partículas lipídicas (p. ej., NPL) de la invención se administran por vía parenteral o intraperitoneal.

- 40 En algunas realizaciones, las partículas lipídicas (p. ej., NPL) de la invención son particularmente útiles en métodos para la administración terapéutica de uno o más ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ARN de interferencia (p. ej., ARNip). En particular, esta invención encuentra uso en métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero (es decir, un roedor tal como un ratón o un primate tal como un humano, chimpancé o mono) mediante la regulación a la baja o el silenciamiento de la transcripción y/o traducción de uno o más genes o secuencias de ácido nucleico diana de interés. Como ejemplo no limitativo, la invención es útil para
- 45 la administración *in vivo* de ARN de interferencia (p. ej., ARNip) en el hígado y/o tumor de un sujeto mamífero. En determinadas realizaciones, la enfermedad o el trastorno está asociado con la expresión y/o sobreexpresión de un gen y la expresión o sobreexpresión del gen se reduce mediante el ARN de interferencia (p. ej., ARNip). En otras realizaciones determinadas, puede administrarse al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula lipídica (p. ej., NPL). En algunos casos, un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNip) se formula en una NPL, y las partículas se administran a pacientes que requieren dicho tratamiento. En otros casos, se retiran células de un
- 50 paciente, el ARN de interferencia (p. ej., ARNip) se administra *in vitro* (p. ej., utilizando una NPL descrita en el presente documento) y las células se reinyectan en el paciente.

- 55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona partículas lipídicas (p. ej., NPL) que comprenden moléculas de ARN de interferencia asimétrico (ARNia) que silencian la expresión de un gen diana y métodos de utilización de dichas partículas para silenciar la expresión del gen diana.

- 60 En una realización, la molécula de ARNia comprende una región bicatenaria (dúplex) de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos (emparejados por bases) de longitud, en donde la molécula de ARNia comprende una cadena antisentido que comprende protuberancias 5' y 3', y en donde la molécula de ARNia es capaz de silenciar la expresión del gen diana.

- 65 En determinados casos, la molécula de ARNai comprende una región bicatenaria (dúplex) de aproximadamente 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 o 14-17 nucleótidos (emparejados por bases) de longitud, más normalmente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos (pares de bases) de longitud. En otros ejemplos determinados, las protuberancias 5' y 3' de la cadena antisentido comprenden secuencias complementarias a la secuencia de ARN diana, y

opcionalmente pueden comprender también secuencias no diana. En algunas realizaciones, cada una de las protuberancias 5' y 3' de la cadena antisentido comprende o consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más nucleótidos.

- 5 En otras realizaciones, la molécula de ARNia comprende nucleótidos modificados comprendidos en el grupo que comprende nucleótidos 2'OMe, nucleótidos 2'F, nucleótidos 2'-desoxi, nucleótidos 2'-O-MOE, nucleótidos LNA y mezclas de los mismos. En una realización preferida, la molécula de ARNia comprende nucleótidos 2'OMe. Como ejemplo no limitativo, los nucleótidos 2'OMe pueden seleccionarse del grupo que consiste en nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina y mezclas de los mismos.

10 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona partículas lipídicas (p. ej., NPL) que comprenden moléculas de microARN (miARN) que silencian la expresión de un gen diana y métodos de utilización de dichas composiciones para silenciar la expresión del gen diana.

- 15 En una realización, la molécula de miARN comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, en donde la molécula de miARN es capaz de silenciar la expresión del gen diana.

20 En determinados casos, la molécula de miARN comprende aproximadamente 15-50, 15-40 o 15-30 nucleótidos de longitud, más usualmente aproximadamente 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, y son preferentemente de aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud. En una realización preferida, la molécula de miARN es una molécula de miARN madura dirigida a una secuencia de ARN de interés.

25 En algunas realizaciones, la molécula de miARN comprende nucleótidos modificados comprendidos en el grupo que comprende nucleótidos 2'OMe, nucleótidos 2'F, nucleótidos 2'-desoxi, nucleótidos 2'-O-MOE, nucleótidos LNA y mezclas de los mismos. En una realización preferida, la molécula de miARN comprende nucleótidos 2'OMe. Como ejemplo no limitativo, los nucleótidos 2'OMe pueden seleccionarse del grupo que consiste en nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina y mezclas de los mismos.

30 En algunas realizaciones, las partículas lipídicas (p. ej., NPL) de la invención son útiles en métodos para la administración terapéutica de una o más moléculas de ARNm. En particular, esta invención encuentra uso en métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero (es decir, un roedor tal como un ratón o un primate tal como un humano, chimpancé o mono) mediante la expresión de una o más proteínas diana. Como ejemplo no limitativo, la invención es útil para la administración *in vivo* de una o más moléculas de ARNm a un sujeto mamífero. En otras realizaciones determinadas, puede administrarse al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula lipídica (p. ej., NPL). En algunos casos, una o más moléculas de ARNm se formulan en una NPL, y las partículas se administran a pacientes que requieren dicho tratamiento. En otros casos, se retiran células de un paciente, se administran una o más moléculas de ARNm *in vitro* (p. ej., utilizando una NPL descrita en el presente documento), y las células se reinyectan en el paciente.

40 Como tal, las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) son ventajosas y adecuadas para usar en la administración de agentes activos o terapéuticos, tales como ácidos nucleicos (p. ej., ARN de interferencia tales como ARNip, ARNia y/o miARN; o ARNm; ARN guía; ARN autoamplificador; ARN circular; ADN, incluido ADN plasmídico y ADN de extremo cerrado a un sujeto (p. ej., un mamífero tal como ser humano) porque son estables en circulación, de un tamaño requerido para el comportamiento farmacodinámico que resulta en el acceso a sitios extravasculares, y son capaces de alcanzar poblaciones celulares diana.

Principios activos

50 Los agentes activos (p. ej., agentes terapéuticos) incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado sobre una célula, tejido, órgano o sujeto. Dichos efectos pueden ser, p. ej., biológico, fisiológico y/o cosmético. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto, incluido, pero sin limitación, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, pequeñas moléculas y mezclas de los mismos. Algunos ejemplos no limitativos de ácidos nucleicos incluyen moléculas de ARN de interferencia (p. ej., ARNip, ARNia, miARN), oligonucleótidos antisentido, ARNm, ARN autoamplificante, plásmidos, ribozimas, oligonucleótidos inmunoestimulantes y mezclas de los mismos.

55 Entre los ejemplos de péptidos o polipéptidos se incluyen, sin limitación, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo; anticuerpos humanizados, se divulgan anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos Primatized™), citocinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores inductores de diferenciación, receptores de la superficie celular y sus ligandos, hormonas y mezclas de los mismos. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas o compuestos tales como cualquier agente o fármaco convencional conocido por los expertos en la materia.

60 En algunas realizaciones, el agente activo es un agente terapéutico, o una sal o un derivado del mismo. Los derivados de agentes terapéuticos pueden ser terapéuticamente activos por sí mismos o pueden ser profármacos, que se activan tras una nueva modificación. Por tanto, en una realización, un derivado del agente terapéutico conserva una parte o la totalidad de la actividad terapéutica en comparación con el agente no modificado, mientras que, en otra realización,

un derivado de un agente terapéutico es un profármaco que carece de actividad terapéutica, pero se activa al modificarlo.

Ácidos nucleicos

En determinadas realizaciones, las partículas lipídicas de la presente invención están asociadas a un ácido nucleico, dando lugar a una partícula de ácido nucleico-lípido (p. ej., NPL). En algunas realizaciones, el ácido nucleico está totalmente encapsulado en la partícula lipídica. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" incluye cualquier oligonucleótido o polinucleótido, los fragmentos que contienen hasta 60 nucleótidos suelen denominarse oligonucleótidos, mientras que los fragmentos más largos se denominan polinucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos de la invención tienen una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos. El ácido nucleico puede administrarse solo en las partículas lipídicas de la invención, o combinado (p. ej., coadministrado) con partículas lipídicas de la invención que comprenden péptidos, polipéptidos o pequeñas moléculas tales como fármacos convencionales.

En el contexto de esta invención, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consiste en bases, azúcares y enlaces entre azúcares (cadena principal) naturales. Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros no naturales, o porciones de los mismos, que funcionan de forma similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo sobre las formas nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, inmunogenicidad reducida y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos se clasifican generalmente como desoxirribooligonucleótidos o ribooligonucleótidos. Un desoxirribooligonucleótido consiste en un azúcar de 5 carbonos, que se denomina desoxirribosa, unido covalentemente a fosfato en los carbonos 5' y 3' de este azúcar para formar un polímero alternante, no ramificado. Un ribooligonucleótido consiste en una estructura repetitiva similar en la que el azúcar de 5 carbonos es ribosa.

El ácido nucleico presente en una partícula lipídica con ácido nucleico de acuerdo con la presente invención incluye cualquier forma de ácido nucleico conocida. Los ácidos nucleicos utilizados en el presente documento pueden ser ADN o ARN monocatenarios, o ADN o ARN bicatenarios, o híbridos de ADN-ARN. En el presente documento se describen ejemplos de ADN bicatenario que incluyen, p. ej., genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y terminación, y sistemas autorreplicantes tales como ADN vírico o plasmídico. En el presente documento se describen ejemplos de ARN bicatenario que incluyen, p. ej., ARNip y otros agentes de ARNi tales como ARNia y pre-miARN. Los ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, p. ej., oligonucleótidos antisentido, ribozimas, miARN maduro y oligonucleótidos formadores de triplex.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden tener diferentes longitudes, generalmente en función de la forma en particular del ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes pueden tener una longitud de aproximadamente 1000 a aproximadamente 100.000 residuos de nucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden estar en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En diversas realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos, tanto monocatenarios, como bicatenarios y de triple cadena, puede estar en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

En realizaciones particulares, un oligonucleótido (o una cadena del mismo) de la invención se hibrida específicamente con una secuencia polinucleotídica diana o es complementario a la misma. La expresión "específicamente hibridable" y el término "complementario" como se utilizan en el presente documento indican un grado suficiente de complementariedad de manera que se produce una unión estable y específica entre la diana de ADN o ARN y el oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. En realizaciones preferidas, un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la secuencia diana interfiere con la función normal de la secuencia diana para causar una pérdida de utilidad o de expresión de la misma, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos. Por tanto, el oligonucleótido puede incluir 1, 2, 3 o más sustituciones de bases en comparación con la región de un gen o secuencia de ARNm a la que se dirige o con la que hibrida específicamente.

ARNip

El componente de ARNip de las partículas lipídicas con ácido nucleico de la presente invención es capaz de silenciar la expresión de un gen diana de interés. Cada cadena del dúplex de ARNip tiene normalmente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos, preferentemente, con una longitud de aproximadamente 15

a aproximadamente 30 nucleótidos. En determinadas realizaciones, el ARNip comprende al menos un nucleótido abásico. El ARNip modificado es generalmente menos inmunoestimulante que una secuencia correspondiente de ARNip sin modificar y conserva la actividad de ARNi contra el gen diana de interés. En algunas realizaciones, el ARNip modificado contiene al menos un nucleótido 2'OMe de purina o pirimidina tal como un nucleótido 2'OMe-guanosina, 2'OMe-uridina, 2'OMe-adenosina y/o 2'OMe-citosina. En realizaciones preferidas, uno o más de los nucleótidos de uridina y/o guanosina están modificados. Los nucleótidos modificados pueden estar presentes en una cadena (es decir, sentido o antisentido) o en ambas cadenas del ARNip. Las secuencias de ARNip pueden tener protuberancias (p. ej., protuberancias 3' o 5' como se describe en Elbashir *et al.*, *Genes Dev.*, 15:188 (2001) o Nykanen *et al.*, *Cell*, 107:309 (2001)), o pueden carecer de protuberancias (es decir, tener extremos romos).

El ARNip modificado comprende generalmente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 100 % (p. ej., aproximadamente el 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 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 %) de nucleótidos modificados en la región bicatenaria del dúplex de ARNip. En determinadas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de los nucleótidos de la región bicatenaria del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

En algunas realizaciones, menos de aproximadamente el 25 % (es decir, menos de aproximadamente el 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

En otras realizaciones, de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 25 % (es decir, de aproximadamente el 1 %-25 %, 2 %-25 %, 3 %-25 %, 4 %-25 %, 5 %-25 %, 6 %-25 %, 7 %-25 %, 8 %-25 %, 9 %-25 %, 10 %-25 %, 11 %-25 %, 12 %-25 %, 13 %-25 %, 14 %-25 %, 15 %-25 %, 16 %-25 %, 17 %-25 %, 18 %-25 %, 19 %-25 %, 20 %-25 %, 21 %-25 %, 22 %-25 %, 23 %-25 %, 24 %-25 %, etc.) o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 % (es decir, de aproximadamente el 1 %-20 %, 2 %-20 %, 3 %-20 %, 4 %-20 %, 5 %-20 %, 6 %-20 %, 7 %-20 %, 8 %-20 %, 9 %-20 %, 10 %-20 %, 11 %-20 %, 12 %-20 %, 13 %-20 %, 14 %-20 %, 15 %-20 %, 16 %-20 %, 17 %-20 %, 18 %-20 %, 19 %-20 %, 1 %-19 %, 2 %-19 %, 3 %-19 %, 4 %-19 %, 5 %-19 %, 6 %-19 %, 7 %-19 %, 8 %-19 %, 9 %-19 %, 10 %-19 %, 11 %-19 %, 12 %-19 %, 13 %-19 %, 14 %-19 %, 15 %-19 %, 16 %-19 %, 17 %-19 %, 18 %-19 %, 1 %-18 %, 2 %-18 %, 3 %-18 %, 4 %-18 %, 5 %-18 %, 6 %-18 %, 7 %-18 %, 8 %-18 %, 9 %-18 %, 10 %-18 %, 11 %-18 %, 12 %-18 %, 13 %-18 %, 14 %-18 %, 15 %-18 %, 16 %-18 %, 17 %-18 %, 1 %-17 %, 2 %-17 %, 3 %-17 %, 4 %-17 %, 5 %-17 %, 6 %-17 %, 7 %-17 %, 8 %-17 %, 9 %-17 %, 10 %-17 %, 11 %-17 %, 12 %-17 %, 13 %-17 %, 14 %-17 %, 15 %-17 %, 16 %-17 %, 1 %-16 %, 2 %-16 %, 3 %-16 %, 4 %-16 %, 5 %-16 %, 6 %-16 %, 7 %-16 %, 8 %-16 %, 9 %-16 %, 10 %-16 %, 11 %-16 %, 12 %-16 %, 13 %-16 %, 14 %-16 %, 15 %-16 %, 1 %-15 %, 2 %-15 %, 3 %-15 %, 4 %-15 %, 5 %-15 %, 6 %-15 %, 7 %-15 %, 8 %-15 %, 9 %-15 %, 10 %-15 %, 11 %-15 %, 12 %-15 %, 13 %-15 %, 14 %-15 %, etc.) de los nucleótidos de la región bicatenaria del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

En realizaciones adicionales, p. ej., cuando una o ambas cadenas del ARNip se modifican selectivamente en los nucleótidos de uridina y/o guanosina, el ARNip modificado resultante puede comprender menos de aproximadamente el 30 % de nucleótidos modificados (p. ej., menos de aproximadamente el 30 %, 29 %, 28 %, 27 %, 26 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de nucleótidos modificados) o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 30 % de nucleótidos modificados (p. ej., de aproximadamente el 1 %-30 %, 2 %-30 %, 3 %-30 %, 4 %-30 %, 5 %-30 %, 6 %-30 %, 7 %-30 %, 8 %-30 %, 9 %-30 %, 10 %-30 %, 11 %-30 %, 12 %-30 %, 13 %-30 %, 14 %-30 %, 15 %-30 %, 16 %-30 %, 17 %-30 %, 18 %-30 %, 19 %-30 %, 20 %-30 %, 21 %-30 %, 22 %-30 %, 23 %-30 %, 24 %-30 %, 25 %-30 %, 26 %-30 %, 27 %-30 %, 28 %-30 % o 29 %-30 % de nucleótidos modificados).

Selección de secuencias de ARNip

Las secuencias de ARNip adecuadas pueden identificarse utilizando cualquier medio conocido en la técnica. Normalmente, los métodos descritos en Elbashir *et al.*, *Nature*, 411:494-498 (2001) y Elbashir *et al.*, *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001) se combinan con las reglas de diseño racional establecidas en Reynolds *et al.*, *Nature Biotech.*, 22(3):326-330 (2004).

Generalmente, la secuencia de nucleótidos 3' del codón de inicio AUG de una transcripción del gen diana de interés se explora en busca de secuencias dinucleotídicas (p. ej., AA, ND, CC, GG o UU, en donde N=C, G o U) (véase, p. ej., Elbashir *et al.*, *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001)). Los nucleótidos inmediatamente 3' a las secuencias de dinucleótidos se identifican como posibles secuencias de ARNip (es decir, una secuencia diana o una secuencia de cadena de sentido). Normalmente, los 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 o más nucleótidos inmediatamente 3' a las secuencias dinucleotídicas se identifican como posibles secuencias de ARNip. En algunas realizaciones, la secuencia de dinucleótidos es una secuencia AA o NA y los 19 nucleótidos inmediatamente 3' al dinucleótido AA o NA se identifican como posibles secuencias de ARNip. las secuencias de ARNip suelen estar espaciadas en diferentes posiciones a lo largo de la longitud del gen diana. Para aumentar aún más la eficacia silenciadora de las secuencias de ARNip, las posibles secuencias de ARNip pueden analizarse para identificar los sitios que no contienen regiones de homología con otras secuencias codificantes, p. ej., en la célula u organismo diana. Por ejemplo, una secuencia adecuada de ARNip de aproximadamente 21 pares de bases normalmente no tendrá más de 16-17 pares de bases

contiguas de homología con secuencias codificantes en la célula u organismo diana. Si las secuencias de ARNip se van a expresar a partir de un promotor de ARN Pol III, se seleccionan las secuencias de ARNip que carecen de más de 4 A o T contiguos.

- 5 Una vez identificada una posible secuencia de ARNip, se puede diseñar una secuencia complementaria (es decir, una secuencia de cadena antisentido). Una posible secuencia de ARNip también puede analizarse utilizando una variedad de criterios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para aumentar su eficacia silenciadora, las secuencias de ARNip pueden analizarse mediante un algoritmo de diseño racional para identificar las secuencias que tienen una o más de las siguientes características: (1) contenido de G/C de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 60 % de G/C; (2) al menos 3 A/U en las posiciones 15-19 de la cadena sentido; (3) sin repeticiones internas; (4) una A en la posición 19 de la cadena de sentido; (S) una A en la posición 3 de la cadena de sentido; (6) un U en la posición 10 de la cadena de sentido; (7) sin G/C en la posición 19 de la cadena de sentido; y (8) ausencia de G en la posición 13 de la cadena sentido. Las herramientas de diseño de ARNip que incorporan algoritmos que asignan valores adecuados de cada una de estas características y son útiles para la selección de ARNip pueden encontrarse en, p. ej., <http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>. Un experto en la materia apreciará que las secuencias con uno o más de las características anteriores pueden seleccionarse para su posterior análisis y prueba como secuencias potenciales de ARNip.

- 20 De manera adicional, las posibles secuencias de ARNip que presenten uno o más de los siguientes criterios a menudo pueden ser eliminadas como ARNip: (1) secuencias que comprenden un tramo de 4 o más de la misma base en una fila; (2) secuencias que comprenden homopolímeros de G (es decir, para reducir los posibles efectos inespecíficos debidos a las características estructurales de estos polímeros; (3) secuencias que comprenden motivos de triple base (p. ej., GGG, CCC, AAA o TTT); (4) secuencias que comprenden tramos de 7 o más G/C en una fila; y (5) secuencias que comprenden repeticiones directas de 4 o más bases dentro de las candidatas que dan lugar a estructuras de pliegue interno. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que las secuencias con uno o más de las características anteriores pueden seleccionarse de todos modos para análisis y pruebas adicionales como secuencias potenciales de ARNip.

- 30 En algunas realizaciones, las posibles secuencias de ARNip pueden analizarse más a fondo basándose en la asimetría del dúplex de ARNip como se describe en, p. ej., Khvorova *et al.*, *Cell*, 115:209-216 (2003); y Schwarz *et al.*, *Cell*, 115:199-208 (2003). En otras realizaciones, las posibles secuencias de ARNip pueden analizarse más a fondo basándose en la estructura secundaria en el sitio diana, como se describe en, p. ej., Luo *et al.*, *Biophys. Res. Commun.*, 318:303-310 (2004). Por ejemplo, la estructura secundaria en el sitio diana puede modelarse utilizando el algoritmo Mfold (disponible en <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) para seleccionar secuencias de ARNip que favorezcan la accesibilidad en el sitio diana donde esté presente menos estructura secundaria en forma de emparejamiento de bases y bucles de tallo.

- Una vez identificada una posible secuencia de ARNip, la secuencia puede analizarse para detectar la presencia de cualquier propiedad inmunoestimulante, p. ej., utilizando un ensayo de citocinas *in vitro* o un modelo animal *in vivo*. Los motivos en la cadena sentido y/o antisentido de la secuencia de ARNip, tales como motivos ricos en GU (p. ej., 5'-GU-3', 5'-UGU-3', 5'-GUGU-3', 5'-UGUGU-3', etc.) también puede proporcionar una indicación de si la secuencia puede ser inmunoestimulante. Una vez que se descubre que una molécula de ARNip es inmunoestimulante, puede modificarse a continuación para disminuir sus propiedades inmunoestimulantes como se describe en el presente documento. Como ejemplo no limitativo, una secuencia de ARNip puede ponerse en contacto con una célula respondedora de mamífero en condiciones tales que la célula produzca una respuesta inmunitaria detectable para determinar si el ARNip es un ARNip inmunoestimulante o no inmunoestimulante. La célula de mamífero respondedora puede ser de un mamífero sin exposición previa (es decir, un mamífero que no ha estado previamente en contacto con el producto génico de la secuencia de ARNip). La célula respondedora de mamífero puede ser, p. ej., una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un macrófago y similares. La respuesta inmunitaria detectable puede comprender la producción de una citocina o un factor de crecimiento tal como, p. ej., TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12 o una combinación de los mismos. Una molécula de ARNip identificada como inmunoestimulante puede modificarse a continuación para disminuir sus propiedades inmunoestimulantes sustituyendo al menos uno de los nucleótidos de la cadena sentido y/o antisentido por nucleótidos modificados. Por ejemplo, menos de aproximadamente el 30 % (es decir, menos de aproximadamente el 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %) de los nucleótidos en la región bicatenaria del dúplex de ARNip pueden sustituirse por nucleótidos modificados tales como nucleótidos 2'OMe. A continuación, el ARNip modificado puede ponerse en contacto con una célula de mamífero respondedora, como se ha descrito anteriormente, para confirmar que sus propiedades inmunoestimulantes se han reducido o anulado.

- 60 Los ensayos *in vitro* adecuados para detectar una respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitación, la técnica de inmunoensayo en sándwich con doble anticuerpo monoclonal de David *et al.* (patente de EE. UU. n.º 4.376.110); ensayos de tipo sándwich de anticuerpos monoclonales-policonales (Wide *et al.*, en Kirkham y Hunter, eds., *Radioimmunoassay Methods*, E. y S. Livingstone, Edimburgo (1970)); el método "de transferencia Western" de Gordon *et al.* (patente de EE. UU. n.º 4.452.901); inmunoprecipitación del ligando marcado (Brown *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:4980-4983 (1980)); ensayos de inmuoadsorción enzimática (ELISA), como se describe, por ejemplo, por Raines *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257:5154-5160 (1982); técnicas inmunocitoquímicas, incluido el uso de fluorocromos (Brooks *et*

al., Clin.). Exp. Immunol., 39:477 (1980)); y neutralización de la actividad (Bowen-Pope *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 81:2396-2400 (1984)). Además de los inmunoensayos descritos anteriormente, existen otros inmunoensayos, incluidos los descritos en las patentes de EE. UU. n.º 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Un ejemplo no limitativo de un modelo *in vivo* para detectar una respuesta inmunitaria incluye un ensayo *in vivo* de inducción de citocinas en ratón como se describe en, p. ej., Judge *et al.*, *Mol. Ther.*, 13:494-505 (2006). En determinadas realizaciones, el ensayo que puede realizarse de la siguiente manera: (1) se puede administrar ARNip mediante inyección intravenosa estándar en la vena lateral de la cola; (2) se puede recoger sangre mediante punción cardíaca aproximadamente 6 horas después de la administración y procesarse como plasma para el análisis de citocinas; y (3) las citocinas pueden cuantificarse utilizando kits ELISA de tipo sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante (es decir, IFN- α de ratón y ser humano (PBL Biomedical; Piscataway, N.J.); IL-6 y TNF- α de ser humano (eBioscience; San Diego, Calif.); y IL-6, TNF- α e IFN- γ de ratón (BD Biosciences; San Diego, Calif.)).

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a citocinas y factores de crecimiento están disponibles en el mercado en múltiples fuentes y pueden generarse utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495-497 (1975), y Harlow y Lane, *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publication, Nueva York (1999)). La generación de anticuerpos monoclonales se ha descrito anteriormente y puede llevarse a cabo por cualquiera de los medios conocidos en la técnica (Buhring *et al.*, en *Hybridoma*, Vol. 10, n.º 1, pág. 77-78 (1991)). En algunos métodos, el anticuerpo monoclonal se marca (p. ej., con cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos o químicos) para facilitar la detección.

Generación de moléculas de ARNip

El ARNip puede proporcionarse de varias formas, incluidas, p. ej., como uno o más dúplex aislados de ARN pequeño de interferencia (ARNip), como ARN bicatenario (ARNbc) más largo, o como ARNip o ARNbc transcrito a partir de un casete transcripcional en un plásmido de ADN. Las secuencias de ARNip pueden tener protuberancias (p. ej., protuberancias 3' o 5' como se describe en Elbashir *et al.*, *Genes Dev.*, 15:188 (2001) o Nykanen *et al.*, *Cell*, 107:309 (2001), o puede carecer de protuberancias (es decir, tener extremos romos).

Se puede utilizar una población de ARN para proporcionar ARN precursores largos, o se pueden usar ARN precursores largos que tengan una identidad sustancial o completa con una secuencia diana seleccionada para fabricar el ARNip. Los ARN pueden aislarse de células o tejidos, sintetizarse y/o clonarse según métodos bien conocidos por los expertos en la materia. El ARN puede ser una población mixta (obtenida a partir de células o tejidos, transcrita a partir de ADNc, restada, seleccionada, etc.) o puede representar una única secuencia diana. El ARN puede ser natural (p. ej., aislado de muestras de tejidos o células), sintetizado *in vitro* (p. ej., utilizando polimerasa T7 o SP6 y productos de PCR o un ADNc clonado), o sintetizado químicamente.

Para formar un ARNbc largo, para los ARN sintéticos, el complemento también se transcribe *in vitro* y se hibrida para formar un ARNbc. Si se usa una población de ARN natural, también se proporcionan los complementos de ARN (p. ej., para formar ARNbc para su digestión por *E. coli* ribonucleasa III o Dicer), p. ej., transcribiendo los ADNc correspondientes a la población de ARN, o utilizando ARN polimerasas. A continuación, los ARN precursores se hibridan para formar ARN bicatenario para su digestión. Los ARNbc pueden administrarse directamente a un sujeto o pueden digerirse *in vitro* antes de su administración.

Los métodos para aislar el ARN, sintetizar ARN, hibridar ácidos nucleicos, crear y cribar bibliotecas de ADNc y realizar la PCR son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Gubler y Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook *et al.*, citado anteriormente; Ausubel *et al.*, citado anteriormente), al igual que los métodos de PCR (véase, las patentes de EE. UU. n.º 4.683.195 y 4.683.202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.*, eds, 1990)). Las bibliotecas de expresiones también son bien conocidas por los expertos en la materia. Otros textos básicos que divulgan los métodos generales de uso de esta invención son los de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2.ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., 1994).

Preferentemente, los ARNip se sintetizan químicamente. Los oligonucleótidos que comprenden las moléculas de ARNip de la invención pueden sintetizarse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tal como los descritos en Usman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); y Wincott *et al.*, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). La síntesis de oligonucleótidos hace uso de grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditos en el extremo 3'. Como ejemplo no limitativo, las síntesis a pequeña escala pueden realizarse en un sintetizador Applied Biosystems utilizando un protocolo a escala de 0,2 μ mol. Como alternativa, a escala de 0,2 μ mol pueden realizarse en un sintetizador de placas de 96 pocillos de Protogene (Palo Alto, California). Sin embargo, una escala de síntesis mayor o menor también está dentro del ámbito de esta invención. Los reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, métodos de desprotección del ARN y métodos de purificación del ARN son conocidos por los expertos en la materia.

Las moléculas de ARNip también pueden sintetizarse mediante una técnica de síntesis en tándem, en donde ambas cadenas se sintetizan como un único fragmento o cadena continua de oligonucleótidos separada por un conector escindible que posteriormente se escinde para proporcionar fragmentos o cadenas separadas que se hibridan para formar el dúplex de ARNip. El conector puede ser un conector polinucleotídico o un conector no nucleotídico. La síntesis en tándem de ARNip puede adaptarse fácilmente tanto a plataformas de síntesis multipocillo/multiplaca como a plataformas de síntesis a gran escala que empleen reactores discontinuos, columnas de síntesis y similares. Como alternativa, las moléculas de ARNip pueden ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos distintos, en donde un oligonucleótido comprende la cadena sentido y el otro comprende la cadena antisentido del ARNip. Por ejemplo, cada cadena puede sintetizarse por separado y unirse mediante hibridación o ligadura tras la síntesis y/o desprotección. En otros ejemplos determinados, las moléculas de ARNip pueden sintetizarse como un único fragmento continuo de oligonucleótido, donde las regiones autocomplementarias sentido y antisentido se hibridan para formar un dúplex de ARNip que tiene una estructura secundaria en horquilla.

15 Modificación de las secuencias de ARNip

En determinados aspectos, las moléculas de ARNip comprenden un dúplex que tiene dos cadenas y al menos un nucleótido modificado en la región bicatenaria, en donde cada cadena tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos. Ventajosamente, el ARNip modificado es menos inmunoestimulante que una secuencia correspondiente de ARNip sin modificar, pero conserva la capacidad de silenciar la expresión de una secuencia diana. En realizaciones preferidas, el grado de modificaciones químicas introducidas en la molécula de ARNip logra un equilibrio entre la reducción o anulación de las propiedades inmunoestimulantes del ARNip y la retención de la actividad de ARNi. Como ejemplo no limitativo, una molécula de ARNip dirigida a un gen de interés puede modificarse mínimamente (es decir, modificarse menos de aproximadamente el 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %) en nucleótidos selectivos de uridina y/o guanosina dentro del dúplex de ARNip para eliminar la respuesta inmunitaria generada por el ARNip, conservando al mismo tiempo su capacidad de silenciar la expresión del gen diana.

Entre los ejemplos de nucleótidos modificados adecuados para usar en la invención se incluyen, pero sin limitación, ribonucleótidos que tiene un 2'-O-metilo (2'OMe), 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F), 2'-desoxi, 5-C-metilo, 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), 4'-tio, 2'-amino o 2'-C-alilo. Los nucleótidos modificados que tienen una conformación Northern tal como las descritas en, p. ej., Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag Ed. (1984), son también adecuados para usar en moléculas de ARNip. Dichos nucleótidos modificados incluyen, sin limitación, nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) (p. ej., 2'-O, nucleótidos 4'-C-metileno-(D-ribofuranosilo)), nucleótidos 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), nucleótidos 2'-metil-tio-etilo, nucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F), nucleótidos 2'-desoxi-2'-cloro (2'C1) y nucleótidos 2'-azido. En determinados casos, las moléculas de ARNip descritas en el presente documento incluyen uno o más nucleótidos G-clamp. Un nucleótido G-clamp se refiere a un análogo modificado de la citosina en donde las modificaciones confieren la capacidad de formar enlaces de hidrógeno tanto en la cara Watson-Crick como en la cara Hoogsteen de un nucleótido de guanina complementario dentro de un dúplex (véase, p. ej., Lin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 120:8531-8532 (1998)). Además, nucleótidos que tiene una base nucleotídica análoga tal como, por ejemplo, C-fenilo, C-naftilo, otros derivados aromáticos, inosina, carboxamidas azólicas y derivados nitroazólicas tales como el 3-nitropirrol, 4-nitroindol, 5-nitroindol y 6-nitroindol (véase, p. ej., Loakes, *Nucl. Acids Res.*, 29:2437-2447 (2001)) pueden incorporarse a moléculas de ARNip.

En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNip pueden comprender además uno o más modificadores químicos, tales como elementos terminales de caperuza, modificaciones de cadena principal de fosfato y similares. Entre los ejemplos de restos terminales de caperuza se incluyen, sin limitación, residuos desoxi abásicos invertidos, modificaciones de glicerilo, nucleótidos de 4',5'-metileno, nucleótidos 1-(β -D-eritrofuranosilo), nucleótidos 4'-tio, nucleótidos carbocíclicos, nucleótidos 1,5-anhidrohexitol, L-nucleótidos, α -nucleótidos, nucleótidos de base modificada, nucleótidos treo-pentofuranosilo, nucleótidos acíclicos 3',4'-sec, nucleótidos acíclicos 3,4-dihidroxibutilo, nucleótidos acíclicos 3,5-dihidroxipentilo, fracciones de nucleótidos 3'-3'-invertidos, fracciones abásicas 3'-3'-invertidas, fracciones de nucleótidos 3'-2'-invertidos, fracciones abásicas 3'-2'-invertidas, fracciones de nucleótidos 5'-5'-invertidos, fracciones abásicas 5'-5'-invertidas, fracciones abásicas desoxi 3'-5'-invertidas, fosfato de 5'-aminoalquilo, fosfato de 1,3-diamino-2-propilo, fosfato de 3-aminopropilo, fosfato de 6-aminohexilo, fosfato de 1,2-aminododecilo, fosfato de hidroxipropilo, fosfato de 1,4-butanodiol, 3'-fosforamidoato, 5'-fosforamidoato, hexilfosfato, fosfato de aminohexilo, 3'-fosfato, 5'-amino, 3'-fosforotioato, 5'-fosforotioato, fosforoditioato y metilfosfonato de puente o no puente o 5'-mercapto (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.998.203; Beaucage *et al.*, *Tetrahedron* 49:1925 (1993)). Entre los ejemplos no limitativos de modificaciones de la cadena principal del fosfato (es decir, que dan lugar a enlaces internucleotídicos modificados) se incluye sustituciones de fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato, carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal y alquilsililo (véase, p. ej., Hunziker *et al.*, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, en *Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417 (1995); Mesmaeker *et al.*, *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, in *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39 (1994)). Dichas modificaciones químicas pueden producirse en el extremo 5' y/o 3' de la cadena sentido, cadena antisentido o ambas cadenas de ARNip.

En algunas realizaciones, la cadena sentido y/o antisentido de la molécula de ARNip puede comprender además una

protuberancia 3'-terminal que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 (p. ej., 1, 2, 3 o 4) 2'-desoxiribonucleótidos y/o cualquier combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Se describen adicionalmente ejemplos de nucleótidos modificados y tipos de modificaciones químicas que pueden introducirse en las moléculas de ARNip, p. ej., en la patente de EE. UU. n.º GB 2.397.818 B y en las patentes de EE. UU. con n.º de publicación 20040192626, 20050282188 y 20070135372.

Las moléculas de ARNip descritas en el presente documento pueden comprender opcionalmente uno o más no nucleótidos en una o ambas cadenas del ARNip. Como se usa en el presente documento, la expresión "no nucleótido" se refiere a cualquiera de los grupos o compuestos que pueden incorporarse a una cadena de ácido nucleico en el lugar de uno o más nucleótidos, incluyendo sustituciones de azúcar y/o fosfato, y permite que las bases restantes presenten su actividad. El grupo o compuesto es abásico en el sentido de que no contiene una base nucleotídica comúnmente reconocida tal como la adenosina, guanina, citosina, uracilo o timina y, por lo tanto, carece de una base en la posición 1'.

En otras realizaciones, la modificación química del ARNip comprende la unión de un conjugado a la molécula de ARNip. El conjugado puede fijarse en el extremo 5' y/o 3' de la cadena sentido y/o antisentido del ARNip mediante una unión covalente tal como, p. ej., un conector biodegradable. El conjugado también puede unirse al ARNip, p. ej., mediante un grupo carbamato u otro grupo de enlace (véase, p. ej., patentes de EE. UU. n.º 20050074771, 20050043219 y 20050158727). En determinados casos, el conjugado es una molécula que facilita la administración del ARNip a una célula. Entre los ejemplos de moléculas conjugadas adecuadas para unirse al ARNip se incluyen, sin limitación, esteroides tales como colesterol, glicoles tales como polietilenglicol (PEG), albúmina sérica humana (HSA), ácidos grasos, carotenoides, terpenos, ácidos biliares, folatos (p. ej., ácido fólico, análogos del folato y derivados de los mismos), azúcares (p. ej., galactosa, galactosamina, N-acetil-galactosamina, glucosa, manosa, fructosa, fucosa, etc.), fosfolípidos, péptidos, ligandos para receptores celulares capaces de mediar la captación celular y combinaciones de los mismos (véase, p. ej., patentes de EE. UU. n.º 20030130186, 20040110296 y 20040249178; la patente de EE. UU. n.º 6.753.423). Otros ejemplos incluyen moléculas conjugadas con fracción lipófila, vitamina, polímero, péptido, proteína, ácido nucleico, molécula pequeña, oligosacárido, grupo de hidratos de carbono, intercalador, aglutinante de surco menor, agente de escisión y agente reticulante descritas en la publicación de patente estadounidense n.º 20050119470 y 20050107325. Otros ejemplos incluyen moléculas conjugadas de 2'-O-alkuilamina, 2'-β-alcóxilalkuilamina, poliamina, pirimidina modificada catiónica C5, péptido catiónico, grupo guanidinio, grupo amidinio, aminoácidos catiónicos descritas en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20050153337. Otros ejemplos incluyen moléculas conjugadas de grupo hidrófobo, compuesto activo de membrana, compuesto penetrante celular, señal de direccionamiento celular, modificador de la interacción y estabilizador estérico descritas en la publicación de patente de EE. UU. n.º 20040167090. Otros ejemplos incluyen las moléculas conjugadas descritas en la patente de EE. UU. n.º de publicación 20050239739. Se puede evaluar el tipo de conjugado utilizado y el grado de conjugación con la molécula de ARNip para perfeccionar los perfiles farmacocinéticos, la biodisponibilidad y/o la estabilidad del ARNip conservando la actividad de ARNi. Como tal, un experto en la técnica puede cribar moléculas de ARNip con varios conjugados unidos a ellas para identificar las que tienen propiedades mejoradas y actividad de ARNi completa utilizando cualquiera de una variedad de modelos bien conocidos de cultivo celular *in vitro* o de animales *in vivo*.

Genes diana

En determinadas realizaciones, el componente de ácido nucleico (p. ej., ARNip) de las partículas lipídicas con ácido nucleico descritas en el presente documento puede utilizarse para reducir o silenciar la traducción (es decir, la expresión) de un gen de interés. Los genes de interés incluyen, pero sin limitación, genes asociados a la infección y la supervivencia de virus, genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos (p. ej., enfermedades y trastornos hepáticos), genes asociados a la tumorigénesis y la transformación celular (p. ej., cáncer), genes angiogénicos, genes inmunomoduladores tales como los asociados a respuestas inflamatorias y autoinmunitarias, genes receptores de ligandos y genes asociados a trastornos neurodegenerativos. En determinadas realizaciones, el gen de interés se expresa en los hepatocitos.

Los genes asociados a la infección y la supervivencia de virus incluyen los expresados por un virus para unirse, entrar y replicarse en una célula. Son de particular interés las secuencias víricas asociadas a enfermedades víricas crónicas. Las secuencias víricas de particular interés incluyen secuencias de Filovirus tales como el virus Ébola y el virus Marburg (véase, p. ej., Geisbert *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 193:1650-1657 (2006)); Arenavirus tales como el virus de Lassa, Junin virus, virus de Machupo, Guanarito virus y Sabia virus (Buchmeier *et al.*, *Arenaviridae: the viruses and their replication*, En: *FIELDS VIROLOGY*, Knipe *et al.* (eds.), 4.^a ed., Lippincott-Raven, Filadelfia, (2001)); virus de la gripe tales como los virus de la gripe A, B y C, (véase, p. ej., Steinhauer *et al.*, *Annu Rev Genet.*, 36:305-332 (2002); y Neumann *et al.*, *J Gen Virol.*, 83:2635-2662 (2002)); Virus de la hepatitis (véase, p. ej., Hamasaki *et al.*, *FEBS Lett.*, 543:51 (2003); Yokota *et al.*, *EMBO Rep.*, 4:602 (2003); Schlomai *et al.*, *Hepatology*, 37:764 (2003); Wilson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 100:2783 (2003); Kapadia *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 100:2014 (2003); y *FIELDS VIROLOGY*, Knipe *et al.* (eds.), 4.^a ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (2001)); Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Banerjee *et al.*, *Mol. Ther.*, 8:62 (2003); Song *et al.*, *J. Virol.*, 77:7174 (2003); Stephenson, *JAMA*, 289:1494 (2003); Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 100:183 (2003)); virus del Herpes (Jia *et al.*, *J. Virol.*, 77:3301 (2003)); y virus del papiloma humano (HPV) (Hall *et al.*, *J. Virol.*, 77:6066 (2003); Jiang *et al.*, *Oncogene*, 21:6041 (2002)).

Algunos ejemplos de secuencias de ácido nucleico de Filovirus que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (p. ej., VP30, VP35, nucleoproteína (NP), proteína polimerasa (L-pol)) y proteínas asociadas a membranas (p. ej., VP40, glucoproteína (GP), VP24). Las secuencias completas del genoma del virus del Ébola figuran en, p. ej., el n.º de registro de Genbank NC-002549; AY769362; NC-006432; NC-004161; AY729654; AY354458; AY142960; AB050936; AF522874; AF499101; AF272001; y AF086833. Las secuencias VP24 del virus del Ébola se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank U77385 y AY058897. Las secuencias L-pol del virus del Ébola se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank X67110. Las secuencias VP40 del virus del Ébola se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank AY058896. Las secuencias NP del virus del Ébola se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank AY058895. Las secuencias GP del virus del Ébola se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank AY058898; Sánchez *et al.*, Virus Res., 29:215-240 (1993); Will *et al.*, J. Virol., 67:1203-1210 (1993); Volchkov *et al.*, FEBS Lett., 305:181 -184 (1992); y patente estadounidense n.º 6.713.069. Se exponen secuencias adicionales del virus del Ébola en, p. ej., el n.º de registro de GenBank L11365 y X61274. Las secuencias completas del genoma del virus de Marburgo se exponen en, p. ej., el n.º de registro de Genbank NC_001608; AY430365; AY430366; y AY358025. Las secuencias GP del virus de Marburgo se exponen en, p. ej., el n.º de registro de Genbank AF005734; AF005733; y AF005732. Las secuencias VP35 del virus de Marburgo se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank AF005731 y AF005730. Se exponen secuencias adicionales del virus de Marburgo en, p. ej., el n.º de registro de Genbank X64406; Z29337; AF005735; y Z12132. Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas a secuencias de ácido nucleico del virus del Ébola y del virus de Marburgo se incluyen las descritas en la patente de EE. UU. con n.º de publicación 20070135370.

Algunos ejemplos de secuencias de ácido nucleico del virus de la gripe que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican la nucleoproteína (NP), proteínas de la matriz (M1 y M2), proteínas no estructurales (NS1 y NS2), ARN polimerasa (PA, PB1, PB2), neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA). Las secuencias NP de la gripe A se exponen en, p. ej., el n.º de registro de Genbank NC-004522; AY818138; AB166863; AB188817; AB189046; AB189054; AB189062; AY646169; AY646177; AY651486; AY651493; AY651494; AY651495; AY651496; AY651497; AY651498; AY651499; AY651500; AY651501; AY651502; AY651503; AY651504; AY651505; AY651506; AY651507; AY651509; AY651528; AY770996; AY790308; AY818138; y AY818140. Las secuencias APA de la gripe se exponen en, p. ej., el n.º de registro de Genbank AY818132; AY790280; AY646171; AY818132; AY818133; AY646179; AY818134; AY551934; AY651613; AY651610; AY651620; AY651617; AY651600; AY651611; AY651606; AY651618; AY651608; AY651607; AY651605; AY651609; AY651615; AY651616; AY651640; AY651614; AY651612; AY651621; AY651619; AY770995; y AY724786. Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas a secuencias de ácido nucleico del virus de la gripe se incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º de publicación 20070218122.

Algunos ejemplos de secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácidos nucleicos que intervienen en la transcripción y la traducción (p. ej., En1, En2, X, P) y secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (es decir, proteínas del núcleo, incluidas las proteínas C y relacionadas con C, proteínas de la cápside y la envoltura, incluidas proteínas S, M y/o L, o fragmentos de las mismas) (véase, p. ej., FIELDS VIROLOGY, supra). Algunos ejemplos de secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC) que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, la región no traducida 5' (UTR 5'), la región no traducida 3' (UTR 3'), la región del codón de iniciación de la traducción de la poliproteína, la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*) y/o secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína del núcleo, la proteína E1, la proteína E2, la proteína p7, la proteína NS2, la proteasa/helicasa NS3, la proteína NS4A, la proteína NS4B, la proteína NS5 A y/o la ARN polimerasa NS5B dependiente de RNN. Las secuencias del genoma del VHC se exponen en, p. ej., NC-004102 (genotipo 1a del VHC), AJ238799 (genotipo 1b del virus VHC), NC-009823 (genotipo 2 del VHC), NC-009824 (genotipo 3 del VHC), NC-009825 (genotipo 4 del VHC), NC_009826 (genotipo 5 del VHC) y NC_009827 (genotipo 6 del VHC). Las secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis A se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank NC_001489; Las secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis B se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank NC_003977; La secuencia del ácido nucleico del virus de la hepatitis D se expone en, p. ej., el n.º de registro de GenBank NC_001653; Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis E se exponen en, p. ej., el n.º de registro de GenBank NC_001434; y las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis G, p. ej., el n.º de registro de GenBank NC_001710. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con la infección vírica y la supervivencia puede usarse convenientemente junto con la administración de agentes convencionales utilizados para tratar la afección viral. Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas a secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis se incluyen las descritas en las patentes de EE. UU. n.º 20060281175, 20050058982 y 20070149470; la patente de EE. UU. n.º 7.348.314; y la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/162.127, presentada el 20 de marzo de 2009.

Los genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos (p. ej., trastornos en los que el hígado es la diana y enfermedades y trastornos hepáticos) incluyen, por ejemplo, genes expresados en la dislipidemia (p. ej., receptores X hepáticos como LXR α y LXR β (n.º de registro de Genbank NM_007121), receptores X famesoides (FXR) (n.º de registro de Genbank NM_005123), proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), sitio-1 proteasa (SIP), 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG coenzima A reductasa), apolipoproteína B (ApoB) (n.º de registro de Genbank NM_000384), apolipoproteína CIII (ApoC3) (n.º de registro de Genbank NM_000040 y NG_008949 REGION: 5001.8164), y la apolipoproteína E (ApoE) (n.º de registro de Genbank NM_000041 y NG_007084 REGION: 5001.8612); y diabetes (es decir, glucosa 6-fosfatasa) (véase, p. ej., Forman *et al.*, Cell, 81:687

(1995); Seol *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 9:72 (1995); Zavacki *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 94:7909 (1997); Sakai *et al.*, *Cell*, 85:1037-1046 (1996); Duncan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:12778-12785 (1997); Willy *et al.*, *Genes Dev.*, 9:1033-1045 (1995); Lehmann *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:3137-3140 (1997); Janowski *et al.*, *Nature*, 383:728-731 (1996); y Peet *et al.*, *Cell*, 93:693-704 (1998)). Un experto en la materia apreciará que los genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos (p. ej., enfermedades y trastornos en los que el hígado es una diana, y enfermedades y trastornos hepáticos) incluyen genes que se expresan en el propio hígado, así como genes expresados en otros órganos y tejidos. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos puede usarse convenientemente junto con la administración de agentes convencionales utilizados para tratar la enfermedad o el trastorno. Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas al gen ApoB se incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º de publicación 20060134189. Algunos ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas al gen ApoC3 incluyen las descritas en la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/147.235, presentada del 26 de enero de 2009.

Algunos ejemplos de secuencias génicas asociadas con la tumorigénesis y la transformación celular (p. ej., cáncer u otras neoplasias) incluyen quinasas mitóticas tales como Eg5 (KSP, KIF11; n.º de registro de Genbank NM_004523); serina/treonina cinasas tales como la cinasa 1 de tipo polo (PLK-1) (n.º de registro de Genbank NM_005030; Barr *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5:429-440 (2004)); tirosina cinasas tales como WEE1 (n.º de registro de Genbank NM_003390 y NM_001143976); inhibidores de la apoptosis tales como XIAP (n.º de registro de Genbank NM_001167); subunidades del señalosoma COP9 tales como CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 (JAB1; n.º de registro de Genbank NM_006837); CSN6, CSN7A, CSN7B y CSN8; ubiquitina ligasas tales como COP1 (RFWD2; n.º de registro de Genbank NM_022457 y NM_001001740); e histona desacetilasas tales como HDAC1, HDAC2 (n.º de registro de Genbank NM_001527), HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, etc. Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas a los genes Eg5 y XIAP, se incluyen las descritas en la solicitud de patente de EE. UU. n.º ser. 11/807.872, presentada el 29 de mayo de 2007. Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas al gen PLK-1, se incluyen las descritas en las patentes de EE. UU. n.º de publicación 20050107316 y 20070265438; y la solicitud de patente de EE. UU. con n.º de serie 12/343.342, presentada el 23 de diciembre de 2008. Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas al gen CSN5, se incluyen las descritas en la solicitud provisional de EE. UU. 61/045.251, presentada el 15 de abril de 2008.

Entre los ejemplos adicionales de secuencias génicas asociadas con la tumorigénesis y la transformación celular, se incluyen secuencias de translocación tales como los genes de fusión MLL, BCR-ABL (Wilda *et al.*, *Oncogene*, 21:5716 (2002); Scherr *et al.*, *Blood*, 101:1566 (2003)), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO y AML1-MTG8 (Heidenreich *et al.*, *Blood*, 101:3157 (2003)); secuencias sobreexpresadas tales como genes de resistencia a múltiples fármacos (Nieth *et al.*, *FEBS Lett.*, 545:144 (2003); Wu *et al.*, *Cancer Res.* 63:1515 (2003)), ciclinas (Li *et al.*, *Cancer Res.*, 63:3593 (2003); Zou *et al.*, *Genes Dev.*, 16:2923 (2002)), betacatenina (Verma *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 9:1291 (2003)), genes de telomerasa (Kosciolek *et al.*, *Mol Cancer Ther.*, 2:209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, receptores del factor de crecimiento (p. ej., EGFR/ErbB1 (n.º de registro de Genbank NM_005228, NM_201282, NM_201283 y NM_201284; véase también, Nagy *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 285:39-49 (2003), ErbB2/HER-2 (n.º de registro de Genbank NM_004448 y NM_001005862), ErbB3 (n.º de registro de Genbank NM_001982 y NM_001005915) y ErbB4 (n.º de registro de Genbank NM_005235 y NM_001042599); y secuencias mutadas tales como RAS (revisado en Tuschl y Borkhardt, *Mol. Interventions*, 2:158 (2002)). Entre los ejemplos no limitativos de moléculas de ARNip dirigidas al gen EGFR, se incluyen las descritas en la solicitud de patente de EE. UU. con n.º de serie 11/807.872, presentada el 29 de mayo de 2007.

El silenciamiento de secuencias que codifican enzimas de reparación del ADN encuentra uso junto con la administración de agentes quimioterapéuticos (Collis *et al.*, *Cancer Res.*, 63:1550 (2003)). Los genes que codifican proteínas asociadas a la migración tumoral también son secuencias diana de interés, por ejemplo, integrinas, selectinas y metaloproteinasas. Los ejemplos anteriores no son excluyentes. Los expertos en la materia entenderán que cualquier secuencia genética completa o parcial que facilite o promueva la tumorigénesis o la transformación celular, crecimiento tumoral o migración tumoral puede incluirse como secuencia de plantilla.

Los genes angiogénicos son capaces de promover la formación de nuevos vasos. Es de particular interés el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Reich *et al.*, *Mol. Vis.*, 9:210 (2003)) o VEGFR. Las secuencias de ARNip dirigidas al VEGFR se exponen en, p. ej., GB 2396864; la publicación de patente de EE. UU. n.º 20040142895; y CA 2456444.

Los genes antiangiogénicos son capaces de inhibir la neovascularización. Estos genes son particularmente útiles para tratar aquellos cánceres en los que la angiogénesis desempeña un papel en el desarrollo patológico de la enfermedad. Algunos ejemplos de genes antiangiogénicos incluyen, pero sin limitación, endostatina (véase, p. ej., patente de EE. UU. n.º 6.174.861), angiostatina (véase, p. ej., patente de EE. UU. n.º 5.639.725) y VEGFR2 (véase, p. ej., Decaussin *et al.*, *J. Pathol.*, 188: 369-377 (1999)).

Los genes inmunomoduladores son genes que modulan una o más respuestas inmunitarias. Algunos ejemplos de genes inmunomoduladores incluyen, sin limitación, citocinas tales como factores de crecimiento (p. ej., TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, etc.), interleucinas (p. ej. IL-2, IL-4, IL-12 (Hill *et al.*, *J. Immunol.*, 171:691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20, etc.), interferones (p. ej., IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.) y TNF. Los genes Fas y de

ligando Fas son también secuencias diana inmunomoduladoras de interés (Song *et al.*, *Nat. Med.*, 9:347 (2003)). Los genes que codifican moléculas de señalización secundarias en células hematopoyéticas y linfoides también están incluidos en la presente invención, por ejemplo, cinasas de la familia Tec, tales como la tirosina cinasa de Bruton (Btk) (Heinonen *et al.*, *FEBS Lett.*, 527:274 (2002)).

Los ligandos de receptores celulares incluyen ligandos capaces de unirse a receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de insulina, receptor de EPO, receptores acoplados a proteína G, receptores con actividad tirosina cinasa, receptores de citocinas, receptores de los factores de crecimiento, etc.), para modular (p. ej., inhibir, activar, etc.) la vía fisiológica en la que interviene el receptor (p. ej., modulación del nivel de glucosa, desarrollo de células sanguíneas, mitogénesis, etc.). Entre los ejemplos de ligandos de receptores celulares, se incluyen, pero sin limitación, citocinas, factores de crecimiento, interleucinas, interferones, eritropoyetina (EPO), insulina, glucagón, ligandos de receptores acoplados a proteína G, etc. Las plantillas que codifican una expansión de repeticiones de trinucleótidos (p. ej., repeticiones CAG) se usan para silenciar secuencias patógenas en trastornos neurodegenerativos causados por la expansión de repeticiones de trinucleótidos, tales como la atrofia muscular espinobulbular y la enfermedad de Huntington (Caplen *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 11:175 (2002)).

Algunos otros genes diana, a los que puede dirigirse un ácido nucleico (p. ej., mediante ARNip) para reducir o silenciar la expresión del gen, incluyen, aunque sin limitación, actina, alfa 2, músculo liso, aorta (ACTA2), alcohol deshidrogenasa 1A (ADH1A), alcohol deshidrogenasa 4 (ADH4), alcohol deshidrogenasa 6 (ADH6), afamin (AFM), angiotensinógeno (AGT), serina-piruvato aminotransferasa (AGXT), alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG), miembro C4 de la familia 1 de la aldocolo reductasa (AKR1C4), albúmina sérica (ALB), precursor de la alfa-1-microglobulina/bikunina (AMBP), proteína 3 relacionada con la angiopoyetina (ANGPTL3), componente P amiloide sérico (APCS), apolipoproteína A-II (APOA2), apolipoproteína B-100 (APOB), apolipoproteína C3 (APOC3), apolipoproteína C-IV (APOC4), apolipoproteína F (APOF), beta-2-glicoproteína 1 (APOH), acuaporina-9 (AQP9), ácido biliar-CoA:aminoácido N-aciltransferasa (BAAT), cadena beta de la proteína de unión a C4b (C4BPB), proteína putativa no caracterizada codificada por LINCO1554 (C5orf27), factor 3 del complemento (C3), factor 5 del complemento (C5), componente del complemento C6 (C6), cadena alfa del componente del complemento C8 (C8A), cadena beta del componente del complemento C8 (C8B), cadena gamma del componente del complemento C8 (C8G), componente del complemento C9 (C9), activador de la transcripción de unión a la calmodulina 1 (CAMTA1), CD38 (CD38), factor B del complemento (CFB), proteína 1 relacionada con el factor H del complemento (CFHR1), proteína 2 relacionada con el factor H del complemento (CFHR2), proteína 3 relacionada con el factor H del complemento (CFHR3), receptor cannabinoide 1 (CNR1), ceruloplasmina (CP), carboxipeptidasa B2 (CPB2), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), quimiocina 2 con motivo C-X-C (CXCL2), citocromo P450 1A2 (CYP1A2), citocromo P450 2A6 (CYP2A6), citocromo P450 2C8 (CYP2C8), citocromo P450 2C9 (CYP2C9), miembro 6 de la subfamilia D de la familia 2 del citocromo P450 (CYP2D6), citocromo P450 2E1 (CYP2E1), omega-hidroxilasa de filloquinona CYP4F2 (CYP4F2), 7-alfa-hidroxicolest-4-en-3-ona 12-alfa-hidroxilasa (CYP8B1), dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), factor de coagulación 12 (F12), factor de coagulación II (trombina) (F2), factor de coagulación IX (F9), cadena alfa del fibrinógeno (FGA), cadena beta del fibrinógeno (FGB), cadena gamma del fibrinógeno (FGG), fibrinógeno de tipo 1 (FGL1), flavina que contiene monooxigenasa 3 (FMO3), flavina que contiene monooxigenasa 5 (FMO5), componente específico de grupo (proteína de unión a vitamina D) (GC), receptor de la hormona del crecimiento (GHR), glicina N-metiltransferasa (GNMT), proteína de unión a hialuronano 2 (HABP2), péptido antimicrobiano hepcidina (HAMP), hidroxiaácido oxidasa (glicolato oxidasa) 1 (HAO1), activador del HGF (HGFAC), proteína relacionada con la haptoglobina; haptoglobina (HPR), hemopexina (HPX), glucoproteína rica en histidina (HRG), hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1 (HSD11B1), hidroxiesteroide (17-beta) deshidrogenasa 13 (HSD17B13), cadena pesada del inhibidor inter-alfa-tripsina H1 (ITI1H1), cadena pesada del inhibidor inter-alfa-tripsina H2 (ITI2H2), cadena pesada del inhibidor inter-alfa-tripsina H3 (ITI3H3), cadena pesada del inhibidor inter-alfa-tripsina H4 (ITI4H4), precalicreína (KLKB1), lactato deshidrogenasa A (LDHA), péptido antimicrobiano expresado en el hígado 2 (LEAP2), quimiocina 2 derivada de células leucocitarias (LECT2), lipoproteína (a) (LPA), lectina serina peptidasa 2 de unión a manano (MASP2), S-adenosilmetionina sintasa isoforma tipo-1 (MAT1A), NADPH oxidasa 4 (NOX4), Poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP1), paraoxonasa 1 (PON1), paraoxonasa 3 (PON3), proteína C dependiente de la vitamina K (PROC), retinol deshidrogenasa 16 (RDH16), amiloide sérico A4, constitutiva (SAA4), serina deshidratasa (SDS), miembro 1 de la familia A de la serpina (SERPINA1), serpina A11 (SERPINA11), calistatina (SERPINA4), globulina fijadora de corticosteroides (SERPINA6), antitrombina-III (SERPINC1), cofactor 2 de la heparina (SERPIND1), miembro 1 de la familia H de la serpina (SERPINH1), miembro 2 de la familia 5 de portadores de solutos (SLC5A2), cotransportador de sodio/ácido biliar (SLC10A1), miembro 5 de la familia 13 e portadores de solutos (SLC13A5), miembro 1 de la familia 22 e portadores de solutos (SLC22A1), miembro 47 de la familia 25 e portadores de solutos (SLC25A47), familia 2 de portadores de soluto, miembro 2 de transportadores facilitados de glucosa (SLC2A2), transportador 4 de aminoácidos neutros acoplado al sodio (SLC38A4), miembro de la familia de transportadores de aniones orgánicos de portadores de solutos 1B1 (SLCO1B1), esfingomielina fosfodiesterasa 1 (SMPD1), sal biliar sulfotransferasa (SULT2A1), tirosina aminotransferasa (TAT), triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO2), familia UDP glucuronosiltransferasa 2, polipéptido B10 (UGT2B10), familia UDP glucuronosiltransferasa 2, polipéptido B15 (UGT2B15), familia UDP glucuronosiltransferasa 2, polipéptido B4 (UGT2B4) y vitronectina (VTN).

Además de su utilidad para silenciar la expresión de cualquiera de los genes descritos anteriormente con fines terapéuticos, ciertos ácidos nucleicos (p. ej., ARNip) descritos en el presente documento también son útiles en aplicaciones de investigación y desarrollo, así como de diagnóstico, profiláctico, pronóstico, clínicas y otras

aplicaciones sanitarias. Como ejemplo no limitativo, ciertos ácidos nucleicos (p. ej., ARNip) pueden usarse en estudios de validación de dianas dirigidos a comprobar si un gen de interés tiene potencial para ser una diana terapéutica. Ciertos ácidos nucleicos (p. ej., ARNip) pueden usarse también en estudios de identificación de dianas destinados a descubrir genes como posibles dianas terapéuticas.

CRISPR

La edición selectiva del genoma ha pasado de ser una tecnología muy poco utilizada a un método utilizado por muchos investigadores biológicos. Esta progresión se ha visto impulsada en gran medida por la aparición de la tecnología de los grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR) (véase, p. ej., Sander *et al.*, *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355, incluida la Información complementaria (2014) y los números de publicación internacionales WO 2016/197132 y WO 2016/197133). Por consiguiente, en el presente documento, se proporcionan mejoras (por ejemplo, nanopartículas lipídicas y formulaciones de las mismas) que pueden utilizarse junto con la tecnología CRISPR para tratar enfermedades, tales como VHB. En cuanto a las dianas para usar CRISPR, el ARN guía (ARNg) utilizado en la tecnología CRISPR puede diseñarse para dirigirse a secuencias específicamente identificadas, p. ej., genes diana, p. ej., del genoma del VHB. En la publicación internacional número WO 2016/197132, se proporcionan ejemplos de tales secuencias diana. Además, la publicación internacional número WO 2013/151665 (p. ej., véase la tabla 6 y el listado de secuencias asociado) describe aproximadamente 35.000 secuencias de ARNm, reivindicadas en el contexto de una construcción de expresión de ARNm. Ciertas realizaciones de la presente invención utilizan la tecnología CRISPR para dirigir la expresión de cualquiera de estas secuencias. Ciertas realizaciones de la presente invención también pueden utilizar la tecnología CRISPR para dirigir la expresión de un gen diana tratado en el presente documento.

ARNia

Como el ARNip, el ARN de interferencia asimétrico (ARNia) puede reclutar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y conducir al silenciamiento eficaz de una variedad de genes en células de mamífero al mediar la escisión específica de la secuencia diana entre los nucleótidos 10 y 11 en relación con el extremo 5' de la cadena antisentido (Sun *et al.*, *Nat. Biotech.*, 26:1379-1382 (2008)). Normalmente, una molécula de ARNai comprende un dúplex de ARN corto que tiene una cadena sentido y una cadena antisentido, en donde el dúplex contiene protuberancias en los extremos 3' y 5' de la cadena antisentido. El ARNia suele ser asimétrico porque la cadena sentido es más corta en ambos extremos que la cadena antisentido complementaria. En algunos aspectos, las moléculas de ARNia pueden diseñarse, sintetizarse e hibridarse en condiciones similares a las utilizadas para las moléculas de ARNip. Como ejemplo no limitativo, las secuencias de ARNia pueden seleccionarse y generarse utilizando los métodos descritos anteriormente para seleccionar secuencias de ARNip.

En otra realización, los dúplex de ARNai de varias longitudes (p. ej., aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 o 14-17 pares de bases, más normalmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o pares de bases) pueden diseñarse con salientes en los extremos 3' y 5' de la cadena antisentido para dirigirse a un ARNm de interés. En determinados casos, la cadena sentido de la molécula de ARNai tiene aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 o 14-17 nucleótidos de longitud, más normalmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud. En otros ejemplos determinados, la cadena antisentido de la molécula de ARNai tiene una longitud de aproximadamente 15-60, 15-50 o 15-40 nucleótidos, más usualmente de aproximadamente 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, y preferentemente de aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, la protuberancia 5' antisentido contiene uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos no diana (p. ej., "AA", "UU", "dTdT", etc.). En otras realizaciones, la protuberancia 3' antisentido contiene uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos no diana (p. ej., "AA", "UU", "dTdT", etc.). En determinados aspectos, las moléculas de ARNia descritas en el presente documento pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, p. ej., en la región bicatenaria (dúplex) y/o en las protuberancias antisentido. Como ejemplo no limitativo, las secuencias de ARNia pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos anteriormente para las secuencias de ARNip. En una realización preferida, la molécula de ARNia comprende nucleótidos 2'OMe tales como, por ejemplo, nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina o mezclas de los mismos.

En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNia pueden comprender una cadena antisentido que corresponde a la cadena antisentido de una molécula de ARNip, p. ej., una de las moléculas de ARNip descritas en el presente documento. En otras realizaciones, las moléculas de ARNia pueden utilizarse para silenciar la expresión de cualquiera de los genes diana mencionados anteriormente, tales como, p. ej., genes asociados a la infección y la supervivencia de virus, genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos, genes asociados a la tumorigénesis y la transformación celular, genes angiogénicos, genes inmunomoduladores tales como los asociados a respuestas inflamatorias y autoinmunitarias, genes receptores de ligandos y genes asociados a trastornos neurodegenerativos.

miARN

Generalmente, los microARN (miARN) son moléculas de ARN monocatenario de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica. Los miARN están codificados por genes a partir de cuyo ADN

se transcriben, pero los miARN no se traducen en proteínas (ARN no codificante); en cambio, cada transcripción primaria (un miRNApi.) se procesa en una estructura de bucle y tallo corto denominada pre-miARN y, finalmente, en un ARNm maduro funcional. Las moléculas maduras de miARN son parcial o totalmente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm), y su función principal es regular a la baja la expresión génica. Se describe la identificación de las moléculas de miARN, p. ej., en Lagos-Quintana *et al.*, *Science*, 294:853-858; Lau *et al.*, *Science*, 294:858-862; y Lee *et al.*, *Science*, 294:862-864.

Los genes que codifican los miARN son mucho más largos que la molécula de miARN madura procesada. Los miARN se transcriben primero como transcripciones primarias o miARN pri. con una caperuza y una cola poli-A y se procesan en estructuras de bucle y tallo cortas, de ~70 nucleótidos, conocidas como pre-miARN en el núcleo celular. En los animales, este procesamiento lo realiza un complejo proteínico conocido como complejo microprocesador, que consiste en la nucleasa Drosha y la proteína de unión a ARN bicatenaria Pasha (Denli *et al.*, *Nature*, 432:231-235 (2004)). A continuación, estos pre-miARN se procesan en miARN maduros en el citoplasma mediante la interacción con la endonucleasa Dicer, que también inicia la formación del complejo de silenciamiento inducido por RNN (RISC) (Bernstein *et al.*, *Nature*, 409:363-366 (2001)). Tanto la cadena sentido como la cadena antisentido del ADN pueden funcionar como plantillas, dando lugar a miARN.

Cuando Dicer escinde la estructura de bucle y tallo de pre-miARN, se forman dos moléculas cortas de ARN complementarias, pero solo una está integrada en el complejo RISC. Esta cadena es conocida como cadena guía y es seleccionada por la proteína argonauta, la ribonucleasa catalíticamente activa en el complejo RISC, basándose en la estabilidad del extremo 5' (Preall *et al.*, *Curr. Biol.*, 16:530-535 (2006)). La cadena restante, conocida como antiguía o filamento pasajero, se degrada como sustrato del complejo RISC (Gregory *et al.*, *Cell*, 123:631-640 (2005)). Tras la integración en el complejo RISC activo, los miARN se emparejan con sus moléculas complementarias de ARNm e inducen la degradación y/o el silenciamiento traslacional del ARNm diana.

Las moléculas de miARN de mamíferos suelen ser complementarias a un sitio de la UTR 3' de la secuencia del ARNm diana. En determinados casos, la unión del miARN al ARNm diana inhibe la traducción de la proteína al bloquear la maquinaria de traducción de la proteína. En otros ejemplos determinados, la hibridación del miARN con el ARNm diana facilita la escisión y degradación del ARNm diana mediante un proceso similar al del ARN de interferencia (ARNi). El miARN también puede dirigirse a la metilación de sitios genómicos que corresponden al ARNm diana. Generalmente, los miARN funcionan en asociación con un complemento de proteínas denominadas colectivamente miRNP.

En determinados aspectos, las moléculas de miARN descritas en el presente documento tienen una longitud de aproximadamente 15-100, 15-90, 15-80, 15-75, 15-70, 15-60, 15-50 o 15-40 nucleótidos, más usualmente de aproximadamente 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, y son preferentemente de aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud. En otros determinados aspectos, las moléculas de miARN pueden comprender uno o más nucleótidos modificados. Como ejemplo no limitativo, las secuencias de miARN pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos anteriormente para las secuencias de ARNip. En una realización preferida, la molécula de miARN comprende nucleótidos 2'OMe tales como, por ejemplo, nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, las moléculas de miARN pueden utilizarse para silenciar la expresión de cualquiera de los genes diana mencionados anteriormente, tales como, p. ej., genes asociados a la infección y la supervivencia de virus, genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos, genes asociados a la tumorigénesis y la transformación celular, genes angiogénicos, genes inmunomoduladores tales como los asociados a respuestas inflamatorias y autoinmunitarias, genes receptores de ligandos y genes asociados a trastornos neurodegenerativos.

En otras realizaciones, uno o más agentes que bloquean la actividad de un miARN dirigido a un ARNm de interés se administran usando una partícula lipídica de la invención (p. ej., una partícula lipídica con ácido nucleico). Algunos ejemplos de agentes bloqueantes incluyen, pero sin limitación, oligonucleótidos de bloqueo estérico, oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueantes y oligonucleótidos morfolino. Dichos agentes bloqueantes pueden unirse directamente al miARN o al sitio de unión del miARN en el ARNm diana.

Oligonucleótidos antisentido

En una realización, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido dirigido a un gen diana o secuencia de interés. La expresión "oligonucleótido antisentido" o el término "antisentido" incluyen oligonucleótidos complementarios a una secuencia polinucleotídica diana. Los oligonucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN complementarias a una secuencia elegida. Los oligonucleótidos de ARN antisentido impiden la traducción de las cadenas complementarias de ARN al unirse al ARN. Los oligonucleótidos de ADN antisentido pueden usarse para dirigirse a una diana específica, ARN complementario (codificante o no codificante). Si se produce la unión, este híbrido de ADN/ARN puede ser degradado por la enzima ribonucleasa H. En una realización particular, los oligonucleótidos antisentido comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. El término abarca también los oligonucleótidos antisentido que pueden no ser exactamente complementarios al gen diana deseado. Por tanto, la invención puede utilizarse en casos en los que se encuentren actividades específicas no diana con antisentido, o en las que una secuencia

antisentido que contenga uno o más emparejamientos incorrectos con la secuencia diana sea la más preferida para un uso en particular.

Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido son inhibidores eficaces y selectivos de la síntesis de proteínas, y, en consecuencia, pueden usarse para inhibir específicamente la síntesis de proteínas por un gen diana. La eficacia de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la síntesis de proteínas está bien demostrada. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y del receptor de acetilcolina muscarina de tipo 2 se inhiben mediante oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus respectivas secuencias de ARNm (véase, las patentes de EE. UU. n.º 5.739.119 y 5.759.829). Adicionalmente, se han demostrado ejemplos de la inhibición de sentido contrario para la proteína nuclear ciclina, el gen de resistencia multifármaco (MDR1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptores de GABAA estriatal y EGF humano (véase, Jaskulski *et al.*, *Science*, 240:1544-6 (1988); Vasanthakumar *et al.*, *Cancer Commun.*, 1:225-32 (1989); Penis *et al.*, *Brain Res Mol Brain Res.*, 15, 57:310-20 (1998); y las patentes de EE. UU. n.º 5.801.154; 5.789.573; 5.718.709 y 5.610.288). Por otro lado, también se han descrito construcciones antisentido que inhiben y pueden usarse para tratar diversas proliferaciones celulares anómalas, p. ej., cáncer (véanse, las patentes de EE. UU. n.º 5.747.470, 5.591.317; y 5.783.683).

Los métodos de producción de oligonucleótidos antisentido son conocidos en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para producir un oligonucleótido antisentido dirigido a cualquier secuencia polinucleotídica. La selección de secuencias de oligonucleótidos antisentido específicas para una secuencia diana determinada se basa en el análisis de la secuencia diana elegida y en la determinación de la estructura secundaria, T_m , la energía de unión y la estabilidad relativa. Los oligonucleótidos antisentido pueden seleccionarse en función de su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm diana de una célula hospedadora. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de iniciación de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' del ARNm. Se pueden realizar estos análisis de estructura secundaria y consideraciones de selección del sitio diana, por ejemplo, utilizando el *software* v.4 de análisis de cebadores OLIGO (Molecular Biology Insights) y/o el *software* del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997)).

Ribozimas

Según otra realización de la invención, las partículas lipídicas con ácido nucleico se asocian con ribozimas. Las ribozimas son complejos de ARN-proteína que tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa (véase, Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 84:8788-92 (1987); y Forster *et al.*, *Cell*, 49:211-20 (1987)). Por ejemplo, una gran cantidad de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, escindiéndose a menudo solo uno de los varios fosfoésteres de un sustrato oligonucleótido (véase, Cech *et al.*, *Cell*, 27:487-96 (1981); Michel *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 216:585-610 (1990); Reinhold-Hurek *et al.*, *Nature*, 357:173-6 (1992)). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una a través de interacciones específicas de emparejamiento de bases a la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

En la actualidad se conocen al menos seis variedades básicas de moléculas enzimáticas de ARN de origen natural. Cada una de ellas puede catalizar la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del ARN en *trans* (y, por tanto, puede escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión a la diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa escindiendo el ARN diana. Por tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce en primer lugar y después se une a un ARN diana mediante emparejamiento de bases complementarias y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido a y escindido su diana de ARN, este se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse a y escindir nuevas dianas de manera repetida.

La molécula enzimática de ácido nucleico puede formarse en cabeza de martillo, horquilla, virus de la hepatitis δ , intrón del grupo I o ARN de ribonucleasa P (en asociación con una secuencia guía de ARN), o motivo de ARN VS de *Neurospora*, por ejemplo. Algunos ejemplos concretos de motivos de cabeza de martillo se describen en, p. ej., Rossi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 20:4559-65 (1992). Algunos ejemplos de motivos de horquilla se describen en, p. ej., el documento EP 0360257, Hampel *et al.*, *Biochemistry*, 28:4929-33 (1989); Hampel *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 18:299-304 (1990); y patente estadounidense n.º 5.631.359. Un ejemplo del motivo del virus de la hepatitis δ se describe en, p. ej., Perrotta *et al.*, *Biochemistry*, 31:11843-52 (1992). Un ejemplo del motivo de ribonucleasa P se describe en, p. ej., Guerrier-Takada *et al.*, *Cell*, 35:849-57 (1983). Algunos ejemplos del motivo de la ribozima de ARN VS de *Neurospora* se describen en, p. ej., Saville *et al.*, *Cell*, 61:685-96 (1990); Saville *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 88:8826-30 (1991); Collins *et al.*, *Biochemistry*, 32:2795-9 (1993). Un ejemplo del intrón del Grupo I se describe en, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 4.987.071. Las características importantes de las moléculas enzimáticas de ácido nucleico usadas de acuerdo con la invención son que tienen un sitio específico de unión a sustrato que es complementario de una o más de las regiones de ADN o ARN del gen diana, y que tienen secuencias de nucleótidos dentro de o alrededor de ese sitio de unión a sustrato que imparten una actividad de escisión de ARN a la molécula. Por tanto, las construcciones ribozimáticas no tienen por qué limitarse a los motivos específicos mencionados en el

presente documento.

Los métodos para producir una ribozima dirigida a cualquier secuencia polinucleotídica son conocidos en la técnica. Las ribozimas pueden diseñarse como se describe en, p. ej., la publicación PCT n.º WO 93/23569 y WO 94/02595, y sintetizarse para ensayarse *in vitro* y/o *in vivo* como se describe en los mismos.

La actividad de la ribozima puede optimizarse alterando la longitud de los brazos de unión de la ribozima o sintetizando químicamente ribozimas con modificaciones que impidan su degradación por las ribonucleasas séricas (véase, p. ej., las publicaciones PCT n.º WO 92/07065, WO 93/15187, WO 91/03162 y WO 94/13688; EP 92110298,4; y la patente de EE. UU. n.º 5.334.711, que describen diversas modificaciones químicas que pueden realizarse en las fracciones de azúcar de las moléculas de ARN enzimático), modificaciones que mejoran su eficacia en las células, y la eliminación de bases del tallo II para acortar los tiempos de síntesis del ARN y reducir las necesidades químicas.

Oligonucleótidos inmunoestimulantes

Los ácidos nucleicos asociados a las partículas lipídicas de la presente invención pueden ser inmunoestimulantes, incluidos los oligonucleótidos inmunoestimulantes (ISS; monocatenarios o bicatenarios) capaces de inducir una respuesta inmunitaria cuando se administra a un sujeto, que puede ser un mamífero tal como un ser humano. ISS incluye, p. ej., ciertos palíndromos que dan lugar a estructuras secundarias en horquilla (véase, Yamamoto *et al.*, *J. Immunol.*, 148:4072-6 (1992)) o motivos CpG, así como otras características conocidas de ISS (tales como los dominios multi-G; véase; la publicación PCT n.º WO 96/11266).

Se considera que los ácidos nucleicos inmunoestimulantes no son específicos de secuencia cuando no se requiere que se unan específicamente a una secuencia diana y reduzcan su expresión para provocar una respuesta inmunitaria. Por tanto, algunos ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden comprender una secuencia correspondiente a una región de un gen o ARNm natural, pero pueden seguir considerándose ácidos nucleicos inmunoestimulantes no específicos de secuencia.

En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido inmunoestimulante comprende al menos un dinucleótido CpG. El oligonucleótido o dinucleótido CpG puede estar sin metilar o metilado. En otra realización, el ácido nucleico inmunoestimulante comprende al menos un dinucleótido CpG que tiene una citosina metilada. En una realización, el ácido nucleico comprende un único dinucleótido CpG, en donde la citosina del dinucleótido CpG está metilada. En una realización alternativa, el ácido nucleico comprende al menos dos dinucleótidos CpG, en donde al menos una citosina de los dinucleótidos CpG está metilada. En una realización adicional, cada citosina de los dinucleótidos CpG presentes en la secuencia está metilada. En otra realización, el ácido nucleico comprende una pluralidad de dinucleótidos CpG, en donde al menos uno de los dinucleótidos CpG comprende una citosina metilada. En la solicitud PCT n.º PCT/US08/88676 se describen ejemplos de oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para usar en las composiciones y métodos de la presente invención, presentada el 31 de diciembre de 2008, las publicaciones PCT n.º WO 02/069369 y WO 01/15726, la patente de EE. UU. n.º 6.406.705 y Raney *et al.*, *J. Pharm. Exper. Ther.*, 298:1185-92 (2001). En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos utilizados en las composiciones y los métodos de la invención tienen una cadena principal fosfodiéster ("PO") o una cadena principal fosforotioato ("PS"), y/o al menos un residuo de citosina metilado en un motivo CpG.

ARNm

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico es una o más moléculas de ARNm (p. ej., un cóctel de moléculas de ARNm).

Modificaciones del ARNm

El ARNm utilizado en la práctica de la presente invención puede incluir una, dos o más de dos modificaciones de nucleósidos. En algunas realizaciones, el ARNm modificado presenta una degradación reducida en una célula en la que se introduce el ARNm, en relación con un ARNm correspondiente no modificado.

En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen ribonucleósido piridin-4-ona, 5-azauridina, 2-tio-5-azauridina, 2-tiouridina, 4-tioseudouridina, 2-tioseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometilpseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desazaseudouridina, dihidrouridina, dihidroseudouridina, 2-tiodihidrouridina, 2-tiodihidroseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina.

En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen la 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroxiacetilcitidina, 1-metil-seudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-

zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisotidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisotidina.

En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 2-aminopurina, 2, 6-diaminopurina, 7-desaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-desaza-2,6-diaminopurina, 7-desaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metil-adenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxi-isopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina y 2-metoxi-adenina.

En realizaciones específicas, un nucleósido modificado es la 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina, 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina. La fracción de fosfato α -tio sustituida se proporciona para conferir estabilidad a los polímeros de ARN a través de los enlaces no naturales de la cadena principal de fosforotioato. Los ARN fosforotioato tienen una mayor resistencia a las nucleasas y, posteriormente, una semivida más larga en un entorno celular. Se espera que los ácidos nucleicos unidos a fosforotioatos reduzcan también la respuesta inmunitaria innata mediante una unión/activación más débil de las moléculas inmunitarias innatas celulares.

En ciertas realizaciones es deseable degradar intracelularmente un ácido nucleico modificado introducido en la célula, por ejemplo, si se desea establecer el momento preciso de la producción de proteínas. Por tanto, la invención proporciona un ácido nucleico modificado que contiene un dominio de degradación, que es capaz de actuar de forma dirigida dentro de una célula.

En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-desazaguanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tioguanosina, 6-tio-7-desaza-guanosina, 6-tio-7-desaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxoguanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

Componentes opcionales de los ácidos nucleicos modificados

En realizaciones adicionales, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir otros componentes opcionales, lo que puede resultar ventajoso en algunas realizaciones. Estos componentes opcionales incluyen, pero sin limitación, regiones no traducidas, secuencias de Kozak, secuencias intrónicas de nucleótidos, sitio interno de entrada a ribosomas (IRES), caperuzas y colas de poliA. Por ejemplo, una región 5' no traducida (UTR) y/o una UTR 3', en donde uno o ambos pueden contener independientemente una o más modificaciones nucleosídicas diferentes. En dichas realizaciones, las modificaciones nucleosídicas también pueden estar presentes en la región traducible. También se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una secuencia de Kozak.

De manera adicional, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una o más secuencias de nucleótidos intrónicas capaces de ser escindidas del ácido nucleico.

Regiones no traducidas (UTR)

Las regiones no traducidas (UTR) de un gen se transcriben, pero no se traducen. La UTR 5' comienza en el sitio de inicio de la transcripción y continúa hasta el codón de inicio, pero no incluye el codón de inicio; mientras que, la UTR 3' comienza inmediatamente después del codón de detención y continúa hasta la señal de terminación transcripcional. Cada vez hay más pruebas sobre las funciones reguladoras que desempeñan las UTR en cuanto a la estabilidad de la molécula de ácido nucleico y la traducción. Las características reguladoras de una UTR pueden incorporarse al ARNm utilizado en la presente invención para aumentar la estabilidad de la molécula. Las características específicas también pueden incorporarse para garantizar una regulación a la baja controlada de las transcripciones en caso de que se dirijan erróneamente a sitios de órganos no deseables.

Protección con caperuza en 5'

La estructura de la caperuza 5' de un ARNm interviene en la exportación nuclear, aumentando la estabilidad del ARNm y se une a la proteína de unión a la caperuza del ARNm (CBP, *Cap Binding Protein*), que es responsable de la estabilidad del ARNm en la célula y de la competencia traductora mediante la asociación de la CBP con la proteína de unión a poli(A) para formar la especie de ARNm cíclico maduro. La caperuza ayuda además a la eliminación de intrones 5' proximales durante el corte y empalme del ARNm.

Las moléculas endógenas de ARNm pueden estar protegidas con caperuza en su extremo 5', lo que genera un enlace 5'-ppp-5'-trifosfato entre un residuo terminal de caperuza de guanosina y el nucleótido sentido transcrito 5'-terminal de la molécula de ARNm. A continuación, esta caperuza de 5'-guanilato puede metilarse para generar un residuo de N7-metil-guanilato. Opcionalmente, los azúcares ribosa de los nucleótidos transcritos terminales y/o antiterminales del extremo 5' del ARNm también pueden estar 2'-O-metilados. La retirada de la caperuza 5' mediante hidrólisis y escisión

de la estructura de caperuza del guanilato puede dirigirse a una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ARNm, para la degradación.

Secuencias de IRES

Los ARNm que contienen un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) también son útiles en la práctica de la presente invención. Un IRES puede actuar como único sitio de unión al ribosoma, o puede servir como uno de los múltiples sitios de unión al ribosoma de un ARNm. Un ARNm que contenga más de un sitio funcional de unión al ribosoma puede codificar varios péptidos o polipéptidos que son traducidos independientemente por los ribosomas ("ARNm multicistrónico"). Cuando los ARNm están dotados de un IRES, opcionalmente, se proporciona además una segunda región traducible. Los ejemplos de secuencias de IRES que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen sin limitación, las de los picornavirus (p. ej. FMDV), virus de la peste (CFFV), virus de la polio (VP), virus de la encefalomiocarditis (VEM), virus de la fiebre aftosa (VFA), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la peste porcina clásica (VPPC), virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia simia (S1V) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

Colas de poli-A

Durante el procesamiento del ARN, puede añadirse una cadena larga de nucleótidos de adenina (cola poli-A) a un polinucleótido tal como una molécula de ARNm para aumentar su estabilidad. Inmediatamente después de la transcripción, el extremo 3' del producto de la transcripción puede ser escindido para liberar un hidroxilo 3'. A continuación, la poli-A polimerasa añade una cadena de nucleótidos de adenina al ARN. El proceso, denominado poliadenilación, añade una cola poli-A que puede tener entre 100 y 250 residuos.

Generalmente, la longitud de una cola poli-A es superior a 30 nucleótidos. En otra realización, la cola poli-A tiene más de 35 nucleótidos de longitud (p. ej., al menos o más de aproximadamente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500 y 3000 nucleótidos).

En este contexto, la cola poli-A puede ser un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % mayor en longitud que el ARNm modificado. La cola poli-A también puede diseñarse como una fracción de los ácidos nucleicos modificados a los que pertenece. En este contexto, la cola poli-A puede ser un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % o más de la longitud total del ARNm modificado o de la longitud total del ARNm modificado menos la cola poli-A.

Generación de moléculas de ARNm

Los métodos para aislar el ARN, sintetizar ARN, hibridar ácidos nucleicos, crear y cribar bibliotecas de ADNc y realizar la PCR son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Gubler y Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2.^a ed. 1989)); al igual que los métodos de PCR (véase, las patentes de EE. UU. n.º 4.683.195 y 4.683.202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.*, eds, 1990)). Las bibliotecas de expresiones también son bien conocidas por los expertos en la materia. Entre los textos básicos adicionales que divulgan los métodos de utilización generales de esta invención se incluye el de Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., 1994).

Polipéptidos codificados

El componente de ARNm de una partícula lipídica con ácido nucleico descrita en el presente documento puede usarse para expresar un polipéptido de interés. Algunas enfermedades humanas están causadas por la ausencia o alteración de una proteína funcional en un tipo de célula en la que la proteína está normalmente presente y activa. La proteína funcional puede estar total o parcialmente ausente debido, p. ej., a la inactividad transcripcional del gen codificador o debido a la presencia de una mutación en el gen codificador que hace que la proteína no funcione total o parcialmente. Algunos ejemplos de enfermedades humanas causadas por la inactivación total o parcial de una proteína incluyen la inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (X-SCID) y la adrenoleucodistrofia (X-ALD). La X-SCID está causada por uno o más mutaciones en el gen que codifica la proteína común de la cadena gamma, que es un componente de los receptores de varias interleucinas que intervienen en el desarrollo y maduración de los linfocitos B y T dentro del sistema inmunitario. La ALD-X está causada por una o más mutaciones en el gen de una proteína transportadora de membrana peroxisomal denominada ABCD1. Las personas afectadas por la ALD-X tienen niveles muy elevados de ácidos grasos de cadena larga en los tejidos de todo el cuerpo, lo que provoca una serie de síntomas que pueden llevar al deterioro mental o a la muerte.

Se ha intentado utilizar la génica para tratar algunas enfermedades causadas por la ausencia o el deterioro de una proteína funcional en un tipo de célula donde la proteína está normalmente presente y activa. La genoterapia implica normalmente la introducción de un vector que incluye un gen que codifica una forma funcional de la proteína afectada, en una persona enferma, y expresión de la proteína funcional para tratar la enfermedad. Hasta ahora, la genoterapia ha tenido un éxito limitado. De manera adicional, se han descrito ciertos aspectos de la administración de ARNm

mediante NPL, p. ej., en las publicaciones PCT números WO 2018/006052 y WO 2015/011633.

Como tal, existe una necesidad continua de mejora para expresar una forma funcional de una proteína dentro de un ser humano que padece una enfermedad causada por la ausencia total o parcial de la proteína funcional, y existe una necesidad de mejora de la administración de ácidos nucleicos (es decir, ARNm) mediante métodos y composiciones, p. ej., que pueden desencadenar una menor respuesta inmunitaria a la terapia. Ciertas realizaciones de la presente invención son útiles en este contexto. Por tanto, en determinadas realizaciones, la expresión del polipéptido mejora uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Ciertas composiciones y métodos de la invención pueden ser útiles para tratar enfermedades humanas causadas por la ausencia, o niveles reducidos, de un polipéptido funcional dentro del cuerpo humano. En otras realizaciones, ciertas composiciones y métodos de la invención pueden ser útiles para expresar un antígeno vacunal para tratar el cáncer.

ARN autoamplificante

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico es una o más moléculas de ARN autoamplificadoras. El ARN autoamplificante (ARNaa) también puede denominarse ARN autorreplicante, ARN competente para la replicación, replicones o RepARN. El RepARN, denominado ARNm autoamplificantes cuando se deriva de virus de cadena positiva, se genera a partir de un genoma vírico que carece al menos de un gen estructural; puede traducirse y replicarse (de ahí lo de "autoamplificarse") sin generar virus descendientes infecciosos. En determinadas realizaciones, la tecnología RepARN puede utilizarse para insertar un casete genético que codifique un antígeno de interés deseado. Por ejemplo, el genoma alfavírico se divide en dos marcos de lectura abiertos (ORF): el primer ORF codifica proteínas para la ARN polimerasa dependiente de ARN (replicasa), y el segundo ORF codifica proteínas estructurales. En las construcciones de vacunas ARNaa, el ORF que codifica las proteínas estructurales víricas puede sustituirse por cualquier antígeno de elección, mientras que la replicasa vírica sigue siendo parte integrante de la vacuna e impulsa la amplificación intracelular del ARN tras la inmunización.

Otros agentes activos

En determinadas realizaciones, el agente activo asociado a las partículas lipídicas de la invención puede comprender una o más proteínas terapéuticas, polipéptidos o pequeñas moléculas o compuestos orgánicos. Entre los ejemplos no limitativos de tales agentes o fármacos terapéuticamente eficaces se incluyen los fármacos oncológicos (p. ej., medicamentos de quimioterapia, agentes terapéuticos hormonales, agentes inmunoterápicos, agentes radioterapéuticos, etc.), agentes hipolipemiantes, fármacos antivíricos, compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicación anticonceptiva, antipiréticos, vasodilatadores, antiangiogénos, agentes citovascuales, inhibidores de la transducción de señales, fármacos cardiovasculares tales como agentes antiarrítmicos, hormonas, vasoconstrictores y esteroides. Estos agentes activos pueden administrarse solos en las partículas lipídicas de la invención, o junto con partículas lipídicas de la invención que comprenden ácido nucleico, tales como ARN de interferencia o ARNm.

Algunos ejemplos no limitativos de fármacos quimioterápicos incluyen los basados en platino (p. ej., oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iproplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (p. ej., 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, pemetrexed, raltitrexed, etc.), alcaloides vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (taxol), docetaxel, etc.), inhibidores de la topoisomerasa (p. ej., irinotecán (CPT-11; Camptosar), topotecán, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), inhibidores de la tirosina cinasa (p. ej., gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®, SU11248), erlotinib (Tarceva®, OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK78HZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec®, STI571), dasatinib (BMS-354825), leflunomide (SU101), vandetanib (Zactima™; ZD6474), etc.), sales farmacéuticamente aceptables del mismo, estereoisómeros del mismo, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos de agentes terapéuticos hormonales convencionales incluyen, sin limitación, esteroides (por ejemplo, dexametasona), finasterida, inhibidores de la aromatasa, tamoxifeno y goserelina, así como otros agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

Algunos ejemplos de agentes inmunoterapéuticos convencionales incluyen, pero sin limitación, inmunoestimulantes (por ejemplo, bacilo Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina-2, interferón alfa, etc.), anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-HER2, anti-CD52, anti-HLA-DR y anti-VEGF), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de *Pseudomonas*, etc.) y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con ^{111}In , ^{90}Y o ^{131}I , etc.).

Algunos ejemplos de agentes radioterapéuticos convencionales incluyen, pero sin limitación, radionucleidos tales

como ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁹Sr, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, y ²¹²Bi, opcionalmente conjugados con anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales.

Entre los fármacos oncológicos adicionales que pueden usarse de acuerdo con la invención se incluyen, pero sin limitación, alkeran, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, bexaroteno, biCNU, carmustina, CCNU, celecoxib, cladribina, ciclosporina A, arabinósido de citosina, citoxano, dexrazoxano, DTIC, estramustina, exemestano, FK506, gemtuzumab-ozogamicina, hydrea, hidroxurea, idarrubicina, interferón, letrozol, leustatina, leuprolida, litretinoína, megastrol, L-PAM, mesna, metoxsaleno, mitramicina, mostaza de nitrógeno, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfímero sódico, prednisona, rituxan, estreptozocina, STI-571, taxotere, temozolamida, VM-26, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina y velban. Otros ejemplos de fármacos oncológicos que pueden usarse de acuerdo con la invención son la elipticina y los análogos o derivados de la elipticina, epotilonas, inhibidores de la cinasa intracelular y camptotecinas.

Algunos ejemplos no limitativos de agentes hipolipemiantes para el tratamiento de una enfermedad o trastorno lipídico asociado a triglicéridos elevados, colesterol y/o glucosa incluyen estatinas, fibratos, ezetimiba, tiazolidinonas, niacina, betabloqueantes, nitroglicerina, antagonistas de calcio, aceite de pescado y mezclas de los mismos.

Algunos ejemplos de fármacos antivíricos incluyen, pero sin limitación, abacavir, aciclovir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, arbidol, atazanavir, atipla, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, inhibidores de la entrada, famciclovir, combinaciones de dosis fijas, fomivirsén, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, inhibidores de la fusión, ganciclovir, ibacitabina, inmunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, inhibidores de integrasa, interferón de tipo III (p. ej., moléculas de IFN- λ tales como IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3), interferón de tipo II (p. ej., IFN- γ), interferón de tipo I (p. ej., IFN- α tal como IFN- α PEGilado, IFN- β , IFN- κ , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- ω e IFN- ζ), interferón, lamivudina, lopinavir, loviroda, MK-0518, maraviroc, moroxidina, nelfinavir, nevirapina, nexavir, análogos de nucleósidos, oseltamivir, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, inhibidores de proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, estavudina, potenciadores sinérgicos, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir, zidovudina, sales farmacéuticamente aceptables del mismo, estereoisómeros del mismo, derivados de los mismos, análogos de los mismos y mezclas de los mismos.

Partículas lipídicas

Las partículas lipídicas de la invención comprenden normalmente un agente activo o terapéutico, un lípido ionizable de la invención, un lípido no catiónico y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. En algunas realizaciones, el agente activo o terapéutico está totalmente encapsulado dentro de la porción lipídica de la partícula lipídica de manera que el agente activo o terapéutico en la partícula lipídica es resistente en solución acuosa a la degradación enzimática, p. ej., por una nucleasa o proteasa. En otras realizaciones, las partículas lipídicas descritas en el presente documento son sustancialmente no tóxicas para mamíferos tales como los seres humanos. Las partículas lipídicas de la invención normalmente tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm o de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm.

En realizaciones preferidas, las partículas lipídicas de la invención son partículas lipídicas con ácido nucleico (NPL) estables en suero que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico, tal como un ARN de interferencia (p. ej., ARNip, ARNia y/o miARN) o ARNm; un lípido ionizable de la invención (es decir, un lípido catiónico de Fórmula I); un lípido no catiónico (es decir, colesterol solo o mezclas de uno o más fosfolípidos y colesterol); y un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (es decir, uno o más conjugados de PEG-lípido). La NPL puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y/o más moléculas de ácido nucleico no modificadas y/o modificadas. Las partículas lipídicas con ácido nucleico y su método de preparación se describen en, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º 5.753.613; 5.785.992; 5.705.385; 5.976.567, 5.981.501; 6.110.745; y 6.320.017; y la publicación PCT n.º WO 96/40964.

Lípidos ionizables

En una realización, la invención proporciona un lípido ionizable que consiste en: un grupo ionizable de fórmula $-NR^2R^3$, en donde R^2 es alquilo C_1-C_4 y R^3 es alquilo C_1-C_4 ; 15-40 átomos de carbono; 30-80 átomos de hidrógeno; 0-10 átomos de oxígeno; 0-10 átomos de nitrógeno; 0-4 átomos de flúor; y 0-5 átomos de azufre, en donde el lípido ionizable tiene una tasa de eliminación tal que queda <10 % del lípido ionizable precursor a los siete (7) días de la administración (p. ej., en el ensayo descrito en el Ejemplo 32 del presente documento).

En una realización, el lípido ionizable comprende al menos un grupo de fórmula $-C(=O)-O-$.

En una realización, el lípido ionizable comprende al menos dos grupos de fórmula $-C(=O)-O-$.

En una realización, el lípido ionizable comprende al menos un grupo de fórmula $-(C=O)N(H)N(R^4)(R^5)-$, en donde R^4 es hidrocarbilo C_2-C_{30} ; y R^5 es hidrocarbilo C_2-C_{30} .

5 En una realización, el lípido ionizable comprende al menos un grupo de fórmula $-(C=O)N(H)-N=C(R^4)-$, en donde R^4 es hidrocarbilo C_2-C_{30} ; y R^5 es hidrocarbilo C_2-C_{30} .

10 En una realización, el lípido ionizable comprende al menos un grupo de fórmula $-(C=O)N(H)N(H)(R^4)(R^5)-$, en donde R^4 es hidrocarbilo C_2-C_{30} ; y R^5 es hidrocarbilo C_2-C_{30} .

En una realización, el lípido ionizable comprende al menos un grupo de fórmula $-CHF-C(=O)-O-$ or $-CF_2-C(=O)-O-$.

15 En una realización, X es $-CH_2-$.

En una realización, X es $-C(=O)-$.

En una realización, X es $-O-$.

20 En una realización, R^2 es metilo.

En una realización, R^2 es etilo.

En una realización, R^2 es propilo.

25 En una realización, R^3 es metilo.

En una realización, R^3 es etilo.

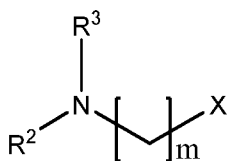
30 En una realización, R^3 es propilo.

En una realización, m es 1.

En una realización, m es 2.

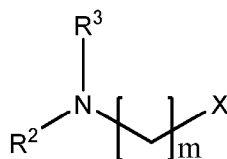
35 En una realización, m es 3.

En una realización, el grupo:



40 se selecciona del grupo que consiste en: $(CH_3)_2NCH_2CH_2C(=O)-$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2C(=O)-$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2-$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH-$, 5-pirolidin-1-ilpentanoilo y $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2O-$.

45 En una realización, el grupo:



50 se selecciona del grupo que consiste en: $(CH_3)_2NCH_2CH_2C(=O)-$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2C(=O)-$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2CH_2C(=O)-$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2-$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH-$ y $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2O-$.

En una realización, R^1 es hidrocarbilo C_5-C_{25} .

En una realización, R^1 es alquilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^1 es alquilo C_5-C_{25} .

5

En una realización, R^1 es alqueno C_5-C_{25} .

En una realización, R^1 es 1-nonilo o 1-decilo.

10 En una realización, o es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

En una realización, o es 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

En una realización, o es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

15

En una realización, o es 2, 3, 4 o 5.

En una realización, L^2 es $-(C=O)-O-$, $-(C=O)N(H)N(R^4)-$, $-(C=O)N(H)-N=C(R^4)-$, $-(C=O)N(H)N(H)C(R^4)(R^5)-$ o $-(C=O)-O-CH_2-R^Z$.

20

En una realización, L^2 es $-(C=O)-O-$.

En una realización, L^2 es $-(C=O)N(H)N(R^4)-$.

25 En una realización, L^2 es $-(C=O)-O-CH_2-R^Z$.

En una realización, a es H.

En una realización, a es F.

30

En una realización, b es H.

En una realización, b es F.

35 En una realización, R^6 es hidrocarbilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^6 es hidrocarbilo C_5-C_{25} .

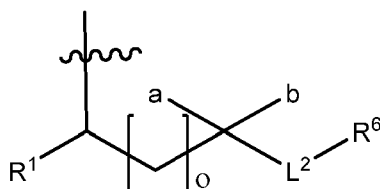
En una realización, R^6 es alquilo C_2-C_{25} .

40

En una realización, R^6 es alquilo C_5-C_{25} .

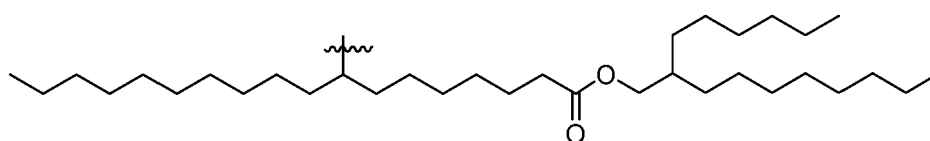
En una realización, R^6 es alqueno C_5-C_{25} .

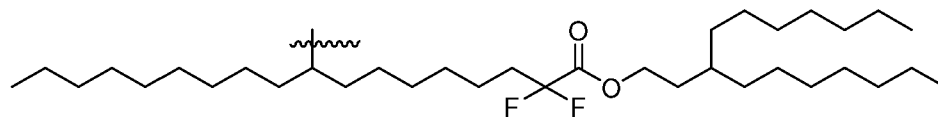
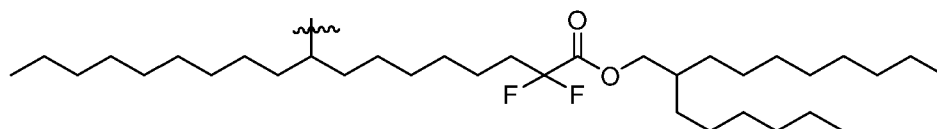
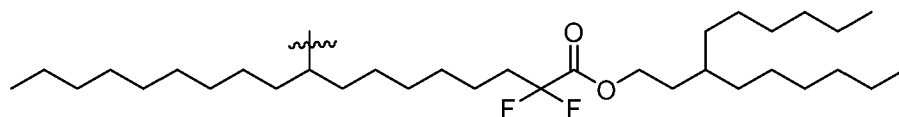
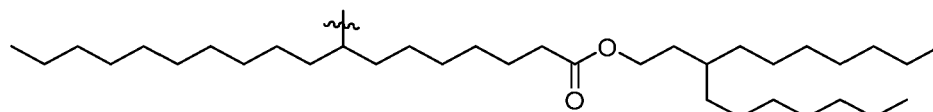
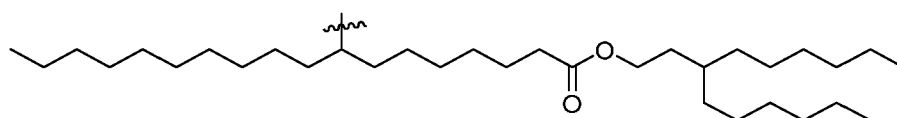
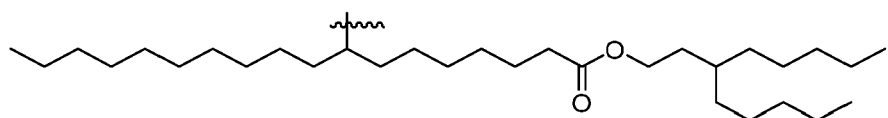
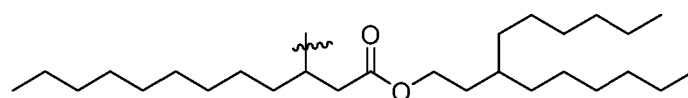
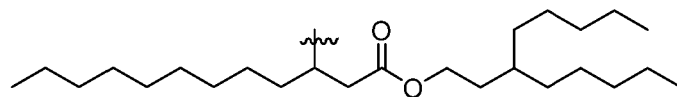
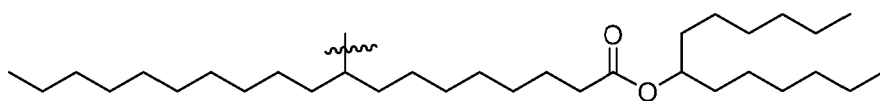
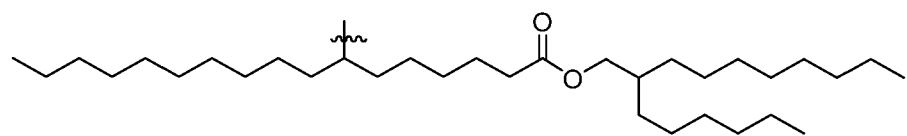
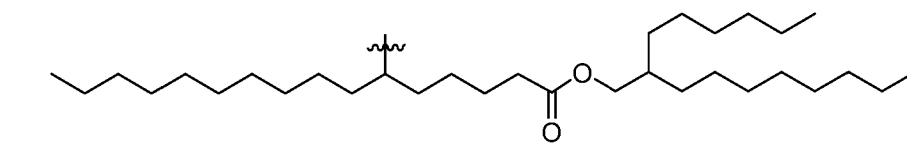
45 En una realización, el grupo:

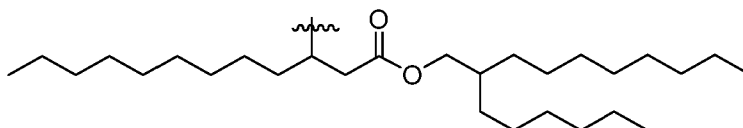
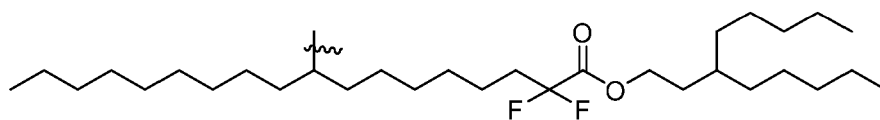
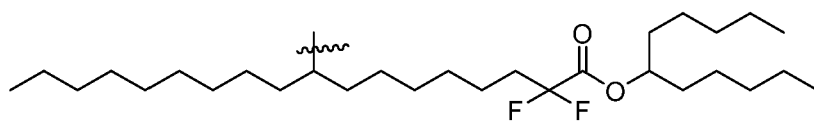


se selecciona del grupo que consiste en:

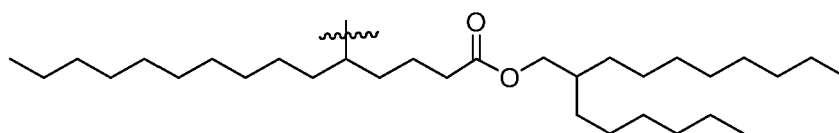
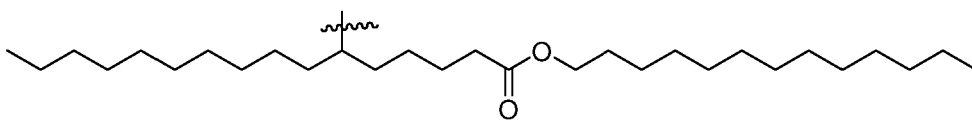
50



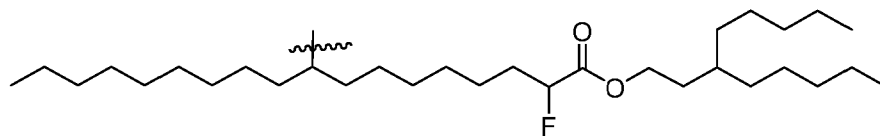
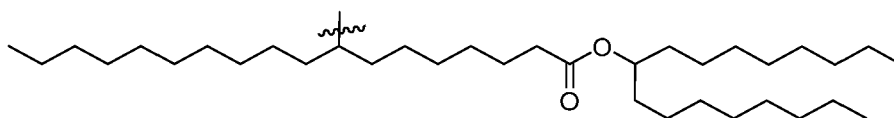
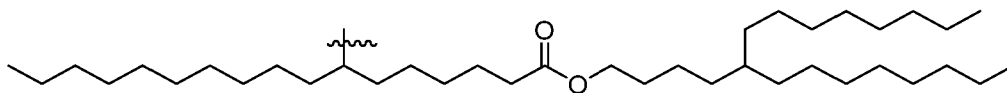
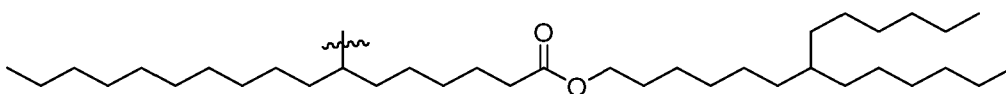




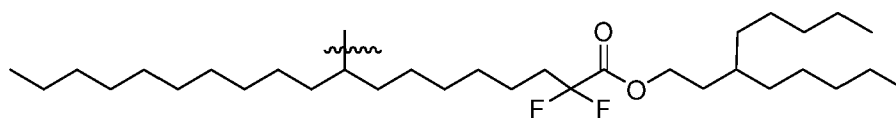
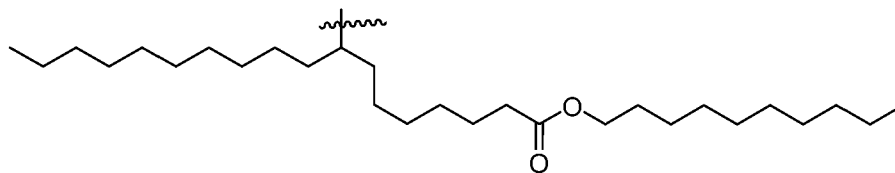
5



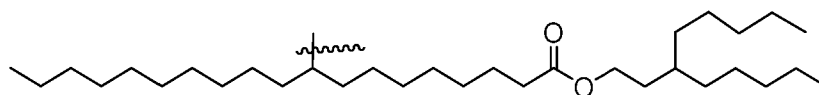
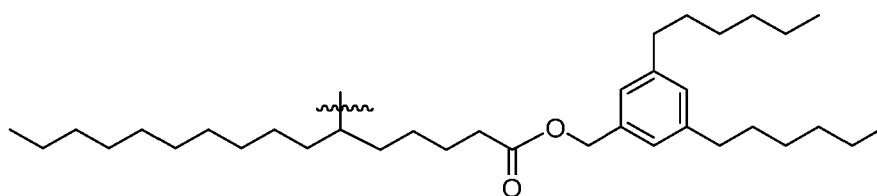
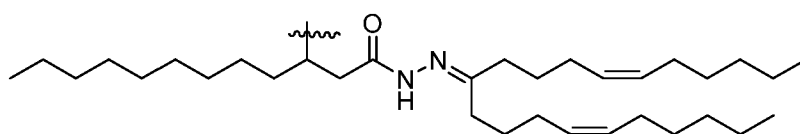
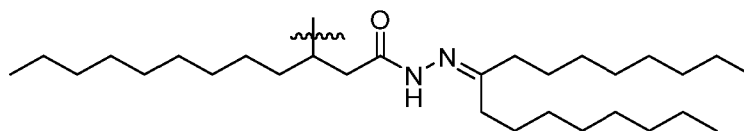
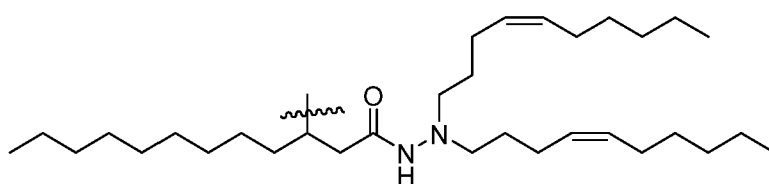
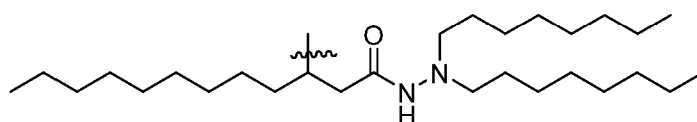
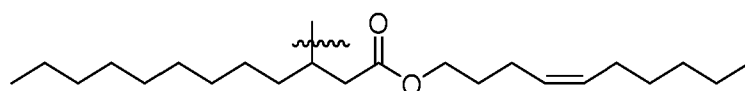
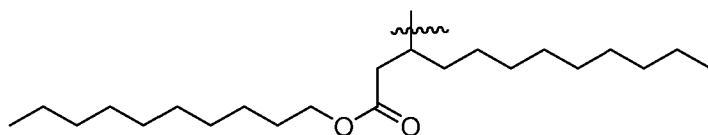
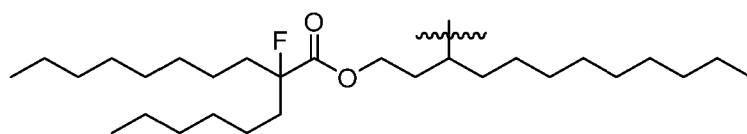
10

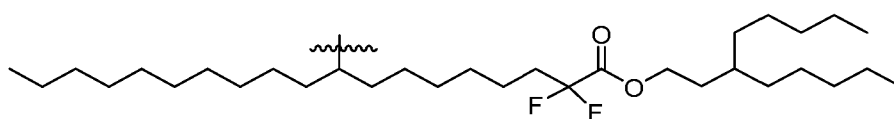
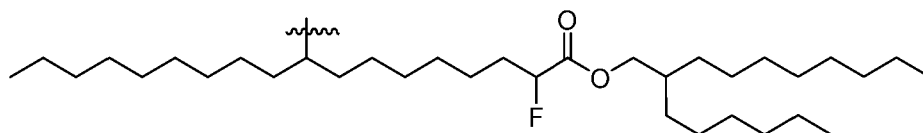
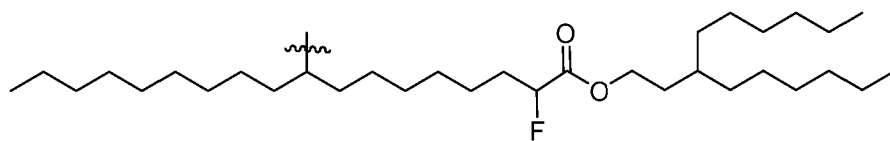


15



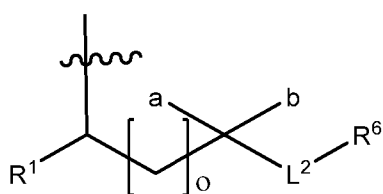
20





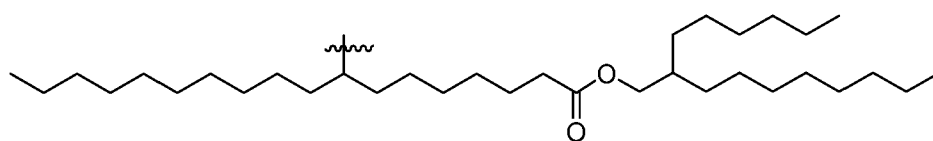
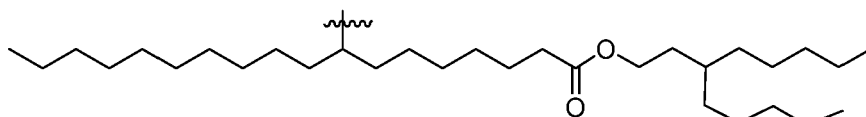
5 y

En una realización, el grupo:

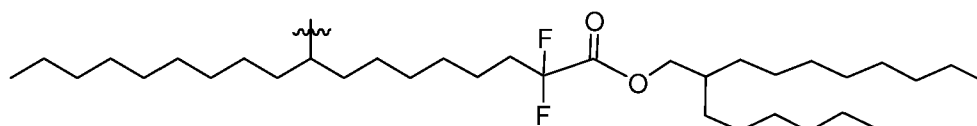
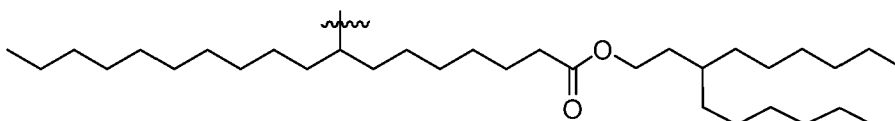


10

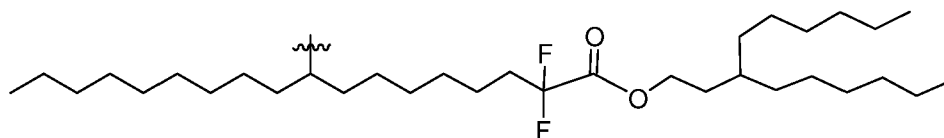
se selecciona del grupo que consiste en:

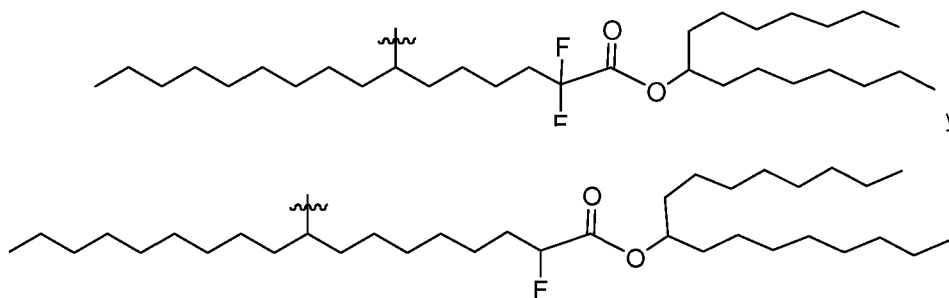


15

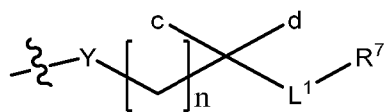


20

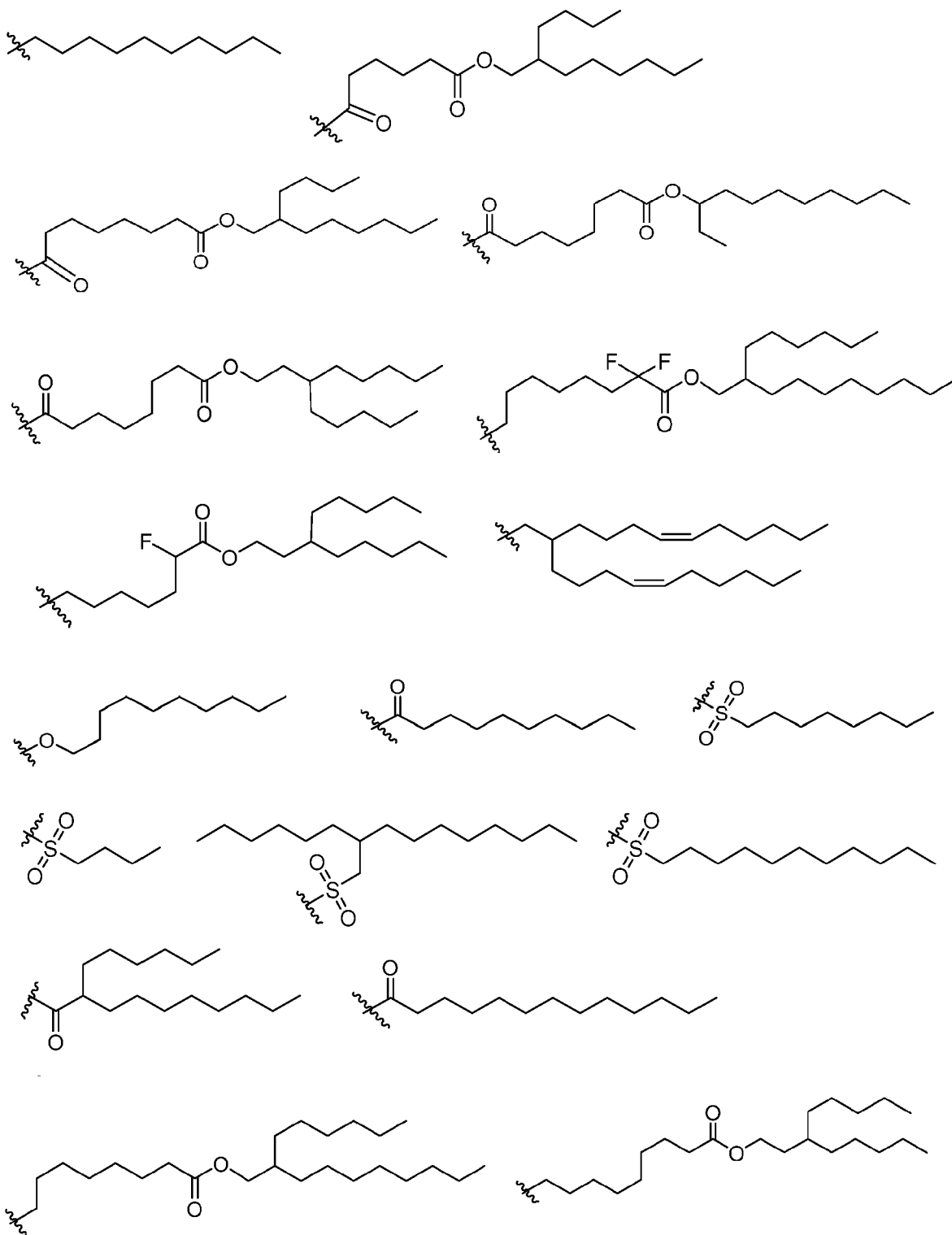


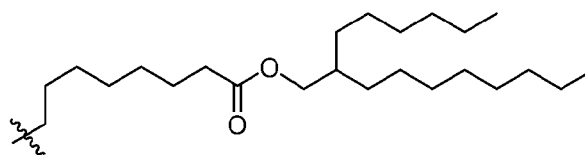
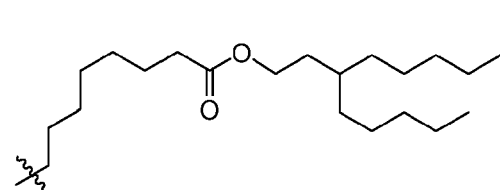
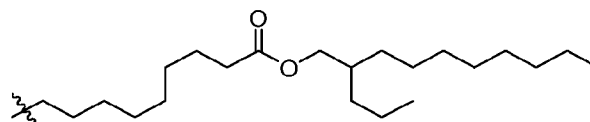
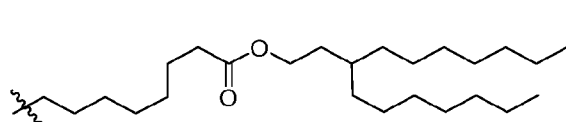
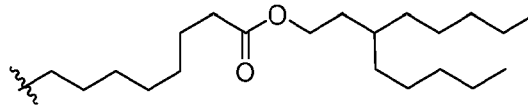
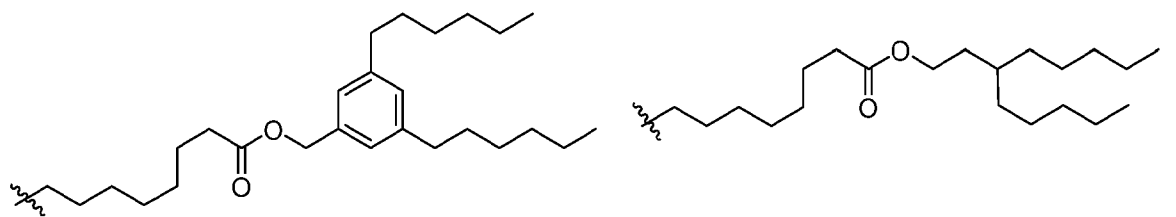


- 5 En una realización, Y es -CH₂-.
- En una realización, Y es -C(=O)-.
- En una realización, Y es -O-.
- 10 En una realización, n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.
- En una realización, n es 10, 11, 12, 13, 14 o 15.
- 15 En una realización, n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
- En una realización, n es 2, 3, 4 o 5.
- 20 En una realización, L¹ está ausente; y L² es -(C=O)-O-, -(C=O)N(H)N(R⁴)-, -(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-, -(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)- o -(C=O)-O-CH₂-R^Z.
- En una realización, L¹ es -(C=O)-O-, -(C=O)N(H)N(R⁴)-, -(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-, -(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)- o -(C=O)-O-CH₂-R^a; y L² está ausente.
- 25 En una realización, L¹ es -(C=O)-O-, -(C=O)N(H)N(R⁴)-, -(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-, -(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)- o -(C=O)-O-CH₂-R^a.
- En una realización, L¹ es -(C=O)-O.
- 30 En una realización, L¹ es -(C=O)N(H)N(R⁴)-.
- En una realización, L¹ es -(C=O)-O-CH₂-R^Z.
- En una realización, c es H.
- 35 En una realización, c es F.
- En una realización, d es H.
- 40 En una realización, d es F.
- En una realización, R⁷ es hidrocarbilo C₂-C₂₅.
- En una realización, R⁷ es hidrocarbilo C₅-C₂₅.
- 45 En una realización, R⁷ es alquilo C₂-C₂₅.
- En una realización, R⁷ es alquilo C₅-C₂₅.
- 50 En una realización, R⁷ es alqueno C₅-C₂₅.
- En una realización, el grupo:

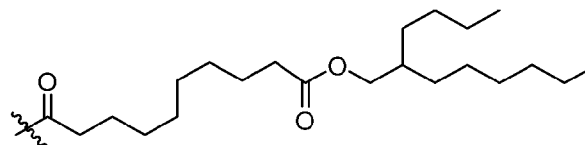
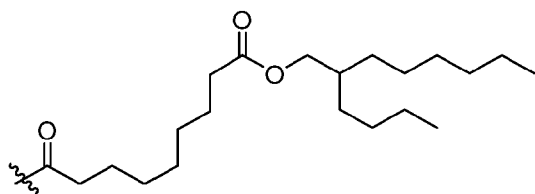
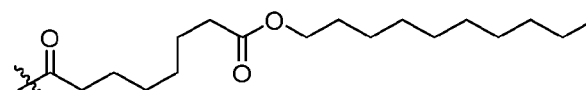
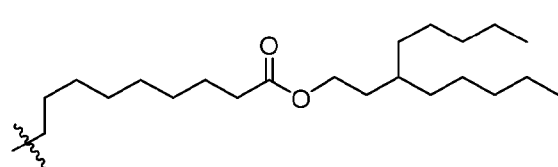


se selecciona del grupo que consiste en:

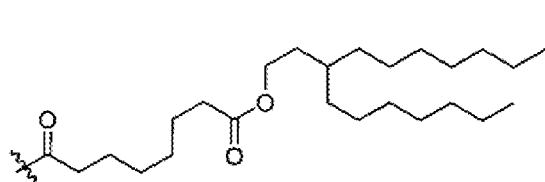
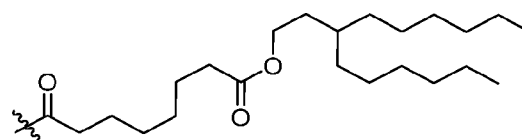
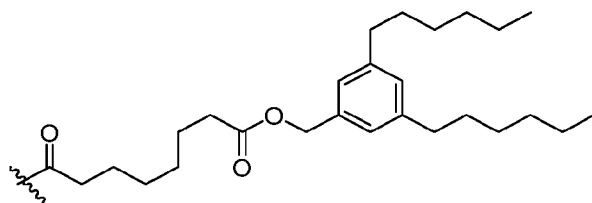




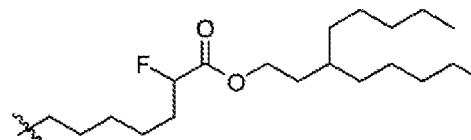
5



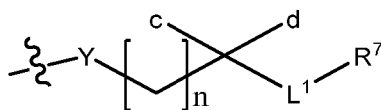
10



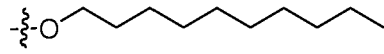
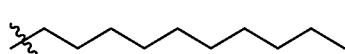
y



15 En una realización, el grupo:



se selecciona del grupo que consiste en:



y

5

En una realización, R^4 es hidrocarbilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^4 es hidrocarbilo C_5-C_{25} .

10

En una realización, R^4 es alquilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^4 es alquilo C_5-C_{25} .

15

En una realización, R^4 es alqueno C_5-C_{25} .

En una realización, R^5 es hidrocarbilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^5 es hidrocarbilo C_5-C_{25} .

20

En una realización, R^5 es alquilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^5 es alquilo C_5-C_{25} .

25

En una realización, R^5 es alqueno C_5-C_{25} .

En una realización, R^4 es hidrocarbilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^{14} es hidrocarbilo C_5-C_{25} .

30

En una realización, $R^{4'}$ es alquilo C_2-C_{25} .

En una realización, $R^{4'}$ es alquilo C_5-C_{25} .

35

En una realización, $R^{4'}$ es alqueno C_5-C_{25} .

En una realización, R^{15} es hidrocarbilo C_2-C_{25} .

En una realización, $R^{15'}$ es hidrocarbilo C_5-C_{25} .

40

En una realización, $R^{5'}$ es alquilo C_2-C_{25} .

En una realización, R^5 es alquilo C_5-C_{25} .

45

En una realización, $R^{5'}$ es alqueno C_5-C_{25} .

En una realización, R^z es fenilo que está sustituido con 1 o 2 grupos seleccionados independientemente entre hidrocarbilo C_2-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrocarbilo C_5-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C_2-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C_5-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alqueno C_5-C_{10} .

50

En una realización, $R^{z'}$ es fenilo que está sustituido con 1 o 2 grupos seleccionados independientemente entre hidrocarbilo C_2-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrocarbilo C_5-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C_2-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C_5-C_{10} . En una realización, cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alqueno C_5-C_{10} .

55

60

En una realización, el lípido ionizable se selecciona entre los compuestos de los Ejemplos 1, 16, 17, 43, 46, 90, 101 y 115, y las sales de los mismos.

En una realización, X es -C(=O)- e Y está ausente o es -O- .

5

En una realización, X es -C(=O)- e Y es -O- .

En una realización, Y es $\text{-CH}_2\text{-}$; L^1 está ausente; y c y d son cada uno H.

10 En una realización, a es F o b es H.

En una realización, a es F y b es F.

En una realización, a es F; b es H; y L^1 es -(C=O)-O- .

15

En una realización, a es F; b es F; y L^1 es -(C=O)-O- .

En una realización, R^2 y R^3 son cada uno metilo.

20 En una realización, L^1 está ausente; y c y d son cada uno H.

En una realización, L^1 está ausente; y a, b, c y d son cada uno H.

En una realización, uno de L^1 y L^2 es -(C=O)-O- .

25

En una realización, L^1 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$ ramificado.

En una realización, L^1 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_5\text{-C}_{25}$ que está ramificado en un carbono que está dentro de 3 carbonos del punto de unión a L^1 .

30

En una realización, L^1 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_4\text{-C}_{25}$ que está ramificado en un carbono que está dentro de 2 carbonos del punto de unión a L^1 .

En una realización, L^1 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_3\text{-C}_{25}$ que está ramificado en un carbono que está unido a L^1 .

35

En una realización, uno de L^1 y L^2 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$ ramificado.

En una realización, uno de L^1 y L^2 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_5\text{-C}_{25}$ que está ramificado en un carbono que está dentro de 3 carbonos del punto de unión a L^1 .

40

En una realización, uno de L^1 y L^2 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_4\text{-C}_{25}$ que está ramificado en un carbono que está dentro de 2 carbonos del punto de unión a L^1 .

En una realización, uno de L^1 y L^2 es -(C=O)-O- y R^7 es un hidrocarbilo $\text{C}_3\text{-C}_{25}$ que está ramificado en un carbono que está unido a L^1 .

45

En una realización, Y está ausente o es -O- ; N es 0; c es H; d es H; L^1 está ausente; y R^7 es hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$.

En una realización, Y está ausente o es -O- ; N es 0; c es H; d es H; L^1 está ausente; y R^7 es hidrocarbilo $\text{C}_5\text{-C}_{15}$.

50

En una realización, Y está ausente o es -O- ; N es 0; c es H; d es H; L^1 está ausente; y R^7 es hidrocarbilo C_{10} .

En una realización, Y está ausente o es -O- ; N es 0; c es H; d es H; L^1 está ausente; y R^7 es hidrocarbilo $\text{C}_5\text{-C}_{15}$ que está ramificado en un carbono que está dentro de 3 carbonos del punto de unión al resto del compuesto de fórmula (I).

55

En una realización, Y está ausente o es -O- ; N es 0; c es H; d es H; L^1 está ausente; y R^7 es hidrocarbilo $\text{C}_5\text{-C}_{15}$ que está ramificado en un carbono que está dentro de 2 carbonos del punto de unión al resto del compuesto de fórmula (I).

60

En una realización, Y está ausente o es -O- ; N es 0; c es H; d es H; L^1 está ausente; y R^7 es hidrocarbilo $\text{C}_5\text{-C}_{15}$ que está ramificado en un carbono que está unido al resto del compuesto de fórmula (I).

En una realización, Y está ausente o es -O- ; N es 0; c es H; d es H; L^1 está ausente; y R^7 es hidrocarbilo C_{10} que está ramificado en un carbono que está dentro de 3 carbonos del punto de unión al resto del compuesto de fórmula (I).

65

En una realización, Y está ausente o es -O-; N es 0; c es H; d es H; L¹ está ausente; y R⁷ es hidrocarbilo C₁₀ que está ramificado en un carbono que está dentro de 2 carbonos del punto de unión al resto del compuesto de fórmula (I).

- 5 En una realización, Y está ausente o es -O-; N es 0; c es H; d es H; L¹ está ausente; y R⁷ es hidrocarbilo C₁₀ que está ramificado en un carbono que está unido al resto del compuesto de fórmula (I).

En una realización, L² es -(C=O)-O- y R⁶ es un hidrocarbilo C₂-C₂₅ ramificado.

- 10 En una realización, L² es -(C=O)-O- y R⁶ es un hidrocarbilo C₅-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está dentro de 3 carbonos del punto de unión a L².

En una realización, L² es -(C=O)-O- y R⁶ es un hidrocarbilo C₄-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está dentro de 2 carbonos del punto de unión a L².

- 15 En una realización, L² es -(C=O)-O- y R⁶ es un hidrocarbilo C₃-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está unido a L².

En una realización, L² es -(C=O)-O-; a es F; b es H; y R⁶ es un hidrocarbilo C₂-C₂₅ ramificado.

- 20 En una realización, L² es -(C=O)-O-; a es F; b es H; y R⁶ es un hidrocarbilo C₅-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está dentro de 3 carbonos del punto de unión a L².

En una realización, uno de L² es -(C=O)-O-; a es F; b es H; y R⁶ es un hidrocarbilo C₄-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está dentro de 2 carbonos del punto de unión a L².

- 25 En una realización, uno de L² es -(C=O)-O-; a es F; b es H; y R⁶ es un hidrocarbilo C₃-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está unido a L².

En una realización, L² es -(C=O)-O-; a es F; b es H; y R⁶ es un hidrocarbilo C₃-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está unido a L².

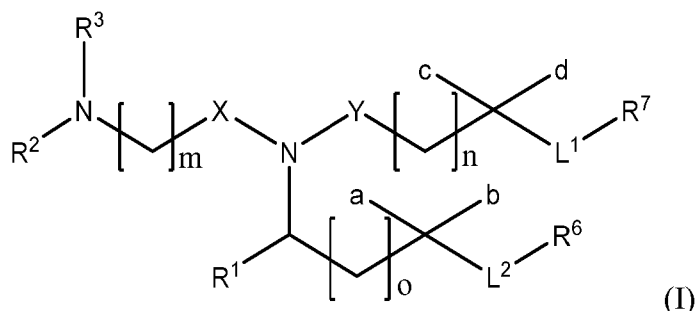
- 30 En una realización, L² es -(C=O)-O-; a es F; b es F; y R⁶ es un hidrocarbilo C₂-C₂₅ ramificado.

En una realización, L² es -(C=O)-O-; a es F; b es F; y R⁶ es un hidrocarbilo C₅-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está dentro de 3 carbonos del punto de unión a L².

- 35 En una realización, L² es -(C=O)-O-; a es F; b es F; y R⁶ es un hidrocarbilo C₄-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está dentro de 2 carbonos del punto de unión a L².

En una realización, L² es -(C=O)-O-; a es F; b es F; y R⁶ es un hidrocarbilo C₃-C₂₅ que está ramificado en un carbono que está unido a L².

- 40 En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



- 45 o una sal del mismo, en donde:

X es -CH₂-, -O-, -O(C=O)-; o -C(=O)-

Y es -CH₂-, -O-, -SO₂- o -C(=O)-;

R¹ es hidrocarbilo C₂-C₂₅;

- 50 R² es alquilo C₁-C₃; y R³ es alquilo C₁-C₃; o R² y R³, tomados junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un anillo aziridino, azetidino o pirrolidino;

m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

n es 0-15;

o es 0-15;

- 55 L¹ está ausente, o es -(C=O)-O-, -(C=O)N(H)N(R⁴)-, -(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-, -(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)-, -(C=O)-O-

$\text{CH}_2\text{-R}^z$ o $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{-R}^w$;

L^2 está ausente, o es $-(\text{C}=\text{O})\text{-O-}$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)\text{-}$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{-N}=\text{C}(\text{R}^4)\text{-}$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)\text{-}$, $-(\text{C}=\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-R}^z$ o $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{-R}^x$;

a es H o F;

b es H o F;

c es H o F; y

d es H o F; o

c y d, tomados junto con el carbono al que están unidos, forman $-\text{C}(\text{=O})\text{-}$;

R^4 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^5 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^4 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^5 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^6 es hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^7 es hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

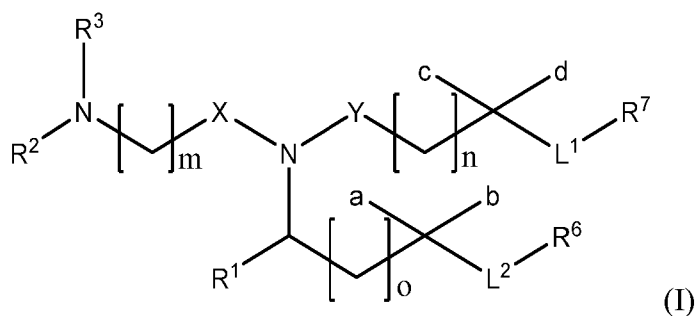
R^w está ausente, o es $-\text{C}(\text{F})\text{H-}$ o $-\text{C}(\text{F})_2\text{-}$;

R^x está ausente, o es $-\text{C}(\text{F})\text{H-}$ o $-\text{C}(\text{F})_2\text{-}$;

R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$; y

R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



o una sal del mismo, en donde:

X es $-\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{O-}$, $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{-}$; o $-\text{C}(\text{=O})\text{-}$;

Y es $-\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{O-}$, $-\text{SO}_2\text{-}$ o $-\text{C}(\text{=O})\text{-}$;

R^1 es hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^2 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$; y R^3 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$; o R^2 y R^3 , tomados junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un anillo aziridino, azetidino o pirrolidino;

m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

n es 0-15;

o es 0-15;

L^1 está ausente o es $-(\text{C}=\text{O})\text{-O-}$;

L^2 está ausente o es $-(\text{C}=\text{O})\text{-O-}$;

a es H o F;

b es H o F;

c es H o F; y d es H o F; o c y d, tomados junto con el carbono al que están unidos, forman $-\text{C}(\text{=O})\text{-}$;

R^4 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^5 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^4 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^5 es H o hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^6 es hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^7 es hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{25}$;

R^w está ausente, o es $-\text{C}(\text{F})\text{H-}$ o $-\text{C}(\text{F})_2\text{-}$;

R^x está ausente, o es $-\text{C}(\text{F})\text{H-}$ o $-\text{C}(\text{F})_2\text{-}$;

R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$; y

R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$.

Realizaciones específicas

En una realización específica, la invención proporciona un lípido ionizable de fórmula (I), en donde X es $-\text{C}(\text{=O})\text{-}$. Dichos lípidos ionizables muestran normalmente una elevada actividad.

En una realización específica, la invención proporciona un lípido ionizable de fórmula (I), en donde X es $-\text{C}(\text{=O})\text{-}$ e Y

es -O-. Dichos lípidos ionizables normalmente demuestran una alta actividad y poseen propiedades pKa deseables.

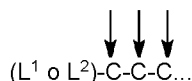
En una realización específica, la invención proporciona un lípido ionizable de fórmula (I), en donde Y es -CH₂-; L¹ está ausente; y c y d son cada uno H. Dichos lípidos ionizables normalmente demuestran una alta actividad.

En una realización específica, la invención proporciona un lípido ionizable de fórmula (I), en donde R² es metilo y R³ es metilo. Dichos lípidos ionizables muestran normalmente una elevada actividad.

En una realización específica, la invención proporciona un lípido ionizable de fórmula (I), en donde L¹ está ausente; y c y d son cada uno H. Dichos lípidos ionizables normalmente demuestran una alta actividad.

En una realización específica, la invención proporciona un lípido ionizable de fórmula (I), en donde L² es -(C=O)-O- y R⁶ es un hidrocarbilo C₂-C₂₅ que está ramificado en un átomo de carbono que está unido a L² o que está ramificado en un átomo de carbono que está a 2 carbonos del punto de unión a L² o que está ramificado en un átomo de carbono que está a 3 carbonos del punto de unión a L². Dichos lípidos ionizables muestran normalmente una elevada actividad.

Cuando un hidrocarbilo está ramificado en un átomo de carbono que está unido a L¹ o L², o está ramificado en un átomo de carbono que está a 2 carbonos del punto de unión a L¹ o L², o está ramificado en un átomo de carbono que está a 3 carbonos del punto de unión a L¹ o L², se entiende que el hidrocarbilo está ramificado en uno de los carbonos ilustrados en la fórmula siguiente:



En una realización, la invención proporciona una partícula lipídica con ácido nucleico que comprende:

(a) una o más moléculas de ácido nucleico;

(b) un lípido no catiónico;

(c) un lípido conjugado; y

(d) un compuesto de fórmula (I) o a una sal del mismo, en donde una o más moléculas de ácido nucleico están encapsuladas dentro de la partícula lipídica.

En una realización, el compuesto o la sal comprende de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende de aproximadamente el 0,1 % molar a aproximadamente el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el compuesto o la sal comprende de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende de aproximadamente el 0,1 % molar a aproximadamente el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, la molécula de ARNi se selecciona del grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia (ARNip), ARNbc en sustrato Dicer, ARN de horquilla pequeña (ARNhc), ARN de interferencia asimétrico (ARNia), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARN vírico (ARNv), ARN autoamplificador y combinaciones de los mismos.

En una realización, el ácido nucleico es una molécula de ARNm.

En una realización, el ácido nucleico comprende una molécula de ARNip bicatenario.

En una realización, la molécula de ARNip bicatenario comprende al menos un nucleótido modificado.

En una realización, el ARNip comprende al menos un nucleótido 2'-O-metilo (2'OMe).

En una realización, el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo.

En una realización, el colesterol o un derivado del mismo comprende de aproximadamente el 31,5 % molar a aproximadamente el 42,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el lípido no catiónico comprende un fosfolípido.

En una realización, el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo.

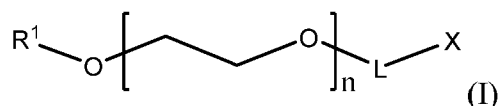
En una realización, el fosfolípido comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC) o una mezcla de las mismas.

En una realización, el fosfolípido comprende de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol comprende de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el fosfolípido comprende de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol comprende de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el lípido conjugado comprende un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido.

En una realización, el conjugado PEG-lípido comprende un compuesto de fórmula (I):



o una sal del mismo, en donde:

R¹ es H, alquilo (C₁-C₆) o alcanóilo (C₁-C₆);

n es un número entero en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 150; y

L está ausente y X es $-C(=O)NR^2R^3$; o

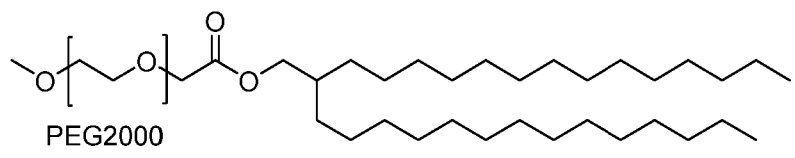
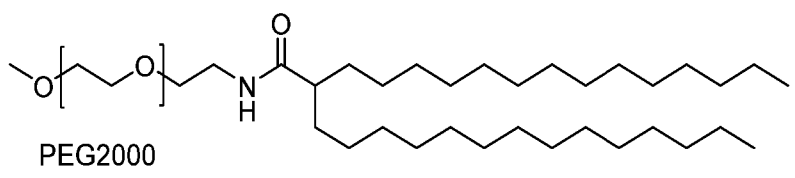
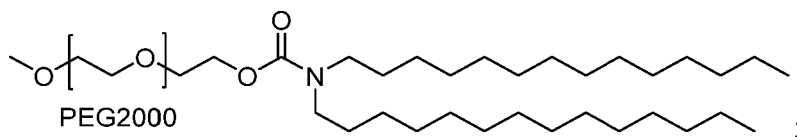
L es alquilo (C₁-C₆) y X se selecciona del grupo que consiste en -N(R⁴)C(=O)CH(R²)(R³), -OCH(R²)(R³), -C(=O)OCH₂CH(R²)(R³), -N(R⁴)C(=O)N(R²)(R³) y -SO₂N(R²)(R³);

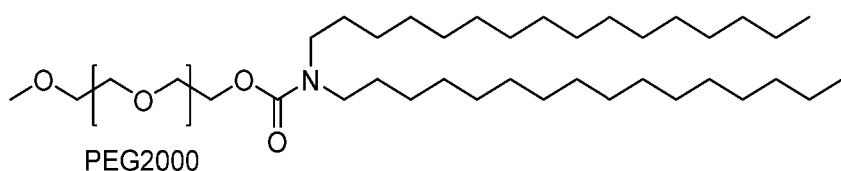
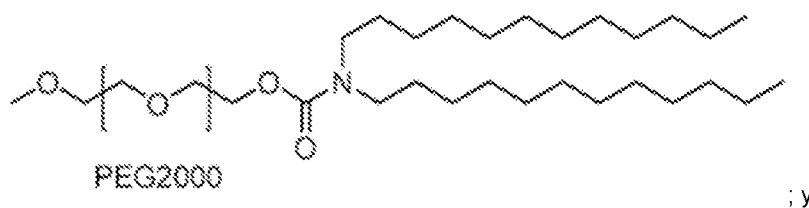
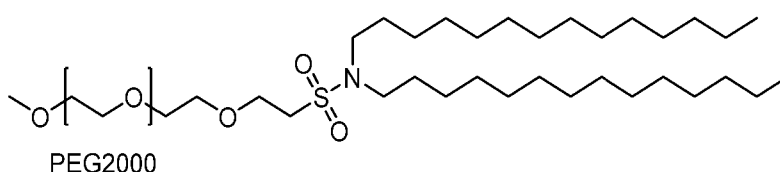
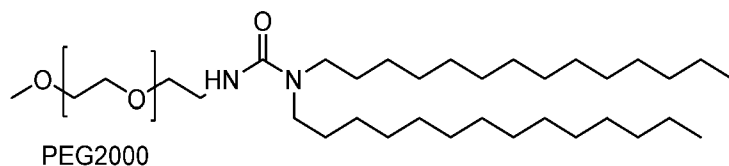
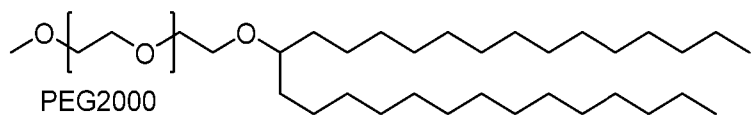
R² es alquilo (C₁₀-C₂₀);

R³ es alquilo (C₁₀-C₂₀); y

R⁴ es H o alquilo (C₁-C₆).

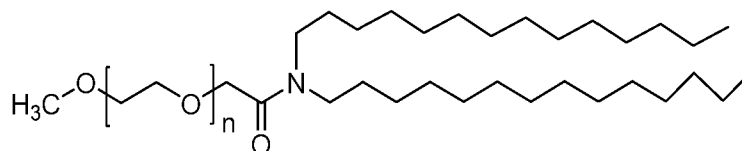
En una realización, el conjugado de PEG-lípido comprende un compuesto seleccionado entre:





o una sal de los mismos.

En una realización, el conjugado de PEG-lípido comprende un compuesto de la fórmula siguiente:



en donde n es 45-50.

En una realización, el conjugado de PEG-lípido comprende un conjugado de PEG-diálilglicerol (PEGDAG), un conjugado de PEG-dialquinoxipropilo (PEG-DAA) o una mezcla de los mismos.

En una realización, el conjugado de PEG-DAA comprende un conjugado de PEG-dimiristaloquinoxipropilo (PEG-DMA), un conjugado de PEG-disteariloquinoxipropilo (PEG-DSA) o una mezcla de los mismos.

En una realización, el conjugado de PEG-DAA comprende un conjugado de PEG-dimiristaloquinoxipropilo (PEG-DMA).

En una realización, el conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido es un compuesto de fórmula:

A-B-C

o una sal del mismo, en donde:

5 A es alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alqueno (C₂-C₆), alquino (C₂-C₆), alcanoilo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) o alcanoiloxi (C₂-C₆), en donde cualquier alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alqueno (C₂-C₆), alquino (C₂-C₆), alcanoilo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) y alcanoiloxi (C₂-C₆) está sustituido con uno o más grupos precursores aniónicos, y en donde cualquier alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alqueno (C₂-C₆), alquino (C₂-C₆), alcanoilo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) y alcanoiloxi (C₂-C₆) está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alcoxi (C₁-C₃), alcanoilo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₃), alquiltio (C₁-C₃) o alcanoiloxi (C₂-C₃);

15 B es una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 550 Da a aproximadamente 10.000 Da;

C es -L-R^a

20 L se selecciona del grupo que consiste en un enlace directo, -C(O)O-, -C(O)NR^b-, -NR^b-, -C(O)-, -NR^bC(O)O-, -NR^bC(O)NR^b-, -S-S-, -O-, -(O)CCH₂CH₂C(O)- y -NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-;

R^a es un alquilo (C₁₀-C₅₀) ramificado o un alqueno (C₁₀-C₅₀) ramificado, en donde uno o más átomos de carbono del alquilo (C₁₀-C₅₀) ramificado o del alqueno (C₁₀-C₅₀) ramificado se han remplazado por -O-; y

25 cada R^b es independientemente H o alquilo (C₁-C₆).

En una realización, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 Da.

30 En una realización, el lípido conjugado comprende de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el ácido nucleico de la partícula lipídica con ácido nucleico no se degrada sustancialmente tras la incubación de la partícula en suero a 37 °C durante 30 minutos.

35 En una realización, el ácido nucleico está totalmente encapsulado en la partícula lipídica con ácido nucleico.

En una realización, la partícula lipídica con ácido nucleico tiene una relación de masas entre al lípido y el ácido nucleico de aproximadamente 5 a aproximadamente 15.

40 En una realización, la partícula lipídica con ácido nucleico tiene una relación de masas entre al lípido y el ácido nucleico de aproximadamente 5 a aproximadamente 30.

En una realización, la partícula lipídica con ácido nucleico tiene una mediana del diámetro de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm.

45 En una realización, el compuesto o la sal comprende de aproximadamente el 56,5 % molar a aproximadamente el 66,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo que comprende de aproximadamente el 31,5 % molar a aproximadamente el 42,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y un conjugado de PEG-lípido comprende de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

50 En una realización, la partícula lipídica con ácido nucleico comprende aproximadamente el 61,5 % molar de compuesto o sal, aproximadamente el 36,9 % de colesterol o un derivado del mismo, y aproximadamente el 1,5 % molar de conjugado de PEG-lípido.

55 En una realización, el compuesto o la sal comprende de aproximadamente el 52 % molar a aproximadamente el 62 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende la mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo que comprende de aproximadamente el 36 % molar a aproximadamente el 47 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el conjugado de PEG-lípido comprende de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

60 En una realización, la partícula lipídica con ácido nucleico comprende aproximadamente el 57,1 % molar de compuesto o sal, aproximadamente el 7,1 % molar de fosfolípidos, aproximadamente el 34,3 % molar de colesterol o un derivado del mismo, y aproximadamente el 1,4 % molar de conjugado de PEG-lípido.

65 En una realización, la partícula lipídica con ácido nucleico comprende aproximadamente el 57,1 % molar de compuesto

o sal, aproximadamente el 20 % molar de fosfolípidos, aproximadamente el 20 % molar de colesterol o un derivado del mismo, y aproximadamente el 1,4 % molar de conjugado de PEG-lípido.

En una realización, el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 65 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en donde el fosfolípido comprende del 4 % molar al 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol o derivado del mismo comprende del 30 % molar al 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

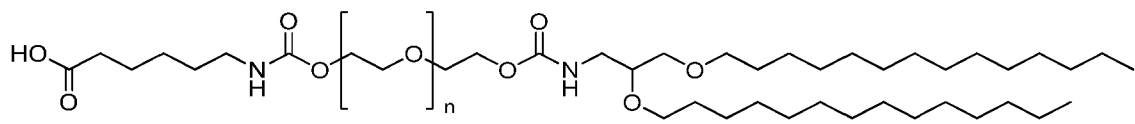
En una realización, el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 65 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en donde el fosfolípido comprende del 3 % molar al 15 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol o derivado del mismo comprende del 30 % molar al 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 65 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende el 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol o un derivado del mismo comprende del 30 % molar al 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende del 13 % molar al 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el compuesto o la sal comprende de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 50 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende la mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo que comprende de aproximadamente el 47 % molar a aproximadamente el 69 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 3 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

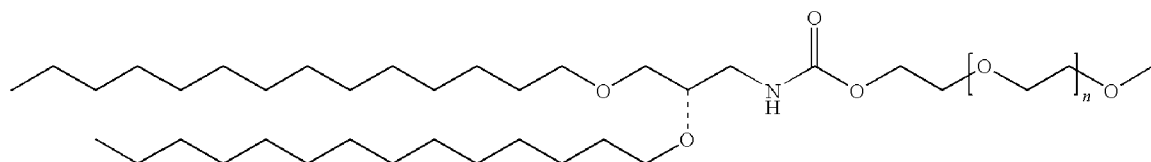
En una realización, el lípido no catiónico comprende una mezcla de colesterol y DSPC; el lípido conjugado es:



en donde n se selecciona de modo que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 2000 Da

en donde el lípido conjugado comprende aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el DSPC comprende aproximadamente el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol comprende aproximadamente el 48 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el compuesto o la sal comprende aproximadamente el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el lípido no catiónico comprende una mezcla de colesterol y DSPC; el lípido conjugado es:

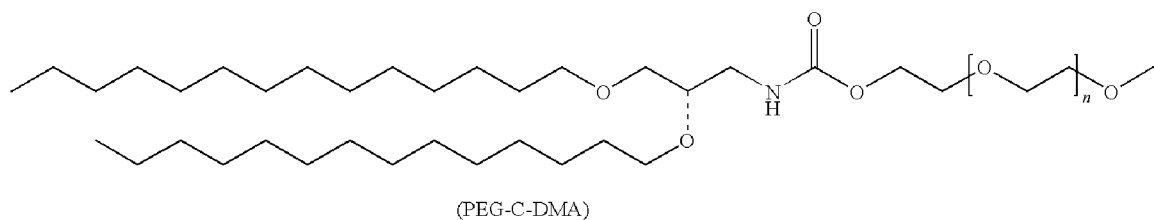


(PEG-C-DMA)

en donde n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 2000 Da;

en donde el lípido conjugado comprende aproximadamente el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el DSPC comprende aproximadamente el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol comprende aproximadamente el 48 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el compuesto o la sal comprende aproximadamente el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, el lípido no catiónico comprende una mezcla de colesterol y DSPC; el lípido conjugado es:



en donde n se selecciona para que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 2000;

en donde el lípido conjugado comprende aproximadamente el 1,6 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el DSPC comprende aproximadamente el 10,9 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol comprende aproximadamente el 32,8 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el compuesto o la sal comprende aproximadamente el 54,9 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En una realización, la proporción entre lípidos y ácidos nucleicos es de aproximadamente 24.

En una realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende dos o más compuestos diferentes de fórmula (I) o sales de la misma.

Lípidos no catiónicos

Los lípidos no catiónicos utilizados en las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) pueden ser cualquiera de una variedad de lípidos neutros no cargados, zwitteriónicos o aniónicos capaces de producir un complejo estable.

Algunos ejemplos no limitativos de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos tales como la lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoilfosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina y mezclas de los mismos. También pueden usarse otros fosfolípidos diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo de estos lípidos son preferentemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tienen cadenas de carbono C₁₀-C₂₄, p. ej., lauroílo, miristoílo, palmitoílo, estearoílo u olearioílo.

Algunos ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen esteroides tales como colesterol y derivados del mismo tales como colestanol, colestanona, colestenona, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietiléter, colesteryl-4'-hidroxibutiléter y mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (p. ej., NPL) comprende o consiste en colesterol o un derivado del mismo, p. ej., una formulación de partículas lipídicas sin fosfolípidos. En otras realizaciones, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (p. ej., NPL) comprende o consiste en uno o más fosfolípidos, p. ej., una formulación de partículas lipídicas sin colesterol. En realizaciones adicionales, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (p. ej., NPL) comprende o consiste en una mezcla de uno o más fosfolípidos y colesterol o un derivado del mismo.

Otros ejemplos de lípidos no catiónicos adecuados para usar en la presente invención incluyen lípidos que no contienen fósforo, tales como, p. ej., alcohol linoleílico, palmitato de acetilo, glicerolricinooleato, estereato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímeros acrílicos anfóteros, laurilsulfato de trietanolamina, amidas de ácidos grasos polietiloxilados de alquilsulfato de alquilo, ceramida, esfingomielina y similares.

En algunas realizaciones, el lípido no catiónico comprende de aproximadamente el 13 % molar a aproximadamente el 49,5 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 20 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 25 % molar a aproximadamente el 40 % molar o de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En determinadas realizaciones, el colesterol presente en las partículas lipídicas sin fosfolípidos comprende de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 45 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 45 % molar o de aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula lipídica sin fosfolípidos puede comprender colesterol en aproximadamente el 37 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En otras realizaciones determinadas, el colesterol presente en las partículas lipídicas que contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol comprende de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 40 % molar, de aproximadamente el 30 % molar a aproximadamente el 35 % molar o de aproximadamente el 35 % molar a aproximadamente el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula lipídica que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol en aproximadamente el 34 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como otros ejemplos no limitativos, la partícula puede comprender colesterol en un 33 % o en un 38,5 %.

En realizaciones adicionales, el colesterol presente en las partículas lipídicas que contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol comprende de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 25 % molar, o de aproximadamente el 17 % molar a aproximadamente el 23 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula lipídica que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol en aproximadamente el 20 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

En realizaciones en las que las partículas lipídicas contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol o un derivado del colesterol, la mezcla puede comprender hasta aproximadamente el 40, 45, 50, 55 o 60 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. En determinados casos, el componente fosfolipídico de la mezcla puede comprender de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 20 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 15 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 12 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 9 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 8 % molar, del 4 % molar a aproximadamente el 20 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 15 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 12 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 9 % molar, de aproximadamente el 4 % molar a aproximadamente el 8 % molar, del 6 % molar a aproximadamente el 20 % molar, de aproximadamente el 6 % molar a aproximadamente el 15 % molar, de aproximadamente el 6 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 6 % molar a aproximadamente el 9 % molar, de aproximadamente el 6 % molar a aproximadamente el 8 % molar, del 8 % molar a aproximadamente el 20 % molar, de aproximadamente el 8 % molar a aproximadamente el 15 % molar, de aproximadamente el 8 % molar a aproximadamente el 12 % molar, de aproximadamente el 8 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 8 % molar a aproximadamente el 9 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula lipídica que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC en aproximadamente el 7 % molar (es decir, en una mezcla con aproximadamente el 34 % molar de colesterol) del total de lípidos presentes en la partícula. En otros ejemplos determinados, el componente fosfolipídico de la mezcla puede comprender de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 30 % molar, de aproximadamente el 10 % molar a aproximadamente el 15 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 20 % molar, de aproximadamente el 15 % molar a aproximadamente el 25 % molar, o de aproximadamente el 17 % molar a aproximadamente el 23 % molar del total de lípidos presentes en la partícula. Como otro ejemplo no limitativo, una partícula lipídica que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC en aproximadamente el 20 % molar (es decir, en una mezcla con aproximadamente el 20 % molar de colesterol) del total de lípidos presentes en la partícula.

Conjugado lipídico

Además de lípidos catiónicos y no catiónicos, las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) comprenden un conjugado lipídico. El lípido conjugado es útil porque impide la agregación de partículas. Los lípidos conjugados adecuados incluyen, pero sin limitación, conjugados de PEG-lípido, conjugados de ATTN-lípido, conjugados de catiónico-polímero-lípido (CPL), POZ polioxazolina (POZ)-lípidos, polisarcosina (pSAR)-lípidos y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, las partículas comprenden un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTN-lípido junto con un CPL.

En una realización preferida, el conjugado lipídico es un PEG-lípido. Entre los ejemplos de PEG-lípidos se incluyen, pero sin limitación, PEG acoplado a dialquiloxypropilos (PEG-DAA) como se describe en, p. ej., la publicación PCT n.º WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) como se describe en, p. ej., las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 20030077829 y 2005008689, PEG acoplado a fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado a ceramidas como se describe en, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 5.885.613, PEG conjugado a colesterol o un derivado del mismo, y mezclas de los mismos. Los PEG-lípidos adicionales incluyen, sin limitación,

PEG-C-DOMG, 2 KPEG-DMG, y una mezcla de los mismos. El PEG es polímero hidrosoluble lineal de unidades repetitivas de etilenglicol. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, el PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 Da, y el PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5000 Da. Los PEG son comercializados por Sigma Chemical Co. y otras empresas e incluyen, por ejemplo, los siguientes: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidilsuccinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES) y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM). Otros PEG tales como los descritos en las patentes de EE. UU. n.º 6.774.180 y 7.053.150 (es decir, mPEG (20 KDa) amina) también son útiles para preparar los conjugados de PEG-lípido de la presente invención. Además, el ácido monometoxipolietilenglicolacético (MePEG-CH₂COOH) es particularmente útil para preparar conjugados de PEG-lípido que incluyen, p. ej., conjugados de PEG-DAA.

La fracción de PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en el presente documento puede comprender un peso molecular promedio de aproximadamente 550 Da a aproximadamente 10.000 Da. En determinados casos, la fracción de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 5000 Da (p. ej., de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 5000 Da, de aproximadamente 1500 Da a aproximadamente 3000 Da, de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 3000 Da, de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 2000 Da, etc.). En realizaciones preferidas, la fracción de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 Da o de aproximadamente 750 Da.

En determinados casos, el PEG puede estar opcionalmente sustituido por un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG puede conjugarse directamente con el lípido o puede unirse al lípido mediante una fracción conectora. Puede usarse cualquier fracción de enlace adecuada para acoplar el PEG a un lípido, incluido, p. ej., fracciones conectoras que no contengan ésteres y fracciones conectoras que contienen ésteres. En una realización preferida, la fracción conectora es una fracción conectora que no contiene éster. Como se usa en el presente documento, la expresión "fracción conectora que no contiene éster" se refiere a una fracción conectora que no contiene un enlace de éster carboxílico (—OC(O)—). Las fracciones conectoras que no contienen éster adecuadas incluyen, pero sin limitación, amido (—C(O)NH—), amino (—NR—), carbonilo (—C(O)—), carbamato (—NHC(O)O—), urea (—NHC(O)NH—), disulfuro (—S—S—), éter (—O—), succinilo (—(O)CCH₂CH₂C(O)—), succinamidilo (—NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH—), éter, disulfuro, así como combinaciones de los mismos (tales como un conector que contiene tanto una fracción conectora de carbamato como una fracción conectora de amido). En una realización preferida, se utiliza un conector de carbamato para acoplar el PEG al lípido.

En otras realizaciones, se utiliza una fracción conectora que contiene éster para acoplar el PEG al lípido. Entre las fracciones conectoras que contienen éster se incluyen, p. ej., carbonato (—OC(O)O—), succinóilo, ésteres de fosfato (—O—(O)POH—O—), ésteres de sulfonato y combinaciones de los mismos.

Los conjugados de PEG-lípido adicionales adecuados para usar en la invención incluyen, pero sin limitación, compuestos de fórmula:



o una sal del mismo, en donde:

A es alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alquenilo (C₂-C₆), alquinilo (C₂-C₆), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxicarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) o alcanoiloxi (C₂-C₆), en donde cualquier alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alquenilo (C₂-C₆), alquinilo (C₂-C₆), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxicarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) y alcanoiloxi (C₂-C₆) está sustituido con uno o más grupos precursores aniónicos, y en donde cualquier alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alquenilo (C₂-C₆), alquinilo (C₂-C₆), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxicarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) y alcanoiloxi (C₂-C₆) está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alcoxi (C₁-C₃), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxicarbonilo (C₁-C₃), alquiltio (C₁-C₃) o alcanoiloxi (C₂-C₃);

B es una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 550 Da a aproximadamente 10.000 Da;

C es -L-R^a;

L se selecciona del grupo que consiste en un enlace directo, -C(O)O-, -C(O)NR^b-, -NR^b-, -C(O)-, -NR^bC(O)O-, -NR^bC(O)NR^b-, -S-S-, -O-, -(O)CCH₂CH₂C(O)- y -NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-;

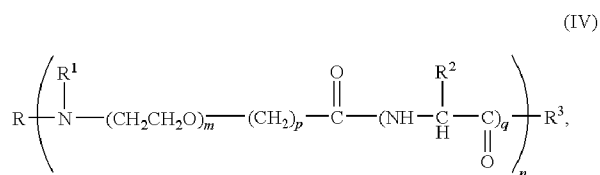
R^a es un alquilo (C₁₀-C₅₀) ramificado o un alquenilo (C₁₀-C₅₀) ramificado, en donde uno o más átomos de carbono del alquilo (C₁₀-C₅₀) ramificado o del alquenilo (C₁₀-C₅₀) ramificado se han remplazado por -O-; y

cada R^b es independientemente H o alquilo (C₁-C₆).

Los lípidos conjugados pueden comprender un PEG-lípido incluido, p. ej., un compuesto de fórmula A-PEG-diacilglicerol (DAG), A-PEG-dialquiloioxipropilo (DAA), A-PEG-fosfolípido, A-PEG-ceramida (Cer) o mezclas de los mismos, en donde A es alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alquenilo (C₂-C₆), alquinilo (C₂-C₆), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) o alcanoiloxi (C₂-C₆), en donde cualquier alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alquenilo (C₂-C₆), alquinilo (C₂-C₆), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) y alcanoiloxi (C₂-C₆) está sustituido con uno o más grupos precursores aniónicos, y en donde cualquier alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₈), cicloalquil (C₃-C₈)-alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), alquenilo (C₂-C₆), alquinilo (C₂-C₆), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₆), alquiltio (C₁-C₆) y alcanoiloxi (C₂-C₆) está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alcoxi (C₁-C₃), alcanoílo (C₁-C₆), alcoxycarbonilo (C₁-C₃), alquiltio (C₁-C₃) o alcanoiloxi (C₂-C₃). El conjugado A-PEG-DAA puede ser A-PEG-dilauriloioxipropilo (C12), A-PEG-dimiristiloioxipropilo (C14), A-PEG-dipalmitiloioxipropilo (C16) o A-PEG-disteariloioxipropilo (C18), o mezclas de los mismos.

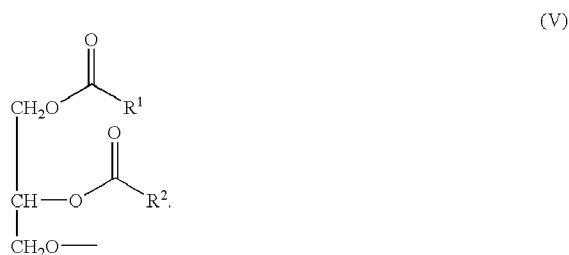
Las fosfatidiletanolaminas que tienen una variedad de grupos de cadenas acilo de diferentes longitudes de cadena y grados de saturación pueden conjugarse con PEG para formar el conjugado lipídico. Dichas fosfatidiletanolaminas están disponibles en el mercado o pueden aislarse o sintetizarse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Se prefieren las fosfatidiletanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. También pueden usarse fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos mono- o diinsaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Las fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, pero sin limitación, dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE).

Los términos "ATTR" o "poliamida" hacen referencia a, sin limitación, los compuestos descritos en las patentes de EE. UU. n.º 6.320.017 y 6.586.559. Estos compuestos incluyen un compuesto que tiene la fórmula:



en donde R es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y acilo; R¹ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo; u, opcionalmente, R y R¹, y el nitrógeno al que están unidos forman una molécula de azido; R² es un miembro del grupo seleccionado entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y una cadena lateral de un aminoácido; R³ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en H, halógeno, hidroxilo, alcoxi, mercapto, hidrazino, amino y NR⁴R⁵, en donde R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno o alquilo; n es de 4 a 80; m es de 2 a 6; p es de 1 a 4; y q es 0 o 1. Será evidente para los expertos en la materia que pueden usarse otras poliamidas en los compuestos de la presente invención.

El término "diacilglicerol" se refiere a un compuesto que tiene 2 cadenas de acilo graso, R¹ y R², ambas de las cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos enlazados a las posiciones 1 y 2 del glicerol mediante enlaces éster. Los grupos acilo pueden estar saturados o tener diversos grados de insaturación. Los grupos acilo adecuados incluyen, pero sin limitación, laurilo (C₁₂), miristilo (C₁₄), palmito (C₁₆), estearilo (C₁₈) e icosilo (C₂₀). En realizaciones preferidas, R¹ y R² son iguales, es decir, R¹ y R² son ambos miristilo (es decir, dimiristilo), R¹ y R² son ambos estearilo (es decir, distearilo), etc. Los diacilgliceroles tienen la siguiente fórmula general:



El término "dialquiloioxipropilo" se refiere a un compuesto que tiene 2 cadenas de alquilo, R¹ y R², ambas de las cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos. Los grupos alquilo pueden estar saturados o tener diversos grados de insaturación. Los dialquiloioxipropilos tienen la siguiente fórmula general:



En una realización preferida, el PEG-lípido es un conjugado de PEG-DAA que tiene la fórmula siguiente:

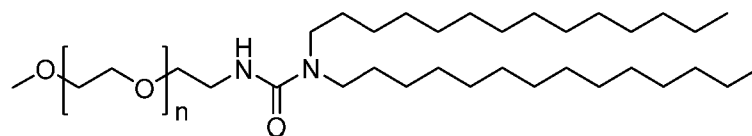


en donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 átomos de carbono; PEG es un polietilenglicol; y L es una fracción conectora que no contiene éster o una fracción conectora que contiene éster, como se ha descrito anteriormente. Los grupos alquilo de cadena larga pueden ser saturados o insaturados. Los grupos alquilo adecuados incluyen, pero sin limitación, laurilo (C_{12}), miristilo (C_{14}), palmito (C_{16}), estearilo (C_{18}) e icosilo (C_{20}). En realizaciones preferidas, R^1 y R^2 son iguales, es decir, R^1 y R^2 son ambos miristilo (es decir, dimiristilo), R^1 y R^2 son ambos estearilo (es decir, distearilo), etc.

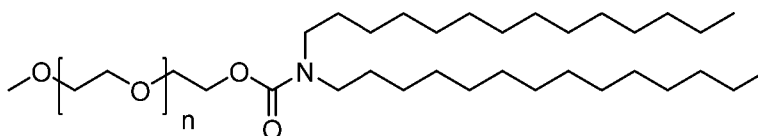
En la Fórmula VII anterior, el PEG tiene un peso molecular promedio que es de aproximadamente 550 Da a aproximadamente 10.000 Da. En determinados casos, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 5.000 Da (p. ej., de aproximadamente 1000 Da a aproximadamente 5000 Da, de aproximadamente 1500 Da a aproximadamente 3000 Da, de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 3000 Da, de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 2000 Da, etc.). En realizaciones preferidas, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 Da o de aproximadamente 750 Da. El PEG puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, acilo o arilo. En determinadas realizaciones, el grupo hidroxilo terminal está sustituido por un grupo metoxi o metilo.

En una realización preferida, "L" es una fracción conectora que no contiene éster. Los conectores adecuados que no contienen éster incluyen, pero sin limitación, una fracción conectora amido, una fracción conectora amino, una fracción conectora carbonilo, una fracción conectora carbamato, una fracción conectora urea, una fracción conectora éter, una fracción conectora disulfuro, una fracción conectora succinamidilo y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la fracción conectora que no contiene éster es una fracción conectora carbamato (es decir, un conjugado de PEG-C-DAA). En otra realización preferida, la fracción conectora que no contiene éster es una fracción conectora amido (es decir, un conjugado de PEG-A-DAA). En otra realización preferida adicional, la fracción conectora que no contiene éster es una fracción conectora succinamidilo (es decir, un conjugado de PEG-S-DAA).

En realizaciones particulares, el conjugado de PEG-lípido se selecciona entre:



metoxi PEG 1,1-ditetradecilurea



Metoxi PEG ditetradecilcarbamato

En una realización, n se selecciona de modo que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de aproximadamente 2000.

Los conjugados de PEG-DAA se sintetizan utilizando técnicas y reactivos estándar conocidos por los expertos en la materia. Se reconocerá que los conjugados de PEG-DAA contendrán varios enlaces amida, amina, éter, tio, carbamato y urea. Los expertos en la materia reconocerán que los métodos y reactivos para formar estos enlaces son bien conocidos y están fácilmente disponibles. Véase, p. ej., March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); y Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5ª ed. (Longman 1989). También se apreciará que cualquiera de los grupos funcionales presentes puede requerir protección y desprotección en diferentes puntos de la síntesis de los conjugados de PEG-DAA. Los expertos en la materia reconocerán que dichas técnicas son bien conocidas. Véase, p. ej., Green y Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991).

Preferentemente, el conjugado de PEG-DAA es un conjugado de dilauriloxipropil (C₁₂)-PEG, conjugado de dimiristoloxipropil (C₁₄)-PEG, un conjugado dipalmitiloxipropil (C₁₆)-PEG o un conjugado disteariloxipropil (C₁₈)-PEG. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que pueden usarse otros dialquiloxipropilos en los conjugados de PEG-DAA de la presente invención.

Además de lo anterior, para los expertos en la materia será evidente que pueden utilizarse otros polímeros hidrófilos en lugar de PEG. Entre los ejemplos de polímeros adecuados que pueden usarse en lugar de PEG se incluyen, pero sin limitación, polivinilpirrolidona, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida y polidimetacrilamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y celulosas derivadas como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

Las cargas de las moléculas policatiónicas pueden distribuirse alrededor de toda la molécula de la partícula, o como alternativa, pueden ser una concentración discreta de densidad de carga en una zona en particular de la partícula, p. ej., un pico de carga. Si la densidad de carga está distribuida en la partícula, la densidad de carga puede estar distribuida de forma equitativa o desigual. La presente invención abarca todas las variaciones de distribución de la carga de la fracción policatiónica.

En determinados casos, la fracción policatiónica puede tener un ligando unido, tal como un ligando diana o una fracción quelante para la formación de complejos de calcio. Preferentemente, después de fijar el ligando, la fracción catiónica mantiene una carga positiva. En determinados casos, el ligando que está unido tiene una carga positiva. Los ligandos adecuados incluyen, pero sin limitación, un compuesto o dispositivo con un grupo funcional reactivo e incluye lípidos, lípidos anfipáticos, compuestos portadores, compuestos de bioafinidad, biomateriales, biopolímeros, dispositivos biomédicos, compuestos detectables analíticamente, compuestos activos desde el punto de vista terapéutico, enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos, inmunoestimulantes, radiomarcadores, fluorógenos, biotina, fármacos, haptenos, ADN, ARN, polisacáridos, liposomas, virosomas, micelas, inmunoglobulinas, grupos funcionales, otras fracciones de direccionamiento o toxinas.

El conjugado lipídico (p. ej., PEG-lípido) comprende normalmente de aproximadamente el 0,1 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 0,5 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 10 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 8 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 5 % molar, de aproximadamente el 2 % molar a aproximadamente el 4 % molar, de aproximadamente el 0,6 % molar a aproximadamente el 1,9 % molar, de aproximadamente el 0,7 % molar a aproximadamente el 1,8 % molar, de aproximadamente el 0,8 % molar a aproximadamente el 1,7 % molar, de aproximadamente el 0,9 % molar a aproximadamente el 1,6 % molar, de aproximadamente el 0,9 % molar a aproximadamente el 1,8 % molar, de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 1,8 % molar, de aproximadamente el 1 % molar a aproximadamente el 1,7 % molar, de aproximadamente el 1,2 % molar a aproximadamente el 1,8 % molar, de aproximadamente el 1,2 % molar a aproximadamente el 1,7 % molar, de aproximadamente el 1,7 % molar, de aproximadamente el 1,3 % molar a aproximadamente el 1,6 % molar o de aproximadamente el 1,4 % molar a aproximadamente el 1,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula.

Un experto habitual en la materia se dará cuenta de que la concentración del conjugado lipídico puede variar en función del conjugado lipídico empleado y de la velocidad a la que la partícula lipídica con ácido nucleico debe volverse fusogénica.

Controlando la composición y la concentración del conjugado lipídico, se puede controlar la velocidad a la que el conjugado lipídico se intercambia fuera de la partícula lipídica con ácido nucleico y, a su vez, la velocidad a la que la partícula lipídica con ácido nucleico se vuelve fusogénica. Por ejemplo, cuando se utiliza un conjugado de PEG-fosfatidiletanolamina o un conjugado de PEG-ceramida como conjugado lipídico, se puede variar la velocidad a la que la partícula lipídica con ácido nucleico se vuelve fusogénica, por ejemplo, variando la concentración del conjugado lipídico, variando el peso molecular del PEG, o variando la longitud de la cadena y el grado de saturación de los grupos de la cadena acilo en la fosfatidiletanolamina o la ceramida. Además, otras variables incluidas, por ejemplo, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. pueden usarse para variar y/o controlar la velocidad a la que la partícula lipídica con ácido nucleico se vuelve fusogénica. Otros métodos que pueden usarse para controlar la velocidad a la que la partícula lipídica con ácido nucleico se hace fusogénica resultarán evidentes para los expertos en la materia con la lectura de

esta divulgación.

Preparación de partículas lipídicas

- 5 Las partículas lipídicas de la presente invención, p. ej., las NPL, en las que un agente activo o terapéutico, tal como una molécula de ácido nucleico, se encapsula en una bicapa lipídica y se protege de la degradación, pueden formarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluido, pero sin limitación, un método de mezcla continua o un proceso de dilución directa.
- 10 En realizaciones preferidas, los lípidos no catiónicos son la esfingomielina de huevo (ESM), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), monometilfosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, PE (1,2-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE)) 14:0, PE (1,2-dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE)) 16:0, PE (1,2-distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE)) 18:0, PE (1,2-dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)) 18:1, trans PE (1,2-dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE)) 18:1, PE (1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE)) 18:0-18:1, PE (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE)) 16:0-18:1, polímeros a base de polietilenglicol (p. ej., PEG 2000, PEG 5000, diacilglicerol modificados con PEG o dialquioxipropilos modificados con PEG), colesterol o combinaciones de los mismos.

- 20 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona una NPL producida mediante un método de mezcla continua, p. ej., un proceso que incluye proporcionar una solución acuosa que comprende un ácido nucleico, tal como un ARN de interferencia o ARNm, en un primer depósito, proporcionar una solución lipídica orgánica en un segundo depósito, y mezclar la solución acuosa con la solución lipídica orgánica de tal manera que la solución lipídica orgánica se mezcle con la solución acuosa para producir de forma sustancialmente instantánea un liposoma que encapsule el ácido nucleico (p. ej., ARN de interferencia o ARNm). Este proceso y el aparato para llevarlo a cabo se describen detalladamente en la patente de EE. UU. n.º de publicación 20040142025.

- 30 La acción de introducir continuamente soluciones lipídicas y tampón en un medio de mezcla, tal como en una cámara de mezcla, provoca una dilución continua de la solución lipídica con la solución tampón, produciendo de este modo un liposoma sustancialmente instantáneo al mezclarse. Como se usa en el presente documento, la expresión "diluir continuamente una solución lipídica con una solución tampón" (y variaciones) generalmente significa que la solución lipídica se diluye suficientemente rápido en un proceso de hidratación con fuerza suficiente para efectuar la generación de vesículas. Al mezclar la solución acuosa que comprende un ácido nucleico con la solución lipídica orgánica, la solución lipídica orgánica se somete a una dilución escalonada continua en presencia de la solución tampón (es decir, la solución acuosa) para producir una partícula lipídica con ácido nucleico.

- 35 Las NPL formadas mediante el método de mezcla continua tienen normalmente un tamaño de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm. Las partículas así formadas no se agregan y, opcionalmente, se calibran para conseguir un tamaño de partícula uniforme.

- 45 En otra realización, la presente invención proporciona NPL producidas mediante un proceso de dilución directa que incluye la formación de una solución de liposomas y la introducción inmediata y directa de la solución de liposomas en un recipiente de recogida que contiene una cantidad controlada de tampón de dilución. En aspectos preferidos, el recipiente de recogida incluye uno o más elementos configurados para agitar el contenido del recipiente de recogida para facilitar la dilución. En un aspecto, la cantidad de tampón de dilución presente en el recipiente de recogida es sustancialmente igual al volumen de solución de liposomas introducido en el mismo. Como ejemplo no limitativo, una solución de liposomas en etanol al 45 %, cuando se introduce en el recipiente de recogida que contiene un volumen igual de tampón de dilución, producirá ventajosamente partículas más pequeñas.

- 50 En otra realización más, la presente invención proporciona una NPL producida mediante un proceso de dilución directa en el que un tercer depósito que contiene tampón de dilución está acoplado fluidamente a una segunda región de mezcla. En esta realización, la solución de liposomas formada en una primera región de mezcla se mezcla inmediata y directamente con tampón de dilución en la segunda región de mezcla. En aspectos preferidos, la segunda región de mezcla incluye un conector en T dispuesto de forma que los flujos de la solución liposomal y del tampón de dilución se encuentren como flujos opuestos de 180°; sin embargo, pueden utilizarse conectores que proporcionen ángulos menos pronunciados, p. ej., de aproximadamente 27° a aproximadamente 180°. Un mecanismo de bombeo suministra un flujo controlable de tampón a la segunda región de mezcla. En un aspecto, el caudal del tampón de dilución suministrado a la segunda región de mezcla se controla para que sea sustancialmente igual al caudal de la solución liposomal introducida en la misma desde la primera región de mezcla. En otro aspecto, el caudal del tampón de dilución suministrado a la segunda región de mezcla se controla para que sea sustancialmente distinto al caudal de la solución liposomal introducida en la misma desde la primera región de mezcla. Esta realización permite ventajosamente un mayor control del flujo del tampón de dilución que se mezcla con la solución liposomal en la segunda región de mezcla, y por tanto también de la concentración de la solución liposomal en el tampón a lo largo del segundo proceso de mezcla. Tal control del caudal del tampón de dilución permite ventajosamente la formación de partículas de pequeño

tamaño a concentraciones reducidas.

Estos procesos y los aparatos para llevar a cabo estos procesos de dilución directa se describen detalladamente en la patente de EE. UU. n.º de publicación 20070042031.

Las NPL formadas mediante el proceso de dilución directa tienen normalmente un tamaño de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm. Las partículas así formadas no se agregan y, opcionalmente, se calibran para conseguir un tamaño de partícula uniforme.

En caso necesario, las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) pueden dimensionarse mediante cualquiera de los métodos disponibles para dimensionar liposomas. El calibrado puede realizarse para conseguir un intervalo de tamaños deseado y una distribución relativamente estrecha de los tamaños de las partículas.

Existen varias técnicas para dimensionar las partículas al tamaño deseado. Un método de dimensionamiento, utilizado para los liposomas e igualmente aplicable a las presentes partículas, se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.737.323. El tratamiento de ultrasonidos de una suspensión de partículas ya sea por ultrasonidos en baño o por ultrasonidos con sonda, produce una reducción progresiva del tamaño hasta partículas de menos de aproximadamente 50 nm de tamaño. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizalla para fragmentar las partículas más grandes en otras más pequeñas. En un procedimiento típico de homogeneización, las partículas se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de partícula seleccionados, habitualmente de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 80 nm. En ambos métodos, la distribución del tamaño de las partículas puede controlarse mediante la discriminación convencional del tamaño de las partículas por rayo láser o QELS.

La extrusión de las partículas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica es también un método eficaz para reducir el tamaño de las partículas a una distribución de tamaños relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión se hace pasar cíclicamente a través de la membrana una o más veces hasta conseguir la distribución de tamaño de partícula deseada. Las partículas pueden extruirse a través de membranas de poros sucesivamente menores, para conseguir una reducción gradual del tamaño.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos en la NPL se precondensan como se describe en, p. ej., la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 09H44,103.

En otras realizaciones, los métodos comprenderán además la adición de policationes no lipídicos que son útiles para efectuar la lipofección de células usando las presentes composiciones. Entre los ejemplos de policationes no lipídicos adecuados se incluyen, bromuro de hexadimetrina (comercializado bajo la marca POLYBRENE®, de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis., EE. UU.) u otras sales de hexadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-omitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, la poli-D-lisina, polialilamina y polietilenimina. La adición de estas sales es preferentemente posterior a la formación de las partículas.

En algunas realizaciones, las proporciones entre ácidos nucleicos y lípidos (proporciones de masa/masa) en una NPL formada serán de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08. La proporción de los materiales de partida también está dentro de este intervalo. En otras realizaciones, la preparación de NPL usa aproximadamente 400 µg de ácido nucleico por cada 10 mg de lípido total o una proporción en masa del ácido nucleico con respecto al lípido de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08 y, más preferentemente, aproximadamente 0,04, que corresponde a 1,25 mg de lípido total por cada 50 µg de ácido nucleico. En otras realizaciones preferidas, la partícula tiene una proporción en masa de ácido nucleico:lípido de aproximadamente 0,08.

En otras realizaciones, las proporciones del lípido con respecto al ácido nucleico (proporciones masa/masa) en una NPL formada variarán de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 20 (20:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 15 (15:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 10 (10:1), de aproximadamente 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), 25 (25:1), 26 (26:1), 27 (27:1), 28 (28:1), 29 (29:1) o 30 (30:1). La proporción de los materiales de partida también suele estar dentro de este intervalo.

Como se ha analizado anteriormente, el lípido conjugado puede incluir además un CPL. En el presente documento se

consideran diversos métodos generales para fabricar CPL de NPL (CPL que contienen NPL). Dos técnicas generales incluyen la técnica "posterior a la inserción", es decir, inserción de un CPL en, por ejemplo, una NPL preformada, y la técnica "convencional", en donde el CPL se incluye en la mezcla lipídica durante, por ejemplo, las etapas de formación de la NPL. La técnica posterior a la inserción da como resultado NPL que tiene CPL principalmente en la cara externa de la membrana bicapa de la NPL, mientras que las técnicas convencionales proporcionan NPL que tienen CPL en las caras interna y externa. El método es especialmente útil para vesículas hechas de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y también para vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAA y PEG-DAG). Los métodos de elaboración de NPL-CPL, se enseñan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.705.385; 6.586.410; 5.981.501; 6.534.484; y 6.852.334; la publicación de patente de EE. UU. n.º 20020072121; y la publicación PCT n.º WO 00/62813.

Se pueden encontrar otros métodos para generar NPL, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 9.005.654 y PCT n.º de publicación WO 200H012191.

Kits

La presente invención también proporciona partículas lipídicas (p. ej., NPL) en forma de kit. El kit puede comprender un recipiente compartimentado para contener los distintos elementos de las partículas lipídicas (p. ej., los agentes activos o terapéuticos como los ácidos nucleicos y los componentes lipídicos individuales de las partículas). En algunas realizaciones, el kit puede comprender además un desestabilizador de la membrana endosomal (p. ej., iones de calcio). El kit contiene normalmente las composiciones de partículas lipídicas de la presente invención, preferentemente en forma deshidratada, con instrucciones para su rehidratación y administración.

Como se explica en el presente documento, las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) pueden adaptarse para dirigirse preferentemente a tejidos concretos, órganos o tumores de interés. En determinados casos, el direccionamiento preferido de partículas lipídicas tales como las NPL puede llevarse a cabo controlando la composición de la propia partícula. Por ejemplo, como se establece en el Ejemplo 11, se ha descubierto que la formulación PEG-cDSA 1:57 de NPL puede usarse para atacar preferentemente tumores fuera del hígado, mientras que la formulación PEG-cDMA 1:57 de NPL puede utilizarse para dirigirse preferentemente al hígado (incluidos los tumores hepáticos).

En otros ejemplos determinados, puede ser deseable tener una fracción diana unida a la superficie de la partícula lipídica para mejorar aún más la diana de la partícula. Los métodos de fijación de moléculas diana (p. ej., anticuerpos, proteínas, etc.) a los lípidos (tal como los utilizados en las presentes partículas) son conocidos por los expertos en la materia.

Administración de partículas lipídicas

Una vez formadas, las partículas lipídicas de la invención (p. ej. NPL) son útiles para introducir agentes activos o terapéuticos (p. ej., ácidos nucleicos, tales como ARN de interferencia o ARNm) en las células. Por consiguiente, la presente invención también encuentra uso en métodos para introducir un agente activo o terapéutico tal como un ácido nucleico (p. ej., ARN de interferencia o ARNm) en una célula. Los métodos se llevan a cabo *in vitro* o *in vivo* formando primero las partículas como se ha descrito anteriormente y poniéndolas, a continuación, en contacto con las células durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la administración del agente activo o terapéutico a las células.

Las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) pueden adsorberse a casi cualquier tipo de célula con la que se mezclen o entren en contacto. Una vez adsorbidas, las partículas pueden ser endocitadas por una parte de las células, intercambiar lípidos con las membranas celulares o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la porción de agente activo o terapéutico (p. ej., ácido nucleico) de la partícula puede tener lugar a través de cualquiera de estas vías. En particular, cuando se produce la fusión, la membrana de la partícula se integra en la membrana celular y el contenido de la partícula se combina con el fluido intracelular.

Las partículas lipídicas de la invención (p. ej., NPL) pueden administrarse solas o en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina fisiológica o tampón fosfato) seleccionado de acuerdo con la vía de administración y la práctica farmacéutica habitual. Generalmente, se empleará solución salina normal tamponada (p. ej., NaCl 135-150 mM) como soporte farmacéuticamente aceptable. Otros soportes adecuados incluyen, p. ej., agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3 % y similares, incluidas las glicoproteínas para mejorar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Otros portadores adecuados se describen en, p. ej., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17.^a ed. (1985). Como se usa en el presente documento, "portador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes de retraso de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones alérgicas o reacciones adversas similares cuando se administran a un ser humano.

El portador farmacéuticamente aceptable se añade generalmente tras la formación de las partículas. Por tanto, una vez formada la partícula, la partícula puede diluirse en portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina normal tamponada.

- 5 La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas puede variar mucho, es decir, de menos de aproximadamente el 0,05 %, normalmente del 0 al menos aproximadamente del 2 al 5 %, hasta aproximadamente del 10 al 90 % en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para reducir la carga de fluidos asociada al tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia
- 10 cardíaca congestiva asociada a aterosclerosis o hipertensión grave. Como alternativa, las partículas compuestas de lípidos irritantes pueden diluirse a bajas concentraciones para disminuir la inflamación en el lugar de administración.

- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones acuosas pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones
- 15 asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tampones, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro potásico y cloruro cálcico. De manera adicional, la suspensión de partículas puede incluir agentes protectores de lípidos que
- 20 protegen a los lípidos de los daños provocados por los radicales libres y los lípidos-peróxidos durante el almacenamiento. Los tampones lipófilos de radicales libres, tales como el alfatocoferol y los quelantes hidrosolubles específicos del hierro, tales como la ferrioxamina, son adecuados.

Administración *in vivo*

- 25 La administración sistémica para terapia *in vivo*, p. ej., la administración de un ácido nucleico terapéutico a una célula diana distal a través de sistemas corporales tales como el aparato circulatorio, se ha logrado utilizando partículas de lípido con ácido nucleico tales como las descritas en la publicación PCT n.º WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152 y WO 04/002453. La presente invención también proporciona partículas lipídicas totalmente encapsuladas
- 30 que protegen el ácido nucleico de la degradación por nucleasas en el suero, no son inmunogénicas, son de pequeño tamaño y son adecuadas para dosis repetidas.

- Para la administración *in vivo*, la administración puede ser de cualquier forma conocida en la técnica, p. ej., mediante inyección, administración oral, inhalación (p. ej., intranasal o intratraqueal), aplicación transdérmica o administración
- 35 rectal. La administración se puede realizar mediante dosis únicas o divididas. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral, es decir, por vía intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en bolo (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.286.634). La administración intracelular de ácidos nucleicos también se ha considerado en Straubinger *et al.*, *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino *et al.*, *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); and Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993). También se describen otros métodos de administración de fármacos lipídicos en, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 3.993.754; 4.145.410; 4.235.871; 4.224.179; 4.522.803; y 4.588.578. Las partículas lipídicas pueden administrarse mediante inyección directa en el lugar de la enfermedad o mediante inyección en un lugar distal del lugar de la enfermedad (véase, p. ej., Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, Nueva York. pág. 70-71 (1994)).
- 45

- Las composiciones de la presente invención, bien solas o junto con otros componentes adecuados, pueden convertirse en formulaciones en aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para su administración por vía inhalatoria (p. ej., intranasal o intratraqueal) (véase, Brigham *et al.*, *Am. J. Sci.*, 298:278 (1989)). Las formulaciones de aerosol pueden
- 50 colocarse en propulsores aceptables a presión, tal como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

- En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante pulverizaciones intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración de aerosoles. Se han descrito métodos para administrar composiciones de ácido nucleico directamente a los pulmones mediante aerosoles nasales, p. ej., en las patentes de
- 55 EE. UU. n.º 5.756.353 y 5.804.212. De manera análoga, la administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente de los Estados Unidos n.º 5.725.871) también es bien conocida en la técnica farmacéutica. De manera similar, la administración transmucosa de fármacos en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.780.045.

- 60 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas, isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.
- 65 En la práctica de la presente invención, se administran preferentemente las composiciones, por ejemplo, mediante infusión intravenosa, o por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal.

Generalmente, cuando se administra por vía intravenosa, las formulaciones de partículas lipídicas se formulan con un portador farmacéutico adecuado. Se pueden emplear muchos portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones y métodos de la presente invención. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17.^a ed. (1985). Se puede usar una diversidad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3 % y similares, y pueden incluir glicoproteínas para mejorar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Generalmente, se empleará solución salina normal tamponada (NaCl 135-150 mM) como portador farmacéuticamente aceptable, pero bastará con otros portadores adecuados. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización liposomal convencionales, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tampones, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante las técnicas mencionadas anteriormente o, como alternativa, pueden producirse en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para usar o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración.

En determinadas aplicaciones, las partículas lipídicas divulgadas en el presente documento pueden administrarse al individuo por vía oral. Las partículas pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, píldoras, pastillas para chupar, elixires, enjuagues bucales, suspensiones, pulverizaciones orales, jarabes, obleas y similares (véanse, p. ej., las patentes de EE. UU. n.º 5.641.515, 5.580.579, 5.792.451). Estas formas farmacéuticas orales también pueden contener lo siguiente: aglutinantes, gelatina; excipientes, lubricantes y/o aromatizantes. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, esta puede contener, además de los materiales descritos anteriormente, un portador líquido. Puede haber otros diversos materiales como recubrimientos o de otro modo para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material que se utilice para preparar cualquier forma farmacéutica unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas.

Normalmente, estas formulaciones orales pueden contener al menos aproximadamente el 0,1 % de las partículas lipídicas o más, aunque el porcentaje de las partículas puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 1 % o el 2 % y aproximadamente el 60 % o el 70 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de partículas en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, la semivida biológica, la vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por un experto en la materia de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y como tales, pueden ser deseables una diversidad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz de un agente terapéutico envasado como un ácido nucleico (p. ej., ARN de interferencia o ARNm) suspendido en diluyentes tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, sobrecitos o comprimidos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente terapéutico tal como un ácido nucleico (p. ej., ARN de interferencia o ARNm), como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas en comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, materiales de relleno, aglutinantes, diluyentes, agentes tampón, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, tintes, agentes disgregantes y portadores farmacéuticamente compatibles. Las pastillas para chupar pueden comprender un agente terapéutico tal como un ácido nucleico (p. ej., ARN de interferencia o ARNm) en un aromatizante, p. ej., sacarosa, así como pastillas que comprenden el agente terapéutico en una base inerte, tales como emulsiones de gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga, geles y similares que contienen, además del principio activo, portadores conocidos en la técnica.

En otro ejemplo de su uso, las partículas lipídicas pueden incorporarse a una amplia selección de formas farmacéuticas tópicas. Por ejemplo, una suspensión que contenga partículas lipídicas con ácido nucleico tales como NPL puede formularse y administrarse en forma de geles, aceites, emulsiones, cremas tópicas, pastas, pomadas, lociones, espumas, mousses y similares.

Al preparar los preparados farmacéuticos de las partículas lipídicas de la invención, se prefiere utilizar cantidades de las partículas que hayan sido purificadas para reducir o eliminar partículas vacías o partículas con agentes terapéuticos tales como ácido nucleico asociado a la superficie externa.

Los métodos pueden practicarse en diversos hospedadores. Los hospedadores preferidos incluyen especies de mamíferos, tal como los primates (p. ej., seres humanos y chimpancés, así como otros primates no humanos), cánidos,

felinos, equinos, bóvidos, ovinos, caprinos, roedores (p. ej., ratas y ratones), lagomorfos y cerdos.

La cantidad de partículas administradas dependerá de la proporción entre el agente terapéutico (p. ej., ácido nucleico) y el lípido, el agente terapéutico en particular (p. ej., ácido nucleico) usado, la enfermedad o trastorno tratado, la edad, el peso y estado del paciente, y el criterio del facultativo, pero generalmente está entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 10^8 - 10^{10} partículas por administración (por ej., inyección).

10 Administración *in vitro*

Para las aplicaciones *in vitro*, la administración de agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos (p. ej., ARN de interferencia o ARNm) puede realizarse a cualquier célula cultivada, ya sea de origen vegetal o animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas, las células son células animales, más preferentemente células de mamífero, y lo más preferentemente células humanas.

La puesta en contacto entre las células y las partículas lipídicas, cuando se realiza *in vitro*, tiene lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de partículas varía mucho en función de la aplicación concreta, pero generalmente es de entre aproximadamente 1 μ mol y aproximadamente 10 mmol. El tratamiento de las células con las partículas lipídicas se lleva a cabo generalmente a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37 °C.) durante períodos de tiempo de aproximadamente 1 a 48 horas, preferentemente de aproximadamente 2 a 4 horas.

En un grupo de realizaciones preferidas, se añade una suspensión de partículas lipídicas a un 60-80 % de células en placas confluentes que tiene una densidad celular de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/ml, más preferentemente aproximadamente 2×10^4 células/ml. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferentemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 μ g/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,1 μ g/ml.

Usando un ensayo de parámetro de liberación endosomal (ERP, *Endosomal Release Parameter*), se puede optimizar la eficacia de administración de la NPL u otra partícula lipídica de la invención. Un ensayo de ERP se describe detalladamente en la patente de EE. UU. n.º de publicación 20030077829. Más en particular, el propósito de un ensayo de ERP es distinguir el efecto de varios lípidos catiónicos y componentes lipídicos auxiliares de la NPL basándose en su efecto relativo sobre la unión/captación o fusión con/deseestabilización de la membrana endosomal. Este ensayo permite determinar cuantitativamente cómo afecta cada componente de la NPL u otra partícula lipídica a la eficacia de la administración, optimizando de este modo la NPL u otra partícula lipídica. Habitualmente, un ensayo de ERP mide la expresión de una proteína indicadora (p. ej., luciferasa, β -galactosidasa, proteína verde fluorescente (GFP), etc.) y en algunos ejemplos, una formulación de NPL optimizada para un plásmido de expresión será también apropiada para encapsular un ARN o ARNm de interferencia. En otros casos, un ensayo de ERP puede adaptarse para medir la regulación a la baja de la transcripción o traducción de una secuencia diana en presencia o ausencia de un ARN de interferencia (p. ej., ARNip). En otros casos, un ensayo de ERP puede adaptarse para medir la expresión de una proteína diana en presencia o ausencia de un ARNm. Comparando los ERP para cada una de las diversas NPL u otras partículas lipídicas, se puede determinar fácilmente el sistema optimizado, p. ej., la NPL u otra partícula lipídica que tiene la mayor captación en la célula.

Células para la administración de partículas lipídicas

Las composiciones de la presente invención se usan para tratar una amplia variedad de tipos celulares, *in vivo* e *in vitro*. Algunas células adecuadas incluyen, p. ej., células precursoras hematopoyéticas (madre), fibroblastos, queratinocitos, hepatocitos, células endoteliales, células musculares esqueléticas y lisas, osteoblastos, neuronas, linfocitos quiescentes, células terminalmente diferenciadas, células primarias lentas o no ciclotoras, células parenquimatosas, células linfoides, células epiteliales, células óseas, y similares. En realizaciones preferidas, un agente activo o terapéutico tal como uno o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia (p. ej., ARNip) o ARNm) se administra a células cancerosas tales como, p. ej., células cancerosas de pulmón, células cancerosas de colon, células de cáncer rectal, células de cáncer anal, células cancerosas de conducto biliar, células cancerosas de intestino delgado, células cancerosas de estómago (gástricas), células cancerosas de esófago, células cancerosas de vesícula biliar, células cancerosas de hígado, células cancerosas de páncreas, células cancerosas de apéndice, células cancerosas de mama, células cancerosas de ovario, células cancerosas de cuello uterino, células cancerosas de próstata, células de cáncer renal, células cancerosas del sistema nervioso central, células tumorales de glioblastoma, células cancerosas de piel, células de linfoma, células tumorales de coriocarcinoma, células cancerosas de cabeza y cuello, células tumorales de sarcoma osteogénico y células cancerosas de la sangre.

La administración *in vivo* de partículas lipídicas tales como NPL que encapsulan una o más moléculas de ácido nucleico (p. ej., ARN de interferencia (p. ej., ARNip) o ARNm) es adecuada para dirigirse a células de cualquier tipo celular. Los métodos y composiciones pueden emplearse con células de una amplia variedad de vertebrados, incluyendo mamíferos, tales como, p. ej., cánidos, felinos, equinos, bóvidos, ovinos, caprinos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas y cobayas), lagomorfos, cerdos y primates (p. ej. monos, chimpancés y seres humanos).

La medida en que pueda ser necesario el cultivo tisular de células es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3.^a Ed., Wiley-Liss, Nueva York (1994), Kuchler *et al.*, *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. (1977), y las referencias citadas en dicho documento proporcionan una guía general para el cultivo de células. Los sistemas celulares cultivados

Detección de partículas lipídicas

En algunas realizaciones, las partículas lipídicas de la presente invención (p. ej., NPL) son detectables en el sujeto aproximadamente a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más horas. En otras realizaciones, las partículas lipídicas de la presente invención (p. ej., NPL) son detectables en el sujeto aproximadamente a las 8, 12, 24, 48, 60, 72 o 96 horas, o aproximadamente a los 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25 o 28 días después de la administración de las partículas. La presencia de las partículas puede detectarse en las células, tejidos u otras muestras biológicas del sujeto. Las partículas pueden ser detectadas, p. ej., mediante la detección directa de las partículas, detección de un ácido nucleico terapéutico, tal como una secuencia de ARN de interferencia (p. ej., ARNip) o de ARNm, detección de la secuencia diana de interés (es decir, detectando la expresión o la expresión reducida de la secuencia de interés), o una combinación de las mismas.

Detección de partículas

Las partículas lipídicas de la invención, tales como la NPL, pueden detectarse para usar cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, una etiqueta puede acoplarse directa o indirectamente a un componente de la partícula lipídica utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Se puede utilizar una amplia variedad de marcas, donde la selección de la marca depende de la sensibilidad necesaria, facilidad de conjugación con el componente lipídico de la partícula, requisitos de estabilidad, y disposiciones sobre instrumentación y eliminación disponibles. Los marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, marcadores espectrales tales como tintes fluorescentes (p. ej., fluoresceína y derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FTTC) y Oregon Green™; rodamina y derivados tales como el rojo tejano, isotiocianato de tetrarrodimina (TRITC, *tetrahodimine isothiocynate*), etc., digoxigenina, biotina, ficoeritrina, AMCA, CyDyes™ y similares; radiomarcadores tales como ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, etc.; enzimas tales como la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, etc.; marcadores colorimétricos espectrales tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreado tal como poliestireno, polipropileno, látex, etc. El marcador puede detectarse utilizando cualquier medio conocido en la técnica.

Detección de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos (p. ej., ARN de interferencia o ARNm) se detectan y cuantifican en el presente documento mediante cualquiera de los medios bien conocidos por los expertos en la materia. La detección de ácidos nucleicos puede realizarse mediante métodos conocidos tales como el análisis Southern, análisis de Northern, electroforesis en gel, PCR, el radiomarcaje, recuento por centelleo y cromatografía de afinidad. Métodos bioquímicos analíticos adicionales, tales como la espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de hiperdifusión también pueden emplearse.

La selección de un formato de hibridación de ácidos nucleicos no es crítica. Una variedad de formatos de hibridación de ácidos nucleicos es conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, entre los formatos más comunes se incluyen los ensayos de tipo sándwich y los ensayos de competición o desplazamiento. Las técnicas de hibridación se describen generalmente en, p. ej., "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach", Eds. Hames y Higgins, IRL Press (1985).

La sensibilidad de los ensayos de hibridación se puede mejorar mediante el uso de un sistema de amplificación de ácidos nucleicos que multiplica el ácido nucleico diana que se detecta. Se conocen técnicas de amplificación *in vitro* adecuadas para amplificar secuencias para usar como sondas moleculares o para generar fragmentos de ácido nucleico para su posterior subclonación. Algunos ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos mediante tales métodos de amplificación *in vitro*, incluida la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA™) se encuentran en Sambrook *et al.*, *En Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); y Ausubel *et al.*, *SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (2002); así como en la patente de EE. UU. n.º 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.* eds.) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990); Amheim y Levinson (1 de octubre de 1990), *C&EN* 36; *The Journal Of NIH Research*, 3:81 (1991); Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 86:1173 (1989); Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 87:1874 (1990); Lomell *et al.*, *J. Clin. Chem.*, 35:1826 (1989); Landegren *et al.*, *Science*, 241:1077 (1988); Van Brunt, *Biotechnology*, 8:291 (1990); Wu y Wallace, *Gene*, 4:560 (1989); Barringer *et al.*, *Gene*, 89:117 (1990); y Sooknanan and Malek, *Biotechnology*, 13:563 (1995). Los métodos mejorados de clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.426.039. Otros métodos descritos en la técnica son la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y los sistemas Q β -replicasa. Estos sistemas pueden

usarse para identificar directamente mutantes en los que los cebadores de PCR o LCR están diseñados para extenderse o ligarse solo cuando está presente una secuencia seleccionada. Como alternativa, las secuencias seleccionadas pueden amplificarse generalmente usando, por ejemplo, cebadores de PCR inespecíficos y la región diana amplificada se sondea posteriormente en busca de una secuencia específica indicativa de una mutación.

Los ácidos nucleicos para usar como sondas, p. ej., en métodos de amplificación *in vitro*, para usar como sondas génicas, o como componentes inhibidores normalmente se sintetizan químicamente según el método del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859 1862 (1981), p. ej., usando un sintetizador automático, como se describe en Needham VanDevanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984). La purificación de polinucleótidos, cuando sea necesaria, se realiza normalmente por electroforesis en gel de acrilamida nativa o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson *et al.*, *J. Chrom.*, 255:137 149 (1983). La secuencia de los polinucleótidos sintéticos puede verificarse utilizando el método de degradación química de Maxam y Gilbert (1980) en Grossman y Moldave (eds.) Academic Press, Nueva York, *Methods in Enzymology*, 65:499.

Un medio alternativo para determinar el nivel de transcripción es la hibridación *in situ*. Los ensayos de hibridación *in situ* son conocidos y se describen de manera general en Angerer *et al.*, *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987). En un ensayo de hibridación *in situ*, las células se fijan a un soporte sólido, normalmente un portaobjetos de vidrio. Si se va a sondear el ADN, las células se desnaturalizan con calor o álcali. A continuación, las células se ponen en contacto con una solución de hibridación a temperatura moderada para permitir la hibridación de las sondas específicas marcadas. Las sondas están preferentemente marcadas con radioisótopos o indicadores fluorescentes.

Lípidos ionizables

Los lípidos catiónicos ionizables son normalmente el principal componente lipídico de las nanopartículas lipídicas (NPL). Están diseñados para tener carga neutra a pH fisiológico estándar (~7), pero adquieren carga positiva a pH más bajo (ácido). Esto ayuda a la encapsulación de la carga útil de ácido nucleico durante la formación de la NPL y a la liberación intracelular (la etapa de fusión endosomal requiere una carga positiva en el lípido ionizable).

Los lípidos ionizables tales como MC3 (utilizado en el producto de ARNip-NPL Onpatro, aprobado por la FDA) y el 3D-P-DMA han demostrado una excelente actividad y tolerabilidad en diversas aplicaciones. Sin embargo, no se metabolizan rápidamente y tardan varias semanas en desaparecer de los tejidos diana. Esto los hace menos atractivos para aplicaciones que requieren múltiples dosis, en especial, con intervalos de dosis cortos y/o indicaciones crónicas.

Una forma de conseguir un perfil más favorable es la inclusión de grupos ésteres carboxílicos en el dominio hidrófobo del lípido. Los grupos éster están sujetos a descomposición enzimática en el cuerpo, y se ha informado de que esto mejora el aclaramiento de los lípidos en los tejidos diana (Maier *et al.* 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta la estructura química que rodea inmediatamente a los ésteres, ya que esta afecta a la eficacia de la estrategia. ALC-0315, el lípido ionizable en BNT162b2 (también conocido como la vacuna COVID de Pfizer), tiene ésteres carboxílicos en su dominio hidrófobo, pero se observó que se metabolizaba a un ritmo similar al MC3 [ref: Informe de evaluación de Comimaty, Agencia Europea del Medicamento]. Además, los ésteres deben incorporarse manteniendo un perfil favorable de actividad y tolerabilidad.

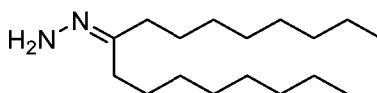
Con este fin, se ha diseñado, sintetizado y evaluado una serie de lípidos catiónicos ionizables que incorporan funcionalidad éster:

- Formulabilidad (tamaño de las partículas, polidispersidad, encapsulación de la carga útil, pKa)
- Potencia (modelo de expresión en hígado de ratón, con ARNm codificante de luciferasa y OTC)
- Tolerabilidad (modelo de inmunestimulación en ratón, lectura de citocinas)
- Eliminación de lípidos (modelo de ratón: aclaramiento del tejido diana (hígado))

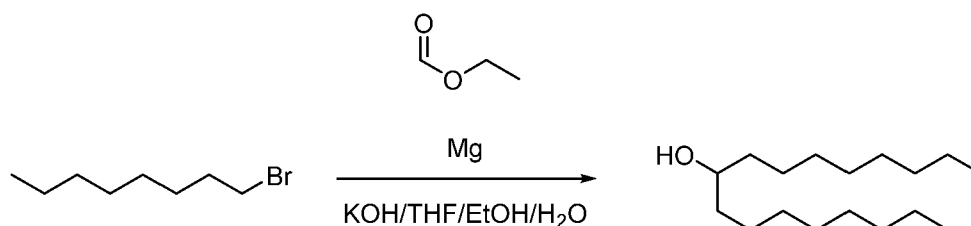
La presente invención se describirá con más detalle por medio de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una serie de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para obtener prácticamente los mismos resultados.

Ejemplos

Ejemplo de preparación 1. Síntesis de heptadecan-9-ilidenohidrazina

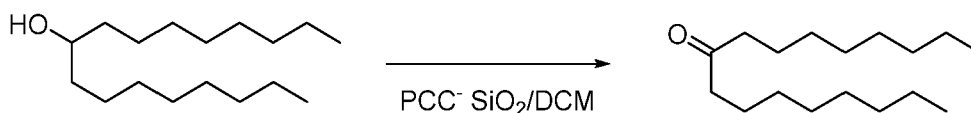


Etapa 1. Síntesis de 9-heptadecanol



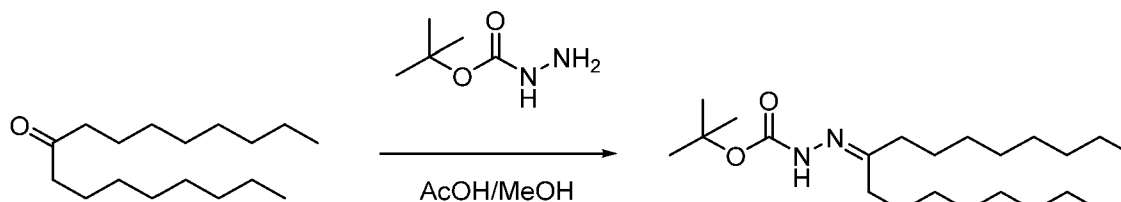
Se preparó un reactivo de Grignard a partir de 1-bromooctano (6 g, 31 mmol) y magnesio (808 mg, 33 mmol) en THF con agitación a 45 °C durante 2 h. La reacción se enfrió hasta 10 °C y se añadió gota a gota formiato de etilo (2,6 ml, 32 mmol) en THF (5 ml). Se añadieron H₂O (3 ml) y HCl 6 M (8 ml) para disolver el magnesio residual. La reacción se dividió entre hexano y H₂O. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se agitó en EtOH con solución de KOH (1,6 g) en agua (3 ml). El etanol se eliminó al vacío y el residuo se dividió entre HCl 6 M y hexano. Los extractos orgánicos se lavaron con H₂O y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de EtOAc/Hex), dando 9-heptadecanol (3,2 g, 81,2 %).

Etapa 2. Síntesis de 9-heptadecanona



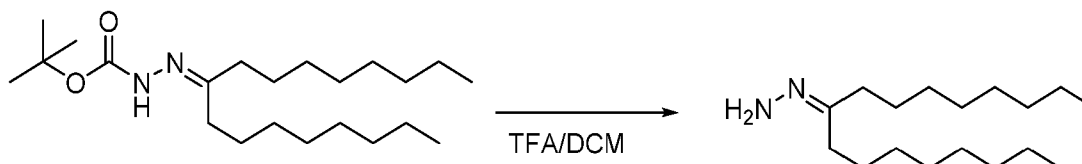
Se agitaron 9-heptadecanol (3,2 g, 12,6 mmol) y PCC-SiO₂ (1:1) (16,3 g, 38 mmol) en DCM (100 ml) a TA durante 16 horas. La reacción se filtró a través de sílice eluyendo con EtOAc. Los extractos orgánicos se concentraron al vacío y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc/Hex), dando 9-heptadecanona (3,2 g, 99,6 %).

Etapa 3. Síntesis de *tert*-butoxicarbohidrazida de N'-(heptadecan-9-ilideno)



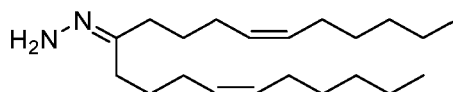
Se agitaron *tert*-butoxicarbohidrazida (195 mg, 1,47 mmol), 9-heptadecanona (750 mg, 2,9 mmol) y AcOH (cat) en MeOH (10 ml) a reflujo durante 15 h. La reacción se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de EtOAc/Hex), dando *tert*-butoxicarbohidrazida de N'-(heptadecan-9-ilideno) (320 mg, 58,9 %).

Etapa 4. Síntesis de heptadecan-9-ilidenohidrazina



Se agitó *tert*-butoxicarbohidrazida de N'-(Heptadecan-9-ilideno) (320 mg, 0,9 mmol) en TFA al 25 % en DCM (40 ml) a TA hasta que se completó la reacción. El disolvente se eliminó al vacío, dando heptadecano-9-ilidenohidrazina (231 mg, 99,1 %) que se usó sin purificación adicional.

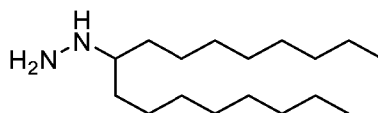
Ejemplo de preparación 2. Síntesis de ((6Z,15Z)-hencosa-6,15-dien-11-iliden)hidracina



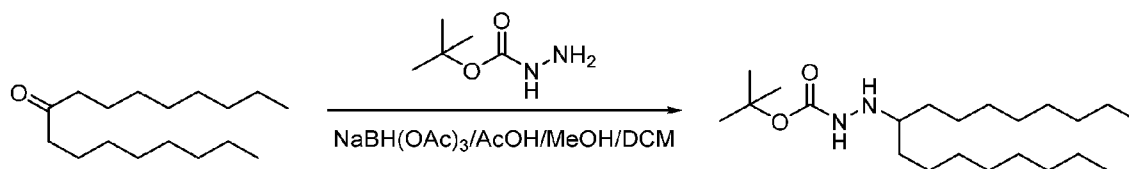
Se preparó ((6Z,15Z)-Henicosa-6,15-dien-1-ylidene)hidracina utilizando una metodología análoga a la que se ha descrito anteriormente.

5

Ejemplo de preparación 3. Síntesis de Heptadecan-9-ilhidrazina

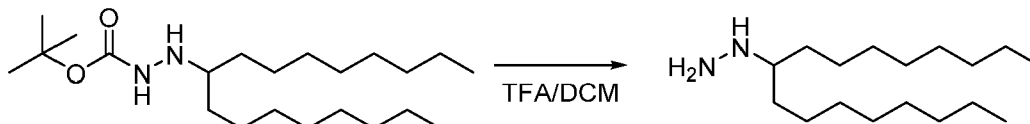


10 Etapa 1. Síntesis de la *tert*-butoxicarbohidrazida de N'-(heptadecan-9-ilo) dada



Se agitaron *tert*-butoxicarbohidrazida (412 mg, 3,1 mmol), 9-heptadecanona (794 mg, 3,1 mmol), AcOH (0,75 ml, 3,2 mmol) y NaBH(OAc)₃ (2,0 g, 9,4 mmol) en DCM (20 ml) a TA durante 2 días y a 40 °C durante 20 horas más. La reacción se lavó con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de EtOAc/Hex), dando N'-*tert*-butoxicarbohidrazida de (heptadecan-9-ilo) (700 mg, 60,5 %).

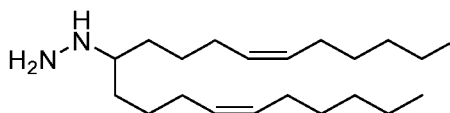
20 Etapa 2. Síntesis de heptadecan-9-ilhidrazina



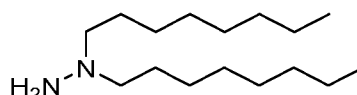
Se agitó *tert*-butoxicarbohidrazida de N'-(heptadecan-9-ilo) (700 mg, 1,9 mmol) con TFA al 25 % en DCM (10 ml) a TA durante 1,5 h. La reacción se concentró al vacío, dando heptadecan-9-ilhidrazina (500 mg, 97,9 %) que se usó sin purificación.

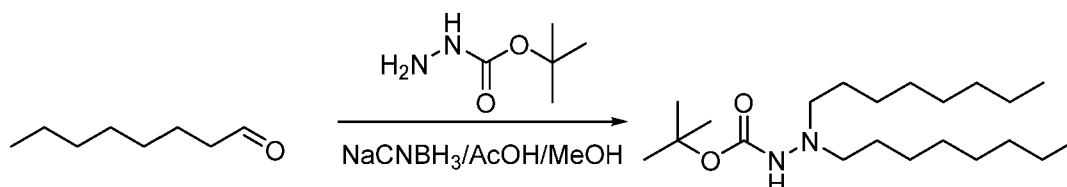
Ejemplo de preparación 4. Síntesis de ((6Z,15Z)-Henicosa-6,15-dien-11-il)hidrazina

La ((6Z,15Z)-Henicosa-6,15-dien-11-il)hidrazina se preparó siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente

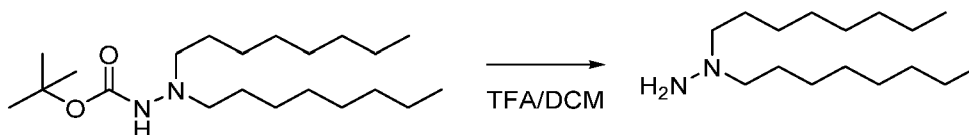


35 Ejemplo de preparación 5. Síntesis de 1,1-dioctilhidrazina

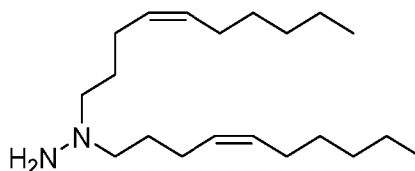


Etapla 1. Síntesis de *tert*-butoxicarbohidrazida de N',N'-dioctilo

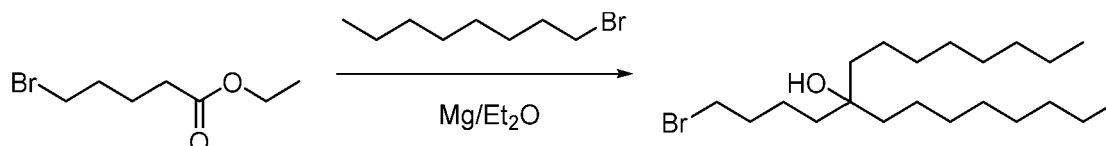
Se agitaron octanal (2,4 ml, 15,0 mmol), *tert*-butoxicarbohidrazida (1 g, 7,6 mmol) y AcOH (7,6 mmol) en MeOH seco bajo atmósfera de nitrógeno a 75 °C durante 1 h. Tras enfriar a TA, se añadió NaBH₃CN (1,9 g, 30,3 mmol) y la mezcla se agitó a TA durante 15 h. El disolvente se retiró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lavó con H₂O y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc/Hex), dando *tert*-butoxicarbohidrazida de N',N'-dioctilo (2,0 g, 74,3 %).

Etapla 2. Síntesis de 1,1-dioctilhidrazina

Se agitó *tert*-butoxicarbohidrazida de N',N'-dioctilo (1,1 g, 3,0 mmol) se agitó en TFA al 30 % en DCM (20 ml) a 0 °C hasta que se completó y se dejó calentar a TA. El disolvente se eliminó al vacío, dando 1,1-dioctilhidrazina (782 mg, cuant.) que se usó sin purificación.

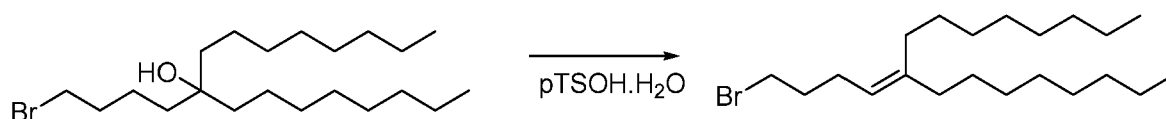
Ejemplo de preparación 6. Síntesis de 1,1-di((Z)-Dec-4-en-1-il)hidracina

Se preparó 1,1-di((Z)-Dec-4-en-1-il)hidracina utilizando una metodología análoga

Ejemplo de preparación 7. Método General (a) para la síntesis de alcoholes alquílicos ramificados: ilustrado mediante la síntesis de 5-octiltridec-4-en-1-ol**Etapla 1. Síntesis de 9-(4-bromobutil)heptadecan-9-ol**

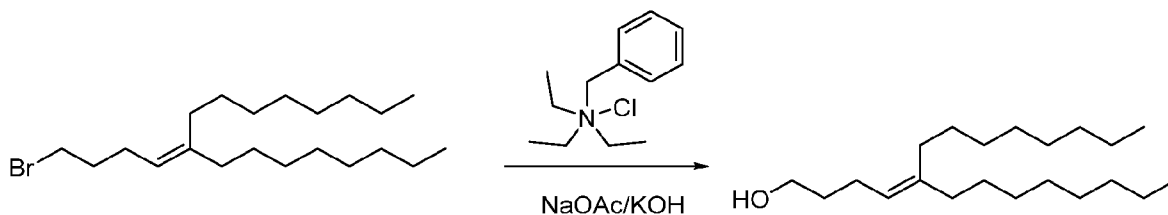
Se preparó un reactivo de Grignard a partir de Mg (2,6 g, 105 mmol) y 1-bromooctano (20,0 g, 105 mmol) en Et₂O anhidro (35 ml) a reflujo durante 1 hora. La reacción se enfrió, y se añadió gota a gota una solución de 5-bromopentanoato de etilo (8,0 g, 38,3 mmol) en Et₂O seco (25 ml), seguido de reflujo durante 1 h adicional. La reacción se enfrió a TA y se vertió en 100 ml de solución sat. de hielo/NH₄Cl. La porción acuosa se extrajo con Et₂O y los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de EtOAc/Hex), dando 9-(4-bromobutil)heptadecan-9-ol (10,6 g, 70,7 %).

Etapla 2. Síntesis de 9-(4-bromobutiliden)heptadecano



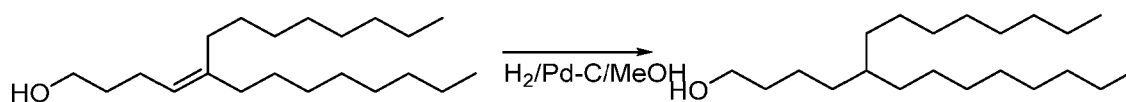
Se agitaron 9-(4-bromobutil)heptadecano-9-ol (10,6 g, 27,0 mmol) y el p-TsOH.H₂O (93 mg, 0,54 mmol) bajo N₂ a 130 °C durante 2 h. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-4 % de EtOAc/Hex), dando 9-(4-bromobutilideno)heptadecano (8,84 g, 87,5 %).

Etapa 3. Síntesis de 5-octiltridec-4-en-1-ol



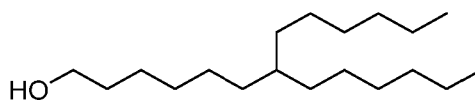
Se agitaron 9-(4-bromobutilideno)heptadecano (8,84 g, 23,7 mmol), bencil(cloro)triethylamina (540 mg, 2,4 mmol) y NaOAc (7,8 g, 94,7 mmol) en DMF (60 ml) a 70 °C durante 20 h. La reacción se vertió en hielo/agua y se extrajo con Et₂O. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se recogió en MeOH, se añadió KOH (18,6 g, 332 mmol) en H₂O y la reacción se agitó durante 30 min. El MeOH se eliminó al vacío y la reacción se dividió entre H₂O y Et₂O. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío y el material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de EtOAc/Hex), dando 5-octiltridec-4-en-1-ol (4,5 g, 60,8 %).

Etapa 4. Síntesis de 5-octiltridecan-1-ol

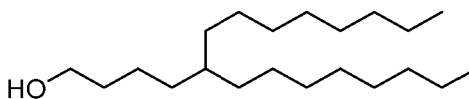


Se sometió 5-octiltridec-4-en-1-ol (4,469 g, 14,39 mmol) a hidrogenación catalítica sobre Pd-C a TA en MeOH (50 ml) durante 15 h. La reacción se filtró y se concentró al vacío, dando 5-octiltridecan-1-ol (3,5 g, 77,8 %) que se usó sin purificación adicional.

Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente



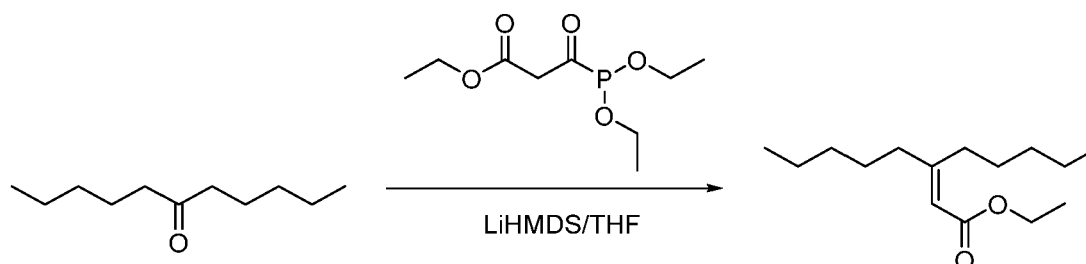
7-Hexiltridecan-1-ol



5-Octiltridecano-1-ol

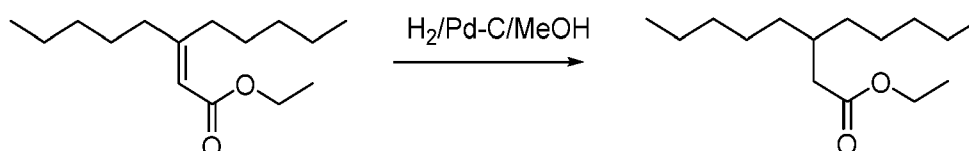
Ejemplo de preparación 8. Método General (b) para la síntesis de alcoholes alquílicos ramificados: ilustrado mediante la síntesis de 3-pentiloctan-1-ol

Etapa 1. Síntesis de 3-nentiloct-2-enoato de etilo



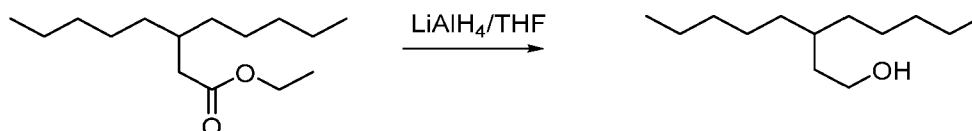
Se agitó fosfonoacetato de trietilo (65,8 g, 294 mmol) en THF (220 ml) a -10°C . Se añadió gota a gota LiHMDS 1 M en THF (294 ml, 294 mmol) y la reacción se agitó a -10°C durante 1 hora y después a 0°C durante 1 h. Se añadió 6-indecanona (25 g, 147 mmol) y la reacción se agitó a 45°C durante 16 h. La reacción se interrumpió con H_2O , se extrajo con Et_2O y se lavó con salmuera. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO_4) se filtraron y se concentraron al vacío, dando 3-pentiloct-2-enoato de etilo (43,5 g) que se usó en la etapa posterior sin mayor procesamiento.

Etapa 2. Síntesis del 3-pentiloctanoato de etilo



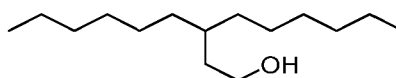
El 3-pentiloct-2-enoato de etilo (35 g, 147 mmol) se sometió a hidrogenación catalítica sobre Pd-C en MeOH (100 ml) a TA durante 20 horas. La reacción se filtró y se concentró al vacío, dando 3-pentiloctanoato de etilo (33,3 g, 93,6 %) que se usó sin purificación adicional.

Etapa 3. Síntesis de 3-pentiloctan-1-ol



Se agitó LiAlH_4 (6,8 g, 179 mmol) en THF (500 ml) a 0°C durante 30 min. Se añadió gota a gota 3-pentiloctanoato de etilo (33,3 g, 138 mmol) en THF (500 ml) y la reacción se agitó a TA hasta completarse. La reacción se enfrió a 0°C , se diluyó con Et_2O (500 ml) y se inactivó con NaOH 1 M (16 ml). La reacción se agitó durante 30 min, se secó (MgSO_4), se filtró a través de celite y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida automatizada (0-30 % de EtOAc/Hex), dando 3-pentiloctan-1-ol (24,7 g, 89,7 %).

Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente:



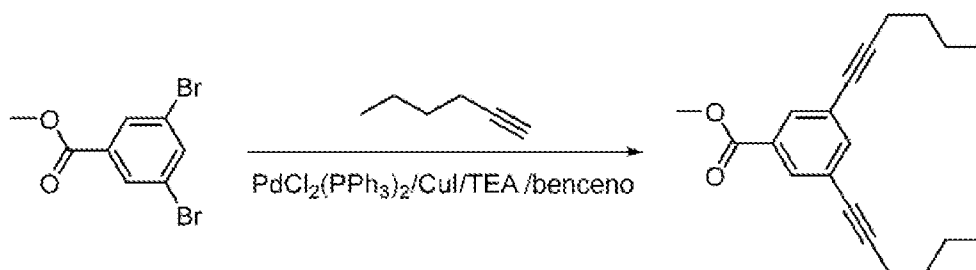
3-Hexilnonan-1-ol



3-Heptildecano-1-ol

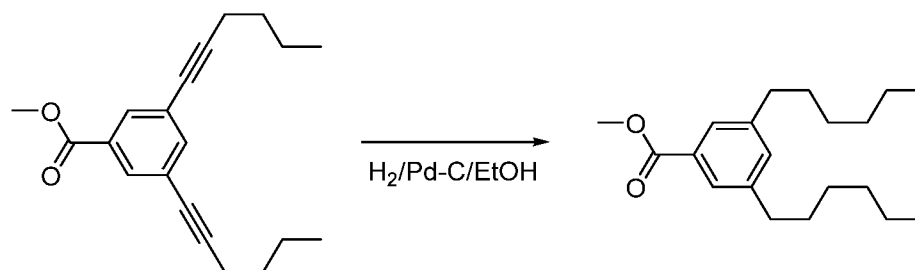
Ejemplo de preparación 9. Síntesis de (3,5-dihexilfenil)metanol

Etapa 1. Síntesis de 3,5-bis(hex-1-in-1-il)benzoato de metilo



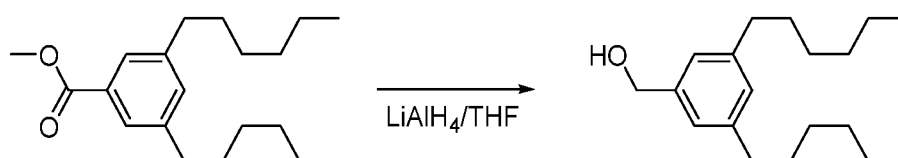
Se agitaron 3,5-dibromobenzoato de metilo (7,4 g, 25,0 mmol), hexina (8,2 g, 100,0 mmol), diclorobis[4-(difenilfosfanil)fenil]paladio (1,4 g, 2,0 mmol), CuI (0,2 g, 1,0 mmol) y TEA (21,0 ml, 150 mmol) en benceno (100 ml) a 80 °C durante 48 h. La reacción se filtró a través de una almohadilla de sílice eluyendo con EtOAc. Los extractos orgánicos se concentraron al vacío y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de EtOAc/Hex), dando 3,5-bis(hex-1-in-1-il)benzoato de metilo (7,0 g, 94,4 %).

Etapa 2. Síntesis de 3,5-dihexilbenzoato de metilo



El 3,5-bis(hex-1-in-1-il)benzoato de metilo (7,0 g, 23,6 mmol) se sometió a hidrogenación catalítica sobre Pd-C en EtOH (100 ml) a TA durante 18 horas. La reacción se filtró a través de Celite y se concentró al vacío, dando 3,5-dihexilbenzoato de metilo (6,3 g, 87,7 %) que se usó sin purificación adicional.

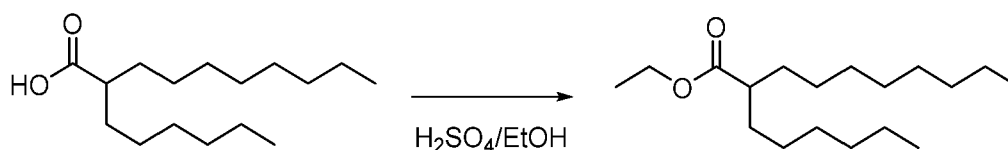
Etapa 3. Síntesis de (3,5-dihexilfenil)metanol



Se agitó 3,5-dihexilbenzoato de metilo (6,3 g, 20,7 mmol) en THF seco a 0 °C. Se añadió LiAlH₄ (1,2 g, 31,0 mmol) en porciones y se agitó la reacción durante 1 h, dejando que se calentara a TA. Una vez completada, la reacción se inactivó con H₂O y NaOH 1 M y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron, se concentraron al vacío y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (EtOAc/Hex al 10 %), dando (3,5-dihexilfenil)metanol (3,0 g, 52,4 %).

Ejemplo de preparación 10. Síntesis de 2-fluoro-2-hexildecanoico

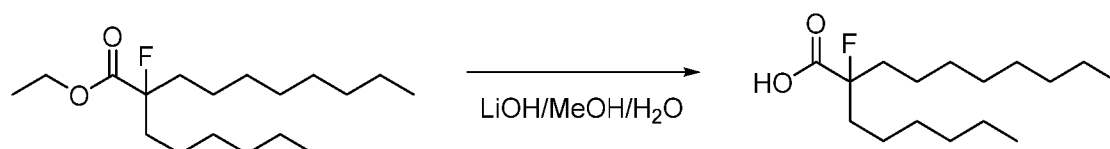
Etapa 1. Síntesis de 2-hexildecanoato de etilo



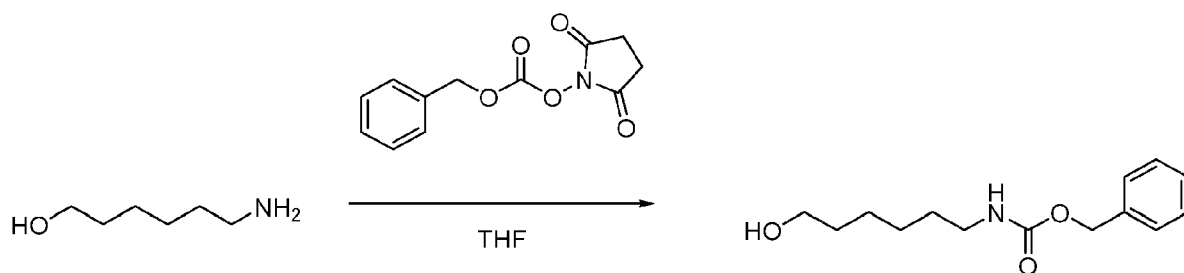
Se sometieron a reflujo ácido hexildecanoico (3 g, 11,7 mmol) y H₂SO₄ (cat) en EtOH (20 ml) durante 15 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se dividió entre hexano y agua. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron, se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-6 % de EtOAc/Hex), dando 2-hexildecanoato de etilo (3,0 g, 90,7 %).

Etapla 2. Síntesis de 2-fluoro-2-hexildecanoato de etilo

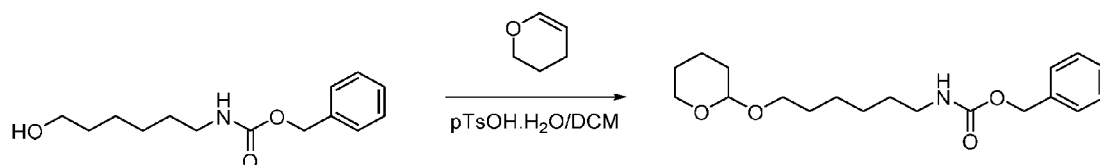
- 5 Se añadió gota a gota 2-hexildecanoato de etilo (1 g, 3,5 mmol) en THF a una solución de LDA (2,6 ml, 2 M, 5,273 mmol) a -78°C y se agitó durante 0,5 h. Se añadió gota a gota N-fluorobencenosulfonimida (1,7 g, 5,3 mmol) en THF (15 ml) y la reacción se agitó durante 18 horas hasta alcanzar la TA. La reacción se diluyó con EtOAc, se lavó secuencialmente con solución acuosa sat. de NH_4Cl , agua y salmuera, se secó (MgSO_4), se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-6 % de EtOAc/Hex). La RMN mostró una conversión del 60 %. La reacción se repitió una segunda vez, dando 2-fluoro-2-hexildecanoato de etilo (770 mg, 72,4 %).

Etapla 3. Síntesis de 2-fluoro-2-hexildecanoico

- 15 Se agitaron 2-fluoro-2-hexildecanoato de etilo (770 mg, 2,5 mmol) y el LiOH (125 mg, 5,2 mmol) en MeOH (10 ml) y H₂O (2 ml) a TA durante 15 horas. Se añadió HCl 6 M (0,87 ml) y se eliminó el MeOH al vacío. El residuo se disolvió en DCM, se lavó con salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío, dando ácido 2-fluoro-2-hexildecanoico (520 mg, 74,4 %).

Ejemplo de preparación 11. Síntesis de THP éteres aminoalcohólicos ilustrada mediante la síntesis de 5-(oxan-2-iloxi)pentan-1-amina**Etapla 1. Síntesis de N-(5-hidroxipentil)carbamato de bencilo**

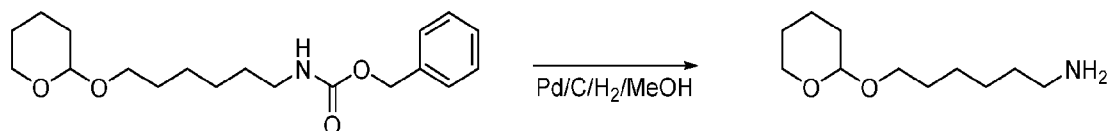
- 30 Se agitaron 5-aminopentanol (21,0 g, 203 mmol) y carbonato de bencil-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (50,7 g, 203 mmol) en THF a TA durante 16 horas. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc (250 ml), se lavó con HCl 1 M y NaOH 0,5 M, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El aceite resultante se agitó en hexano hasta que el producto cristalizó. El sólido se recuperó por filtración, dando N-(5-hidroxipentil)carbamato de bencilo (44 g, 91,0 %).

Etapla 2. Síntesis de N-[5-(oxan-2-iloxi)pentil]carbamato de bencilo

- 40 Se agitaron N-(5-hidroxipentil)carbamato de bencilo (20,0 g, 84 mmol), 2H-pirano,3,4-dihidro-(8,6 g, 101) y pTsOH-H₂O (1,6 g, 8,4 mmol) en DCM (270 ml) a TA durante 2 h. La reacción se lavó con NaHCO_3 (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida

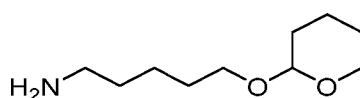
automatizada (10-50 % de EtOAc/Hex), dando N-[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]carbamato de bencilo (19,5 g, 72,0 %).

Etapa 3. Síntesis de 5-(oxan-2-iloxi)pentan-1-amina



Se sometió N-[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]carbamato de bencilo (19,0 g, 59 mmol) a hidrogenación catalítica sobre Pd/C en MeOH a TA durante 16 horas. La reacción se filtró a través de Celite y se concentró al vacío, dando 5-(oxan-2-iloxi)pentan-1-amina (10,9 g, 98,5 %) que se usó sin purificación.

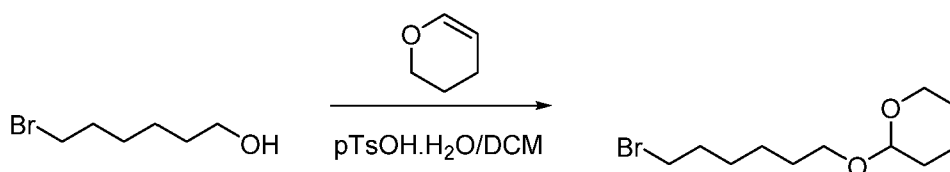
El siguiente compuesto se preparó utilizando una metodología análoga a la descrita anteriormente:



5-((Tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)pentan-1-amina

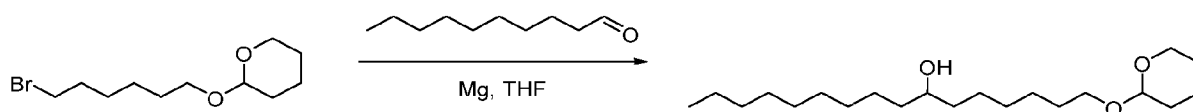
Ejemplo de preparación 12. Síntesis de ceto-THP éteres ilustrada mediante la síntesis de 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ona

Etapa 1. Síntesis de 2-[(6-bromohexil)oxi]oxano



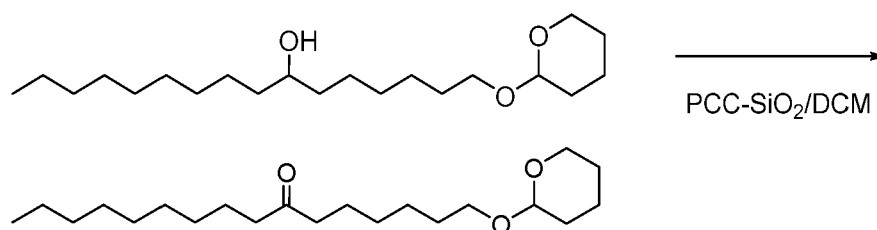
Se agitaron 6-bromo-1-hexanol (40 g, 220 mmol), dihidropirano (23 g, 265 mmol) y pTsOH-H₂O (4,2 g, 22,0 mmol) en DCM (500 ml) a TA durante 2 h. La reacción se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (0-20 % de EtOAc/Hex), dando 2-[(6-bromohexil)oxi]oxano (49 g, 83,6 %).

Etapa 2. Síntesis de 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ol



Se preparó un reactivo de Grignard a partir de 2-[(6-bromohexil)oxi]oxano (49 g, 185 mmol) y magnesio (5,4 g, 222 mmol) en THF anhidro (175 ml) a reflujo durante 30 min. La reacción se enfrió a 0 °C y se añadió decanal (23 g, 148 mmol) en THF anhidro (144 ml) gota a gota durante 1 h. La reacción se agitó durante 2 h y se dejó calentar a temperatura ambiente, a continuación, se inactivó con una solución sat. de NH₄Cl. Los extractos orgánicos se separaron, se lavaron con agua y salmuera y se secaron (MgSO₄). El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de EtOAc/Hex), dando 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ol (47 g, 92,8 %).

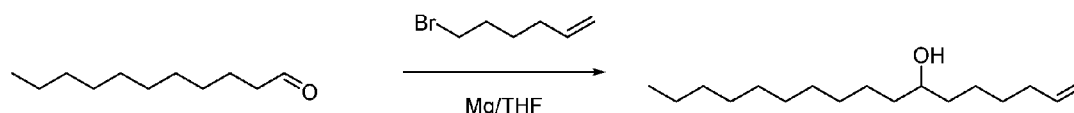
Etapa 3. Síntesis de 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ona



Se agitaron 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ol (47 g, 137 mmol) y PCC/SiO₂ (1:1) (118 g, 274 mmol) en DCM (294 ml) a TA durante 16 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de sílice y se eluyó con EtOAc/Hex 50:50. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc/Hex), dando 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ona (37,5 g, 80,3 %).

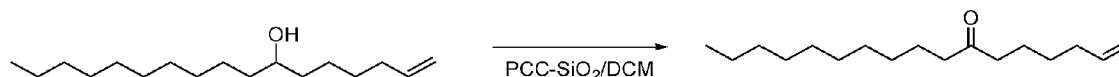
Ejemplo de preparación 13. Síntesis de oxoalquenos ilustrada mediante la síntesis de heptadec-1-en-7-ona

Etapa 1. Síntesis de heptadec-1-en-7-ol



Se preparó un reactivo de Grignard a partir de 6-bromohex-1-eno (35 g, 215 mmol) y magnesio (6,3 g, 258 mmol) en THF (250 ml). Tras el reflujo inicial, la reacción se agitó durante 2 horas y, a continuación, se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota undecanal (29 g, 172 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se inactivó con agua (100 ml), se enfrió a 0 °C y se añadió HCl 6 M (50 ml) para disolver el magnesio residual. La solución se diluyó con Et₂O (250 ml), se separaron los extractos orgánicos, se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando heptadec-1-en-7-ol (43 g, 98,4 %) que se usó sin purificación adicional.

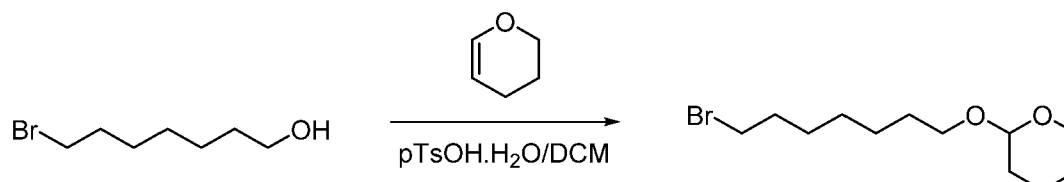
Etapa 2. Síntesis de heptadec-1-en-7-ona



Se agitaron heptadec-1-en-7-ol (43 g, 169 mmol) y PCC/Sílice 1:1 en peso (91 g, 211 mmol) en DCM (300 ml) a TA durante 16 h. La reacción se filtró a través de sílice, eluyendo con DCM y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc/hexano), dando heptadec-1-en-7-ona (31 g, 72,7 %).

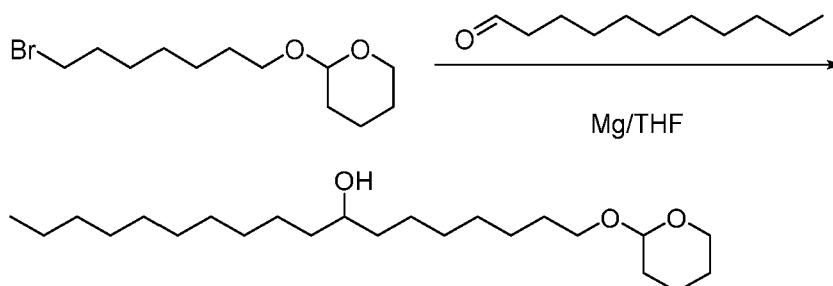
Ejemplo de preparación 14. Síntesis de ácidos oxocarboxílicos. Método (a) ilustrado mediante la síntesis de ácido 8-oxooctadecanoico

Etapa 1. Síntesis de 2-[(7-bromoheptil)oxi]oxano



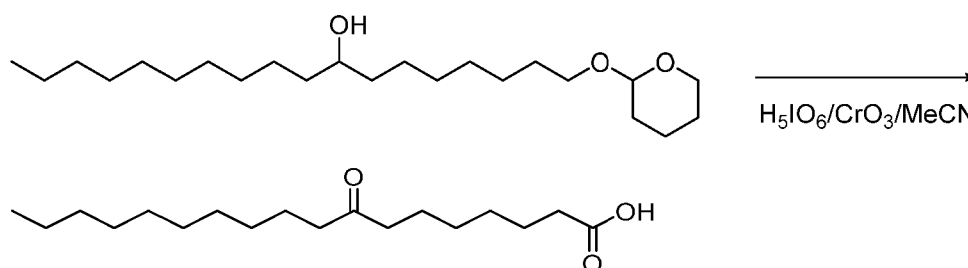
Se agitaron 7-bromoheptan-1-ol (102 g, 523 mmol), dihidropirano (53 g, 627 mmol) y pTsOH-H₂O (10 g, 52 mmol) en DCM (1370 ml) durante 2 h. La reacción se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se pasó a través de una almohadilla de sílice con 25 % de EtOAc/Hex y los extractos orgánicos combinados se concentraron al vacío, dando 2-[(7-bromoheptil)oxi]oxano (135 g, 92,5 %) que se usó sin purificación adicional.

Etapa 2. Síntesis de 1-(oxan-2-iloxi)octadecan-8-ol



Se preparó un reactivo de Grignard a partir de 2-[(7-bromoheptil)oxi]oxano (135 g, 483 mmol) y magnesio (14,1 g, 580 mmol) en THF anhidro (82 ml). Tras añadir el bromuro, la reacción se agitó a reflujo durante 30 min. La reacción se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota Undecanal (66 g, 387 mmol) en THF anhidro (412 ml) durante 1 h. La reacción se agitó durante 16 h y se dejó calentar a temperatura ambiente, a continuación, se inactivó con H₂O (100 ml) seguido de HCl 6 M (200 ml). La reacción se extrajo con EtOAc, se lavó con H₂O y salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-50 % de EtOAc/Hex), dando 1-(oxan-2-iloxy)octadecan-8-ol (68 g, 47,0 %).

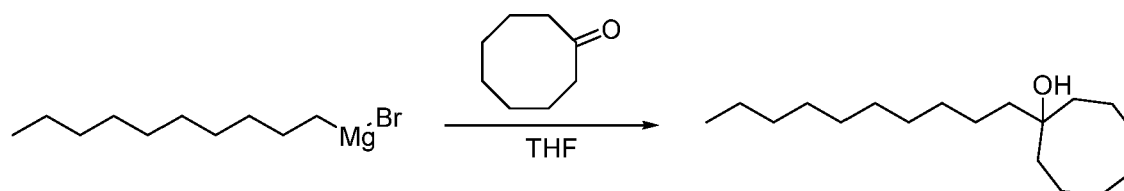
Etapa 3. Síntesis de ácido 8-oxooctadecanoico



Se disolvieron ácido peryódico (239 g, 1009 mmol) y CrO₃ (0,5 g, 2,6 % molar) en MeCN (3 l, 0,75 % H₂O v/v) a TA durante 16 h. Se añadió 1-(oxan-2-iloxy)octadecan-8-ol (68 g, 183 mmol) en MeCN (1 l, 0,75 % en vol. de agua) durante 30-60 min mientras se mantenía la temperatura de reacción a 0-5 °C. La reacción se agitó durante 16 h dejando que se calentara a TA. Se añadió Na₂HPO₄ (163 g en 2,7 l de H₂O) para enfriar y la reacción se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron secuencialmente con salmuera, NaHSO₃ ac. (29,91 g en 680 ml de H₂O) y salmuera. La reacción se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El sólido residual se trituró en un volumen mínimo de MeCN, dando ácido 8-oxooctadecanoico (40,9 g, 74,7 %).

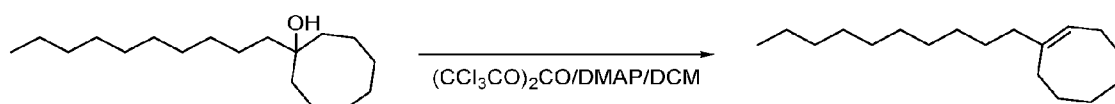
Ejemplo de preparación 15. Síntesis de ácidos oxocarboxílicos. Método (b) ilustrado mediante la síntesis de ácido 8-oxooctadecanoico

Etapa 1. Síntesis de 1-decilciclooctan-1-ol



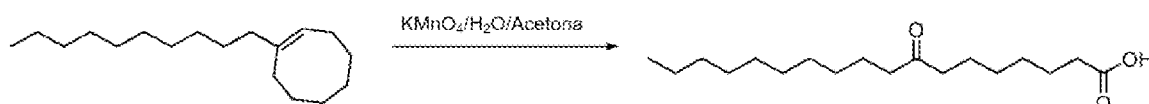
Se agitó bromo(decil)magnesio (22,2 g, 90,4 mmol) a 10 °C en THF (150 ml). Se añadió gota a gota ciclooctanona (9,3 g, 72 mmol) en THF (50 ml). Tras la adición completa, la reacción se enfrió a 0 °C, y se inactivó con agua (100 ml) y HCl 6 M (400 ml). Los extractos orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc-hexano), dando 1-decilciclooctano-1-ol (14,2 g, 73,1 %).

Etapa 2. Síntesis de (Z)-1-decilciclooct-1-eno



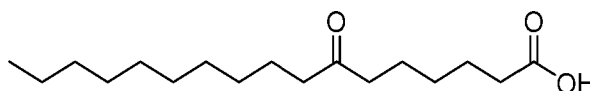
Se agitaron 1-decilociclooctano-1-ol (7,71 g, 28,8) y DMAP (7,0 g, 57,4 mmol) en DCM (77,1 ml) a 0 °C. Se añadió gota a gota trifosgeno (4,3 g, 14,4 mmol) en DCM (40 ml). La reacción se agitó durante 3 h dejando que se calentara a TA y después se inactivó con HCl 2 M. Los extractos orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (100 % de hexano), dando (Z)-1-decilociclooct-1-eno (7,2 g, 76,5 %).

Etapa 3. Síntesis de ácido 8-oxooctadecanoico

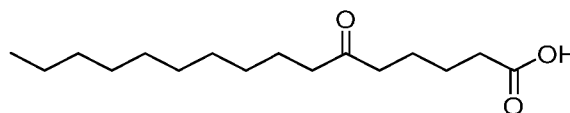


Se agitó (1Z)-1-decilociclooct-1-eno (5,5 g, 22 mmol) en acetona (55 ml) y H_2O (5,5 ml) a 0 °C. Se añadió KMnO_4 (17,4 g, 110 mmol) en partes a lo largo de 4 h mientras se mantenía la temperatura a 0 °C. La reacción se agitó durante 18 h dejando que se calentara a TA, y después se inactivó con la adición alterna de bisulfito sódico y HCl 6 M. La reacción se dividió entre HCl 1 M y EtOAc y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (5-30 % de EtOAc-hexano), dando ácido 8-oxooctadecanoico (3,7 g, 56,0 %).

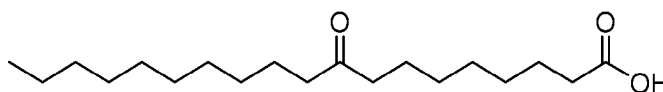
Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente:



Ácido 7-oxoheptadecanoico

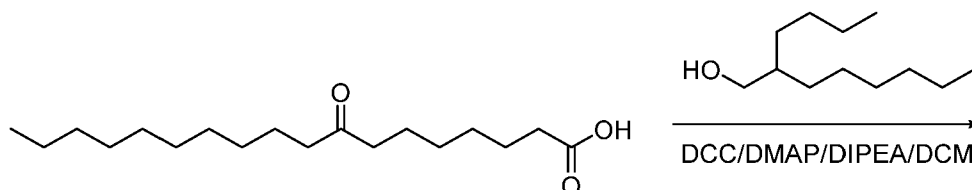


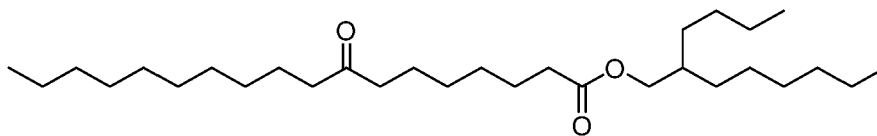
Ácido 6-oxohexadecanoico



Ácido 9-oxononadecanoico

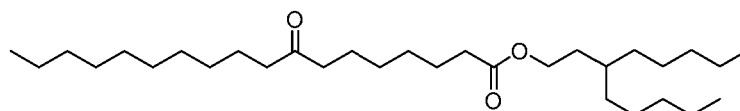
Ejemplo de preparación 16. Síntesis de Oxoésteres ilustrada mediante la síntesis de 8-oxooctadecanoato de 2-butilotilo





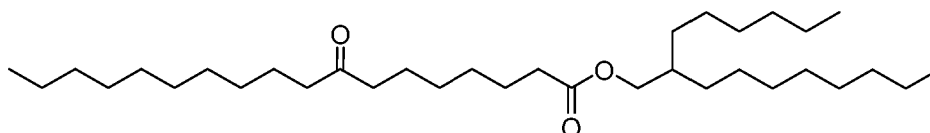
Se agitaron ácido 8-oxooctadecanoico (1 g, 3,4 mmol), butiloctanol (687 mg, 3,7 mmol), DCC (1,4 g, 6,7 mmol) y DMAP (20 mg, 0,17 mmol) en DCM a TA durante 1,5 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se suspendió en
 5 hexanos y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-25 % de EtOAc/Hex), dando 8-oxooctadecanoato de 2-butilo (1,1 g, 68,9 %).

Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga descrita anteriormente



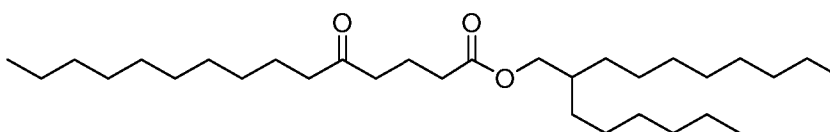
10

8-Oxooctadecanoato de 3-pentiloctilo



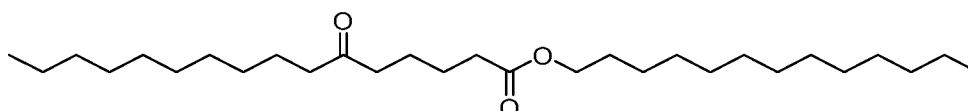
15

8-Oxooctadecanoato de 2-hexildecilo



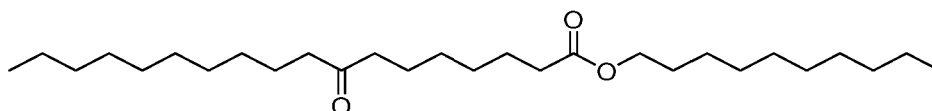
20

5-Oxopentadecanoato de 2-hexildecilo

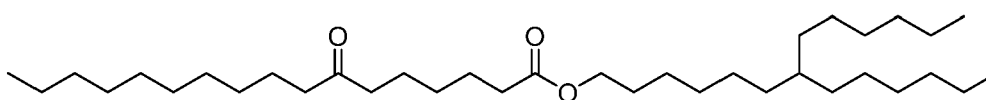


25

6-Oxohexadecanoato de tridecilo

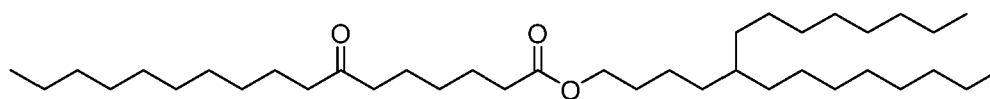


8-Oxooctadecanoato de decilo



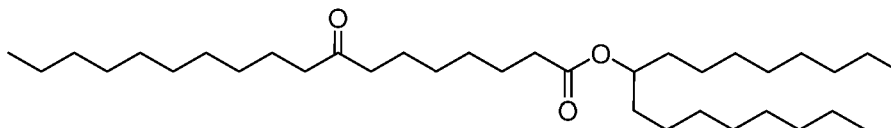
30

7-Oxoheptadecanoato de 7-hexiltridecilo

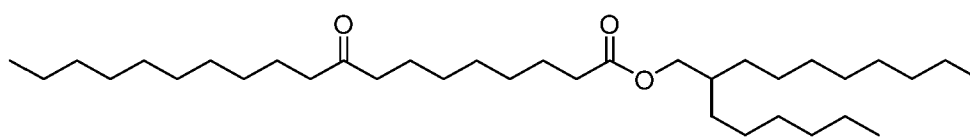


7-Oxoheptadecanoato de 5-octiltridecilo

5

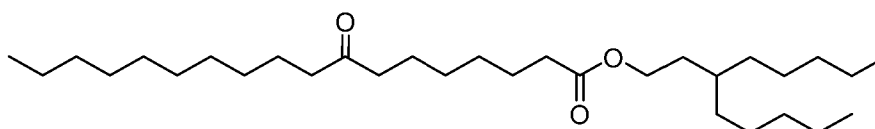


8-Oxo-octadecanoato de heptadecan-9-ilo



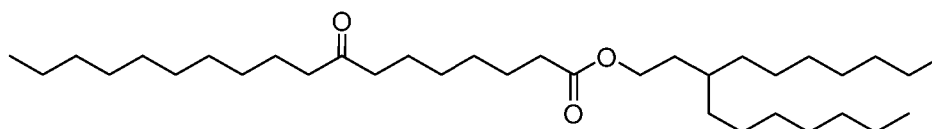
9-Oxononadecanoato de 2-hexildecilo

10



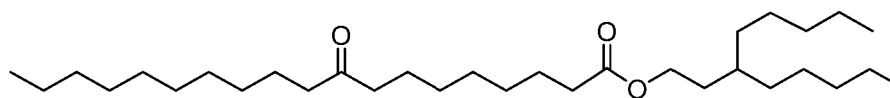
8-Oxo-octadecanoato de 3-pentiloctilo

15



8-Oxo-octadecanoato de 3-heptildecilo

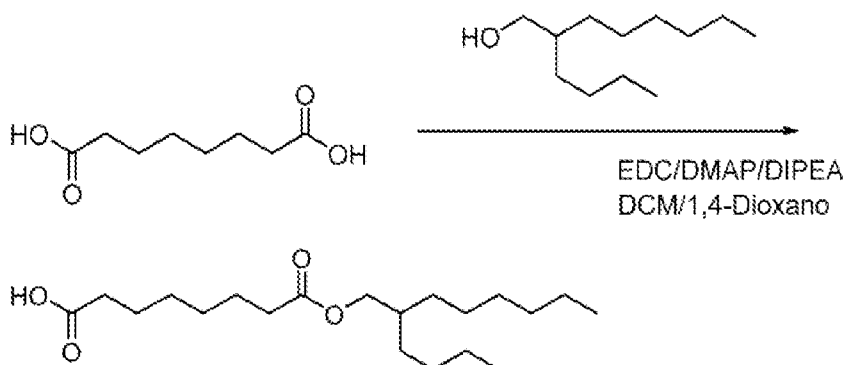
20



9-Oxononadecanoato de 3-pentiloctilo

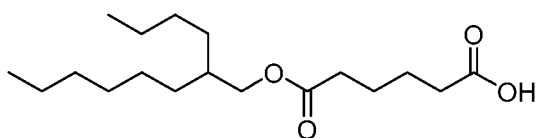
25

Ejemplo de preparación 17. Síntesis del ácido 8-[(2-butiloctil)oxi]-8-oxooctanoico

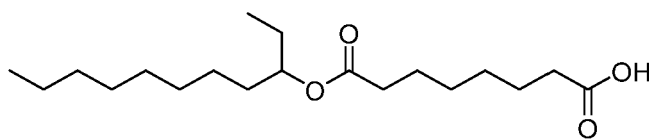


Se agitaron ácido subérico (5 g, 28,7 mmol), butiloctanol (5,4 g, 28,7 mmol), EDC (5,8 g, 30,1 mmol), DIPEA (10 ml, 57,4 mmol) y DMAP (cat.) en DCM (10 ml) y 1,4 dioxano (180 ml) a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en DCM, se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (5-30 % de EtOAc-hexano), dando ácido 8-[(2-butiloctil)oxi]-8-oxooctanoico (4,4 g, 45,0 %).

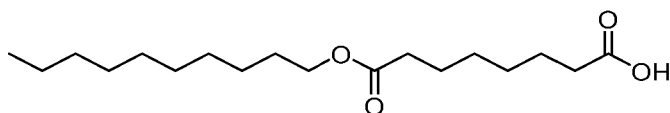
Los siguientes compuestos se prepararon utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente



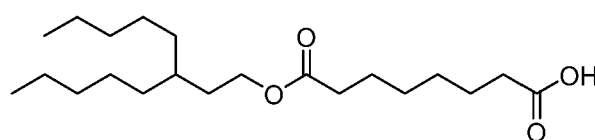
Ácido 6-((2-butiloctil)oxi)-6-oxohexanoico



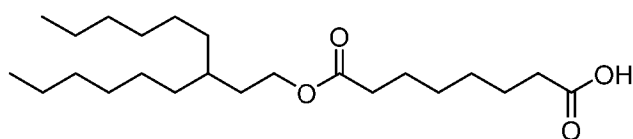
Ácido 5-8-oxo-8-(undecan-3-iloxi)octanoico



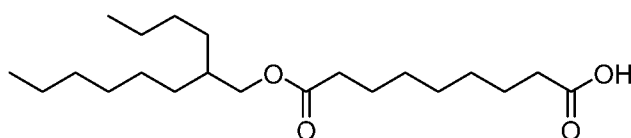
Ácido 8-(diciloxi)-8-oxooctanoico



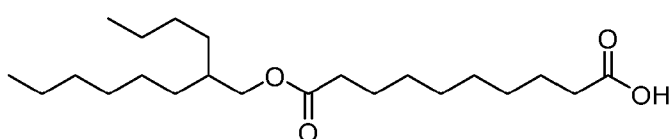
Ácido 8-oxo-8-((3-pentiloxil)oxi)octanoico



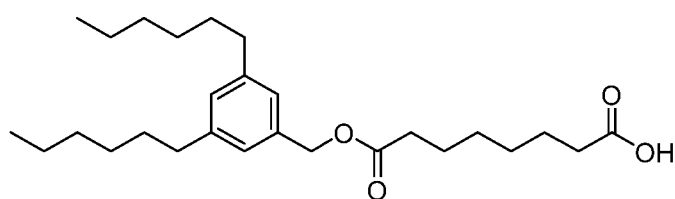
Ácido 8-((3-hexilnonil)oxi)-8-oxooctanoico



Ácido 9-((2-butiloctil)oxi)-9-oxononanoico



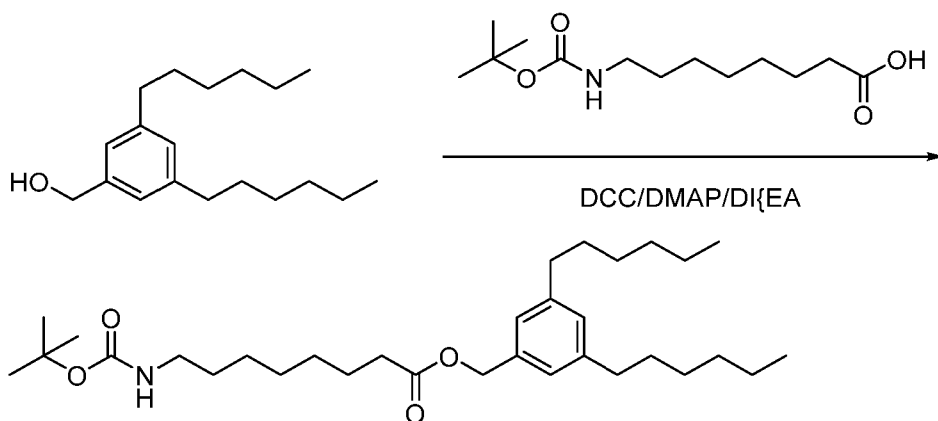
Ácido 10-((2-butiloctil)oxi)-10-oxodecanoico



Ácido 8-((3,5-dihexilbencil)oxi)-8-oxooctanoico

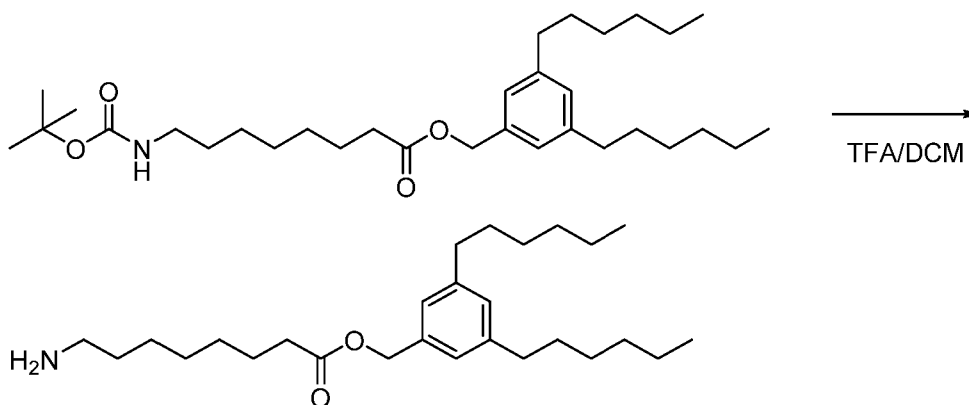
5 **Ejemplo de preparación 18. Síntesis de 8-aminooctanoato de 3,5-dihexilbencilo**

Etapla 1. Síntesis de 8-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]octanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo



10 Se agitaron (3,5-dihexilfenil)metanol (3,0 g, 10,9 mmol), ácido 8-((*tert*-butoxicarbonil)amino)acético (2,8 g, 10,9 mmol), DCC (2,5 g, 11,9 mmol), DIPEA (3,8 ml, 21,7 mmol) y DMAP (133 mg, 1,1 mmol) en DCM a TA durante 16 h. El precipitado resultante se retiró por filtración, el filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (10 % de EtOAc/Hex), dando (3,5-dihexilfenil)metil 8-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]octanoato (1,81 g, 32,2 %).

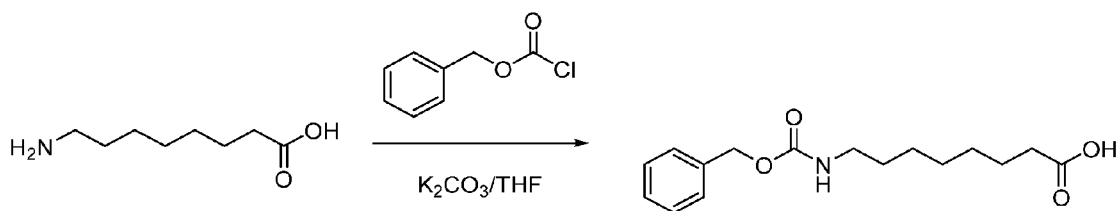
Etapla 2. Síntesis de 8-aminooctanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo



20 Se agitó (3,5-dihexilfenil)metil 8-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]octanoato (1,8 g, 3,5 mmol) en una solución de TFA al 20 % a TA en DCM durante 1 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en DCM y se convirtió en la base libre con NaOH 1 M. Los extractos orgánicos se separaron, se secaron (MgSO_4) y se concentraron al vacío, dando 8-aminooctanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo (1,35 g, 93,0 %) que se usó sin purificación.

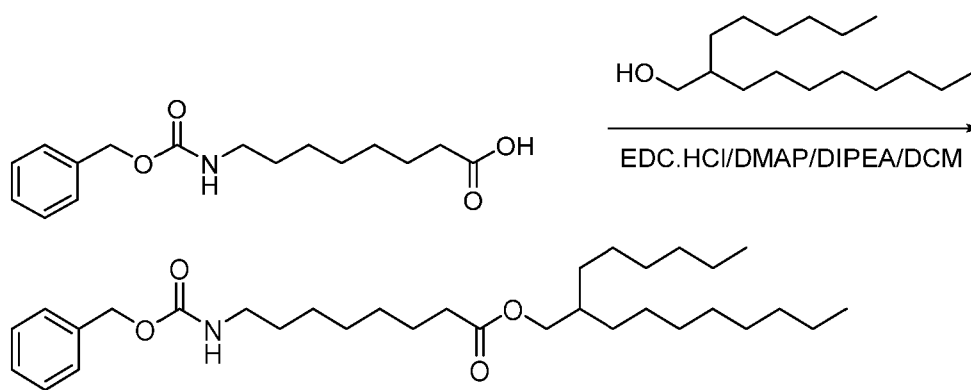
25 **Ejemplo de preparación 19. Síntesis de 8-aminooctanoato de 2-hexildecilo**

Etapla 1. Síntesis de ácido 8-[[benciloxi]carbonil]amino]octanoico



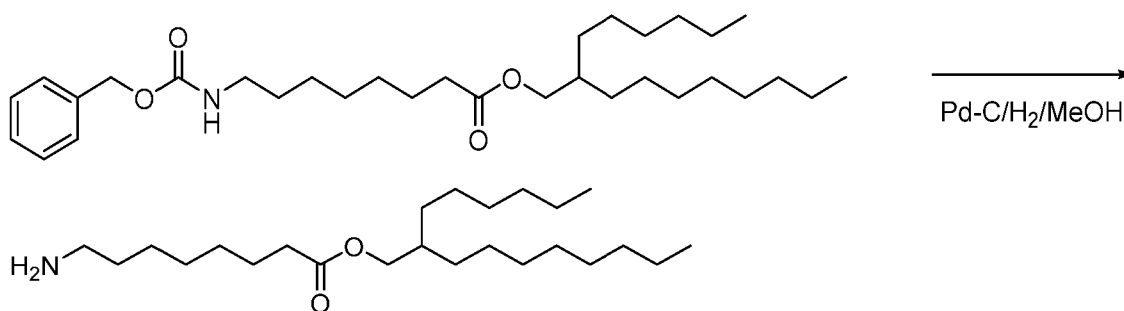
Se agitaron ácido 8-cianofenilborónico (5 g, 31,4 mmol), K_2CO_3 (8,7 g, 63 mmol) y cloroformato de bencilo (7,0 ml, 47,1 mmol) en THF (150 ml) a TA durante 16 h. La reacción se acidificó (HCl 6 M) y se concentró al vacío. El residuo se dividió entre DCM (100 ml) y H_2O agua (100 ml) y el extracto acuoso se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 8-[[*(benciloxi)carbonil*]amino]octanoico (8,4 g, 91,2 %) que se usó sin purificación.

Etapa 2. Síntesis de 8-[[*(benciloxi)carbonil*]amino]octanoato de 2-hexildecilo



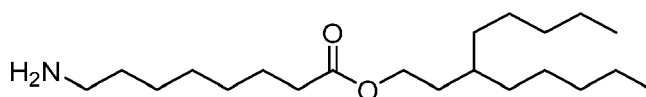
Se agitaron ácido 8-[[*(benciloxi)carbonil*]amino]octanoico (1,05 g, 3,6 mmol), HCl de EDC (1,4 g, 7,2 mmol), hexildecanol (1,0 g, 4,0 mmol), DMAP (22 mg, 0,18 mmol) y DIPEA (1,9 ml, 10,7 mmol) en DCM (25 ml) a TA durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, se recogió en EtOAc (100 ml), se lavó con solución saturada de $NaHCO_3$ y salmuera, se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-50 % de EtOAc/hexanos), dando 8-[[*(benziloxi)carbonil*]amino]octanoato de 2-hexildecilo (1,45 g, 64,5 %).

Etapa 3. Síntesis de 8-aminooctanoato de 2-hexildecilo

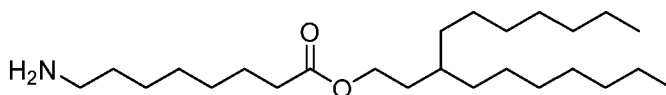


Se sometió 8-[[*(benciloxi)carbonil*]amino]octanoato de 2-hexildecilo (1 g, 1,9 mmol) a hidrogenación catalítica sobre paladio en carbono al 10 % (100 mg) en MeOH (25 ml) a TA durante 16 h. La reacción se filtró a través de celite y se concentró al vacío, dando 8-aminooctanoato de 2-hexildecil (0,71 g, 95,8 %).

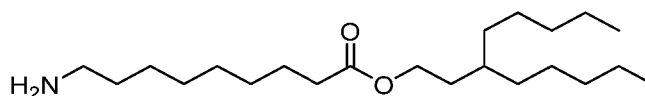
Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.



8-Aminooctanoato de 3-pentiloctilo

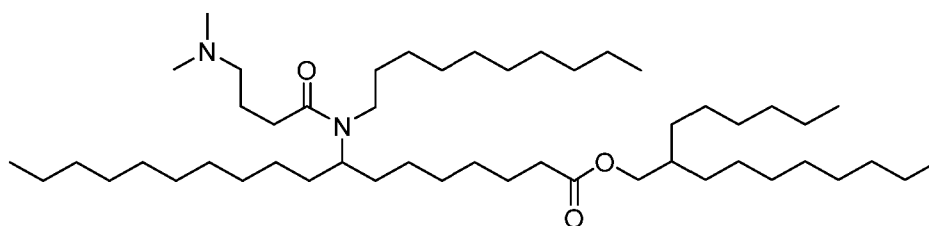


8-Aminooctanoato de 3-epitildecilo



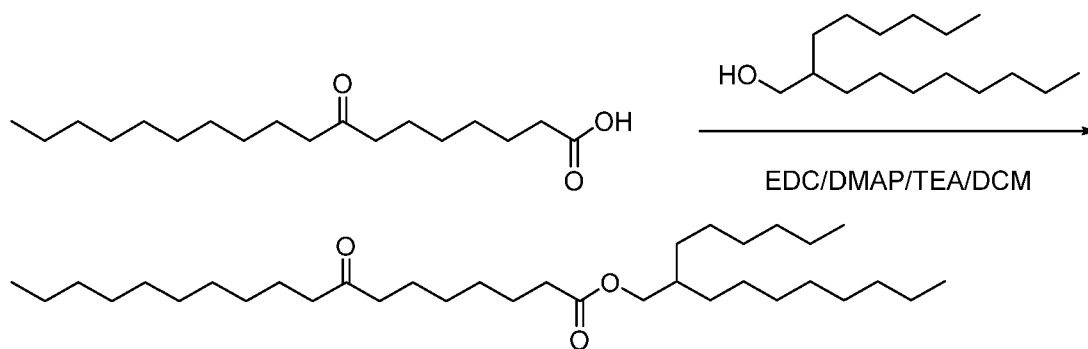
9-Aminononanoato de 3-pentiloctilo

Ejemplo 1. Síntesis de 8-(N-decil-4-(dimetilamino)butanamido)-octadecanoato de 2-hexildecilo (1)



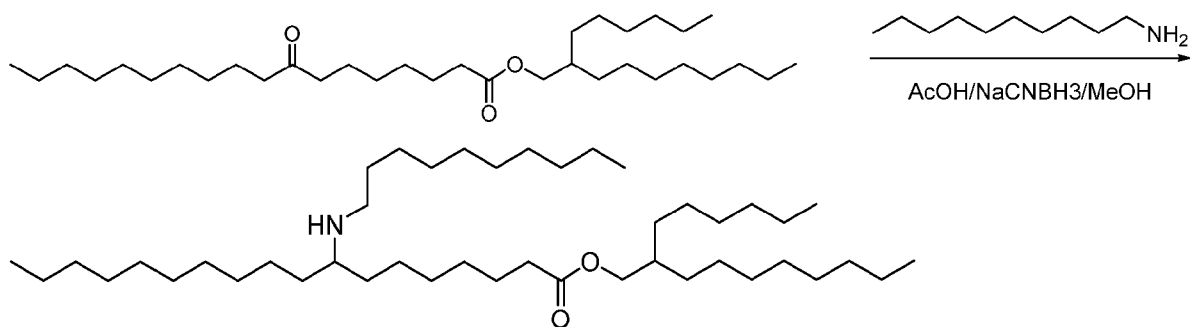
(1)

Etapla 1. Síntesis de 8-oxooctadecanoato de 2-hexildecilo



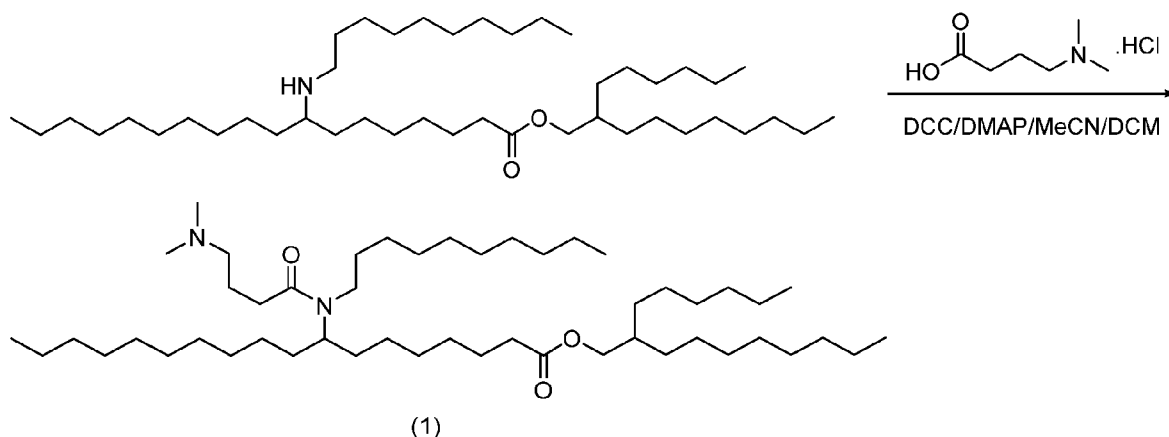
Se agitaron ácido 8-oxooctadecanoico (1 g, 3,4 mmol), hexildecanol (894 mg, 3,7 mmol), EDC (1,29 g, 6,7 mmol), DIPEA (1,8 ml, 10,1 mmol) y DMAP (cat.) en DCM (30 ml) a TA durante 18 h. La reacción se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO_3 (sat.) y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc-hexano), dando 8-oxooctadecanoato de 2-hexildecilo (1,33 g, 75,9 %).

Etapla 2. Síntesis de 8-(decilamino)octadecenoato de 2-hexildecilo



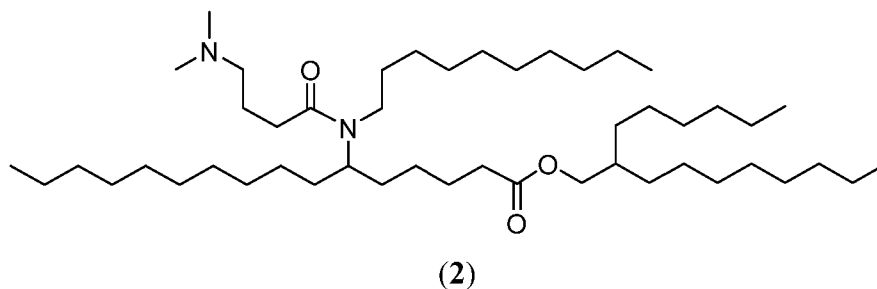
Se calentaron 8-oxooctadecanoato de 2-hexildecilo (933 mg, 1,8 mmol), N-decilamina (0,3 g, 1,9 mmol), NaCNBH₃ (340 mg, 5,4 mmol) y AcOH (0,2 g, 3,6 mmol) en MeOH (10 ml) a 50 °C durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en DCM y se lavó con NaHCO₃ (sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-5 % de MeOH-DCM), dando 8-(decilamino)octadecenoato de 2-hexildecilo (447 mg, 37,7 %).

Etapa 3. Síntesis de 8-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-octadecenoato de 2-hexildecilo (1)

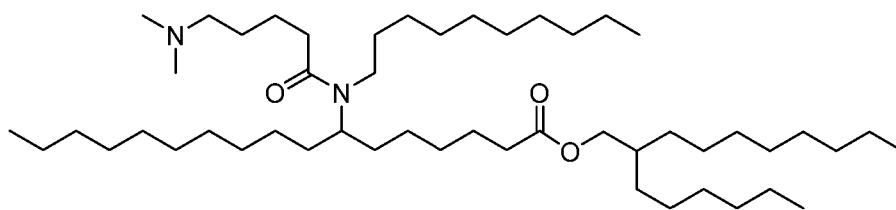


Se agitaron ácido 4-dimetilaminobutanoico (HCl) (0,38 g, 2,2 mmol), DCC (0,51 g, 2,5 mmol) y DMAP (0,41 g, 3,4 mmol) en MeCN (6 ml) a TA durante 3 horas. Se añadió una solución de 8-(decilamino)octadecenoato de 2-hexildecilo (744 mg, 1,1 mmol) en DCM (8 ml) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se concentró, se dispersó en hexano:EtOAc: TEA (75:25:1), se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando 8-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]octadecenoato de 2-hexildecilo (**1**) (230 mg, 26,4 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,01-3,92 (m, 2H), 3,63 (s, 1H), 3,10-2,97 (m, 2H), 2,31 (h, J = 6,6 Hz, 6H), 2,22 (s, 6H), 1,82 (c, J = 7,7 Hz, 2H), 1,48 (d, J = 36,9 Hz, 10H), 1,27 (s, 58H), 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 12H).

Los siguientes compuestos se prepararon utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente

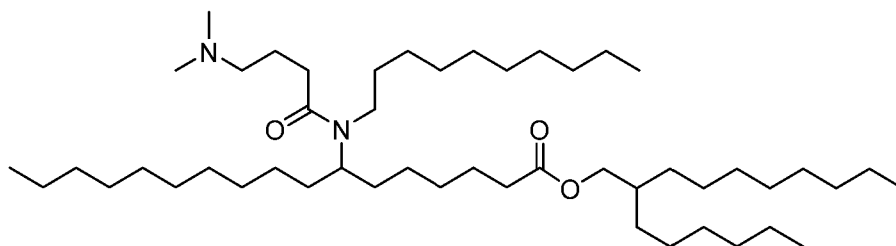


6-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)hexadecanoato de 2-hexildecilo (2). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,95 (d, J = 5,7 Hz, 2H), 3,65 (s, 1H), 3,09-2,98 (m, 2H), 2,31 (dt, J = 15,3, 7,4 Hz, 6H), 2,21 (s, 6H), 1,82 (c, J = 7,7 Hz, 2H), 1,48 (d, J = 29,4 Hz, 10H), 1,27 (s, 54H), 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 12H).



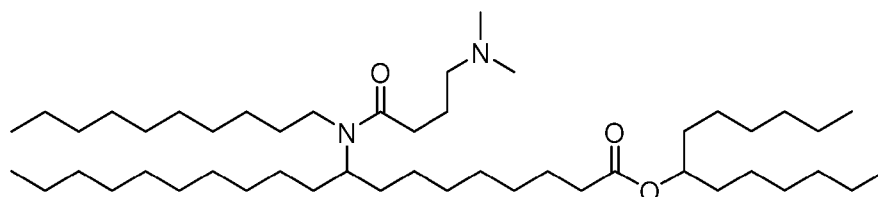
(3)

7-(N-Decil-5-(dimetilamino)pentanamido)heptadecanoato de 2-hexildecilo (3). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,98 (dd, $J = 5,8, 3,9$ Hz, 2H), 3,70-3,57 (m, 1H), 3,04 (s, 2H), 2,31 (dt, $J = 7,5, 5,8, 3,0$ Hz, 6H), 2,24 (s, 6H), 1,75-1,40 (m, 17H), 1,28 (p, $J = 5,4$ Hz, 55H), 0,90 (td, $J = 6,8, 2,1$ Hz, 12H).



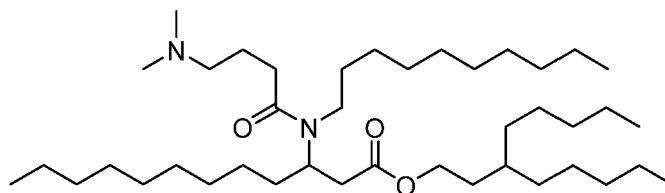
(4)

7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)heptadecanoato de 2-hexildecilo (4). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,98 (dd, $J = 5,8, 4,1$ Hz, 2H), 3,72-3,60 (m, 1H), 3,06 (c, $J = 7,7$ Hz, 2H), 2,39-2,27 (m, 6H), 2,24 (d, $J = 1,1$ Hz, 6H), 1,85 (h, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,72-1,40 (m, 13H), 1,29 (dc, $J = 10,3, 6,5$ Hz, 55H), 0,90 (td, $J = 6,8, 2,3$ Hz, 12H).



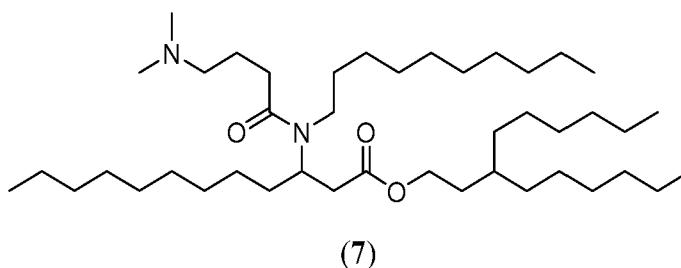
(5)

9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)nonadecanoato de tridecano-7-ilo (5). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,88 (c, $J = 6,4$ Hz, 1H), 3,66 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 3,06 (c, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,39-2,25 (m, 6H), 2,24 (s, 6H), 1,84 (h, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,72-1,40 (m, 17H), 1,29 (d, $J = 8,9$ Hz, 57H), 0,90 (t, $J = 6,4$ Hz, 12H).

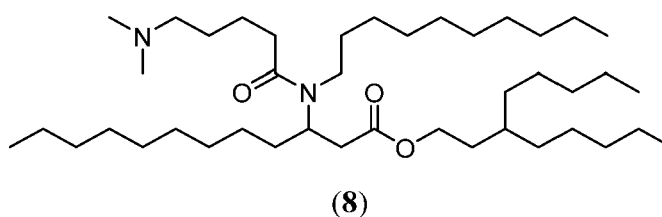


(6)

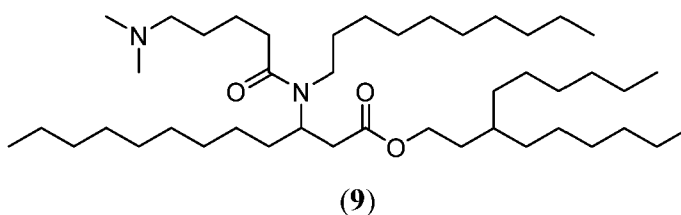
3-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)dodecanoato de 3-pentiloctilo (6). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,37-4,16 (m, 1H), 4,08 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,17 (tt, $J = 8,4, 4,9$ Hz, 1H), 2,83-2,35 (m, 3H), 2,32 (cd, $J = 8,0, 1,8$ Hz, 3H), 2,24 (m, 6H), 1,83 (cd, $J = 7,6, 5,3$ Hz, 2H), 1,58 (c, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,50 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H), 1,29 (dd, $J = 13,2, 5,6$ Hz, 12H).



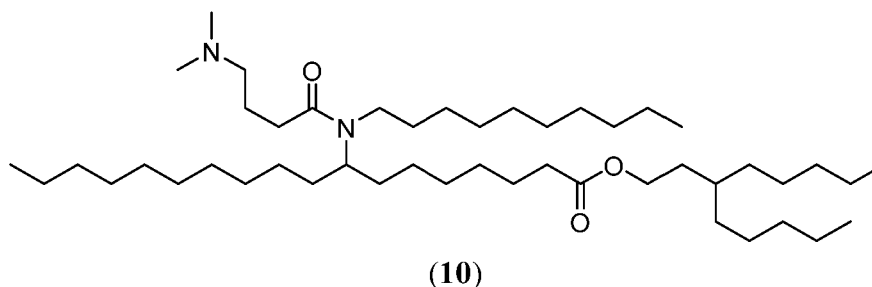
- 5 **3-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)dodecanoato de 3-hexilnonilo (7).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,36-4,19 (m, 1H), 4,08 (c, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,17 (tt, $J = 8,1$, 4,7 Hz, 2H), 2,77-2,36 (m, 4H), 2,32 (cd, $J = 7,7$, 2,2 Hz, 3H), 2,24 (m, 6H), 1,83 (cd, $J = 7,6$, 5,1 Hz, 2H), 1,76 (s, 1H), 1,55 (dh, $J = 24,3$, 6,8 Hz, 5H), 1,37-1,18 (m, 47H), 0,90 (t, $J = 6,8$ Hz, 12H).



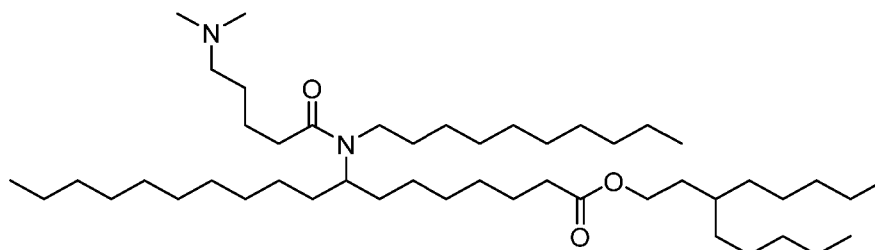
- 10 **3-(N-Decil-5-(dimetilamino)pentanamido)dodecanoato de 3-pentiloctilo (8).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,35-4,15 (m, 1H), 4,08 (c, $J = 7,5$ Hz, 2H), 3,23-3,09 (m, 1H), 3,06-2,91 (m, 1H), 2,80-2,33 (m, 3H), 2,29 (ddd, $J = 7,7$, 6,1, 3,9 Hz, 3H), 2,23 (d, $J = 1,2$ Hz, 6H), 1,66 (p, $J = 7,5$ Hz, 3H), 1,61-1,45 (m, 7H), 1,37-1,14 (m, 44H), 0,90 (td, $J = 6,9$, 2,7 Hz, 12H).



- 15 **3-(N-Decil-5-(dimetilamino)pentanamido)dodecanoato de 3-hexilnonilo (9).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,26 (s, 1H), 4,08 (c, $J = 7,5$ Hz, 2H), 3,21-3,08 (m, 1H), 2,78-2,33 (m, 3H), 2,29 (ddd, $J = 7,5$, 6,1, 3,7 Hz, 3H), 2,23 (d, $J = 1,2$ Hz, 6H), 1,67 (p, $J = 7,5$ Hz, 3H), 1,61-1,45 (m, 7H), 1,28 (t, $J = 5,7$ Hz, 49H), 0,90 (td, $J = 6,9$, 2,5 Hz, 12H).

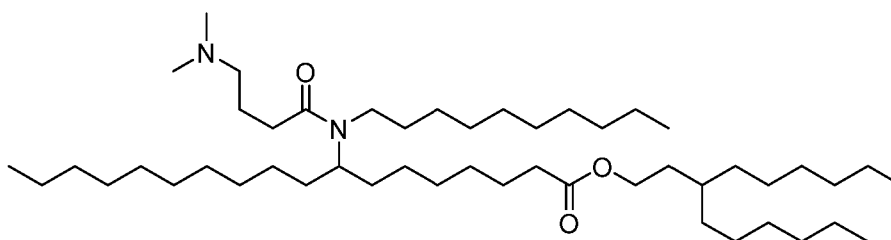


- 20 **8-(N-decil-4-(dimetilamino)butanamido)octadecenoato de 3-pentiloctilo (10)** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,1$, 2,8 Hz, 2H), 3,05 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H), 2,40 (dd, $J = 20,2$, 11,9 Hz, 6H), 2,29 (td, $J = 7,6$, 4,9 Hz, 3H), 1,65-1,54 (m, 6H), 1,44 (c, $J = 6,2$ Hz, 5H), 1,29 (d, $J = 10,3$ Hz, 52H), 0,90 (td, $J = 6,9$, 2,7 Hz, 12H), 0,09 (s, 2H).



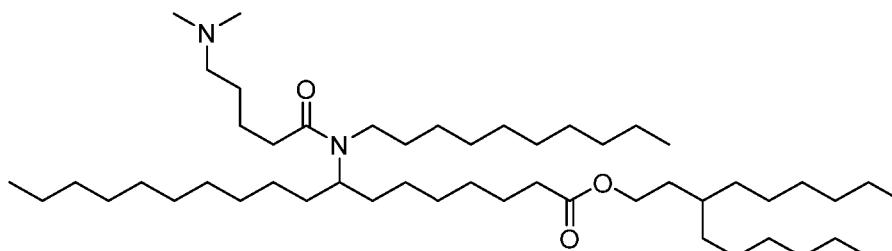
(11)

5 **8-(N-Decil-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecenoato de 3-pletilo (11).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,1, 2,8$ Hz, 2H), 3,04 (t, $J = 8,3$ Hz, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,36-2,26 (m, 6H), 1,64-1,55 (m, 6H), 1,53 (s, 2H), 1,45 (s, 5H), 1,29 (d, $J = 10,2$ Hz, 48H), 0,90 (td, $J = 6,9, 2,9$ Hz, 12H).



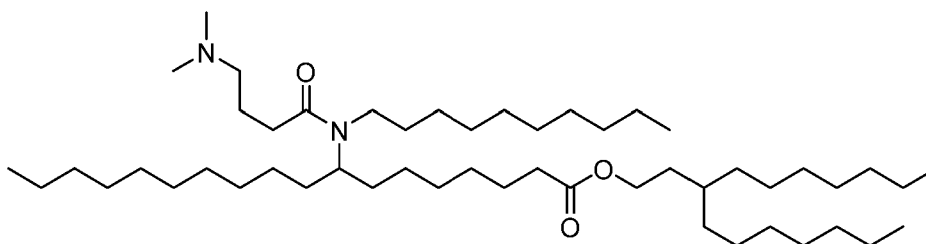
(12)

10 **8-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)octadecenoato de 3-hexilnonilo (12).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,1, 3,0$ Hz, 2H), 3,06 (c, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,47 (s, 1H), 2,42-2,34 (m, 6H), 2,29 (td, $J = 7,6, 5,1$ Hz, 4H), 1,96-1,88 (m, 2H), 1,66-1,51 (m, 7H), 1,44 (d, $J = 7,0$ Hz, 5H), 1,29 (d, $J = 9,5$ Hz, 56H), 0,90 (td, $J = 6,9, 2,4$ Hz, 12H).



(13)

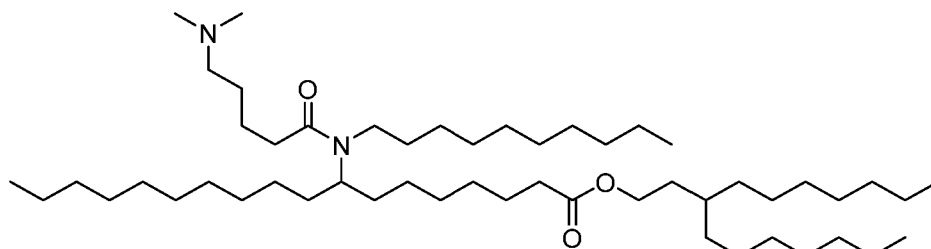
15 **8-(N-Decil-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecenoato de 3-hexilnonilo (13).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,1, 2,7$ Hz, 2H), 3,08-2,99 (m, 2H), 2,47 (s, 2H), 2,34 (d, $J = 7,1$ Hz, 6H), 2,29 (td, $J = 7,5, 5,6$ Hz, 3H), 1,75-1,54 (m, 10H), 1,45 (s, 5H), 1,29 (d, $J = 9,9$ Hz, 56H), 0,90 (td, $J = 6,8, 2,3$ Hz, 12H).



(14)

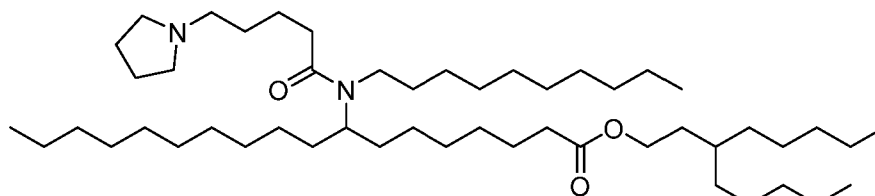
20 **8-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)octadecenoato de 3-heptildecilo (14).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,09 (td, $J = 7,1, 2,9$ Hz, 2H), 3,06 (c, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,62 (s, 2H), 2,40 (dt, $J = 9,5, 7,0$ Hz, 6H), 2,29 (td, $J = 7,5, 5,0$ Hz, 2H), 1,98 (s, 2H), 1,59 (tc, $J = 16,8, 8,3$ Hz, 6H), 1,44 (d, $J = 7,2$ Hz, 5H), 1,29 (d, $J = 9,8$ Hz, 61H), 0,90 (td, $J =$

6,8, 2,1 Hz, 12H).



(15)

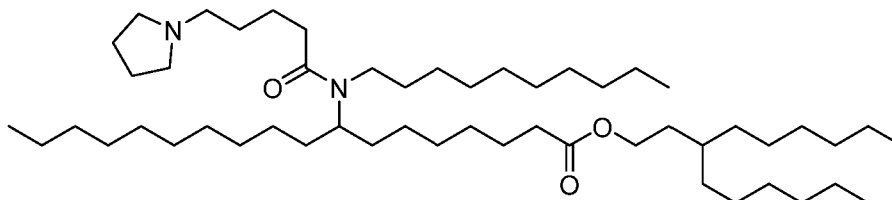
- 5 **8-(N-Decil-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecenoato de 3-heptildecilo (15).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,09 (td, $J = 7,1, 2,6$ Hz, 2H), 3,04 (c, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,67 (s, 2H), 2,53 (s, 6H), 2,41-2,24 (m, 4H), 1,72 (s, 4H), 1,60 (dc, $J = 13,8, 7,0$ Hz, 7H), 1,49-1,38 (m, 5H), 1,29 (d, $J = 9,3$ Hz, 59H), 0,90 (td, $J = 6,9, 2,2$ Hz, 12H).



(89)

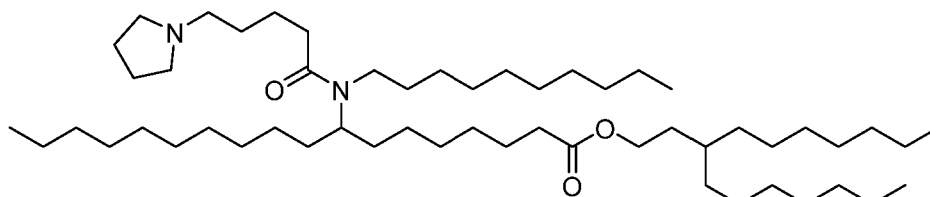
- 10 **8-(N-Decil-5-(pirrolidin-1-il)pentanamido)octadecanoato de 3-pentiloctilo (89).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,1, 3,1$ Hz, 2H), 3,04 (dd, $J = 11,3, 7,0$ Hz, 2H), 2,54-2,42 (m, 6H), 2,30 (ddd, $J = 15,2, 7,7, 5,3$ Hz, 4H), 1,83-1,75 (m, 4H), 1,70 (dc, $J = 16,0, 7,7$ Hz, 3H), 1,64-1,50 (m, 11H), 1,49-1,41 (m, 5H), 1,29 (d, $J = 11,0$ Hz, 53H), 0,90 (td, $J = 6,9, 2,8$ Hz, 12H).

15



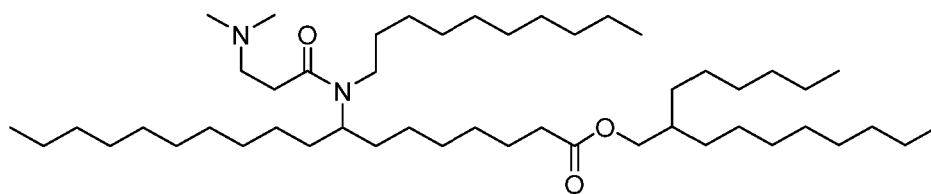
(90)

- 20 **8-(N-Decil-5-(pirrolidin-1-il)pentanamido)octadecanoato de 3-hexilnonilo (90).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,1, 3,1$ Hz, 2H), 3,04 (dd, $J = 10,9, 6,4$ Hz, 2H), 2,48 (ddt, $J = 18,2, 7,6, 3,0$ Hz, 6H), 2,30 (ddd, $J = 15,2, 7,7, 5,3$ Hz, 4H), 1,79 (c, $J = 3,2$ Hz, 4H), 1,71 (dd, $J = 10,0, 7,2$ Hz, 3H), 1,66-1,52 (m, 9H), 1,49-1,41 (m, 5H), 1,29 (d, $J = 10,0$ Hz, 55H), 0,90 (td, $J = 6,9, 2,4$ Hz, 12H).



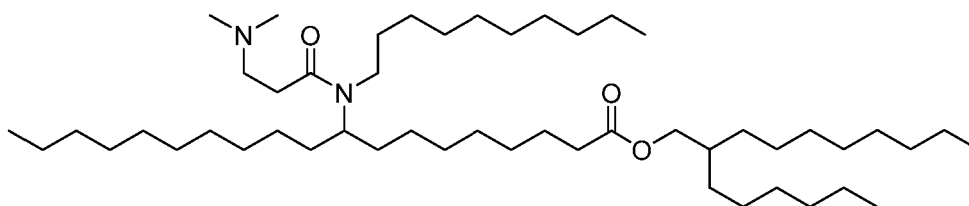
(91)

- 25 **8-(N-Decil-5-(pirrolidin-1-il)pentanamido)octadecanoato de 3-heptildecilo (91).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,1, 3,1$ Hz, 2H), 3,03 (d, $J = 12,6$ Hz, 2H), 2,54-2,42 (m, 6H), 2,30 (ddd, $J = 15,3, 7,7, 5,4$ Hz, 4H), 1,79 (c, $J = 3,6$ Hz, 4H), 1,74-1,65 (m, 2H), 1,63-1,54 (m, 12H), 1,46 (s, 6H), 1,29 (d, $J = 10,0$ Hz, 54H), 0,90 (td, $J = 6,8, 2,3$ Hz, 12H).



(107)

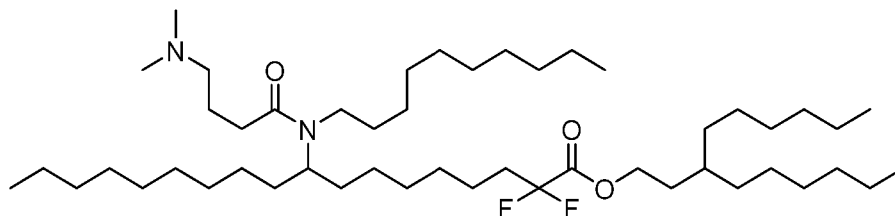
8-(N-Decil-3-(dimetilamino)propanamido)octadecanoato de 2-hexildecilo (107). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,98 (dd, $J = 5,8, 2,7$ Hz, 2H), 3,68-3,57 (m, 1H), 3,10-3,01 (m, 2H), 2,68 (c, $J = 8,1$ Hz, 2H), 2,51 (c, $J = 7,8$ Hz, 2H), 2,35-2,26 (m, 8H), 1,79-1,40 (m, 12H), 1,28 (d, $J = 6,6$ Hz, 64H), 0,90 (c, $J = 4,2$ Hz, 12H).



(119)

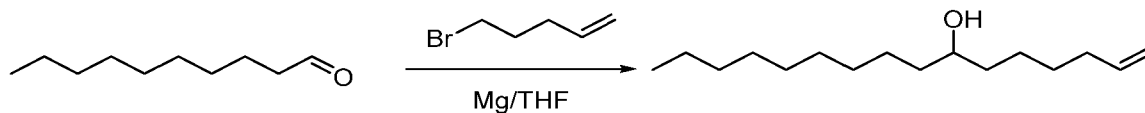
9-(N-Decil-3-(dimetilamino)propanamido)nonadecanoato de 2-hexildecilo (119). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,99 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H), 3,69-3,58 (m, 1H), 3,06 (dd, $J = 10,8, 5,9$ Hz, 2H), 2,70 (dd, $J = 10,9, 6,4$ Hz, 2H), 2,53 (c, $J = 8,1$ Hz, 2H), 2,30 (t, $J = 4,2$ Hz, 8H), 1,71-1,11 (m, 77H), 0,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).

Ejemplo 2. Síntesis de 9-(N-decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorooctadecanoato de 3-hexilnonilo (16)



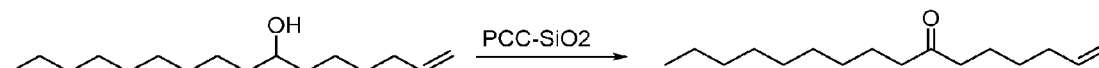
(16)

Etapa 1. Síntesis de hexadec-1-en-7-ol



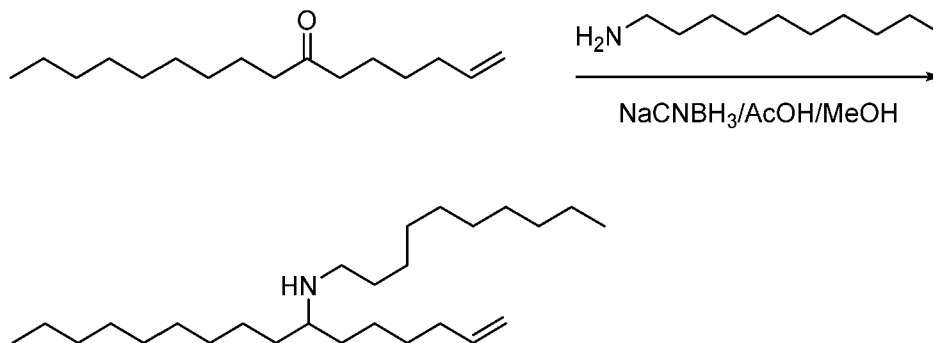
Se preparó un reactivo de Grignard con 6-bromohex-1-eno (70 g, 429 mmol) y magnesio (11,2 g, 459 mmol) en THF (150 ml) y se agitó a 45 °C durante 2 h. La reacción se enfrió a 15 °C y se añadió gota a gota decanal (54 g, 343 mmol) en THF (150 ml). Tras 1 h, la reacción se enfrió (0 °C, baño de hielo) y se inactivó con H_2O seguido de HCl 6 M (350 ml). La reacción se extrajo con hexano, los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna automatizada (2-20 % de EtOAc-hexano), dando hexadec-1-en-7-ol (65 g, rendimiento del 78,7 %).

Etapa 2. Síntesis de hexadec-1-en-7-ona



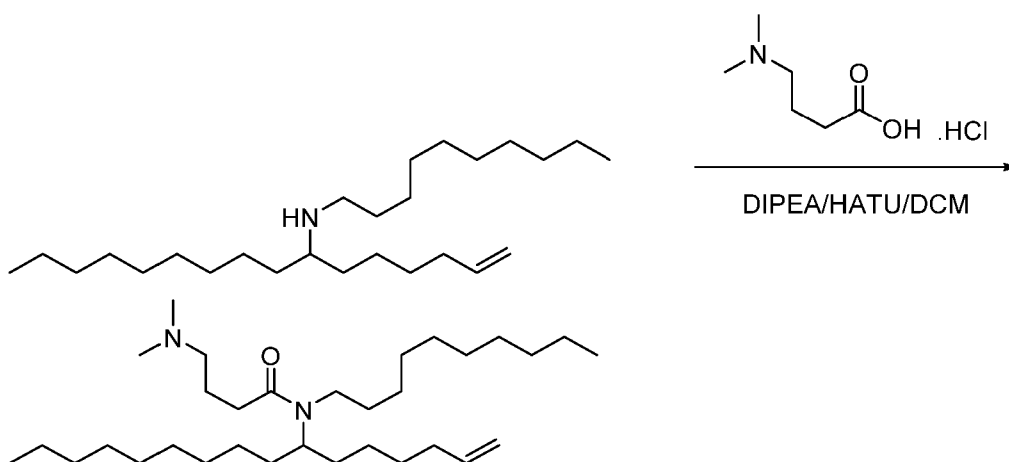
Se agitaron hexadec-1-en-7-ol (65 g, 270 mmol) y el PCC-SiO₂ (1:1) (140 g, 324 mmol) en DCM (600 ml) a TA durante 18 horas. La mezcla se concentró parcialmente al vacío y se eluyó a través de un lecho corto de sílice con EtOAc-hexano (25 %, 700 ml). Los extractos orgánicos combinados se concentraron al vacío y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc-hexano), dando hexadec-1-en-7-ona (59 g, 91,5 %).

Etapla 3. Síntesis de decil(hexadec-1-en-7-il)amina



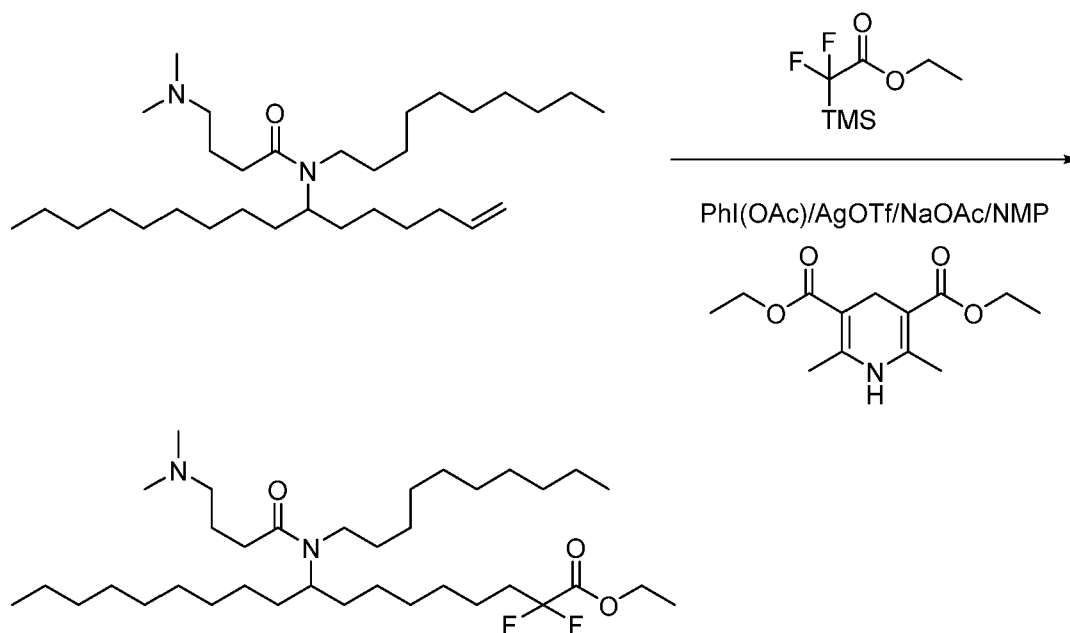
Se agitaron hexadec-1-en-7-ona (59 g, 247 mmol), N-decilamina (40,9 g, 260 mmol), NaCNBH₃ (47 g, 742 mmol) y AcOH (30 g, 495 mmol) en MeOH a 50 °C durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en Et₂O y se lavó secuencialmente con NaHCO₃ (sol. sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando decil(hexadec-1-en-7-il)amina (50 g, 53,2 %).

Etapla 4. Síntesis de N-decil-4-(dimetilamino)-N-(hexadec-1-en-7-il)butanamida



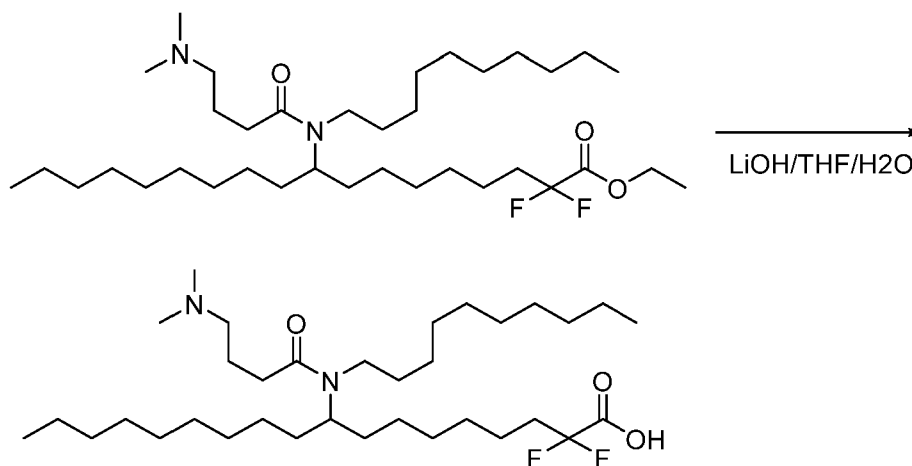
Se agitaron 4-dimetilamino]butanoico (sal HCl) (25,4 g, 151 mmol), HATU (60 g, 158 mmol) y DIPEA (46 ml, 263 mmol) en DCM (500 ml) durante 1 h a TA. Se añadió decil(hexadec-1-en-7-il)amina (25 g, 66 mmol en DCM (65 ml) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en Et₂O y se lavó secuencialmente con NaOH 1 M, NaHCO₃ (sol. sat.), agua y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando N-decil-4-(dimetilamino)-N-(hexadec-1-en-7-il)butanamida (20 g, 61,6 %).

Etapla 5. Síntesis de 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoato de etilo



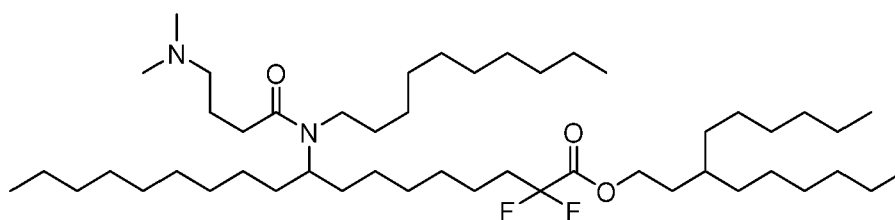
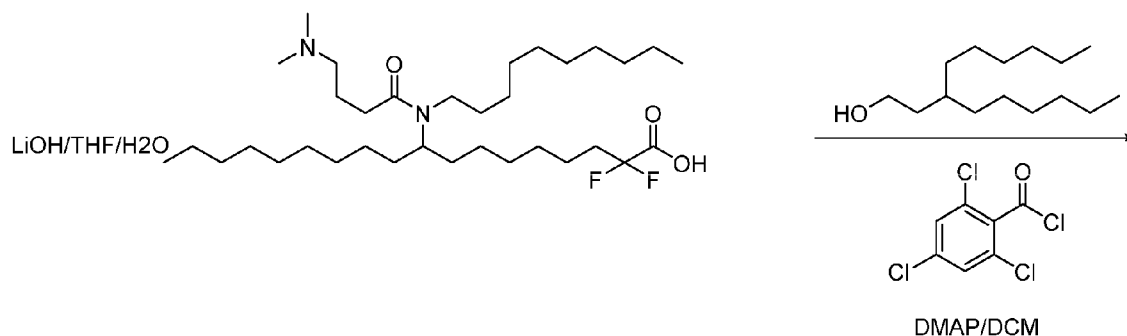
En un matraz al vacío, secado al calor, se añadieron el éster de Hantsch (2,3 g, 9,13 mmol), NaOAc (2,25 g, 27,4 mmol), AgOTf (5,9 g, 22,8 mmol) y diacetato de yodobenceno (5,9 g, 18,3 mmol) y se evacuó el matraz y se volvió a llenar con nitrógeno. Se añadieron NMP (15 ml), N-decil-4-(dimetilamino)-N-(hexadec-1-en-7-il)butanamida (4,5 g, 9,1 mmol) en NMP y 2,2-difluoro-2-(trimetilsilil)acetato de etilo (9,0 g, 46 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La mezcla se filtró a través de Celite, eluyendo con Et₂O. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoato de etilo (5 g, 80,0 %).

Etapa 6. Síntesis del ácido 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoico



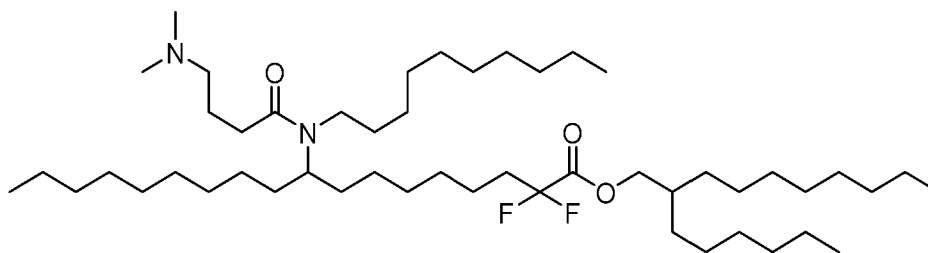
Se agitaron 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoato de etilo (5 g, 8,1 mmol) y LiOH (0,39 g, 16,2 mmol) en THF (50 ml) y H₂O (10 ml) a 50 °C durante 2 h. La reacción se inactivó con HCl 6 M (3,0 ml) y se concentró parcialmente. El residuo acuoso se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se azeotrópico con tolueno (50 ml), dando ácido 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoico que se usó sin purificar.

Etapa 7. Síntesis de 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoato de 3-hexilnonilo



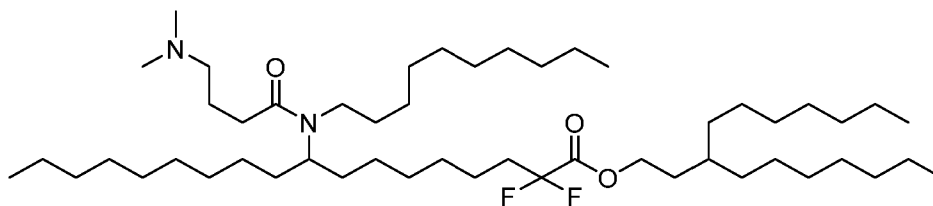
(16)

- 5 Se agitaron ácido 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoico (4 g, 6,8 mmol), 3-hexilnonan-1-ol (1,63 g, 7,1 mmol), cloruro de 2,4,6 triclorobenzóilo (1,8 g, 7,5 mmol) y el DMAP (1,7 g, 13,6 mmol) en DCM (100 ml) a TA durante 3 horas. La reacción se concentró al vacío y el residuo se dividió entre Et₂O y H₂O. Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH-DCM), dando 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoato de 3-hexilnonilo (**16**) (2,44 g, 44,9 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,29 (td, *J* = 7,1, 1,9 Hz, 2H), 3,66 (dd, *J* = 9,4, 4,8 Hz, 1H), 3,06 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,41-2,31 (m, 4H), 2,27 (s, 6H), 2,13-1,96 (m, 2H), 1,87 (h, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,67 (c, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,60-1,39 (m, 9H), 1,28 (c, *J* = 6,6 Hz, 56H), 0,95-0,84 (m, 12H). RMN de ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ -105,9 (2F).
- 15 Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente



(17)

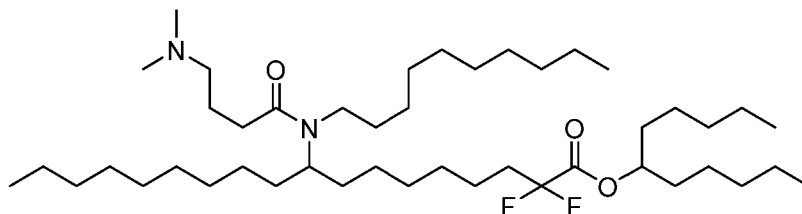
- 20 **9-[N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorooctadecanoato de 2-hexildecilo (17)**. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,18 (dd, *J* = 6,0, 2,0 Hz, 2H), 3,69-3,57 (m, 1H), 3,06 (c, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,57 (s, 2H), 2,46-2,34 (m, 8H), 2,01-1,89 (m, 3H), 1,59-1,40 (m, 8H), 1,38-1,18 (m, 60H), 0,90 (td, *J* = 6,8, 2,7 Hz, 12H).



(18)

9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorooctadecanoato de 3-heptildecilo (18). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,29 (td, $J = 7,1, 1,9$ Hz, 2H), 3,71-3,56 (m, 1H), 3,06 (c, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,42-2,29 (m, 8H), 2,04 (ddt, $J = 16,8, 11,4, 5,3$ Hz, 3H), 1,91 (h, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,67 (c, $J = 6,9$ Hz, 2H), 1,60-1,39 (m, 9H), 1,29 (d, $J = 8,3$ Hz, 53H), 0,90 (td, $J = 6,7, 3,1$ Hz, 12H).

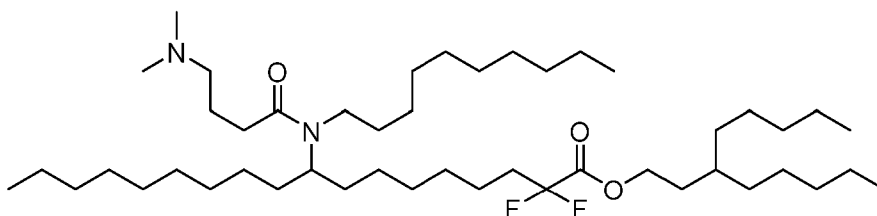
5



(19)

9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorooctadecanoato de undecan-6-ilo (19). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,57 (s, 1H), 3,28 (c, $J = 7,8$ Hz, 2H), 3,06 (dd, $J = 11,9, 5,3$ Hz, 2H), 2,94 (d, $J = 2,3$ Hz, 6H), 2,60 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 2,53 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 2,18-1,75 (m, 11H), 1,70-1,42 (m, 13H), 1,42-1,16 (m, 55H), 0,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).

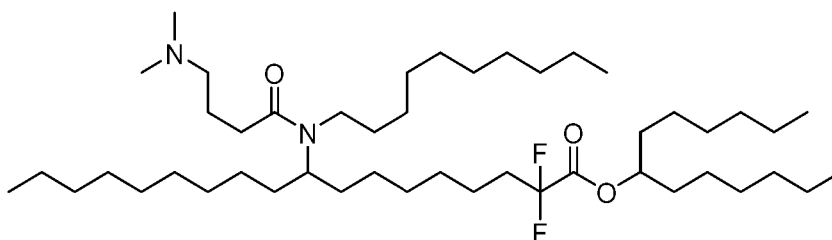
10



(20)

9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorooctadecanoato de 3-pentiloctilo (20). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,29 (td, $J = 7,1, 1,9$ Hz, 2H), 3,71-3,60 (m, 1H), 3,06 (c, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,35 (tdd, $J = 6,6, 4,2, 2,4$ Hz, 4H), 2,26 (s, 6H), 2,13-1,96 (m, 3H), 1,85 (h, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,68 (c, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,60-1,40 (m, 9H), 1,38-1,19 (m, 49H), 0,94-0,86 (m, 12H).

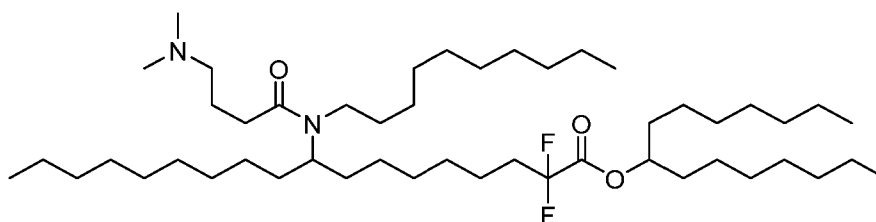
15



(92)

9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorooctadecanoato de tridecan-7-ilo (92). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,02 (p, $J = 6,8$ Hz, 1H), 3,65 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 3,06 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,40-2,31 (m, 4H), 2,29 (s, 6H), 2,16-1,94 (m, 2H), 1,68-1,10 (m, 65H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).

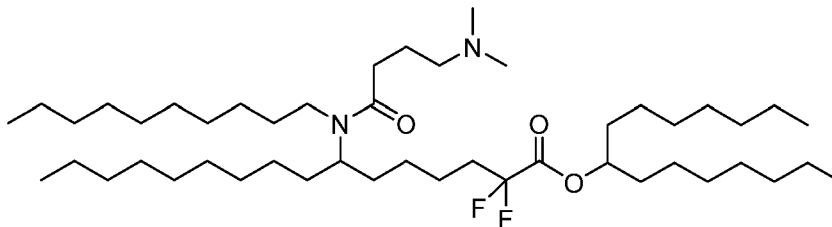
20



(93)

25

9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorooctadecanoato de pentadecan-8-ilo (93). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,09-4,94 (m, 1H), 3,65 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 3,06 (c, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,37 (dt, $J = 14,7, 7,7$ Hz, 4H), 2,30 (s, 6H), 2,20-1,97 (m, 2H), 1,88 (h, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,67-1,08 (m, 68H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).

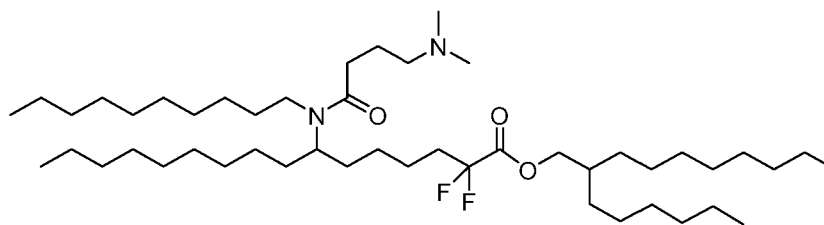


(101)

5

7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorohexadecanoato de pentadecan-8-ilo (101). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,01 (c, $J = 5,8$ Hz, 1H), 3,78-3,57 (m, 1H), 3,15-2,94 (m, 2H), 2,58-2,17 (m, 10H), 2,04 (tc, $J = 16,1, 7,6$ Hz, 2H), 1,88 (h, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,73-1,01 (m, 66H), 0,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).

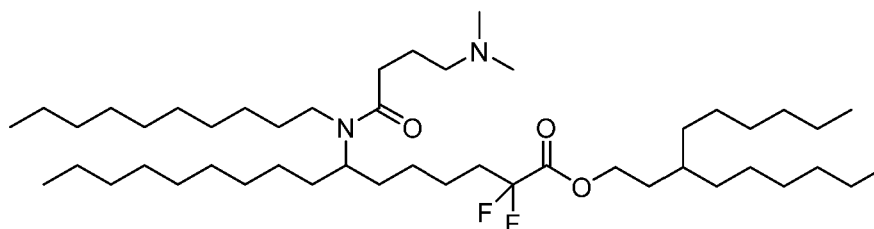
10



(102)

7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorohexadecanoato de 2-hexildecilo (102). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,18 (dd, $J = 5,7, 3,2$ Hz, 2H), 3,71-3,61 (m, OH), 3,05 (dd, $J = 10,6, 6,2$ Hz, 2H), 2,59-2,27 (m, 9H), 2,06 (dp, $J = 16,6, 8,1$ Hz, 1H), 1,92 (c, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,73 (s, 1H), 1,59-1,40 (m, 8H), 1,29 (dt, $J = 10,2, 6,3$ Hz, 53H), 0,90 (td, $J = 6,7, 2,7$ Hz, 12H).

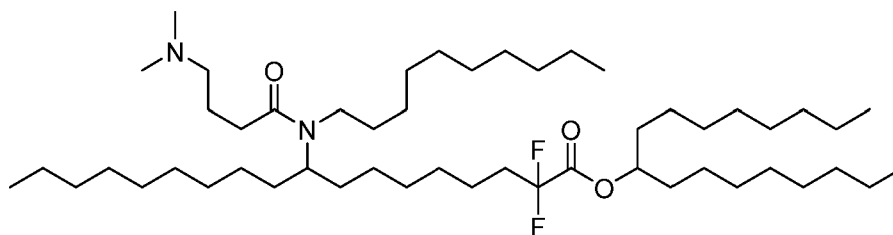
15



(103)

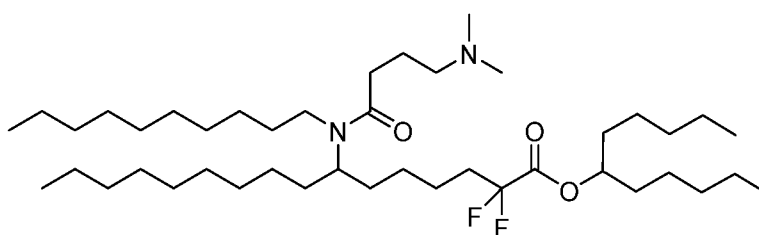
7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorohexadecanoato de 3-hexilnonilo (103). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,29 (td, $J = 7,1, 2,9$ Hz, 2H), 3,65 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 3,05 (dd, $J = 10,5, 6,2$ Hz, 2H), 2,49 (s, 2H), 2,45-2,31 (m, 7H), 2,04 (tt, $J = 16,5, 8,2$ Hz, 2H), 1,91 (p, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,72-1,62 (m, 2H), 1,59-1,40 (m, 13H), 1,29 (d, $J = 8,3$ Hz, 53H), 0,90 (td, $J = 6,8, 3,0$ Hz, 12H).

20



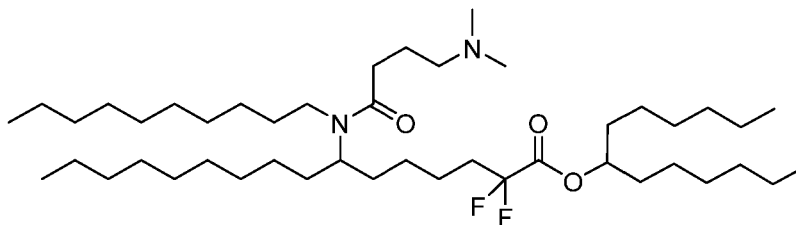
(104)

5 **9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorooctadecanoato de heptadecan-9-ilo (104).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,06-4,96 (m, 1H), 3,74-3,50 (m, 1H), 3,06 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,64-2,26 (m, 9H), 2,14-1,89 (m, 4H), 1,73-1,12 (m, 71H), 0,90 (t, $J = 6,8$ Hz, 12H).



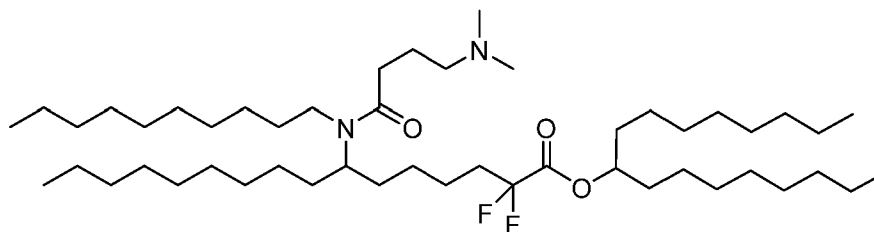
(108)

10 **7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorohexadecanoato de undecan-6-ilo (108).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,01 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 3,67 (s, OH), 3,05 (d, $J = 10,4$ Hz, 2H), 2,35 (c, $J = 7,7$ Hz, 4H), 2,27 (s, 6H), 2,05 (dt, $J = 16,2, 8,2$ Hz, 2H), 1,86 (h, $J = 7,7$ Hz, 2H), 1,67-1,42 (m, 8H), 1,40-1,24 (m, 41H), 0,94-0,86 (m, 12H).



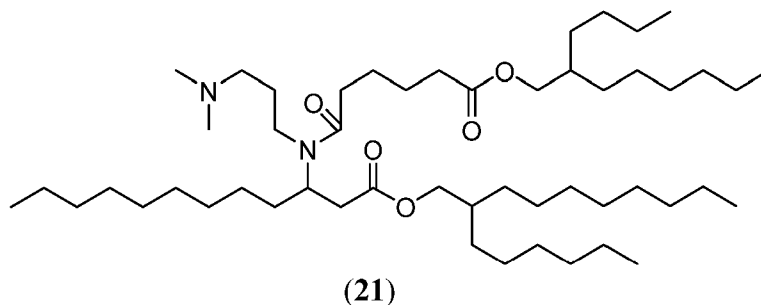
(109)

15 **7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorohexadecanoato tridecan-7-ilo (107).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,14-4,93 (m, 1H), 3,05 (dd, $J = 11,0, 6,0$ Hz, 2H), 2,35 (c, $J = 7,4$ Hz, 3H), 2,27 (s, 5H), 2,03 (tt, $J = 16,2, 8,2$ Hz, 2H), 1,87 (h, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,74-1,41 (m, 10H), 1,34-1,21 (m, 47H), 0,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).

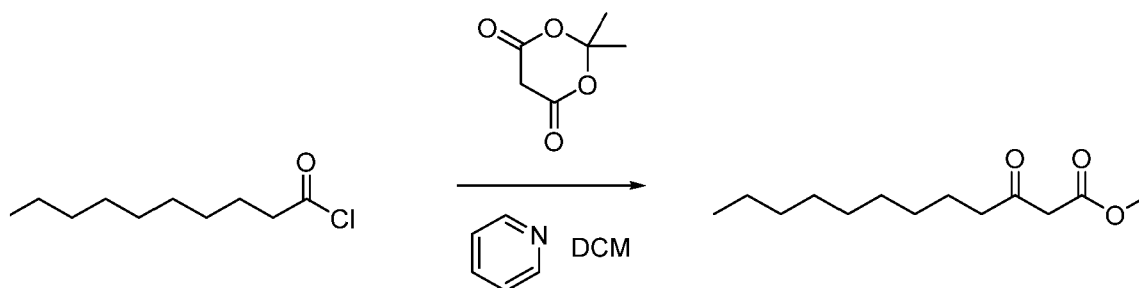


(110)

20 **7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2,2-difluorohexadecanoato de heptadecano-9-ilo (110).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,01 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 3,05 (dd, $J = 10,9, 6,1$ Hz, 2H), 2,52 (s, 2H), 2,39 (d, $J = 6,2$ Hz, 7H), 2,15-1,87 (m, 3H), 1,73-1,40 (m, 10H), 1,29 (d, $J = 8,5$ Hz, 54H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).

Ejemplo 3. Síntesis de 3-{6-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-6-oxohexanamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (21)

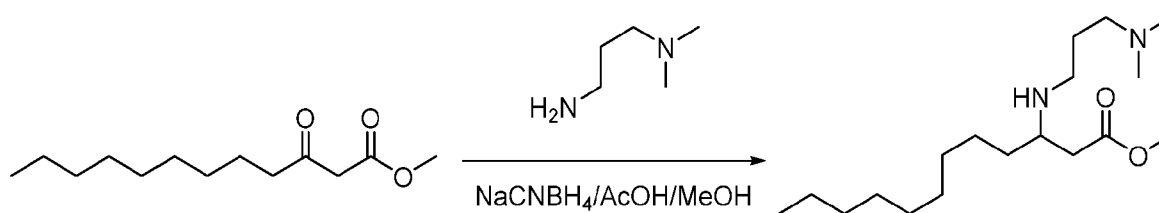
5

Etapa 1. Síntesis de 3-oxododecanoato de metilo

10

Se agitaron ácido de Meldrum (15 g, 104 mmol) y piridina (16,5 g, 208 mmol) en DCM (250 ml) a 0 °C. Se añadió gota a gota cloruro de decanoilo (21,6 ml, 104 mmol) y la reacción se agitó durante 16 h dejando que se calentara a TA. La reacción se lavó con HCl 1 M, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se sometió a reflujo en MeOH (200 ml) durante 3,5 h y, a continuación, se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (2-20 % de EtOAc-hexano), dando 3-oxododecanoato de metilo (17,7 g, 74,4 %).

15

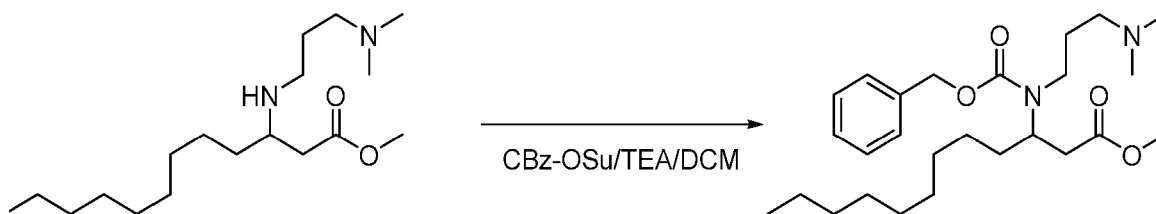
Etapa 2. Síntesis de 3-{[3-(dimetilamino)propil]amino}dodecanoato

20

Se calentaron a reflujo 3-oxododecanoato de metilo (7,92 g, 34,7 mmol), DMAP (4,08 g, 40,0 mmol) y AcOH (7,9 ml, 139 mmol) en MeOH (285 ml) durante 1 h, a continuación, se enfrió a 0 °C y se trató en porciones con NaCNBH₃ (4,9 g, 69 mmol). La reacción se agitó a TA durante 40 h, se concentró parcialmente al vacío, el residuo se recogió en EtOAc y se lavó secuencialmente con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH-DCM), dando 3-{[3-(dimetilamino)propil]amino}dodecanoato (1,9 g, 17,4 %).

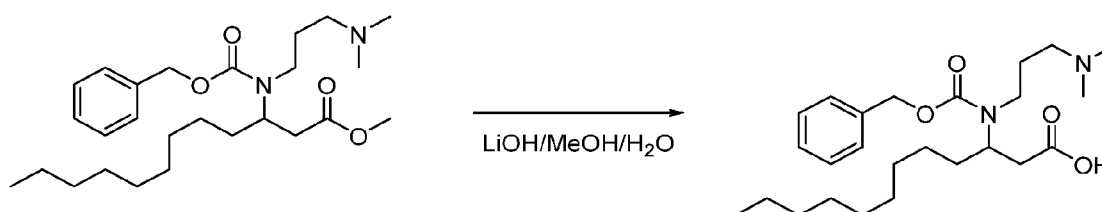
25

Etapa 3. Síntesis de 3-{[(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)-propil]amino}dodecanoato de metilo



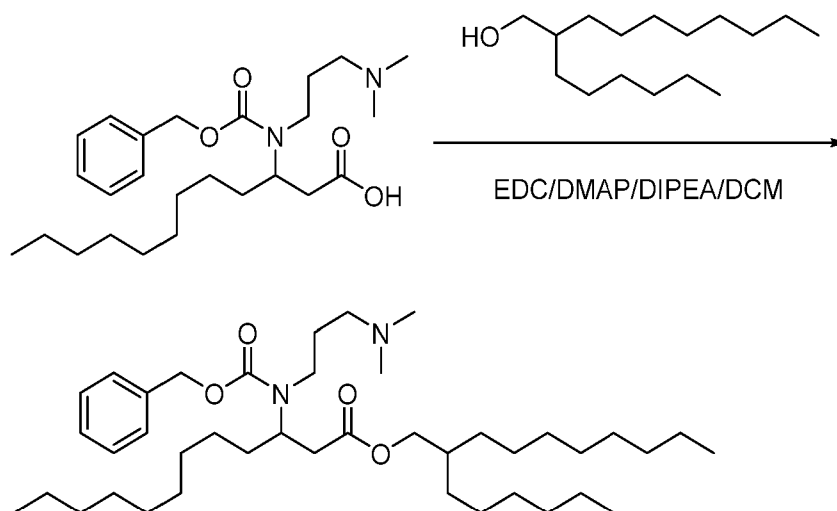
Se agitaron 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (1,2 g, 3,8 mmol), CBz-OSu (1,0 g, 4,2 mmol) y TEA (0,8 ml, 5,7 mmol) en DCM (35 ml) a TA durante 18 h. Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (EtOAc/Hex a 50:50), dando 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (1,6 g, 93,5 %).

Etapa 4. Síntesis del ácido 3-(((benciloxi)carbonil)(3-(dimetilamino)propil)amino)dodecanoico



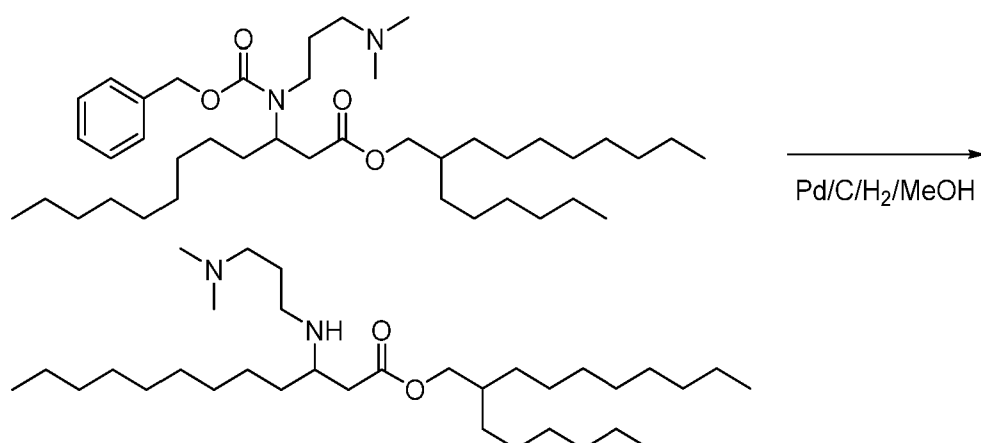
Se calentaron 3-[[3-(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (1,68 g, 3,7 mmol) y LiOH (0,18 g, 7,5 mmol) a 50 °C en MeOH/H₂O (20:3) durante 18 h. La reacción se enfrió a TA, se inactivó con HCl 1 M (1,3 ml) y se concentró al vacío. El residuo se recogió en DCM, se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío, dando ácido 3-(((benciloxi)carbonil)(3-(dimetilamino)propil)amino)dodecanoico que se usó sin purificación.

Etapa 5. Síntesis de 3-[[3-(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de 2-hexildecilo



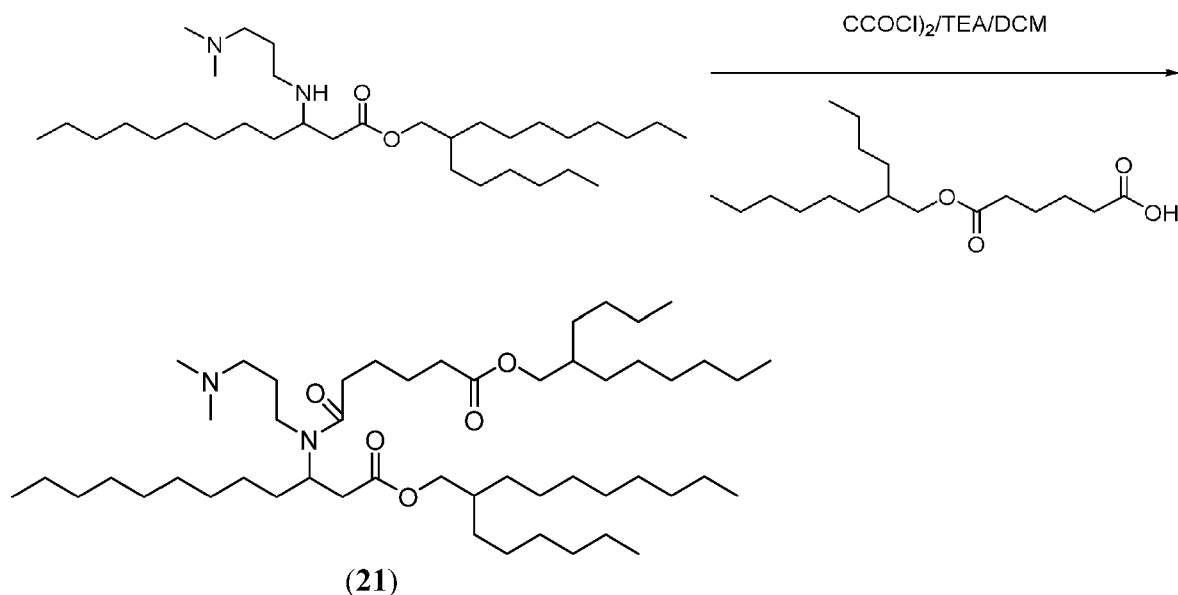
Se agitaron ácido 3-[[3-(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoico (1,2 g, 2,8 mmol), hexildecanol (0,72 g, 3,0 mmol), EDC (1,04 g, 5,4 mmol), DIPEA (1,4 ml, 8,1 mmol) y DMAP (cat.) en DCM (30 ml) a TA durante 18 h. La reacción se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada, dando 3-[[3-(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de 2-hexildecilo (827 mg, 46,2 %).

Etapa 6. Síntesis de 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de 2-hexildecilo



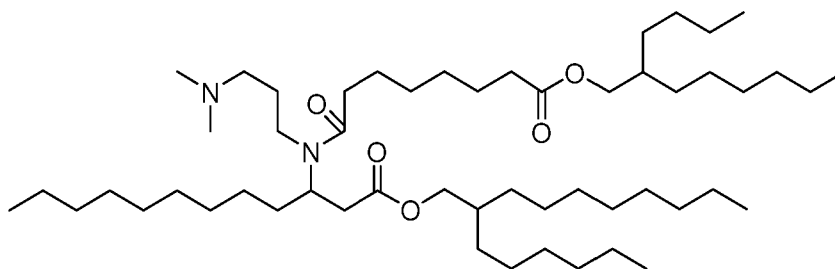
Se sometió 3-[(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)propil]amino}dodecanoato de 2-hexildecilo (874 mg, 1,3 mmol) a hidrogenación catalítica sobre Pd/C al 10 % en MeOH (5 ml) durante 18 horas. La reacción se filtró a través de Celite, se concentró al vacío y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando 3-{3-(dimetilamino)propil}amino}dodecanoato de 2-hexildecilo (294 mg, 42,2 %).

Etapas 7. Síntesis de 3-{6-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-6-oxohexanamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (21)



Se agitaron ácido 6-[(2-butiloctil)oxi]-6-oxohexanoico (252 mg, 0,8 mmol) y cloruro de oxalilo (0,20 g, 1,7 mmol) a TA durante 3 horas. La reacción se concentró al vacío y el residuo se volvió a disolver en DCM (5 ml). El producto intermedio de cloruro ácido se añadió a 3-{3-(dimetilamino)propil}amino}dodecanoato de 2-hexildecilo (295 mg, 0,6 mmol) y TEA (0,14 ml, 1,6 mmol) en DCM (5 ml) y se agitó a TA durante 2 h. La reacción se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando 3-{6-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-6-oxohexanamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (21) (231 mg, 50 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,23 (s, 1H), 3,95 (c, J = 5,3 Hz, 4H), 3,22 (c, J = 8,2 Hz, 2H), 3,04 (s, 1H), 2,52 (td, J = 15,1, 6,8 Hz, 2H), 2,40-2,23 (m, 6H), 2,21 (s, 6H), 1,79-1,55 (m, 11H), 1,25 (c, J = 4,8 Hz, 53H), 0,88 (td, J = 6,7, 3,9 Hz, 15H).

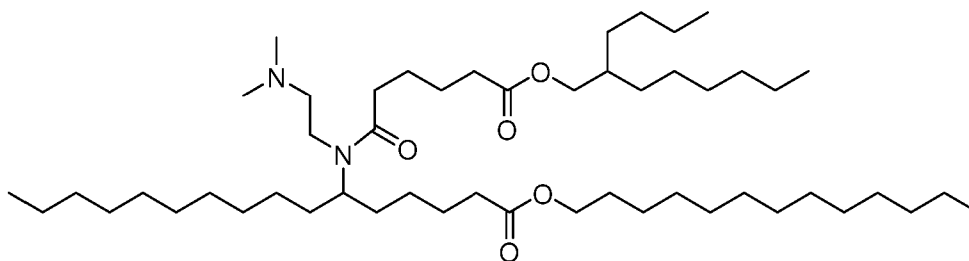
El siguiente compuesto se preparó utilizando una metodología análoga a la descrita anteriormente.



(22)

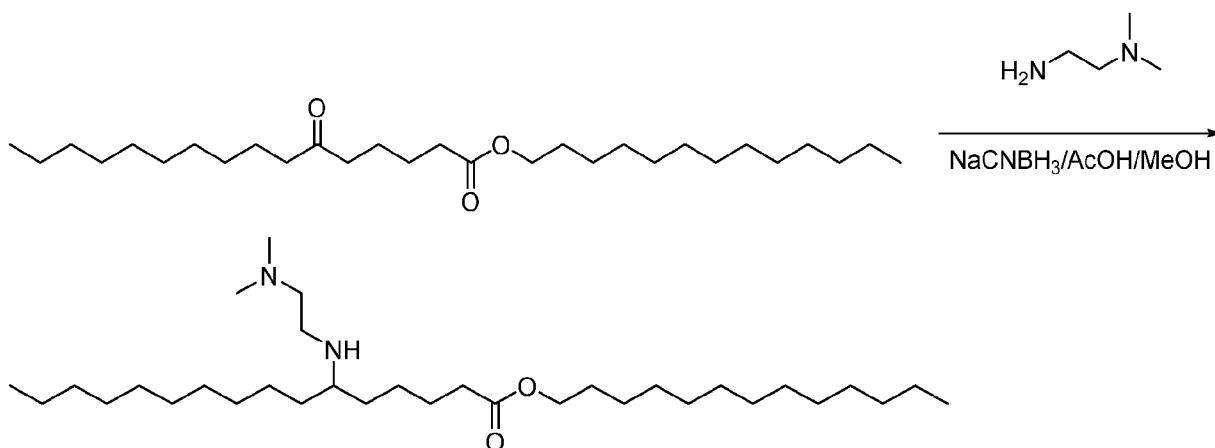
3-(8-((2-Butiloctil)oxi)-N-(3-(dimetilamino)propil)-8-oxooctanamido)-dodecanoato de 2-hexildecilo (22). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,27 (s, 1H), 3,97 (t, $J = 6,4$ Hz, 4H), 3,24 (dc, $J = 12,2, 6,8$ Hz, 2H), 3,07 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 2,62-2,45 (m, 2H), 2,36-2,25 (m, 5H), 2,24 (s, 6H), 1,71-1,59 (m, 8H), 1,29 (c, $J = 4,6$ Hz, 57H), 0,91 (td, $J = 6,7, 3,9$ Hz, 15H).

Ejemplo 4. Síntesis de 6-{6-[(2-butiloctil)oxi]-N-[2-(dimetilamino)etil]-6-oxohexanamido}hexadecanoato de tridecilo (23)



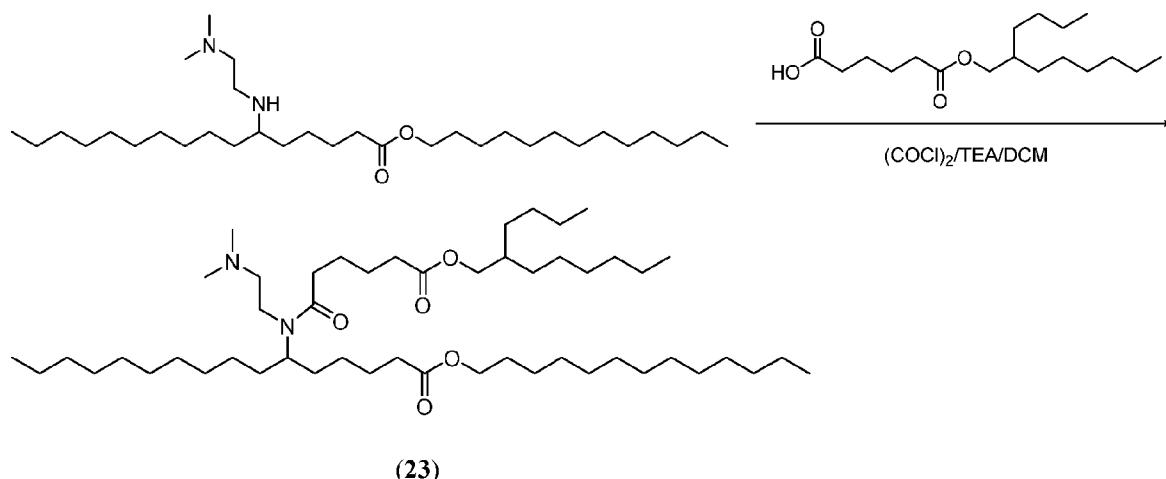
(23)

Etapla 1. Síntesis de 6-{[2-(dimetilamino)etil]amino}hexadecanoato de tridecilo



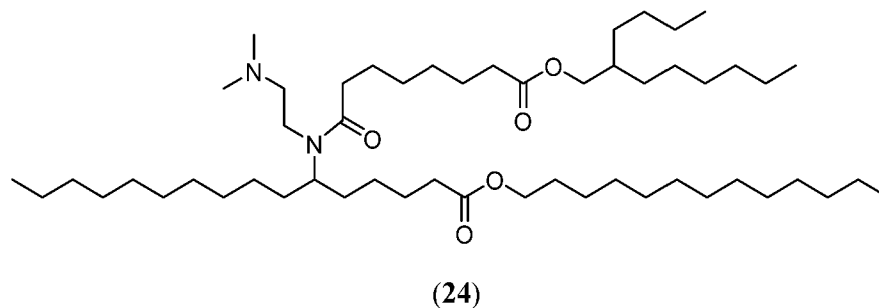
Se agitaron 6-oxohexadecanoato de tridecilo (377 mg, 0,83 mmol), 1,1-dimetiletilendiamina (81 mg, 0,92 mmol), AcOH (0,1 ml, 1,7 mmol) y el NaCNBH_3 (157 mg, 2,5 mmol) en MeOH a 50°C durante 2 horas. La reacción se retiró del fuego y se agitó durante 30 horas más. La reacción se concentró parcialmente al vacío, a continuación, se disolvió en DCM, se lavó (NaHCO_3 y salmuera), se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH-DCM), dando 6-{[2-(dimetilamino)etil]amino}hexadecanoato de tridecilo (201 mg, 46,0 %).

Etapla 2. Síntesis de 6-{6-[(2-butiloctil)oxi]-N-[2-(dimetilamino)etil]-6-oxohexanamido}hexadecanoato (23)

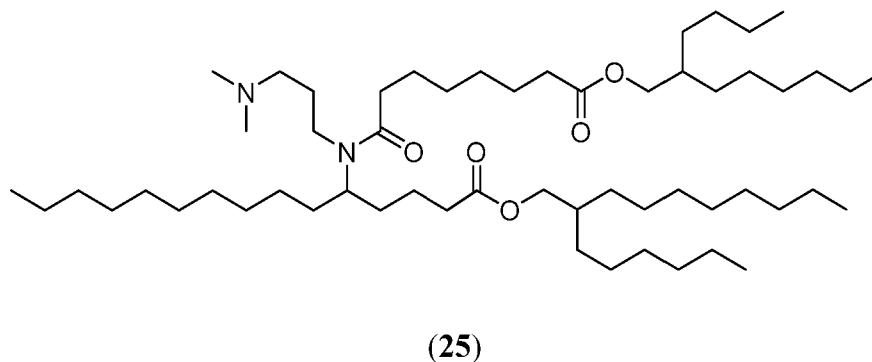


Se agitaron ácido 6-[(2-butiloctil)oxi]-6-oxohexanoico (0,2 g, 0,64 mmol) y cloruro de oxalilo (0,15 ml, 1,74 mmol) en DCM (10 ml) con DMF (1 gota) a TA durante 3 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en DCM (5 ml) y se añadió 6-[[2-(dimetilamino)etil]amino]hexadecanoato de tridecilo (303 mg, 0,6 mmol) y TEA (0,32 ml, 2,3 mmol) en DCM (10 ml). Tras agitar a TA durante 1 h, la reacción se diluyó con DCM, se lavó (NaHCO₃ (solución ac. sat.) y salmuera), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH-DCM), dando 6-[[2-(2-butiloctil)oxi]-N-[2-(dimetilamino)etil]-6-oxohexanamido]hexadecanoato de tridecilo (23) (113 mg, 23,8 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,07 (td, *J* = 6,8, 4,4 Hz, 2H), 3,99 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 2,58 (s, 1H), 2,47-2,25 (m, 12H), 1,74-1,58 (m, 9H), 1,49 (td, *J* = 11,9, 7,6 Hz, 4H), 1,39-1,16 (m, 52H), 0,91 (m, 12H).

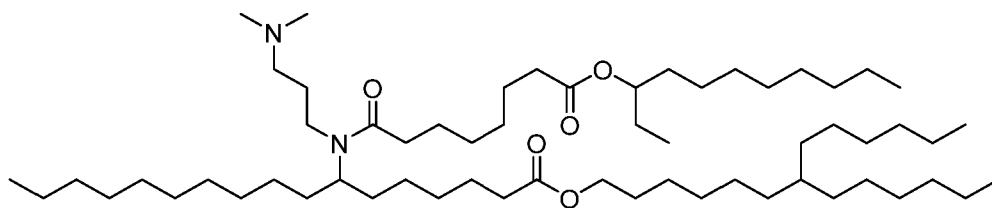
Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.



6-[(2-Butiloctil)oxi]-N-[2-(dimetilamino)etil]-8-oxooctanamido)-hexadecanoato de tridecilo (24). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,07 (td, *J* = 6,8, 4,4 Hz, 2H), 3,99 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 2,58 (s, 1H), 2,47-2,25 (m, 12H), 1,74-1,58 (m, 9H), 1,49 (td, *J* = 11,9, 7,6 Hz, 4H), 1,39-1,16 (m, 52H), 0,91 (m, 12H).

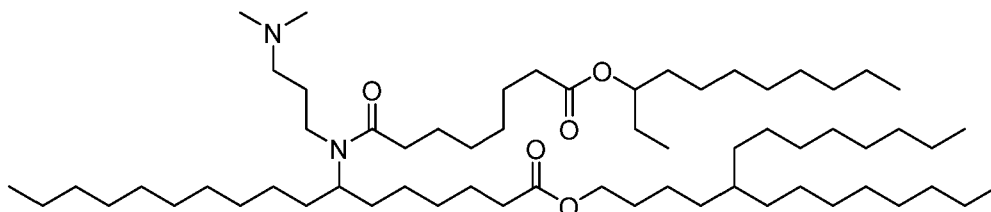


5-[(2-Butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-8-oxooctanamido)-pentadecanoato de 2-hexildecilo (25). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,99 (dd, *J* = 5,8, 2,1 Hz, 4H), 3,14 (dd, *J* = 11,0, 5,8 Hz, 2H), 2,44-2,22 (m, 13H), 1,71-1,60 (m, 7H), 1,48 (s, 6H), 1,40-1,16 (m, 60H), 0,91 (td, *J* = 6,7, 4,0 Hz, 15H).



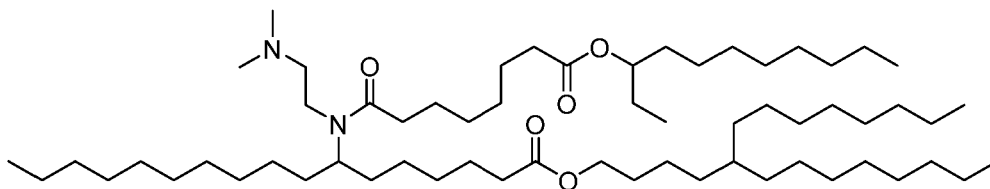
(26)

- 5 **7-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-8-oxo-8-(undecan-3-iloxi)octanamido)-heptadecanoato de 7-hexiltridecilo (26).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,12-4,02 (m, 3H), 2,46-2,15 (m, 14H), 1,59 (dt, $J = 34,1, 5,6$ Hz, 28H), 1,42-1,16 (m, 58H), 0,98-0,79 (m, 15H).



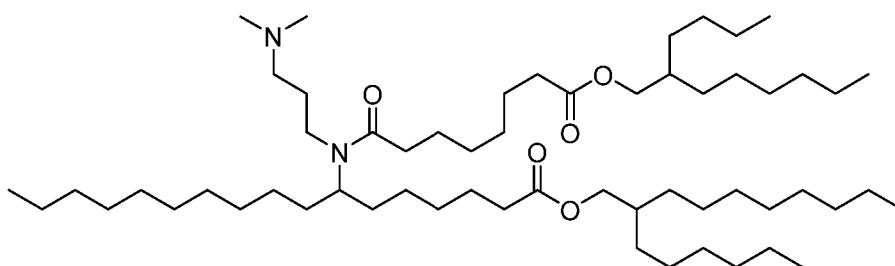
(27)

- 10 **7-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-8-oxo-8-(undecan-3-iloxi)octanamido)-heptadecanoato de 5-octiltridecilo (27).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,69-3,63 (m, 1H), 3,36-3,29 (m, 2H), 2,36-2,27 (m, 2H), 2,15-1,96 (m, 14H), 1,85-1,48 (m, 44H), 1,46-1,16 (m, 44H), 0,89 (t, $J = 6,7$ Hz, 15H).



(28)

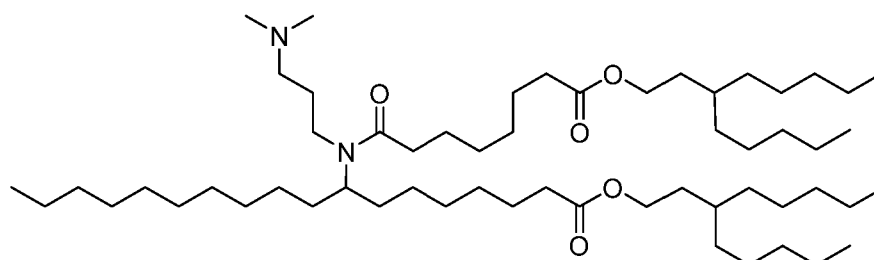
- 15 **7-(N-(2-(Dimetilamino)etil)-8-oxo-8-(undecan-3-iloxi)octanamido)-heptadecanoato de 5-octiltridecilo (28).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,69-3,63 (m, 1H), 3,35-3,28 (m, 2H), 2,18-1,93 (m, 15H), 1,89-1,82 (m, 2H), 1,71-1,55 (m, 41H), 1,43-1,19 (m, 44H), 0,89 (t, $J = 6,7$ Hz, 15H).



(29)

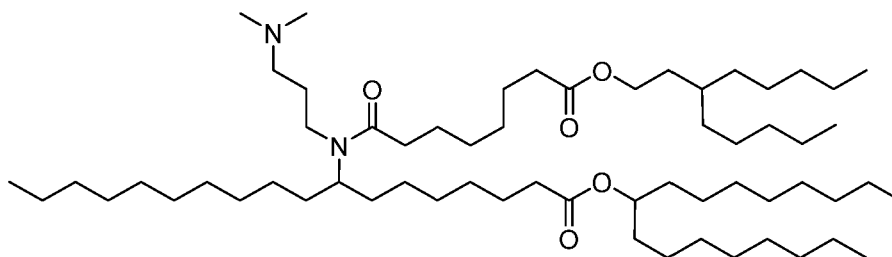
- 20 **7-(8-((2-Butilooctil)oxi)-N-(3-(dimetilamino)propil)-8-oxooctanamido)-heptadecanoato de 2-hexildecilo (29).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,03-3,94 (m, 4H), 3,67-3,61 (m, 1H), 3,18-3,09 (m, 2H), 2,42-2,12 (m, 12H), 1,81-1,41 (m,

24H), 1,41-1,03 (m, 56H), 0,90 (t, $J = 3,2$ Hz, 15H).



(30)

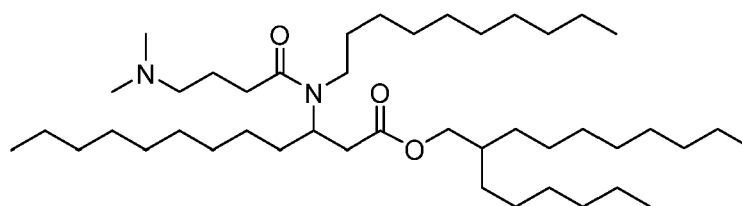
- 5 **8-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-8-oxo-8-((3-pentilooctil)oxi)-octanamido)octadecenoato de 3-pentilooctilo (30).**
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,14-4,07 (m, 4H), 3,67-3,61 (m, 1H), 3,19-3,11 (m, 2H), 2,36-2,21 (m, 10H), 1,72-1,53 (m, 22H), 1,53-1,39 (m, 6H), 1,39-1,18 (m, 52H), 0,97-0,84 (m, 15H).



(31)

- 10 **8-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-8-oxo-8-((3-pentilooctil)oxi)-octanamido)octadecenoato de heptadecan-9-ilo (31).**
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,91-4,85 (m, 1H), 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,42-2,19 (m, 12H), 2,04-1,83 (m, 12H), 1,77-1,46 (m, 18H), 1,39-1,13 (m, 60H), 0,96-0,82 (m, 15H).

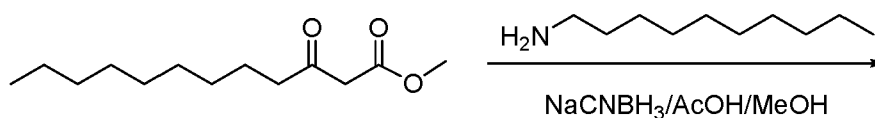
- 15 **Ejemplo 5. Síntesis de 3-[N-decil-4-(dimetilamino)-butanamido]dodecanoato de 2-hexildecilo (32)**

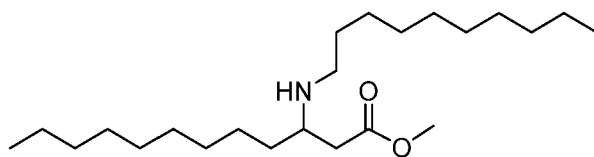


(32)

Etapla 1. Síntesis de 3-(decilamino)dodecanoato de metilo

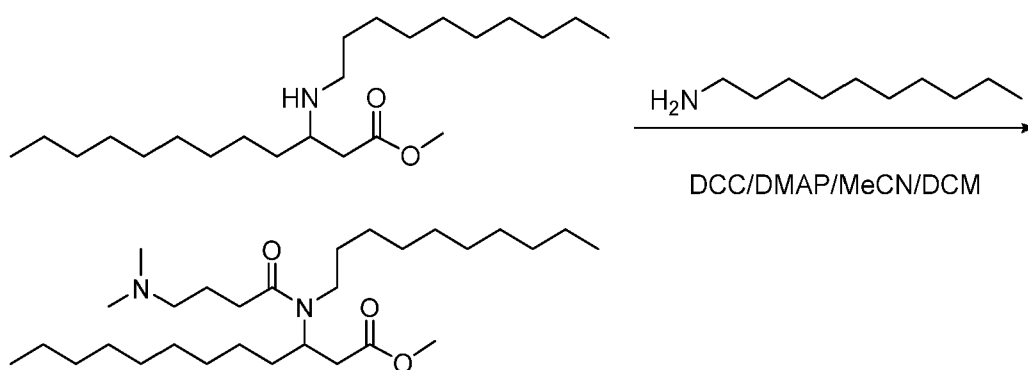
20





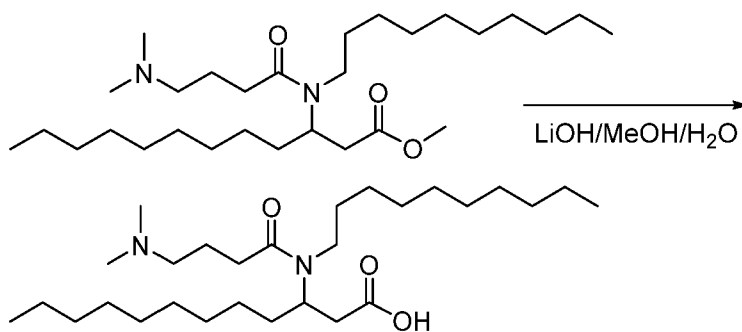
Se agitaron 3-oxododecanoato de metilo (1 g, 4,4 mmol), N-decilamina (723 mg, 5,0 mmol), NaCNBH₃ (826 mg, 13,1 mmol) y AcOH (0,5 ml, 8,8 mmol) en MeOH en metanol a 50 °C durante 18 h. La reacción se enfrió a TA y se concentró parcialmente al vacío. La mezcla se recogió en DCM, se lavó con NaHCO₃ (solución ac. sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH-DCM), dando 3-(decilamino)dodecanoato de metilo (560 mg, 34,6 %).

Etapa 2. Síntesis de 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoato de metilo



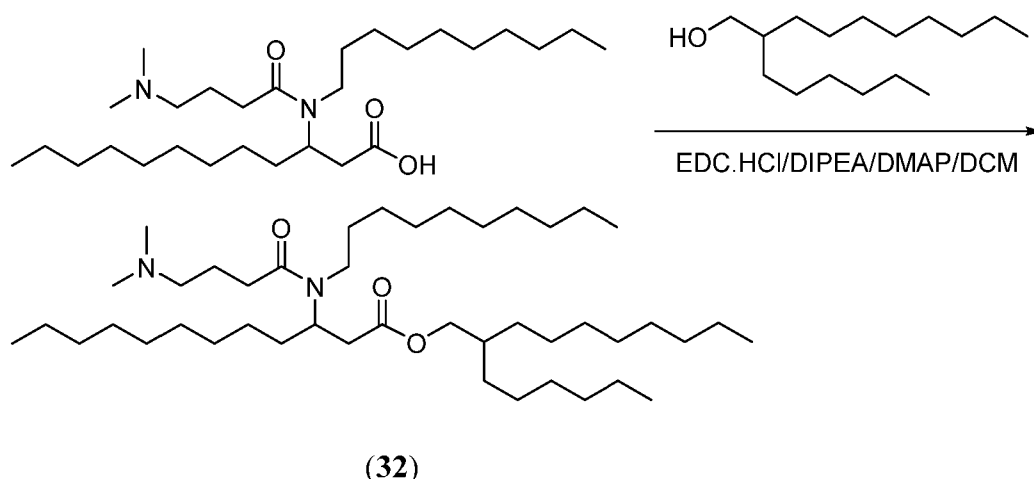
Se agitaron sal HCl de 4-dimetilamino]ácido butanoico (508 mg, 3,03 mmol), DCC (688 mg, 3,3 mmol) y DMAP (555 mg, 4,5 mmol) en MeCN (5 ml) a TA durante 2 h. Se añadió 3-(decilamino)dodecanoato de metilo (560 mg, 1,5 mmol) en DCM (5 ml) y se continuó agitando durante 72 h. La reacción se filtró a través de celite, se aclaró con DCM y el filtrado se lavó con NaHCO₃ (solución ac. sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoato de metilo (498 mg, 68,1 %).

Etapa 3. Síntesis del ácido 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoico



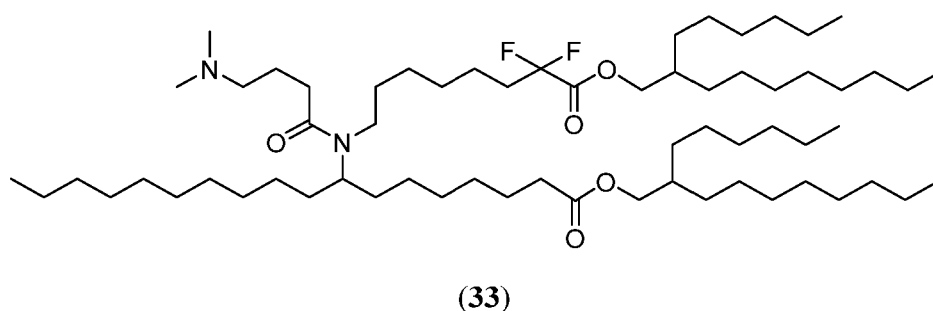
Se agitaron 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoato de metilo (498 mg, 1,0 mmol) y el LiOH (49 mg, 2,1 mmol) en MeOH (3,0 ml) y H₂O agua (0,5 ml) a 50 °C durante 2 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con HCl 6 M (0,35 ml). La reacción se concentró parcialmente al vacío y, a continuación, se dividió entre H₂O agua y DCM. La capa acuosa se extrajo con DCM y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoico (409 mg, 84,6 %) que se usó sin purificación adicional.

Etapa 4. Síntesis de 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoato de 2-hexildecilo (32)

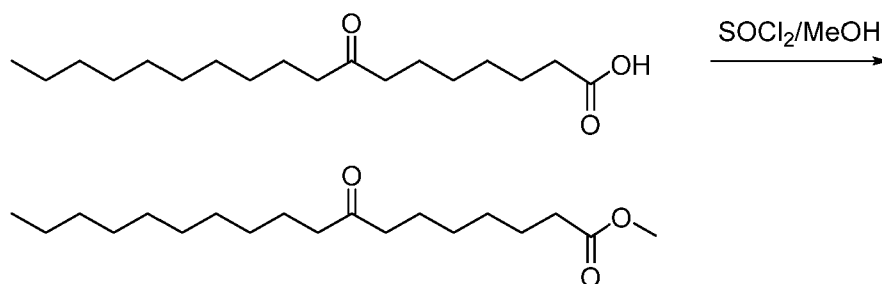


Se agitaron ácido 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoico (369 mg, 0,8 mmol), hexildecanol (229 mg, 0,95 mmol), EDC (302 mg, 1,6 mmol), DIPEA (0,411 ml, 2,4 mmol) y DMAP (cat.) en DCM (5 ml) a TA durante 18 h. La reacción se lavó con NaHCO_3 (solución ac. sat.) y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH-DCM), dando 3-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]dodecanoato de 2-hexildecilo (32). (88 mg, 16,1 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,26 (s, 1H), 4,03-3,93 (m, 2H), 3,89-3,76 (m, 1H), 3,16 (ddt, J = 15,2, 10,6, 5,7 Hz, 1H), 2,98 (s, 1H), 2,79-2,22 (m, 13H), 1,90 (ddd, J = 27,0, 14,0, 7,1 Hz, 3H), 1,51 (dc, J = 22,6, 6,4 Hz, 5H), 1,28 (c, J = 4,2 Hz, 51H), 0,90 (m, 12H).

Ejemplo 6. Síntesis de 8-(N-{7,7-difluoro-8-[(2-hexildecil)oxi]-8-oxooctil}-4-(dimetilamino)butanamido)octadecenoato de 2-hexildecilo (33)

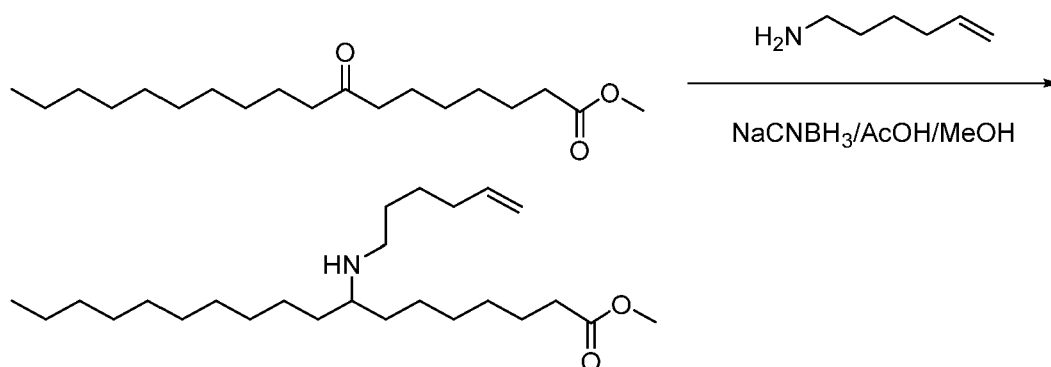


Etapla 1. Síntesis de 8-oxooctadecanoato de metilo



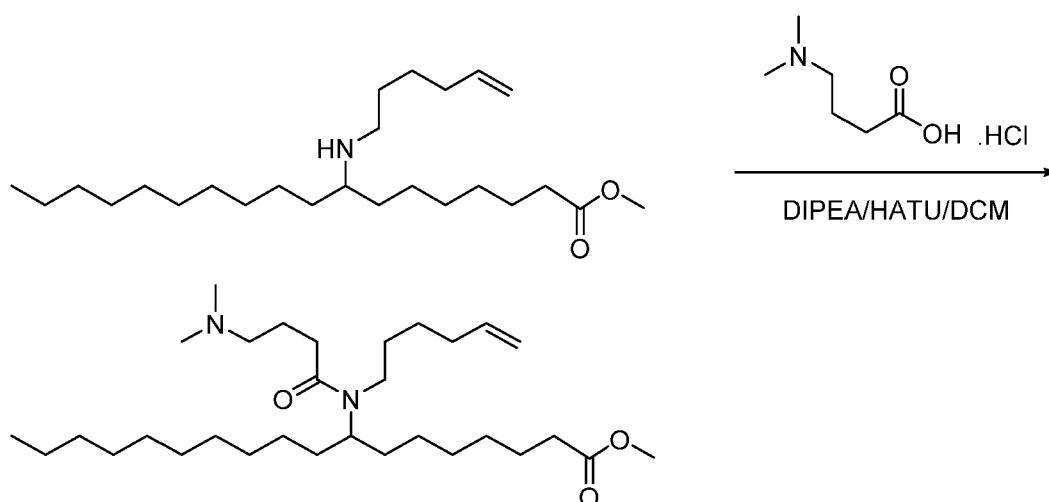
Se agitó ácido 8-oxooctadecanoico (3,3 g, 10,9 mmol) en MeOH (60 ml) a 0 °C. Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (1,43 g, 12,0 mmol) y la reacción se agitó durante 18 h dejando que se calentara a TA. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en hexano y se lavó con NaHCO_3 (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (2-20 % de EtOAc-hexano), dando 8-oxooctadecanoato de metilo (3,33 g, 97,9 %).

Etapla 2. Síntesis de 8-(hex-5-en-1-ilamino)octadecenoato de metilo



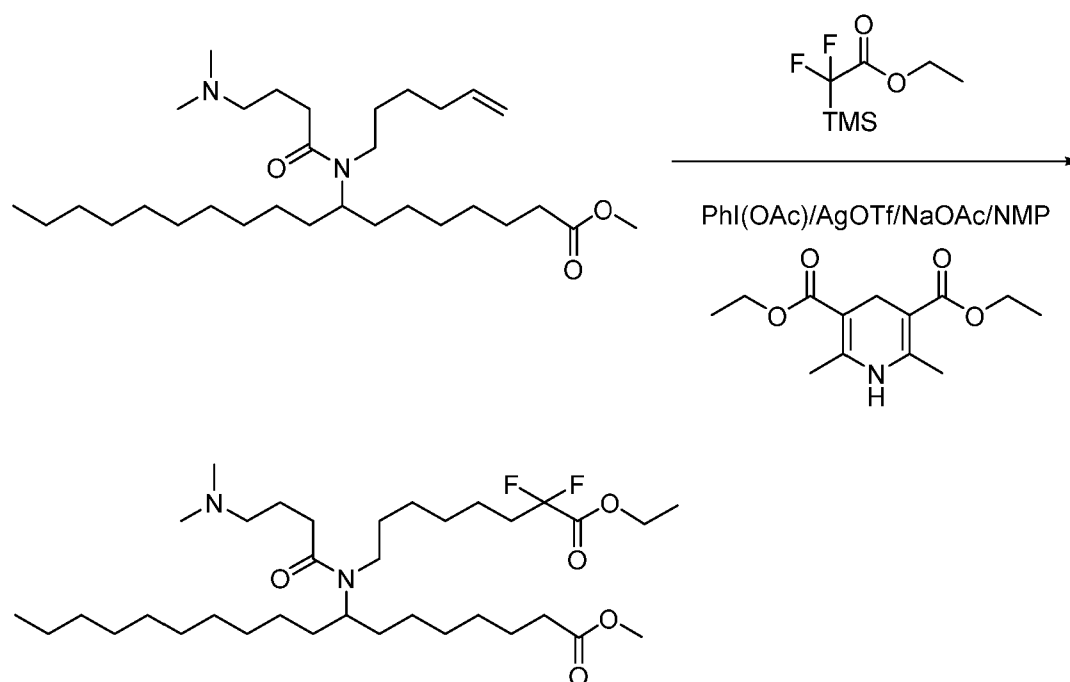
Se agitaron 8-oxooctadecanoato de metilo (2,68 g, 8,6 mmol), hex-5-en-1-amina (0,94 g, 9,4 mmol), AcOH (1,0 ml, 17,2 mmol) y NaCNBH₃ (1,62 g, 25,7 mmol) en MeOH (32 ml) a 50 °C durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc y se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando 8-(hex-5-en-1-ilamino)octadecanoato de metilo (2,1 g, 61,9 %).

Etapa 3. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(hex-5-en-1-il)butanamido]octadecenoato



Se agitaron ácido 4-dimetilaminobutanoico (sal HCl) (1,8 g, 10,6 mmol), HATU (4,0 g, 10,6 mmol) y DIPEA (3,7 ml, 21,2 mmol) en DCM (50 ml) a TA durante 1 h. Se añadió 8-(hex-5-en-1-ilamino)octadecanoato de metilo (2,1 g, 5,3 mmol) en DCM (5 ml) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc y se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (1-15 % de MeOH-DCM), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(hex-5-en-1-il)butanamido]octadecanoato de metilo (2,0 g, 74,1 %).

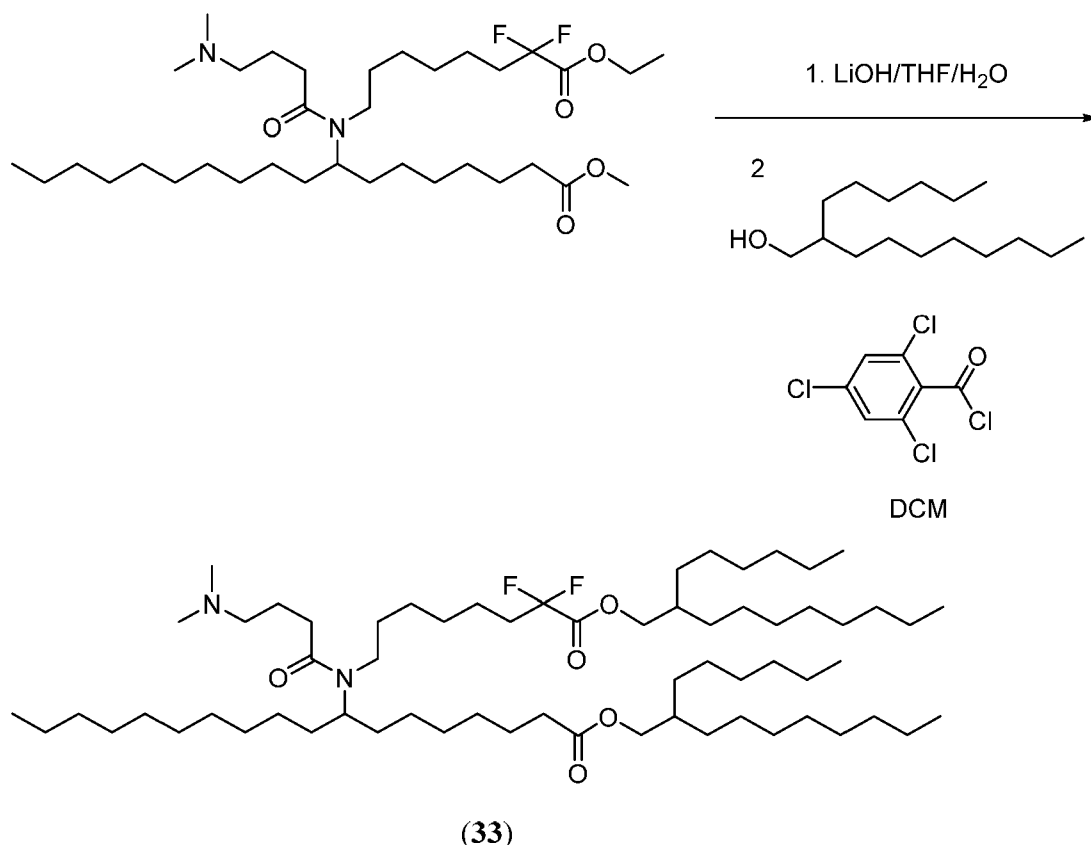
Etapa 4. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-[(5E)-8-ethoxi-7,7-difluoro-8-oxooct-5-en-1-il]butanamido]octadecenoato de metilo



- 5 En un matraz al vacío, secado al calor, se purgaron con nitrógeno éster de Hantzsch (1,0 g, 3,9 mmol), diacetato de yodobenceno (2,5 g, 7,9 mmol), NaOAc (1,0 g, 11,8 mmol) y AgOTf (2,5 g, 9,8 mmol) y se disolvieron en NMP (40 ml). Se añadieron 8-[4-(dimetilamino)-N-(hex-5-en-1-il)butanamido]octadecanoato de metilo (2 g, 3,9 mmol) y 2,2-difluoro-2-(trimetilsilil)acetato de etilo (3,6 g, 20,0 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se filtró a través de celite, el filtrado se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en
- 10 bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-[(5E)-8-etoxi-7,7-difluoro-8-oxooct-5-en-1-il]butanamido]octadecanoato de metilo (2,21 g, 66,8 %).

Etapas **5.** **Síntesis** **de** **8-[N-{7,7-difluoro-8-[(2-hexildecil)oxi]-8-oxooctil}-4-(dimetilamino)butanamido]octadecenoato de 2-hexildecilo (33).**

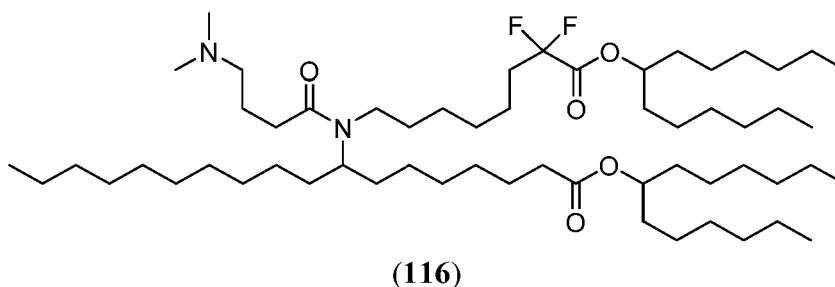
15



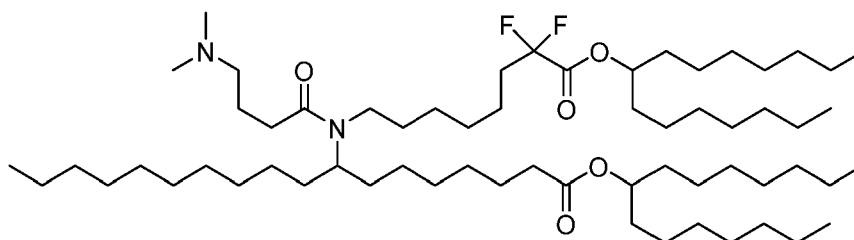
Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-(8-etoxi-7,7-difluoro-8-oxooctil)butanamido]-octadecanoato de metilo (2,21 g, 3,9 mmol) y LiOH (335 mg, 14,0 mmol) en THF (22 ml) y H₂O (6,6 ml) a 50 °C durante 2 h. La reacción se inactivó con HCl 6 M (11,6 ml) y se concentró parcialmente al vacío. El extracto acuoso se diluyó con HCl (1 M) y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío azeotrópicamente con tolueno.

Se disolvieron el bisácido y 2-hexildecán-1-ol (1,8 g, 7,3 mmol) en DCM (22 ml) y se añadieron cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (1,87 g, 7,76 mmol) y DMAP (1,71 g, 14,0 mmol). La reacción se agitó a TA durante 18 h, se concentró al vacío y el residuo se recogió en EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (0-12 % de MeOH-DCM), dando 8-(N-{7,7-difluoro-8-[(2-hexildecil)oxi]-8-oxooctil}-4-(dimetilamino)butanamido)octadecenoato de 2-hexildecilo (33) (615 mg, 16,9 %). RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) δ 4,18 (dd, *J* = 5,8, 4,0 Hz, 2H), 3,98 (dd, *J* = 5,8, 3,2 Hz, 2H), 3,65 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,11-3,00 (m, 2H), 2,39-2,28 (m, 6H), 2,26 (s, 6H), 2,16-1,97 (m, 3H), 1,85 (dt, *J* = 9,2, 6,9 Hz, 3H), 1,73 (s, 1H), 1,68-1,38 (m, 13H), 1,29 (m, 73H), 0,95-0,86 (m, 15H). RMN de ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ -105,78 (s, 2F).

Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.

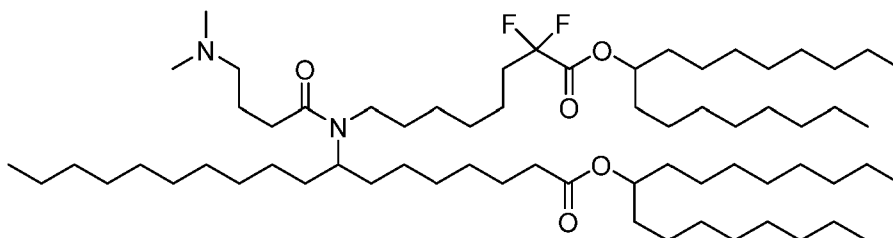


8-(N-(7,7-difluoro-8-oxo-8-(tridecan-7-iloxi)octil)-4-(dimetilamino)-butanamido)octadecanoato de tridecan-7-ilo (116). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,02 (c, J = 6,5 Hz, 1H), 4,89 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 3,67 (d, J = 7,8 Hz, OH), 3,40 (s, OH), 3,06 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 2,38-2,25 (m, 5H), 2,24 (s, 4H), 2,07 (tc, J = 16,8, 9,2 Hz, 2H), 1,84 (c, J = 8,1 Hz, 2H), 1,73-1,15 (m, 59H), 0,90 (t, J = 6,6 Hz, 12H).



(117)

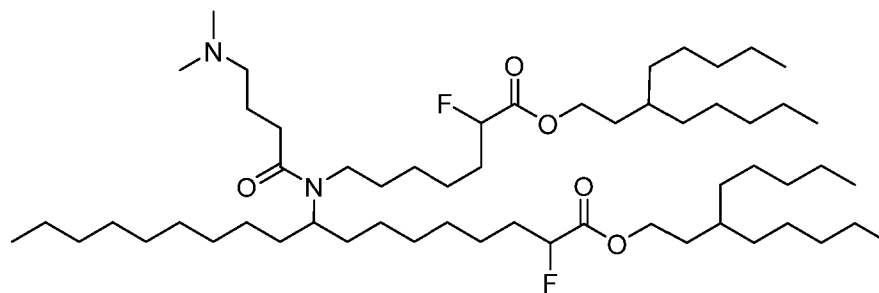
5 **8-(N-(7,7-difluoro-8-oxo-8-(pentadecan-8-ilo)octil)-4-(dimetilamino)butanamido)octadecanoato de pentadecan-8-ilo (117)**. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,07-4,98 (m, 1H), 4,88 (td, $J = 6,5, 3,1$ Hz, 1H), 3,64 (s, OH), 2,47 (s, 1H), 2,42-2,24 (m, 7H), 2,06 (tt, $J = 16,7, 8,3$ Hz, 2H), 1,96-1,88 (m, 2H), 1,72-1,15 (m, 65H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).



(118)

10 **8-(N-(7,7-difluoro-8-(heptadecan-9-ilo)octil)-8-oxooctil)-4-(dimetilamino)butanamido)octadecanoato de heptadecan-9-ilo (118)**. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,02 (c, $J = 5,9$ Hz, 1H), 4,88 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H), 3,64 (s, 1H), 3,43-3,38 (m, OH), 3,06 (dd, $J = 11,6, 5,5$ Hz, 2H), 2,51 (s, 2H), 2,43-2,24 (m, 7H), 2,07 (tc, $J = 16,7, 9,2$ Hz, 2H), 1,93 (c, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,72-1,13 (m, 76H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).

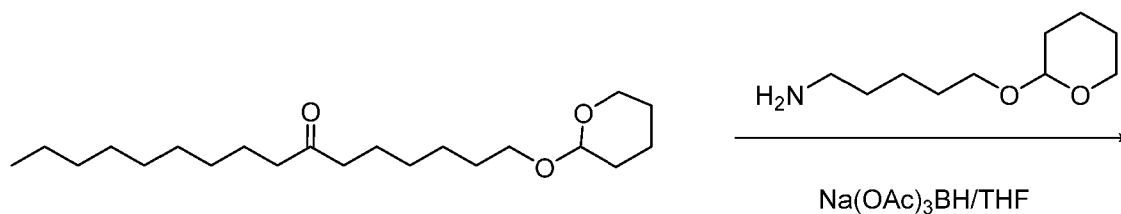
15 **Ejemplo 7. Síntesis de Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-{6-fluoro-7-oxo-7-[(3-pentilooctil)oxi]heptil}butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentilooctilo (34)**

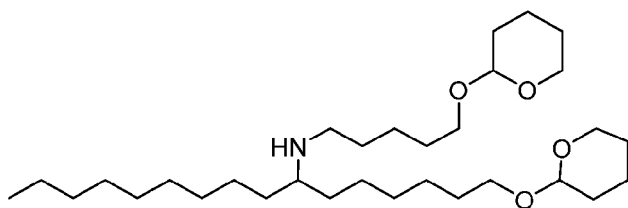


(34)

20

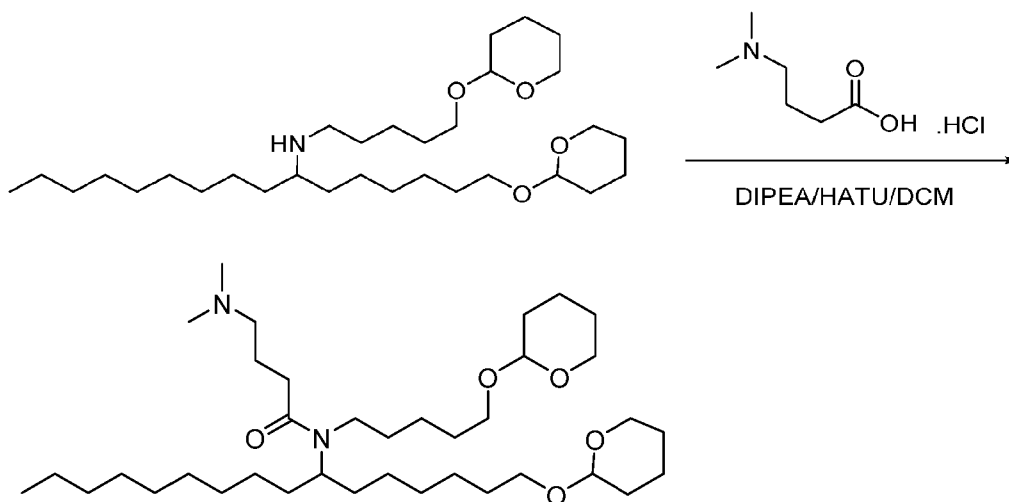
Etapla 1. Síntesis de [1-(oxan-2-ilo)hexadecan-7-il][5-(oxan-2-ilo)pentilo]amina





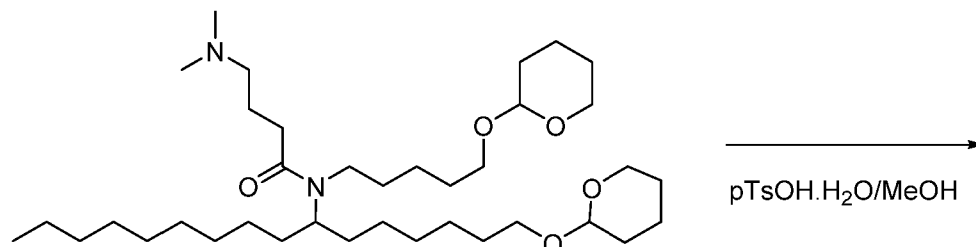
Se agitaron 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ona (9,9 g, 29,1 mmol), 5-(oxan-2-iloxi)pentan-1-amina (6 g, 32,0 mmol) y Na(OAc)₃BH (18,5 g, 87,4 mmol) en THF (100 ml) a 50 °C durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en Et₂O, se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando [1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il][5-(oxan-2-iloxi)pentilo]amina (5,2 g, 34,9 %).

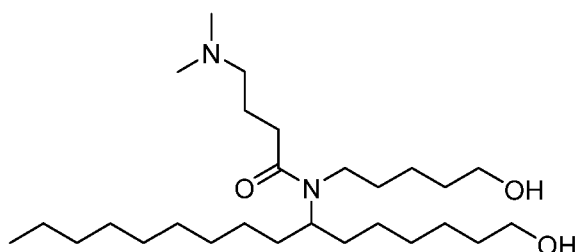
Etapa 2. Síntesis de 4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]-N-[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]butanamida



Se agitaron 4-(dimetilamino)butanoico (sal HCl) (5,2 g, 31,1 mmol), HATU (11,8 g, 31,0 mmol) y DIPEA (10,8 ml, 62,1 mmol) en DCM (75 ml) a TA durante 1 h. Se añadió una solución de [1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il][5-(oxan-2-iloxi)pentilo]amina (5,3 g, 10,4 mmol) en DCM (10 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (1-15 % de MeOH-DCM), dando 4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]-N-[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]butanamida (2,08 g, 32,1 %).

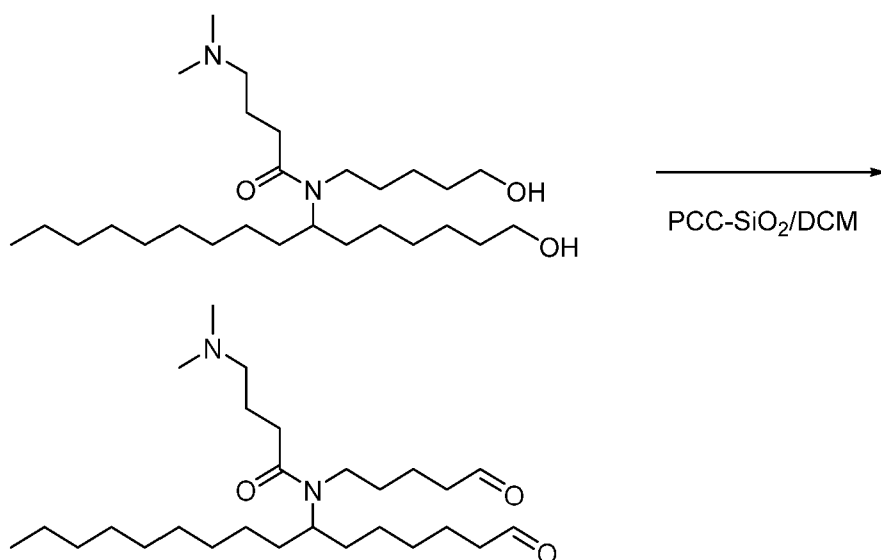
Etapa 3. Síntesis de 4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)-N-(5-hidroxipentil)butanamida





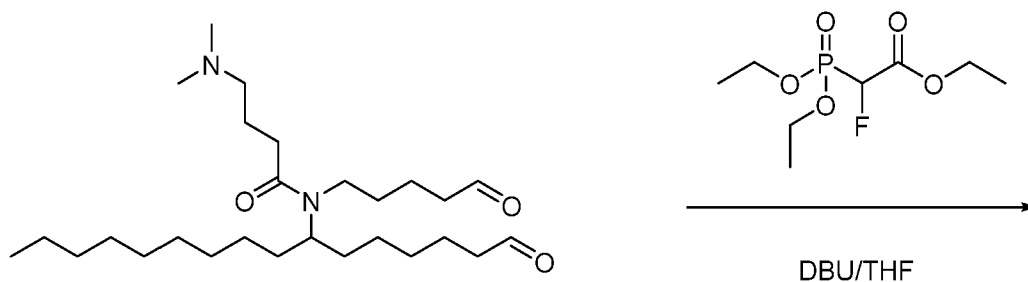
Se agitaron 4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]-N-[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]butanamida (2,08 g, 3,3 mmol) y pTsO-H₂O (127 mg, 0,7 mmol) en MeOH (25 ml) a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lava con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío, dando 4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)-N-(5-hidroxipentil)butanamida (1,5 g, 98,7 %) que se usó sin procesamiento adicional.

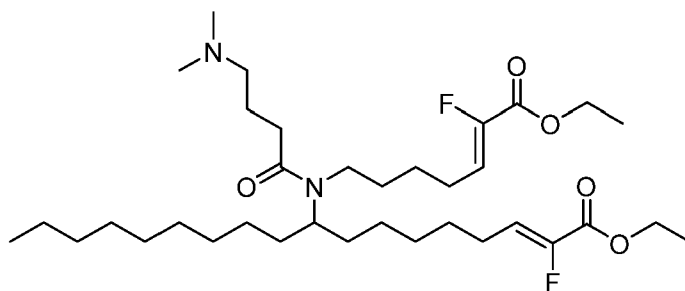
Etapa 4. Síntesis de 4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)-N-(5-oxopentil)-butanamida



Se agitaron 4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)-N-(5-hidroxipentil)butanamida (1,5 g, 3,3 mmol) y PCC-SiO₂ (1:1) (5,0 g, 11,5 mmol) en DCM (30 ml) a TA durante 18 h. La mezcla con filtró a través de un lecho de sílice, eluyendo con EtOAc. El filtrado se concentró al vacío y el material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % MeOH-DCM), dando 4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)-N-(5-oxopentil)butanamida (486 mg, 32,7 %).

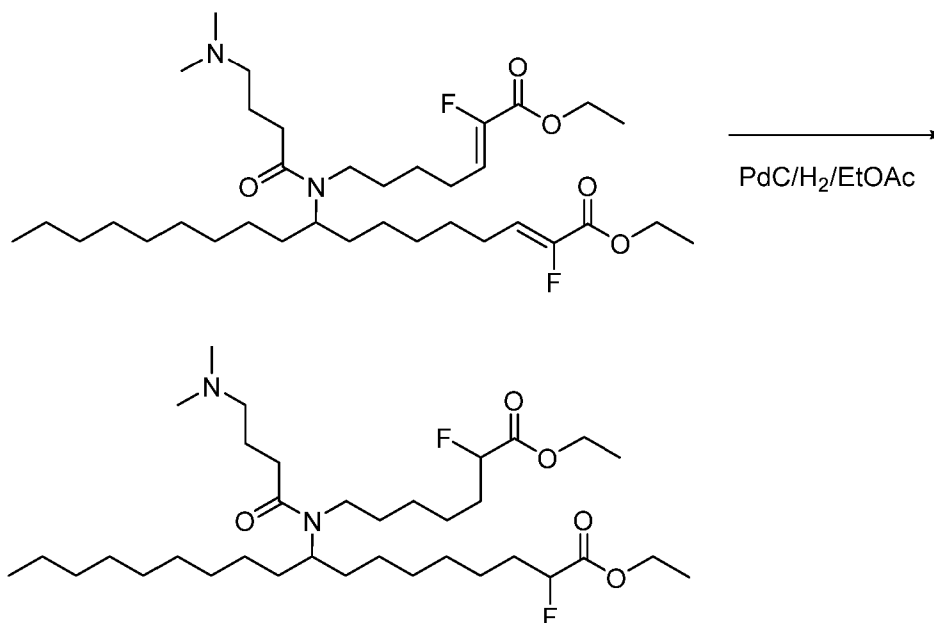
Etapa 5. Síntesis de (2Z)-9-[4-(dimetilamino)-N-[(5Z)-7-ethoxi-6-fluoro-7-oxohept-5-en-1-il]butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo





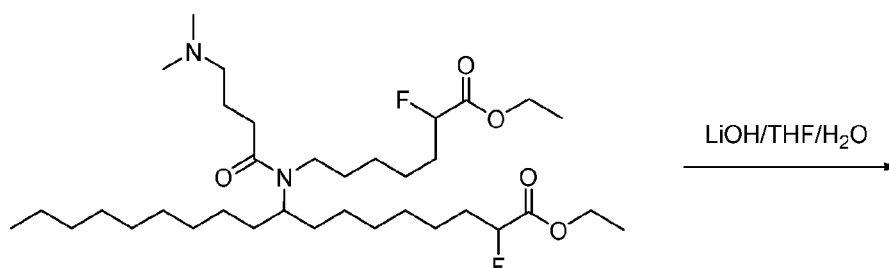
Se agitaron 4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)-N-(5-oxopentil)butanamida (346 mg, 0,76 mmol), 2-(dietoxifosforil)-2-fluoroacetato de etilo (0,62 ml, 3,1 mmol) y DBU (0,46 ml, 3,1 mmol) en THF (10 ml) a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando (2Z)-9-[4-(dimetilamino)-N-[(5Z)-7-etoxi-6-fluoro-7-oxohept-5-en-1-il]butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (116 mg, 24,1 %).

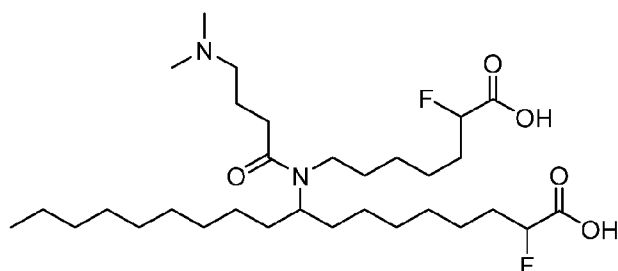
Etapla 6. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-(7-ethoxi-6-fluoro-7-oxoheptil)-butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo



Se sometió (2Z)-9-[4-(dimetilamino)-N-[(5Z)-7-etoxi-6-fluoro-7-oxohept-5-en-1-il]butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (116 mg, 0,18 mmol) a hidrogenación catalítica sobre Pd/C (10 % en peso) (15 mg) en EtOAc (5 ml) a TA durante 18 h. La mezcla se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró al vacío, dando 9-[4-(dimetilamino)-N-(7-etoxi-6-fluoro-7-oxoheptil)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo (117 mg, 100 %) que se usó sin purificación.

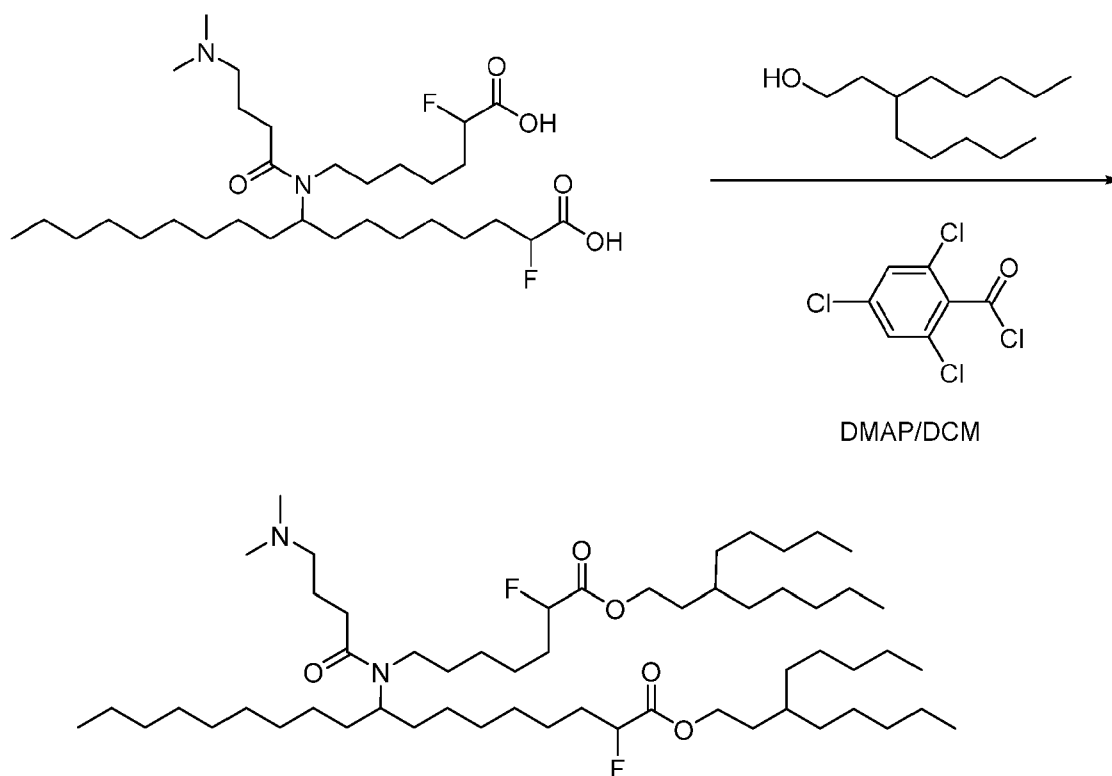
Etapla 7. Síntesis del ácido 9-[N-(6-carboxi-6-fluorohexil)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico





Se agitaron 9-[4-(dimetilamino)-N-(7-etoxi-6-fluoro-7-oxoheptil)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo (117 mg, 0,19 mmol) y el LiOH (18 mg, 0,74 mmol) en THF (0,6 ml) y H₂O agua (0,18 ml) a 50 °C durante 2 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se inactivó con HCl 6 M (0,126 ml) y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 9-[N-(6-carboxi-6-fluorohexil)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (75 mg, 70,3 %) que se usó sin purificación.

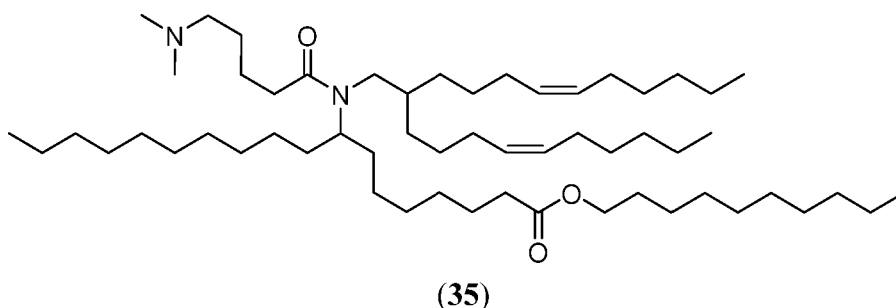
Etapa 8. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-{6-fluoro-7-oxo-7-[(3-pentiloxil)oxi]heptil}butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentiloxil (34)



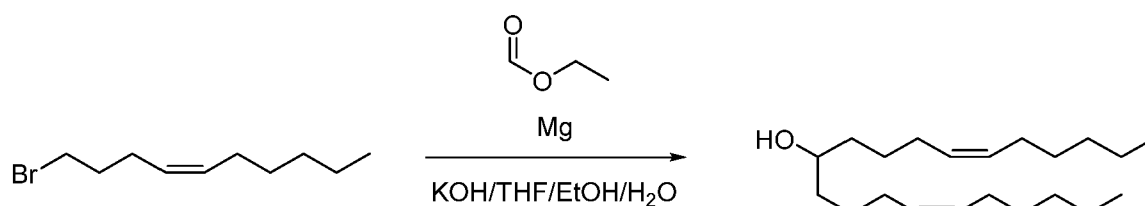
(34)

Se agitaron ácido 9-[N-(6-carboxi-6-fluorohexil)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (75 mg, 0,13 mmol), 3-pentiloctan-1-ol (72 mg, 0,36 mmol), cloruro de 2,4,6 triclorobenzoilo (95 g, 0,4 mmol) y el DMAP (64 mg, 0,52 mmol) en DCM (4 ml) a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lavó con NaHCO₃ (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH-DCM), dando 9-[4-(dimetilamino)-N-{6-fluoro-7-oxo-7-[(3-pentiloxil)oxi]heptilo}butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentiloxil (34) (42 mg, 34,3 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,00-4,91 (m, 1H), 4,88-4,79 (m, 1H), 4,23 (cd, J = 6,2, 2,9 Hz, 4H), 3,71-3,56 (m, 1H), 3,07 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 2,62 (s, 2H), 2,45 (m, 8H), 1,99-1,80 (m, 7H), 1,69-1,40 (m, 18H), 1,39-1,15 (m, 56H), 0,95-0,86 (m, 15H).

Ejemplo 8. Síntesis de 8-{N-[(6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-en-1-il]-5-(dimetilamino)pentanamido}octadecenoato de decilo (35)

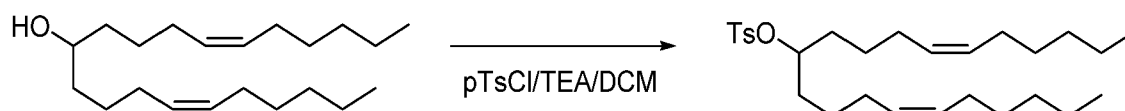


Etapla 1. Síntesis de (6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-ol



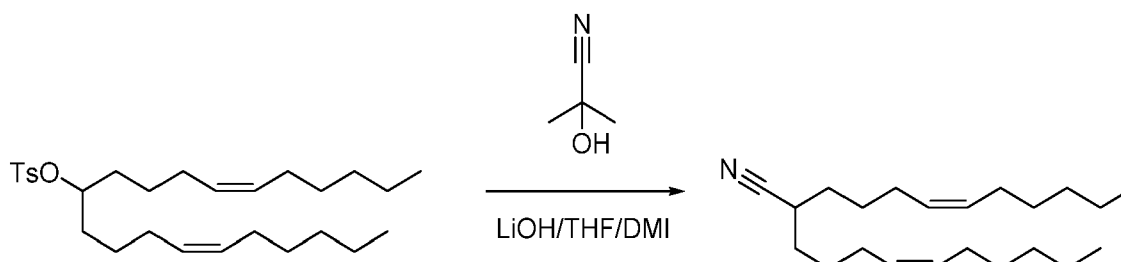
Se preparó un reactivo de Grignard a partir de (4Z)-1-bromodec-4-eno (19,9 g, 91 mmol) y magnesio (2,4 g, 97,0 mmol) en THF. La reacción se calentó a 45 °C durante 3 h. Después del enfriamiento a 10 °C, se añadió gota a gota formiato de etilo (7,0 g, 93,5 mmol en THF (35 ml) y la reacción se agitó durante 1 h. Se añadieron agua (40 ml) y HCl 6 M (50 ml) para enfriar y la reacción se repartió entre agua y hexano. Los extractos orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se recogió en EtOH (30 ml) con una solución de KOH (4,6 g) en agua (10 ml). Tras 5 min se eliminó el EtOH y el residuo se repartió entre hexano y HCl 6 M. Los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc-hexano), dando (6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-ol (11,4 g, 81,4 %).

Etapla 2. Síntesis de 4-metilbencenosulfonato de (6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-ilo



Se agitaron (6Z, 15Z)-henicosa-6,15-dien-11-ol (10 g, 32,4 mmol), TEA (9,0 ml, 64,8 mmol), HCl de trimetilamonio (0,31 g, 3,2 mmol) y cloruro de p toluenosulfonilo (8,0 g, 42,1 mmol) en DCM (50 ml) a TA durante 18 h. La reacción se inactivó lentamente con N,N-dimetilpropano-diamina (1,09 g, 10,7 mmol). Tras agitar durante 15 min, la reacción se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada, dando 4-metilbencenosulfonato de (6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-ilo (0-5 % de EtOAc-hexano) (8,7 g, 57,9 %).

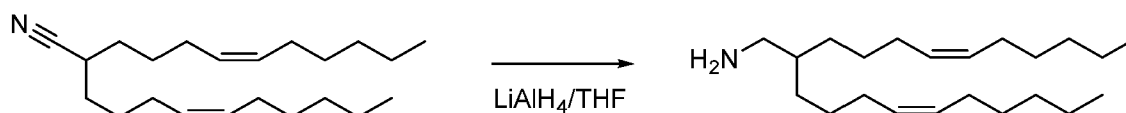
Etapla 3. Síntesis de (6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-enenitrilo



Se agitaron (6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-ol 4-metilbencenosulfonato (8,7 g, 18,8 mmol), dimetilimidazolidinona (22,6 ml, 0,83 M), cianohidrina de acetona (3,5 g, 41,5 mmol) y LiOH (880 mg, 36,6 mmol) en THF (52 ml) a 65 °C durante 18 h. La reacción se dividió entre EtOAc-hexano (1:1, 500 ml) y agua, los extractos orgánicos se lavaron con

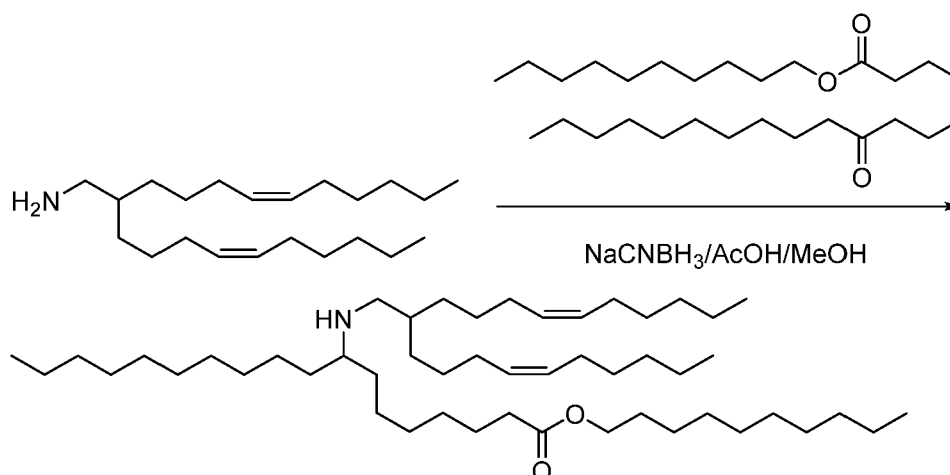
salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc-hexano), dando (6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-enenitrilo (4,9 g, 81,5 %).

5 **Etapla 4. Síntesis de (6Z,15Z)-11-(aminometil)henicosa-6,15-dieno de rendimiento**



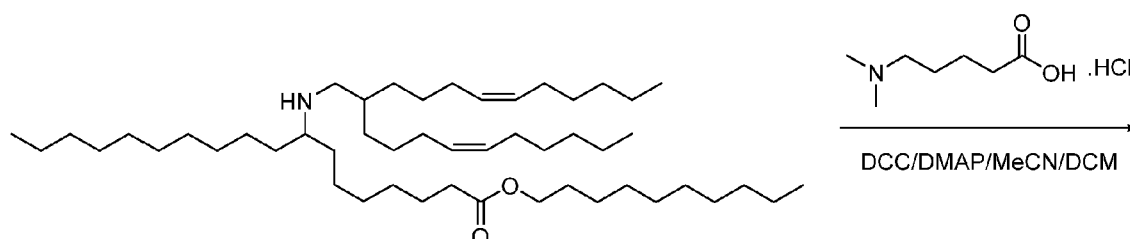
10 Se agitaron (6Z)-2-[(4Z)-Dec-4-en-1-il]dodec-6-enenitrilo (3,4 g, 9,9 mmol) y LiAlH_4 (1,9 g, 50,0 mmol) en THF (75 ml) a 0 °C durante 18 h y se dejaron calentar a TA. La reacción se enfrió a 0 °C y se inactivó con NaOH 1 M (1,9 ml). La mezcla se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío y el material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH-DCM), dando (6Z,15Z)-11-(aminometil)henicosa-6,15-dieno (2,4 g, 75,4 %).

15 **Etapla 5. Síntesis de 8-[(6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-en-1-il]amino}octadecenoato de decilo**

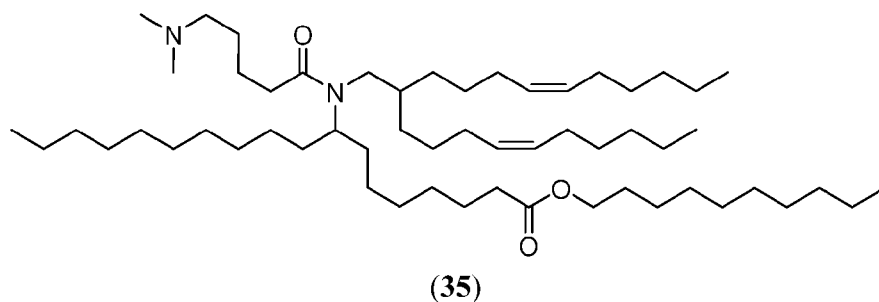


20 Se agitaron 8-oxooctadecanoato de decilo (368 mg, 0,84 mmol), (6Z,15Z)-11-(aminometil)henicosa-6,15-dieno (297 mg, 0,9 mmol), AcOH (0,1 ml, 1,7 mmol) y NaCNBH_3 (156 mg, 2,5 mmol) en MeOH (10 ml) a (50 °C) durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en DCM, se lavó con NaHCO_3 (solución sat.) y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (5-40 % de EtOAc-hexano), dando 8-[(6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-en-1-il]amino}octadecenoato de decilo (438 mg, 70,2 %).

25 **Etapla 6. 8-[N-[(6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-en-1-il]-5-(dimetilamino)-pentanamido}octadecenoato de decilo**

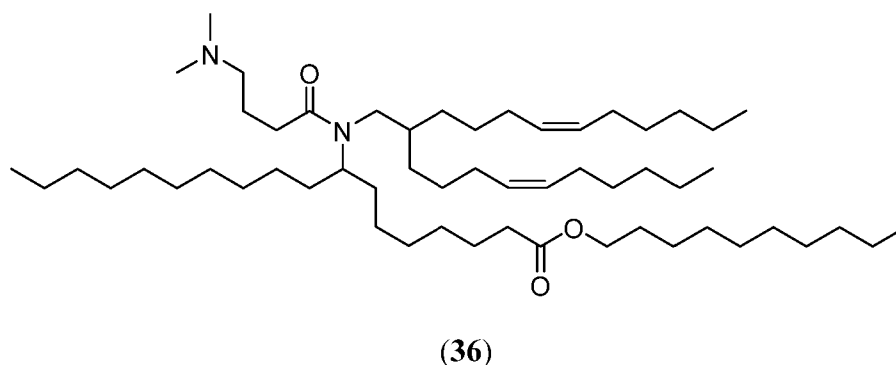


30

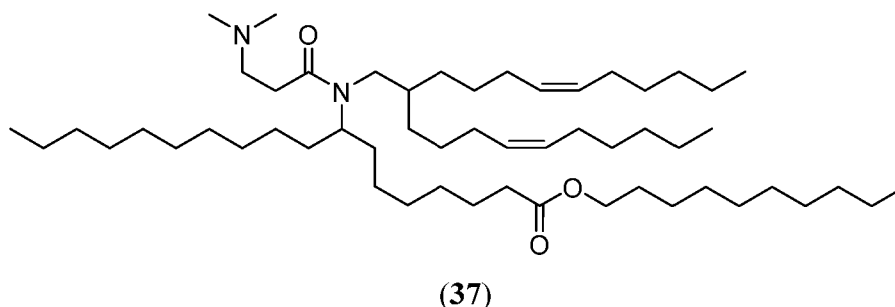


Se agitaron sal HCl de ácido 5-(metilamino)pentanoico (71 mg, 0,4 mmol), DCC (90 mg, 0,43 mmol) y DMAP (72 mg, 0,6 mmol) en MeCN (5 ml) a TA durante 3 h. Se añadió 8-[[[(6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il] dodec-6-en-1-il]amino]octadecanoato de decanilo (146 mg, 0,2 mmol) en DCM (2 ml) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se dispersó en hexano:EtOAc:TEA (75:25:1), se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH-DCM), dando 8-{N-[(6Z)-2-[(4Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-en-1-il]-5-(dimetilamino)pentanamido}octadecanoato de decilo **(35)** (88 mg, 51,5 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,38 (hd, $J = 7,9, 5,4$ Hz, 4H), 4,07 (td, $J = 6,8, 2,4$ Hz, 2H), 3,63 (s, 1H), 3,09 (dd, $J = 18,4, 7,5$ Hz, 2H), 2,42-2,26 (m, 6H), 2,23 (d, $J = 1,5$ Hz, 6H), 2,01 (dd, $J = 13,6, 6,8$ Hz, 8H), 1,76-1,57 (m, 11H), 1,51 (dc, $J = 14,7, 7,2$ Hz, 5H), 1,43-1,17 (m, 53H), 0,96-0,84 (m, 12H).

Los siguientes compuestos se prepararon utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

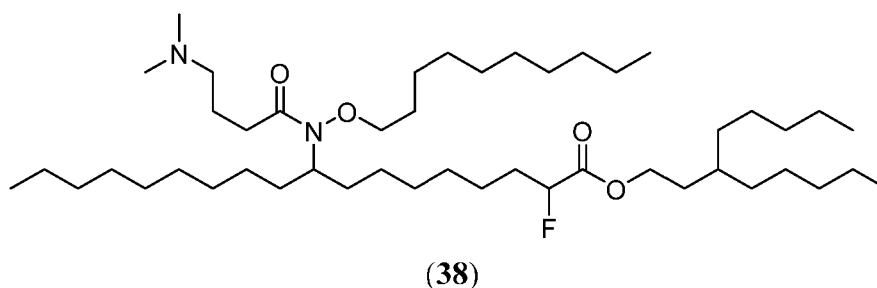


8-{N-[(Z)-2-[(Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-en-1-il]-4-(dimetilamino)butanamido}-octadecenoato de decilo (36). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,48-5,25 (m, 4H), 4,07 (td, $J = 6,8, 2,7$ Hz, 2H), 3,66 (s, 1H), 3,09 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,42-2,26 (m, 6H), 2,24 (s, 6H), 2,02 (t, $J = 6,9$ Hz, 7H), 1,82 (dt, $J = 9,7, 7,2$ Hz, 2H), 1,63 (d, $J = 4,1$ Hz, 9H), 1,47 (s, 2H), 1,41-1,18 (m, 53H), 0,97-0,84 (m, 12H).

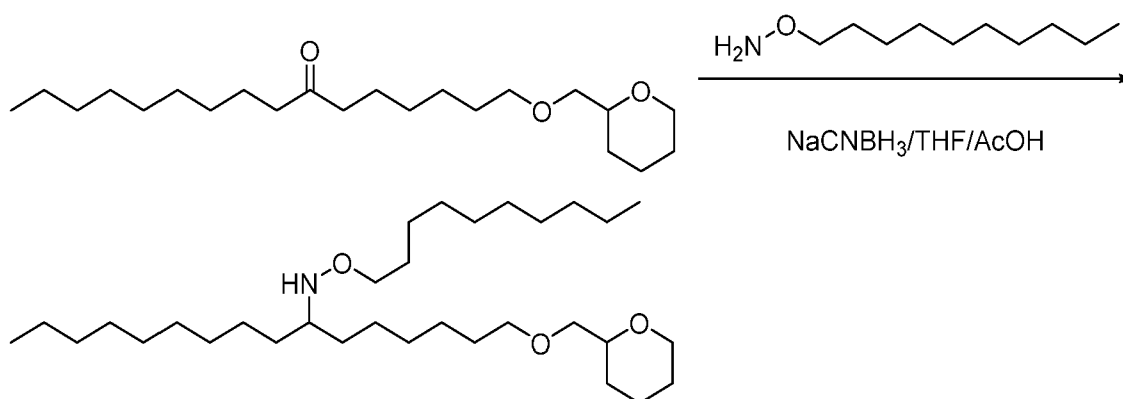


8-{N-[(Z)-2-[(Z)-dec-4-en-1-il]dodec-6-en-1-il]-3-(dimetilamino)propanamido}-octadecenoato de decilo (37). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,46-5,30 (m, 4H), 4,96-4,83 (m, 1H), 4,07 (td, $J = 6,8, 2,0$ Hz, 3H), 3,09 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,75-2,61 (m, 3H), 2,60-2,45 (m, 3H), 2,35-2,23 (m, 9H), 2,03 (c, $J = 6,5$ Hz, 7H), 1,58 (d, $J = 53,6$ Hz, 20H), 1,43-1,19 (m, 57H), 0,91 (ddt, $J = 6,9, 3,6, 2,3$ Hz, 12H).

Ejemplo 9. Síntesis de 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentiloctilo (38)

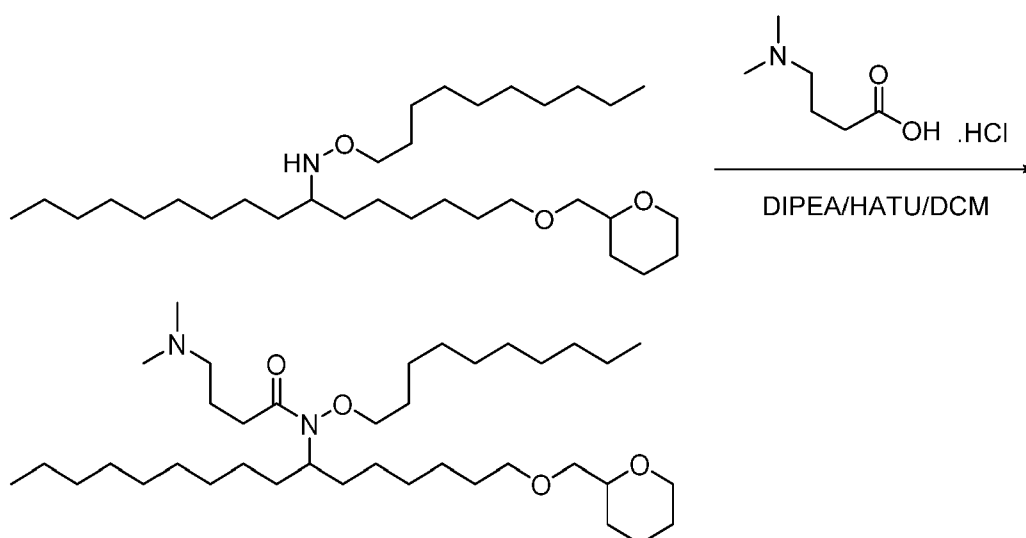


Etapa 1. Síntesis de (deciloxi)[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amina

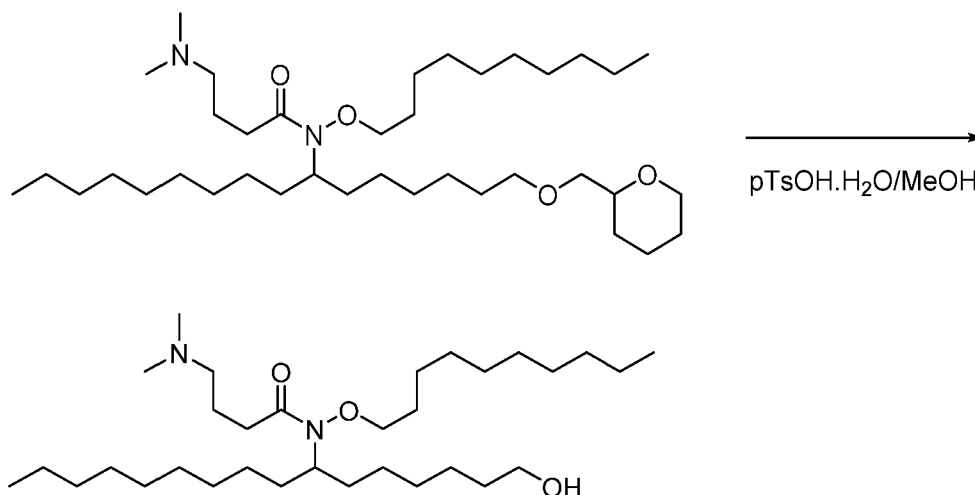


Se agitaron 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ona (7 g, 20,6 mmol), O-decilhdroxilamina (3,6 g, 21 mmol) y NaCNBH₃ (3,9 g, 61,7 mmol) en THF (10 ml) a 50 °C durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con agua. La fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de EtOAc/Hex), dando (deciloxi)[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amina (700 mg, 6,8 %).

Etapa 2. Síntesis de N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamida



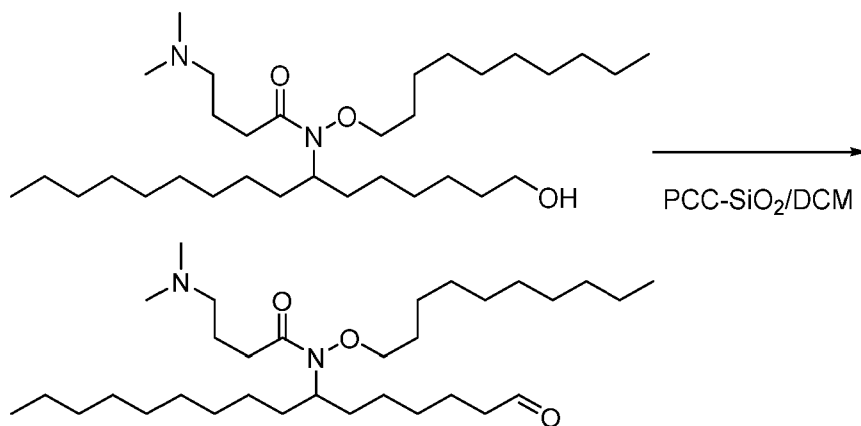
Se agitaron sal HCl del ácido 4-(dimetilamino)butanoico (1,4 g, 8,0 mmol), HATU (3,1 g, 8,0 mmol) y DIPEA (4,2 ml, 24,1 mmol) en DCM (40 ml) a TA durante 1 h. Se añadió (deciloxi)[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amina (2 g, 4,0 mmol) en DCM (10 ml) y la reacción se sometió a reflujo durante 16 h. Tras enfriar a temperatura ambiente, la reacción se lavó secuencialmente con HCl 1 M, solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secó (MgSO₄), se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamida (2 g, 81,8 %).

Etapla 3. Síntesis de N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamida

5

Se agitaron N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamida (2,5 g, 4,1 mmol) y pTsOH-H₂O (389 mg, 2,05 mmol) a TA en MeOH (10 ml) durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en DCM, se lavó con NaHCO₃ sat y salmuera, se secó (MgSO₄) y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de MeOH/DCM), dando N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamida (1,0 g, 46,4 %).

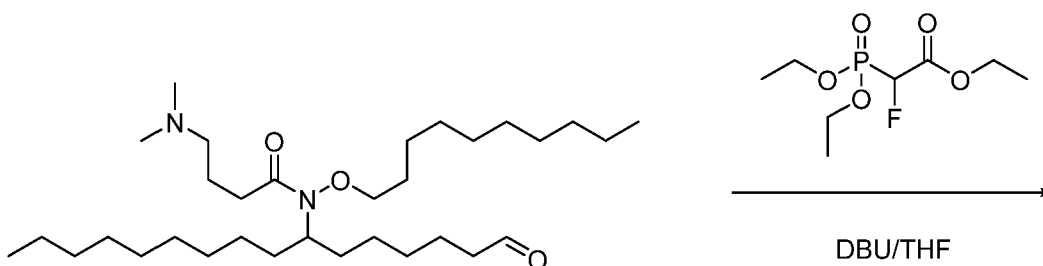
10

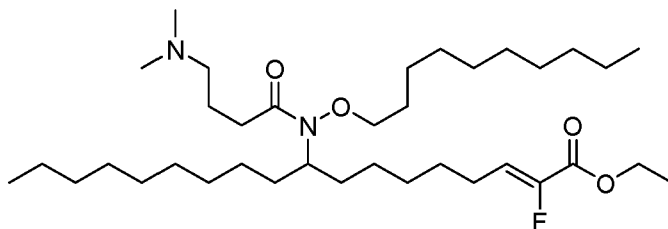
Etapla 4. Síntesis de N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamida

15

Se agitaron N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamida (1,0 g, 1,9 mmol) y PCC-SiO₂ (1:1) (3,3 g, 7,6 mmol) en DCM (10 ml) a TA durante 16 h. La reacción se filtró a través de sílice y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-30 % de ACN/DCM), dando N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamida (438 mg, 44,0 %).

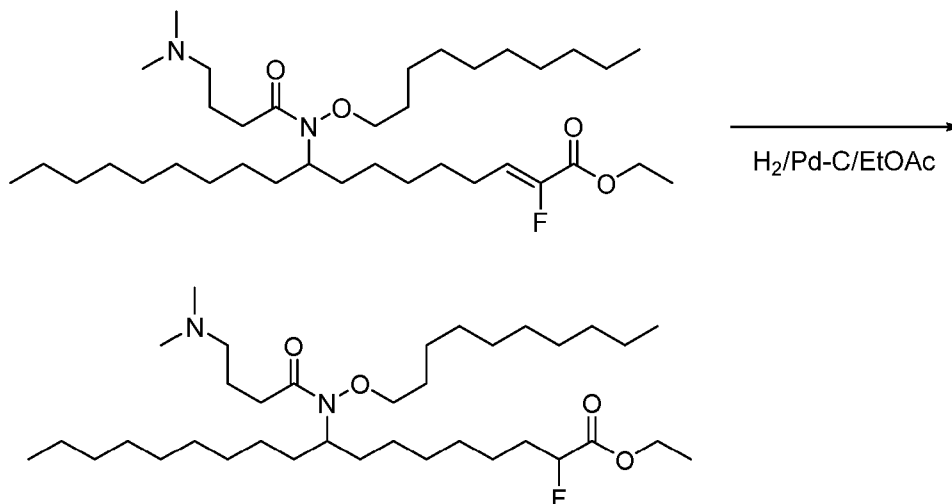
20

Etapla 5. Síntesis de (2Z)-9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo



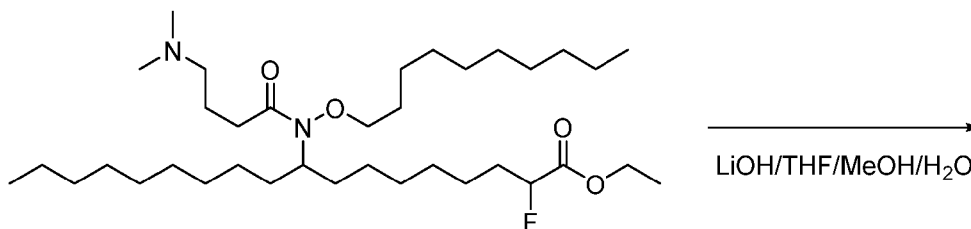
5 Se agitaron N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamida (438 mg, 0,8 mmol), 2-(dietoxifosforil)-2-fluoroacetato de etilo (606 mg, 2,5 mmol) y DBU (381 mg, 2,5 mmol) a TA en THF (10 ml) durante 16 h. El disolvente se retiró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lavó con salmuera y se secó (MgSO₄). El filtrado se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de ACN/DCM), dando (2Z)-9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (512 mg, 100,0 %).

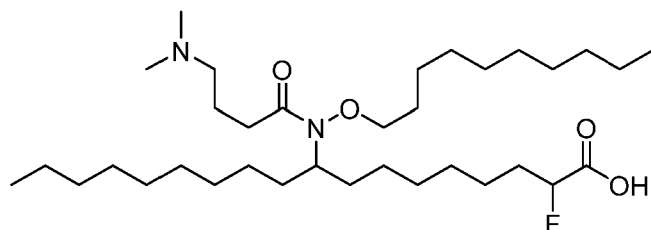
10 **Etapa 6. Síntesis de 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo en bruto**



15 Se sometió (2Z)-9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (546 mg, 0,9 mmol) a hidrogenación catalítica sobre Pd-C en EtOAc (10 ml) a TA hasta completarse. La reacción se filtró a través de Celite y se concentró al vacío, dando 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo que se usó sin purificación.

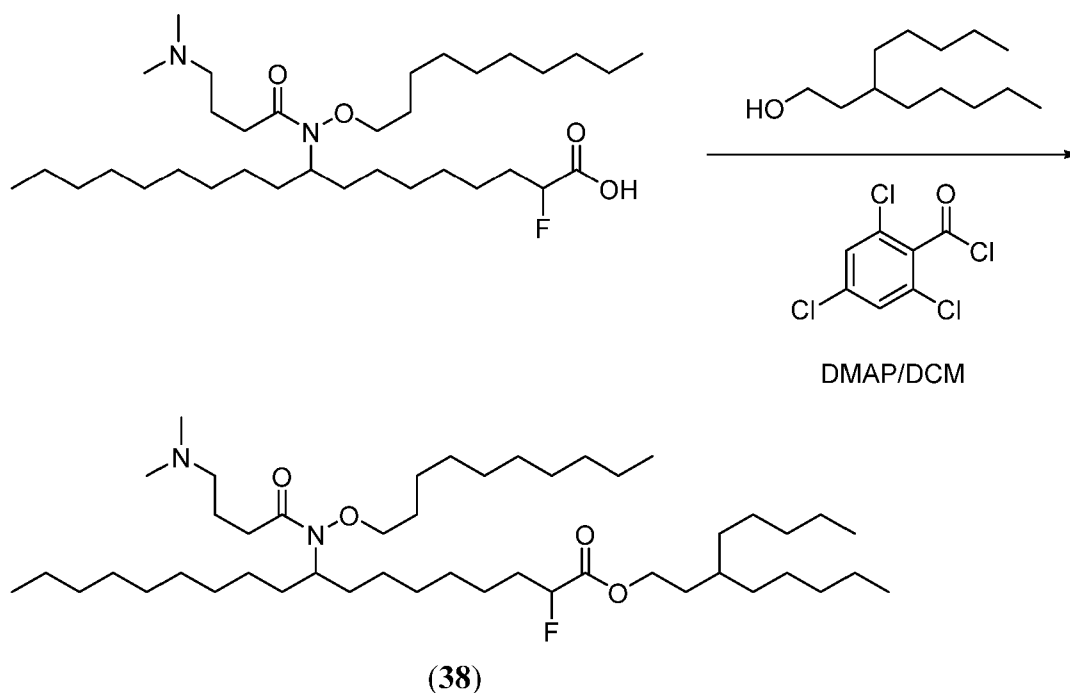
20 **Etapa 7. Síntesis del ácido 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico**





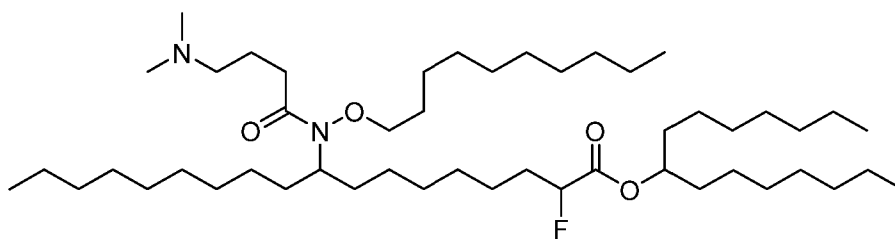
Se agitaron 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo (548 mg, 0,9 mmol) y el LiOH (85 mg, 3,6 mmol) en THF (10 ml) y H₂O (1 ml) a TA durante 16 h. Se añadió HCl 6 M (0,9 ml) y se eliminó el THF al vacío. El residuo se recogió en DCM, se lavó con agua, la capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (390 mg, 74,6 %) que se usó sin purificación.

10 **Etapla 8. Síntesis de 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentiloctilo (38)**



Se agitaron ácido 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (390 mg, 0,66 mmol), 3-pentiloctan-1-ol (0,2 g, 1,0 mmol), cloruro de 2,4,6-triclorobenzoylo (324 g, 1,33 mmol), TEA (81 mg, 0,8 mmol) y DMAP (106 mg, 0,86 mmol) en THF (6 ml) a TA durante 1,5 h. La reacción se filtró, se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de DCM/Hex y 0-30 % ACN/DCM), dando 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentiloctilo (38) (30 mg, 5,9 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,30-4,20 (m, 3H), 3,98-3,89 (m, 2H), 3,30 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 2,97 (s, 6H), 2,93-2,88 (m, 2H), 2,29-2,09 (m, 2H), 2,09-1,58 (m, 8H), 1,56-0,92 (m, 56H), 0,95-0,75 (m, 12H).

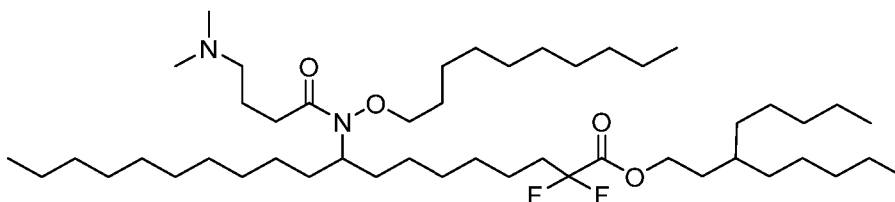
Los siguientes compuestos se prepararon utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.



(111)

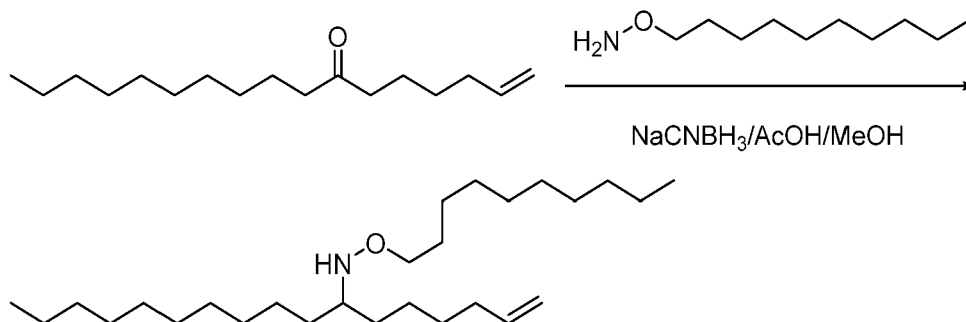
9-(N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorooctadecanoato de pentadecan-8-ilo (111). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,05-4,90 (m, 1H), 4,81 (t, $J = 5,9$ Hz, OH), 4,39-4,18 (m, 1H), 3,86 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,48 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,33 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,25 (s, 6H), 1,94-1,77 (m, 4H), 1,69-1,53 (m, 11H), 1,45 (td, $J = 13,9, 6,4$ Hz, 5H), 1,29 (dd, $J = 11,9, 6,1$ Hz, 56H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).

Ejemplo 10. Síntesis de 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorononadecanoato de 3-pentiloxilo (39)



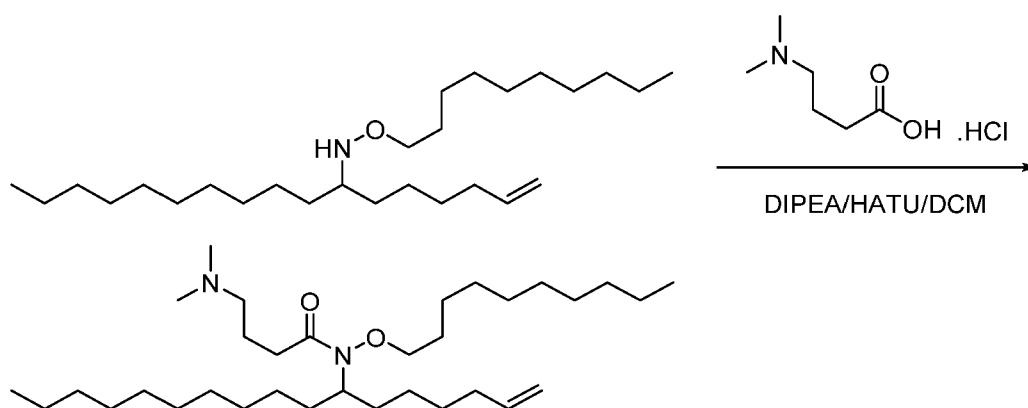
(39)

Etapla 1. Síntesis de (deciloxi)(heptadec-1-en-7-il)amina



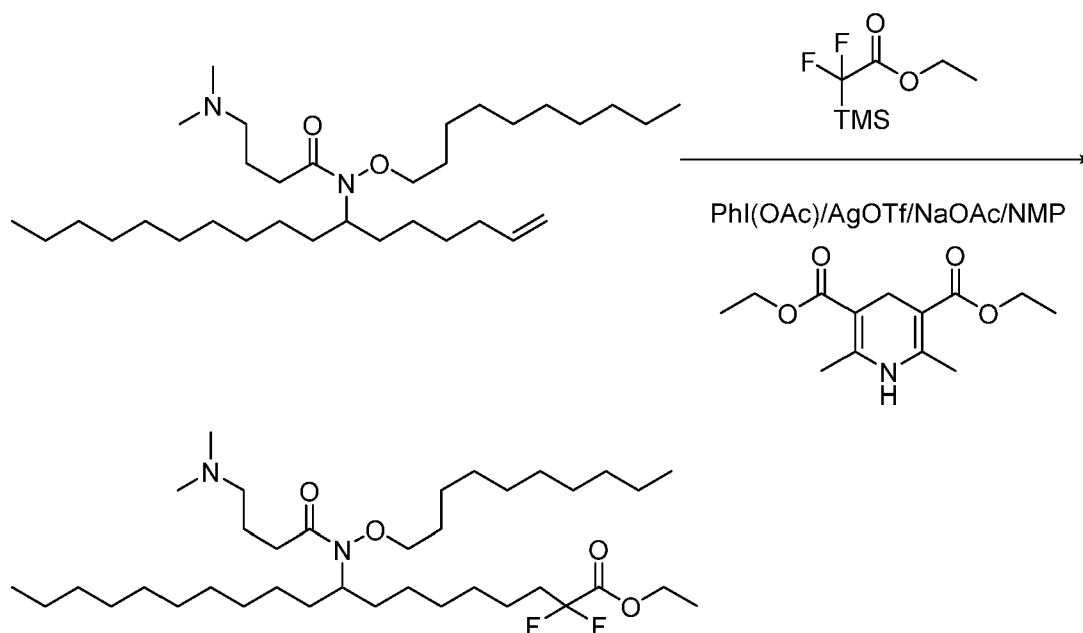
Se agitaron heptadec-1-en-7-ona (5,2 g, 20,8 mmol), AcOH (2,4 ml, 42 mmol) y NaCNBH_3 (4,0 g, 62,0 mmol) en THF (60 ml) a 50°C durante 15 h. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se repartió entre H_2O (50 ml) y DCM (50 ml). La capa acuosa se extrajo adicionalmente con DCM, los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4) se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de EtOAc/Hex) dando (deciloxi)(heptadec-1-en-7-il)amina (4,04 g, 47,5 %).

Etapla 2. Síntesis de N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(heptadec-1-en-7-il)butanamida



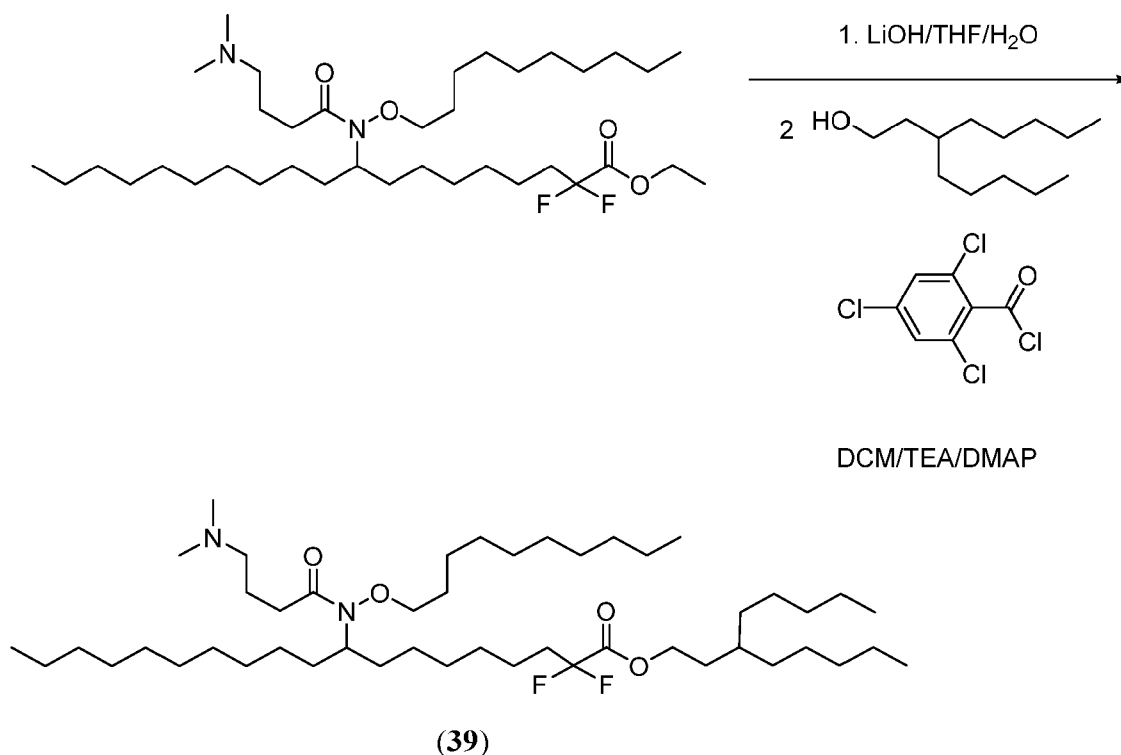
Se agitaron sal HCl del ácido 4-(dimetilamino)butanoico (3,3 g, 19,5 mmol), HATU (7,4 g, 19,5 mmol) y DIPEA (7,6 g, 58,6 mmol) en DCM (40 ml) a TA durante 1 h. Se añadió (diciloxi)(heptadec-1-en-7-il)amina (4 g, 9,8 mmol) en DCM (10 ml) y la reacción se calentó a reflujo durante 16 h. Tras enfriarse, la reacción se lavó secuencialmente con HCl 1 M, solución sat. De NaHCO_3 y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(heptadec-1-en-7-il)butanamida (4,1 g, 80,3 %).

10 **Etapla 3. Síntesis de 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorononadecanoato de etilo**



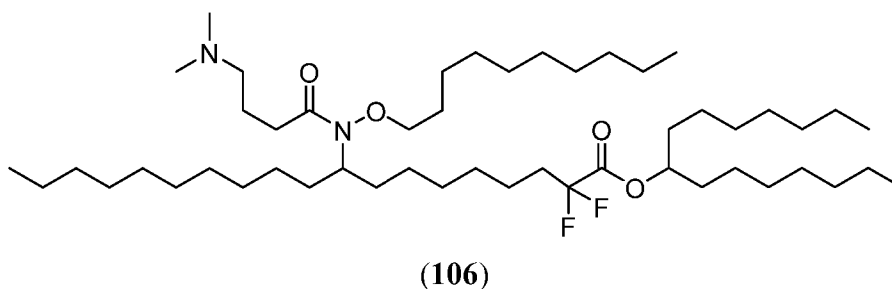
En un matraz secado al vacío, se agitaron en atmósfera de nitrógeno en NMP (30 ml) el éster de Hantsch (2,0 g, 7,7 mmol), NaOAc (4,9 g, 15,3 mmol), AgOTf (4,9 g, 19,1 mmol) y diacetato de yodobenceno (4,9 g, 15,3 mmol). Se añadieron N-(diciloxi)-4-(dimetilamino)-N-(heptadec-1-en-7-il)butanamida (4 g, 7,7 mmol) en NMP (30 ml) y 2,2-difluoro-2-(trimetilsilil)acetato de etilo (7,5 g, 38,3 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se filtró a través de Celite y el filtrado se lavó con salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El material en to se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-50 % de ACN/DCM) para dar 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluoronadecanoato de etilo (3,2 g, 64,7 %).

Etapla 4. Síntesis de 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluorononadecanoato de 3-pentiloxilo (39)



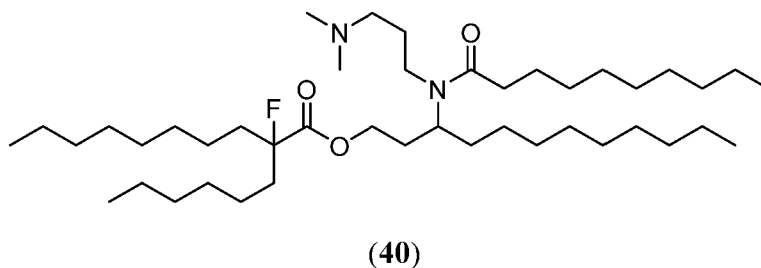
- 5 Se agitaron 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluoronadecanoato de etilo (731 mg, 1,1 mmol) y LiOH (108 mg, 4,5 mmol) en THF (10 ml) y agua (2 ml) a TA hasta completarse. La reacción se inactivó con HCl 6 M (0,75 ml) y se concentró parcialmente al vacío. La reacción se diluyó con DCM, se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró azeotrópicamente al vacío con tolueno (25 ml). Se agitaron ácido carboxílico en bruto, 3-pentiloctan-1-ol (0,34 g, 1,7 mmol), cloruro de 2,4,6-triclorobenzoylo (0,6 g, 2,3 mmol), TEA (137 mg, 1,4 mmol) y DMAP (179 mg, 1,5 mmol) en THF (6 ml) TA durante 1,5 h. La reacción se concentró al vacío y el material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de DCM/Hex y 0-15 % de ACN/DCM), dando una mezcla de 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluoronadecanoato de 3-pentiloctilo y una impureza insaturada. La mezcla se sometió a hidrogenación catalítica sobre Pd-C en EtOAc (10 ml) a TA durante 1 h. La reacción se filtró a través de celite y se concentró al vacío, dando 9-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluoronadecanoato de 3-pentiloctilo (39) (371 mg, 41,0 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,30 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 4,24 (dd, J = 9,5, 4,6 Hz, 1H), 3,99-3,92 (m, 2H), 3,30 (dd, J = 12,4, 7,1 Hz, 2H), 2,98 (s, 6H), 2,92 (dd, J = 7,3, 4,3 Hz, 2H), 2,04 (dt, J = 11,6, 6,4 Hz, 4H), 1,74-1,61 (m, 6H), 1,53-1,19 (m, 57H), 0,94-0,87 (zm, 12H).

El siguiente compuesto se preparó utilizando una metodología análoga a la descrita anteriormente.

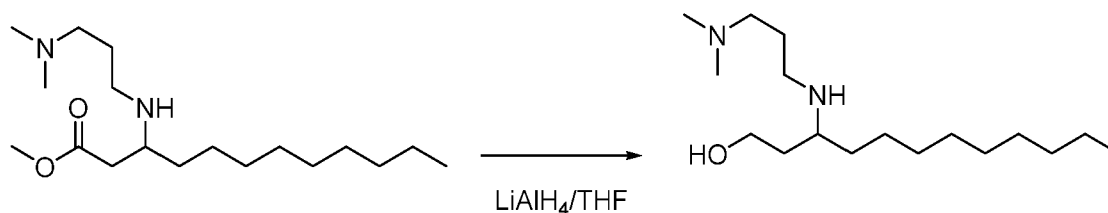


- 9-[N-(Deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-2,2-difluoro-nonadecanoato de pentadecan-8-ilo (106). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,31, 7,28, 5,32, 5,03, 5,02, 5,00, 4,30, 3,88, 3,86, 3,84, 2,50, 2,48, 2,46, 2,34, 2,32, 2,30, 2,25, 2,07, 2,05, 2,03, 2,01, 1,99, 1,87, 1,85, 1,83, 1,81, 1,64, 1,62, 1,60, 1,58, 1,47, 1,30, 1,29, 1,27, 0,92, 0,91, 0,90, 0,88.

Ejemplo 11. Síntesis de 2-fluoro-2-hexildecanoato de 3-[N-[3-(dimetilamin)propil]decanamido]-dodecilo (40)



Etapa 1. Síntesis de 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecan-1-ol

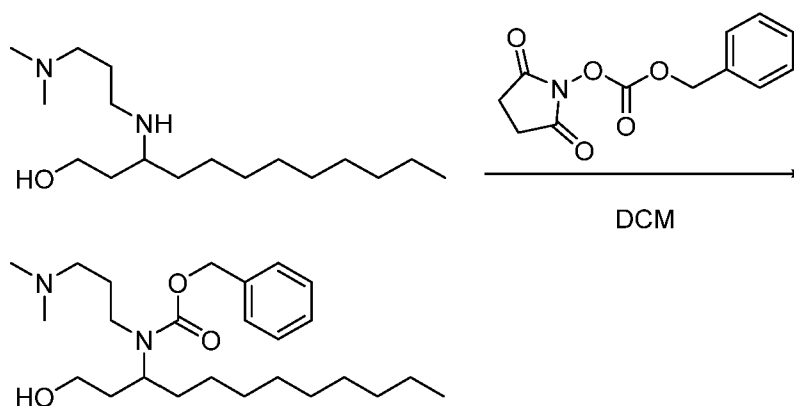


5

Se agitó LiAlH_4 (1,7 g, 26,8 mmol) en THF (100 ml) a 0 °C. Se añadió gota a gota 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (2,8 g, 8,9 mmol) en THF (100 ml) y la reacción se agitó a TA hasta completarse. La reacción se enfrió hasta 0 °C, se añadió NaOH 1 M (20 ml) y se extrajo con EtOAc. Los orgánicos se secaron (MgSO_4), se filtraron y el filtrado se concentró al vacío, dando 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecan-1-ol en bruto (2,6 g, 100,0 %), que se usó sin purificación.

10

Etapa 2. Síntesis de N-[3-(dimetilamino)propil]-N-(1-hidroxidodecan-3-il)carbamato de bencilo

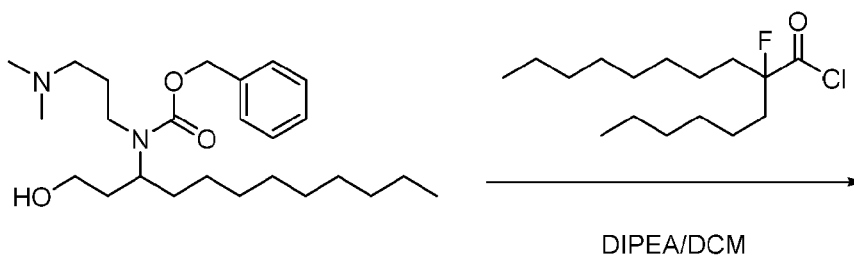


15

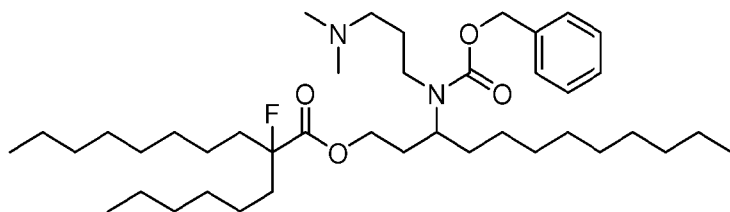
Se agitaron 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecan-1-ol (2,6 g, 8,9 mmol) y carbonato bencil-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2,2 g, 8,9 mmol) en DCM (50 ml) a 0 °C durante 16 h y se dejaron calentar a TA. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de MeOH/DCM), dando N-[3-(dimetilamino)propil]-N-(1-hidroxidodecan-3-il)carbamato de bencilo (2,1 g, 56,0 %).

20

Etapa 3. Síntesis de 2-fluoro-2-hexildecanoato de 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecilo

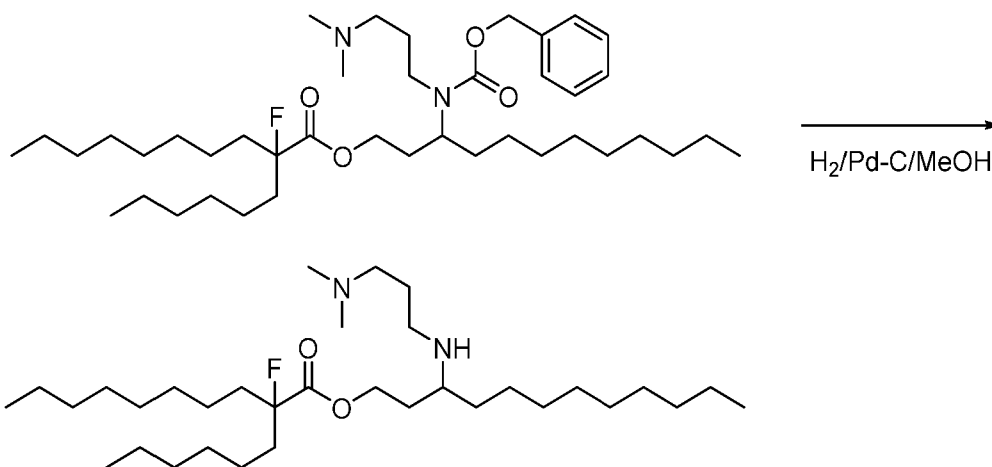


25



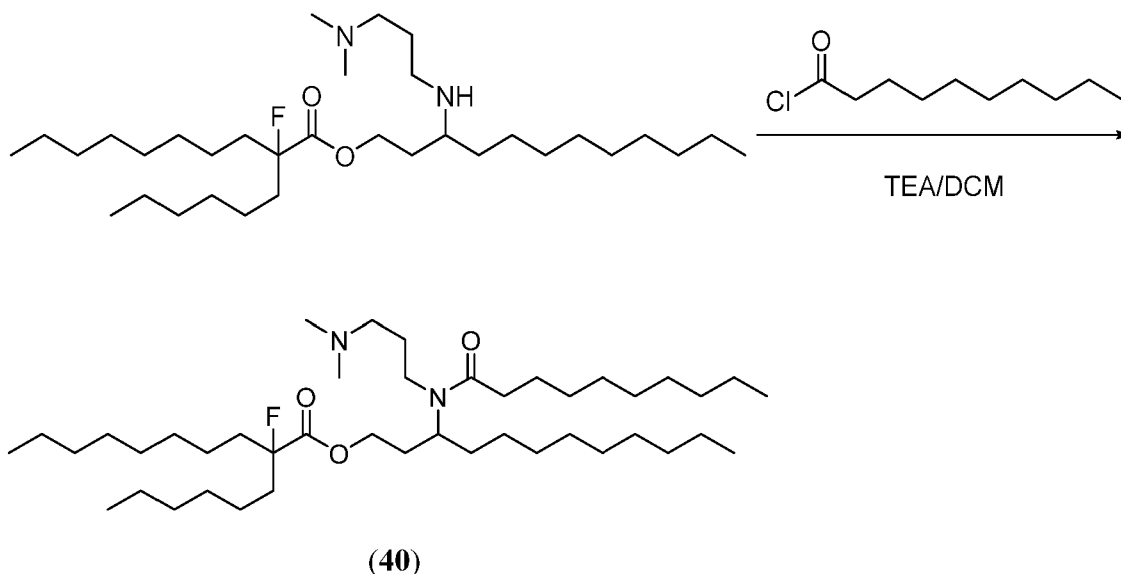
Se calentaron N-[3-(dimetilamino)propil]-N-(1-hidroxidodecan-3-il)carbamato de bencilo (230 mg, 0,5 mmol), cloruro de 2-fluoro-2-hexildecanoilo (160 mg, 0,5 mmol) y DIPEA (0,2 ml, 1,1 mmol) en DCM 80 °C durante 10 min bajo irradiación de microondas. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM) para dar 3-[(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)propil]amino}dodecil 2-fluoro-2-hexildecanoato (196 mg, 53,0 %).

Etapa 4. Síntesis de 2-fluoro-2-hexildecanoato de 3-{[3-(dimetilamino)propil]amino}dodecilo



Se sometió 3-[(benciloxi)carbonil][3-(dimetilamino)propil]amino}dodecil 2-fluoro-2-hexildecanoato (196 mg, 0,3 mmol) a hidrogenación catalítica sobre Pd/C en MeOH a TA durante 16 h. La reacción se filtró y se concentró al vacío, dando 2-fluoro-2-hexildecanoato de 3-{[3-(dimetilamino)propil]amino}dodecilo (157 mg, 99,9 %) que se utilizó sin purificación adicional.

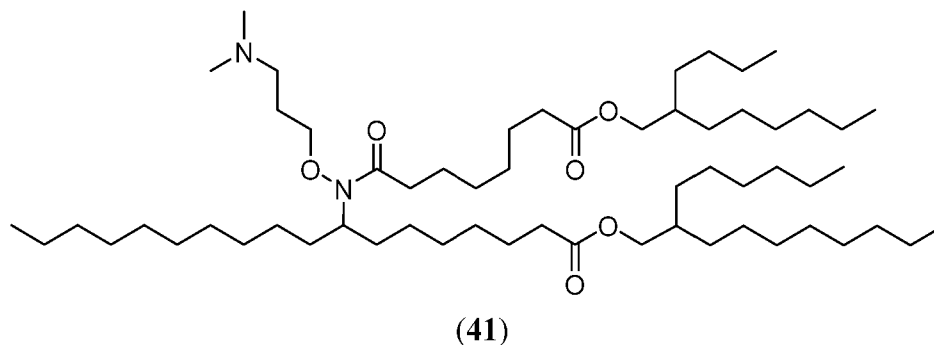
Etapa 5. Síntesis de 2-fluoro-2-hexildecanoato de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecilo (40)



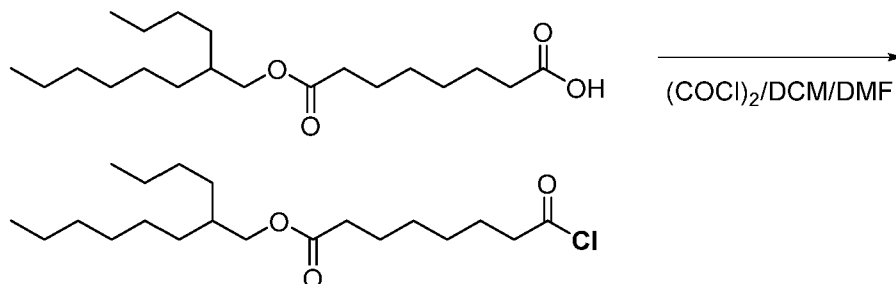
Se sometieron 2-fluoro-2-hexildecanoato de 3-{[3-(dimetilamino)propil]amino}dodecilo (157 mg, 0,3 mmol), cloruro de

decanilo (61 mg, 0,32 mmol) y TEA (59 mg, 0,6 mmol) a reflujo en DCM (20 ml) durante 24 horas. Tras enfriar, la reacción se lavó con NaHCO_3 , salmuera, se secó (MgSO_4) y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecil 2-fluoro-2-hexildecanoato (40) (64 mg, 31,7 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,41-4,34 (m, 1H), 4,23-4,16 (m, 1H), 4,12-4,05 (m, 1H), 4,01-3,94 (m, 1H), 3,93-3,85 (m, 1H), 3,78-3,71 (m, 1H), 3,24-3,15 (m, 2H), 2,39-2,23 (m, 7H), 1,96-1,72 (m, 8H), 1,51 (d, $J = 7,4$ Hz, 8H), 1,39-1,08 (m, 42H), 0,90 (t, 12H).

Ejemplo 12. Síntesis de Síntesis de 8-{8-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propoxi]-8-oxooctanamido}octadecenoato de 2-hexildecilo (41)

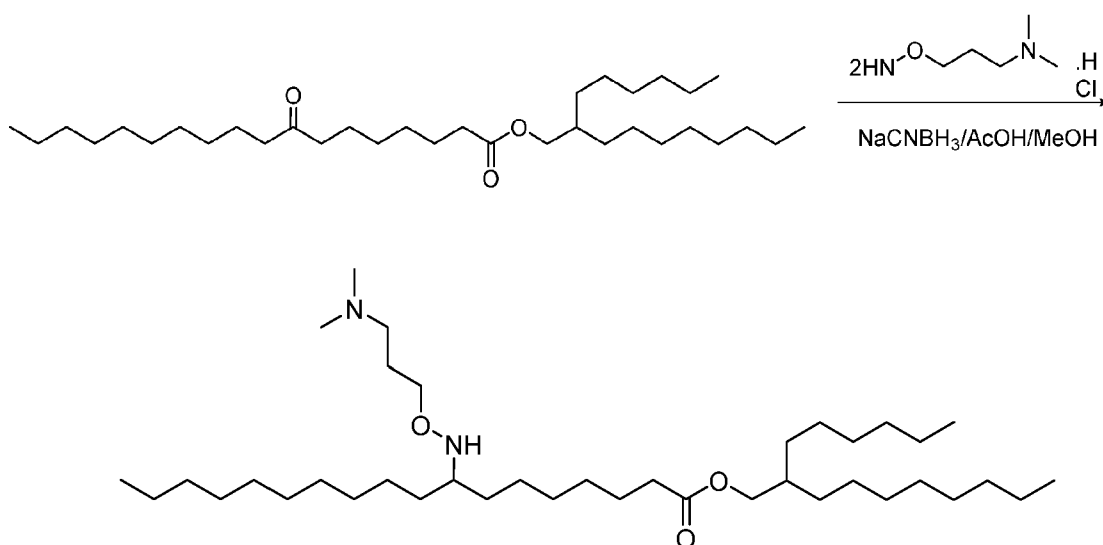


Etapas 1. Síntesis de 8-cloro-8-oxooctanoato de 2-butiloctilo



Se agitaron ácido 8-[(2-butiloctil)oxi]-8-oxooctanoico (120 mg, 0,35 mmol), cloruro de oxalilo (67 mg, 0,53 mmol) y DMF (cat) en DCM a TA durante 3 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se secó al vacío, dando 8-cloro-8-oxooctanoato de 2-butilo (126 mg, 99,6 %) que se utilizó sin purificar.

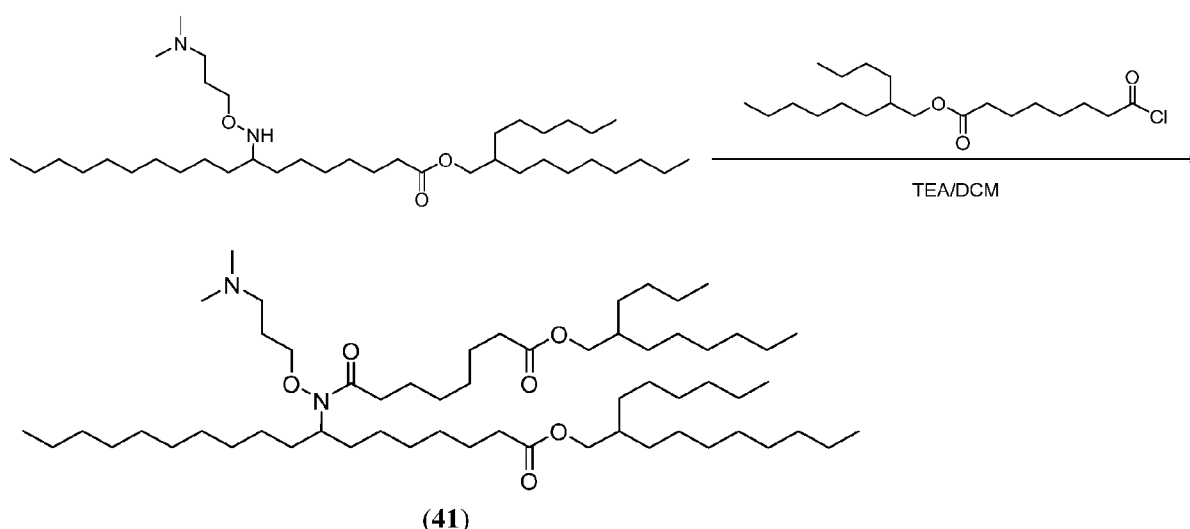
Etapas 2. Síntesis de 8-{[3-(dimetilamino)propoxi]amino}octadecenoato de 2-hexildecilo



Se agitaron [3-(dimetilamino)propoxi]amina (sal HCl) (148 mg, 1,0 mmol), 8-oxooctadecanoato de 2-hexildecilo (500

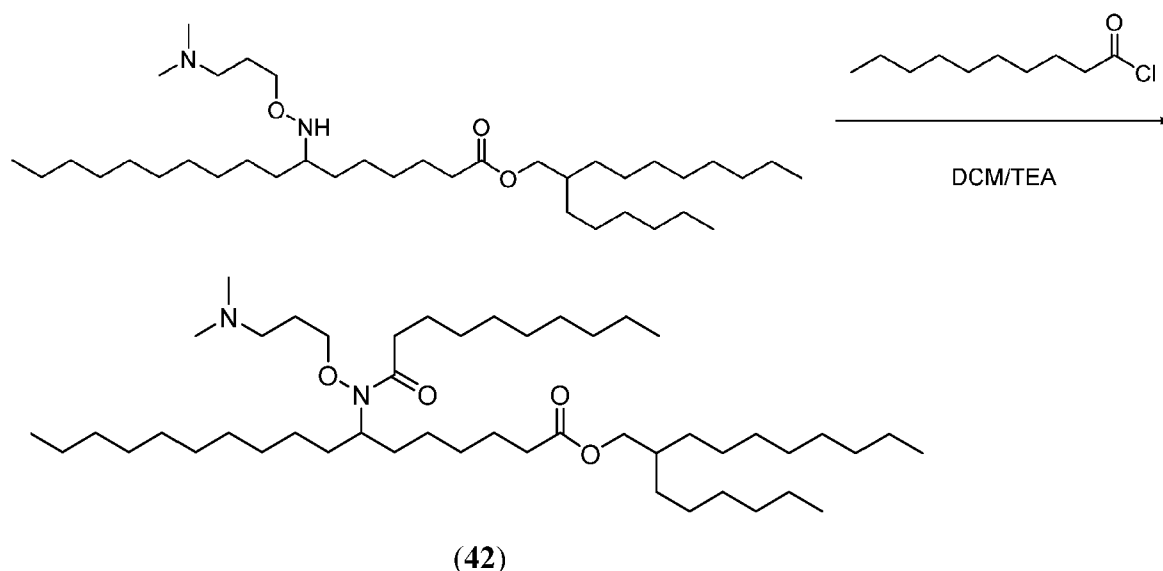
mg, 1,0 mmol), AcOH (115 mg, 1,9 mmol) y NaCNBH₃ (180 mg, 2,9 mmol) en MeOH (8 ml) a 45 °C durante 3 días. La reacción se concentró al vacío y el residuo se dividió entre DCM/H₂O 1:1. Se extrajo el extracto acuoso de nuevo con DCM y los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando 8-[[3-(dimetilamino)propoxi]amino]octadecanoato de 2-hexildecilo (385 mg, 64,4 %).

Etapla 3. Síntesis de 8-{8-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propoxi]-8-oxooctanamido}octadecenoato de 2-hexildecilo (41)



Se agitaron 8-[[3-(dimetilamino)propoxi]amino]octadecanoato de 2-hexildecil (192 mg, 0,31 mmol) y TEA (62 mg, 0,6 mmol) en DCM a TA. Se añadió 8-cloro-8-oxooctanoato de 2-butilo (133 mg, 0,37 mmol) en DCM y la reacción se agitó a TA durante 18 h. Se lavaron los extractos orgánicos con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando 8-{8-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propoxi]-8-oxooctanamido}octadecanoato de 2-hexildecilo (41) (88 mg, 30,2 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,32-4,24 (m, 1H), 3,99 (m, 4H), 3,93-3,89 (m, 2H), 2,53-2,13 (m, 14H), 1,60-1,42 (m, 14H), 1,43-1,02 (m, 66H), 0,94-0,85 (m, 15H).

Ejemplo 13. Síntesis de 7-{N-[3-(dimetilamino)propoxi]decanamido}-heptadecanoato de 2-hexildecilo (42)

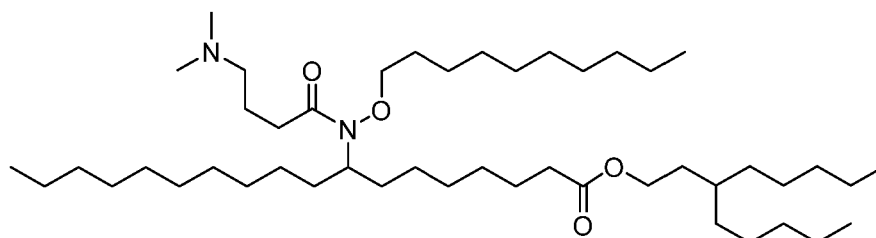


Se agitaron 7-[[3-(dimetilamino)propoxi]amino]heptadecanoato de 2-hexildecil (133 mg, 0,22 mmol) y TEA (44 mg, 0,44 mmol) en DCM (3 ml) a TA. Se añadió gota a gota cloruro de decanoilo (5 mg, 0,26 mmol) en DCM. La reacción se agitó a TA durante 18 h. Se lavaron los extractos orgánicos con solución de solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía

ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM) dando 7-[N-[3-(dimetilamino)propoxi]decanamido]heptadecanoato de 2-hexildecilo (42) (51 mg, 30,6 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,30 (s, 2H), 3,98 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,92 (s, 1H), 2,57-2,19 (m, 12H), 1,87-1,81 (m, 2H), 1,65-1,56 (m, 11H), 1,48-1,42 (s, 3H), 1,38-1,17 (m, 51H), 0,90 (td, $J = 6,9, 1,8$ Hz, 12H).

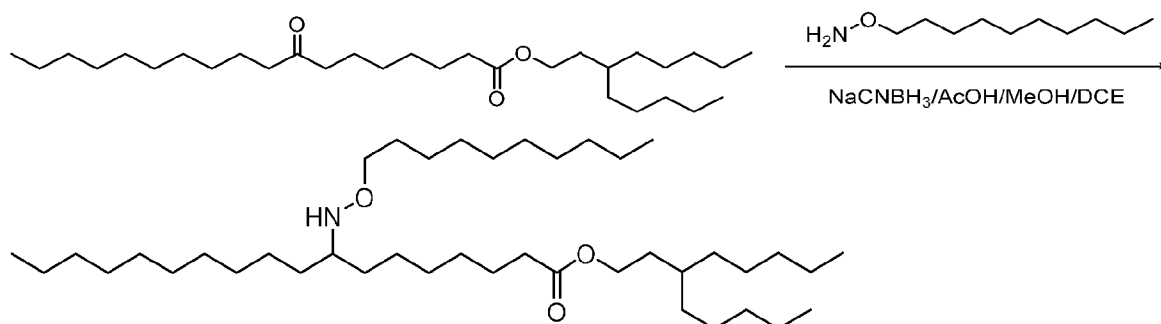
5

Ejemplo 14. Síntesis de 8-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-octadecenoato (43)



(43)

10 Etapa 1. Síntesis de 8-[(deciloxi)amino]octadecenoato de 3-pentiloxilo

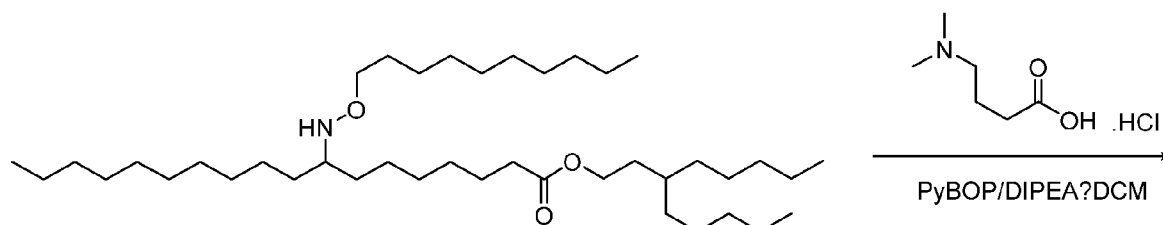


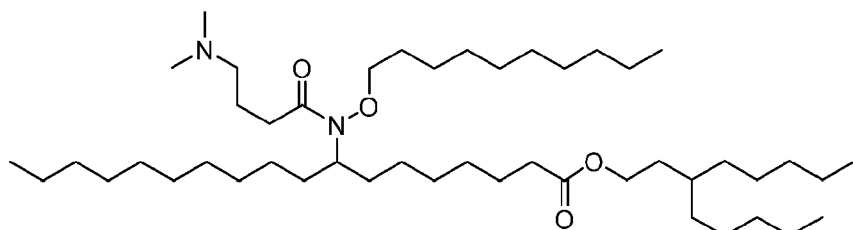
Se agitaron 3-pentiloxil 8-oxooctadecanoato (13,3 g, 28 mmol), O-decilhdroxilamina (7,2 g, 41,5 mmol) AcOH (3,2 ml, 55 mmol) y NaCNBH_3 (5,2 g, 83 mmol) en MeOH (100 ml) y DCE (50 ml) a 50 °C durante 15 h. Se añadió NaCNBH_3 (1 eq) adicional y la reacción se agitó a 60 °C durante 72 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se dividió entre H_2O (50 ml) y DCM (50 ml). Se extrajo el extracto acuoso con DCM y los extractos orgánicos combinados se secaron con MgSO_4 , se filtraron, se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada, dando 8-[(deciloxi)amino]octadecenoato de 3-pentiloxilo (18 g, 28,2 mmol, cuant).

15

20

Etapa 2. Síntesis de 8-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]-octadecenoato de 3-pentiloxilo (43)

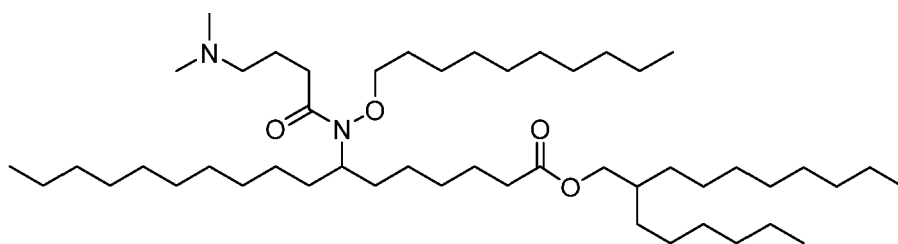




(43)

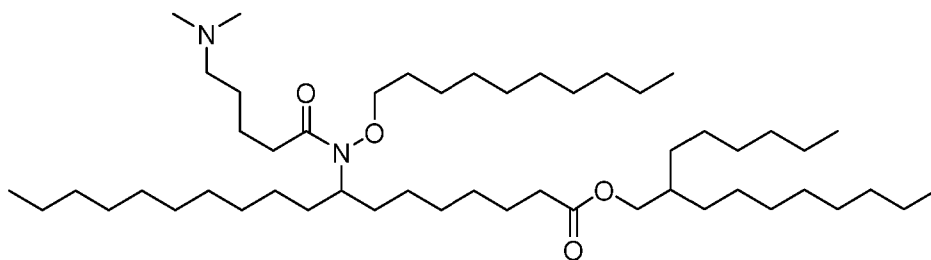
Se agitaron 8-[(deciloxi)amino]octadecanoato de 3--pentiloctilo (16,21 g, 25,4 mmol), sal HCl del ácido carboxílico 4-(dimetilamino)butano (4,7 g, 27,9 mmol), DIPEA (10,8 g, 83,8 mmol) y PyBOP (14,5 g, 27,9 mmol) en DCM (50 ml) a TA durante 18 h. La reacción se lavó con HCl 1 M, NaHCO₃ (solución ac. sat.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó con cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando 3-8-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]octadecanoato de pentiloctilo que se tomó en EtOAc, se lavó con solución sat. de NaHCO₃ (3 ×) y NaOH 1 M (2 ×) dos veces, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío, dando 8-[N-(deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido]octadecanoato (43) (6,4 g, 33,5 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,25 (tt, J = 9,9, 5,0 Hz, 1H), 4,05 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 3,81 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,43 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,26 (dt, J = 17,2, 7,4 Hz, 4H), 2,20 (s, 6H), 1,78 (p, J = 7,4 Hz, 2H), 1,56 (dc, J = 20,5, 6,6 Hz, 8H), 1,47-1,33 (m, 5H), 1,24 (dd, J = 13,4, 4,8 Hz, 50H), 0,85 (td, J = 6,9, 3,0 Hz, 12H).

Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.



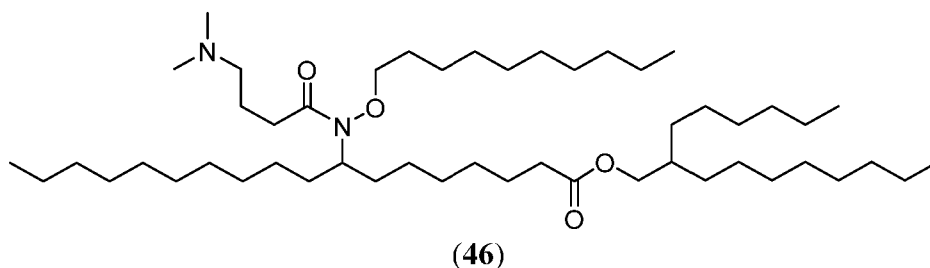
(44)

7-(N-(Deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido)heptadecanoato de 2-hexildecilo (44). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,29 (s, 1H), 3,98 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 3,86 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,55-2,21 (m, 10H), 1,61-1,90 (m, 19H), 1,29 (m, 48H), 0,99-0,73 (m, 12H).

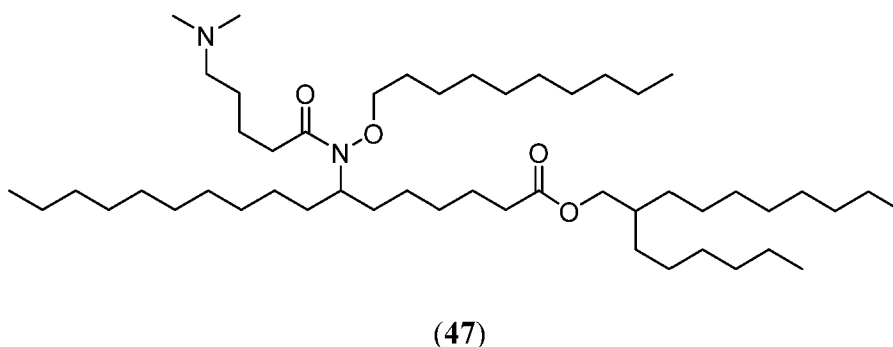


(45)

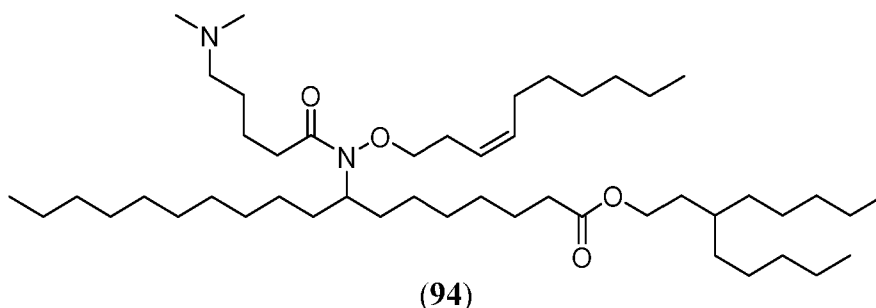
8-(N-(Deciloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecenoato de 2-hexildecilo (45). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,29 (s, 1H), 3,98 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 3,85 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,47 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,38 (s, 2H), 2,29 (d, J = 7,8 Hz, 6H), 1,84-1,52 (m, 22H), 1,52-1,06 (m, 53H), 0,90 (td, J = 6,9, 2,0 Hz, 12H).



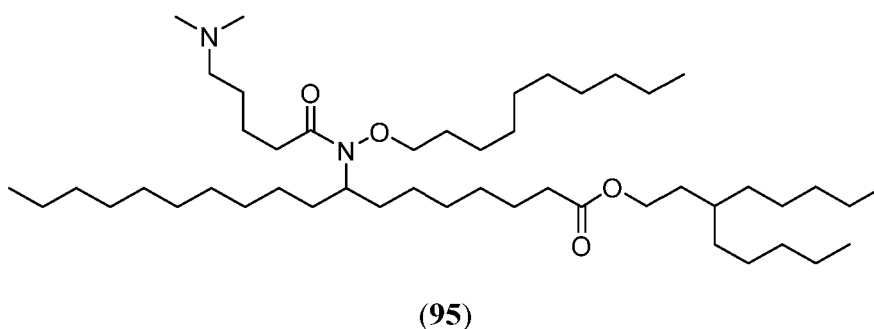
5 **8-(N-(Deciloxi)-4-(dimetilamino)butanamido)octadecenoato de 2-hexildecilo (46).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,28 (s, 1H), 3,98 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,86 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,51 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H), 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 4H), 1,96-1,83 (m, 2H), 1,63 (d, $J = 16,9$ Hz, 22H), 1,54-1,22 (m, 52H), 0,90 (td, $J = 6,8, 2,1$ Hz, 12H).



10 **7-(N-(Deciloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)heptadecanoato de 2-hexildecilo (47).** Producto confirmado mediante EM (IEN+)

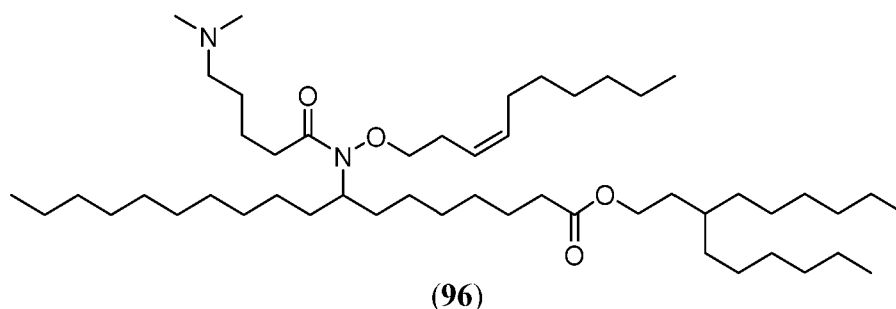


15 **(Z)-8-(N-(dec-3-en-1-iloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecanoato de 3-pentiloctilo (94).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,51-5,30 (m, 2H), 4,39-4,19 (m, 1H), 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,86 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,47 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,40-2,24 (m, 10H), 2,05 (dd, $J = 13,8, 6,7$ Hz, 2H), 1,95 (s, 7H), 1,76-1,49 (m, 7H), 1,44-1,20 (m, 44H), 0,91 (ddt, $J = 7,0, 5,3, 2,6$ Hz, 12H).

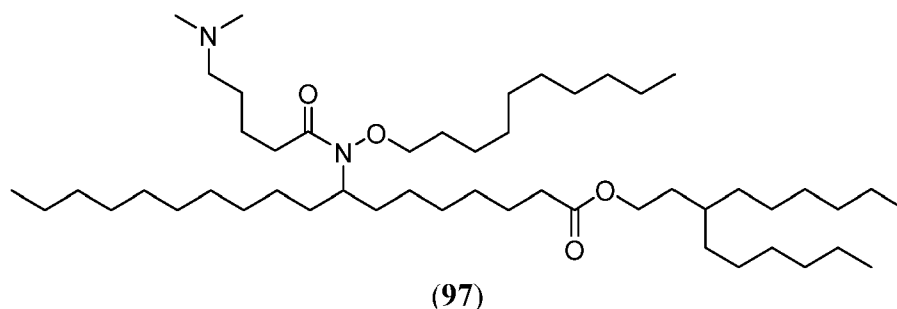


20 **8-(N-(Deciloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecanoato de 3-pentiloctilo (95).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,29 (d, $J = 4,9$ Hz, OH), 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,85 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,47 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,34 (dd, $J = 16,2,$

8,8 Hz, 3H), 2,29 (d, $J = 5,3$ Hz, 7H), 1,74-1,51 (m, 20H), 1,51-1,14 (m, 57H), 0,90 (td, $J = 6,9$, 2,6 Hz, 12H).

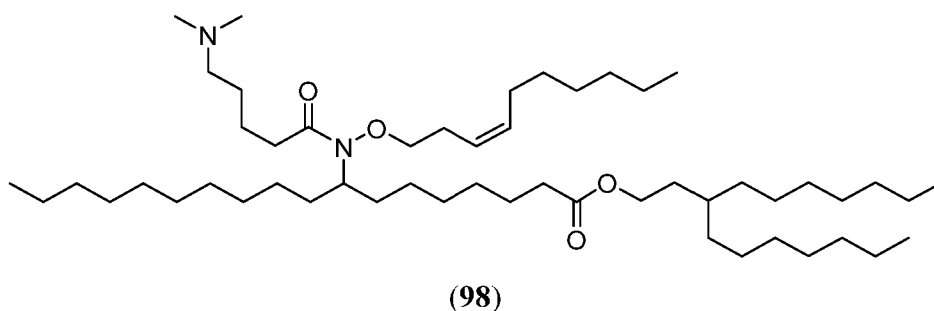


- 5 **(Z)-8-(N-(dec-3-en-1-iloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecanoato de 3-hexilnonilo (96).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,50-5,31 (m, 2H), 4,29 (s, 1H), 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,86 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,47 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,37-2,23 (m, 10H), 2,16 (c, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,05 (c, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,76-1,54 (m, 20H), 1,52-1,15 (m, 47H), 0,91 (tt, $J = 6,8$, 2,8 Hz, 12H).

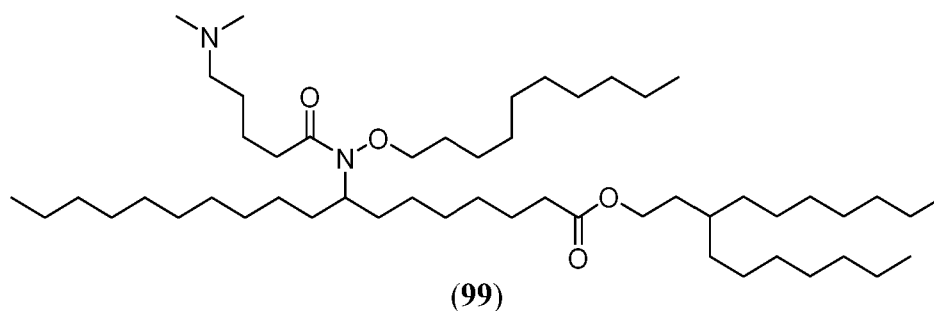


- 10 **8-(N-(Deciloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecanoato de 3-hexilnonilo (97).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,29 (d, $J = 5,1$ Hz, OH), 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,85 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,47 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,38-2,22 (m, 9H), 1,74-1,51 (m, 17H), 1,50-1,19 (m, 57H), 0,90 (td, $J = 6,8$, 2,2 Hz, 12H).

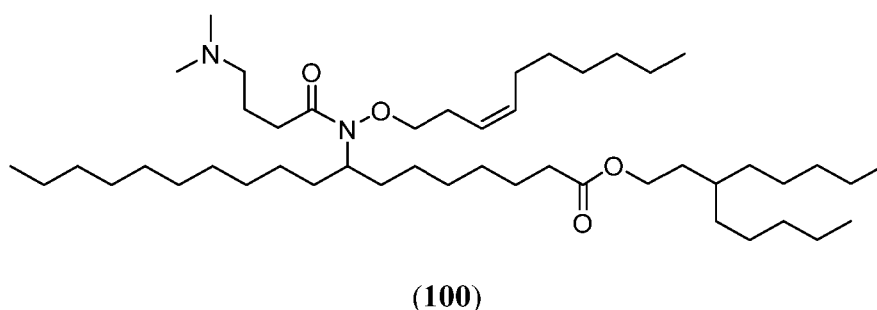
15



- 20 **(Z)-8-(N-(dec-3-en-1-iloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecanoato de 3-heptildecilo (98).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,51-5,31 (m, 2H), 4,29 (s, 1H), 4,09 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,86 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,48 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,44-2,23 (m, 9H), 2,17 (c, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,77-1,18 (m, 70H), 0,90 (td, $J = 6,7$, 2,3 Hz, 12H).

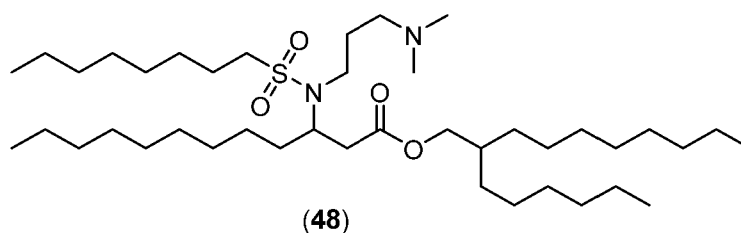


5 **8-(N-(Deciloxi)-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecanoato de 3-heptildecilo. (99).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,29 (s, 1H), 4,09 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,85 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,68-2,14 (m, 12H), 1,63 (tc, $J = 13,9, 7,3$ Hz, 21H), 1,53-1,16 (m, 60H), 1,00-0,79 (m, 12H).

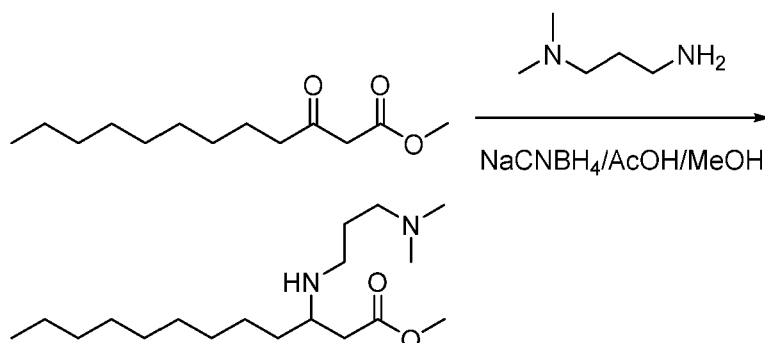


10 **(Z)-8-(N-(dec-3-en-1-iloxi)-4-(dimetilamino)butanamido)octadecanoato de 3-pentildecilo (100).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,50-5,31 (m, 2H), 4,29 (s, OH), 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,50 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,40 (s, 2H), 2,33-2,27 (m, 7H), 2,16 (c, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,05 (c, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,87 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,77-1,54 (m, 16H), 1,29 (d, $J = 13,9$ Hz, 42H), 0,91 (tt, $J = 6,9, 2,8$ Hz, 12H).

15 **Ejemplo 15. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (48)**



Etapla 1. Síntesis de 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo

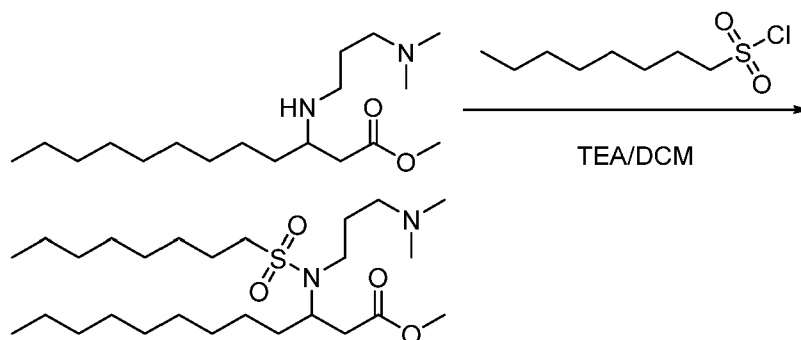


20 Se agitaron 3-oxododecanoato de metilo (5 g, 21,9 mmol), dimetilaminopropilamina (2,2 g, 21,9 mmol) y AcOH (1,4 g, 22,6 mmol) en MeOH (100 ml) a 75 °C durante 1 h. Tras enfriar se añadió NaCNBH_3 (2,8 g, 43,8 mmol) en porciones

y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lava con H₂O y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó con cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM/0,5 % de TEA), dando 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (2,62 g, 38,0 %).

5

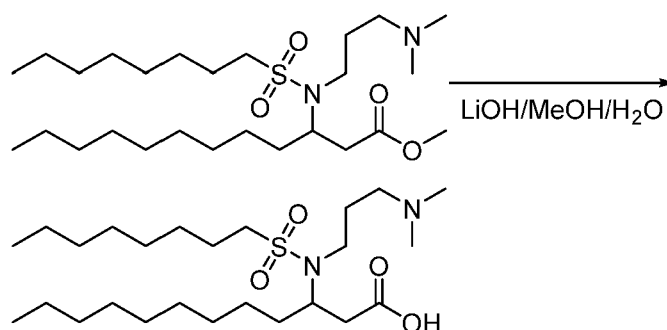
Etapa 2. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoato de metilo



- 10 Se agitaron 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (300 mg, 1,0 mmol), TEA (193 mg, 1,9 mmol) y cloruro de 1-octanesulfonilo (213 mg, 1,0 mmol) en DCM a TA durante 18 h. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-5 % de MeOH/DCM), dando 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoato de metilo (276 mg, 59,0 %).

15

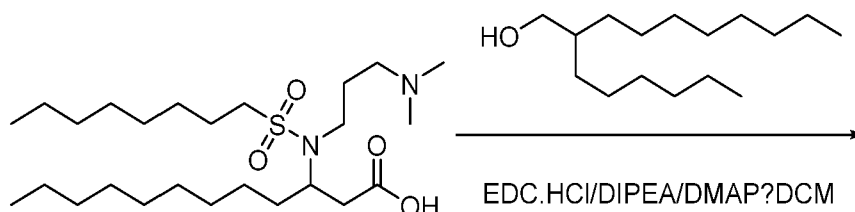
Etapa 3. Síntesis del ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoico

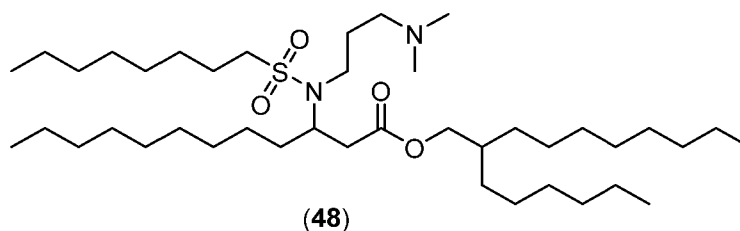


- 20 Se agitaron 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoato de metilo (278 mg, 0,6 mmol) y LiOH (27 mg, 1,1 mmol) en MeOH (10 ml) y H₂O (2 ml) a TA durante 18 h. Se añadió HCl 6 M (0,19 ml, 6 M, 1,1 mmol), la reacción se diluyó con agua y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoico (0,27 g, cuant.), que se usó sin purificación.

25

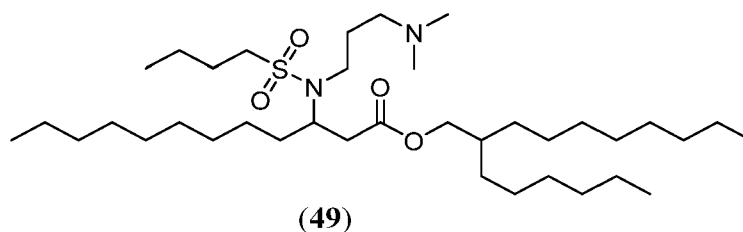
Etapa 4. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (48)





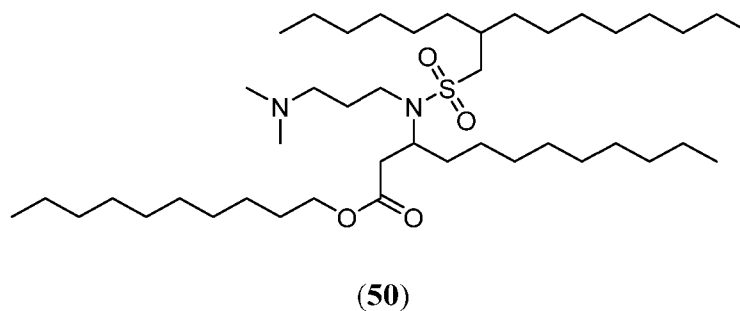
Se agitaron ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoico (0,27 g, 0,6 mmol), hexildecanol (151 mg, 0,6 mmol), HCl de EDC (217 mg, 1,1 mmol), DIPEA (0,3 ml, 1,7 mmol) y DMAP (cat) a TA durante 18 h. Los extractos orgánicos se lavaron con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secaron (MgSO₄) se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-12 % de MeOH/DCM) y (0-2 % de MeOH/EtOAc), dando 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]octano-1-sulfonamido}dodecanoato de 2-hexildecilo **(48)** (61 mg, 15,4 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,05-4,00 (m, 3H), 3,25-3,14 (m, 2H), 2,95 (td, J = 7,0, 3,2 Hz, 2H), 2,71-2,53 (m, 2H), 2,32-2,24 (m, 7H), 1,91-1,58 (m, 12H), 1,43-1,28 (m, 44H), 0,93-0,75 (m, 12H).

El siguiente compuesto se preparó utilizando una metodología análoga a la descrita anteriormente.

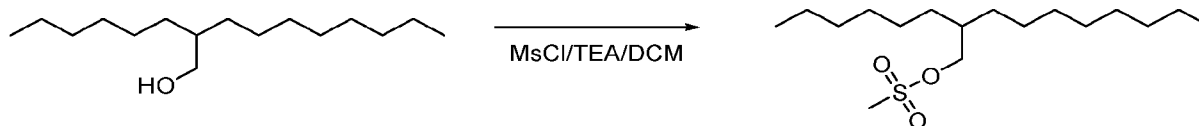


3-{N-[3-(dimetilamino)propil]butilsulfonamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (49). Producto confirmado mediante EM (IEN⁺)

Ejemplo 16. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido}dodecanoato de decilo (50)

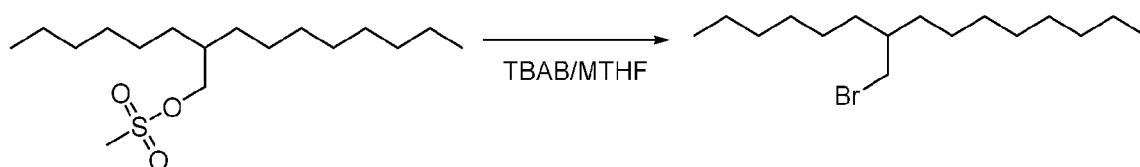


Etapla 1. Síntesis de metanosulfonato 2-hexildecilo



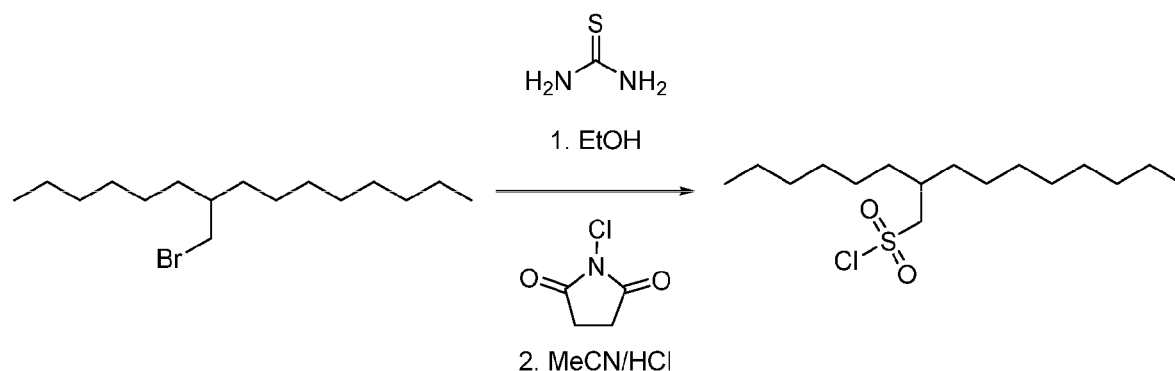
Se agitaron hexildecanol (2 g, 8,2 mmol) y TEA (1,44 ml, 10,3 mmol) en DCM (30 ml) a 0 °C. Se añadió gota a gota MsCl (0,7 ml, 9,1 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 2 h. La reacción se inactivó con la solución sat. de NaHCO₃ y se diluyó con Et₂O. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄) y se concentraron al vacío, dando metanosulfonato de 2-hexildecilo en bruto (2,64 g, cuant.) que se usó sin purificación.

Etapla 2. Síntesis de 7-(bromometil)pentadecano



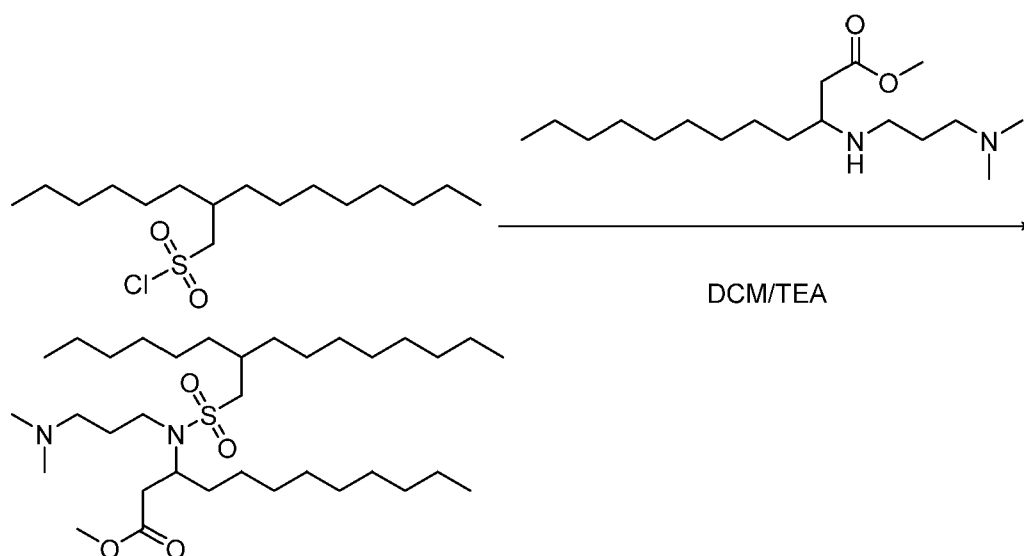
Se agitaron metanosulfonato de 2-hexildecil (2,64 g, 8,2 mmol) y TBAB (3,5 g, 10,7 mmol) en metil-THF (50 ml) a 80 °C durante 2,5 h. La reacción se vertió en agua helada y se extrajo con hexano. La capa acuosa se extrajo de nuevo con hexano y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (100 % de hexano), dando 7-(bromometil)pentadecano (2,52 g, 95,2 %).

Etapa 3. Síntesis de cloruro de 2-hexildecano-1-sulfonilo

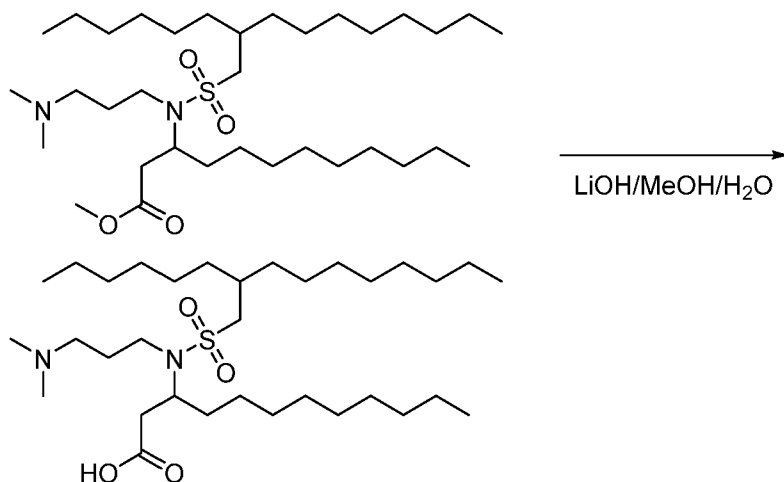


Se sometieron 7-(bromometil)pentadecano (500 mg, 1,64 mmol) y tiourea (124 mg, 1,64 mmol) a reflujo en EtOH (10 ml) durante 1 hora. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se agitó con clorosuccinimida (1,1 g, 8,2 mmol), HCl 2 M (1,1 ml, 1,1 mmol) y MeCN (10 ml) manteniendo la temperatura entre 10 y 20 °C durante 15 min. La reacción se dividió entre Et₂O (15 ml) y H₂O (15 ml). Los extractos orgánicos se separaron, se secaron (Na_2SO_4), se concentraron al vacío y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (PE-EtOAc, 5:1), dando cloruro de 2-hexildecano-1-sulfonilo (436 mg, 82,0 %).

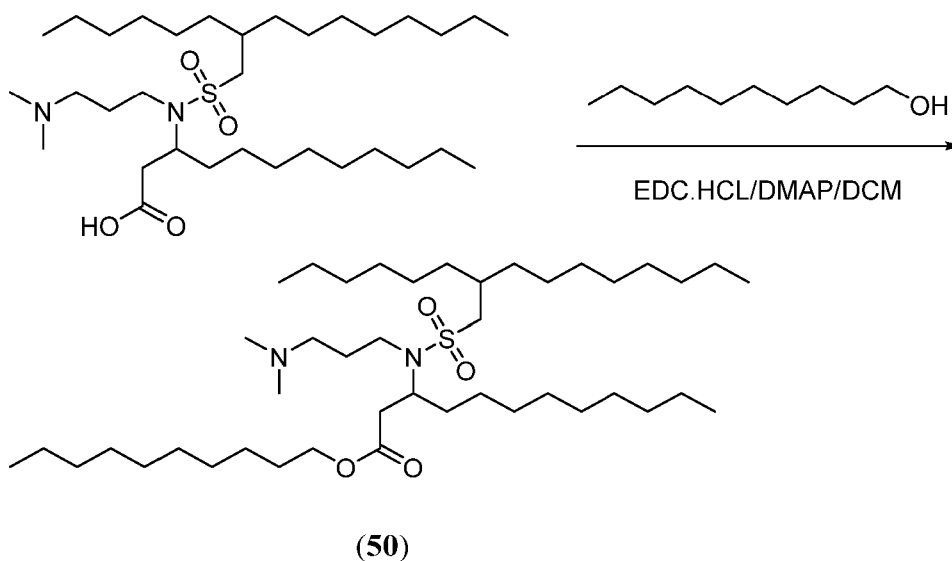
Etapa 4. Síntesis de 3-[N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido]-dodecanoato de metilo



Se agitaron 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (426 mg, 1,4 mmol), TEA (380 μl , 2,7 mmol) y cloruro de 2-hexildecano-1-sulfonilo (462 mg, 1,4 mmol) en DCM (10 ml) a TA durante 2 días. Se lavaron los extractos orgánicos con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron, el filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando 3-[N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido]dodecanoato de metilo (366 mg, 44,8 %).

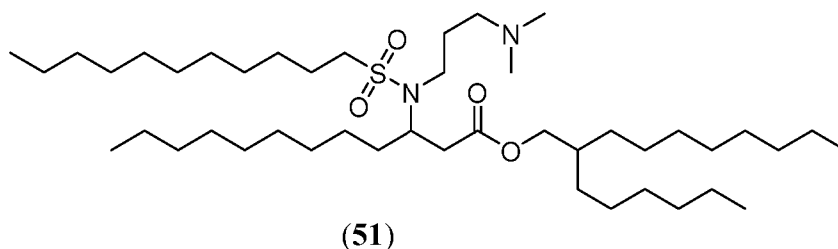
Etapla 5. Síntesis del ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido}dodecanoico

Se agitaron 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido}dodecanoato de metilo (366 mg, 0,61 mmol) y LiOH (29 mg, 1,2 mmol) en MeOH (10 ml) y H₂O (2 ml) a TA durante 18 h. La reacción se inactivó con HCl 6 M (0,2 ml), se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido}dodecanoico (291 mg, 81,4 %) que se usó sin purificación adicional.

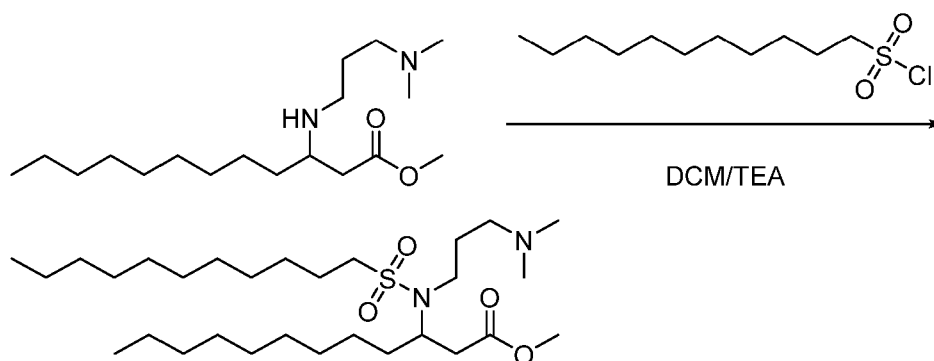
Etapla 6. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido}dodecanoato de decilo (50)

Se agitaron decanol (86 mg, 0,54 mmol), ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido}dodecanoico (291 mg, 0,5 mmol), HCl de EDC (189 mg, 1,0 mmol), DIPEA (0,26 ml, 1,5 mmol) y DMAP (6 mg, 0,05 mmol) en DCM (2 ml) a TA durante 18 h. Los extractos orgánicos se lavaron con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-2 % de MeOH/EtOAc) dos veces, dando 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]2-hexildecansulfonamido}dodecanoato de decilo (50) (41 mg, 11,4 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,11-4,04 (m, 3H), 3,20-3,14 (m, 2H), 2,91 (dd, *J* = 13,7, 6,2 Hz, 1H), 2,80 (dd, *J* = 13,7, 6,1 Hz, 1H), 2,65 (dd, *J* = 15,4, 7,1 Hz, 1H), 2,55 (dd, *J* = 15,5, 6,9 Hz, 1H), 2,31-2,23 (m, 7H), 2,08-2,02 (m, 1H), 1,84-1,63 (m, 10H), 1,42-1,49 (m, 5H), 1,49-1,28 (m, 44H), 0,90 (t, *J* = 6,6 Hz, 12H).

Ejemplo 17. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecan-1-sulfonamido}dodecanoato (51)

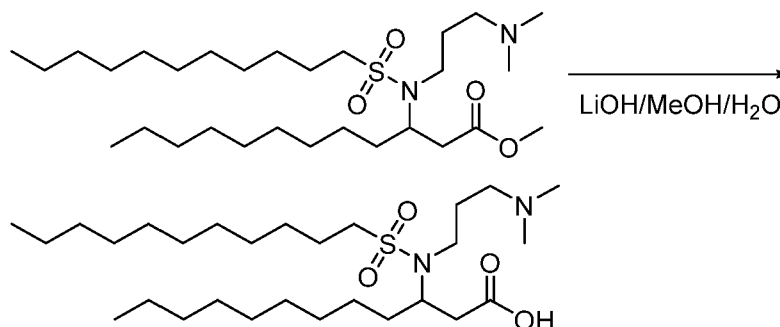


Etapa 1. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecan-1-sulfonamido}dodecanoato de metilo



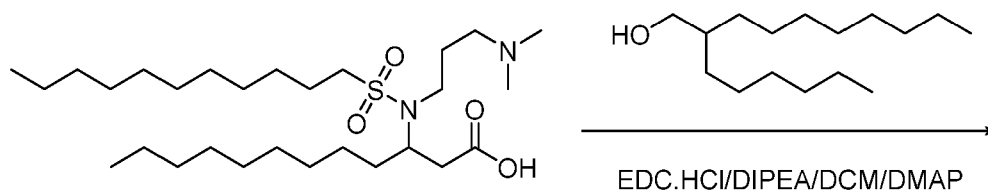
Se agitaron 3-[[3-(dimetilamino)propil]amino]dodecanoato de metilo (939 mg, 3,0 mmol), TEA (0,8 ml, 6,0 mmol) y cloruro de undecano-1-sulfonilo (989 mg, 3,9 mmol) en DCM (30 ml) a TA durante 18 h. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecano-1-sulfonamido}dodecanoato de metilo (564 mg, 35,5 %).

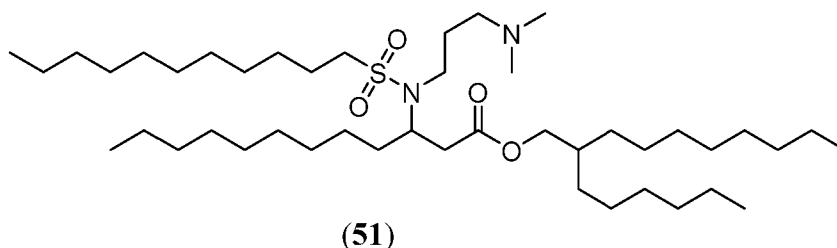
Etapa 2. Síntesis del ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecano-1-sulfonamido}dodecanoico



Se agitaron 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecano-1-sulfonamido}dodecanoato de metilo (564 mg, 1,1 mmol) y LiOH (76 mg, 3,2 mmol) en MeOH (10 ml) y H₂O (2 ml) a TA durante 18 h. Se añadió HCl 6 M (0,53 ml), la reacción se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecano-1-sulfonamido}dodecanoico, que se usó sin purificación.

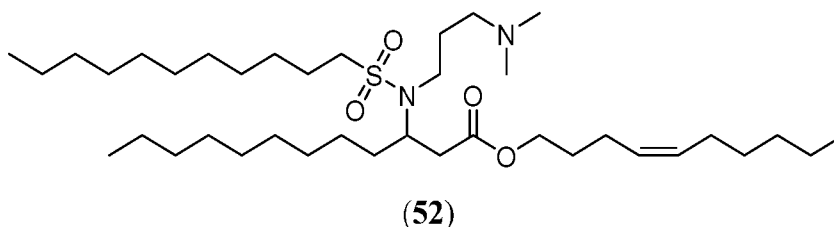
Etapa 3. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecan-1-sulfonamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (51)





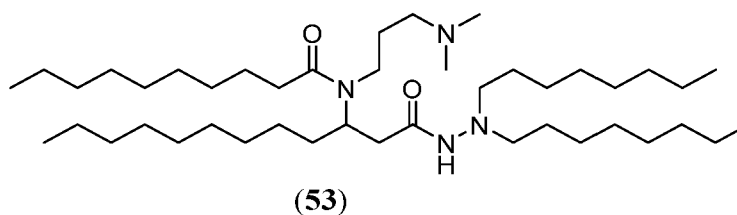
Se agitaron hexildecanol (139 mg, 0,6 mmol), ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecano-1-sulfonamido}dodecanoico (270 mg, 0,52 mmol), HCl de EDC (0,2 g, 1,04 mmol), DIPEA (202 mg, 0,3 ml, 1,56 mmol) y DMAP (13 mg, 0,1 mmol) en DCM (10 ml) a TA durante 18 h. Los extractos orgánicos se lavaron con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-4 % de MeOH/EtOAc y 0-10 % de MeOH/DCM), dando 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecano-1-sulfonamido}dodecanoato de 2-hexildecilo (**51**) (50 mg, 13,0 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,08-3,89 (m, 3H), 3,29-3,08 (m, 2H), 3,01-2,83 (m, 2H), 2,72-2,47 (m, 2H), 2,33-2,09 (m, 7H), 1,86-1,45 (m, 10H), 1,44-0,94 (m, 52H), 0,87 (t, J = 6,5 Hz, 12H).

El siguiente compuesto se preparó utilizando una metodología análoga a la descrita anteriormente

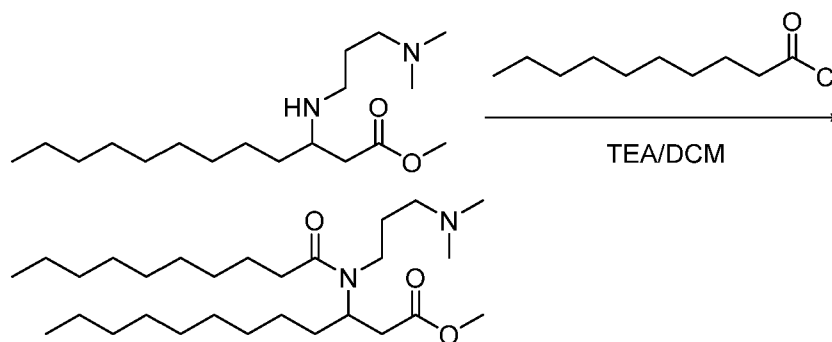


3-{N-[3-(dimetilamino)propil]undecilsulfonamido}dodecanoato de (Z)-dec-4-en-1-ilo (52). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,46-5,26 (m, 2H), 4,15-3,91 (m, 3H), 3,23-3,06 (m, 2H), 3,01-2,82 (m, 2H), 2,70-2,46 (m, 2H), 2,35-2,13 (m, 7H), 2,05 (dc, J = 35,5, 7,2 Hz, 4H), 1,89-1,45 (m, 10H), 1,44-0,99 (m, 35H), 0,94-0,80 (m, 9H).

Ejemplo 18. Síntesis de N-[3-(dimetilamino)propil]-N-[1-(N',N'-dioctilhidrazincarbonil)undecan-2-il]decanamida (53)



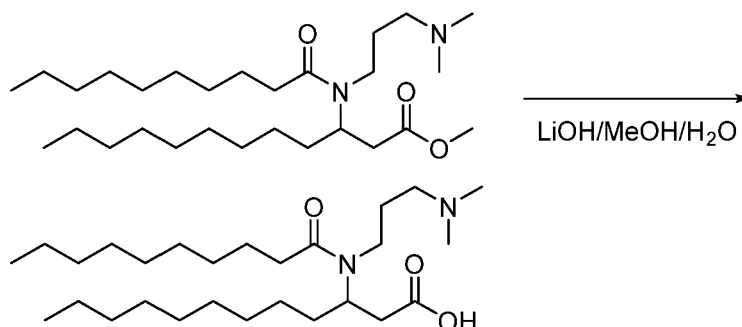
Etapla 1. Síntesis de 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecanoato de metilo



Se agitaron 3-{[3-(dimetilamino)propil]amino}dodecanoato de metilo (2 g, 6,4 mmol) y TEA (4,6 ml, 12,7 mmol) en DCM a TA. Se añadió cloruro de decanoílo (1,3 g, 7,0 mmol) gota a gota y la reacción se agitó a temperatura ambiente

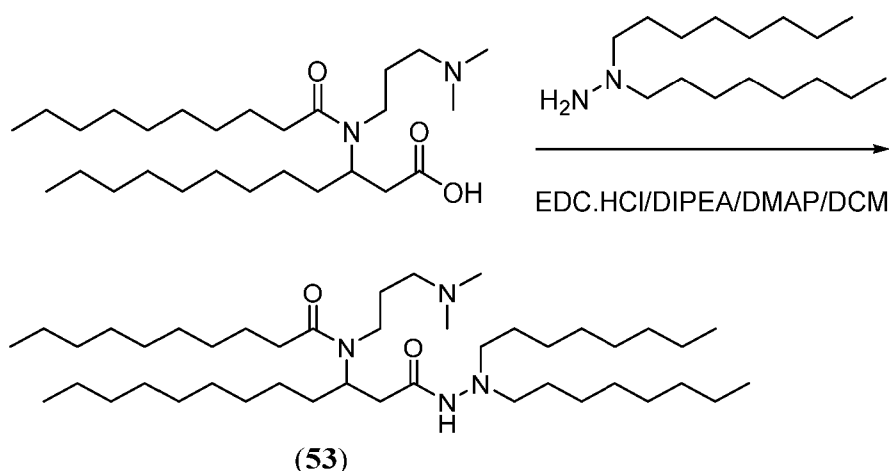
durante 18 h. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por (0-10 % de MeOH/DCM), dando 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecanoato de metilo (2 g, 67,4 %).

5 Etapa 2. Síntesis del ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecanoico



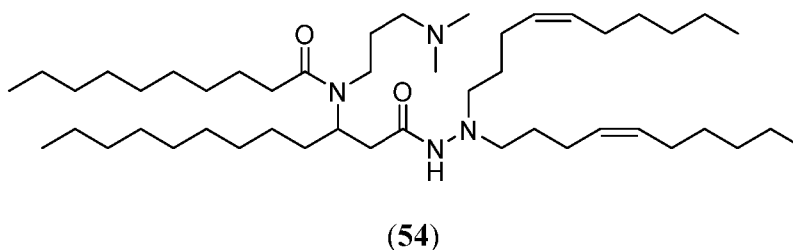
Se agitaron 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecanoato de metilo (3,4 g, 7,3 mmol) y LiOH (347 mg, 14,5 mmol) en MeOH (8 ml) y H_2O (2 ml) a TA durante 18 h. Se añadió HCl 6 M (2,4 ml) y se extrajo la reacción con DCM. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecanoico (3,03 g, 91,9 %) que se usó sin purificación.

15 Etapa 3. Síntesis de N-[3-(dimetilamino)propil]-N-[1-(N',N'-dioctilhidrazin-carbonil)undecan-2-il]decanamida (53)



Se agitaron 1,1-dioctilhidrazina (782 mg, 3,0 mmol), ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]-decanamido}dodecanoico (1,5 g, 3,35 mmol), HCl de EDC (1,17 g, 6,1 mmol) y DMAP (37 mg, 0,31 mmol) en DCM a TA durante 16 h. Se inactivó la reacción con solución sat. de NaHCO_3 , se extrajo con DCM, los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4) y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (5 % de MeOH/DCM), dando N-[3-(dimetilamino)propil]-N-[1-(N',N'-dioctilhidrazin-carbonil)undecan-2-il]decanamida (53) (495 mg, 23,4 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,74 (s, 1H), 3,32-3,07 (m, 2H), 2,83-2,55 (m, 5H), 2,55-2,14 (m, 12H), 1,79-1,64 (m, 5H), 1,55-1,40 (m, 5H), 1,39-0,99 (m, 46H), 0,96-0,84 (m, 12H).

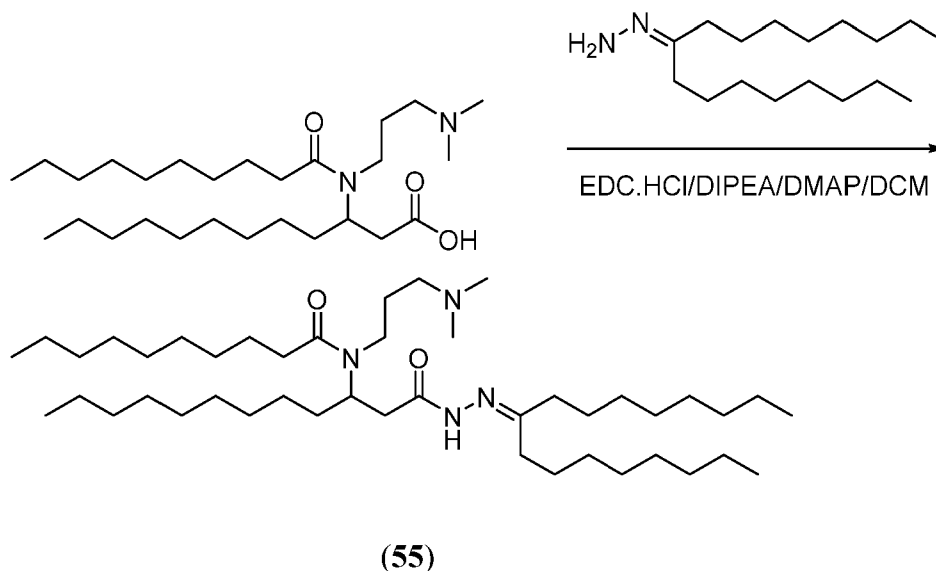
El siguiente compuesto se preparó utilizando una metodología análoga a la descrita anteriormente.



(54)

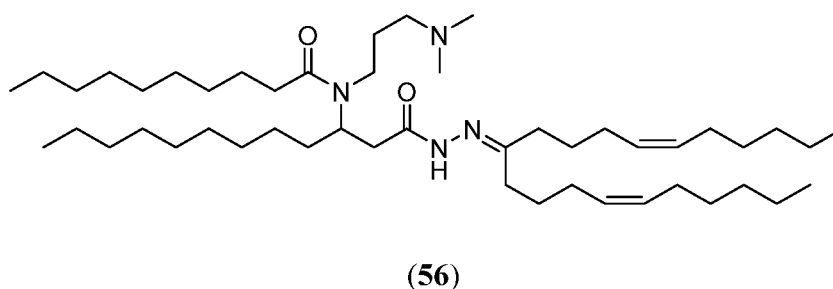
N-(1-(2,2-di((Z)-Dec-4-en-1-il)hidrazineil)-1-oxododecan-3-il)-N-(3-(dimetilamino)propil)decanamida (54). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,72 (d, $J = 31,3$ Hz, 1H), 5,45-5,22 (m, 4H), 4,45 (d, $J = 57,4$ Hz, 1H), 3,31-3,16 (m, 1H), 2,80-2,59 (m, 6H), 2,59-2,20 (m, 9H), 2,11-1,93 (m, 8H), 1,82-1,43 (m, 10H), 1,43-1,13 (m, 40H), 0,99-0,78 (m, 12H).

5 **Ejemplo 19. Síntesis de N-[3-(dimetilamino)propil]-N-{1-[N'-(heptadecan-9-ilideno)hidrazinecarbonil]undecan-2-il}decanamida (55)**

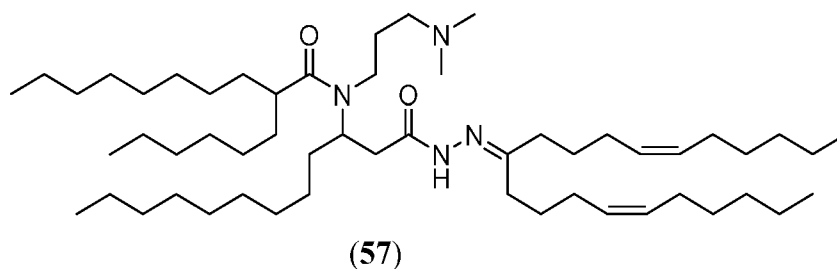


10 Se agitaron heptadecan-9-ilidenohidrazina (231 mg, 0,86 mmol), ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecanoico (430 mg, 0,95 mmol), HCl de EDC (330 mg, 1,7 mmol) y DMAP (10 mg, 0,1 mmol) en DCM (20 ml) a TA durante 16 h. La reacción se inactivó con solución sat. de NaHCO_3 y se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4) se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (MeOH/DCM al 5 %), dando N-[3-(dimetilamino)propil]-N-{1-[N'-(heptadecan-9-ilideno)hidrazinecarbonil]undecan-2-il}decanamida (55) (176 mg, 29,0 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,19 (s, 1H), 4,53-4,38 (m, 1H), 3,73-3,65 (m, 1H), 3,39-3,09 (m, 3H), 2,95-2,86 (m, 1H), 2,82-2,65 (m, 3H), 2,59-2,19 (m, 12H), 2,19-2,10 (m, 2H), 1,57-1,41 (m, 6H), 1,40-1,15 (m, 46H), 0,95-0,84 (m, 12H).

Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.

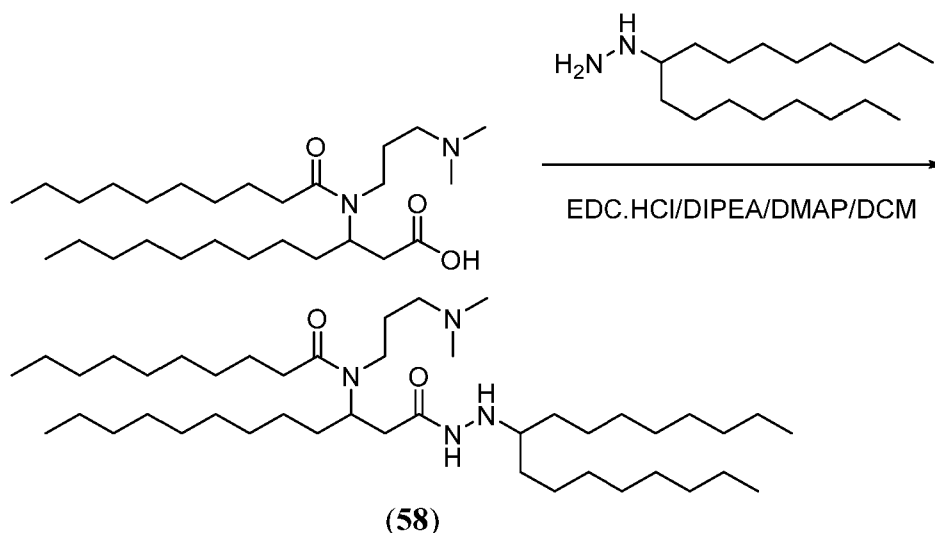


N-(3-(Dimetilamino)propil)-N-(1-(2-((6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-ilideno)hidrazinil)-1-oxododecan-3-il)decanamida (56). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,21 (s, 1H), 5,49-5,30 (m, 4H), 4,58-4,35 (m, 3H), 3,35-3,12 (m, 3H), 3,04-2,59 (m, 7H), 2,54-2,21 (m, 10H), 2,18-1,77 (m, 12H), 1,51-1,05 (m, 40H), 0,95-0,77 (m, 12H).



5 **N-(3-(dimetilamino)propil)-N-(1-(2-((6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-iliden)hidrazineil)-1-oxododecan-3-il)-2-hexildecanamida (57).** RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,53-5,22 (m, 4H), 4,57-4,38 (m, 2H), 4,32-4,19 (m, 2H), 3,44-3,15 (m, 4H), 3,15-2,15 (m, 16H), 2,15-1,75 (m, 9H), 1,60-1,01 (m, 52H), 0,97-0,67 (m, 15H).

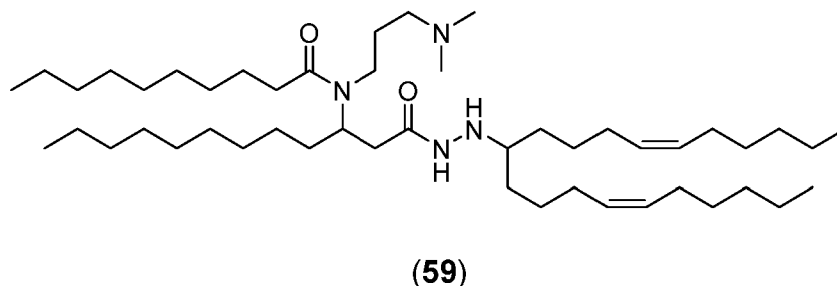
Ejemplo 20. Síntesis de N-[3-(dimetilamino)propil]-N-{1-[N'-(heptadecan-9-il)hidrazinecarbonil]undecan-2-il}decanamida (58)



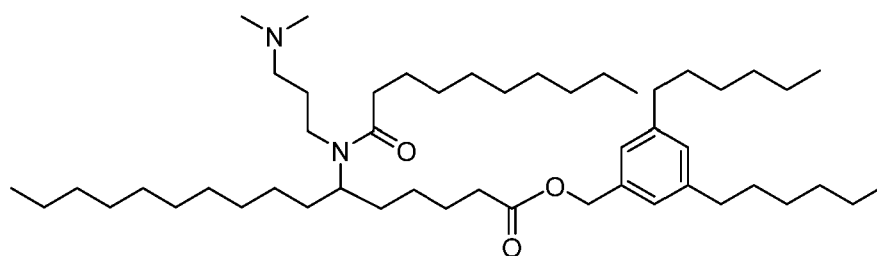
10

Se agitaron heptadecano-9-ilhidracina (500 mg, 1,9 mmol), ácido 3-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}dodecanoico (925 mg, 2,0 mmol), HCl de EDC (709 mg, 3,7 mmol) y DMAP (23 mg, 0,19 mmol) a TA durante 16 h. La reacción se inactivó con solución sat. de NaHCO_3 , se extrajo con DCM, se lavó con salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de EtOAc/Hex y 0-10 % de MeOH/DCM), dando N-[3-(dimetilamino)propil]-N-{1-[N'-(heptadecan-9-il)hidrazinecarbonil]undecan-2-il}decanamida (**58**) (598 mg, 45,7 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,29-8,15 (m, 1H), 4,45 (s, 1H), 3,54-3,13 (m, 4H), 2,76-2,03 (m, 14H), 2,01-1,70 (m, 2H), 1,59-1,03 (m, 56H), 1,02-0,81 (m, 12H).

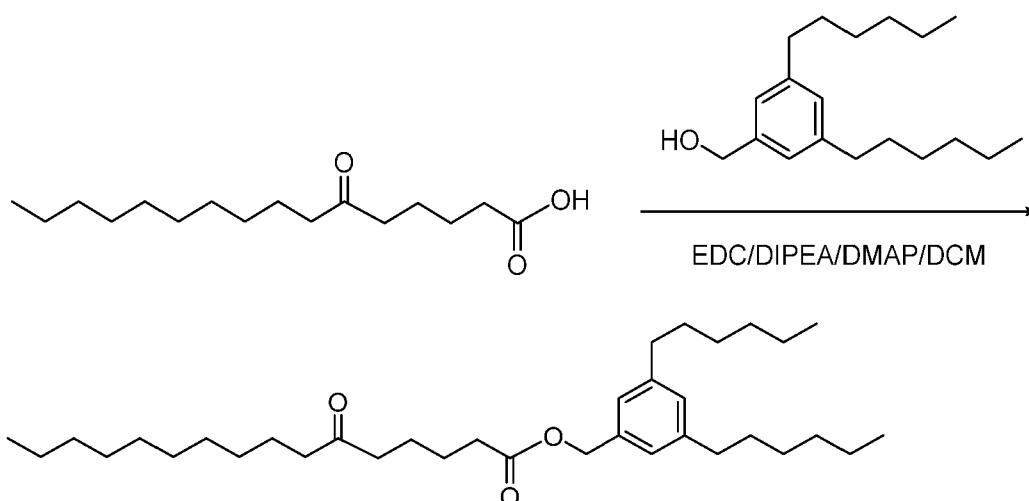
20 El siguiente compuesto se preparó utilizando una metodología análoga a la descrita anteriormente.



25 **N-(3-(Dimetilamino)propil)-N-(1-(2-((6Z,15Z)-henicosa-6,15-dien-11-il)hidrazineil)-1-oxododecan-3-il)decanamida (59).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,20 (d, $J = 25,7$ Hz, 1H), 5,47-5,26 (m, 4H), 3,34-3,19 (m, 2H), 3,09-2,95 (m, 1H), 2,79-2,66 (m, 1H), 2,62-2,19 (m, 10H), 2,11-1,97 (m, 8H), 1,77-1,46 (m, 7H), 1,45-1,13 (m, 48H), 0,94-0,86 (m, 12H)

Ejemplo 21. Síntesis de 6-{N-[3-(dimetilamino)-propil]decanamido}hexadecanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo (60)**(60)**

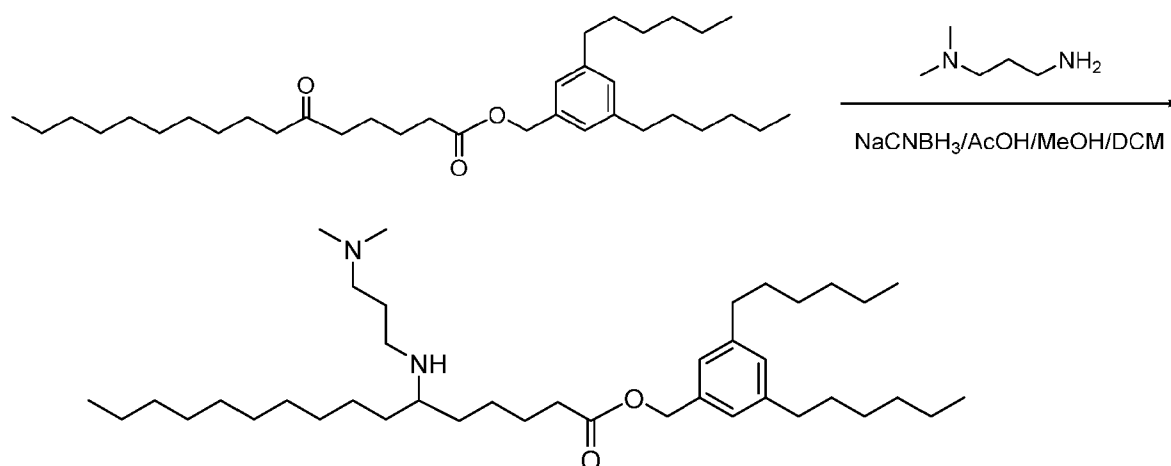
5

Etapa 1. Síntesis de 6-oxohexadecanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo

10

Se agitaron ácido 6-oxohexadecanoico (500 mg, 1,8 mmol), (3,5-dihexilfenil)metanol (511 mg, 1,8 mmol), DIPEA (1,0 ml, 5,5 mmol), EDC (710 mg, 3,7 mmol) y DMAP (100 mg, 0,19 mmol) en DCM (10 ml) a 0 °C durante 16 h dejando que se calentaran a TA. La reacción se lavó con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secó (MgSO₄) se filtró, se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de EtOAc/Hex), dando 6-oxohexadecanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo (546 mg, 55,8 %).

15

Etapa 2. Síntesis de 6-{[3-(dimetilamino)propil]-amino}hexadecanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo

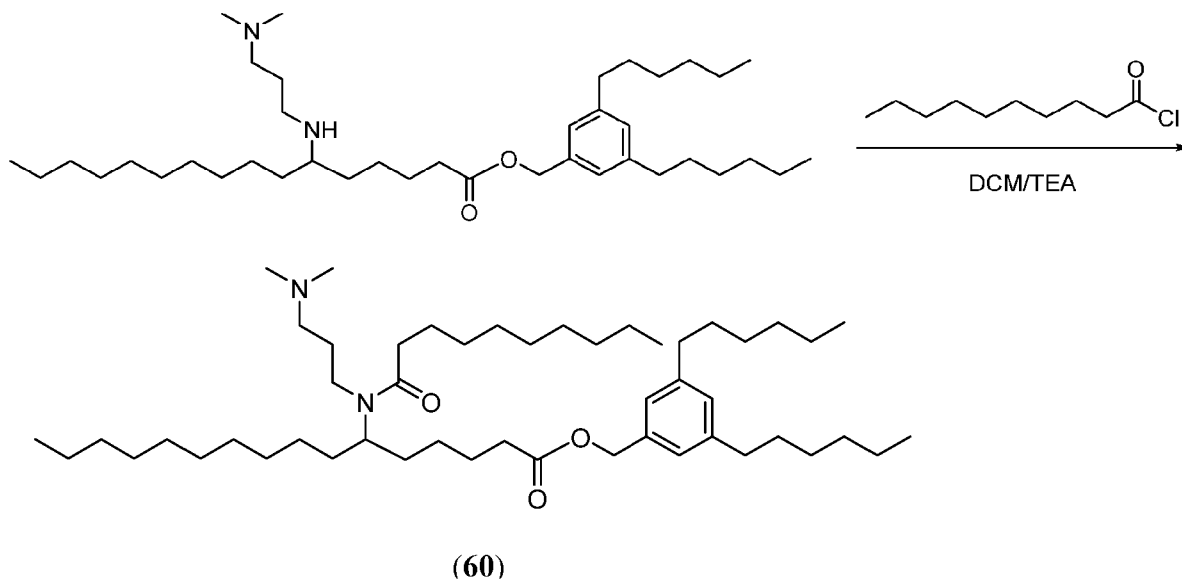
20

Se agitaron (3,5-dihexilfenil)metil 6-oxohexadecanoato (546 mg, 1,1 mmol), dimetilaminopropano (119 mg, 1,2 mmol), AcOH (0,12 ml, 2,12 mmol) y NaCNBH₃ (200 mg, 3,2 mmol) en un MeOH (10 ml) y DCM (3 ml) a TA durante 15 h. La

25

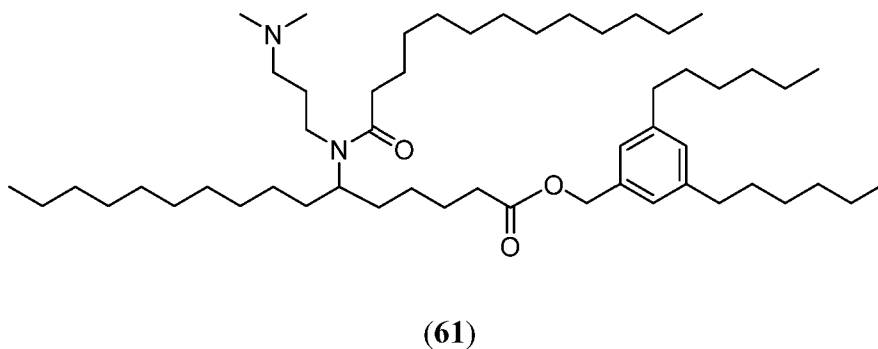
reacción se concentró al vacío y el residuo se dividió entre H₂O (50 ml) y EtOAc (50 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc, los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM/0,5 % de TEA), dando (3,5-dihexilfenil)metil 6-[[3-(dimetilamino)propil]amino]hexadecanoato (490 mg, 75,1 %).

Etap 3. 6-{N-[3-(Dimetilamino)propil]-decanamido}hexadecanoato de (3,5-dihexilfenil)metilo (60)

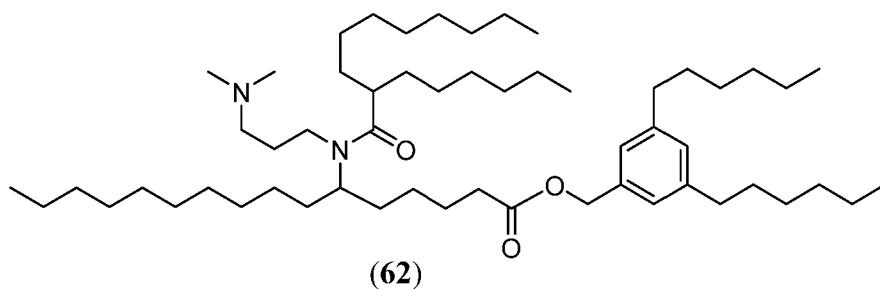


Se disolvieron (3,5-dihexilfenil)metil 6-[[3-(dimetilamino)propil] amino]hexadecanoato (163 mg, 0,27 mmol) y TEA (80 mg, 0,80 mmol) en DCM (10 ml) seguido de la adición gota a gota de cloruro de decanoílo (0,11 ml, 0,53 mmol) en DCM (10 ml). La reacción se agitó a TA durante 20 h, se lavó con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando (3,5-dihexilfenil)metil 6-{N-[3-(dimetilamino)propil]decanamido}hexadecanoato (**60**) (61 mg, 30,0 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,98 (s, 3H), 5,06 (s, 2H), 3,70-3,62 (m, 1H), 3,22-3,12 (m, 2H), 2,64-2,49 (m, 8H), 2,40-2,25 (m, 6H), 1,71-1,58 (m, 8H), 1,54-1,42 (m, 4H), 1,42-1,14 (m, 46H), 0,93-0,86 (m, 12H).

Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.

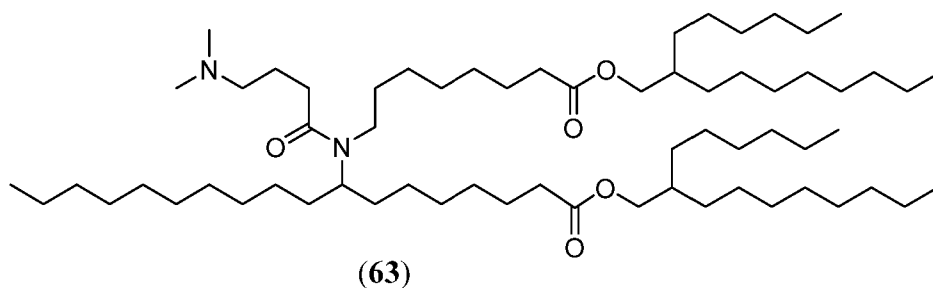


6-{N-[3-(Dimetilamino)propil]tridecanamido}hexadecanoato de 3,5-Dihexilbencilo (61). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,98 (s, 3H), 5,07 (s, 2H), 3,69-3,62 (m, 1H), 3,19-3,10 (m, 2H), 2,62-2,56 (m, 4H), 2,41-2,20 (m, 10H), 1,64-1,56 (m, 8H), 1,56-1,41 (m, 6H), 1,41-1,13 (m, 50H), 0,95-0,86 (m, 12H).



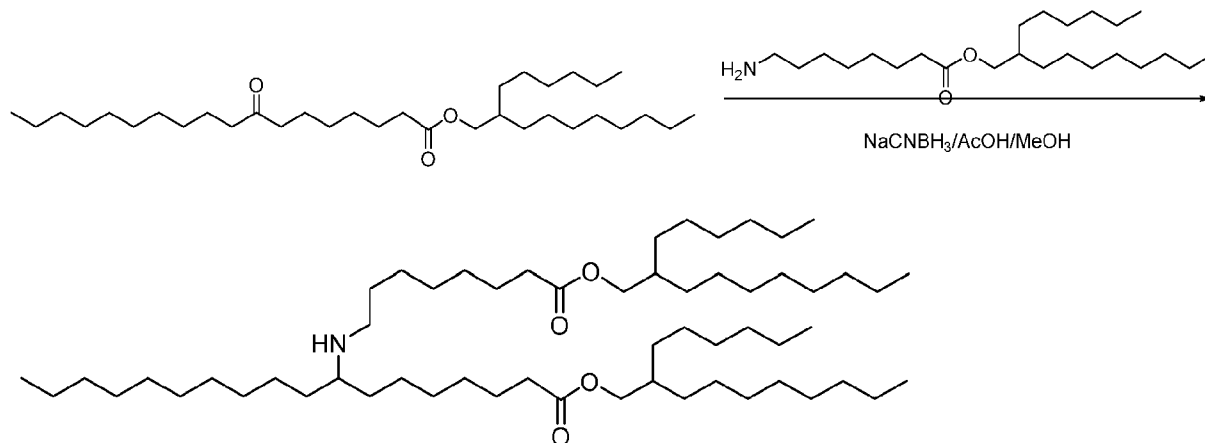
5 **6-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-2-hexildecanamido)hexadecanoato de 3,5-dihexilbencilo (62).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6,98 (s, 3H), 5,06 (s, 2H), 3,78-3,71 (m, 1H), 3,24-2,96 (m, 4H), 2,69-2,55 (m, 6H), 2,51-2,45 (m, 1H), 2,43-2,20 (m, 7H), 1,61-1,12 (m, 65H), 0,96-0,81 (m, 15H).

Ejemplo 22. Síntesis de 7-([9-[(2-hexildecil)oxi]-9-oxononil]amino)heptadecanoato de 2-hexildecilo (63)



10

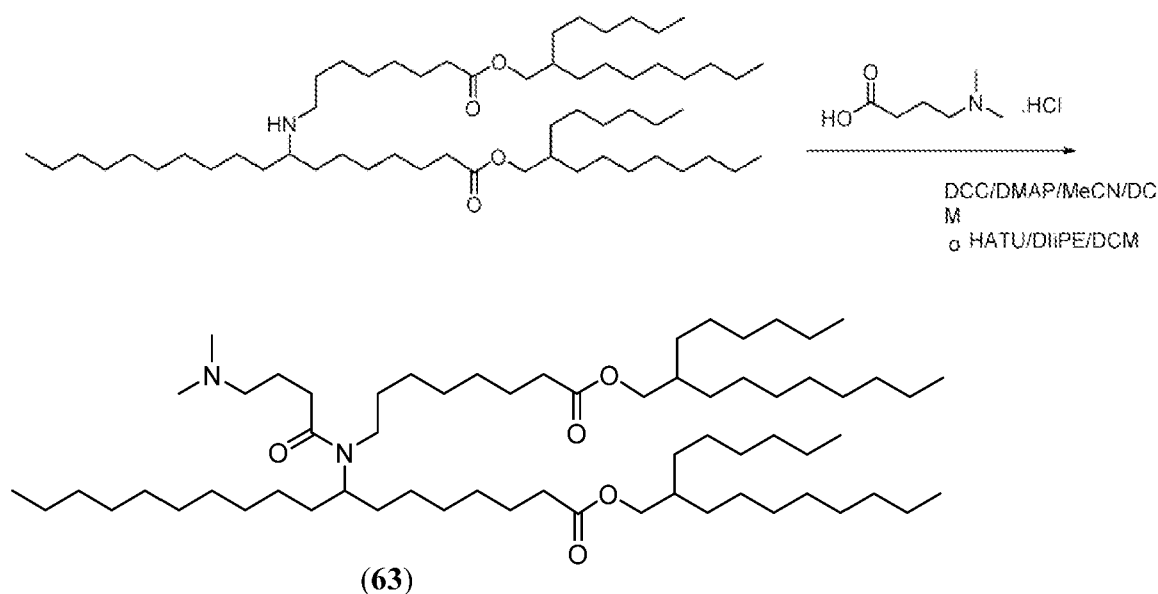
Etapla 1. Síntesis de 8-([8-[(2-hexildecil)oxi]-8-oxooctil]amino)-octadecenoato de 2-hexildecilo



15

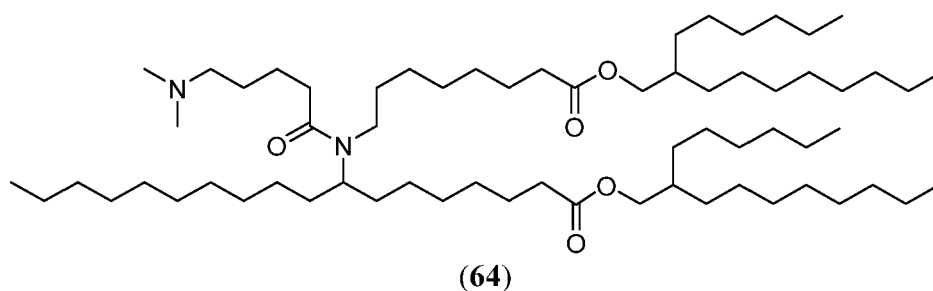
20 Se agitaron 8-oxooctadecanoato de 2-hexildecil (743 mg, 1,4 mmol), 8-amino-octanoato de 2-hexildecilo (600 mg, 1,6 mmol) y AcOH (170 mg, 2,8 mmol) en MeOH a 50 °C durante 30 min. Se añadió NaCNBH_3 (268 mg, 4,3 mmol) y se siguió agitando durante 16 h. La solución se concentró al vacío, se recogió en EtOAc (75 ml), se lavó con solución sat. de NaHCO_3 y salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando 8-([8-[(2-hexildecil)oxi]-8-oxooctil]amino)octadecenoato de 2-hexildecilo (567 mg, 44,8 %).

25 **Etapla 2. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-[8-[(2-hexildecil)oxi]-8-oxooctil]butanamido]octadecenoato de 2-hexildecilo (63)**

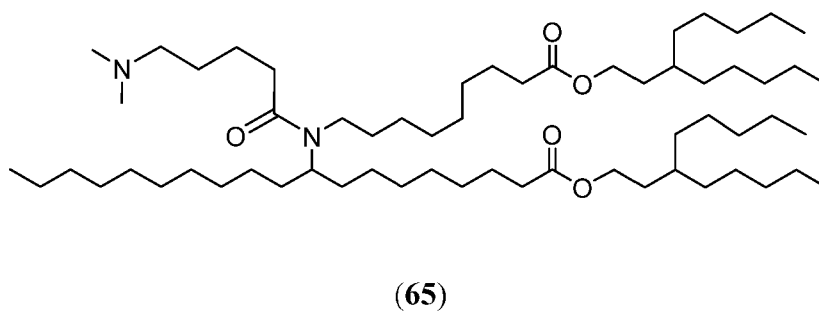


- 5 Se agitaron sal HCl de ácido 4-dimetilaminobutanoico (94 mg, 0,6 mmol), DMAP (103 mg, 0,84 mmol) y DCC (127 mg, 0,62 mmol) en ACN (1,25 ml) a TA durante 2 h. Se añadió 8-((2-hexildecil)oxi)-8-oxooctil)amino)octadecanoato de 2-hexildecilo (250 mg, 0,28 mmol) en DCM (1,25 ml) y se siguió agitando durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se suspendió en hexanos y se filtró, y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (100 % de EtOAc y después 0-10 % de MeOH/EtOAc), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-{8-[(2-hexildecil)oxi]-8-oxooctil}butanamido]octadecenoato de 2-hexildecilo **(63)** (64 mg, 22,7 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,99 (d, $J = 5,9$ Hz, 4H), 3,67 (s, 1H), 3,13-3,00 (m, 2H), 2,39-2,27 (m, 8H), 2,25 (s, 6H), 1,85 (c, $J = 7,9$ Hz, 3H), 1,63 (d, $J = 10,2$ Hz, 15H), 1,46 (s, 4H), 1,30 (s, 74H), 0,91 (d, $J = 7,2$ Hz, 15H). EM (IEN) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calc. para $\text{C}_{64}\text{H}_{126}\text{N}_2\text{O}_5$ 1003,97; Encontrado 1003,2

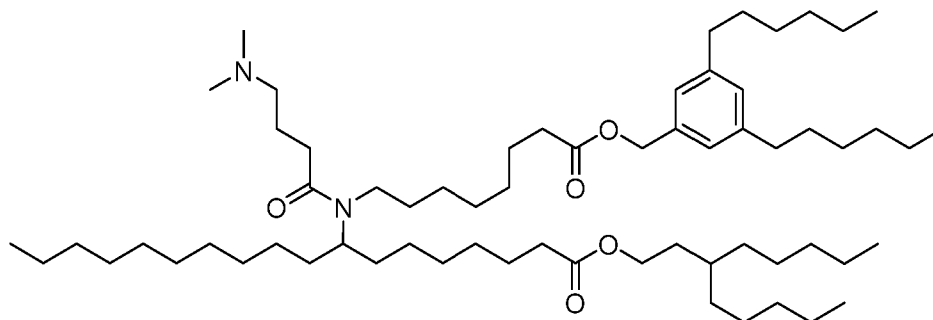
- 15 Cabe señalar que también puede usarse HATU/DIPEA/DCM para producir el acoplamiento de amida final. Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.



- 20 **8-((5-(Dimetilamino)-N-(8-((2-hexildecil)oxi)-8-oxooctil)pentanamido)-octadecenoato de 2-hexildecilo (64)**. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,99 (d, $J = 6,0$ Hz, 4H), 3,64 (s, 1H), 3,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 2,41-2,26 (m, 8H), 2,24 (d, $J = 3,1$ Hz, 6H), 1,79-1,41 (m, 20H), 1,41-1,02 (m, 74H), 1,02-0,79 (m, 15H). EM (IEN) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calc. para $\text{C}_{65}\text{H}_{128}\text{N}_2\text{O}_5$ 1017,98; Encontrado 1017,2



9-(5-(Dimetilamino)-N-(9-oxo-9-((3-pentiloctil)oxi)nonil)-pentanamido)-nonadecanoato de 3-pentiloctilo (65).
EM (IEN) m/z: $[M + H]^+$ Calc. para $C_{59}H_{116}N_2O_5$ 933,89; Observada 933.

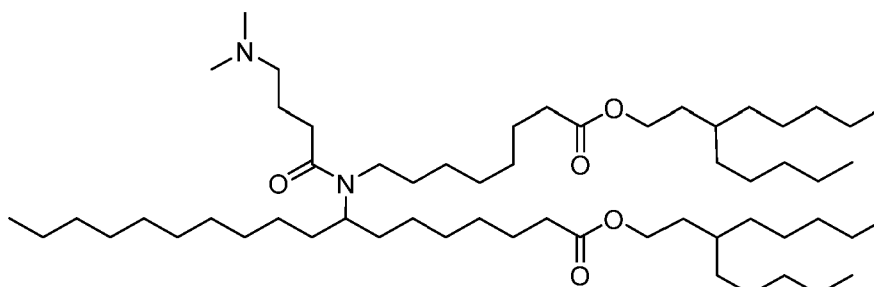


5

(66)

8-(N-(8-((3,5-Dihexilbenzil)oxi)-8-oxooctil)-4-(dimetilamino)-butanamido)-octadecenoato de 3-pentiloctilo (66).
RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,28 (s, 1H), 6,99 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 4,09 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,83 (s, 6H), 2,65 (m, 10H), 2,29-2,37 (m, 5H), 1,28-1,6 (m, 66H), 0,89 (m, 15H)

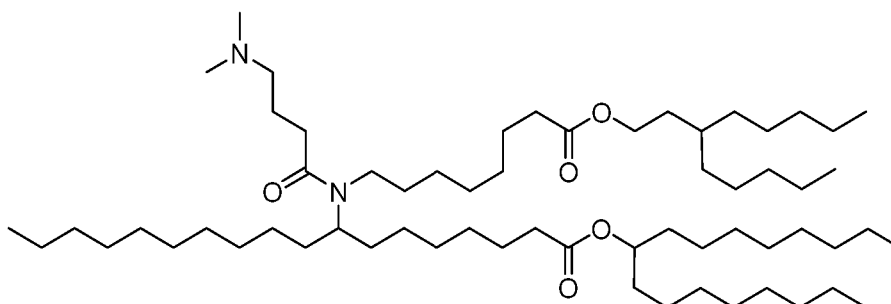
10



(67)

8-(4-(Dimetilamino)-N-(8-oxo-8-((3-pentiloctil)oxi)octil)-butanamido)-octadecenoato de 3-pentiloctilo (67). RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,11 (d, $J = 6,4$ Hz, 4H), 3,66 (s, 1H), 3,11-3,01 (m, 2H), 2,33 (dc, $J = 15,0, 6,8$ Hz, 8H), 2,24 (s, 6H), 1,85 (h, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,61 (dc, $J = 14,1, 7,2$ Hz, 13H), 1,47 (s, OH), 1,44 (s, 7H), 1,30 (d, $J = 16,7$ Hz, 60H), 0,91 (t, $J = 6,9$ Hz, 15H). EM (IEN) m/z: $[M + H]^+$ Calc. para $C_{58}H_{114}N_2O_5$ 919,88; Encontrado 920,0

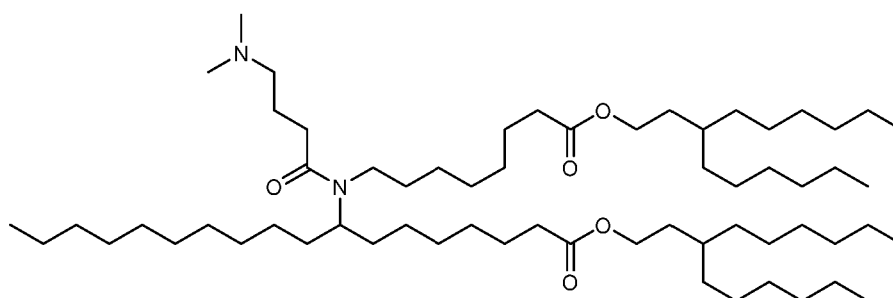
15



(68)

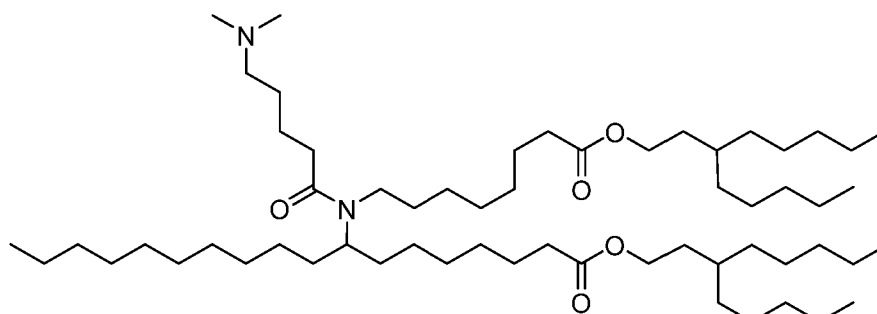
8-(4-(Dimetilamino)-N-(8-oxo-8-((3-pentiloctil)oxi)-octil)butanamido)-octadecenoato de heptadecan-9-ilo (68)
EM (IEN) m/z: $[M + H]^+$ Calc. para $C_{62}H_{122}N_2O_5$ 975,94; Encontrado 975,2

20



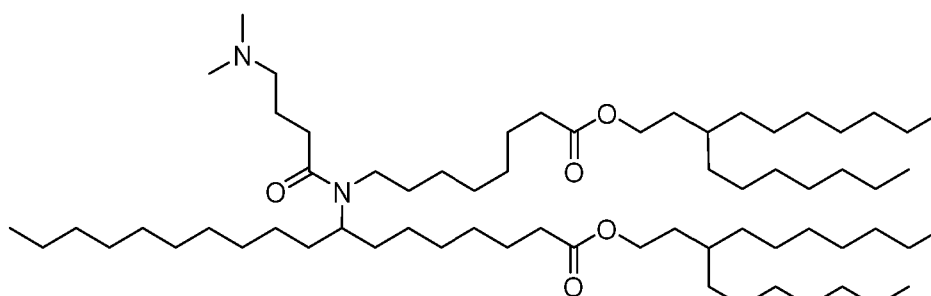
(69)

5 **8-(4-(Dimetilamino)-N-(8-((3-hexilnonil)oxi)-8-oxooctil)-butanamido)-octadecenoato de 3-hexilnonilo (69).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (t, 4H), 2,38-2,25 (m, 8H), 2,24 (s, 6H), 1,68 (s, 5H), 1,60 (dc, $J = 15,2, 7,5$ Hz, 13H), 1,49-1,40 (m, 5H), 1,33 (d, $J = 7,5$ Hz, 8H), 1,30 (s, 9H), 1,27 (s, 45H), 0,94-0,86 (m, 15H).



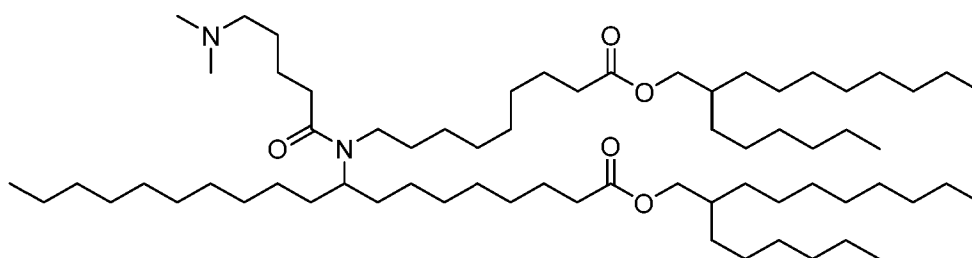
(70)

10 **8-(5-(Dimetilamino)-N-(8-oxo-8-((3-pentilooctil)oxi)octil)-pentanamido)-octadecenoato de 3-pentilooctilo (70).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (t, $J = 7,1$, 4H), 2,38-2,29 (m, 7H), 2,27 (s, 6H), 1,58 (dt, $J = 17,0, 8,5$ Hz, 19H), 1,43 (s, 7H), 1,29 (d, $J = 15,8$ Hz, 65H), 0,91 (t, $J = 7,0$ Hz, 15H).



(71)

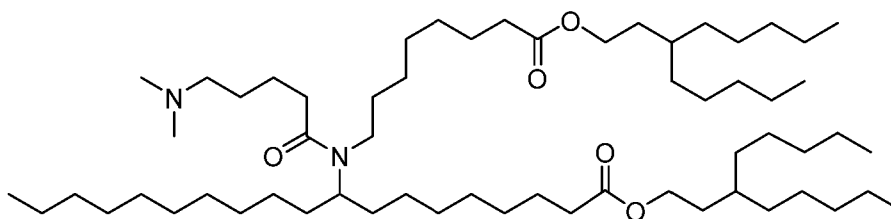
15 **8-(4-(Dimetilamino)-N-(8-((3-heptildecil)oxi)-8-oxooctil)butanamido)-octadecenoato de 3-heptildecilo (71).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (td, $J = 7,2, 2,6$ Hz, 4H), 3,11-2,99 (m, 2H), 2,41-2,29 (m, 7H), 2,28 (s, 7H), 1,85 (dt, $J = 14,9, 7,5$ Hz, 2H), 1,75 (s, 8H), 1,60 (dt, $J = 13,9, 6,8$ Hz, 7H), 1,45 (t, $J = 7,3$ Hz, 6H), 1,37-1,18 (m, 76H), 0,94-0,87 (m, 15H).



(72)

2-Hexildecilo 9-(5-(Dimetilamino)-N-(9-((2-hexildecil)oxi)-9-oxononil)pentanamido)-nonadecanoato de (72) EM (IEN) m/z: $[M + H]^+$ Calc. para $C_{67}H_{132}N_2O_5$ 1045,01; Encontrado 1046,3

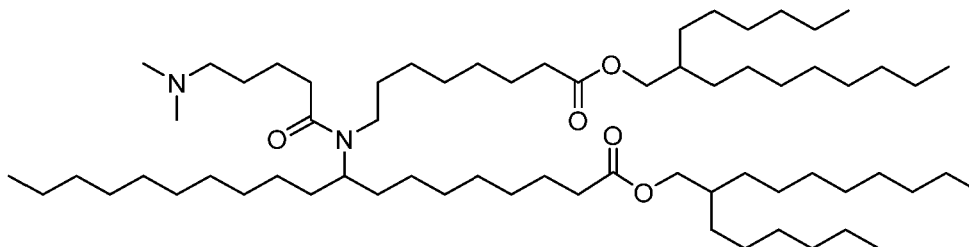
5



(73)

9-(5-(Dimetilamino)-N-(8-oxo-8-((3-pentiloctil)oxi)octil)-pentanamido)-nonadecanoato de 3-pentiloctilo (73). RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,10 (t, $J = 7,1$, 4H), 2,34 (s, 6H), 2,30 (t, $J = 8,6$ Hz, 5H), 1,62-1,56 (m, 17H), 1,49-1,41 (m, 6H), 1,30 (d, $J = 16,9$ Hz, 57H), 0,91 (t, $J = 6,9$ Hz, 15H).

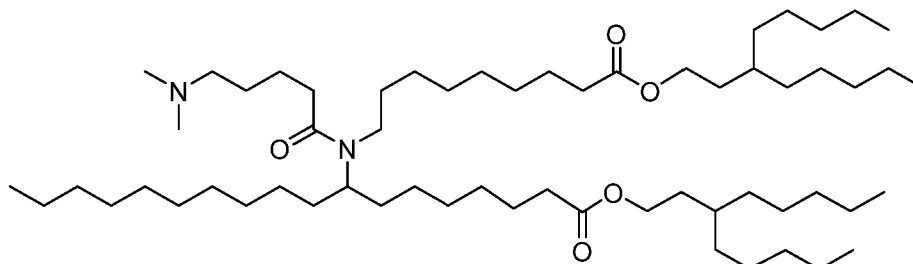
10



(74)

9-(5-(Dimetilamino)-N-(8-((2-hexildecil)oxi)-8-oxooctil)-pentanamido)-nonadecanoato de 2-hexildecilo (74). RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,98 (d, $J = 5,4$ Hz, 4H), 2,38-2,29 (m, 7H), 2,27 (s, 6H), 1,84-1,77 (m, 3H), 1,64 (h, $J = 7,0$ Hz, 9H), 1,30 (d, $J = 7,4$ Hz, 78H), 0,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 15H).

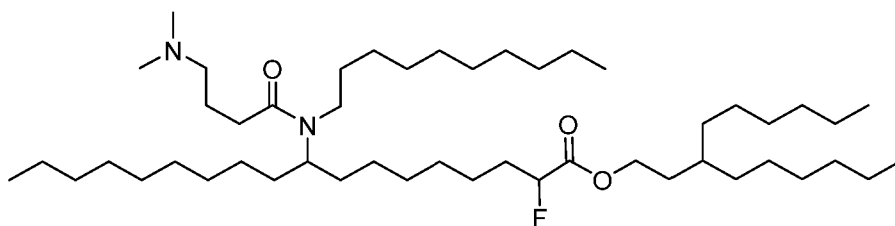
15



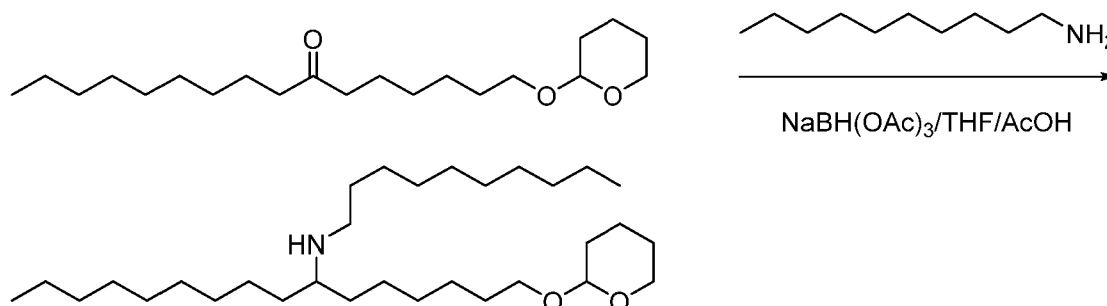
(75)

8-(5-(Dimetilamino)-N-(9-oxo-9-((3-pentiloctil)oxi)nonil)pentanamido)-octadecenoato de 3-pentiloctilo (75). RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,10 (t, $J = 7,3$ Hz, 4H), 2,34 (dd, $J = 14,1, 7,2$ Hz, 5H), 2,29 (s, 6H), 1,62 (cc, $J = 17,6, 5,4$ Hz, 16H), 1,49-1,39 (m, 6H), 1,38-1,22 (m, 62H), 0,91 (t, $J = 6,9$ Hz, 15H).

20

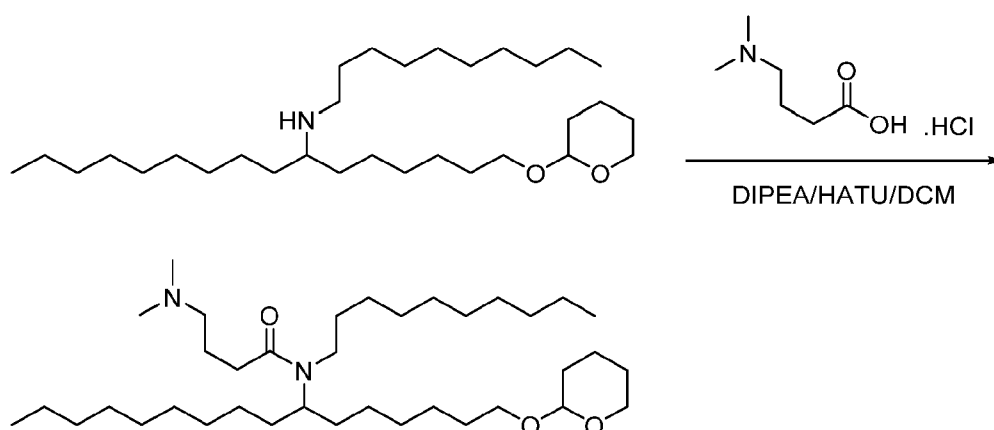
Ejemplo 23. Síntesis de 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-hexilnonilo (76)**(76)**

5

Etapla 1. Síntesis de decil[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amina

10 Se agitaron 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ona (5 g, 14,7 mmol) y N-decilamina (2,31 g, 14,7 mmol) en THF (100 ml) a 50 °C durante 30 min. Se añadió $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (9,3 g, 44,0 mmol) y se siguió agitando durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se inactivó con solución sat. de NaHCO_3 y se extrajo la fase acuosa con EtOAc. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada, dando decil[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amina (4,9 g, 69,3 %).

15

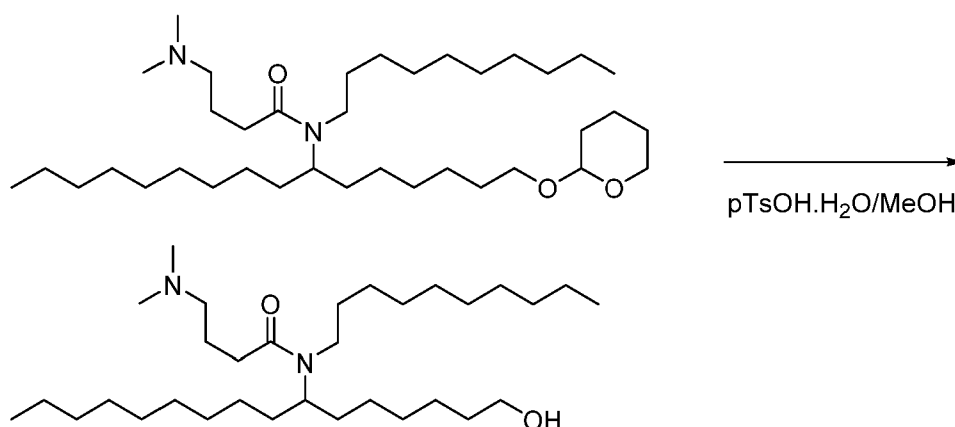
Etapla 2. Síntesis de N-decil-4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamida

20

25 Se agitaron sal HCl de ácido 4-(dimetilamino)butanoico (4,0 g, 30,5 mmol), HATU (11,6 g, 30,5 mmol) y DIPEA (10,7 ml 61,0 mmol) en DCM (50 ml) a TA durante 30 min. Se añadió decil[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amina (4,9 g, 10,2 mmol) en DCM y la reacción se agitó hasta completarse. La reacción se concentró al vacío, el residuo se dividió entre solución sat. de NaHCO_3 y EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4) y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando N-decil-4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamida (4,7 g, 77,7 %).

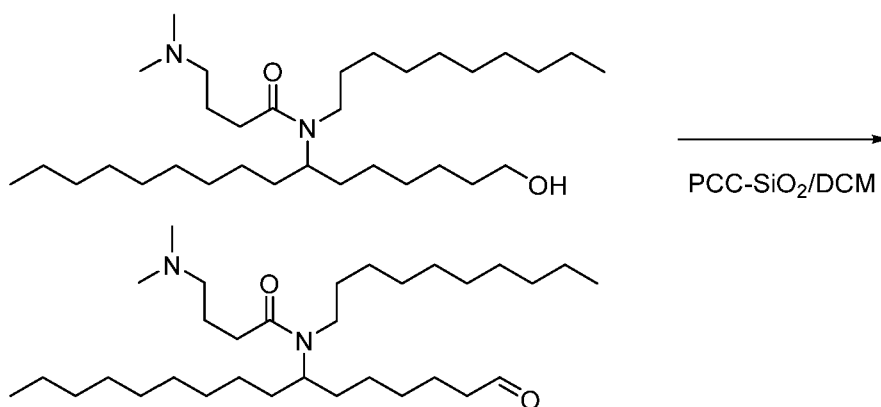
Etapla 3. Síntesis de N-decil-4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamida

30



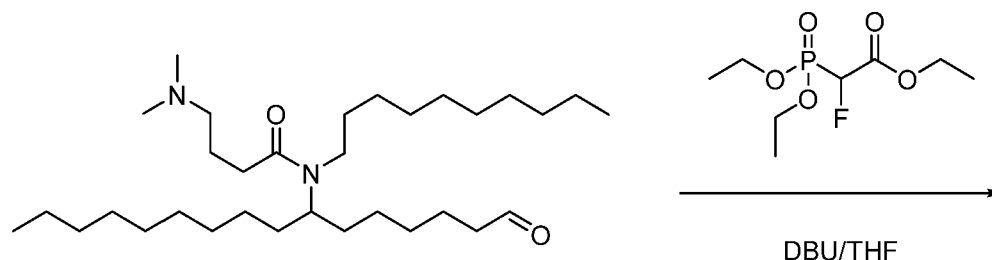
Se agitaron N-decil-4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamida (4,6 g, 7,7 mmol) y p-TsOH (67 mg, 0,4 mmol) en MeOH (150 ml) a TA durante 16 h. El metanol se retiró al vacío, se recogió el residuo en EtOAc y se lavó con solución sat. de NaHCO₃. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando N-decil-4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamida (3,5 g, 88,6 %) que se usó sin purificación.

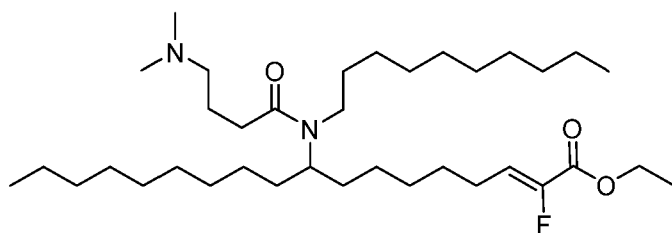
Etapa 4. Síntesis de N-decil-4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamida



Se agitaron N-decil-4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamida (3,5 g, 6,9 mmol) y PCC sobre sílice (1:1) (5,9 g, 13,7 mmol) en DCM (100 ml) a TA durante 16 h. La mezcla se filtró a través de sílice, se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando N-decil-4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamida (1,8 g, 51,6 %).

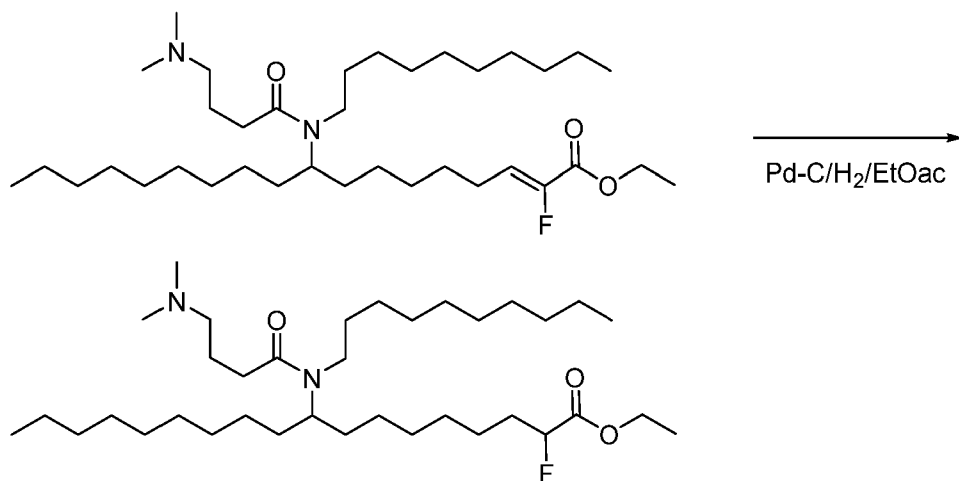
Etapa 5. Síntesis de (2Z)-9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo





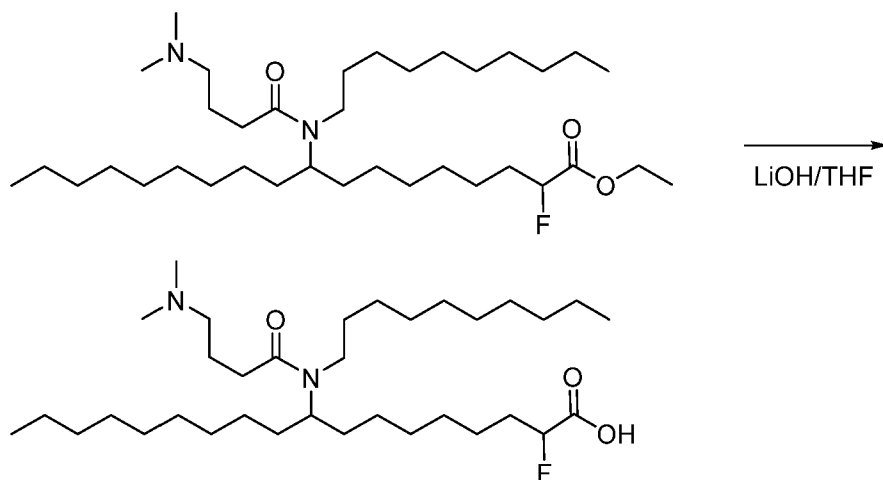
Se agitaron N-decil-4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamida (1,8 g, 3,5 mmol), 2-(dietoxifosforil)-2-fluoroacetato de etilo (1,7 g, 7,1 mmol) y DBU (1,1 g, 7,1 mmol) en THF (25 ml) a TA durante 16 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de EtOAc/hexanos), dando (2Z)-9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (1,54 g, 72,9 %).

Etapa 6. Síntesis de 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo



Se sometió (2Z)-9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (1,5 g, 2,5 mmol) a hidrogenación catalítica sobre 10 % de Pd-C (150 mg) en EtOAc a TA durante 16 h. La reacción se filtró a través de celite y se concentró al vacío, dando 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo (1,2 g, 79,7 %).

Etapa 7. Síntesis del ácido 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico

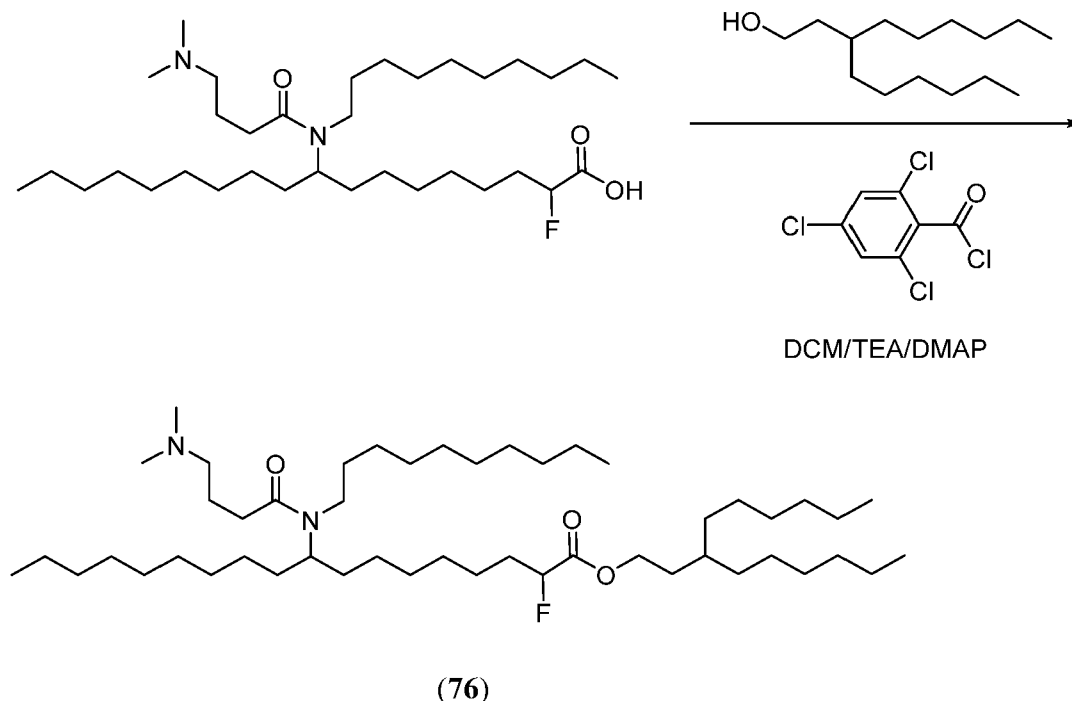


Se agitaron 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo (1,2 g, 2,0 mmol) y LiOH (144 mg, 6,0 mmol) en THF (50 ml) a TA durante 16 h. Se añadió HCl 6 M (1,3 ml) y se extrajo la reacción con DCM. Los

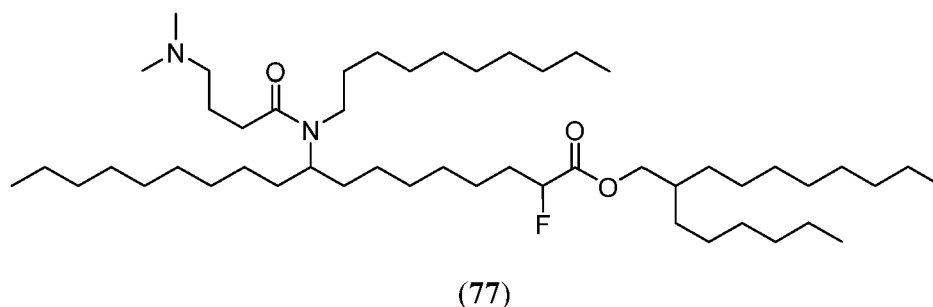
extractos combinados se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (810 mg, 70,8 %) que se usó sin purificación.

Etapas 8. Síntesis de 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-hexilnonilo (76)

5

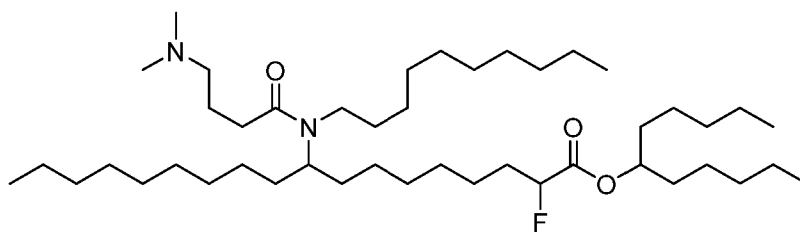


- 10 Se agitaron ácido 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (800 mg, 1,4 mmol), cloruro de 2,4,6-triclorobenzoylo (684 mg, 2,8 mmol), 3-hexilnonan-1-ol (400 mg, 1,75 mmol) y DMAP (514 mg, 4,2 mmol) en DCM (10 ml) a TA durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc (50 ml) y se lavó con NaOH 0,5 M (2 x 25 ml), agua (25 ml) y salmuera (25 ml). Los extractos orgánicos se secaron (MgSO_4), se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-hexilnonilo (76) (468 mg, 42,7 %). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,92 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H), 4,83-4,76 (m, 1H), 4,20 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,62 (s, 1H), 3,04 (c, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,51-2,23 (m, 10H), 1,99-1,55 (m, 16H), 1,44 (c, $J = 7,6$ Hz, 10H), 1,26 (d, $J = 8,5$ Hz, 55H), 0,93-0,84 (m, 12H). RMN de ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ -191,86 (dtd, $J = 49,6, 25,4, 19,6$ Hz). EM (IEN) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{49}\text{H}_{97}\text{FN}_2\text{O}_3$ 781,8; descubierta: 781,2. El siguiente compuesto se preparó siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.
- 15
- 20



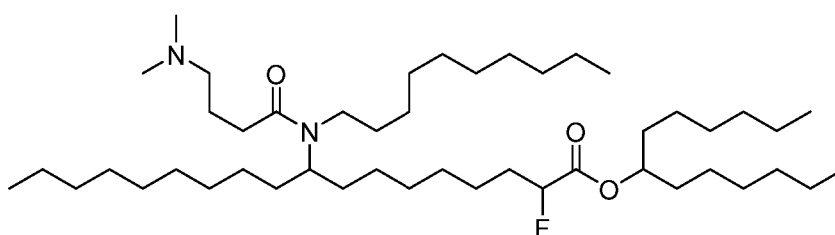
- 25 9-[N-decil-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 2-hexildecilo (77). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,01-4,74 (m, 1H), 4,08 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H), 3,63-3,50 (m, 1H), 3,25 (ddt, $J = 11,1, 5,9, 2,2$ Hz, 2H), 3,13-3,01 (m, 2H), 2,91 (d, $J = 8,4$ Hz, 6H), 2,79-2,72 (m, 1H), 2,68 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 2,00 (d, $J = 7,8$ Hz, 3H), 1,95-1,80 (m, 2H), 1,60-1,39 (m, 1H), 1,37-1,08 (m, 58H), 0,88 (td, $J = 6,9, 1,7$ Hz, 12H). EM (IEN) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calc. para $\text{C}_{50}\text{H}_{99}\text{FN}_2\text{O}_3$ 795,8; Observada 795,6.

- 30 Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.



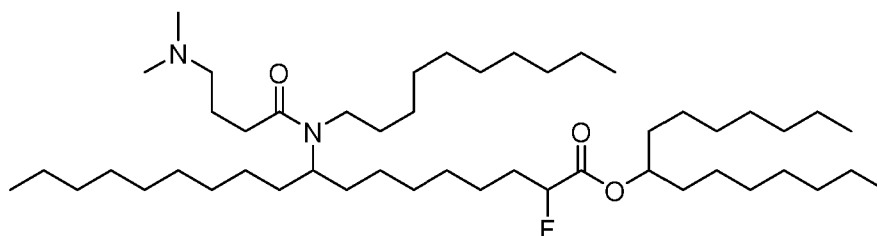
(112)

5 **9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorooctadecanoato de undecan-6-ilo (112).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,13-4,90 (m, 2H), 4,82 (c, $J = 5,4$ Hz, OH), 3,75-3,60 (m, 1H), 3,06 (c, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,35 (c, $J = 6,9$ Hz, 4H), 2,26 (s, 6H), 1,86 (dp, $J = 14,5, 6,3$ Hz, 4H), 1,75-1,09 (m, 64H), 0,90 (td, $J = 6,8, 2,7$ Hz, 12H).



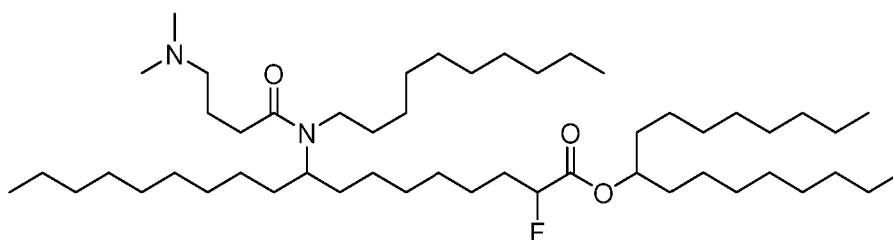
(113)

10 **9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorooctadecanoato de tridecan-7-ilo (113).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,12-4,92 (m, 2H), 4,82 (c, $J = 5,4$ Hz, OH), 3,73-3,57 (m, 1H), 3,11-3,01 (m, 2H), 2,35 (c, $J = 6,8$ Hz, 4H), 2,27 (s, 6H), 1,87 (td, $J = 12,5, 5,6$ Hz, 4H), 1,77-1,39 (m, 17H), 1,30 (dc, $J = 11,4, 6,4$ Hz, 53H), 0,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).



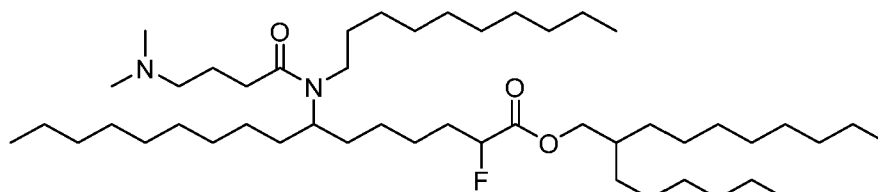
(114)

15 **9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorooctadecanoato de pentadecan-8-ilo (114).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,10-4,90 (m, 1H), 4,82 (c, $J = 5,4$ Hz, OH), 3,74-3,57 (m, 1H), 3,06 (c, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,35 (c, $J = 6,7$ Hz, 4H), 2,26 (s, 6H), 1,87 (tt, $J = 10,7, 6,0$ Hz, 4H), 1,81-1,16 (m, 73H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).



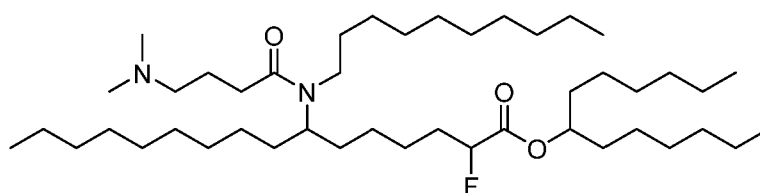
(115)

20 **9-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorooctadecanoato de heptadecan-9-ilo (115).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,08-4,90 (m, 1H), 4,82 (c, $J = 5,5$ Hz, OH), 3,79-3,58 (m, 1H), 3,15-2,95 (m, 2H), 2,35 (c, $J = 7,0$ Hz, 4H), 2,25 (s, 6H), 1,86 (dp, $J = 14,5, 6,4$ Hz, 4H), 1,77-1,13 (m, 80H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 12H).



(120)

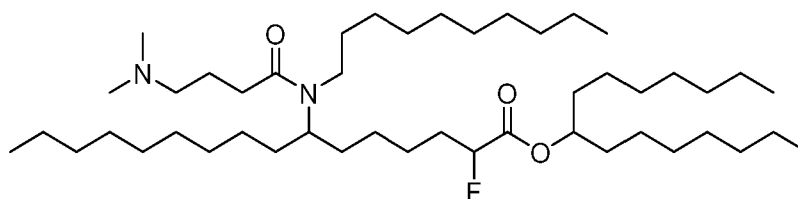
5 **7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorohexadecanoato de 2-hexildecilo (120).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,97 (t, $J = 5,8$ Hz, OH), 4,84 (c, $J = 5,9$ Hz, OH), 4,11 (t, $J = 4,9$ Hz, 2H), 3,05 (d, $J = 9,5$ Hz, 2H), 2,57-2,24 (m, 10H), 2,20 (s, 1H), 1,95-1,80 (m, 4H), 1,67 (s, 6H), 1,48 (tt, $J = 14,2, 8,8$ Hz, 7H), 1,28 (dd, $J = 10,0, 5,6$ Hz, 53H), 0,95-0,86 (m, 12H).



(121)

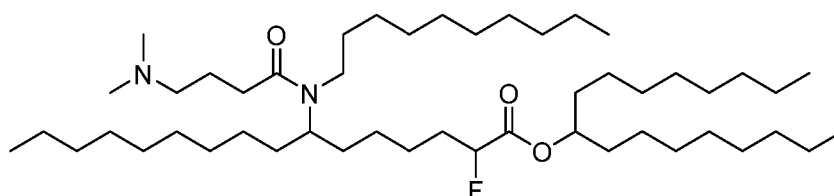
10 **7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorohexadecanoato de tridecan-7-ilo (121).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,05-4,85 (m, 2H), 4,79 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 3,65 (s, 1H), 3,03 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H), 2,32 (dt, $J = 11,9, 6,9$ Hz, 4H), 2,22 (s, 6H), 1,84 (dt, $J = 15,0, 7,3$ Hz, 4H), 1,73-1,35 (m, 16H), 1,27 (p, $J = 6,9$ Hz, 47H), 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).

15



(122)

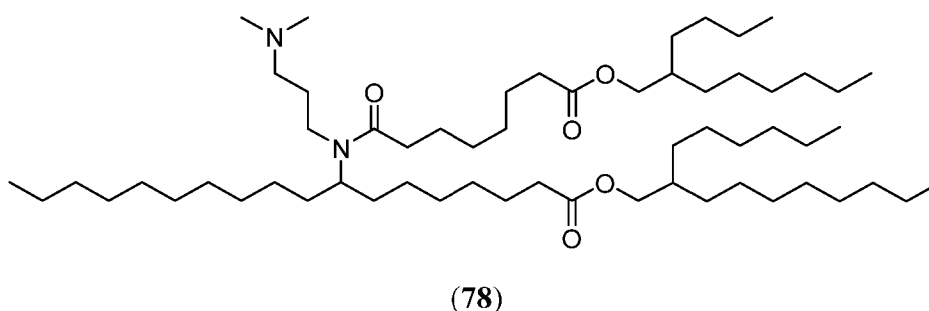
20 **7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorohexadecanoato de pentadecan-8-ilo (122).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,12-4,85 (m, 1H), 4,78 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), 3,64 (s, 1H), 3,02 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 2,34 (p, $J = 7,1$ Hz, 4H), 2,26 (s, 6H), 1,85 (dd, $J = 15,6, 8,3$ Hz, 6H), 1,67-1,36 (m, 12H), 1,26 (c, $J = 7,3$ Hz, 51H), 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).



(123)

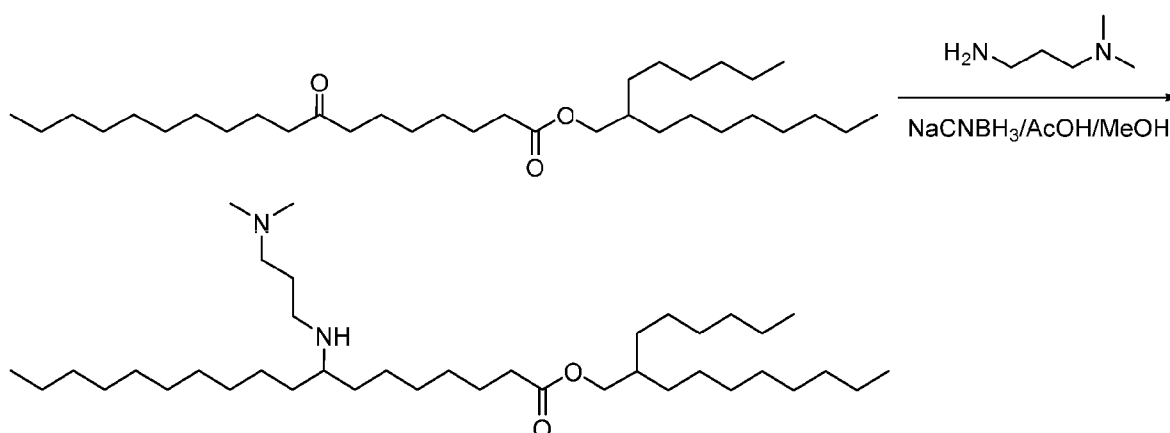
25 **7-(N-Decil-4-(dimetilamino)butanamido)-2-fluorohexadecanoato de heptadecan-9-ilo (123).** RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,09-4,87 (m, 2H), 4,79 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 3,04 (c, $J = 9,7$ Hz, 2H), 2,33 (c, $J = 7,1$ Hz, 4H), 2,24 (s, 5H), 1,84 (tt, $J = 17,5, 8,4$ Hz, 6H), 1,65-1,40 (m, 12H), 1,27 (d, $J = 8,5$ Hz, 57H), 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 12H).

Ejemplo 24. Síntesis de 8-{8-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-8-oxooctanamido}octadecenoato de 2-hexildecilo (78)



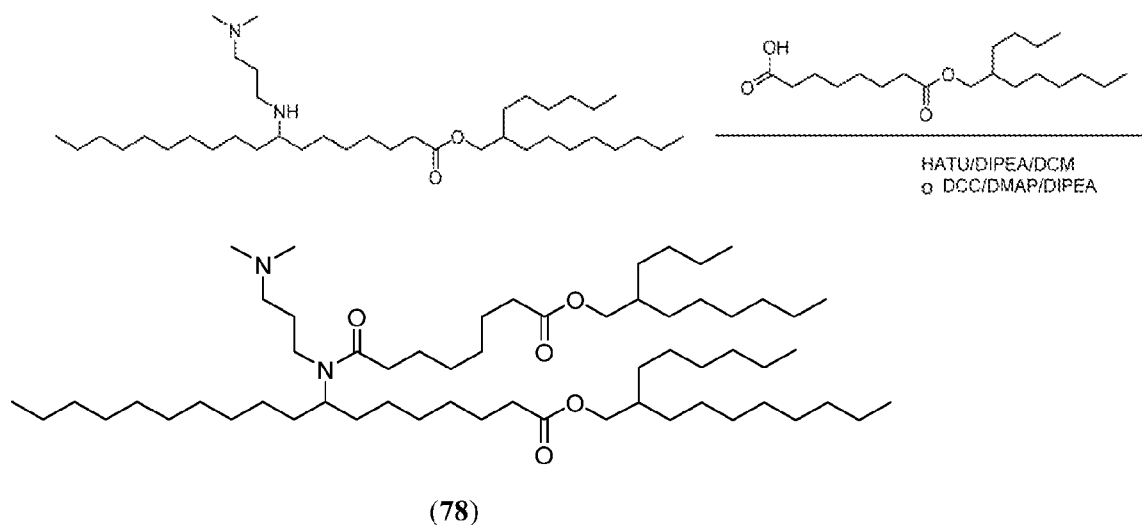
5

Etapa 1. Síntesis de 8-[3-(dimetilamino)propil]amino}octadecenoato de 2-hexildecilo



10 Se agitaron 8-oxooctadecanoato de 2-hexildecilo (500 mg, 1,0 mmol), dimetilaminopropilamina (117 mg, 1,14 mmol) y AcOH (0,11 ml, 1,9 mmol) en MeOH (15 ml) a 50 °C durante 1 h. La reacción se enfrió a TA, se añadió NaCNBH₃ (180 mg, 2,9 mmol) y se siguió agitando durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, se recogió el residuo en EtOAc (50 ml) y se lavó con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄), se filtraron, se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de MeOH/DCM), dando octadecanoato de 2-hexildecil-8-[[3-(dimetilamino)propil]amino} (430 mg, 73,8 %).

Etapla 2. Síntesis de 8-{8-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-8-oxooctanamido}octadecenoato de 2-hexildecilo (78)



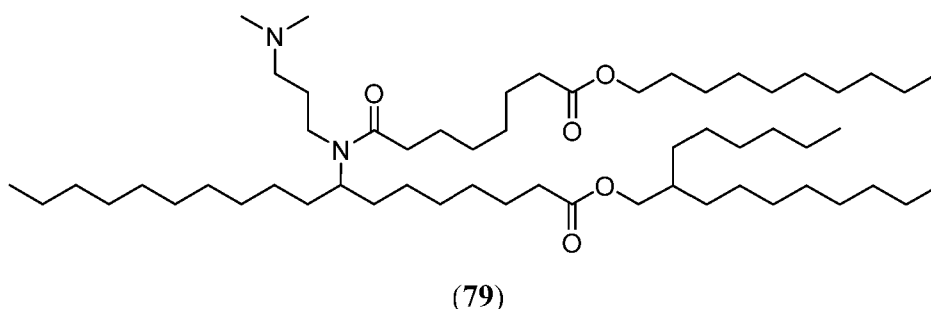
Se agitaron ácido 8-[(2-butiloctil)oxi]-8-oxooctanoico (169 mg, 0,5 mmol), HATU (187 mg, 0,5 mmol) y DIPEA (0,12 ml,

0,66 mmol) en DCM (5 ml) a TA durante 15 min. Se añadió 8-[[3-(dimetilamino)propil]amino]octadecanoato de 2-hexildecilo (200 mg, 0,33 mmol) y se siguió agitando durante 16 h. La reacción se concentró al vacío. El residuo se recogió en EtOAc (50 ml), se lavó con NaHCO₃ y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-5 % de MeOH/DCM, 100 % de EtOAc), dando

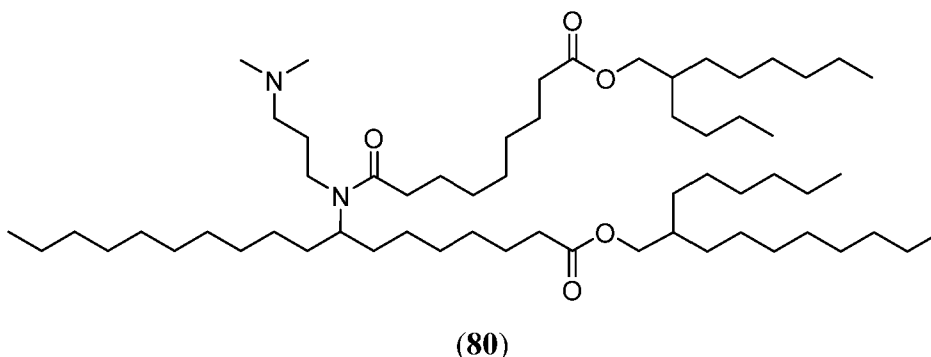
5 8-{8-[(2-butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-8-oxooctanamido}octadecenoato de 2-hexildecilo (**78**) (112 mg, 36,5 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,96 (dd, *J* = 5,9, 3,0 Hz, 4H), 3,70 (s, 1H), 3,30 (s a, 2H), 3,13 (s a, 2H), 2,94 (s, 6H), 2,38 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,30 (td, *J* = 7,4, 3,8 Hz, 4H), 1,96 (s, 2H), 1,62 (p, *J* = 6,6 Hz, 14H), 1,38-1,06 (m, 64H), 0,88 (t, *J* = 6,5 Hz, 15H).

10 Cabe señalar que el acoplamiento de amida final puede conseguirse utilizando la metodología de acoplamiento de DCC/DMAP/DIPEA

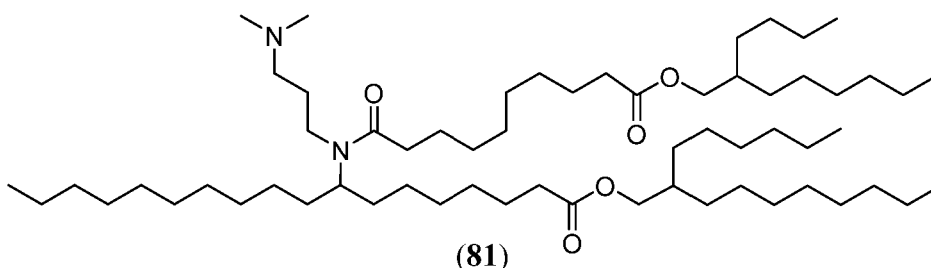
Los siguientes compuestos se prepararon siguiendo una metodología análoga a la descrita anteriormente.



15 **8-{8-(Deciloxi)-N-[3-(dimetilamino)propil]-8-oxooctanamido}-octadecenoato de 2-hexildecilo (79)**. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,08 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,99 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,74 (s, 1H), 3,33 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,17 (s, 2H), 2,97 (s, 5H), 2,41 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 2,33 (t, *J* = 7,5 Hz, 4H), 1,99 (s, 2H), 1,64 (t, *J* = 7,4 Hz, 12H), 1,29 (s, 57H), 0,91 (t, *J* = 6,7 Hz, 12H).

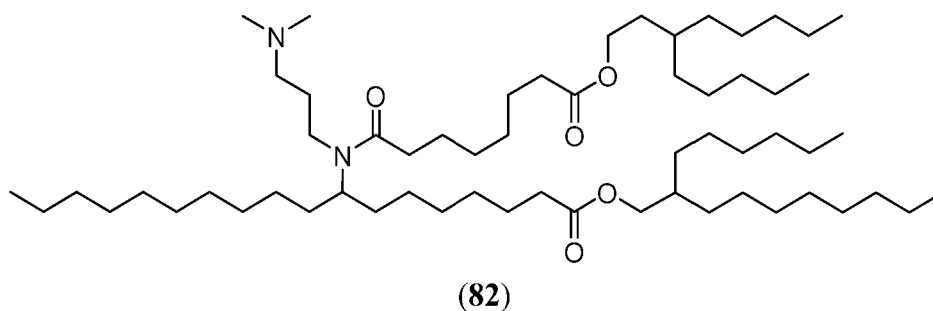


25 **8-{9-[(2-Butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-9-oxononanamido}-octadecenoato de 2-hexildecilo (80)**. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,98 (dd, *J* = 5,8, 2,3 Hz, 4H), 3,71 (s, 1H), 3,29 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 3,04 (s, 2H), 2,86 (s, 6H), 2,82 (s, 20H), 2,38 (dd, *J* = 8,6, 6,2 Hz, 2H), 2,32 (t, *J* = 7,5 Hz, 4H), 1,94 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 1,50 (dd, *J* = 29,4, 6,7 Hz, 13H), 1,38-1,24 (m, 68H), 0,94-0,88 (m, 15H).



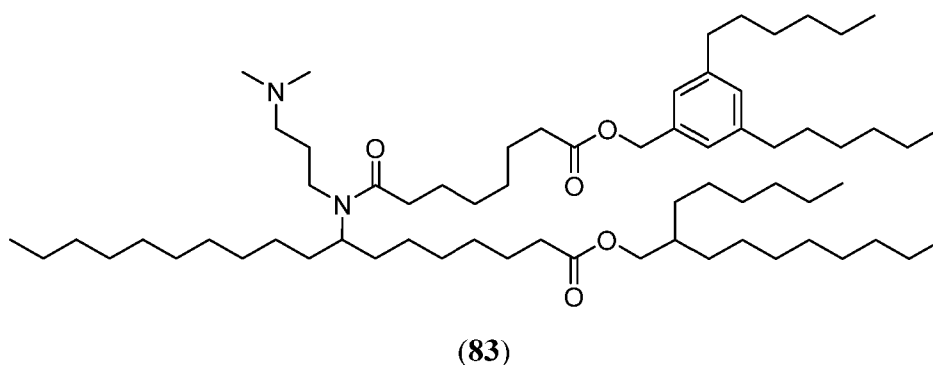
30 **8-{10-[(2-Butiloctil)oxi]-N-[3-(dimetilamino)propil]-10-oxodecanamido}-octadecenoato de 2-hexildecilo (81)**. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,10 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,98 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,29 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,06 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,87 (s, 6H), 2,83 (s, 1H), 2,38 (dd, *J* = 8,5, 6,5 Hz, 2H), 2,32 (td, *J* = 7,5, 2,5 Hz, 4H), 2,01-1,93 (m, 2H), 1,61 (dc, *J* = 20,5, 6,7 Hz, 10H), 1,41-1,17 (m, 68H), 0,91 (t, *J* = 6,7 Hz, 15H).

35



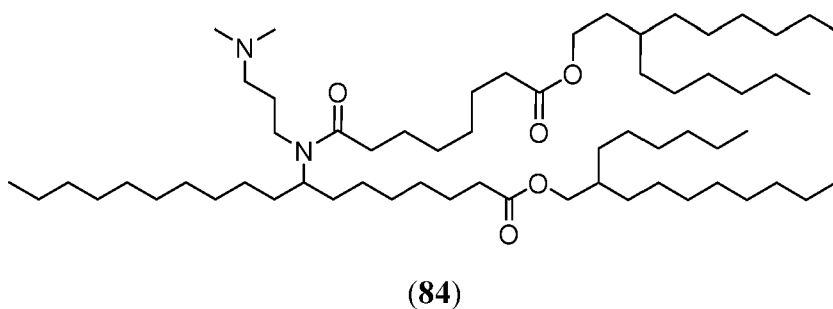
8-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-8-oxo-8-((2-pentilooctil)oxi)-octanamido)-octadecenoato de 2-hexildecilo (82).

5 RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,98 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,29 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 3,06 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,87 (s, 6H), 2,83 (s, 1H), 2,38 (dd, $J = 8,5, 6,5$ Hz, 2H), 2,32 (td, $J = 7,5, 2,5$ Hz, 4H), 2,01-1,93 (m, 2H), 1,61 (dc, $J = 20,5, 6,7$ Hz, 10H), 1,41-1,17 (m, 68H), 0,91 (t, $J = 6,7$ Hz, 15H).



8-(8-((3,5-Dihexilbencil)oxi)-N-(3-(dimetilamino)propil)-8-oxooctanamido)-octadecenoato de 2-hexildecilo (83).

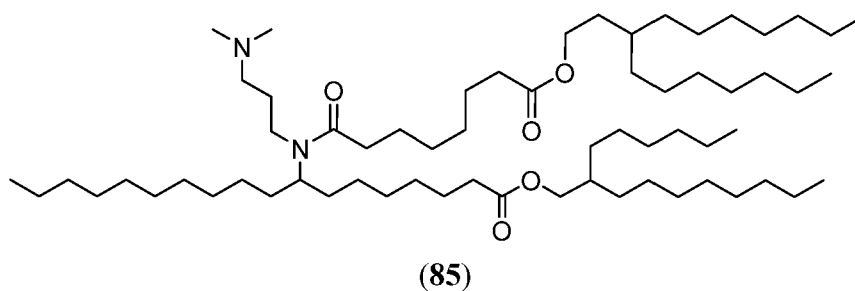
10 RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6,98 (m, 3H), 5,07 (s, 2H), 3,98 (dd, $J = 5,9, 2,8$ Hz, 2H), 3,69-3,56 (m, 1H), 3,12 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,59 (t, $J = 7,8$ Hz, 4H), 2,42-2,20 (m, 13H), 1,79-1,56 (m, 21H), 1,46 (t, $J = 7,2$ Hz, 4H), 1,41-1,10 (m, 61H), 0,98-0,86 (m, 15H).



8-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-8-((3-hexilnonil)oxi)-8-oxooctanamido)-octadecenoato de 2-hexildecilo (84).

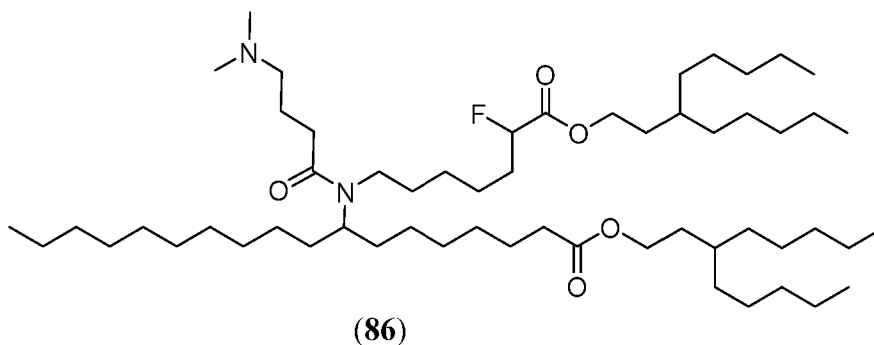
15 RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,10 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,98 (dd, $J = 5,8, 1,9$ Hz, 2H), 3,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,75 (s, 2H), 2,58 (s, 6H), 2,31 (cd, $J = 7,5, 2,9$ Hz, 6H), 2,26 (s, 2H), 1,88 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,74-1,55 (m, 10H), 1,49 (td, $J = 13,1, 5,6$ Hz, 4H), 1,41-1,19 (m, 69H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 15H).

20

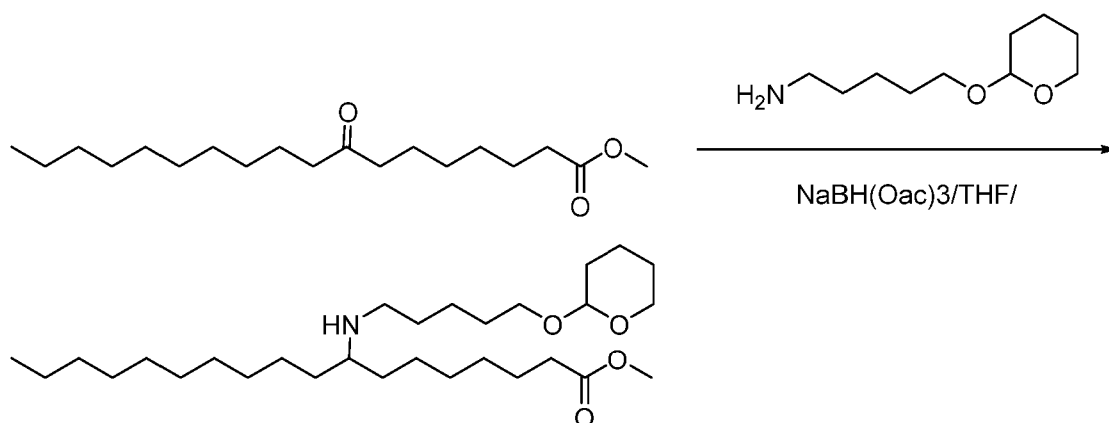


8-(N-(3-(Dimetilamino)propil)-8-((3-heptildecil)oxi)-8-oxooctanamido)-octadecenoato de 2-hexildecilo (85).
 RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4,09 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,98 (dd, $J = 5,8, 3,2$ Hz, 2H), 3,13 (dd, $J = 10,4, 5,9$ Hz, 2H), 2,30 (pd, $J = 4,9, 3,0$ Hz, 8H), 2,24 (s, 6H), 1,77-1,55 (m, 13H), 1,47 (c, $J = 7,5$ Hz, 4H), 1,29 (dd, $J = 8,3, 5,0$ Hz, 74H), 0,94-0,86 (m, 15H).

5 **Ejemplo 25. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-{6-fluoro-7-oxo-7-[(3-pentiloctil)oxi]heptil}butanamido]octadecenoato de 3-pentiloctilo (86)**



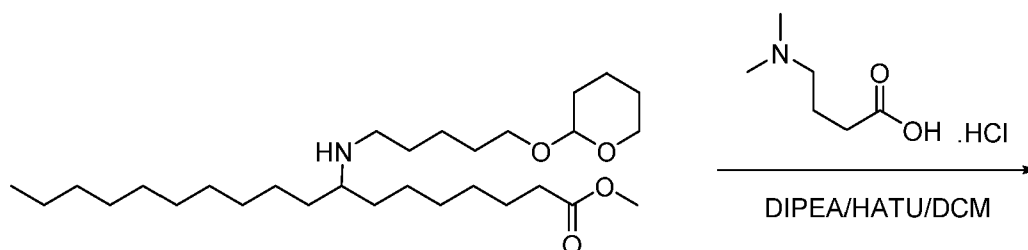
10 **Etapla 1. Síntesis de 8-{[5-(oxan-2-iloxi)pentil]amino}octadecenoato de metilo**



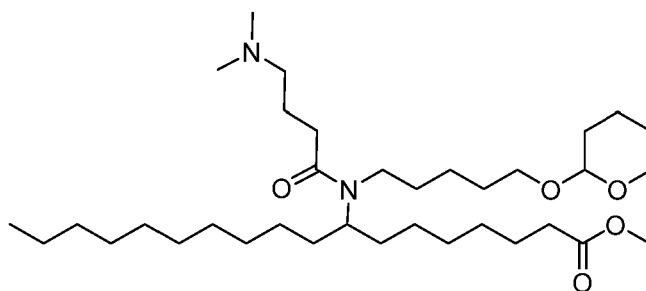
15 Se calentaron 5-(oxan-2-iloxi)pentan-1-amina (1,8 g, 9,6 mmol) y 8-oxooctadecanoato de metilo (3 g, 9,6 mmol) en THF (25 ml) a 50 °C durante 45 min. Se añadió $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (6,1g, 28,8 mmol) y se siguió agitando durante 16 h. Tras enfriar a TA, la reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc (100 ml), se lavó con NaHCO_3 y salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentra al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de EtOAc/Hex), dando 8-{[5-(oxan-2-iloxi)pentil]amino}octadecenoato de metilo (1,6 g, 34,5 %).

20

Etapla 2. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-[5-(oxan-2-iloxi)pentil]-butanamido] octadecenoato de metilo

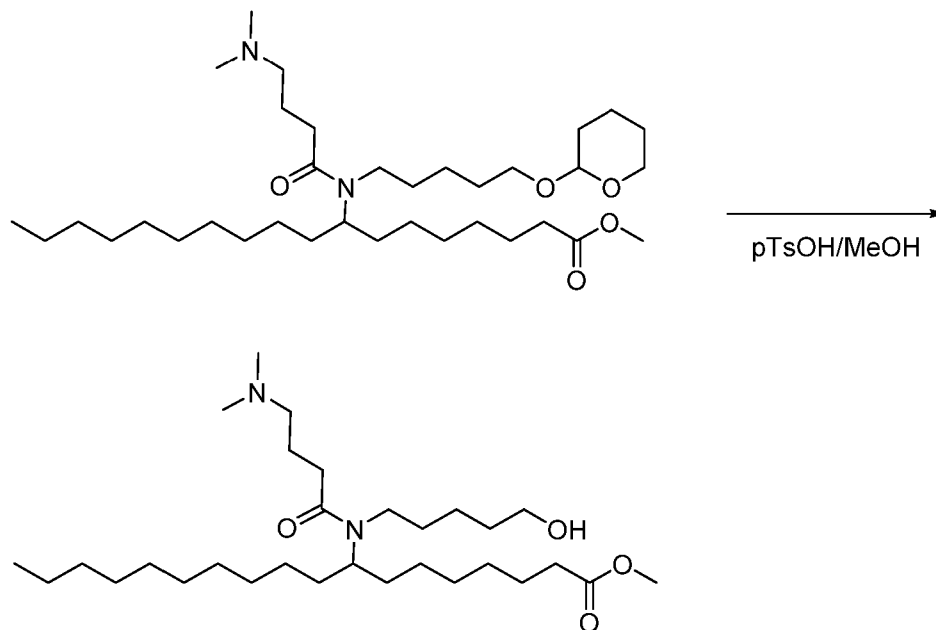


25



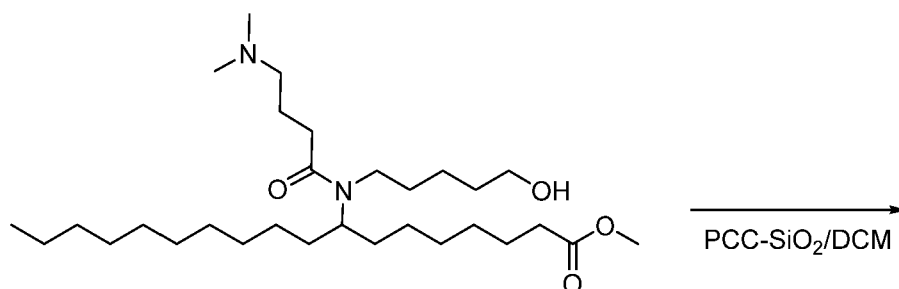
Se agitaron HCl de ácido 4-(dimetilamino)butanoico (1,30 g, 9,9 mmol), DIPEA (3,5 ml, 20,0 mmol) y HATU (3,8 g, 9,9 mmol) en DCM (50 ml) a TA durante 30 min. Se añadió 8-[[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]amino]octadecanoato de metilo (1,6 g, 3,3 mmol) en DCM (10 ml) y se siguió agitando durante 16 h a TA. La reacción se concentró al vacío y el residuo se recogió en EtOAc. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con NaOH 0,5 M, agua y salmuera (25 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]butanamido]octadecanoato de metilo (1,85 g, 93,7 %).

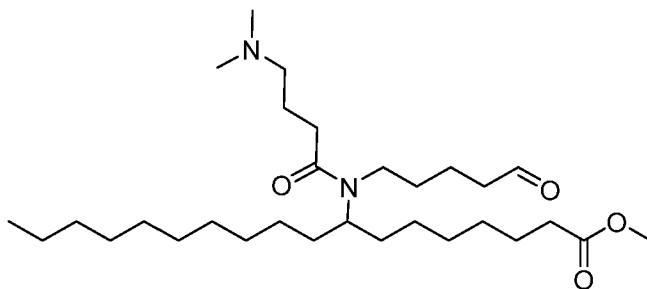
Etapa 3. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(5-hidroxipentil)butanamido]-octadecenoato de metilo



Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-[5-(oxan-2-iloxi)pentilo]butanamido]octadecanoato de metilo (1,9 g, 3,2 mmol) y p-ToSH.H₂O (27 mg 0,16 mmol) en MeOH (25 ml) a TA durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc (100 ml) se lavó con solución sat. de NaHCO₃, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío, dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(5-hidroxipentil)butanamido]octadecanoato de metilo (cuant.) que se usó sin purificación.

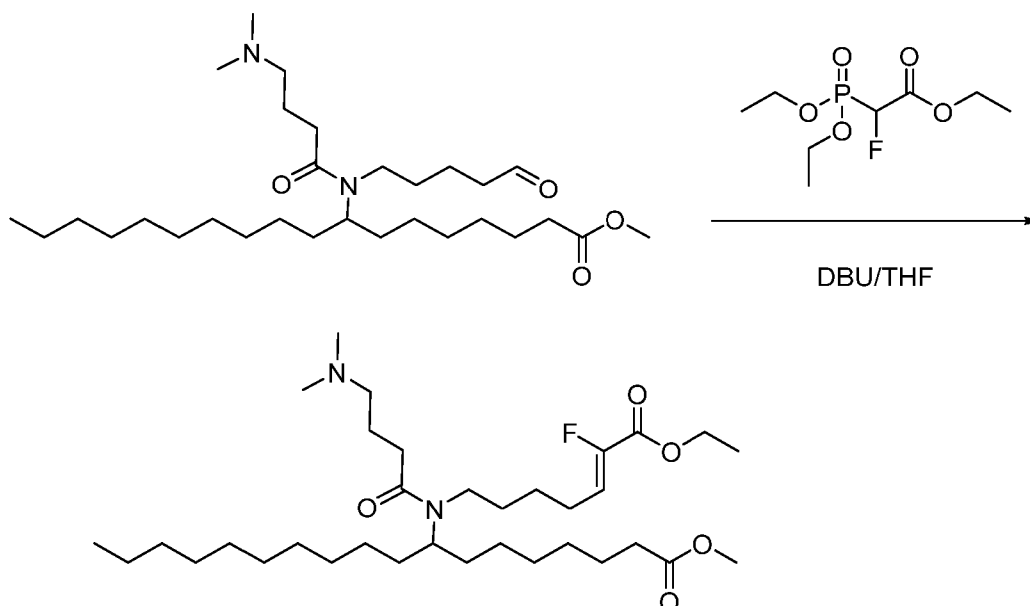
Etapa 4. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(5-oxopentil)butanamido]-octadecenoato de metilo





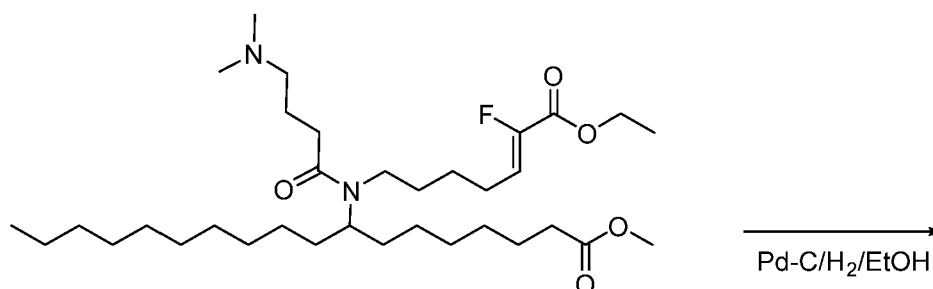
5 Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-(5-hidroxipentil)butanamido]octadecanoato de metilo (1,6 g, 3,1 mmol) y PCC/sílice 1:1 en peso (1,3 g, 3,12 mmol) en DCM (50 ml) a TA durante 16 h. La reacción se filtró a través de gel de sílice eluyendo con DCM. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-20 % de MeOH/DCM), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(5-oxopentil)butanamido]octadecanoato de metilo (1,6 g, cuant.).

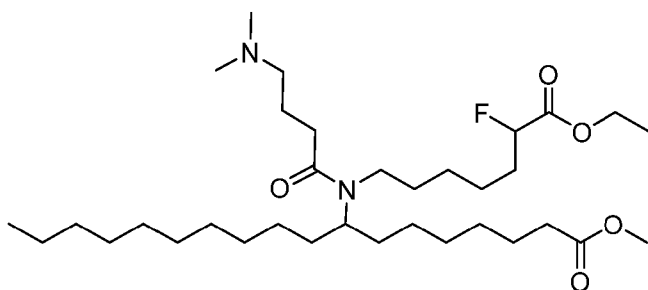
10 **Etapla 5. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(7-etoxi-6-fluoro-7-oxohept-5-en-1-il)butanamido]octadecenoato de metilo**



15 Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-(5-oxopentil)butanamido]octadecanoato de metilo (1,6 g, 3,1 mmol), 2-(dietoxifosforil)-2-fluoroacetato de etilo (1,9 g, 7,8 mmol) y DBU (1,17 ml, 7,8) en THF anhidro (25 ml) a TA durante 16 h. Se añadieron adicionalmente 2-(dietoxifosforil)-2-fluoroacetato de etilo (379 mg, 1,6 mmol) y DBU (0,23 ml, 1,6 mmol) y se siguió agitando durante otras 3 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-15 % de MeOH/DCM, 0-100 % de EtOAc/Hex), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(7-etoxi-6-fluoro-7-oxohept-5-en-1-il)butanamido]octadecenoato de metilo (500 mg, 26,7 %).

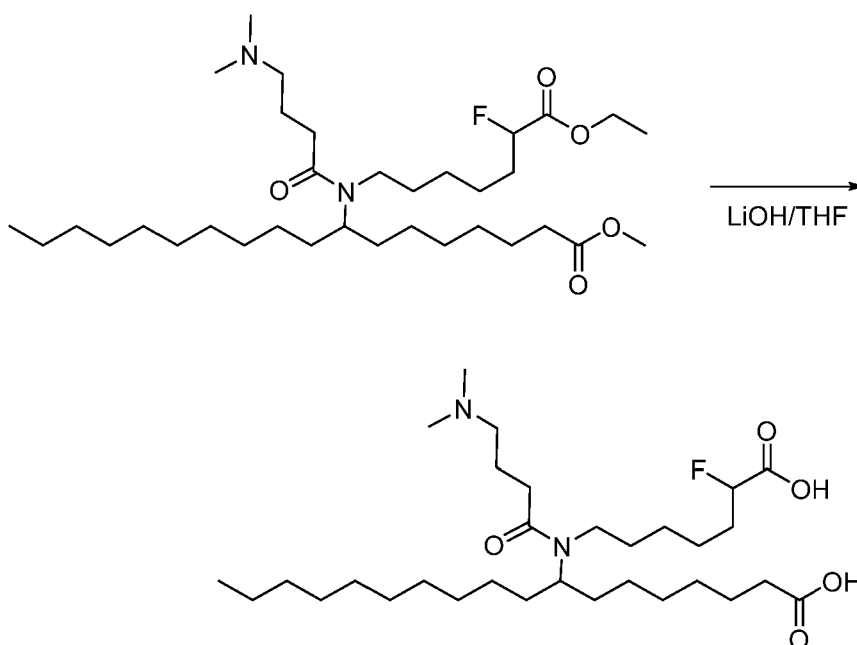
25 **Etapla 6. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(7-ethoxi-6-fluoro-7-oxoheptil)butanamido]octadecenoato de metilo**





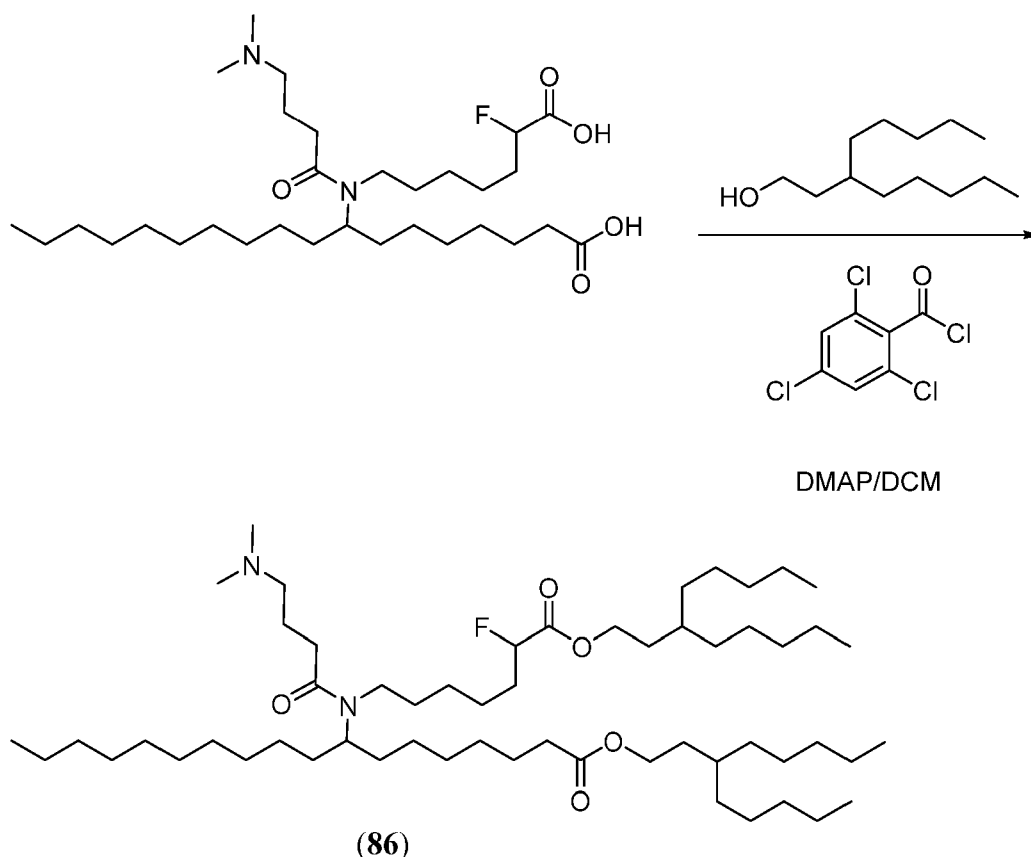
Se sometió 8-[4-(dimetilamino)-N-(7-etoxi-6-fluoro-7-oxohept-5-en-1-il)butanamido]octadecanoato de metilo (500 mg, 0,84 mmol) a hidrogenación catalítica sobre paladio en carbono (50 mg) en EtOH (25 ml) a TA durante 16 horas. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró al vacío, dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(7-etoxi-6-fluoro-7-oxoheptil)butanamido]octadecanoato de metilo (375 mg, 74,7 %) que se usó sin purificación.

Etapa 7. Síntesis de ácido 8-[N-(6-carboxi-6-fluorohexil)-4-(dimetilamino)butanamido]-octadecanoico



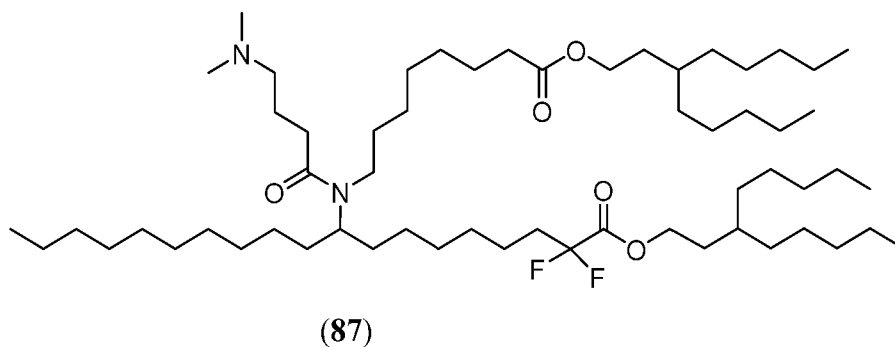
Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-(7-etoxi-6-fluoro-7-oxoheptil)butanamido]octadecanoato de metilo (375 mg, 0,6 mmol) y LiOH (60,0 mg, 2,5 mmol) en THF (10 ml) a TA durante 16 h. Se añadió HCl 6 M (0,6 ml), la reacción se diluyó con H₂O y la reacción se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 8-[N-(6-carboxi-6-fluorohexil)-4-(dimetilamino)butanamido]octadecanoico (205 mg, 59,0 %) que se usó sin purificación.

Etapa 8. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-{6-fluoro-7-oxo-7-[(3-pentiloxil)oxi]heptil}butanamido]octadecenoato de 3-pentiloxilo (86)



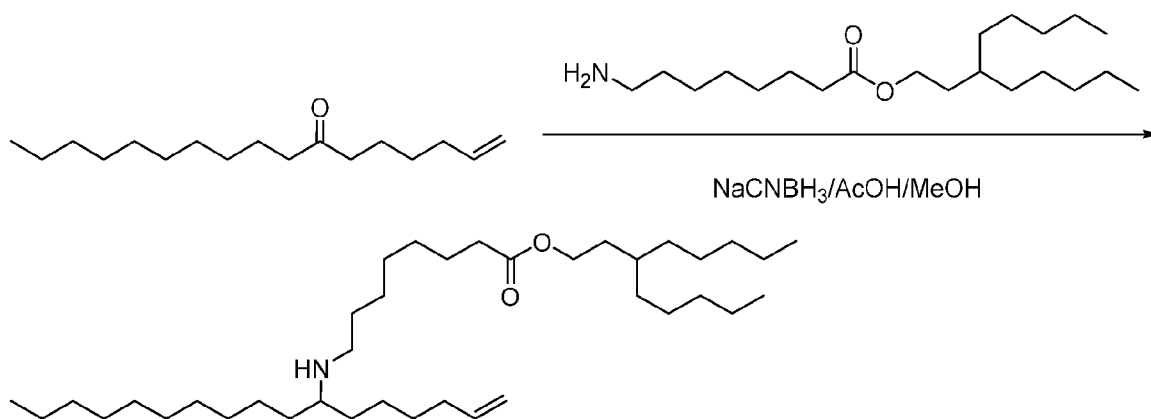
- 5 Se agitaron ácido 8-[N-(6-carboxi-6-fluorohexil)-4-(dimetilamino)butanamido]octadecanoico (200 mg, 0,36 mmol), 3-pentiloctan-1-ol (215 mg, 1,0 mmol), DMAP (175 mg, 1,4 mmol) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzóilo (262 mg, 1,0 mmol) en DCM (10 ml) a TA durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc y se lavó con NaOH 0,5 M, H₂O y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante
- 10 cromatografía ultrarrápida automatizada (0-25 % de ACN/DCM, 0-15 % de MeOH/DCM), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-{6-fluoro-7-oxo-7-[(3-pentiloctil)oxi]heptilo}butanamido]octadecenoato de 3-pentiloctilo **(86)** (93 mg, 28,14 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,97 (ddd, J = 6,9, 4,5, 2,3 Hz, 1H), 4,85 (ddd, J = 7,1, 5,1, 2,4 Hz, 1H), 4,23 (tt, J = 7,3, 2,0 Hz, 2H), 4,09 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 3,59 (s, 1H), 3,33-3,23 (m, 2H), 3,10 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 2,95 (d, J = 11,7 Hz, 6H), 2,82-2,76 (m, 1H), 2,72 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 2,30 (td, J = 7,5, 3,1 Hz, 2H), 2,06-1,84 (m, 4H), 1,71-1,38 (m, 22H), 1,38-1,16 (m, 55H), 0,91 (tt, J = 7,1, 1,5 Hz, 15H). EM (IEN) m/z: [M + H]⁺ calc. para C₅₇H₁₁₁FN₂O₅ 923,9; Encontrado 923,2
- 15

Ejemplo 26. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluorononadecanoato de 3-pentiloctilo (87)



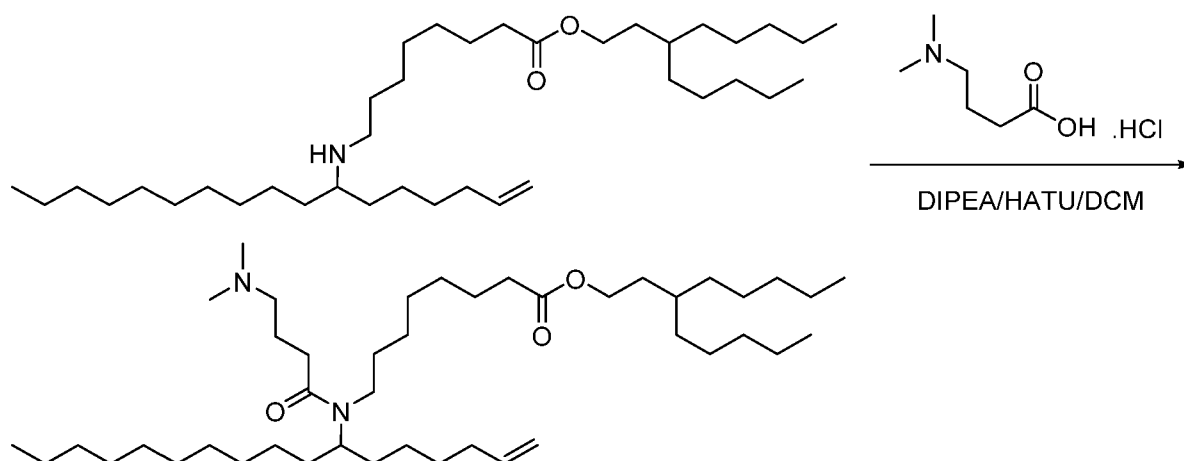
20

Etapla 1. Síntesis de 8-(heptadec-1-en-7-ilamino)octanoato de 3-pentiloctilo



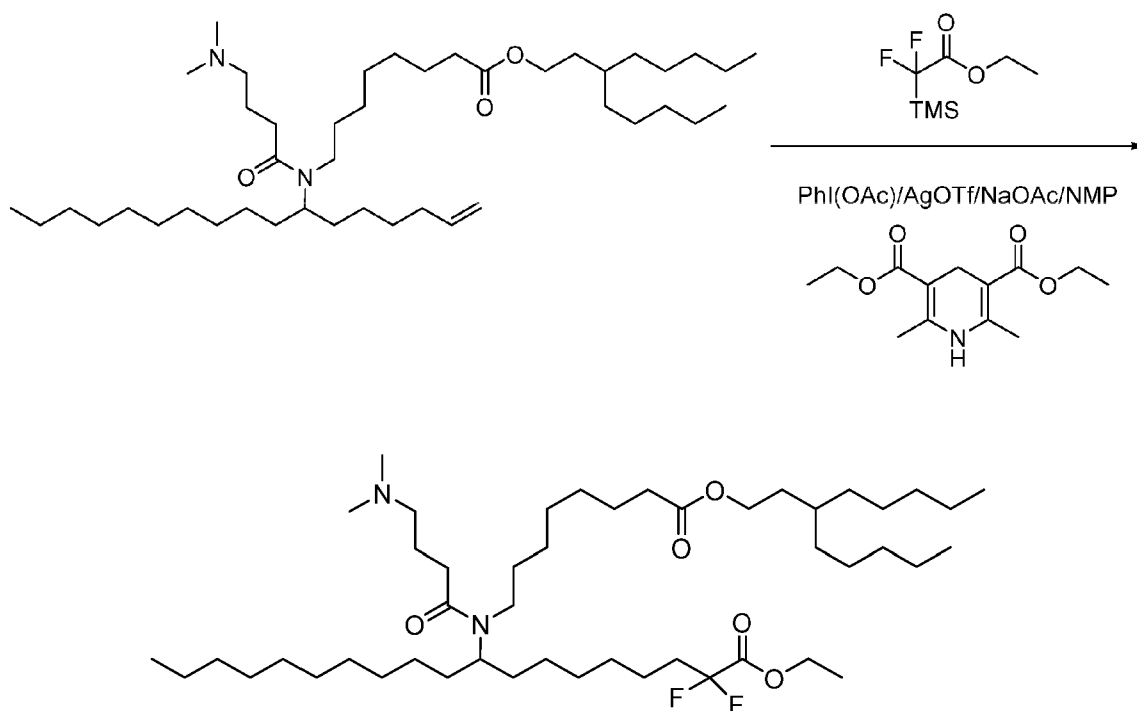
Se agitaron 8-aminooctanoato de 3-pentiloctilo (1,2 g, 3,5 mmol), heptadec-1-en-7-ona (872 mg, 3,5 mmol) y ácido de AcOH (200 μ l, 3,5 mmol) en MeOH a 60 °C durante 30 min. Se añadió NaCNBH₃ y se siguió agitando durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en DCM, se lavó con NaHCO₃ (solución sat. ac.) y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-60 % de EtOAc/Hex), dando 8-(heptadec-1-en-7-ilamino)octanoato de 3-pentiloctilo (1,33 g, 66,7 %).

Etapa 2. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(heptadec-1-en-7-il)butanamido]octanoato de 3-pentiloctilo



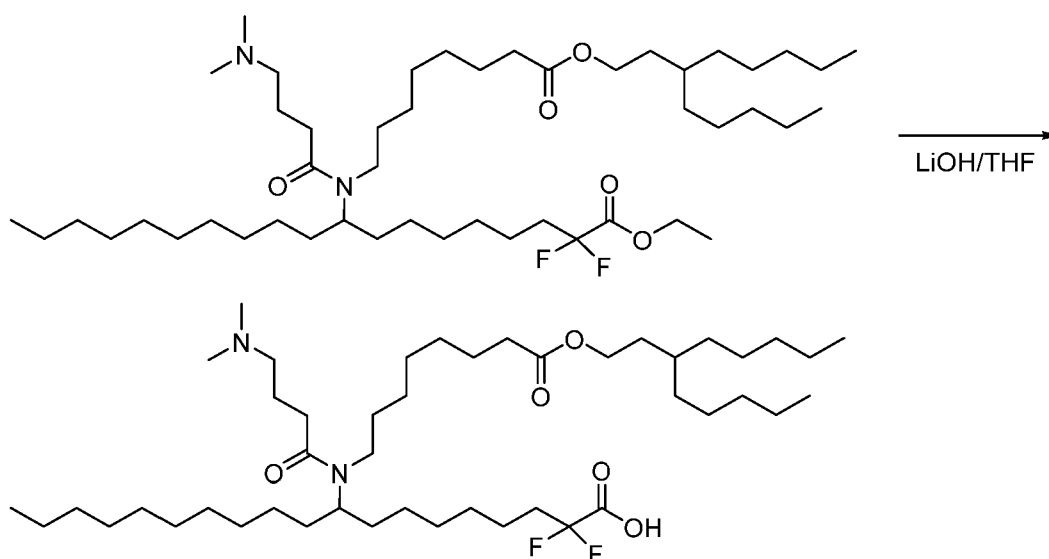
Se agitaron clorhidrato de ácido 4-(dimetilamino)butírico (1,16 g, 6,9 mmol), HATU (3,15 g, 8,3 mmol) y DIPEA (3,6 ml, 20,7 mmol) en DCM (40 ml) a TA durante 3 h. Se añadió 8-(heptadec-1-en-7-ilamino)octanoato de 3-pentiloctilo (1,33 g, 2,3 mmol) en DCM (40 ml) y se siguió agitando durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lavó con solución sat. de NaHCO₃ y la capa acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de EtOAc/Hex y 0-20 % de MeOH/EtOAc), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(heptadec-1-en-7-il)butanamido]octanoato de 3-pentiloctilo (1,54 g, 97,1 %).

Etapa 3. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluorononadecanoato de etilo



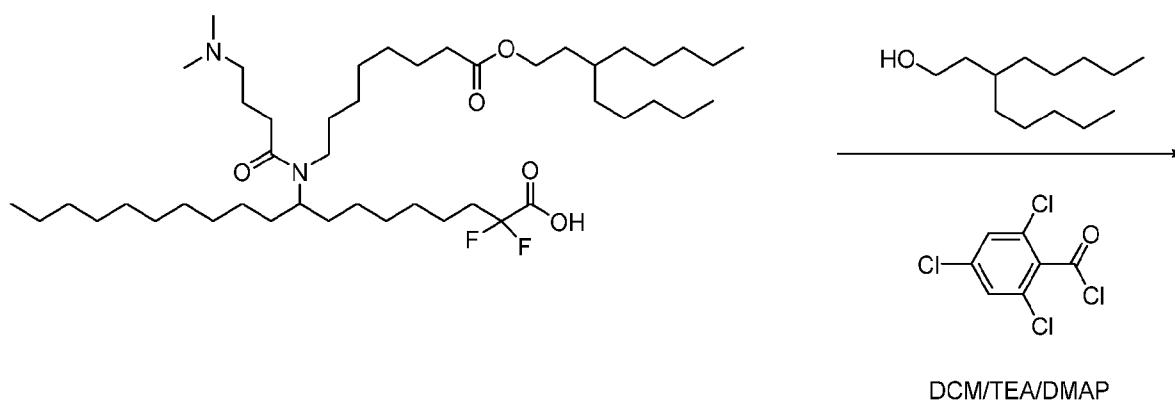
- 5 En un matraz secado al calor/vacío, se agitaron éster de Hantsch (566 mg, 2,24 mmol), NaOAc (367 mg, 4,5 mmol), AgOTf (1,44 g, 5,6 mmol) y diacetato de yodobenceno (1,44 g, 4,471 mmol, 2 eq.) en NMP (15 ml) bajo N_2 . Se añadieron 8-[4-(dimetilamino)-N-(heptadec-1-en-7-il)butanamido]octanoato de 3-pentilo (1,55 g, 2,24 mmol) en NMP (7 ml) y 2,2-difluoro-2-(trimetilsilil)acetato de etilo (2,2 g, 11,2 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 18 h. La reacción se filtró a través de Celite eluyendo con Et_2O . Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO_4), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-25 % de ACN/DCM), dando 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluoronadecanoato de etilo (588 mg, 32,3 %).

15 **Etapla 4. Síntesis del ácido 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluoronadecanoico**

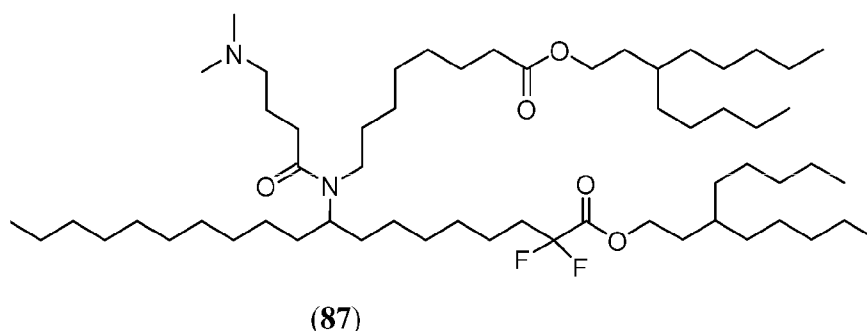


- 20 Se agitaron 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluoronadecanoato de etilo (588 mg, 0,7 mmol) y LiOH 1 M (2,2 ml, 2,2 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C hasta que se completó la reacción. Se añadió HCl 6 M (0,36 ml) y la reacción se destiló azeotrópicamente con tolueno. El residuo se recogió en DCM, se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío, dando ácido 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluoronadecanoico (600 mg, 98,8 %) que se usó sin purificación.

Etapa 5. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloxil)oxi]-octil}butanamido]-2,2-difluorononadecanoato de 3-pentiloxil (87)

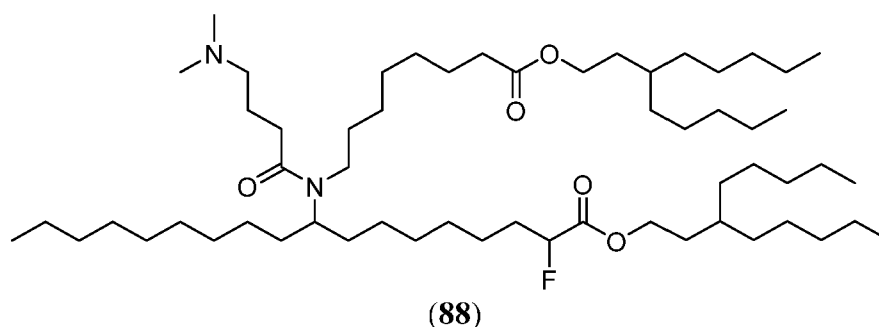


5



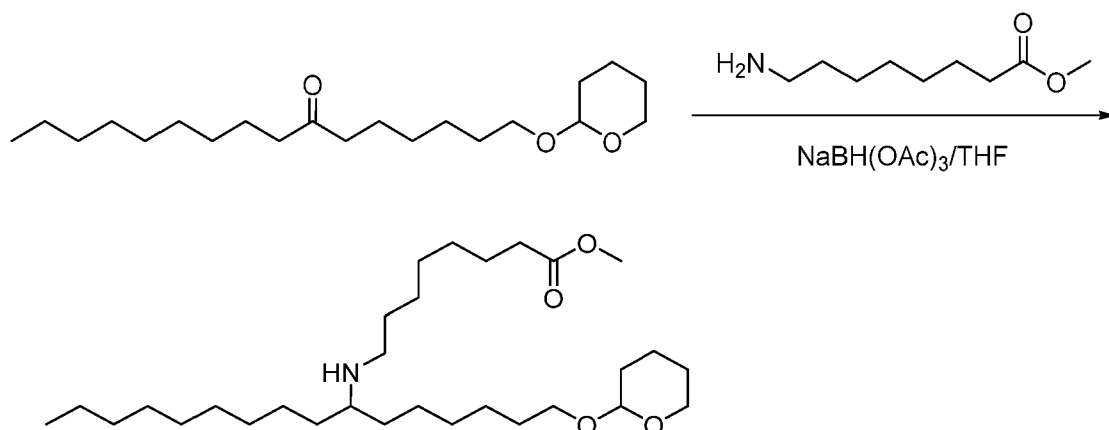
Se combinaron ácido 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentilooctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluoronadecanoico (561 mg, 0,7 mmol), 3-pentilooctanol-1-ol (157 mg, 0,78 mmol), cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (382 mg, 1,6 mmol) y DMAP (261 mg, 2,1 mmol) en DCM (10 ml) a 0 °C. La reacción se agitó durante 16 h dejando que se calentara a TA. Se añadió Et₂O y el PPT resultante se eliminó por filtración. Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃, se secaron (MgSO₄), se filtraron, se concentraron al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM y ACN/DCM 3CV (1:1), 0-20 % de MeOH/DCM), dando 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentilooctil)oxi]octil}butanamido]-2,2-difluoronadecanoato de 3-pentilooctilo (87) (128 mg, 18,5 %). RMN de ¹H (400 MHz, MeOH) δ 4,33 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 4,12 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,19 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 3,12 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 2,81 (t, J = 7,5 Hz, 3H), 2,62 (s, 6H), 2,52 (dt, J = 10,2, 7,0 Hz, 3H), 2,33 (td, J = 7,3, 4,3 Hz, 3H), 1,93 (h, J = 7,1 Hz, 3H), 1,64 (dc, J = 29,9, 6,6 Hz, 9H), 1,55 (s, 3H), 1,46 (s, 3H), 1,39 (d, J = 3,8 Hz, 7H), 1,37 (s, 9H), 1,31 (d, J = 4,2 Hz, 39H), 0,93 (t, J = 6,9 Hz, 15H).

Ejemplo 27. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentiloxil)oxi]octil}butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentiloxil (88)



25

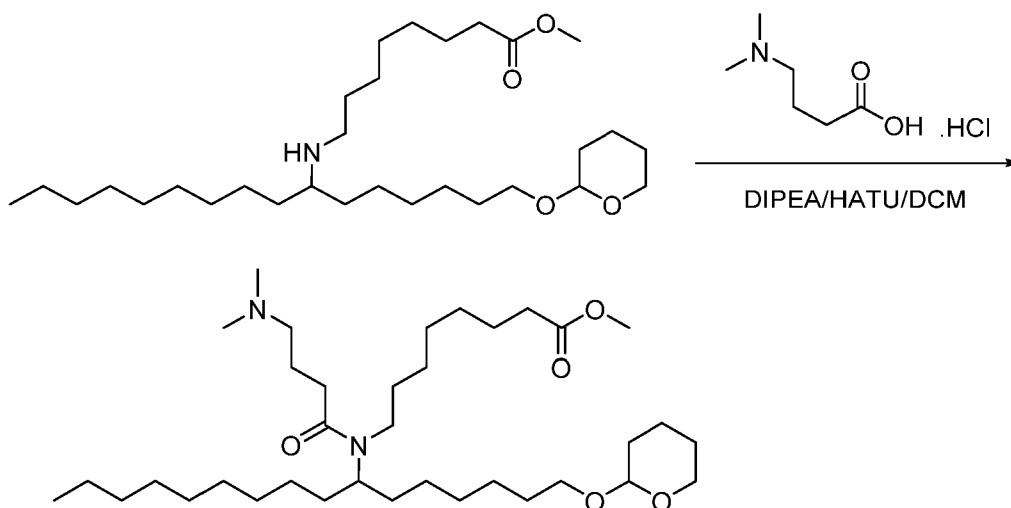
Etapa 1. Síntesis de 8-{[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amino}octanoato de metilo



- 5 Se agitaron 1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-ona (5,7 g, 16,7 mmol), 8-amino-octanoato de metilo (2,9 g, 16,7 mmol) y NaCN(OAc)₃ (10,6 g, 50,2 mmol) en THF a 50 °C durante 16 h. La reacción se filtró, eluyendo con EtOAc y lavando los extractos orgánicos con solución sat. de NaHCO₃, agua y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron (MgSO₄) se concentraron al vacío y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (7 % de MeOH/DCM), dando 8-[[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amino]octanoato de metilo (2,9 g, 34,2 %).

10

Etapla 2. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamido]octanoato de metilo

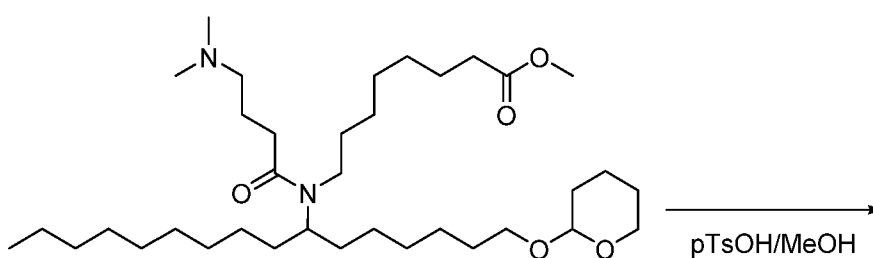


15

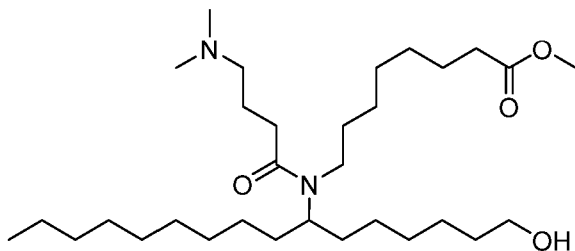
- Se agitaron sal HCl de ácido 4-dimetilaminobutanoico (3,84 g, 22,9 mmol), HATU (8,7 g, 22,9 mmol) y DIPEA (8,0 ml, 45,8 mmol) en DCM (40 ml) durante 3 h a TA. Se añadió 8-[[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]amino]octanoato de metilo (2,85 g, 5,7 mmol) en DCM (40 ml) y se siguió agitando durante 18 h. La reacción se concentró al vacío, el residuo se recogió en EtOAc, se lavó con solución saturada de NaHCO₃ y la capa acuosa se extrajo con EtOAc adicionalmente. Los extractos orgánicos combinados se concentraron al vacío y el material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de EtOAc/Hex, y 0-20 % MeOH/EtOAc), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-[1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il]butanamido]octanoato de metilo (cuant.).

20

Etapla 3. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamido]octanoato de metilo

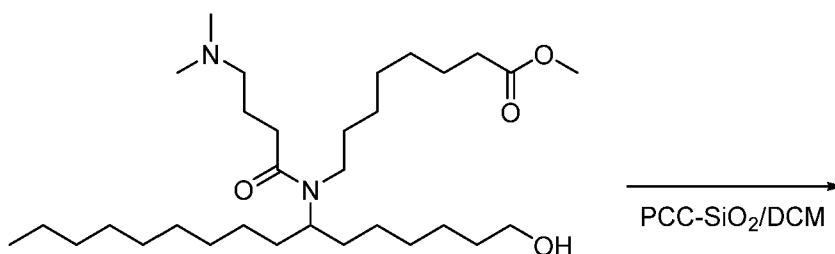


25

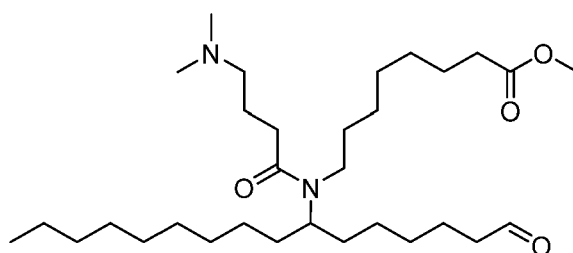


5 Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-(1-(oxan-2-iloxi)hexadecan-7-il)butanamido]octanoato de metilo (3,5 g, 5,7 mmol) y pTsOH-H₂O (109 mg, 0,57 mmol) en MeOH a TA durante 2,5 h. La reacción se concentró al vacío, dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamido]octanoato de metilo (5,06 g) que se usó sin purificación.

Etapla 4. Síntesis de 8-[4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamido]octanoato de metilo

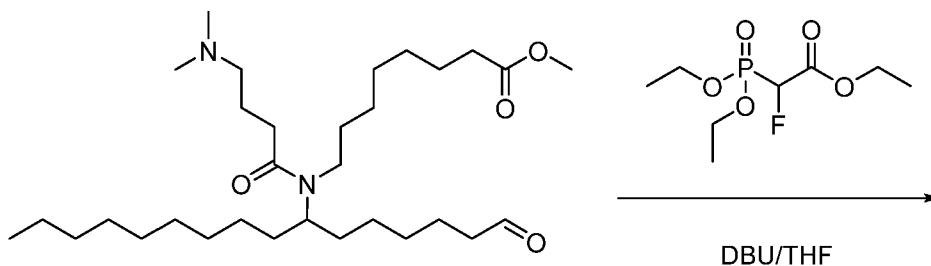


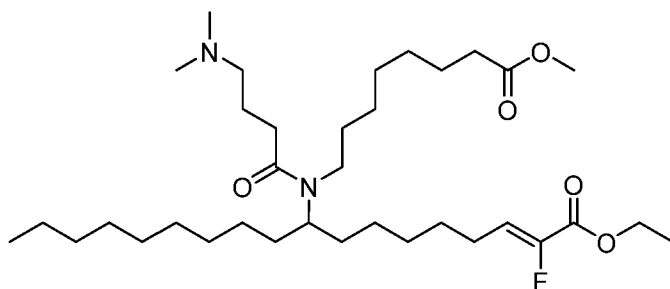
10



15 Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-(1-hidroxihexadecan-7-il)butanamido]octanoato de metilo (3,02 g, 5,73 mmol) y PCC-SiO₂ (1:1) (4,3 g, 10,0 mmol) en DCM a TA durante 16 h. Se añadió MeCN y la reacción se filtró a través de sílice eluyendo con MeCN/DCM a 1:1. El filtrado se concentró al vacío, el residuo se tomó en EtOAc y se filtró a través de celite. El filtrado se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-50 % de ACN/DCM), dando 8-[4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamido]octanoato de metilo (1,79 g, 59,3 %)

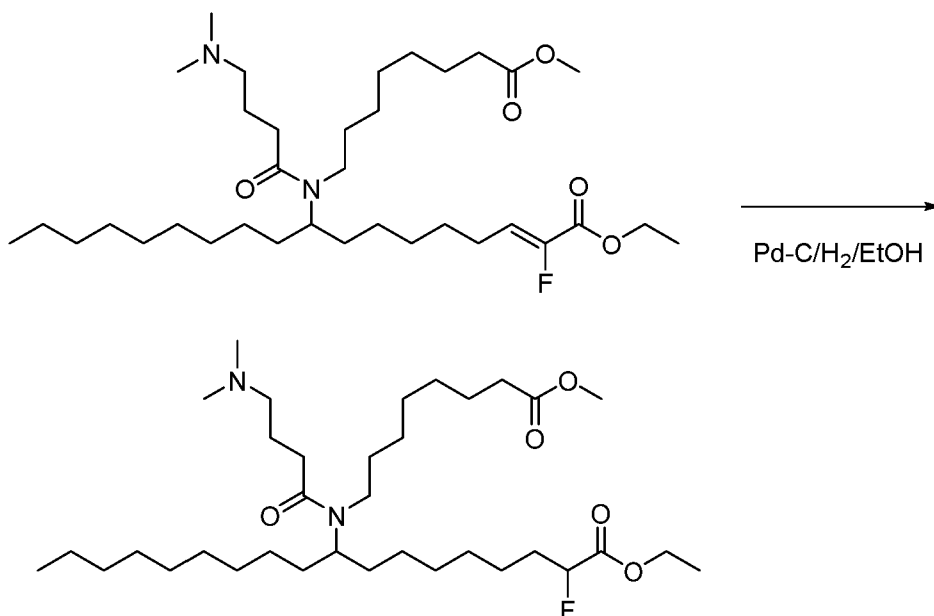
20 **Etapla 5. Síntesis de (2Z)-9-[4-(dimetilamino)-N-(8-metoxi-8-oxooctil)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo**





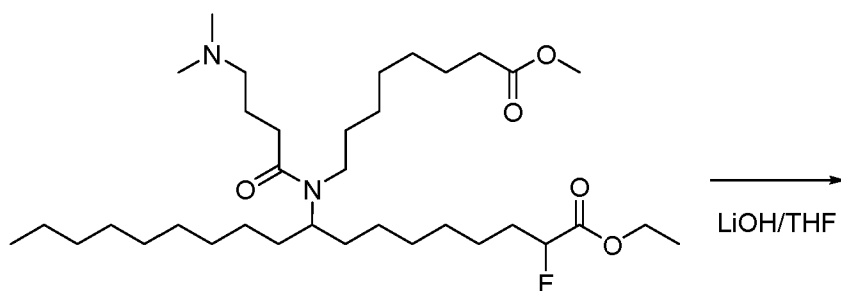
Se agitaron 8-[4-(dimetilamino)-N-(1-oxohexadecan-7-il)butanamido]octanoato de metilo (1,79 g, 3,4 mmol), 2-(dietoxifosforil)-2-fluoroacetato de etilo (1,4 g, 6,0 mmol) y DBU (0,9 ml, 6,0 mmol) en THF a TA durante 16 h. La reacción se concentró al vacío y el residuo se recogió en EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃ y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-100 % de EtOAc/Hex y 0-15 % de MeOH/DCM), dando la síntesis de (2Z)-9-[4-(dimetilamino)-N-(8-metoxi-8-oxooctil)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (626 mg, 30,0 %)

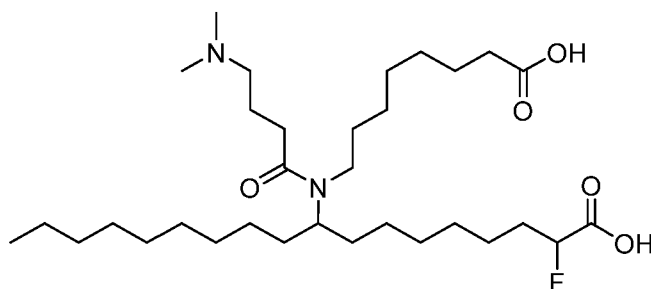
Etapa 6. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-(8-metoxi-8-oxooctil)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo



Se sometió (2Z)-9-[4-(dimetilamino)-N-(8-metoxi-8-oxooctil)butanamido]-2-fluorooctadec-2-enoato de etilo (620 mg, 1,0 mmol) a hidrogenación catalítica sobre Pd-C en EtOH a TA durante 16 h. La reacción se filtró a través de celite y se concentró al vacío, dando 9-[4-(dimetilamino)-N-(8-metoxi-8-oxooctil)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo (550 mg, 88,4 %) que se usó sin purificación.

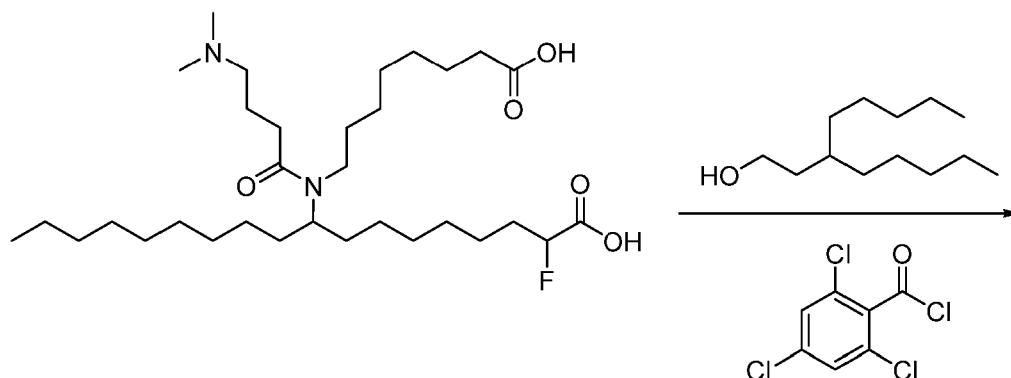
Etapa 7. Síntesis del ácido 9-[N-(7-carboxiheptil)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico



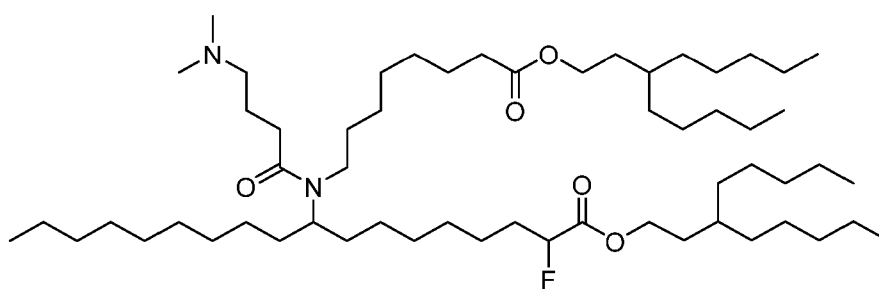


Se agitaron 9-[4-(dimetilamino)-N-(8-metoxi-8-oxooctil)butanamido]-2-fluorooctadecanoato de etilo (550 mg, 0,90 mmol) y LiOH (96 mg, 4,0 mmol) en THF a TA durante 16 h. La reacción se concentró al vacío, se acidificó con HCl 6 M (1,0 ml) y se extrajo en DCM (50 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera y la capa acuosa se extrajo de nuevo con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío, dando ácido 9-[N-(7-carboxiheptil)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (284 mg, 55,4 %) que se usó sin purificación adicional.

10 **Etapas 8. Síntesis de 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentilooctil)oxi]-octil}butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentilooctilo (88)**



DMAP/DCM

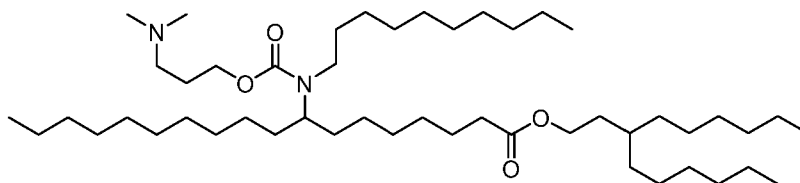


(88)

Se combinaron ácido 9-[N-(7-carboxiheptil)-4-(dimetilamino)butanamido]-2-fluorooctadecanoico (275 mg, 0,48 mmol), 3-pentilooctan-1-ol (289 mg, 1,44 mmol), cloruro de 2,4,6-triclorobenzoyl (351 mg, 1,44 mmol) y DMAP (235 mg, 1,92 mmol) a 0 °C en DCM (10 ml). La reacción se agitó durante 16 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción se concentró al vacío y el residuo se recogió en EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución sat. de NaHCO₃ y salmuera, se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando 9-[4-(dimetilamino)-N-{8-oxo-8-[(3-pentilooctil)oxi]-octil}butanamido]-2-fluorooctadecanoato de 3-pentilooctilo (88) (211 mg, 46,9 %). RMN de ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,23 (td, J = 7,1, 2,1 Hz, 2H), 4,10 (td, J = 7,1, 4,0 Hz, 2H), 3,09-3,01 (m, 2H), 2,33 (dt, J = 23,1, 7,3 Hz, 9H), 1,69-1,53 (m, 11H), 1,38-1,18 (m, 57H), 0,95-0,86 (m, 15H). RMN de ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ (-191,67)-(-192,07) (m).

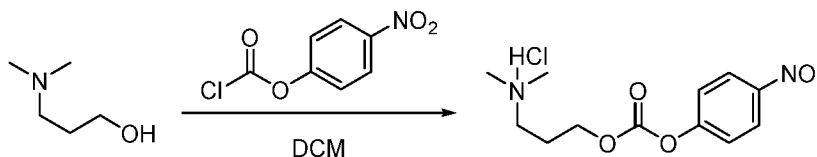
Ejemplo 28. Síntesis de 8-(decil((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)-amino)octadecanoato de 3-hexilnonilo

(105)



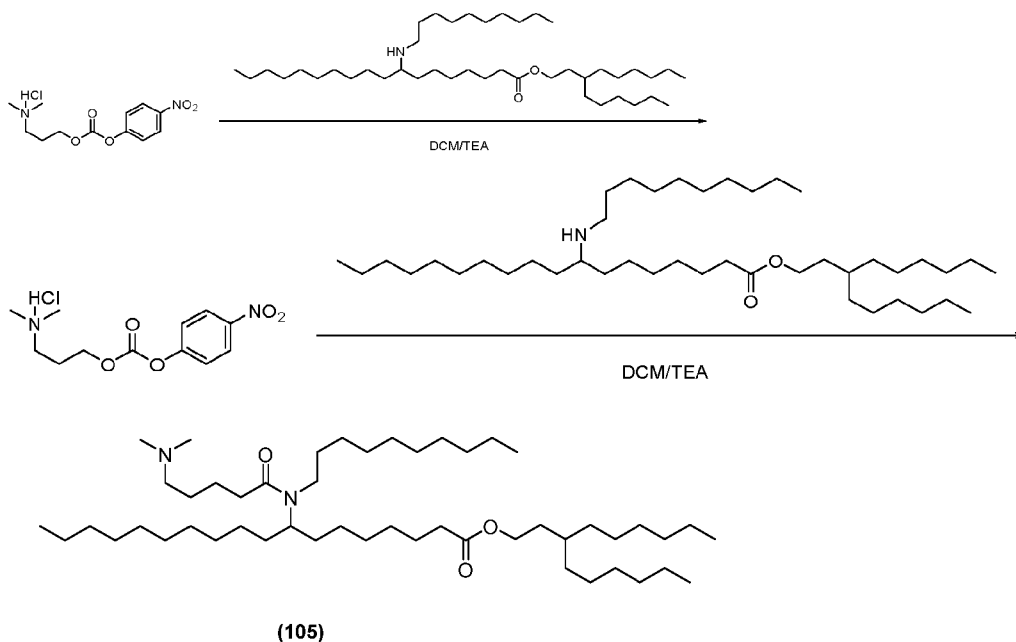
(105)

5 **Etapla 1: Síntesis de clorhidrato de (4-nitrofenil)carbonato de 3-(dimetilamino)propilo**



10 Se añadió gota a gota 3-(dimetilamino)propan-1-ol (2,5 g, 24,2 mmol) en DCM (20 ml) a una solución agitada de cloroformiato de 4-nitrofenilo (4,9 g, 24,2 mmol) en DCM (80 ml) a 0 °C. La reacción se agitó durante 16 h dejando que se calentara a TA. El disolvente se eliminó al vacío, dando clorhidrato de 3-(dimetilamino)propil(4-nitrofenil)carbonato (5,3 g, 70,9 %) como una mezcla en bruto que se usó sin purificación adicional.

15 **Etapla 2: Síntesis de 8-(N-decil-5-(dimetilamino)pentanamido)octadecenoato de 3-hexilnonilo (105)**



(105)

20 Se agitaron 8-(decilamino)octadecanoato de 3-hexilnonilo (0,61 g, 0,94 mmol), trietilamina (0,29 g, 2,82 mmol) y clorhidrato de 3-(dimetilamonio)propilcarbonato de 4-nitrofenilo (0,36 g, 1,18 mmol) en DCM a TA durante 16 horas. Se añadieron adicionalmente 1 eq de clorhidrato de carbonato de 3-(dimetilamino)propil 4-nitrofenilo y trietilamina con DMAP (cat) y la reacción se calentó a reflujo durante 16 h. El disolvente se extrajo al vacío y el residuo se recogió en hexanos, se filtró y se concentró. El aceite resultante se trata en DCM y se añade cloruro de decanoilo (90 mg, 0,5

25 eq.) y se agita durante 15 minutos. La reacción se concentró al vacío, se diluyó con éter dietílico, se lavó con solución saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida automatizada (0-10 % de MeOH/DCM), dando octadecanoato de 3-hexilnonilo 8-[decil([3-(dimetilamino)propoxi]carbonil)amino] (0,30 g, 40,5 %). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4,09 (dt, J = 17,8, 6,7 Hz, 4H), 3,02-2,89 (m, 2H), 2,39 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 2,26 (d, J = 4,5 Hz, 7H), 1,82 (s, 6H), 1,57 (dp, J = 16,8, 8,4 Hz, 4H),

30 1,41 (d, J = 10,5 Hz, 3H), 1,35-1,23 (m, 55H), 0,88 (td, J = 6,8, 1,9 Hz, 12H).

Métodos generales

Formulaciones de nanopartículas lipídicas

5 La solución lipídica contiene 4 componentes: un lípido conjugado con PEG, un lípido ionizable, colesterol y un fosfolípido (p. ej., DSPC). Se prepararon soluciones madre de lípidos utilizando las identidades de lípidos y las proporciones molares descritas, para alcanzar una concentración total de ~7 mg/ml en etanol al 100 %. Se diluyó ARNm de luciferasa de luciérnaga (TriLink Biotechnologies, L-7202) o ARN de ornitina transcarbamilasa (OTC) (TriLink Biotechnologies, diseño personalizado) en acetato, tampón de pH 5 y agua exenta de nucleasas para alcanzar una
10 concentración diana de 0,366 mg/ml de ARNm en acetato 100 mM, pH 5. Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones de lípidos y ácidos nucleicos a un caudal de 400 ml/min a través de un conector en T, y se diluyeron con ~4 volúmenes de PBS, pH 7,4. Las formulaciones se colocaron en unidades de diálisis Slide-N-Lyzer (MWCO 10.000) y se dializaron durante la noche contra Tris 10 mM, NaCl 500 mM, tampón a pH 8. Después de la diálisis, las formulaciones se concentraron a ~0,6 mg/ml utilizando unidades concentradoras VivaSpin (MWCO 100.000) y se
15 dializaron durante la noche contra Tris 5 mM, sacarosa al 10 %, tampón a pH 8. Las formulaciones se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm (membrana de PES). La concentración de ácido nucleico se determinó mediante el ensayo RiboGreen. El tamaño de las partículas y la polidispersidad se determinaron con un Zetasizer Malvern Nano Series.

20 Administración *in vivo* de NPL de luciferasa

Se inyectaron formulaciones de NPL con ARNm de luciferasa de luciérnaga encapsulado por vía intravenosa a 0,5 mg/kg a ratones BALB/c hembra (6-8 semanas de vida). El día de la inyección, las soluciones madre de NPL se filtraron y diluyeron en solución salina tamponada con fosfato hasta alcanzar la concentración de dosificación requerida. A las
25 6 horas de la administración, los animales fueron anestesiados con una dosis letal de ketamina/xilacina. Se recogieron muestras de hígado (lóbulo lateral izquierdo), se pesaron y se ultracongelaron en nitrógeno líquido. Las muestras de hígado se almacenaron en tubos FastPrep® a -80 °C hasta que se analizó la actividad de la luciferasa.

30 Análisis de la actividad luciferasa

Se descongelaron alícuotas congeladas de hígado y se homogeneizaron en 1 ml de 1 x CCLR (Cell Culture Lysis Reagent) utilizando un homogeneizador FastPrep®. A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 16.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se cargaron veinte (20) µl del sobrenadante en una placa blanca de 96 pocillos y se midió la luminiscencia tras añadir el reactivo de luciferasa (Promega Luciferase Assay System). La actividad de la luciferasa
35 se determinó comparando la luminiscencia de las muestras homogeneizadas con patrones de proteína luciferasa. Para tener en cuenta cualquier apagamiento de la luminiscencia por componentes en el homogeneizado de hígado, se añadió luciferasa a los homogeneizados hepáticos de animales no tratados y se midió la luminiscencia resultante. El factor de extinción resultante se aplicó a todas las muestras para obtener la actividad luciferasa corregida, y se normalizó por unidad de masa de tejido analizado.

40 Administración *in vivo* de NPL con OTC

Se inyectaron formulaciones de NPL con ARNm de ornitina transcarbamilasa encapsulado por vía intravenosa a los niveles de dosis especificados a ratones C57BL/6 machos (de 6 a 8 semanas de vida). El día de la inyección, las
45 soluciones madre de NPL se filtraron y diluyeron en solución salina tamponada con fosfato hasta alcanzar la concentración de dosificación requerida. A las 24 horas de la administración, los animales fueron anestesiados con una dosis letal de ketamina/xilacina. Se recogieron muestras de hígado (lóbulo lateral izquierdo), se pesaron y se ultracongelaron en nitrógeno líquido. Las muestras de hígado se almacenaron en tubos FastPrep® a -80 °C hasta que se analizó la expresión de OTC.

50 Análisis de la expresión de la OTC humana

Se prepararon homogeneizados de hígado con PBS, cóctel de inhibidores de la proteasa Halt y la homogeneización FastPrep, estandarizada a 2 mg/ml de proteína con un ensayo de proteínas BCA, y analizada a continuación mediante
55 ELISA. Resumiendo, las muestras se diluyeron con PBS y se sembraron en placas Nunc Maxisorp. Se preparó una curva patrón utilizando la proteína humana PROTEÍNA 1 a partir de los controles de animales sin exposición previa (vehículo). Tras 2 h de incubación, se lavaron las placas y se añadió el anticuerpo primario. Después de 1 h de incubación, se añadió el anticuerpo secundario y se incubó durante otra hora. Después del lavado, se añadió sustrato TMB para el desarrollo del color y se topó la reacción con ácido sulfúrico 2 N. La placa se leyó a una DO 450/570.

60 Administración *in vivo* de NPL con EGFP

Se inyectaron formulaciones de NPL con ARNm de proteína fluorescente verde mejorada encapsulada por vía intravenosa a 0,5 mg/kg a ratones BALB/c hembra (6-8 semanas de vida). El día de la inyección, las soluciones madre
65 de NPL se filtraron y diluyeron en solución salina tamponada con fosfato hasta alcanzar la concentración de dosificación requerida. A las 24 horas de la administración, los animales fueron anestesiados con una dosis letal de

ketamina/xilacina. Se recogieron muestras de hígado (lóbulo lateral izquierdo), se pesaron y se ultracongelaron en nitrógeno líquido. Las muestras de hígado se almacenaron en tubos FastPrep® a -80 °C hasta que se analizó la expresión de EGFP.

5 Análisis de la expresión de EGFP

Se prepararon homogeneizados de hígado en tampón de extracción celular, se diluyeron y se analizaron mediante ELISA para determinar los niveles de proteína EGFP, según las instrucciones del fabricante (Abeam, kit de ELISA de GFP).

10 Análisis de lípidos de EM-CL

Se trataron tejidos hepáticos con PBS y se homogeneizaron con una máquina FastPrep, 3 ciclos de 5 m/s x 15 s. Los homogeneizados de los animales de control tratados con PBS se agruparon y usaron para la preparación de la curva patrón. Las muestras se extrajeron en una placa de pocillos profundos con 250 µl de un patrón interno de idoneidad. Las placas se centrifugaron durante 15 min a 4 °C y 2000 rpm. Los análisis se realizaron utilizando un QTOF Agilent 6520 acoplado a un UHPLC Agilent 1290, usando separación de CL de fase inversa. La cuantificación de los lípidos ionizables se realizó por EM/EM frente a una curva de calibración mezclada con una matriz en blanco adecuadamente mateada. En la calibración se utilizó una clase similar de lípido sintético como patrón interno.

20 Ejemplo 29. Características de las partículas de las formulaciones NPL que contienen nuevos lípidos ionizables

Todas las formulaciones de NPL que contenían nuevos lípidos ionizables produjeron partículas estables con una elevada eficacia de encapsulación (Tablas 1-7).

El siguiente compuesto, identificado como 13-B43 se incluye a continuación a efectos comparativos:

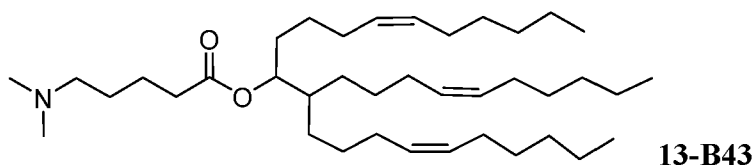


Tabla 1. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de luciferasa y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	70 (0,13)	94
Compuesto 48	71 (0,04)	96
Compuesto 49	61 (0,08)	96
Compuesto 50	61 (0,07)	93
Compuesto 51	62 (0,09)	94
Compuesto 52	72 (0,05)	95

Tabla 2. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de luciferasa y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	72 (0,03)	99
Compuesto 53	106 (0,07)	97

(continuación)

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
Compuesto 21	77 (0,03)	98
Compuesto 22	74 (0,04)	98
Compuesto 40	87 (0,05)	98
Compuesto 55	94 (0,17)	98
Compuesto 58	81 (0,13)	99
Compuesto 56	97 (0,10)	96
Compuesto 25	78 (0,03)	99

Tabla 3. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de luciferasa y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	72 (0,06)	99
Compuesto 59	82 (0,07)	99
Compuesto 54	82 (0,05)	97
Compuesto 57	84 (0,03)	80
Compuesto 32	85 (0,02)	99
Compuesto 4	82 (0,03)	99
Compuesto 3	91 (0,05)	99
Compuesto 60	73 (0,05)	99
Compuesto 61	76 (0,05)	99
Compuesto 62	67 (0,08)	98
Compuesto 23	69 (0,06)	97
Compuesto 24	72 (0,08)	96

5

Tabla 4. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de luciferasa y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	72 (0,07)	98
Compuesto 35	85 (0,06)	99
Compuesto 36	81 (0,04)	96
Compuesto 37	73 (0,05)	82
Compuesto 26	97 (0,03)	98
Compuesto 27	86 (0,04)	98
Compuesto 28	90 (0,20)	95
Compuesto 78	65 (0,03)	99
Compuesto 79	65 (0,06)	99

Tabla 5. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de luciferasa y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	69 (0,06)	98
Compuesto 44	68 (0,06)	98
Compuesto 63	70 (0,03)	99
Compuesto 64	84 (0,00)	99
Compuesto 42	65 (0,10)	97
Compuesto 2	81 (0,08)	96
Compuesto 1	77 (0,04)	99
Compuesto 29	80 (0,02)	98
Compuesto 67	77 (0,04)	99
Compuesto 30	79 (0,03)	98
Compuesto 41	70 (0,04)	94
Compuesto 31	79 (0,04)	98
Compuesto 68	67 (0,06)	99
Compuesto 80	75 (0,08)	99
Compuesto 81	73 (0,06)	99
Compuesto 82	64 (0,03)	99
Compuesto 83	75 (0,08)	96

5 Tabla 6. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de luciferasa y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	77 (0,07)	99
Compuesto 84	80 (0,04)	98
Compuesto 85	84 (0,03)	99
Compuesto 43	73 (0,05)	99
Compuesto 45	83 (0,01)	99
Compuesto 46	72 (0,11)	99
Compuesto 17	68 (0,10)	99
Compuesto 16	76 (0,10)	95
Compuesto 18	73 (0,07)	98
Compuesto 19	71 (0,09)	99
Compuesto 69	68 (0,07)	99
Compuesto 5	68 (0,05)	99

(continuación)

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
Compuesto 65	83 (0,01)	98
Compuesto 71	86 (0,02)	97
Compuesto 72	79 (0,00)	99

Tabla 7. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de luciferasa y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	74 (0,06)	98
Compuesto 73	82 (0,00)	99
Compuesto 47	77 (0,07)	98
Compuesto 76	69 (0,07)	98
Compuesto 74	89 (0,05)	99
Compuesto 33	61 (0,12)	99
Compuesto 75	84 (0,03)	99
Compuesto 20	72 (0,08)	98
Compuesto 39	59 (0,19)	98
Compuesto 87	78 (0,05)	98
Compuesto 66	73 (0,04)	99
Compuesto 34	70 (0,10)	99
Compuesto 88	72 (0,04)	99
Compuesto 86	65 (0,23)	99
Compuesto 77	63 (0,09)	99
Compuesto 38	65 (0,17)	98

5

Ejemplo 30. Rendimiento de las NPL que contienen nuevos lípidos ionizables en un modelo de ratón intravenoso

10 Se compararon formulaciones de NPL con una carga útil de ARNm de luciferasa y diferentes lípidos ionizables nuevos con el control de referencia para la actividad en un modelo de ratón de luciferasa tras la administración intravenosa. A las 6 h de la dosis, las formulaciones lipídicas novedosas mediaron altos niveles de actividad luciferasa en el hígado. Algunos lípidos nuevos presentaron una actividad comparable o superior a la de referencia, mientras que otros no son tan activos como la referencia en este modelo, pero pueden tener utilidad en otras aplicaciones de las NPL (Tablas 8-14).

15

Tabla 8. Actividad luciferasa de 0,5 mg/kg de NPL que contiene ARNm de luciferasa de luciérnaga y varios lípidos ionizables a las 6 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	5,94E+07	1,73E+07

(continuación)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
Compuesto 48	6,49E+06	1,26E+06
Compuesto 49	8,36E+06	1,18E+06
Compuesto 50	4,82E+06	1,06E+06
Compuesto 51	2,50E+07	1,93E+06
Compuesto 52	5,65E+06	1,17E+06

Tabla 9. Actividad luciferasa de 0,5 mg/kg de NPL que contiene ARNm de luciferasa de luciérnaga y varios lípidos ionizables a las 6 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	7,29E+07	9,59E+06
Compuesto 53	8,02E+06	1,36E+06
Compuesto 21	4,58E+07	4,10E+06
Compuesto 22	4,71E+07	8,19E+06
Compuesto 40	3,57E+07	7,78E+06
Compuesto 55	1,22E+06	3,01E+05
Compuesto 58	3,11E+05	7,64E+04
Compuesto 56	9,00E+06	1,82E+06
Compuesto 25	7,76E+06	1,42E+06

5

Tabla 10. Actividad luciferasa de 0,5 mg/kg de NPL que contiene ARNm de luciferasa de luciérnaga y varios lípidos ionizables a las 6 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	7,04E+07	2,41E+07
Compuesto 59	1,12E+06	9,00E+05
Compuesto 54	3,28E+06	8,08E+05
Compuesto 57	2,43E+06	7,28E+05
Compuesto 32	3,07E+07	7,90E+06
Compuesto 4	7,84E+07	1,06E+07
Compuesto 3	5,94E+07	1,18E+07
Compuesto 60	8,23E+06	1,18E+06
Compuesto 61	2,45E+07	6,04E+06
Compuesto 62	7,84E+06	1,51E+06
Compuesto 23	4,44E+06	5,65E+05
Compuesto 24	3,98E+06	6,96E+05

Tabla 11. Actividad luciferasa de 0,5 mg/kg de NPL que contiene ARNm de luciferasa de luciérnaga y varios lípidos ionizables a las 6 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	6,86E+07	1,11E+07
Compuesto 35	1,40E+07	4,66E+06
Compuesto 36	5,54E+06	1,36E+06
Compuesto 37	3,01E+06	2,58E+05
Compuesto 26	2,03E+07	2,75E+06
Compuesto 27	9,17E+06	1,49E+06
Compuesto 28	6,50E+06	8,73E+05
Compuesto 78	5,30E+07	1,18E+07
Compuesto 79	1,05E+07	3,29E+06

5 Tabla 12. Actividad luciferasa de 0,5 mg/kg de NPL que contiene ARNm de luciferasa de luciérnaga y varios lípidos ionizables a las 6 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	7,83E+07	5,16E+06
Compuesto 44	6,17E+07	6,12E+07
Compuesto 63	6,23E+07	1,45E+07
Compuesto 64	9,76E+07	2,26E+07
Compuesto 42	1,14E+07	6,81E+05
Compuesto 2	7,11E+07	5,10E+06
Compuesto 1	1,70E+08	2,64E+07
Compuesto 29	6,74E+07	4,00E+07
Compuesto 67	1,31E+08	2,94E+07
Compuesto 30	3,76E+07	9,34E+06
Compuesto 41	6,69E+06	5,40E+05
Compuesto 31	1,47E+07	2,93E+06
Compuesto 68	4,36E+07	1,00E+06
Compuesto 80	3,28E+07	8,20E+06
Compuesto 81	3,47E+07	4,92E+06
Compuesto 82	1,23E+07	2,69E+06
Compuesto 83	4,59E+07	2,41E+06

Tabla 13. Actividad luciferasa de 0,5 mg/kg de NPL que contiene ARNm de luciferasa de luciérnaga y varios lípidos ionizables a las 6 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	7,60E+07	8,27E+06
Compuesto 84	6,26E+07	2,01E+07
Compuesto 85	4,79E+07	1,30E+07
Compuesto 43	1,04E+08	4,11E+07
Compuesto 45	8,00E+07	1,41E+07
Compuesto 46	1,08E+08	2,22E+07
Compuesto 17	5,52E+07	5,92E+06
Compuesto 16	4,39E+07	1,07E+07
Compuesto 18	4,32E+07	4,15E+06
Compuesto 19	1,25E+06	2,48E+05
Compuesto 69	4,10E+07	7,07E+06
Compuesto 5	9,49E+07	1,06E+07
Compuesto 65	3,88E+07	1,74E+07
Compuesto 71	4,58E+07	4,96E+06
Compuesto 72	2,26E+07	9,80E+06

5 Tabla 14. Actividad luciferasa de 0,5 mg/kg de NPL que contiene ARNm de luciferasa de luciérnaga y varios lípidos ionizables a las 6 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	6 h después de la administración i.v.	
	Actividad Luc (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	6,02E+07	8,72E+06
Compuesto 73	3,64E+07	5,95E+06
Compuesto 47	8,09E+07	4,67E+06
Compuesto 76	2,09E+07	7,52E+06
Compuesto 74	6,77E+07	1,21E+07
Compuesto 75	2,58E+07	3,61E+06
Compuesto 20	2,71E+07	5,48E+06
Compuesto 39	4,30E+06	8,30E+05
Compuesto 87	1,18E+06	5,56E+05
Compuesto 66	2,00E+07	4,53E+06
Compuesto 34	1,91E+06	4,04E+05
Compuesto 88	1,64E+07	7,91E+06
Compuesto 86	1,21E+07	6,99E+06
Compuesto 77	3,26E+07	7,41E+06
Compuesto 38	2,13E+07	8,50E+06

Ejemplo 31. Comportamiento de las NPL que contienen nuevos lípidos ionizables en un estudio de dosis-respuesta tras la administración intravenosa

Se compararon las formulaciones de NPL con una carga útil de ARNm de OTC y diferentes lípidos ionizables novedosos con el control de referencia en cuanto a la actividad en ratones tras la administración intravenosa. A las 24 h de la dosis, las nuevas formulaciones lipídicas indicaron aumentos dependientes de la dosis en la expresión de OTC humana en el hígado (Tabla 15).

Tabla 15. Respuesta a la dosis de NPL que contienen ARNm de OTC humana y varios lípidos ionizables a las 24 h de la administración intravenosa en ratones C57BL/6 macho (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Expresión de OTC humana (ng de OTCh/mg de proteína en el hígado)					
	0,3 mg/kg	DT	1 mg/kg	DT	3 mg/kg	DT
13-B43	908	175	6651	3325	12413	1946
Compuesto 43	1247	404	5713	775	12887	1260
Compuesto 16	1155	330	4127	366	10316	1762
Compuesto 33	660	204	2954	765	11080	3883

Ejemplo 32: Lípido ionizable precursor detectado en el hígado a las 6 horas de la administración intravenosa

Se compararon formulaciones de NPL con una carga útil de ARNm de luciferasa y diferentes lípidos ionizables nuevos con el valor de referencia en cuanto a la cantidad de lípido ionizable que quedaba en el hígado tras la administración intravenosa. A las 6 h de la dosis, algunos grupos de tratamiento registraron niveles más bajos de los lípidos ionizables novedosos en el hígado de ratón en comparación con el valor de referencia (Tablas 16-18). En conjunto, estos lípidos ionizables novedosos muestran una actividad y/o un aclaramiento superiores a los del control.

Tabla 16. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado a las 6 h de la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de luciferasa en ratones BALB/c hembra (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	22,64	5,62
Compuesto 59	22,67	2,58
Compuesto 54	17,78	0,68
Compuesto 57	15,88	1,68
Compuesto 32	21,66	2,21
Compuesto 4	18,97	2,38
Compuesto 3	7,72	0,77
Compuesto 60	35,39	5,02
Compuesto 61	27,21	3,49
Compuesto 62	20,17	4,14
Compuesto 23	31,85	2,88
Compuesto 24	35,16	20,53

Tabla 17. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado a las 6 h de la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de luciferasa en ratones BALB/c hembra (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	43,87	15,72
Compuesto 84	38,96	3,46
Compuesto 85	37,66	10,20
Compuesto 43	25,97	12,36
Compuesto 45	36,39	14,81
Compuesto 46	47,63	16,10
Compuesto 17	24,00	7,00
Compuesto 16	6,32	0,66
Compuesto 18	17,02	3,14
Compuesto 19	20,22	6,27
Compuesto 69	50,57	14,28
Compuesto 5	49,53	33,93
Compuesto 65	27,84	10,74
Compuesto 71	27,52	5,53
Compuesto 72	47,56	12,24

5 Tabla 18. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado a las 6 h de la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de luciferasa en ratones BALB/c hembra (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	63,32	7,62
Compuesto 67	31,32	6,01
Compuesto 17	36,58	20,51
Compuesto 16	17,06	3,48
Compuesto 43	23,83	3,74
Compuesto 73	31,41	4,58
Compuesto 47	54,78	9,98
Compuesto 76	17,86	2,26
Compuesto 74	17,92	1,40
Compuesto 75	20,44	3,29
Compuesto 20	1,82	0,66
Compuesto 39	2,91	0,72
Compuesto 87	3,23	0,64
Compuesto 66	34,35	4,06
Compuesto 34	1,78	0,65
Compuesto 88	7,88	1,49
Compuesto 86	12,79	5,26
Compuesto 77	30,63	5,83
Compuesto 38	3,14	2,44

Ejemplo 33. Aclaramiento de NPL que contienen nuevos lípidos ionizables tras su administración intravenosa

Se compararon formulaciones de NPL con una carga útil de ARNm de OTC y diferentes lípidos ionizables novedosos

con el valor de referencia para el aclaramiento de lípidos en el hígado tras la administración intravenosa. En varios puntos temporales tras la dosis, se evaluaron los niveles de lípidos en el hígado. Algunos lípidos ionizables novedosos indicaron velocidades de aclaramiento más rápidas en comparación con el valor de referencia (Tabla 19).

- 5 Tabla 19. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado tras la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de PTC humana en ratones macho C57BL/6 (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Tiempo después de la dosis (h)	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	0,25	29,17	10,45
	1	46,37	7,13
	3	63,61	9,80
	6	45,23	2,66
	24	40,01	2,93
	168	34,42	3,91
Compuesto 67	0,25	12,37	1,61
	1	21,11	0,44
	3	16,12	1,48
	6	10,82	2,69
	24	11,31	1,80
	168	0,72	0,20
Compuesto 43	0,25	22,97	4,05
	1	38,91	6,47
	3	28,99	2,81
	6	24,19	4,79
	24	13,50	3,24
	168	0,19	0,02
Compuesto 16	0,25	11,11	3,02
	1	15,47	2,03
	3	10,91	1,84
	6	4,71	0,60
	24	1,33	0,43
	168	0,04	0,03
Compuesto 33	0,25	33,97	5,84
	1	98,57	22,91
	3	76,20	14,36
	6	86,57	8,83
	24	58,68	6,57
	168	6,22	0,46

Ejemplo 34. Características de las partículas de las formulaciones NPL que contienen nuevos lípidos ionizables

10

Todas las formulaciones de NPL que contenían nuevos lípidos ionizables produjeron partículas estables con una elevada eficacia de encapsulación (Tablas 20-23).

Tabla 20. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de EGFP y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	75 (0,07)	98
Compuesto 89	83 (0,03)	99
Compuesto 90	79 (0,07)	99
Compuesto 91	85 (0,03)	99

5 Tabla 21. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de EGFP y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	75 (0,08)	97
Compuesto 92	71 (0,09)	99
Compuesto 93	69 (0,02)	98
Compuesto 94	83 (0,06)	98
Compuesto 95	80 (0,08)	96
Compuesto 96	88 (0,05)	99
Compuesto 97	85 (0,07)	99
Compuesto 98	84 (0,06)	99
Compuesto 99	86 (0,04)	97
Compuesto 100	72 (0,08)	98
Compuesto 101	70 (0,10)	100
Compuesto 102	67 (0,09)	98
Compuesto 103	67 (0,09)	98

Tabla 22. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de EGFP y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	73 (0,08)	97
Compuesto 104	74 (0,07)	99
Compuesto 105	82 (0,08)	97
Compuesto 106	73 (0,13)	95
Compuesto 107	76 (0,06)	98
Compuesto 108	80 (0,07)	95
Compuesto 109	75 (0,10)	98
Compuesto 110	67 (0,11)	98

(continuación)

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
Compuesto 111	69 (0,09)	97
Compuesto 112	82 (0,08)	95
Compuesto 113	72 (0,05)	98
Compuesto 114	73 (0,08)	98
Compuesto 115	72 (0,04)	98
Compuesto 116	75 (0,09)	98
Compuesto 117	80 (0,06)	99
Compuesto 118	83 (0,06)	98
Compuesto 119	73 (0,09)	97

Tabla 23. Características de las partículas de las NPL que contienen ARNm de EGFP y nuevos lípidos ionizables para la administración *in vivo*

Porcentajes molares de las NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG2000-C-DMA: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC	Producto final	
	Z promedio (IPD) nm	% de EE
13-B43	76 (0,15)	98
Compuesto 120	69 (0,15)	99
Compuesto 121	77 (0,10)	99
Compuesto 122	70 (0,13)	100
Compuesto 123	73 (0,15)	99

5

Ejemplo 35. Rendimiento de las NPL que contienen nuevos lípidos ionizables en un modelo de ratón intravenoso

Se compararon formulaciones de NPL con una carga útil de ARNm de EGFP y diferentes lípidos ionizables nuevos con el control de referencia para la actividad en un modelo de ratón de EGFP tras la administración intravenosa. A las 24 h después de la dosis, las formulaciones lipídicas novedosas mediaron altos niveles de expresión de EGFP en el hígado. Algunos lípidos nuevos presentaron una actividad comparable o superior a la de referencia, mientras que otros no son tan activos como la referencia en este modelo, pero pueden tener utilidad en otras aplicaciones de las NPL (Tablas 24-27).

15

Tabla 24. Expresión de EGFP de 0,5 mg/kg de NPL que contienen ARNm de EGFP y varios lípidos ionizables a las 24 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	EGFP (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	3,75E+07	1,11E+07
Compuesto 89	2,01E+07	4,14E+06
Compuesto 90	2,12E+07	5,94E+06
Compuesto 91	3,15E+07	1,17E+07

Tabla 25. Expresión de EGFP de 0,5 mg/kg de NPL que contienen ARNm de EGFP y varios lípidos ionizables a las 24 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	EGFP (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	9,74E+04	4,62E+04
Compuesto 92	6,34E+05	1,69E+05
Compuesto 93	1,77E+05	8,03E+04
Compuesto 94	1,20E+06	5,66E+05
Compuesto 95	8,76E+05	2,75E+05
Compuesto 96	1,50E+06	1,60E+05
Compuesto 97	1,48E+06	3,22E+05
Compuesto 98	9,76E+05	2,33E+05
Compuesto 99	1,05E+06	2,26E+05
Compuesto 100	5,98E+05	2,47E+05
Compuesto 101	2,25E+05	3,52E+04
Compuesto 102	1,94E+05	1,26E+05
Compuesto 103	9,54E+04	9,11E+04

5 Tabla 26. Expresión de EGFP de 0,5 mg/kg de NPL que contienen ARNm de EGFP y varios lípidos ionizables a las 24 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	EGFP (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	5,23E+07	1,18E+07
Compuesto 104	7,36E+06	1,26E+05
Compuesto 105	1,86E+07	3,14E+06
Compuesto 106	2,45E+07	5,36E+06
Compuesto 107	3,66E+07	6,62E+06
Compuesto 108	5,41E+07	1,10E+07
Compuesto 109	5,30E+07	5,45E+06
Compuesto 110	4,01E+07	4,19E+06
Compuesto 111	3,89E+07	2,12E+06
Compuesto 112	4,78E+07	8,51E+06
Compuesto 113	3,45E+07	6,79E+06
Compuesto 114	4,29E+07	1,15E+07
Compuesto 115	6,06E+07	9,14E+06
Compuesto 116	2,93E+07	8,42E+06

(continuación)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	EGFP (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
Compuesto 117	3,15E+07	2,86E+06
Compuesto 118	1,86E+07	1,19E+06
Compuesto 119	1,60E+07	1,73E+06

Tabla 27. Expresión de EGFP de 0,5 mg/kg de NPL que contienen ARNm de EGFP y varios lípidos ionizables a las 24 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	EGFP (pg/g de hígado)	Desviación típica (pg/g de hígado)
13-B43	6,46E+07	1,37E+07
Compuesto 120	1,90E+07	5,37E+06
Compuesto 121	3,81E+07	6,70E+06
Compuesto 122	2,35E+07	4,61E+06
Compuesto 123	3,94E+07	4,23E+06

5

Ejemplo 36. Lípido ionizable precursor detectado en el hígado a las 24 horas de la administración intravenosa

Se compararon formulaciones de NPL con una carga útil de ARNm de EGFP y diferentes lípidos ionizables nuevos con el valor de referencia en cuanto a la cantidad de lípido ionizable que quedaba en el hígado tras la administración intravenosa. A las 24 h de la dosis, algunos grupos de tratamiento registraron niveles más bajos de los lípidos ionizables novedosos en el hígado de ratón en comparación con el valor de referencia (Tablas 28-31). En conjunto, estos lípidos ionizables novedosos muestran una actividad y/o un aclaramiento superiores a los del control.

10

Tabla 28. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado a las 24 h de la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de EGFP en ratones BALB/c hembra (n = 4)

15

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	38,48	6,56
Compuesto 89	4,32	0,80
Compuesto 90	13,37	0,36
Compuesto 91	18,58	0,83

Tabla 29. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado a las 24 h de la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de EGFP en ratones BALB/c hembra (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	29,77	4,09
Compuesto 92	8,83	1,83
Compuesto 93	24,61	6,54

(continuación)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
Compuesto 94	6,57	1,14
Compuesto 95	9,44	2,33
Compuesto 96	17,68	1,69
Compuesto 97	19,31	1,44
Compuesto 98	30,21	4,04
Compuesto 99	19,93	2,90
Compuesto 100	5,03	1,03
Compuesto 101	16,30	1,84
Compuesto 102	5,72	1,13
Compuesto 103	0,00	0,00

Tabla 30. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado a las 24 h de la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de EGFP en ratones BALB/c hembra (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	50,86	2,51
Compuesto 104	51,14	15,83
Compuesto 105	18,96	2,32
Compuesto 106	56,97	24,23
Compuesto 107	28,74	4,34
Compuesto 108	3,86	1,02
Compuesto 109	7,32	1,44
Compuesto 110	33,07	3,52
Compuesto 111	17,74	3,63
Compuesto 112	1,73	0,32
Compuesto 113	4,68	1,48
Compuesto 114	12,79	1,71
Compuesto 115	27,15	7,40
Compuesto 116	60,05	7,75
Compuesto 117	49,53	8,08
Compuesto 118	62,81	6,24
Compuesto 119	25,25	4,12

Tabla 31. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado a las 24 h de la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de EGFP en ratones BALB/c hembra (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	24 h después de la administración i.v.	
	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	23,9	7,13
Compuesto 120	4,8	1,33
Compuesto 121	2,1	0,68
Compuesto 122	6,3	1,25
Compuesto 123	10,5	1,23

Ejemplo 37. Comportamiento de las NPL que contienen nuevos lípidos ionizables en un estudio de dosis-respuesta tras la administración intravenosa

Se compararon las formulaciones de NPL con carga útil de ARNm de EGFP y diferentes lípidos ionizables novedosos con el control de referencia en cuanto a la actividad en ratones tras la administración intravenosa. A las 24 h de la dosis, las nuevas formulaciones lipídicas indicaron aumentos dependientes de la dosis en la expresión de EGFP en el hígado (Tabla 32).

Tabla 32. Respuesta a la dosis de NPL que contiene ARNm de EGFP y varios lípidos ionizables a las 24 h de la administración intravenosa en ratones BALB/c hembra (n = 4)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Expresión de EGFP (ng de EGFP/g de hígado)					
	0,3 mg/kg	DT	1 mg/kg	DT	3 mg/kg	DT
13-B43	3,65E+07	6,48E+06	1,88E+08	3,84E+07	4,40E+08	7,11E+07
Compuesto 101	2,65E+07	1,11E+07	1,04E+08	2,70E+07	3,90E+08	5,54E+07
Compuesto 111	1,34E+07	1,88E+06	8,58E+07	4,87E+06	2,48E+08	2,88E+07
Compuesto 115	2,98E+07	2,81E+06	1,31E+08	2,64E+07	3,41E+08	5,46E+07

Ejemplo 38: Aclaramiento de NPL que contienen nuevos lípidos ionizables tras su administración intravenosa

Se compararon formulaciones de NPL con carga útil de ARNm de EGFP y diferentes lípidos ionizables novedosos con el valor de referencia para el aclaramiento de lípidos en el hígado tras la administración intravenosa. En varios puntos temporales tras la dosis, se evaluaron los niveles de lípidos en el hígado. Algunos lípidos ionizables novedosos indicaron velocidades de aclaramiento más rápidas en comparación con el valor de referencia (Tabla 33).

Tabla 33. Lípidos precursores ionizables que quedan en el hígado tras la administración intravenosa de 0,5 mg/kg de NPL con ARNm de EGFP en ratones BALB/c hembra (n = 4)

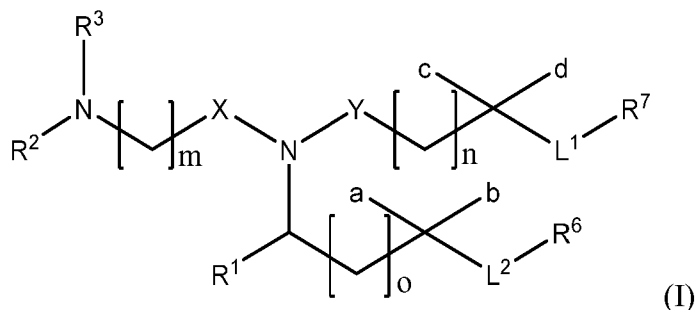
Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Tiempo después de la dosis (h)	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
13-B43	0,25	29,8	2427
	1	31,2	1763
	3	40,2	5235
	6	45,2	2210
	24	26,4	688
	168	25,6	1767

(continuación)

Tratamiento [Proporciones molares de NPL de 1,6:54,6:32,8:10,9, PEG-lípido: Lípido ionizable: Colesterol: DSPC]	Tiempo después de la dosis (h)	Promedio (nmol/g hígado)	DT (nmol/g hígado)
Compuesto 101	0,25	23,8	3753
	1	42,4	2078
	3	26,9	2103
	6	30,6	718
	24	12,6	1727
	168	0,6	35
Compuesto 111	0,25	30,4	1174
	1	43,0	2145
	3	39,1	1934
	6	32,0	1151
	24	12,8	2732
	168	0,0	0
Compuesto 115	0,25	36,7	4930
	1	51,3	7591
	3	44,8	4707
	6	45,3	630
	24	0,0	0
	168	1,3	232

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



o una sal del mismo, en donde:

X es $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$; o $-\text{C}(=\text{O})-$

Y está ausente, o es $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{SO}_2-$ o $-\text{C}(=\text{O})-$;

R^1 es hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^2 es alquilo C_1-C_3 ; y R^3 es alquilo C_1-C_3 ; o R^2 y R^3 , tomados junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un anillo aziridino, azetidino o pirrolidino;

m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

n es 0-15;

o es 0-15;

L^1 está ausente, o es $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^2$ o $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{R}^w$;

L^2 está ausente, o es $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^2$ o $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{R}^x$;

a es H o F;

b es H o F;

c es H o F; y d es H o F; o c y d, tomados junto con el carbono al que están unidos, forman $-\text{C}(=\text{O})-$;

R^4 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^5 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^4 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^5 es H o hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^6 es hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^7 es hidrocarbilo C_2-C_{25} ;

R^w está ausente, o es $-\text{C}(\text{F})\text{H}-$ o $-\text{C}(\text{F})_2-$;

R^x está ausente, o es $-\text{C}(\text{F})\text{H}-$ o $-\text{C}(\text{F})_2-$;

R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo C_2-C_{10} ; y

R^z es fenilo que está sustituido con 1, 2 o 3 grupos seleccionados independientemente de hidrocarbilo C_2-C_{10} .

2. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, en donde:

(i) R^1 es hidrocarbilo C_5-C_{25} , alquilo C_5-C_{25} , alquenilo C_5-C_{25} , 1-nonilo o 1-decilo; y/o

(ii) X es $-\text{CH}_2-$, $-\text{C}(=\text{O})-$ u $-\text{O}-$; y/o

(iii) R^2 es metilo, etilo o propilo; y/o

(iv) R^3 es metilo, etilo o propilo; y/o

(v) m es 1, 2 o 3; y/o

(vi) o es 2-15, 10-15, 2-10 o 2-5; y/o

(vii) L^2 es $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ o $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^2$, y, opcionalmente, en donde L^2 es $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ o $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^2$; y/o

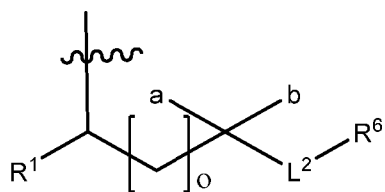
(viii) a es H o F; y/o

(ix) b es H o F; y/o

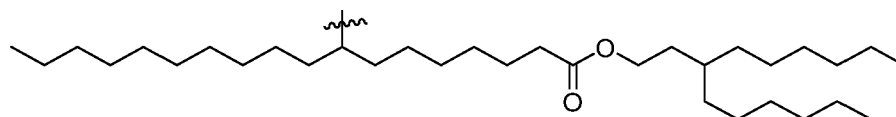
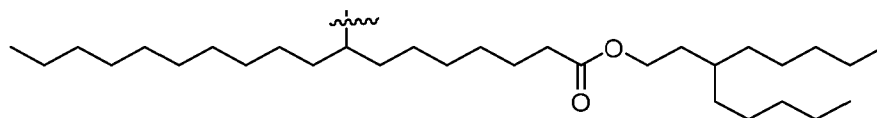
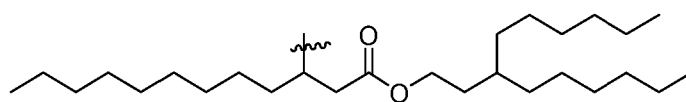
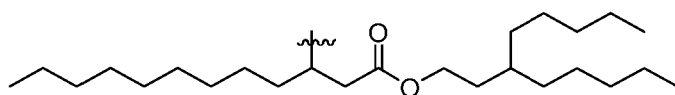
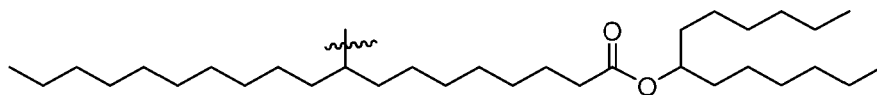
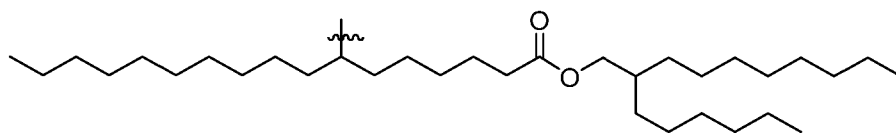
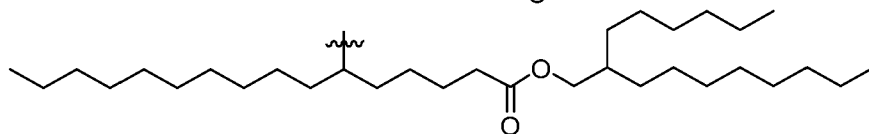
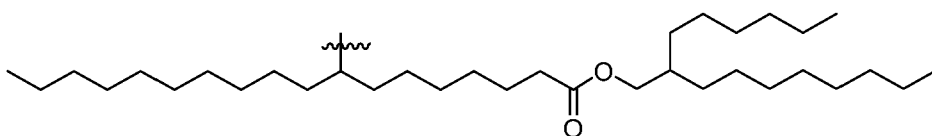
(x) R^6 es hidrocarbilo C_2-C_{25} , hidrocarbilo C_5-C_{25} , alquilo C_2-C_{25} , alquilo C_5-C_{25} o alquenilo C_5-C_{25} .

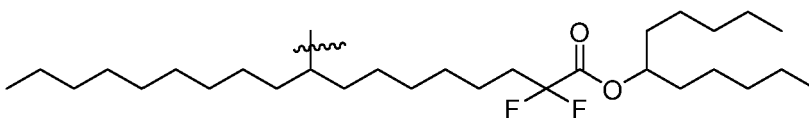
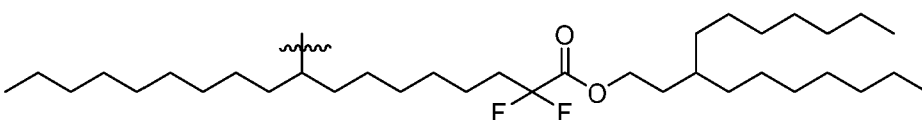
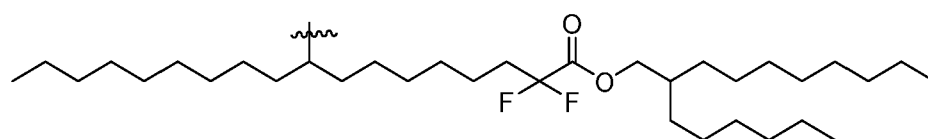
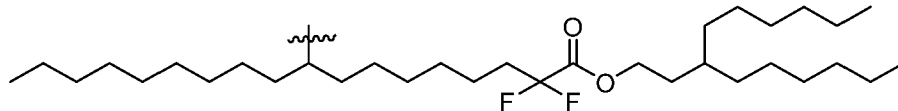
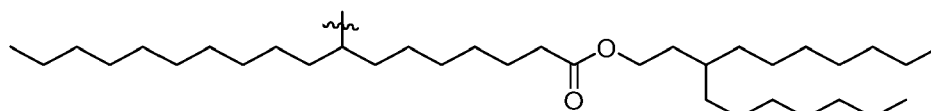
3. El compuesto o la sal de la reivindicación 1 o 2, en donde:

(i)

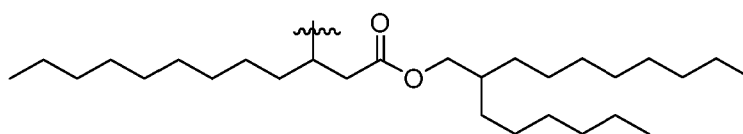
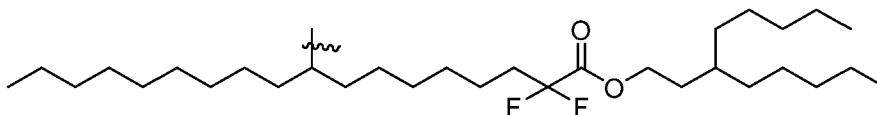


se selecciona del grupo que consiste en

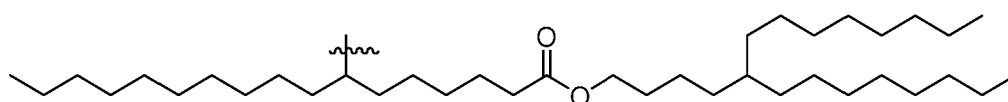
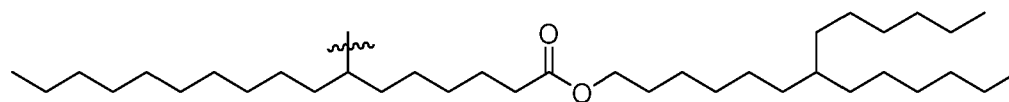
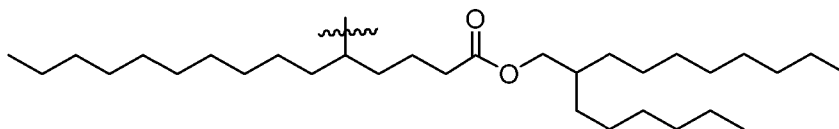
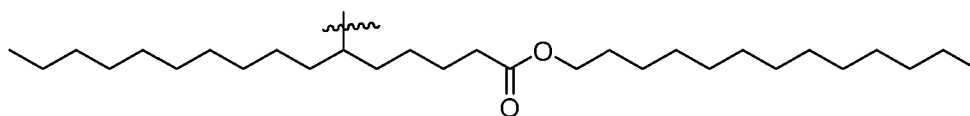




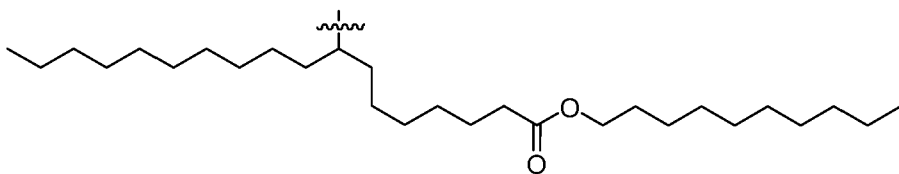
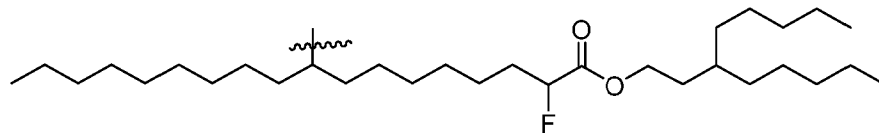
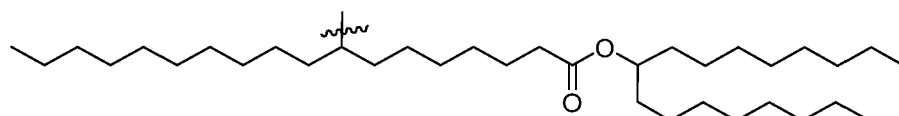
5



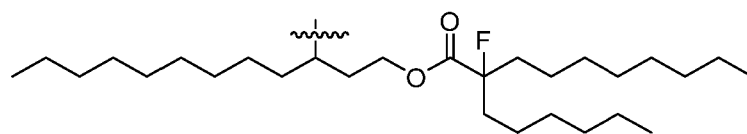
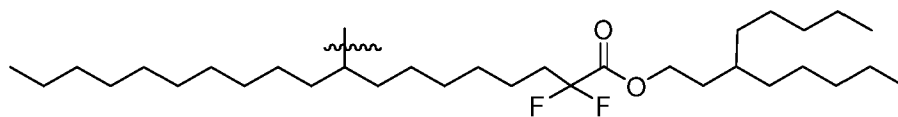
10



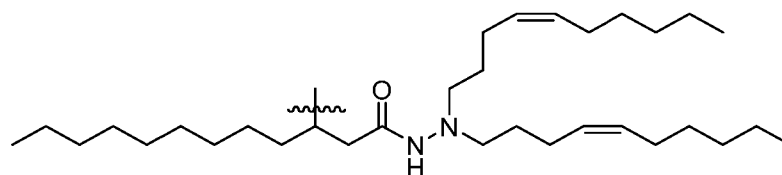
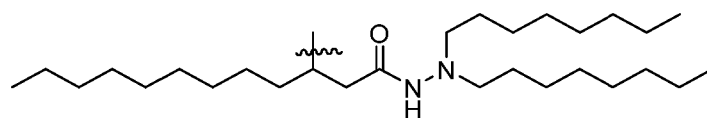
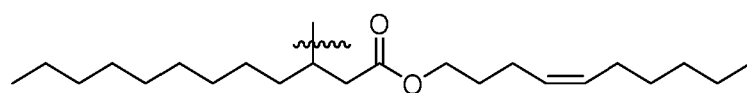
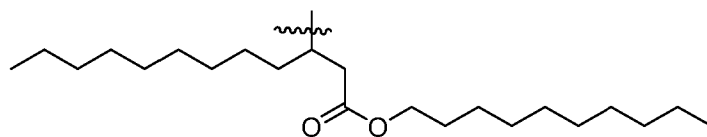
15



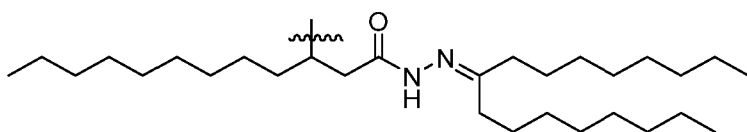
5

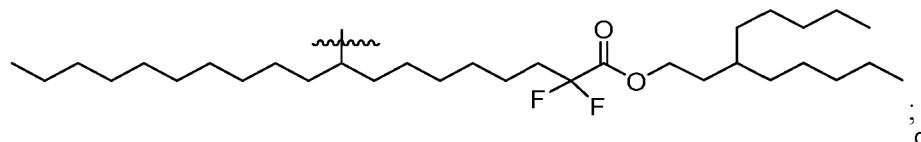
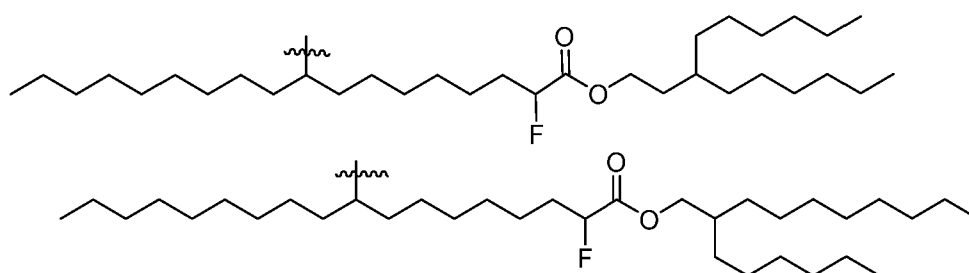
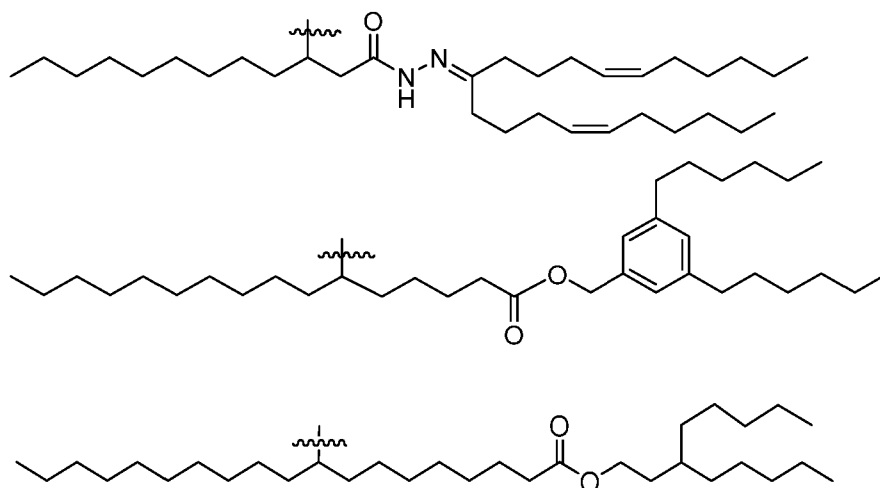


10

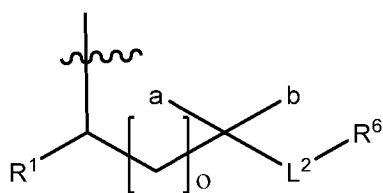


15

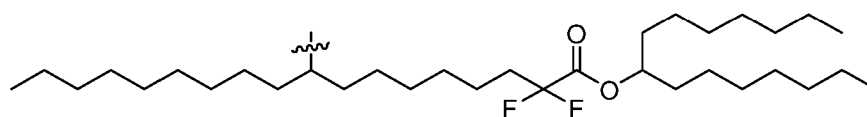
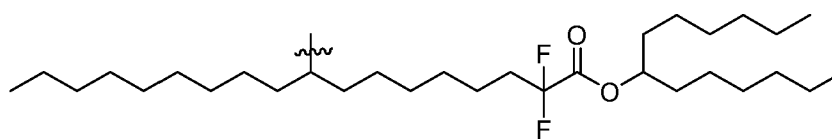


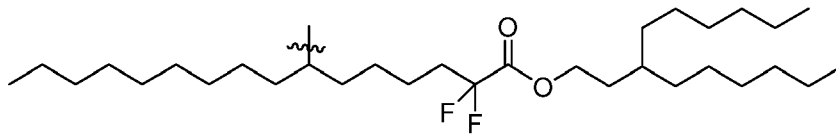
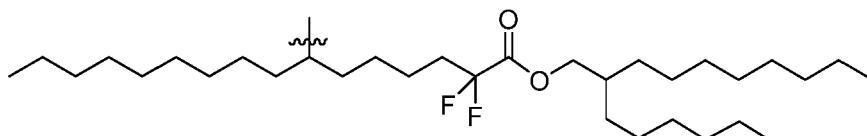
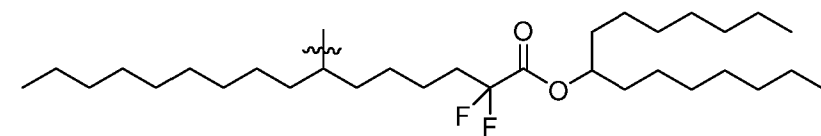


(ii)

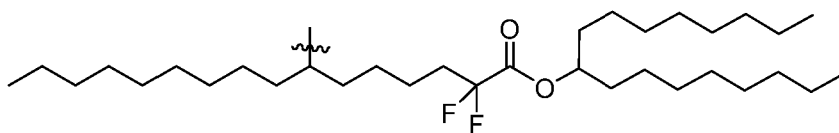
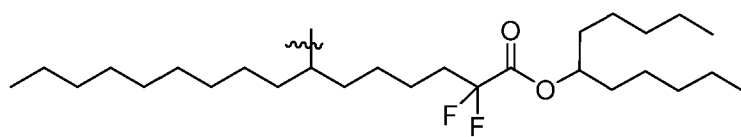
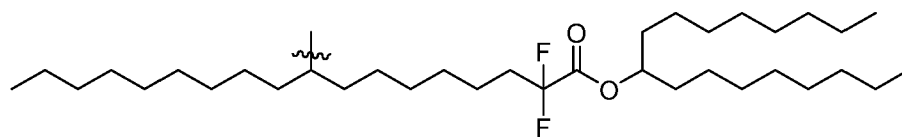


se selecciona del grupo que consiste en:

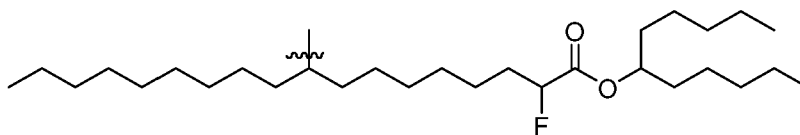
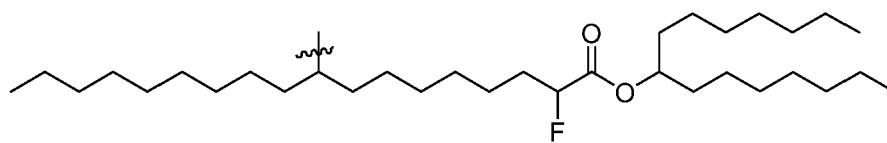




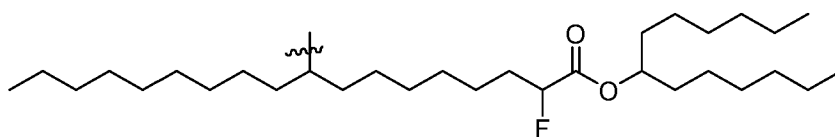
5

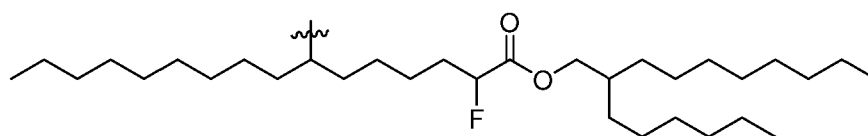
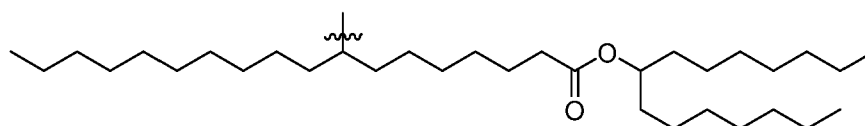
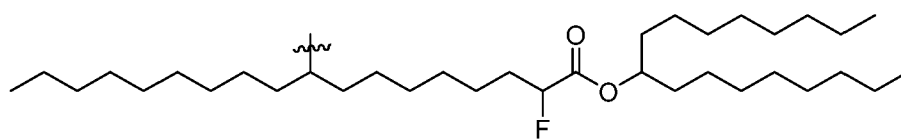


10

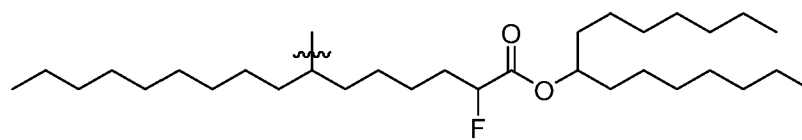
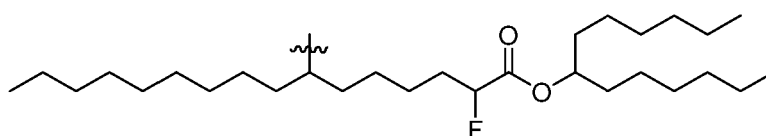


15

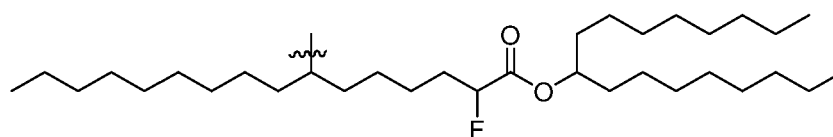




5



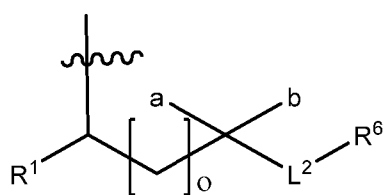
10



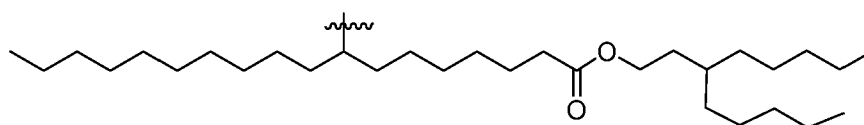
y

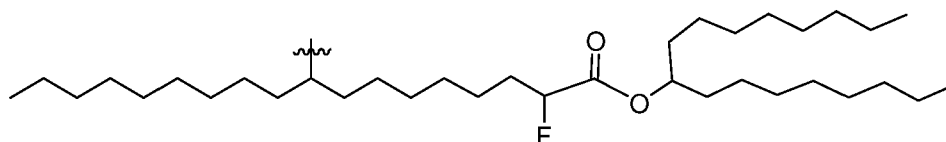
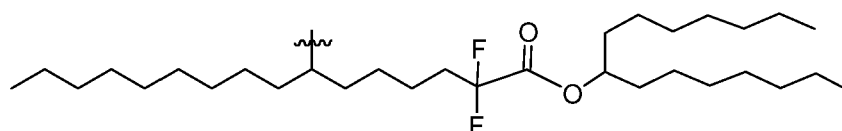
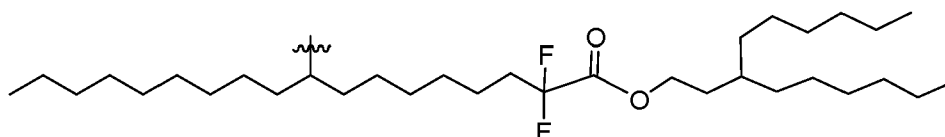
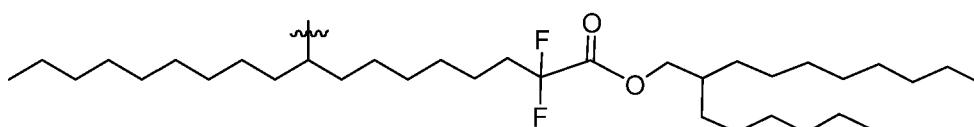
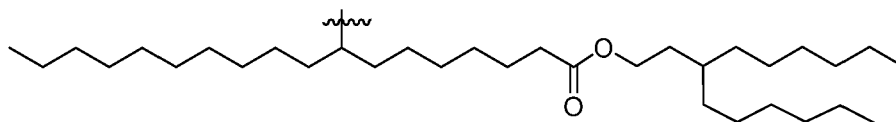
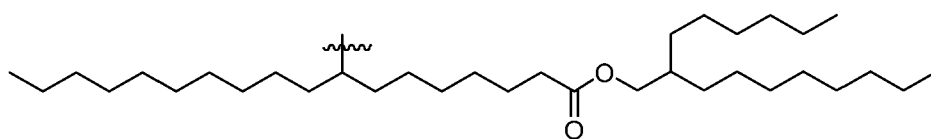
; o

(iii)



15 se selecciona del grupo que consiste en





4. El compuesto o la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:

(i) Y es $-\text{CH}_2-$, $-\text{C}(=\text{O})-$ u $-\text{O}-$; y/o

(ii) n es 2-15, 10-15, 2-10 o 2-5; y/o

(iii)(a) L^1 está ausente; y L^2 es $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ o $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^Z$, o (b) L^1 es $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ o $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^a$; y L^2 está ausente, o (c) L^1 es $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ o $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^a$, o (d) L^1 es $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, L^1 es $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ o L^1 es $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^Z$; y/o

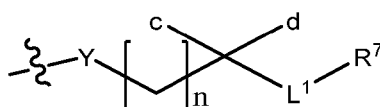
(iv) c es H o F; y/o

(v) d es H o F; y/o

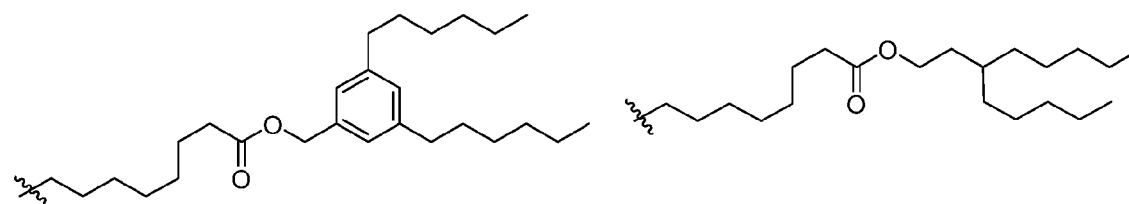
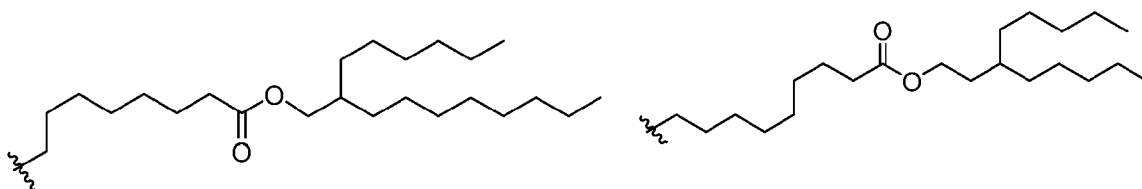
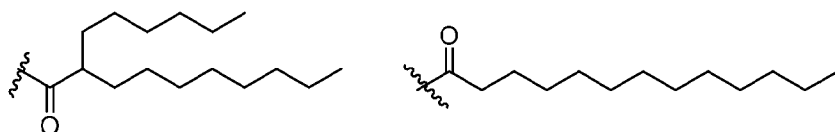
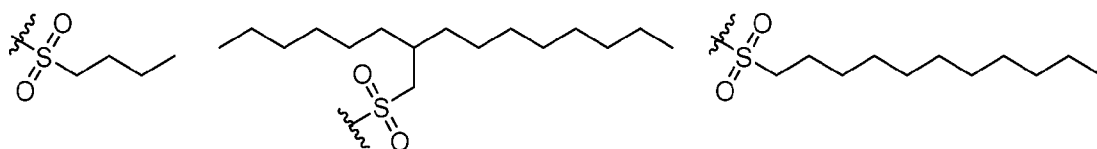
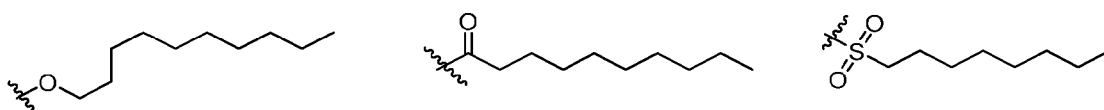
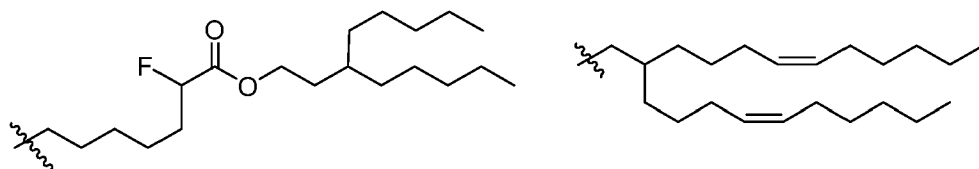
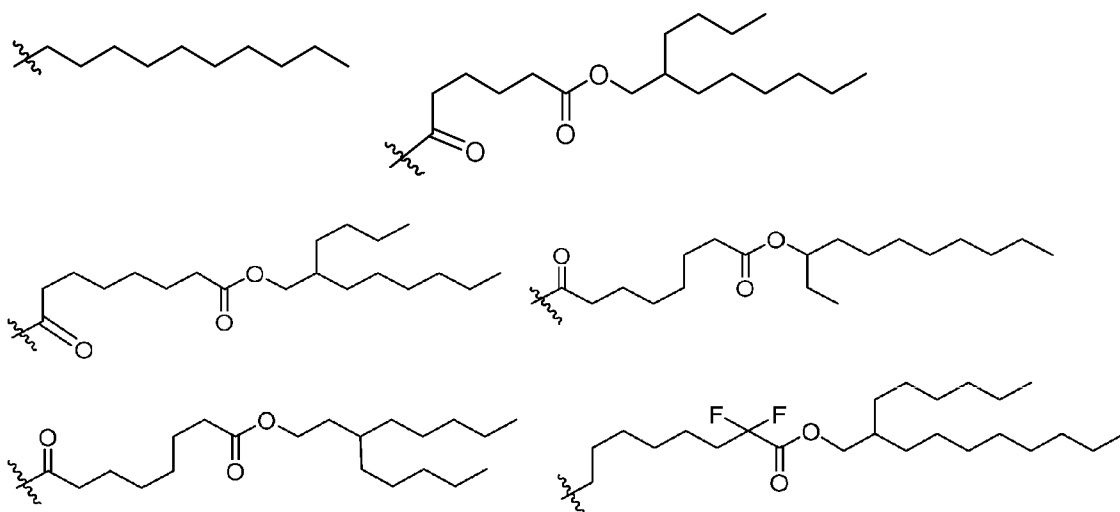
(vi) R^7 es hidrocarbilo C_2-C_{25} , hidrocarbilo C_5-C_{25} , alquilo C_2-C_{25} , alquilo C_5-C_{25} o alquenilo C_5-C_{25} .

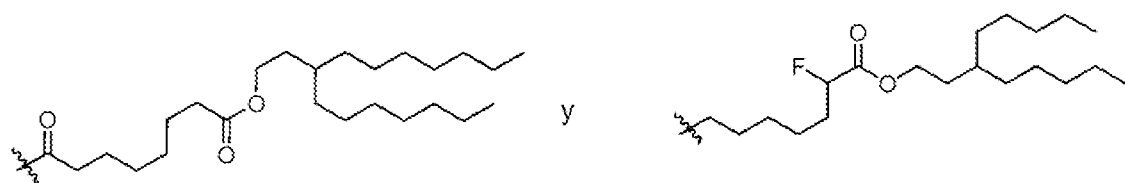
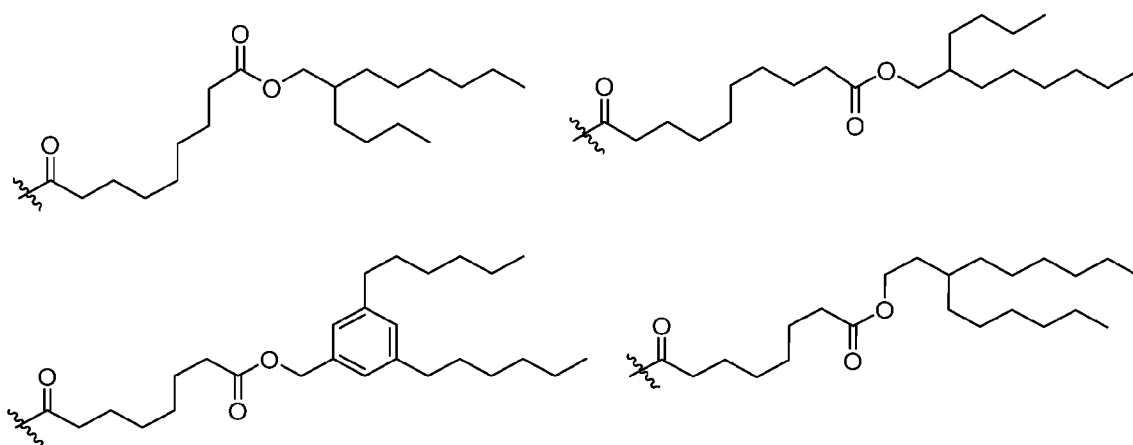
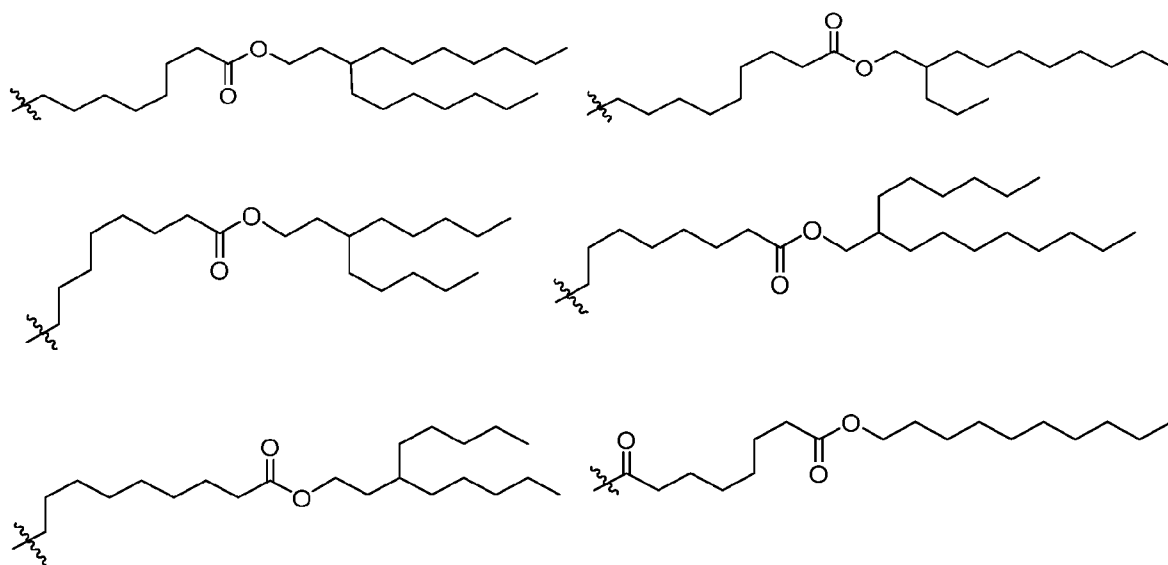
5. El compuesto o la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:

(i)



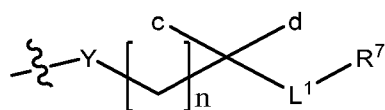
se selecciona del grupo que consiste en



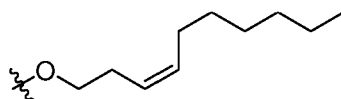


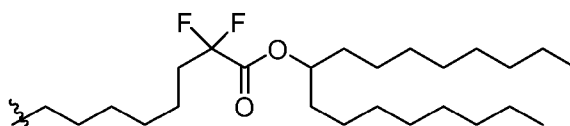
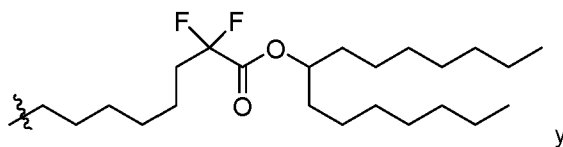
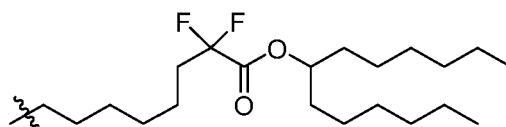
; o

(ii)



15 se selecciona del grupo que consiste en

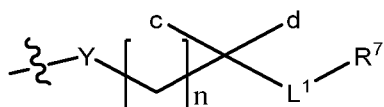




5

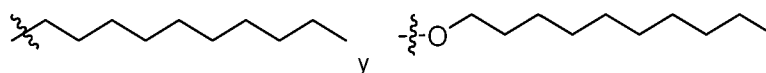
; o

(iii)



se selecciona del grupo que consiste en

10



6. El compuesto o la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:

15

- (i) R^4 es hidrocarbilo C_2-C_{25} , hidrocarbilo C_5-C_{25} , alquilo C_2-C_{25} , alquilo C_5-C_{25} o alqueno C_5-C_{25} ; o
- (ii) R^5 es hidrocarbilo C_2-C_{25} , hidrocarbilo C_5-C_{25} , alquilo C_2-C_{25} , alquilo C_5-C_{25} o alqueno C_5-C_{25} ; o
- (iii) R^z es fenilo que está sustituido con 1 o 2 grupos seleccionados independientemente entre hidrocarbilo C_2-C_{10} , y opcionalmente en donde cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrocarbilo C_5-C_{10} , alquilo C_2-C_{10} , alquilo C_5-C_{10} y alqueno C_5-C_{10} .

20

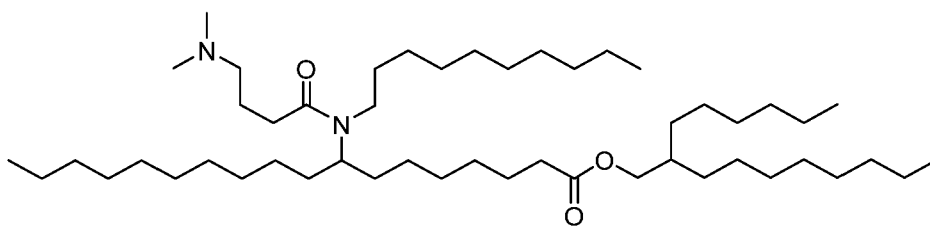
7. El compuesto o la sal de la reivindicación 1 o 2, en donde:

25

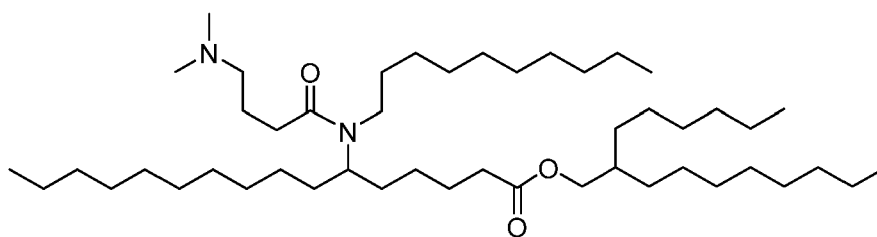
- (i) R^4 es hidrocarbilo C_2-C_{25} , hidrocarbilo C_5-C_{25} , alquilo C_2-C_{25} , alquilo C_5-C_{25} o alqueno C_5-C_{25} ; o
- (ii) R^5 es hidrocarbilo C_2-C_{25} , hidrocarbilo C_5-C_{25} , alquilo C_2-C_{25} , alquilo C_4-C_{25} o alqueno C_5-C_{25} o
- (iii) R^z es fenilo que está sustituido con 1 o 2 grupos seleccionados independientemente entre hidrocarbilo C_2-C_{10} , y opcionalmente en donde cada hidrocarbilo C_2-C_{10} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrocarbilo C_5-C_{10} , alquilo C_2-C_{10} , alquilo C_5-C_{10} y alqueno C_5-C_{10} .

30

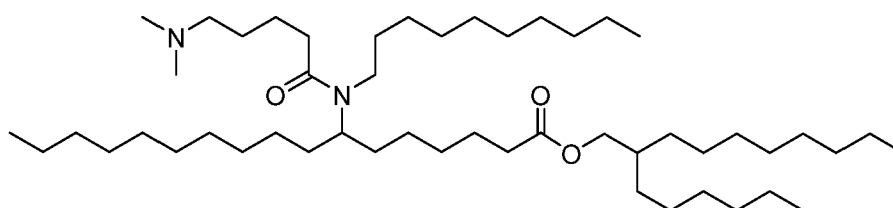
8. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en:



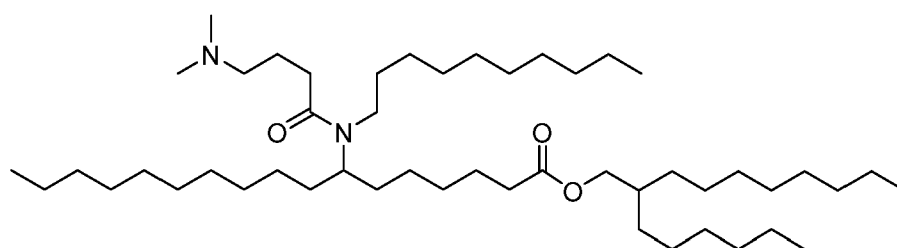
(1)



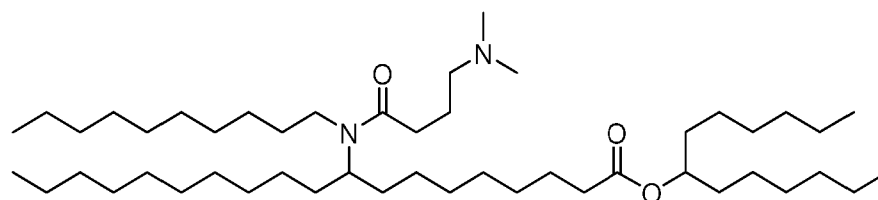
(2)



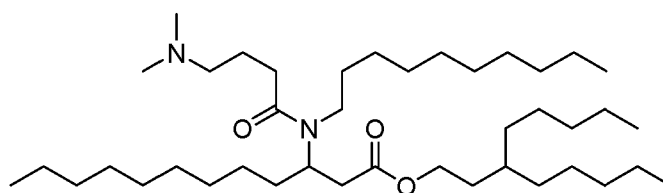
(3)



(4)



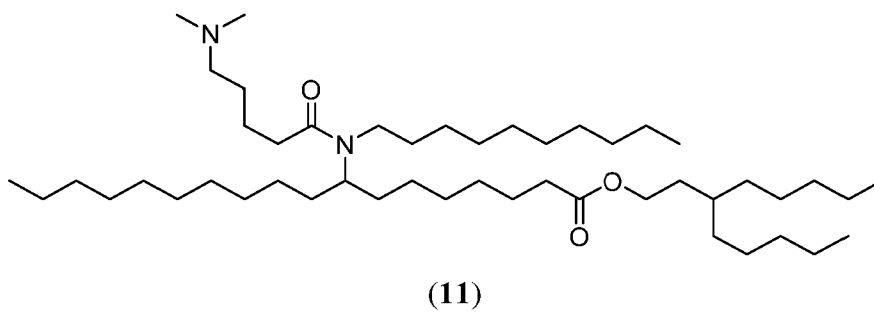
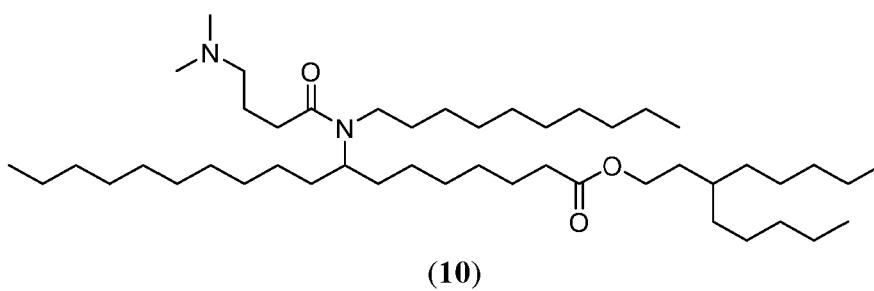
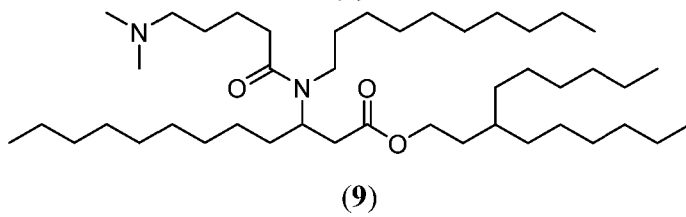
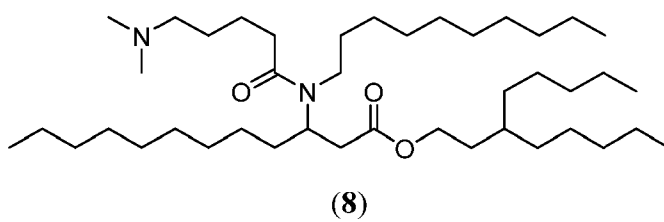
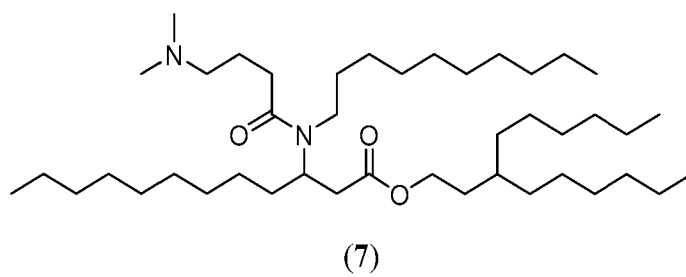
(5)

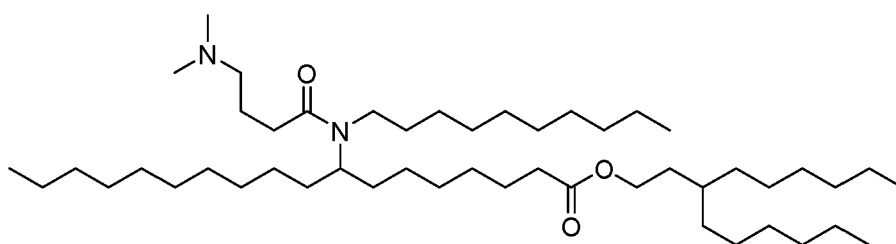


(6)

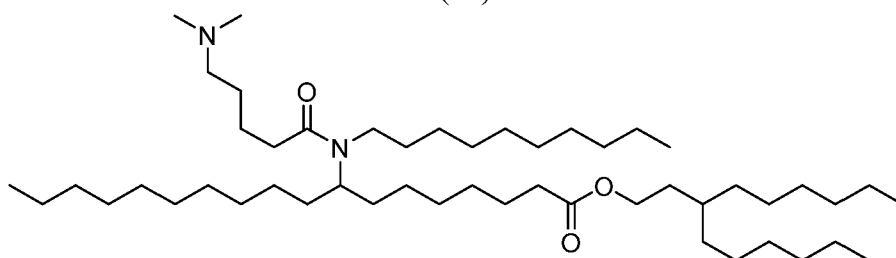
5

10

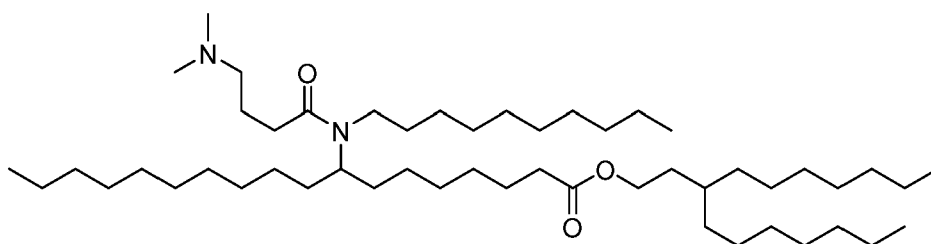




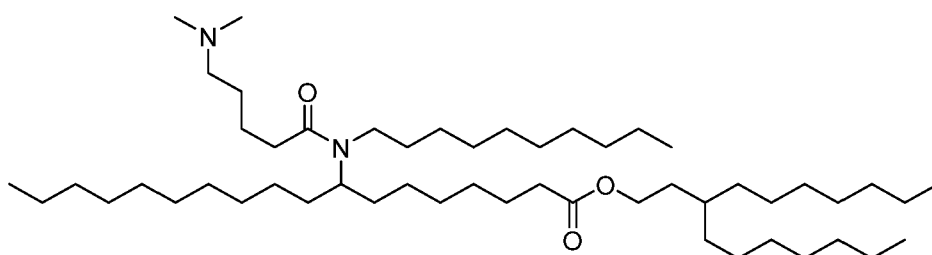
(12)



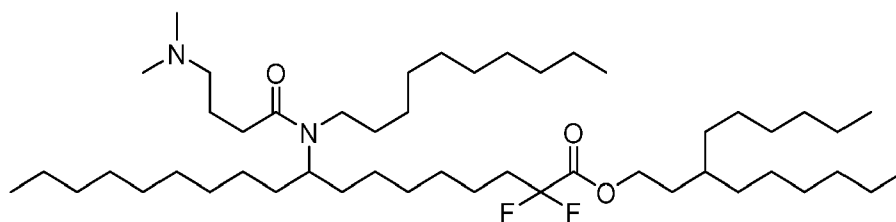
(13)



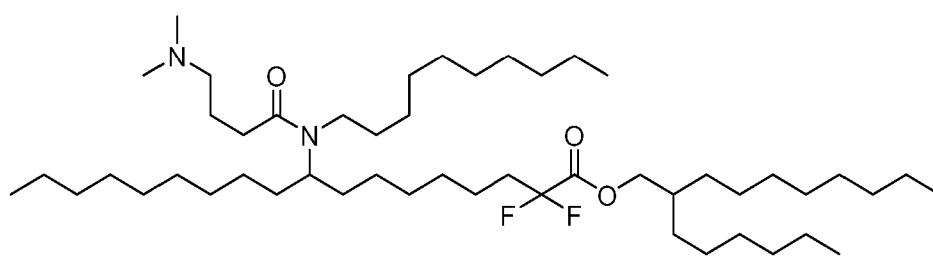
(14)



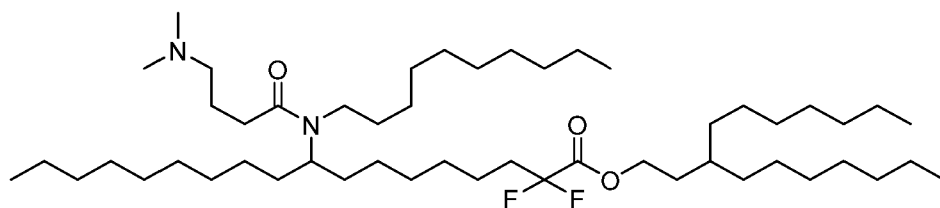
(15)



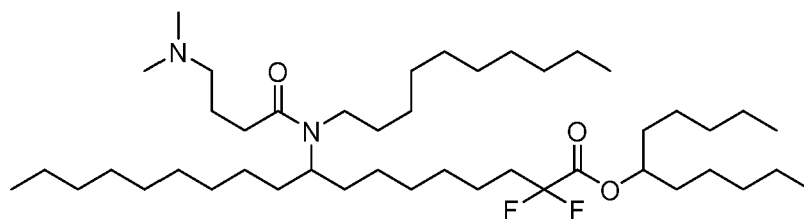
(16)



(17)

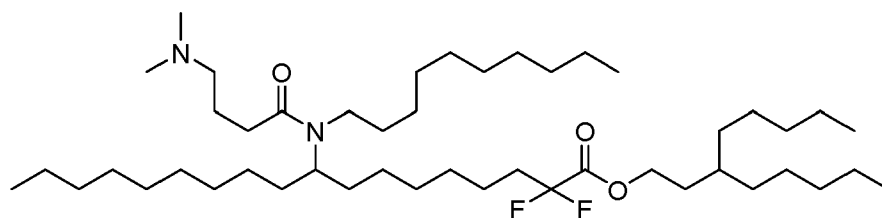


(18)

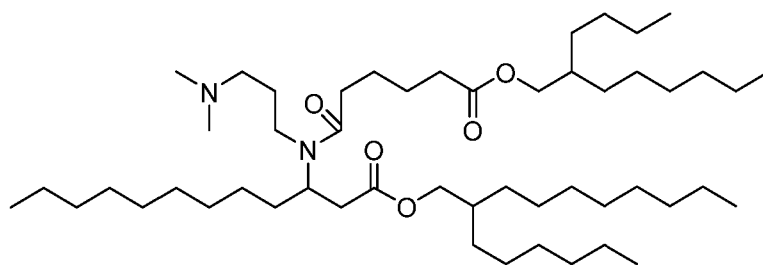


(19)

5

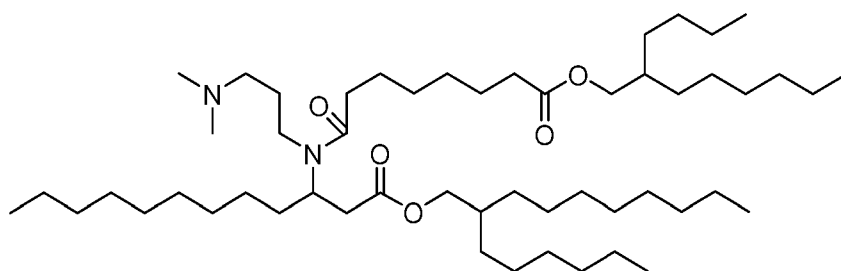


(20)

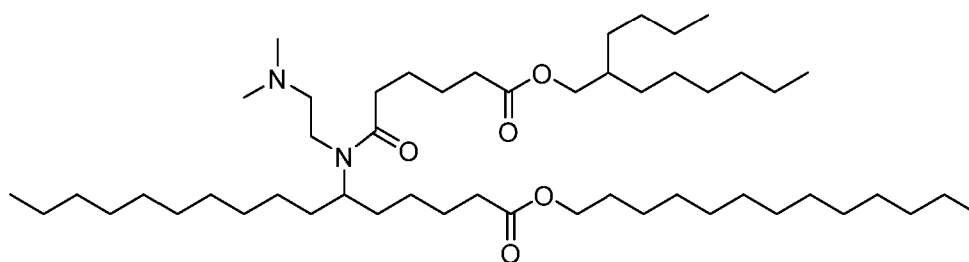


(21)

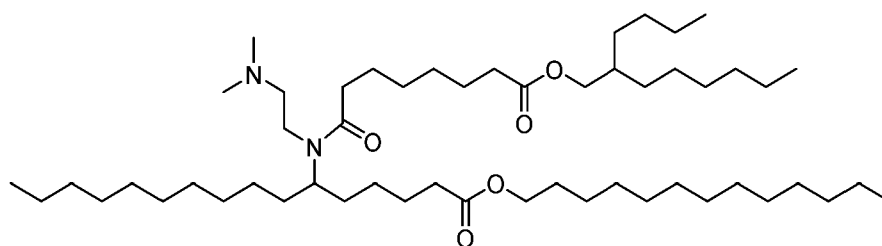
10



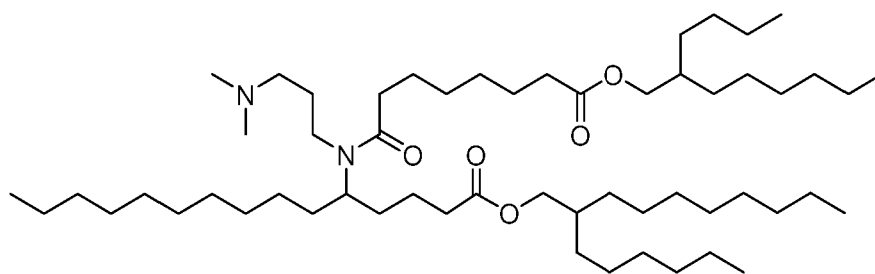
(22)



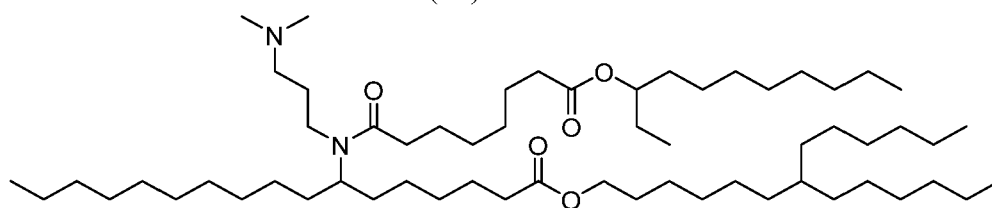
(23)



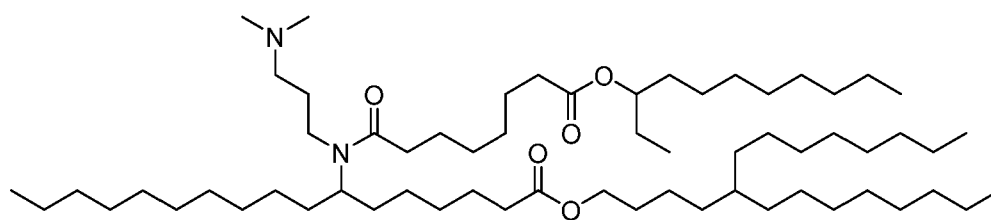
(24)



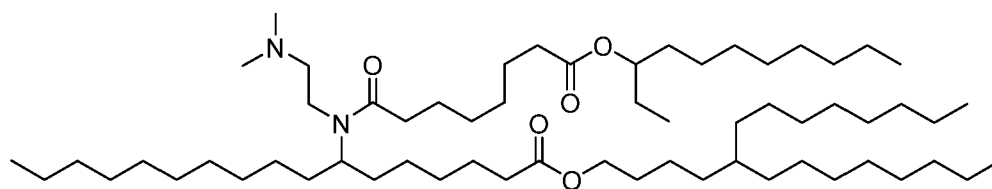
(25)



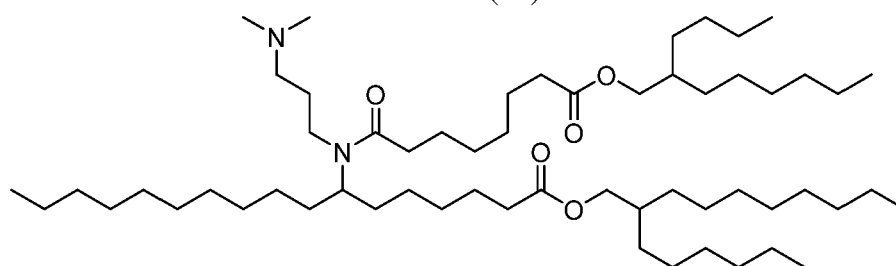
(26)



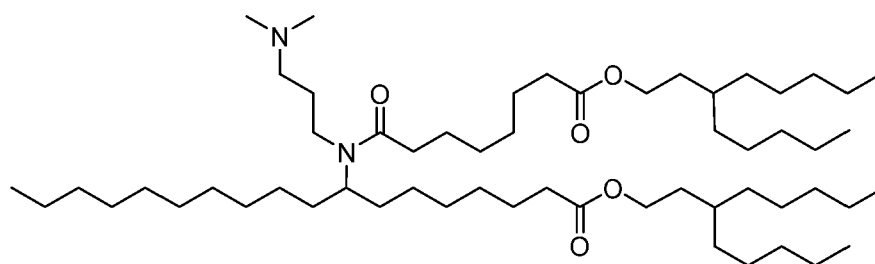
(27)



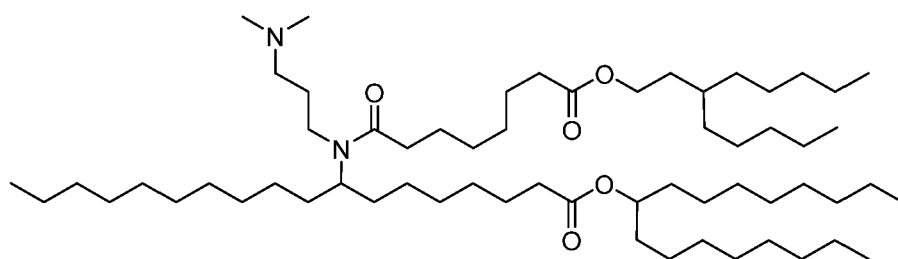
(28)



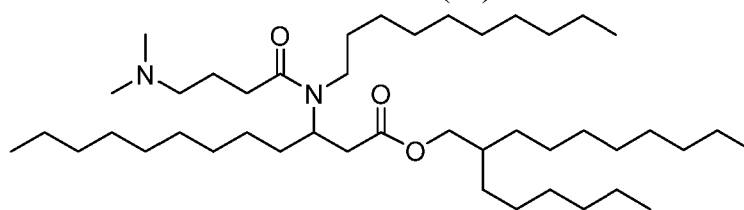
(29)



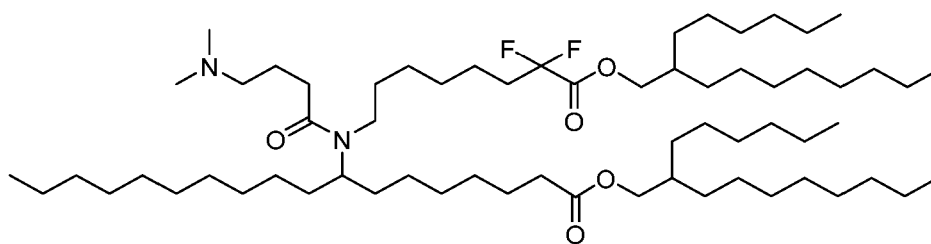
(30)



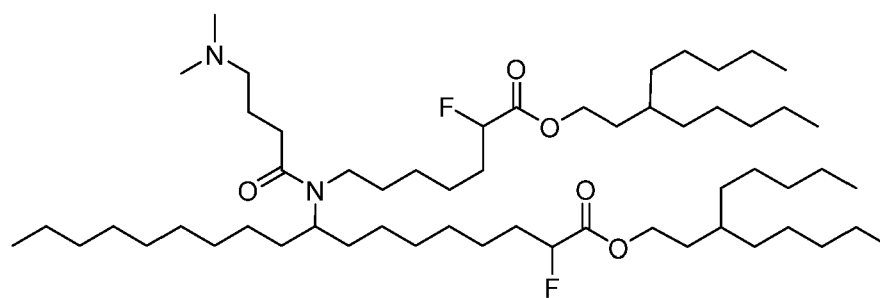
(31)



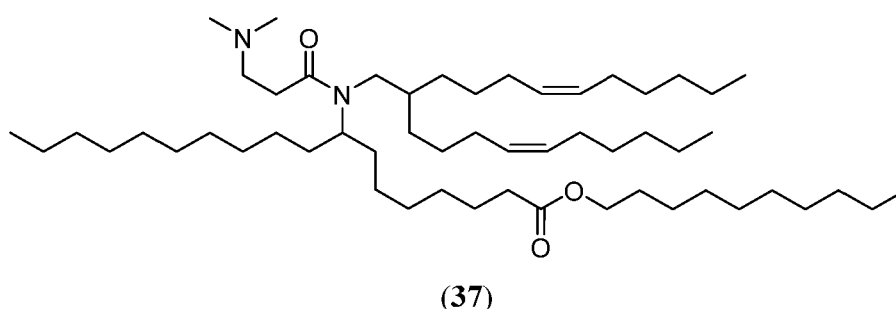
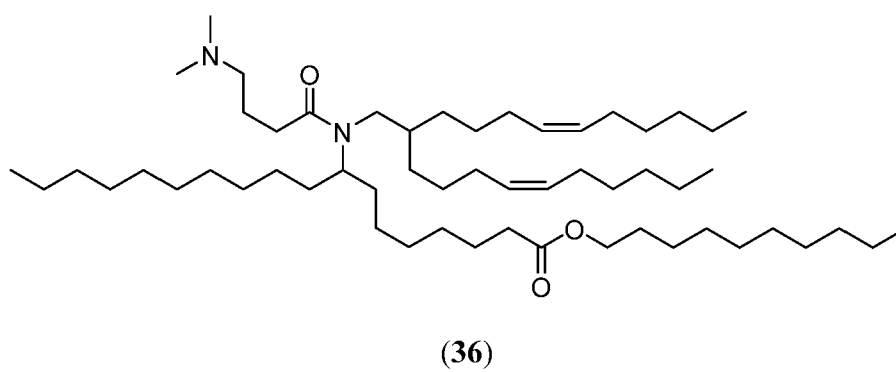
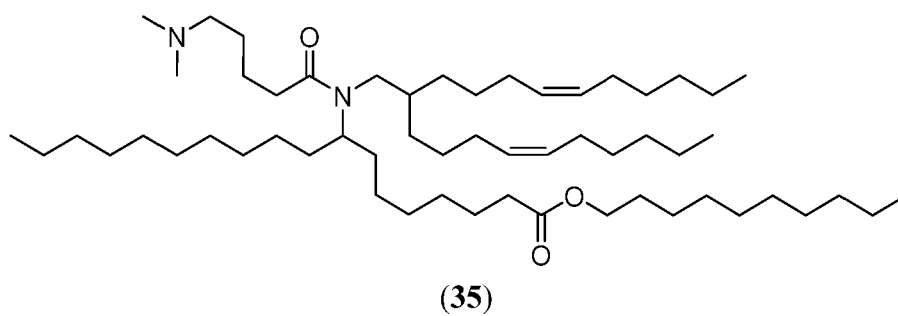
(32)



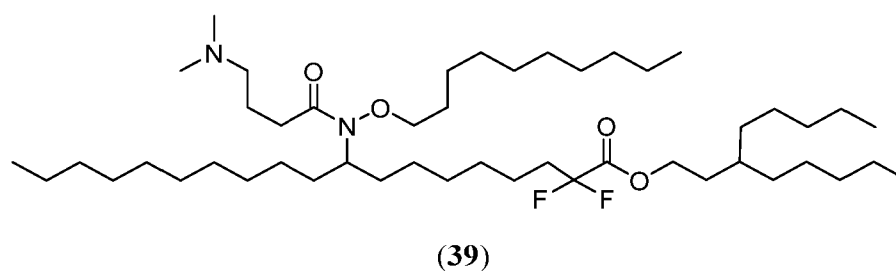
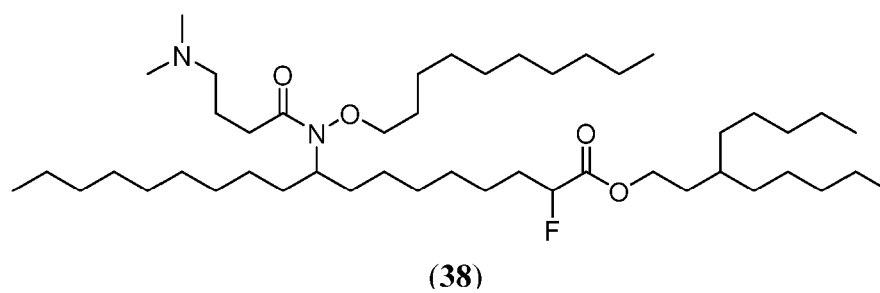
(33)



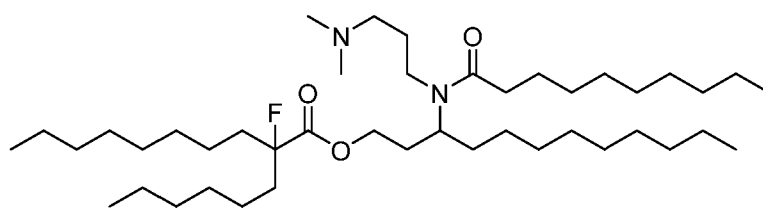
(34)



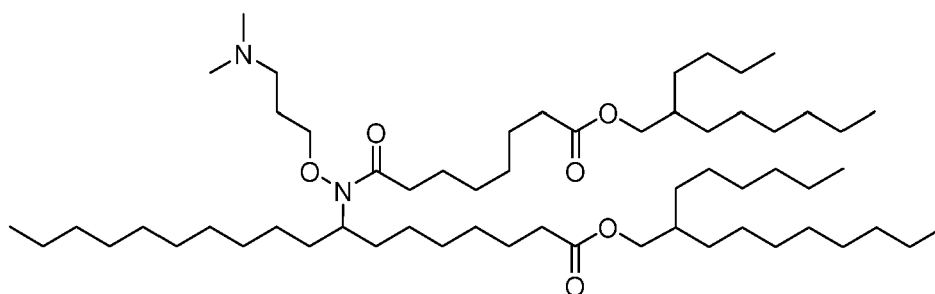
5



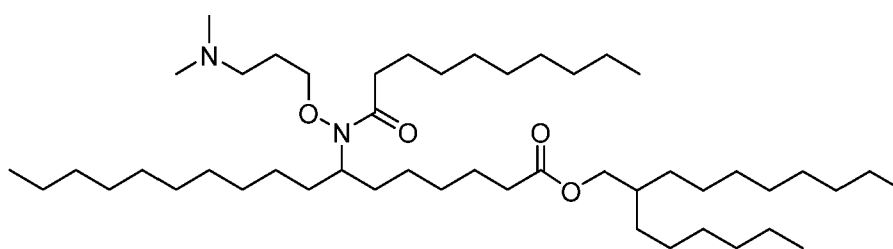
10



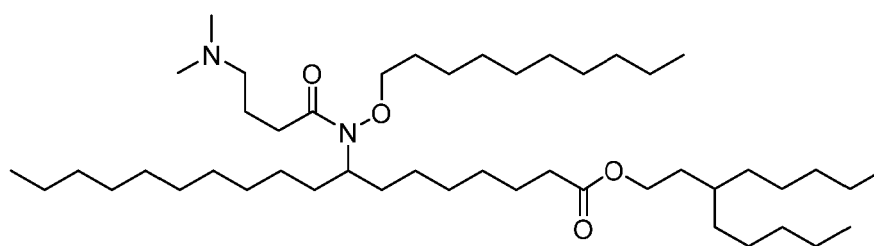
(40)



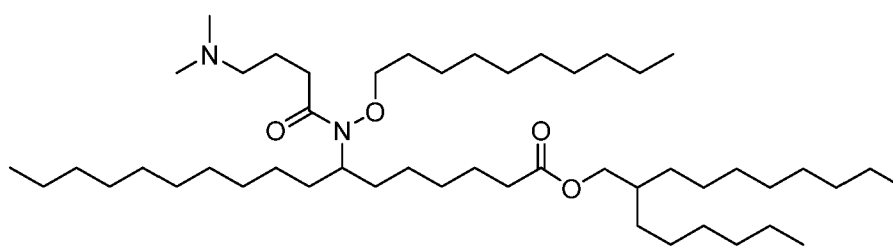
(41)



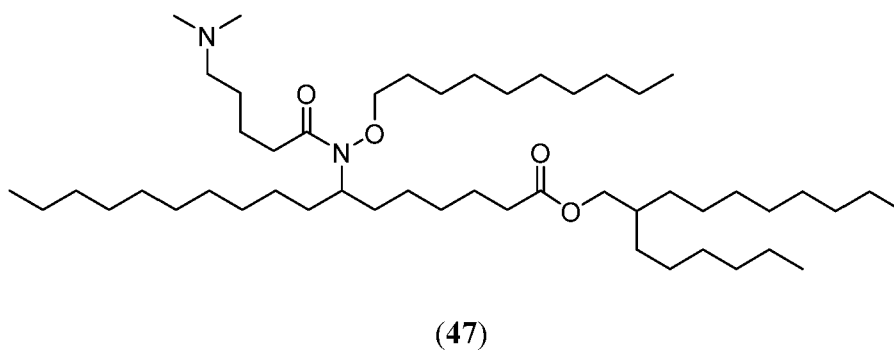
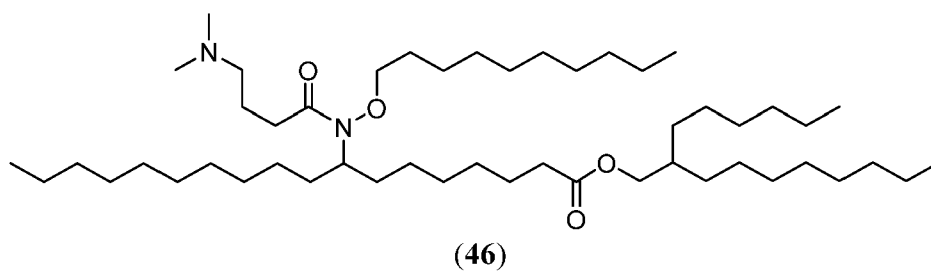
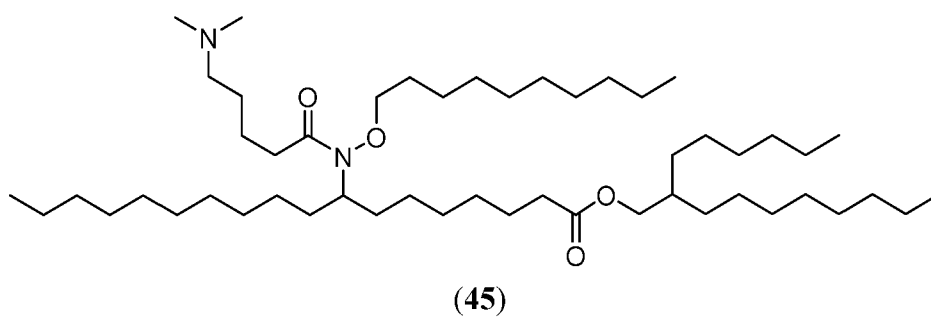
(42)



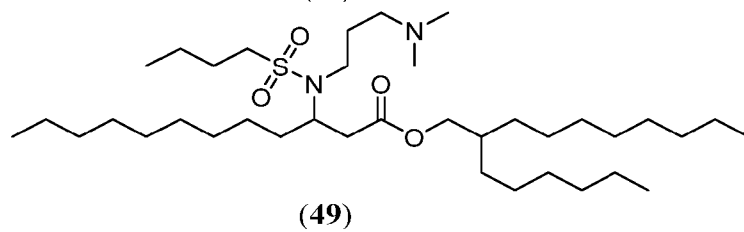
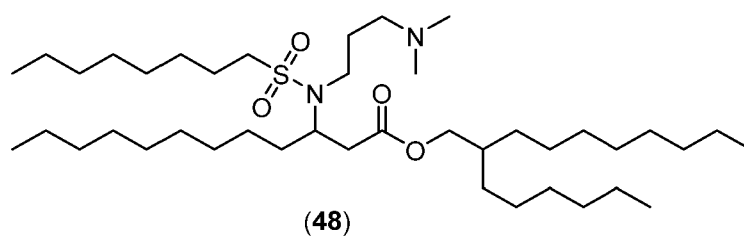
(43)

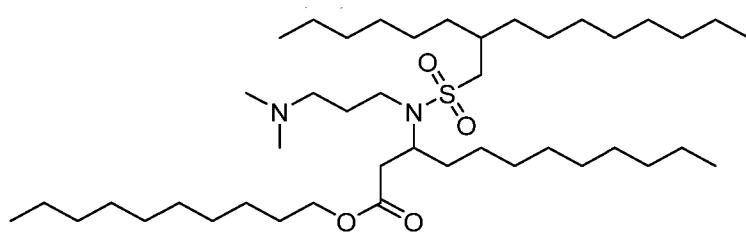


(44)

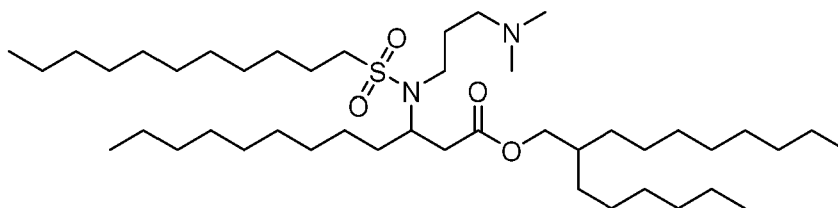


5

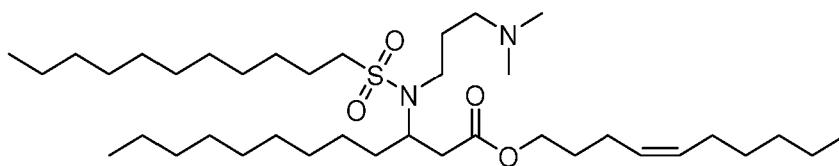




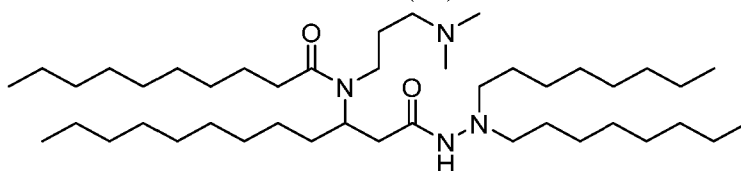
(50)



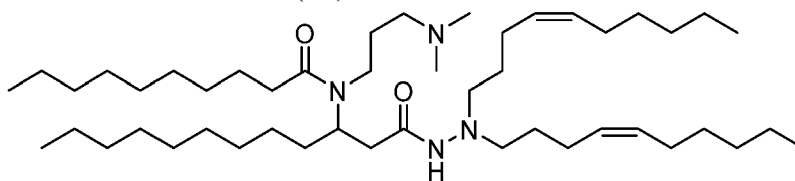
(51)



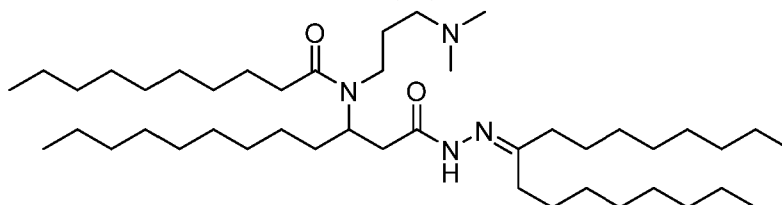
(52)



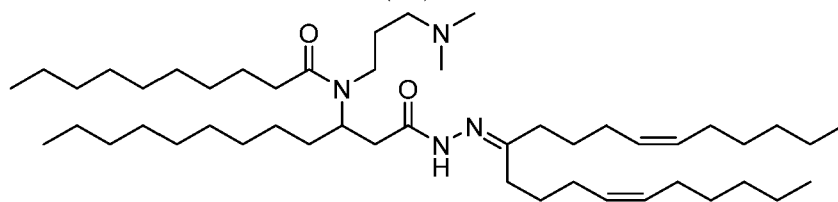
(53)



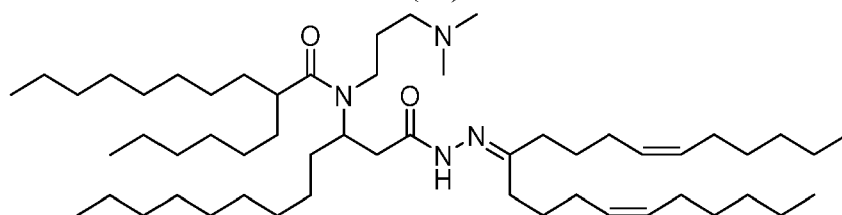
(54)



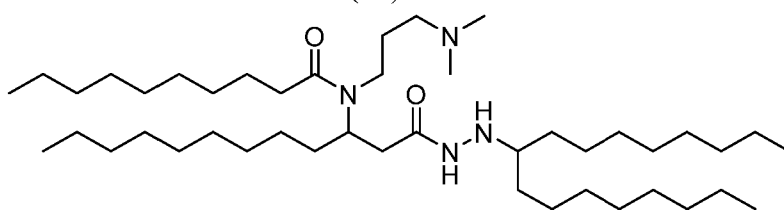
(55)



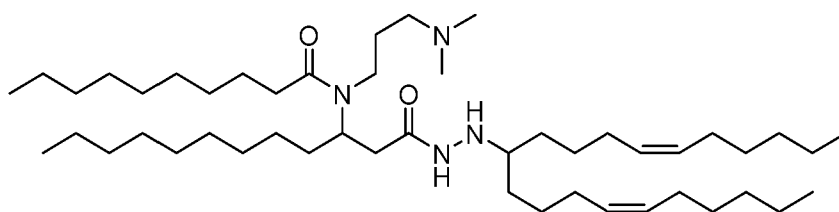
(56)



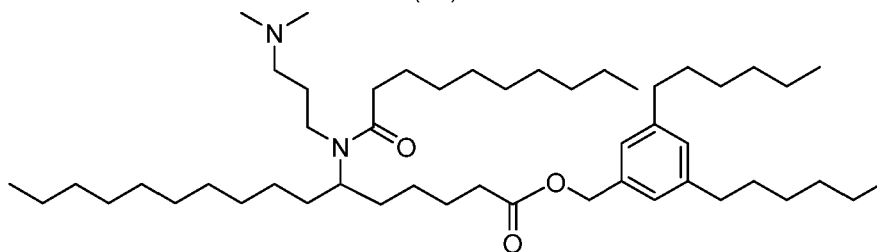
(57)

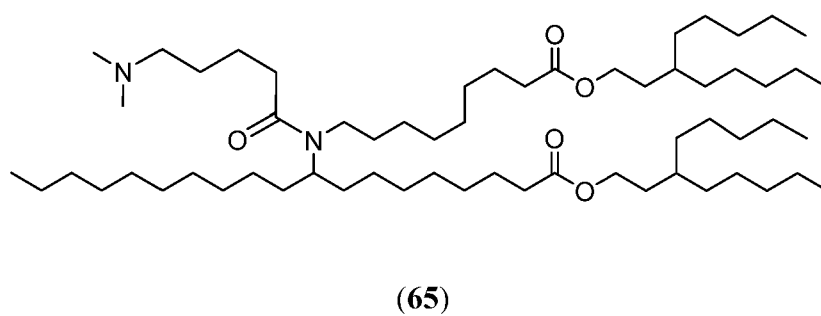
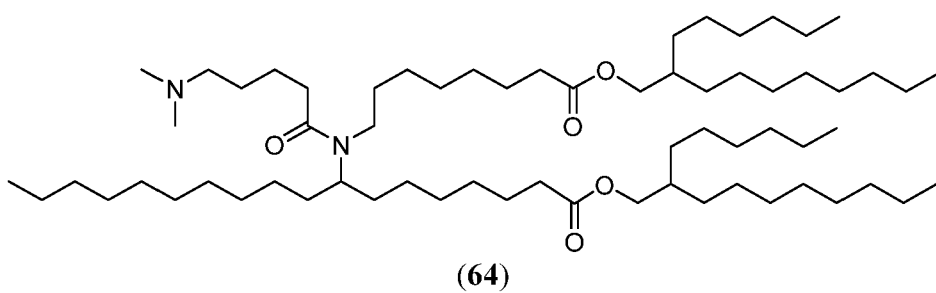
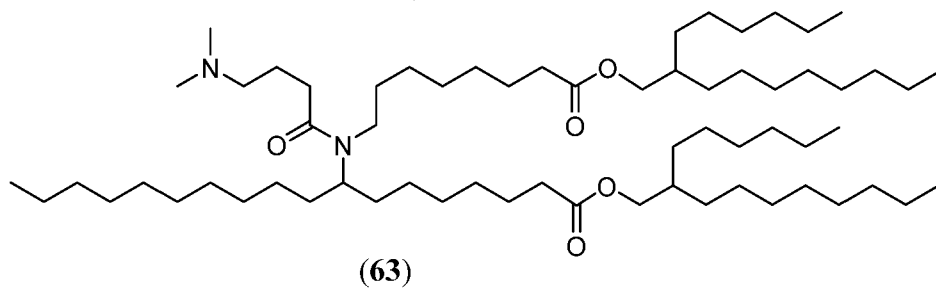
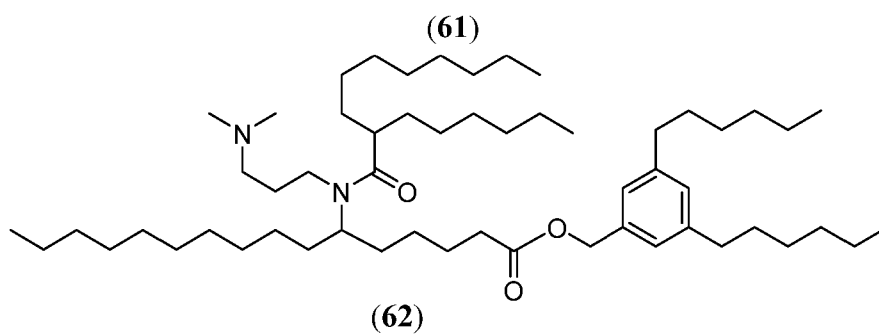
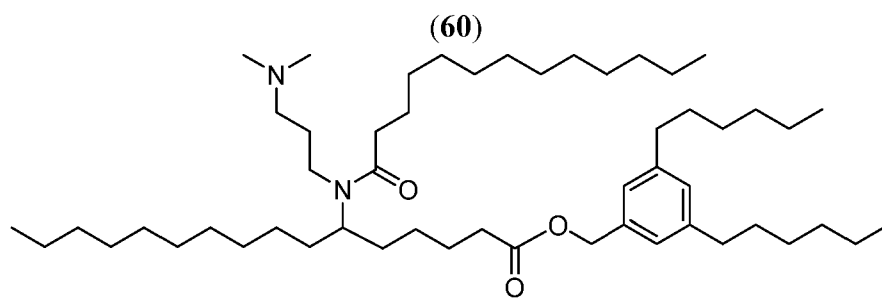


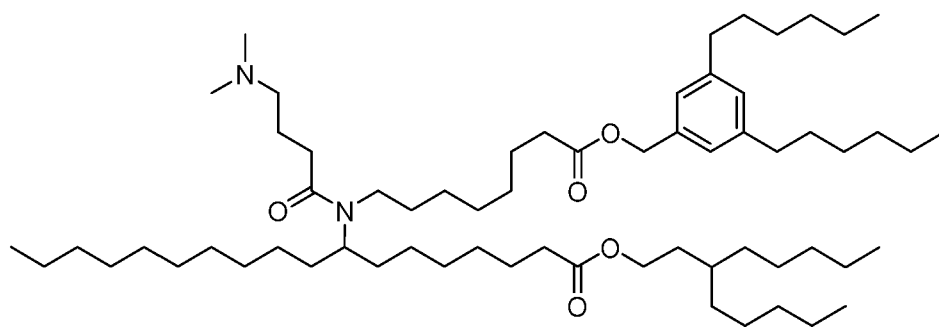
(58)



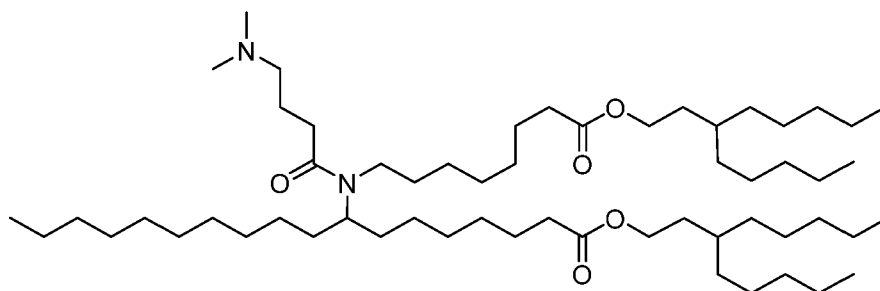
(59)



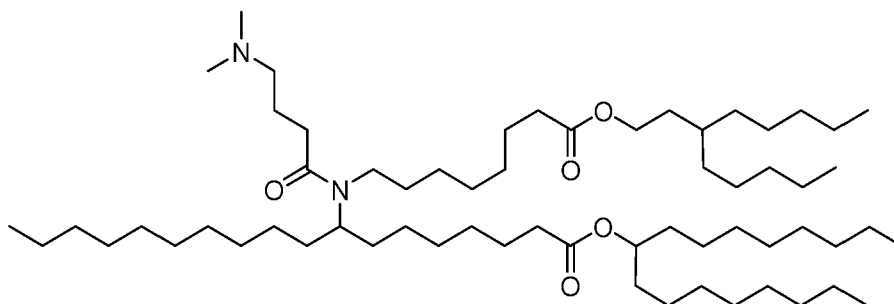




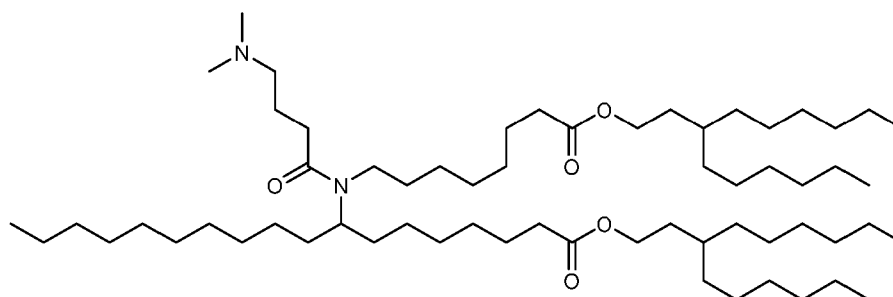
(66)



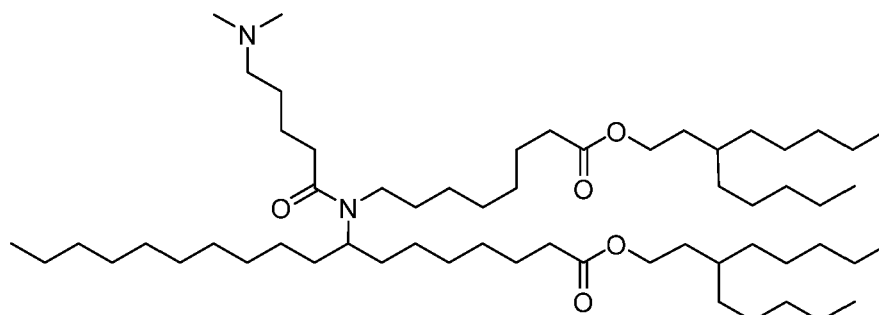
(67)



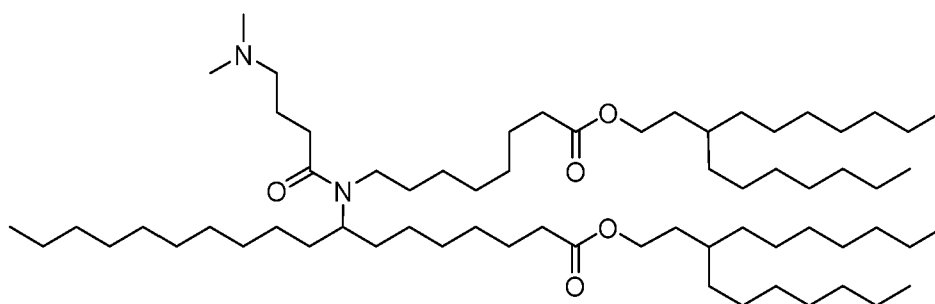
(68)



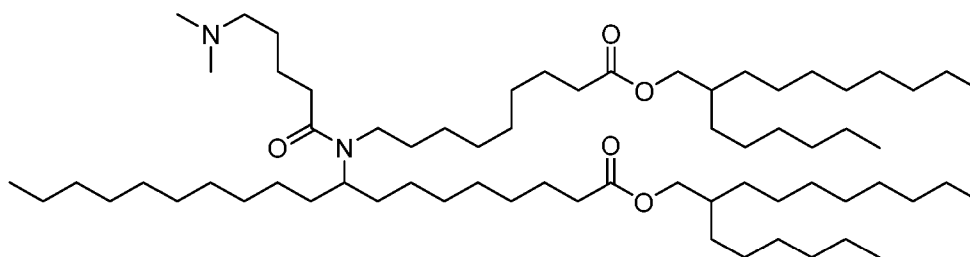
(69)



(70)

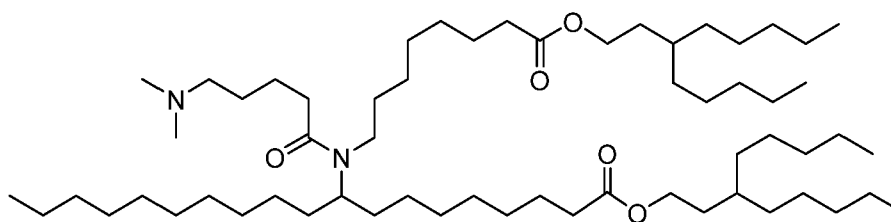


(71)

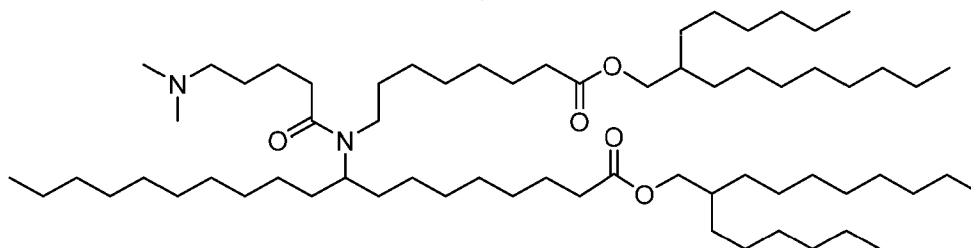


(72)

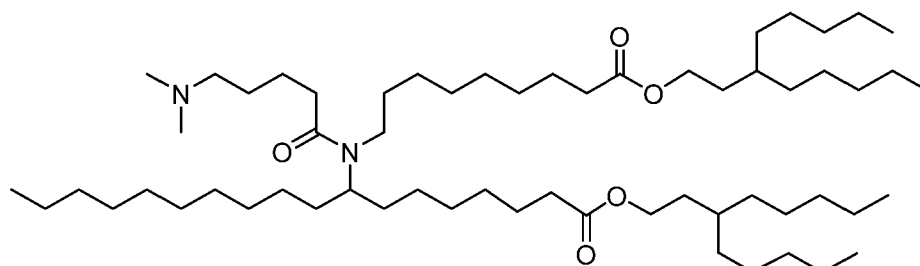
5



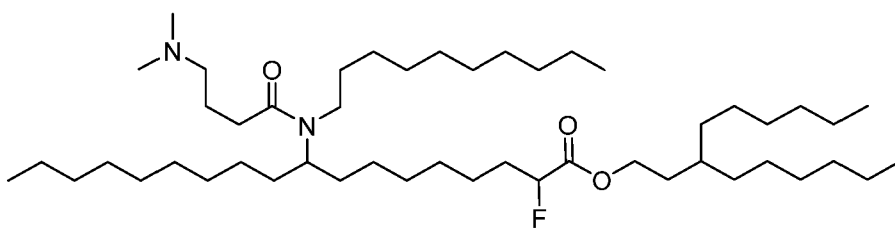
(73)



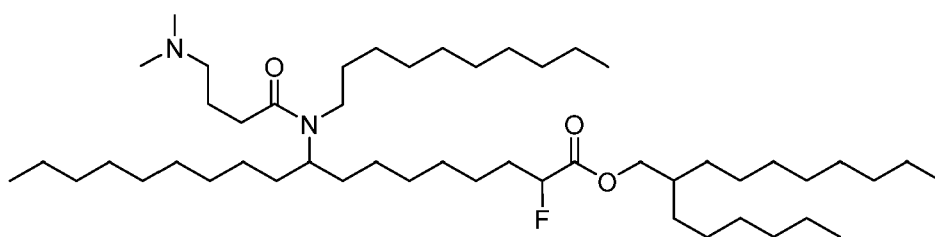
(74)



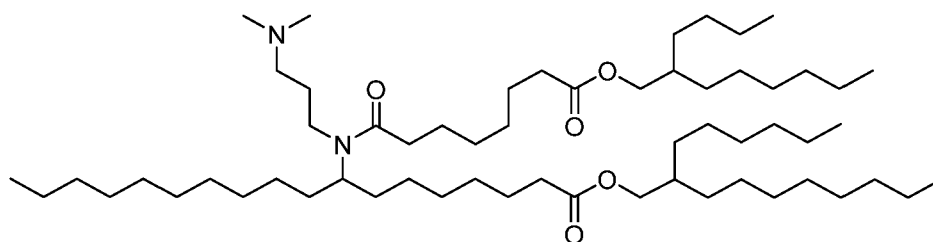
(75)



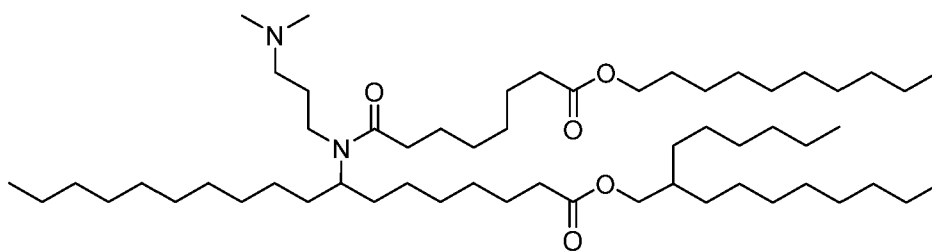
(76)



(77)



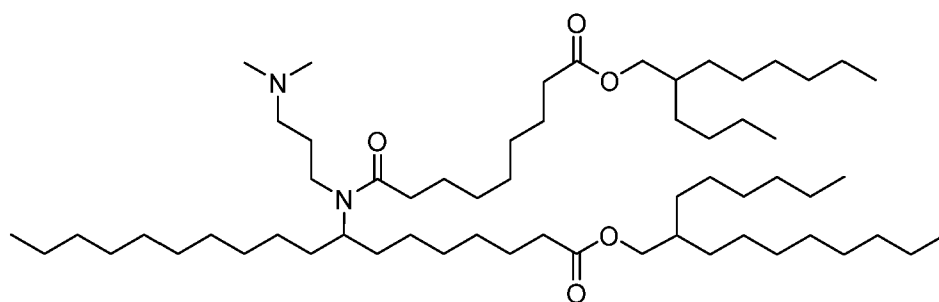
(78)



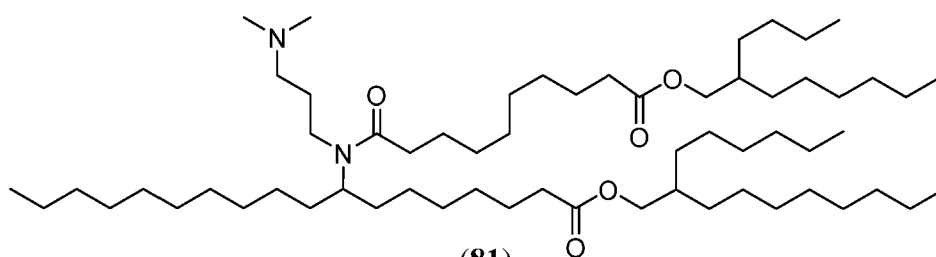
(79)

5

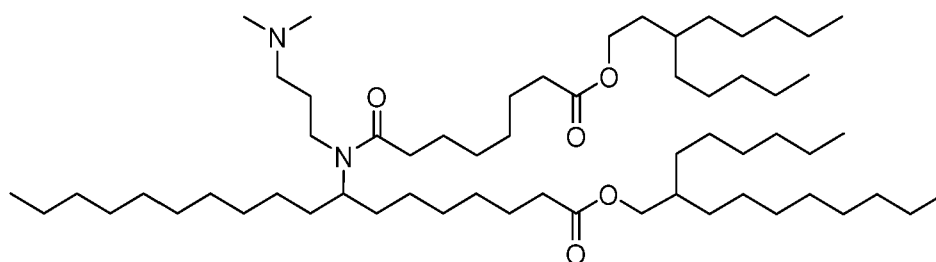
10



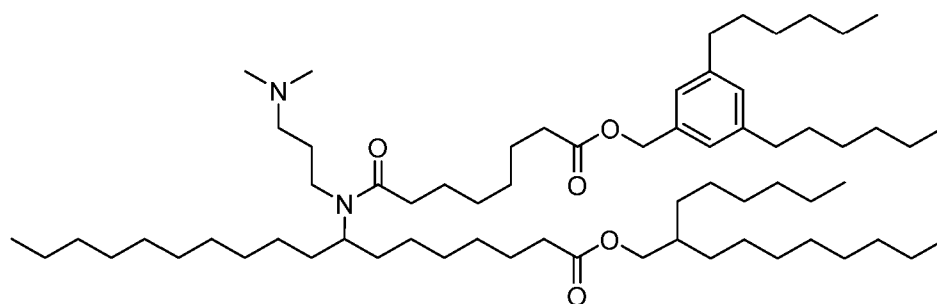
(80)



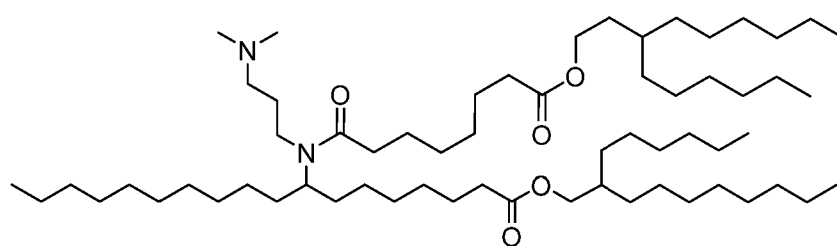
(81)



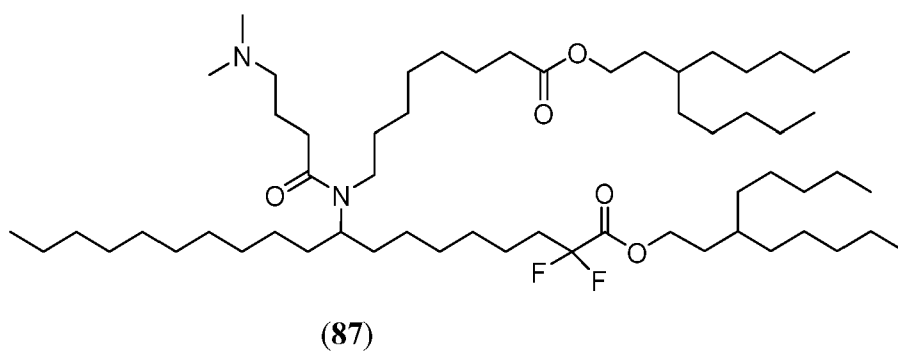
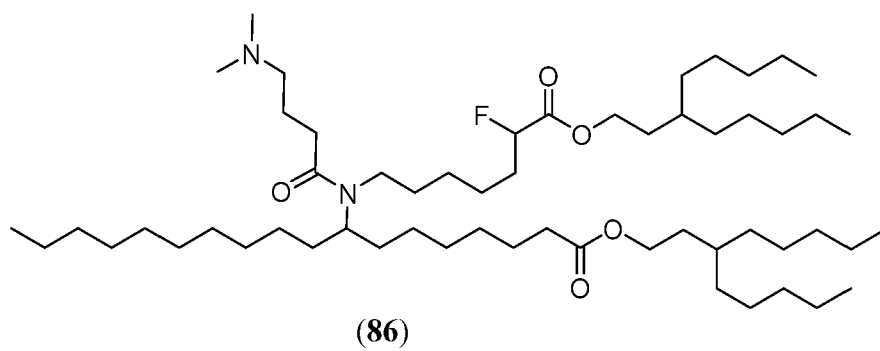
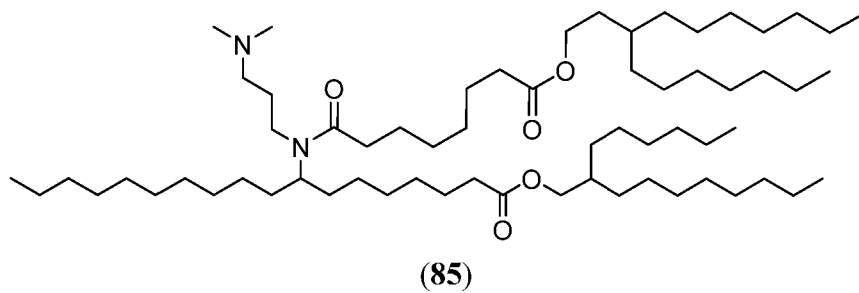
(82)



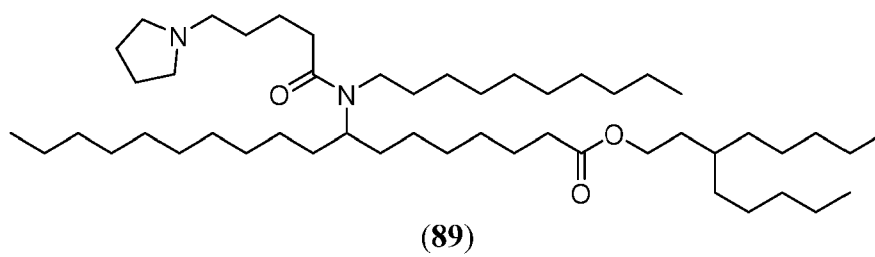
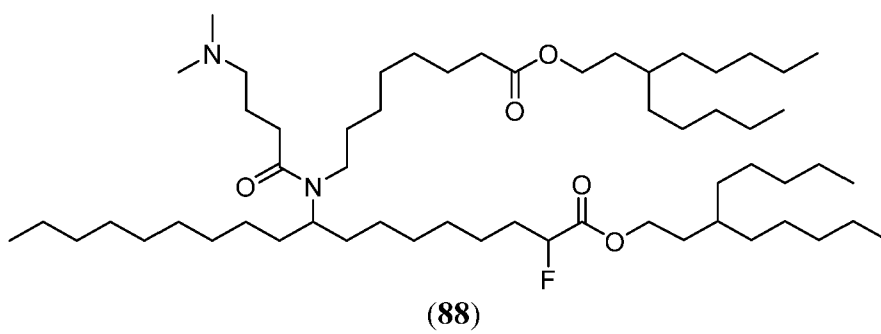
(83)



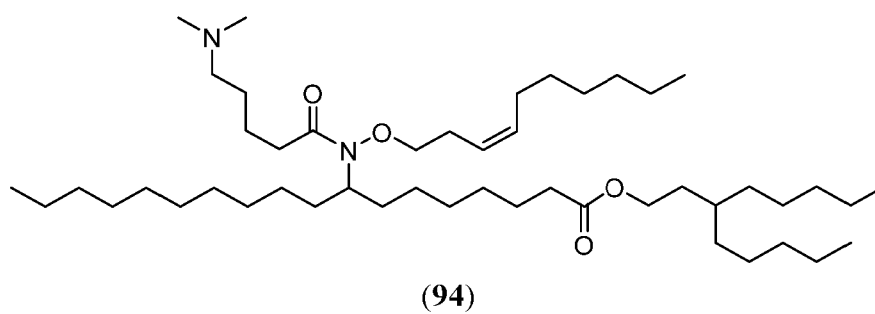
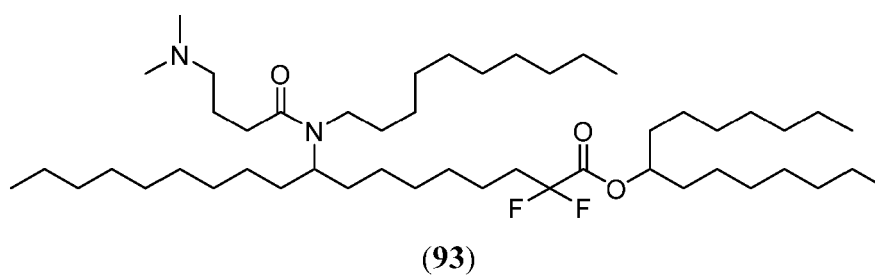
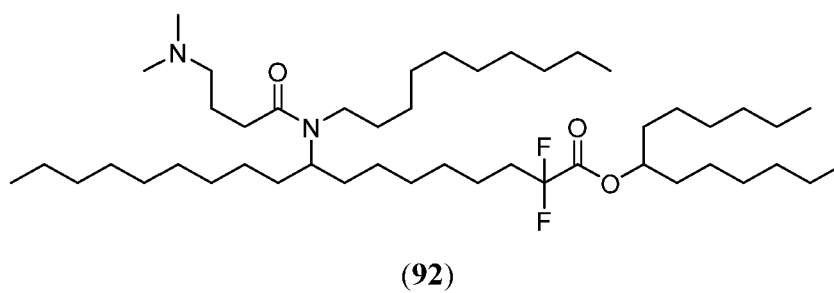
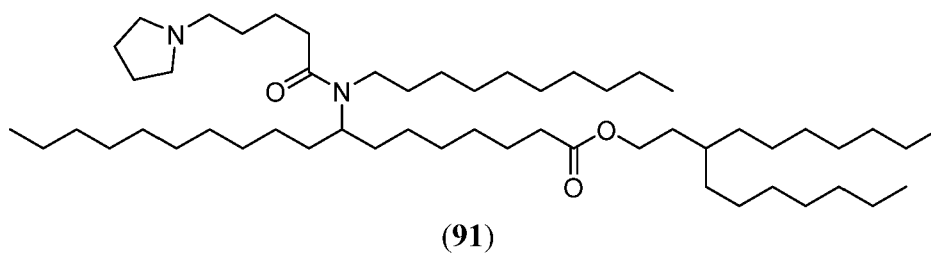
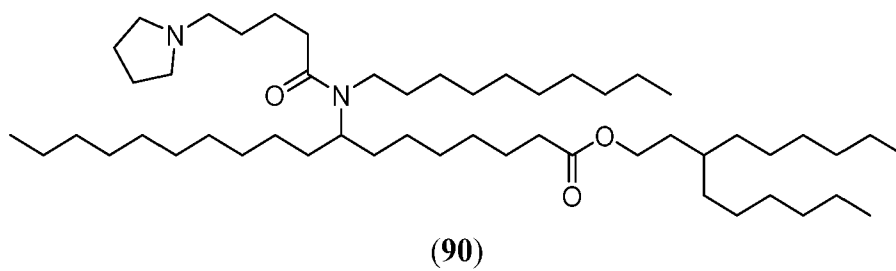
(84)



5

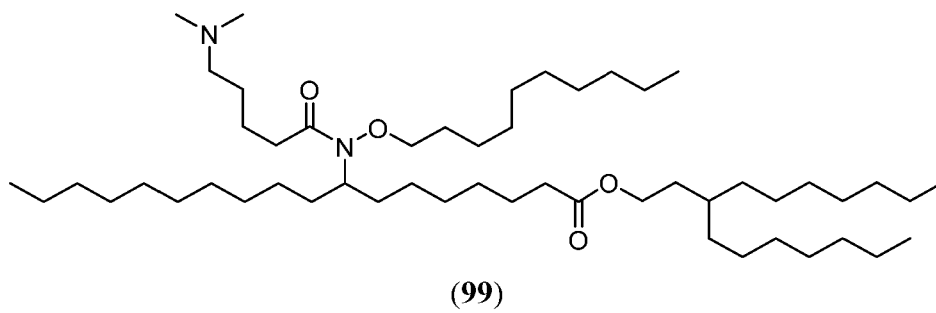
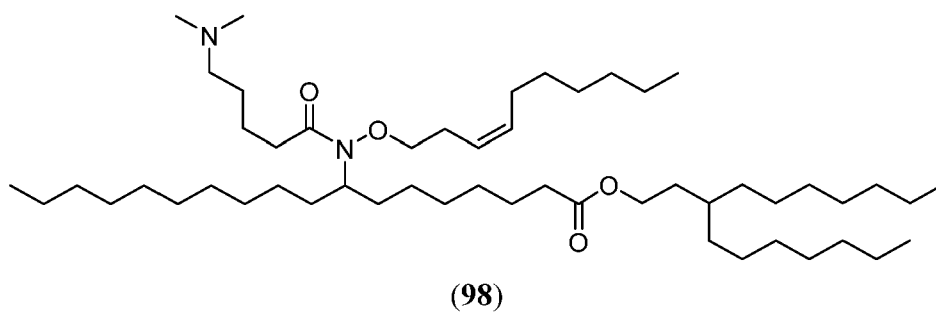
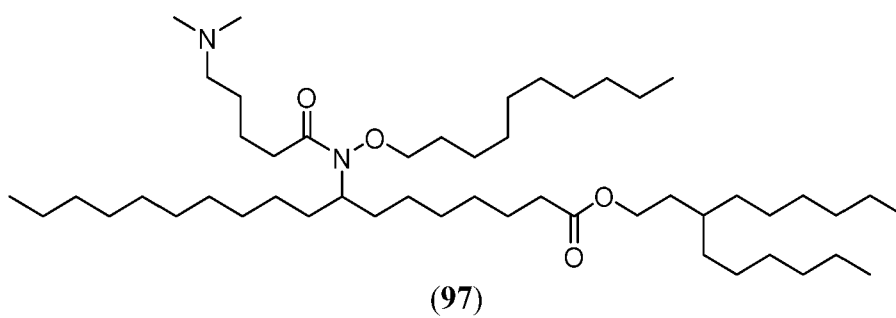
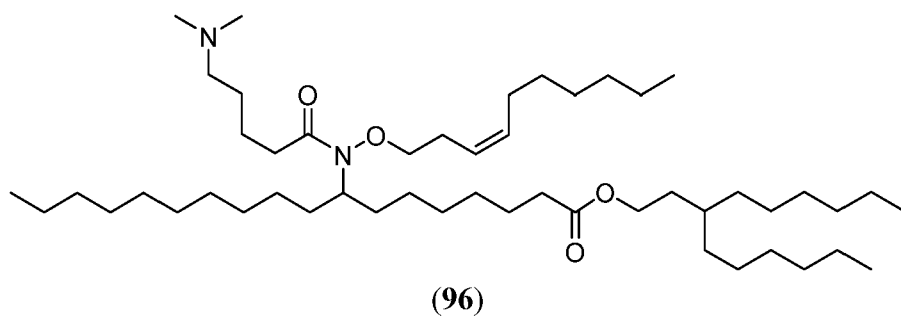
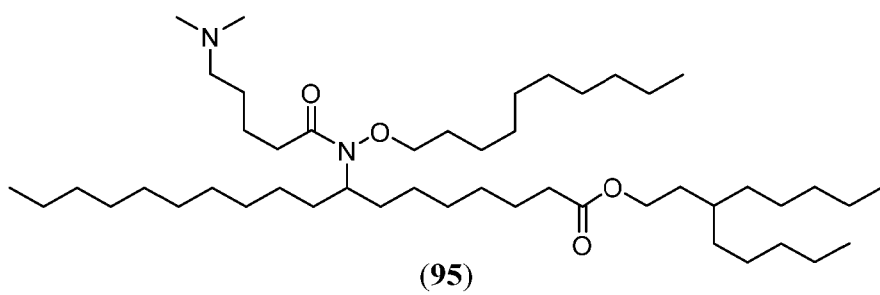


10



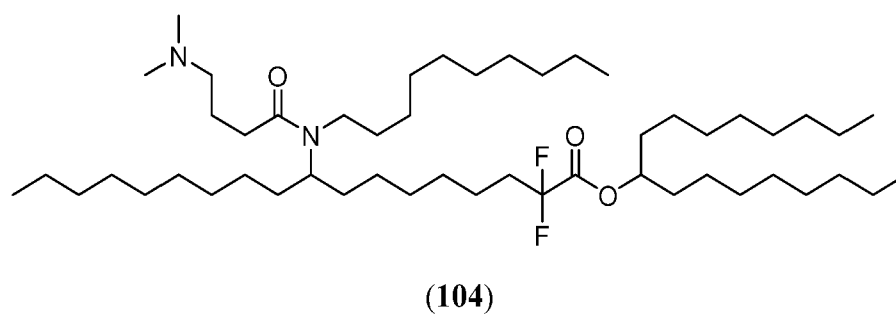
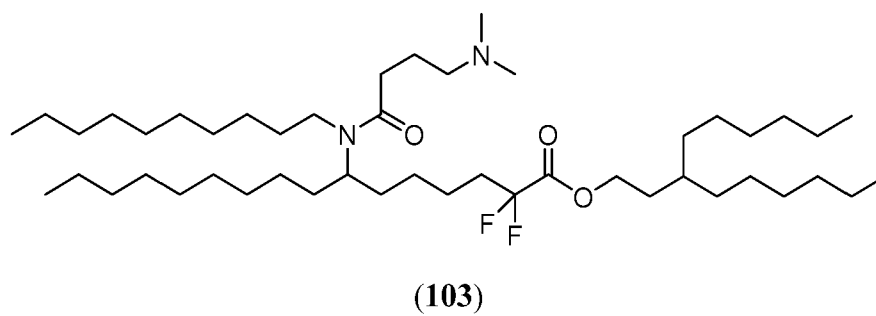
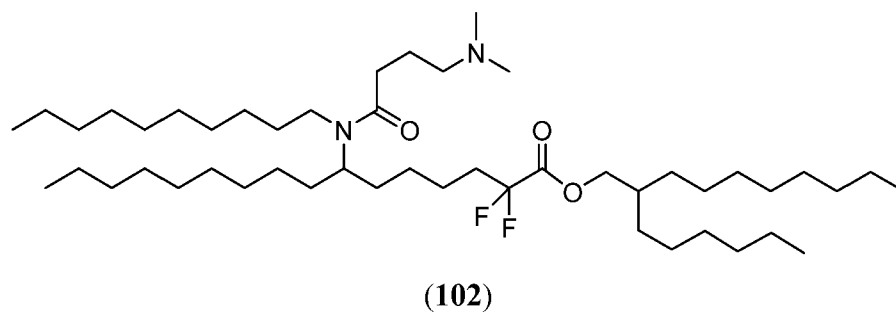
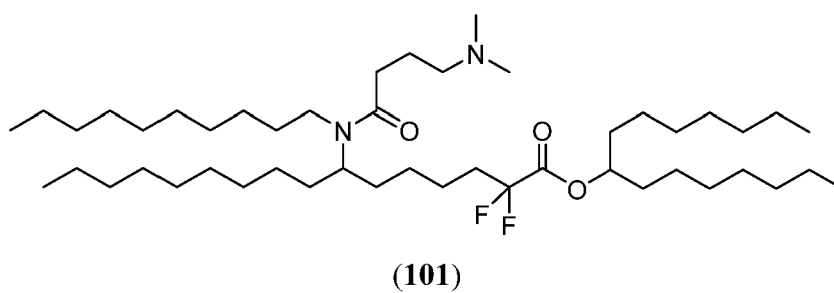
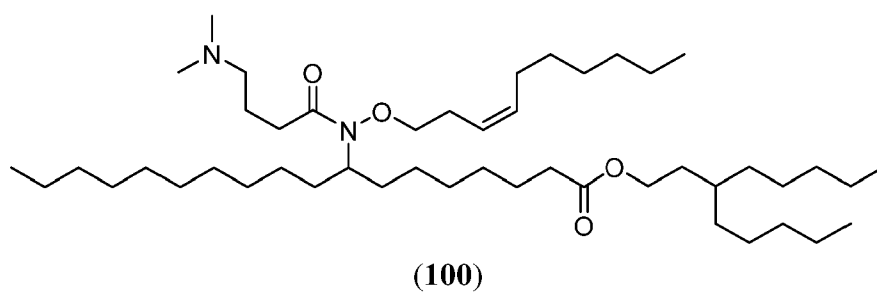
5

10



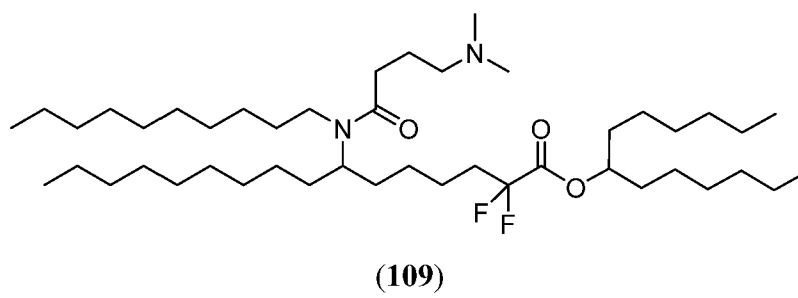
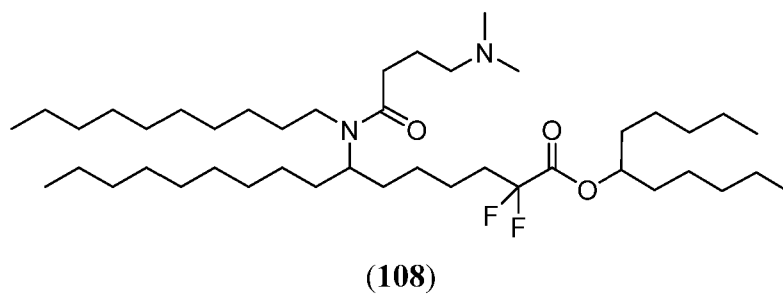
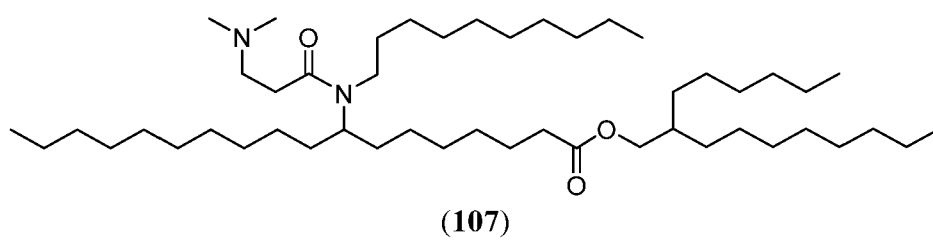
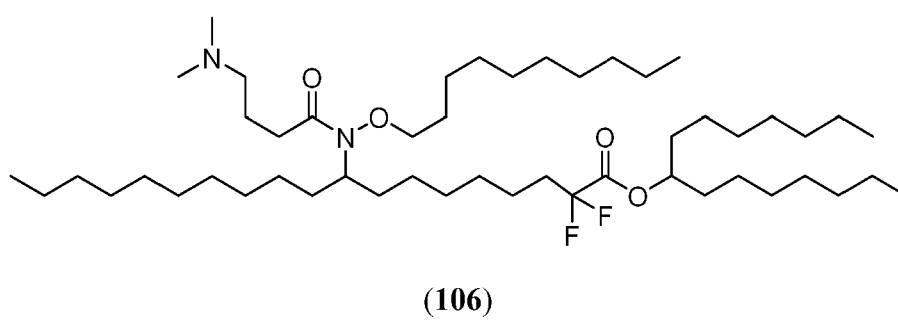
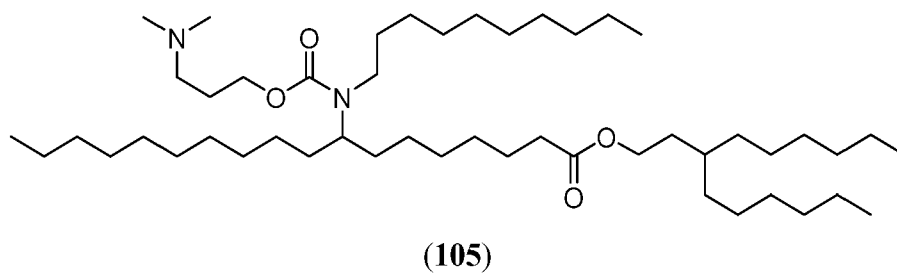
5

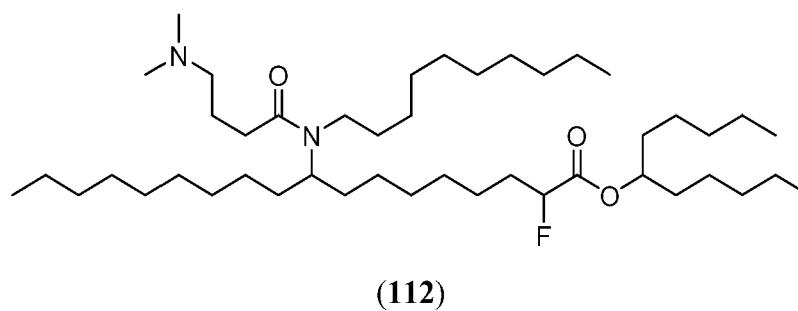
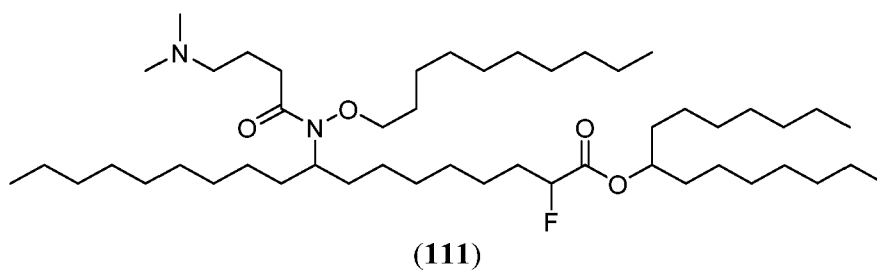
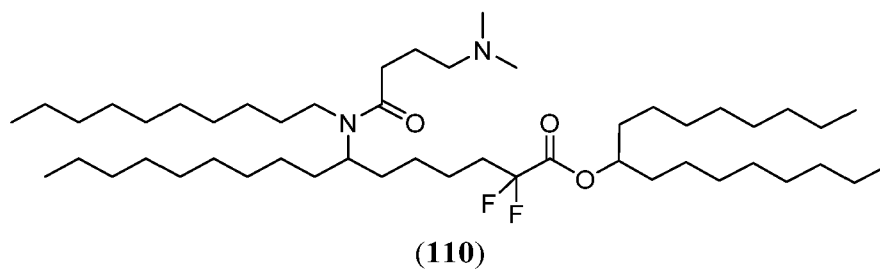
10



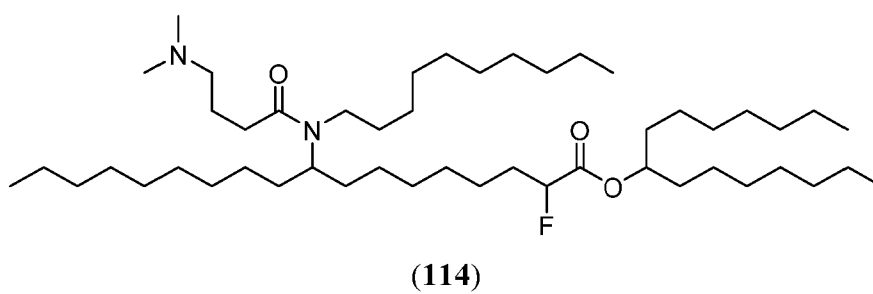
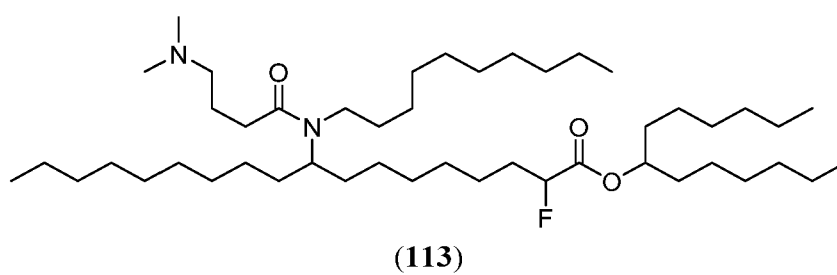
5

10

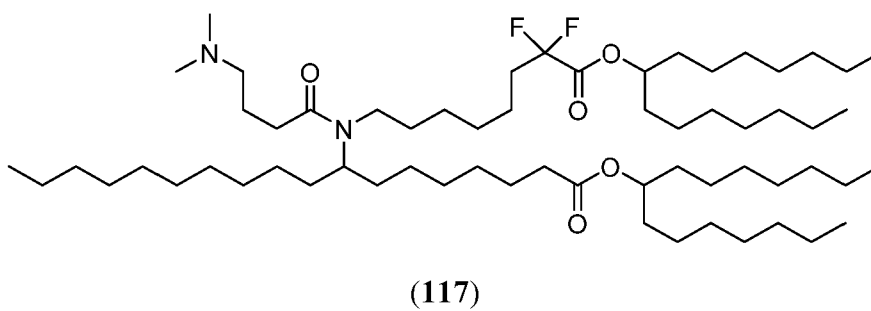
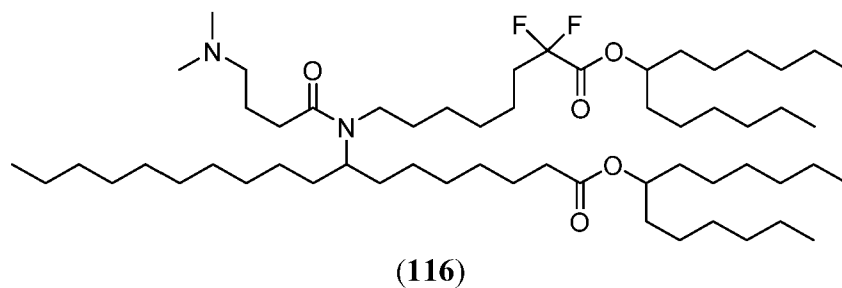
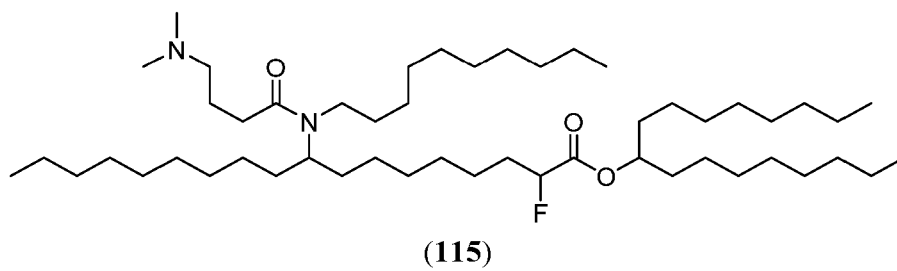




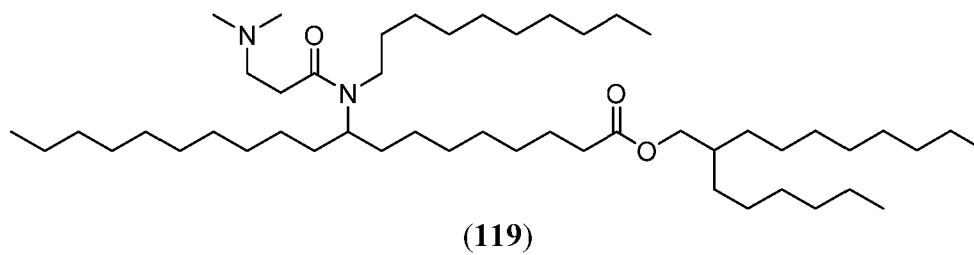
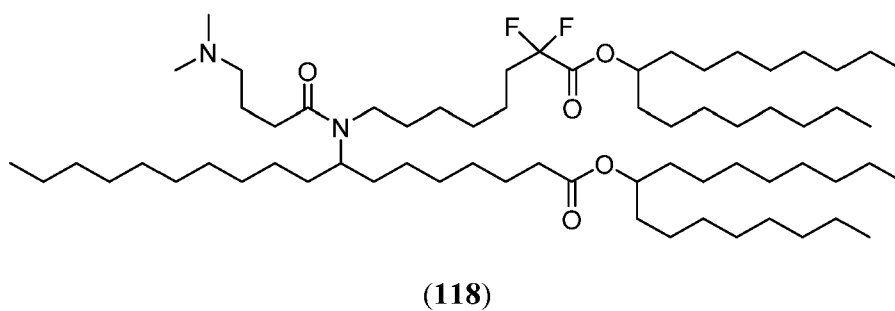
5



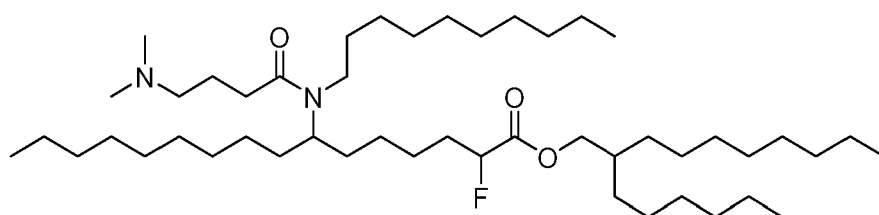
10



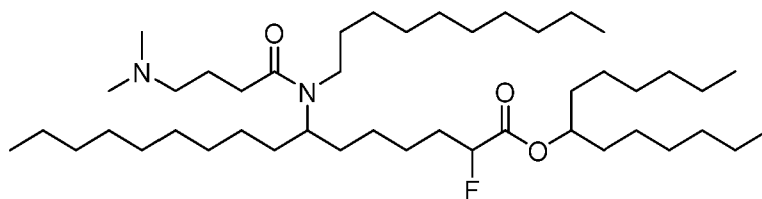
5



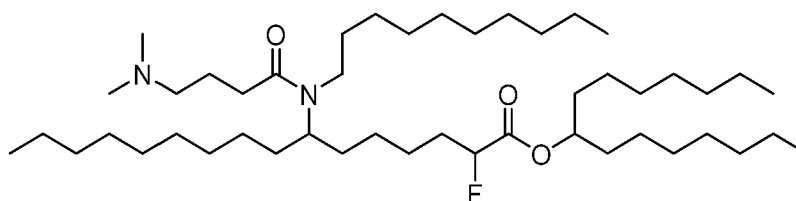
10



(120)



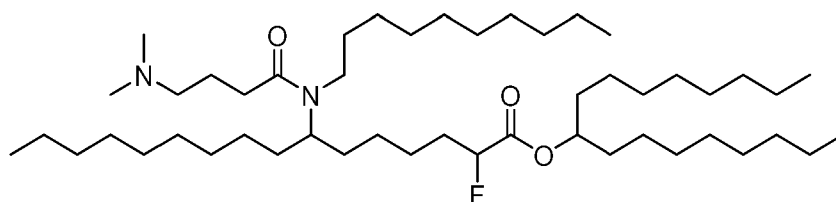
(121)



(122)

5

y



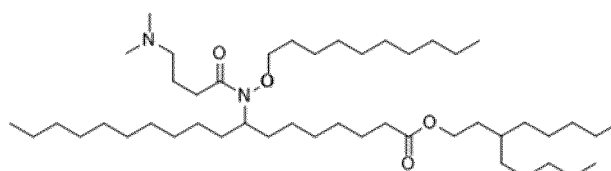
(123)

o una sal de los mismos.

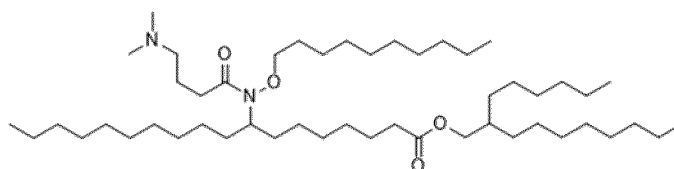
10

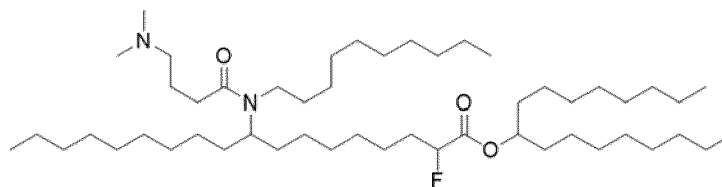
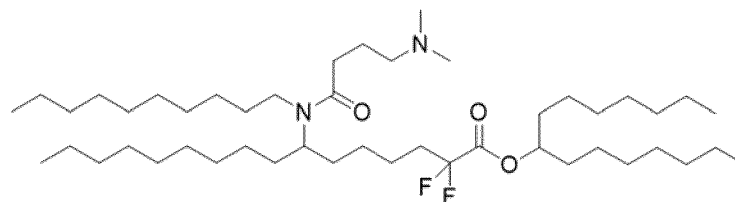
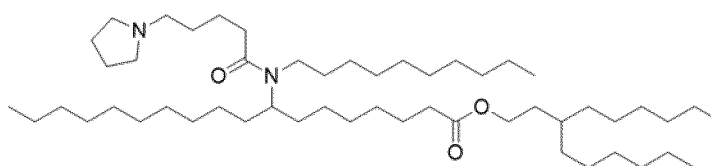
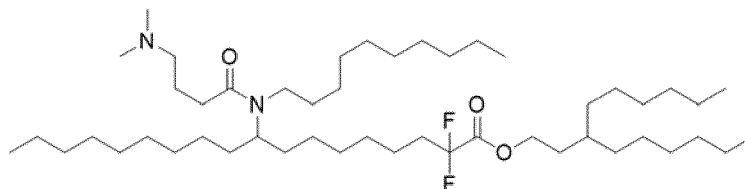
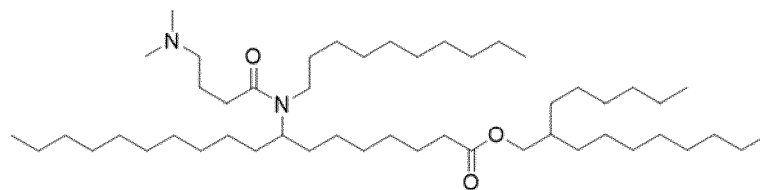
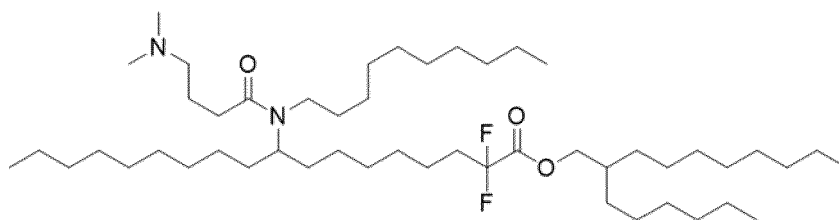
9. El compuesto o la sal de la reivindicación 1, en donde:

(i) el compuesto o la sal es:



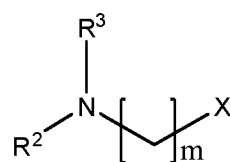
15





o una sal de los mismos; o

(ii)



se selecciona del grupo que consiste en $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$, 5-pirolidin-1-ilpentanoilo y $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$.

5

10. Una partícula lipídica con ácido nucleico que comprende:

- (a) una o más moléculas de ácido nucleico;
 (b) un lípido no catiónico;
 10 (c) un lípido conjugado; y
 (d) un compuesto o una sal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde una o más moléculas de ácido nucleico están encapsuladas dentro de la partícula lipídica.

11. La partícula lipídica con ácido nucleico de la reivindicación 10, en donde:

15

(i)(a) el compuesto o la sal comprende del 30 % molar al 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende del 13 % molar al 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,1 % molar al 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, o (b) el compuesto o la sal comprende del 30 % molar al 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende del 13 % molar al 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,1 % molar al 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y/o

20

(ii) el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARNbc en sustrato Dicer, ARN de horquilla pequeña (ARNhc), ARN de interferencia asimétrico (ARNia), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARN vírico (ARNv), ARN autoamplificador y combinaciones de los mismos; o el ácido nucleico es una molécula de ARNm; o el ácido nucleico comprende una molécula de ARNip bicatenaria, opcionalmente, en donde la molécula de ARNip bicatenaria comprende al menos un nucleótido modificado o el ARNip comprende al menos un nucleótido 2'-O-metilo (2'OMe); y/o

25

(iii) el lípido no catiónico comprende: (a) colesterol o un derivado del mismo, opcionalmente, en donde el colesterol o derivado del mismo comprenden del 31,5 % molar al 42,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; (b) un fosfolípido; o (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, opcionalmente, en donde el fosfolípido comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC) o una mezcla de las mismas, el fosfolípido comprende del 4 % molar al 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol comprende del 30 % molar al 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, o el fosfolípido comprende del 10 % molar al 30 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol comprende del 10 % molar al 30 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y/o

35

(iv) el lípido conjugado comprende un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, opcionalmente en donde: (a) el conjugado de PEG-lípido comprende un conjugado de PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), un conjugado de PEG-dialquiloxipropilo (PEG-DAA) o una mezcla de los mismos, opcionalmente, en donde el conjugado de PEG-DAA comprende un conjugado de PEG-dimiristiloxipropilo (PEG-DMA), un conjugado de PEG-disteariloxipropilo (PEG-DSA) o una mezcla de los mismos, o un conjugado de PEG-dimiristiloxipropilo (PEG-DMA); (b) el conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido es un compuesto de fórmula:

40

45

A-B-C

o una sal del mismo, en donde:

50

A es alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), cicloalquilo ($\text{C}_3\text{-C}_8$), cicloalquil ($\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_6$), alquino ($\text{C}_2\text{-C}_6$), alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o alcanoiloxi ($\text{C}_2\text{-C}_6$), en donde cualquier alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), cicloalquilo ($\text{C}_3\text{-C}_8$), cicloalquil ($\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_6$), alquino ($\text{C}_2\text{-C}_6$), alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$) y alcanoiloxi ($\text{C}_2\text{-C}_6$) está sustituido con uno o más grupos precursores aniónicos, y en donde cualquier alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), cicloalquilo ($\text{C}_3\text{-C}_8$), cicloalquil ($\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alqueno ($\text{C}_2\text{-C}_6$), alquino ($\text{C}_2\text{-C}_6$), alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_6$) y alcanoiloxi ($\text{C}_2\text{-C}_6$) está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alcoxi ($\text{C}_1\text{-C}_3$), alcanoilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), alcoxycarbonilo ($\text{C}_1\text{-C}_3$), alquiltio ($\text{C}_1\text{-C}_3$) o alcanoiloxi ($\text{C}_2\text{-C}_3$);

55

B es una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 550 Da a 10.000 Da;

60

C es $-\text{L}-\text{R}^a$

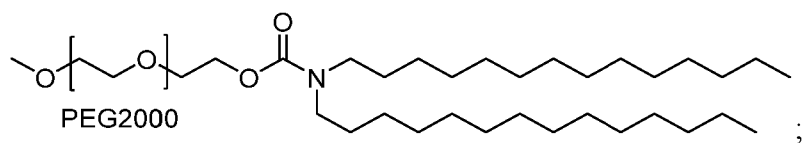
L se selecciona del grupo que consiste en un enlace directo, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^b-$, $-\text{NR}^b-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^b\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{NR}^b\text{C}(\text{O})\text{NR}^b-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ y $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$;

R^a es un alquilo ($\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$) ramificado o un alqueno ($\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$) ramificado, en donde uno o más átomos de carbono del alquilo ($\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$) ramificado o del alqueno ($\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$) ramificado se han remplazado por $-\text{O}-$; y

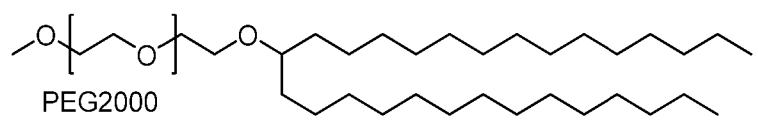
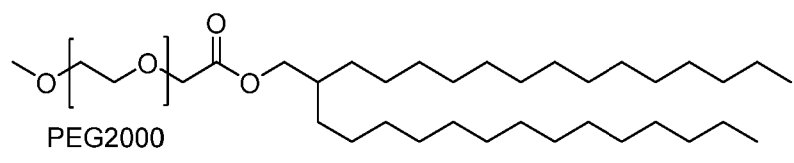
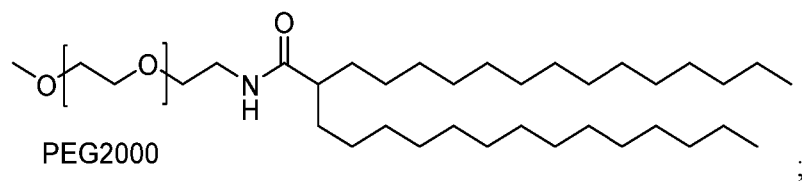
65

cada R^b es independientemente H o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$); o (c) el PEG tiene un peso molecular promedio de 2000 Da; y/o

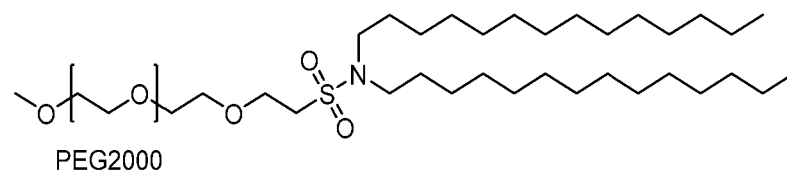
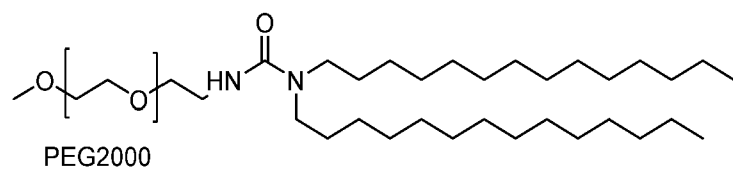
(v) el lípido conjugado comprende un conjugado de PEG-lípido seleccionado entre:



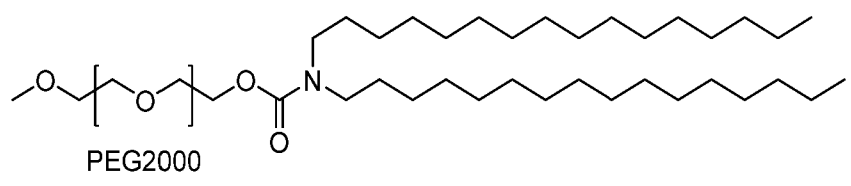
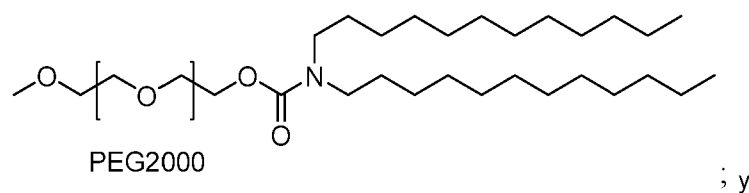
5



10

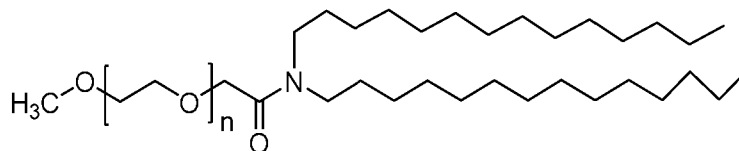


15



o una sal de los mismos; y/o

(vii) el lípido conjugado comprende un compuesto de la fórmula siguiente:



en donde n es 45-50; y/o

(viii) el lípido conjugado comprende del 1 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y/o

(ix) el ácido nucleico de la partícula lipídica con ácido nucleico no se degrada sustancialmente tras la incubación de la partícula en suero a 37 °C durante 30 minutos y/o

(x) el ácido nucleico está totalmente encapsulado en la partícula lipídica con ácido nucleico, opcionalmente, en donde la partícula lipídica con ácido nucleico tiene una proporción en masa de lípido:ácido nucleico de 5 a 15 o de 5 a 30; y/o

(xi) la partícula lipídica con ácido nucleico tiene una mediana del diámetro de 40 nm a 150 nm.

12. La partícula lipídica con ácido nucleico de la reivindicación 10, en donde:

(i) el compuesto o la sal comprende del 56,5 % molar al 66,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo que comprende del 31,5 % molar al 42,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y un conjugado de PEG-lípido comprende del 1 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, opcionalmente, en donde la partícula lipídica con ácido nucleico comprende el 61,5 % molar de compuesto o sal, el 36,9 % de colesterol o un derivado del mismo y el 1,5 % molar de conjugado de PEG-lípido; o

(ii) el compuesto o la sal comprende del 52 % molar al 62 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende la mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo que comprende del 36 % molar al 47 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el conjugado de PEG-lípido comprende del 1 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, opcionalmente en donde: (a) la partícula lipídica con ácido nucleico comprende el 57,1 % molar de compuesto o sal, el 7,1 % molar de fosfolípido, el 34,3 % molar de colesterol o un derivado del mismo y el 1,4 % molar de conjugado de PEG-lípido; o (b) la partícula lipídica con ácido nucleico comprende el 57,1 % molar de compuesto o sal, el 20 % molar de fosfolípido, el 20 % molar de colesterol o un derivado del mismo y el 1,4 % molar de conjugado de PEG-lípido; o

(iii) el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 65 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en donde el fosfolípido comprende del 4 % molar al 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol o derivado del mismo comprende del 30 % molar al 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; o

(iv) el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 65 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en donde el fosfolípido comprende del 3 % molar al 15 % molar del total de lípidos presentes en la partícula y el colesterol o derivado del mismo comprende del 30 % molar al 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; o

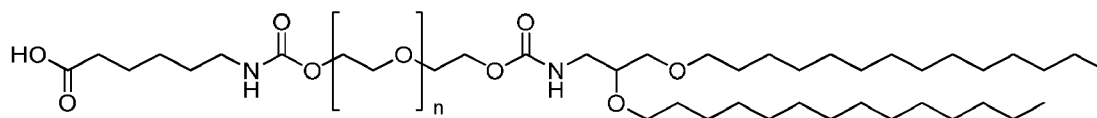
(v) el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 65 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende el 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol o un derivado del mismo comprende del 30 % molar al 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; o

(vi) el compuesto o la sal comprende del 50 % molar al 85 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende del 13 % molar al 49,5 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 0,5 % molar al 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; o

(vii) el compuesto o la sal comprende del 30 % molar al 50 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el lípido no catiónico comprende la mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo que comprende del 47

% molar al 69 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el lípido conjugado comprende del 1 % molar al 3 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, opcionalmente, en donde la proporción de lípido/ácido nucleico es de 24; o

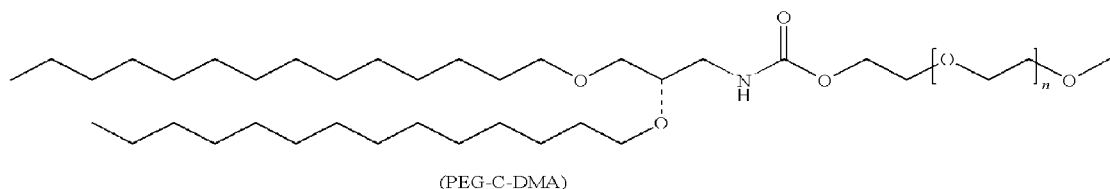
- 5 (viii) el lípido no catiónico comprende una mezcla de colesterol y DSPC; el lípido conjugado es:



en donde n se selecciona de forma que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de 2000 Da

en donde el lípido conjugado comprende el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el DSPC comprende el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol comprende el 48 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el compuesto o la sal comprende el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, opcionalmente, en donde la proporción de lípido/ácido nucleico es de 24; o

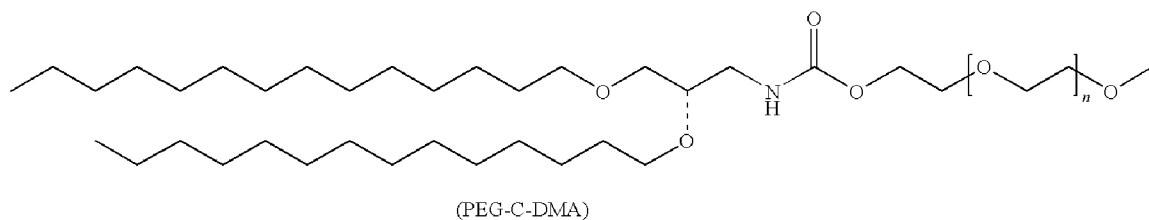
- (ix) el lípido no catiónico comprende una mezcla de colesterol y DSPC; el lípido conjugado es:



en donde n se selecciona de modo que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de 2000 Da;

en donde el lípido conjugado comprende el 2 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el DSPC comprende el 10 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol comprende el 48 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el compuesto o la sal comprende el 40 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, opcionalmente, en donde la proporción de lípido/ácido nucleico es de 24; o

- (x) el lípido no catiónico comprende una mezcla de colesterol y DSPC; el lípido conjugado es:



en donde n se selecciona de forma que la cadena polimérica resultante tenga un peso molecular de 2000;

en donde el lípido conjugado comprende el 1,6 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el DSPC comprende el 10,9 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; el colesterol comprende el 32,8 % molar del total de lípidos presentes en la partícula; y el compuesto o la sal comprende el 54,9 % molar del total de lípidos presentes en la partícula, opcionalmente, en donde la proporción de lípido/ácido nucleico es de 24; o

- (xi) la partícula lipídica con ácido nucleico comprende dos o más compuestos o sales como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

13. Una composición farmacéutica que comprende una partícula lipídica con ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12 y un portador farmacéuticamente aceptable.

14. Una partícula lipídica con ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12 o la composición de la reivindicación 13, para usar en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un mamífero.

15. La partícula lipídica con ácido nucleico o la composición para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una infección vírica, una enfermedad o trastorno hepático y cáncer.