

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 981**

51 Int. Cl.:

C07D 295/13 (2006.01)

C07C 211/22 (2006.01)

C07C 233/36 (2006.01)

C07C 233/38 (2006.01)

C07C 235/74 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2016** **PCT/US2016/039999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017** **WO17004143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2016** **E 16738338 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3313829**

54 Título: **Lípidos y formulaciones de nanopartículas lipídicas para el suministro de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

29.06.2015 US 201562186210 P

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

31.10.2024

73 Titular/es:

ACUITAS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
6190 Agronomy Road, Suite 402 University of
British Columbia - KETR
Vancouver, British Columbia V6T 1W5, CA

72 Inventor/es:

DU, XINYAO y
ANSELL, STEVEN, M.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 984 981 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 y formulaciones de nanopartículas lipídicas para el suministro de ácidos nucleicos

5 **Antecedentes****Campo técnico**

10 La presente invención se refiere en general a lípidos catiónicos novedosos que pueden usarse en combinación con otros componentes lipídicos, tales como lípidos neutros, colesterol y lípidos conjugados con polímeros, para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos, para facilitar el suministro intracelular de ácidos nucleicos terapéuticos (por ejemplo, oligonucleótidos, ARN mensajero) tanto *in vitro* como *in vivo*.

Descripción de la técnica relacionada

15 Hay muchos desafíos asociados al suministro de ácidos nucleicos para efectuar una respuesta deseada en un sistema biológico. La terapia basada en ácidos nucleicos tiene un enorme potencial, pero sigue siendo necesario un suministro más eficaz de los ácidos nucleicos a los sitios adecuados dentro de una célula u organismo con el fin de desarrollar este potencial. Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), oligonucleótidos antisentido, ribozimas, ADNzimas, plásmidos, ácidos nucleicos inmunoestimuladores, antagomir, antimir, mimético, supermir y aptámeros. Algunos ácidos nucleicos, tales como el ARNm o los plásmidos, puede usarse para efectuar la expresión de productos celulares específicos como sería útil en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades relacionadas con una deficiencia de una proteína o enzima. Las aplicaciones terapéuticas del suministro de nucleótidos traducibles son sumamente amplias, ya que pueden sintetizarse construcciones para producir cualquier secuencia de proteína elegida, sea o no autóctona del sistema. Los productos de expresión del ácido nucleico pueden aumentar los niveles existentes de proteína, reemplazar las versiones faltantes o no funcionales de una proteína, o introducir una nueva proteína y funcionalidad asociada en una célula u organismo.

30 Algunos ácidos nucleicos, tales como los inhibidores de miARN, pueden usarse para efectuar la expresión de productos celulares específicos que están regulados por miARN como sería útil en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades relacionadas con una deficiencia de proteína o enzima.

35 Las aplicaciones terapéuticas de la inhibición de miARN son sumamente amplias, ya que pueden sintetizarse construcciones para inhibir uno o más miARN que, a su vez, regularían la expresión de productos de ARNm. La inhibición del miARN endógeno puede aumentar su expresión de proteínas endógenas diana en dirección 3' y restablecer la función adecuada en una célula u organismo como medio para tratar enfermedades asociadas a un miARN específico o a un grupo de miARN.

40 Otros ácidos nucleicos pueden regular negativamente los niveles intracelulares de ARNm específicos y, como resultado, regular negativamente la síntesis de las proteínas correspondientes a través de procesos tales como la interferencia de ARN (iARN) o la unión complementaria del ARN antisentido. Las aplicaciones terapéuticas del oligonucleótido antisentido y de la iARN son también sumamente amplias, puesto que pueden sintetizarse construcciones de oligonucleótidos con cualquier secuencia de nucleótidos dirigida contra un ARNm diana. Las dianas pueden incluir ARNm de células normales, ARNm asociados a patologías, tales como el cáncer, y ARNm de agentes infecciosos, tales como virus. Hasta ahora, las construcciones de oligonucleótidos antisentido han demostrado la capacidad de regular negativamente y específicamente las proteínas diana a través de la degradación del ARNm afín tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Además, las construcciones de oligonucleótidos antisentido actualmente se están evaluando en estudios clínicos.

50 Sin embargo, el uso de oligonucleótidos en contextos terapéuticos se enfrenta actualmente a dos problemas. En primer lugar, los ARN libres son susceptibles de digestión por nucleasas en el plasma. En segundo lugar, los ARN libres tienen una capacidad limitada para acceder al compartimento intracelular donde reside la maquinaria de traducción pertinente. Se han utilizado nanopartículas lipídicas formadas a partir de lípidos catiónicos con otros componentes lipídicos, tales como lípidos neutros, colesterol, PEG, lípidos PEGilados y oligonucleótidos, para bloquear la degradación de los ARN en el plasma y facilitar la captación celular de los oligonucleótidos.

60 El documento WO 2013/016058 divulga lípidos catiónicos que contienen bis-nitrógeno que pueden usarse en combinación con otros componentes lipídicos tales como colesterol y PEG-lípidos para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos.

65 Sigue existiendo la necesidad de lípidos catiónicos y nanopartículas lipídicas mejorados para el suministro de oligonucleótidos. Preferentemente, estas nanopartículas lipídicas proporcionarían relaciones fármaco:lípido óptimas, protegerían el ácido nucleico de la degradación y el aclaramiento en suero, serían adecuadas para el suministro sistémico y proporcionarían un suministro intracelular del ácido nucleico. Además, estas partículas de lípido-ácido nucleico deben ser bien toleradas y proporcionar un índice terapéutico adecuado, de manera que el tratamiento del paciente a una dosis eficaz del ácido nucleico no se asocie a una toxicidad inaceptable y/o un riesgo para el paciente.

exhaustiva de diversas realizaciones de la invención. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que la invención puede ponerse en práctica sin estos detalles.

La presente invención se basa, en parte, en al descubrimiento de (amino) lípidos catiónicos novedosos que proporcionan ventajas cuando se usan en nanopartículas lipídicas para el suministro *in vivo* de un agente activo o terapéutico, tal como un ácido nucleico, en una célula de un mamífero. En particular, las realizaciones de la presente invención proporcionan composiciones de nanopartículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos novedosos que se describen en el presente documento y que proporcionan una actividad aumentada del ácido nucleico y una tolerabilidad aumentada de las composiciones *in vivo*, dando como resultado un aumento significativo del índice terapéutico en comparación con las composiciones de nanopartículas de ácido nucleico-lípido descritas anteriormente.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona lípidos catiónicos novedosos que permiten la formulación de composiciones mejoradas para el suministro *in vitro* e *in vivo* de ARNm y/u otros oligonucleótidos. En algunas realizaciones, estas composiciones de nanopartículas lipídicas mejoradas son útiles para la expresión de la proteína codificada por el ARNm. En otras realizaciones, estas composiciones de nanopartícula lipídica mejoradas son útiles para la regulación positiva de la expresión de proteínas endógenas mediante el suministro de inhibidores de miARN dirigidos a un miARN específico o a un grupo de miARN que regulan un ARNm diana o varios ARNm. En otras realizaciones, estas composiciones de nanopartículas lipídicas mejoradas son útiles para regular negativamente (por ejemplo, silenciar) los niveles de proteína y/o los niveles de ARNm de los genes diana. En algunas otras realizaciones, las nanopartículas lipídicas también son útiles para el suministro de ARNm y plásmidos para la expresión de transgenes. En otras realizaciones más, las composiciones de nanopartículas lipídicas son útiles para inducir un efecto farmacológico resultante de la expresión de una proteína, por ejemplo, producción aumentada de glóbulos rojos a través del suministro de un ARNm de eritropoyetina adecuado, o protección contra la infección a través del suministro de ARNm que codifica un anticuerpo adecuado.

Las nanopartículas lipídicas y las composiciones de las realizaciones de la presente invención pueden usarse para una diversidad de fines, incluyendo el suministro de agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos, encapsulados o asociados (por ejemplo, formando complejos) a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, las realizaciones de la presente invención pueden usarse en métodos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos en un sujeto que los necesita poniendo en contacto al sujeto con una nanopartícula lipídica que encapsula o está asociada a un agente terapéutico adecuado, en donde la nanopartícula lipídica comprende uno o más de los lípidos catiónicos novedosos descritos en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, las realizaciones de las nanopartículas lipídicas de la presente invención son particularmente útiles para el suministro de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, ARNm, oligonucleótido antisentido, ADN plasmídico, microARN (miARN), inhibidores de miARN (antagomirs/antimirs), ARN complementario que interfiere con el ARN mensajero (ARNcim), ADN, ARN multivalente, ARN sustrato de Dicer, ADN complementario (ADNc), etc. Por tanto, las nanopartículas lipídicas y las composiciones de determinadas realizaciones de la presente invención pueden usarse para inducir la expresión de una proteína deseada tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos catiónicos novedosos descritos en el presente documento, en donde la nanopartícula lipídica encapsula o se asocia a un ácido nucleico que se expresa para producir la proteína deseada (por ejemplo, un ARN mensajero o un plásmido que codifica la proteína deseada). Como alternativa, las nanopartículas lipídicas y las composiciones de algunas realizaciones de la presente invención pueden usarse para disminuir la expresión de genes diana y proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos catiónicos novedosos descritos en el presente documento, en donde la nanopartícula lipídica encapsula o se asocia a un ácido nucleico que reduce la expresión de genes diana (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido o ARN de interferencia pequeño (ARNip)). Las nanopartículas lipídicas y las composiciones de realizaciones de la presente invención también pueden usarse para el cosuministro de diferentes ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm y ADN plasmídico) por separado o en combinación, tal como pueden ser útiles para proporcionar un efecto que requiere la colocalización de diferentes ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima modificadora de genes adecuada y un segmento o segmentos de ADN para su incorporación en el genoma del hospedador).

Los ácidos nucleicos para su uso en realizaciones de la invención pueden prepararse de acuerdo con cualquier técnica disponible. Para el ARNm, la metodología primaria de preparación es, pero no se limita a, la síntesis enzimática (también denominada transcripción *in vitro*) que actualmente representa el método más eficiente para producir ARNm específico de secuencia larga. La transcripción *in vitro* describe un proceso de síntesis dirigida por moldes de moléculas de ARN a partir de un molde de ADN modificado por ingeniería genética compuesto por una secuencia promotora de bacteriófago en dirección 5' (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, la del copolífago T7, T3 y SP6) unida a una secuencia en dirección 3' que codifica el gen de interés. El ADN molde puede prepararse para la transcripción *in vitro* a partir de varias fuentes con técnicas adecuadas que son bien conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa y ADN plasmídico (véase Linpinsel, J.L y Conn, G.L., *General protocols for preparation of plasmid DNA template* y Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P. y Williams, L.D. en *RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods* v. 941 Conn G.L. (ed), Nueva York, N.Y. Humana Press, 2012)

La transcripción del ARN se produce *in vitro* usando el molde de ADN linealizado en presencia de la correspondiente ARN polimerasa y trifosfatos de ribonucleósido (rNTPs) de adenosina, guanosina, uridina y citidina en condiciones que favorecen la actividad de la polimerasa minimizando al mismo tiempo la posible degradación de los transcritos de ARNm resultantes. La transcripción *in vitro* puede realizarse usando una diversidad de equipos disponibles en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, el Sistema de Producción de ARN a Gran Escala RiboMax (Promega), Kits de Transcripción MegaScript (Life Technologies), así como con reactivos disponibles en el mercado, incluyendo polimerasas de ARN y rNTP. La metodología para la transcripción *in vitro* de ARNm es bien conocida en la técnica. (véase, por ejemplo, Losick, R., 1972, *In vitro transcription*, *Ann Rev Biochem* v. 41 409-46; Kamakaka, R. T. y Kraus, W. L. 2001. *In Vitro Transcription*. *Current Protocols in Cell Biology*. 2:11.6:11.6.1-11.6.17; Beckert, B. y Masquida, B., (2010) *Synthesis of RNA by In Vitro Transcription in RNA in Methods in Molecular Biology* v. 703 (Neilson, H. Ed), Nueva York, N.Y. Humana Press, 2010; Brunelle, J.L. y Green, R., 2013, Capítulo cinco - *In vitro transcription from plasmid or PCR-amplified DNA*, *Methods in Enzymology* v. 530, 101-114).

El ARNm transcrito *in vitro* deseado después se purifica de los componentes no deseados de la transcripción o reacciones asociadas (incluyendo los rNTP no incorporados, enzima proteínica, sales, oligos de ARN cortos, etc.). Las técnicas para el aislamiento de los transcritos de ARNm son bien conocidas en la técnica. Los procedimientos bien conocidos incluyen la extracción con fenol/cloroforno o la precipitación con alcohol (etanol, isopropanol) en presencia de cationes monovalentes o cloruro de litio. Los ejemplos no limitantes adicionales de procedimientos de purificación que pueden usarse incluyen cromatografía de exclusión por tamaño (Lukavsky, P.J. y Puglisi, J.D., 2004, *Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides*, *RNA* v. 10, 889-893), cromatografía de afinidad a base de sílice y electroforesis en gel de poliácridamida (Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P. y Williams, L.D. en *RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods* v. 941 Conn G.L. (ed), Nueva York, N.Y. Humana Press, 2012). La purificación puede realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, el Sistema de Aislamiento Total SV (SV Total Isolation System, Promega) y el Kit de Limpieza y Concentración de Transcripción *In Vitro* (*In Vitro Transcription Cleanup and Concentration Kit*, Norgen Biotek).

Además, aunque la transcripción inversa puede producir grandes cantidades de ARNm, los productos pueden contener varias impurezas de ARN aberrantes asociadas a la actividad polimerasa no deseada que puede ser necesario retirar de la preparación de ARNm de longitud completa. Éstas incluyen ARN cortos que son resultado de la iniciación abortiva de la transcripción, así como ARN bicatenario (ARNbc) generado por la actividad ARN polimerasa dependiente de ARN, transcripción cebada con ARN a partir de moldes de ARN y extensión 3' autocomplementaria. Se ha demostrado que estos contaminantes con estructuras de ARNbc pueden conducir a una actividad inmunoestimuladora no deseada a través de la interacción con diversos sensores inmunitarios innatos en las células eucarióticas que actúan reconociendo estructuras de ácidos nucleicos específicas e induciendo respuestas inmunitarias potentes. Esto, a su vez, puede reducir drásticamente la traducción del ARNm, puesto que la síntesis de proteínas se reduce durante la respuesta inmunitaria celular innata. Por tanto, se han desarrollado, y se conocen en la técnica, técnicas adicionales para retirar estos contaminantes de ARNbc, incluyendo, pero sin limitación, la purificación por HPLC escalable (véase, por ejemplo, Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. y Weissman, D., 2011, *Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside- modified, protein-encoding mRNA*, *Nud Acid Res*, v. 39 e142; Weissman, D., Pardi, N., Muramatsu, H. y Kariko, K., *HPLC Purification of in vitro transcribed long RNA in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology* v. 969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013). Se ha publicado que el ARNm purificado por HPLC se traduce a niveles mucho mayores, particularmente en células primarias e *in vivo*.

Se ha descrito en la técnica una diversidad significativa de modificaciones que se usan para alterar propiedades específicas del ARNm transcrito *in vitro* y mejorar su utilidad. Éstas incluyen, pero sin limitación, modificaciones de los extremos 5' y 3' del ARNm. Los ARNm eucariotas endógenos contienen normalmente una estructura de caperuza en el extremo 5' de una molécula madura que desempeña una función importante en la mediación de la unión de la proteína de unión a la caperuza (CBP) del ARNm, que a su vez es responsable de potenciar la estabilidad del ARNm en la célula y la eficiencia de la traducción del ARNm. Por tanto, los niveles más altos de expresión de proteínas se consiguen con transcripciones de ARNm con capuchón. El capuchón en 5' contiene un enlace 5'-5'-trifosfato entre el nucleótido más hacia el extremo 5' y un nucleótido de guanina. El nucleótido de guanina conjugado está metilado en la posición N7. Las modificaciones adicionales incluyen la metilación de los nucleótidos último y penúltimo más hacia el extremo 5' en el grupo 2'-hidroxilo.

Pueden usarse múltiples estructuras de capuchón distintas para generar el capuchón en 5' de ARNm sintético transcrito *in vitro*. La colocación de la caperuza en 5' del ARNm sintético puede realizarse cotranscripcionalmente con análogos químicos de caperuza (es decir, colocación de la caperuza durante la transcripción *in vitro*). Por ejemplo, el capuchón Anti-Análogo de Capuchón Inverso (ARCA) contiene un enlace de 5'-5'-trifosfato guanina-guanina donde una guanina contiene un grupo metilo N7 así como un grupo 3'-O-metilo. Sin embargo, hasta el 20 % de los transcritos permanecen sin caperuza durante este proceso cotranscripcional y el análogo de caperuza sintético no es idéntico a la estructura de caperuza 5' de un ARNm celular auténtico, reduciendo potencialmente la traducibilidad y la estabilidad celular. Como alternativa, a las moléculas de ARNm sintéticas también se les puede poner el capuchón enzimáticamente después de la transcripción. Esto puede generar una estructura de capuchón 5' más auténtica que

imita más estrechamente, ya sea estructural o funcionalmente, el capuchón 5' endógeno que tiene una unión potenciada de las proteínas de unión al capuchón, una semivida aumentada, una susceptibilidad reducida a las endonucleasas 5' y/o una eliminación del capuchón 5' reducida. Se han desarrollado numerosos análogos sintéticos de la caperuza 5' y se sabe en la técnica que potencian la estabilidad y la capacidad de traducción del ARNm (véase, por ejemplo, Grudzien-Nogalska, E., Kowalska, J., Su, W., Kuhn, A.N., Slepnev, S.V., Darynkiewicz, E., Sahin, E., Jemielity, J. y Rhoads, R.E., *Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation* en *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

En el extremo 3', normalmente se añade una cadena larga de nucleótidos de adenina (cola poli-A) a las moléculas de ARNm durante el procesamiento del ARN. Inmediatamente después de la transcripción, el extremo 3' del transcrito se escinde para liberar un hidroxilo 3' al que la poli-A polimerasa le añade una cadena de nucleótidos de adenina al ARN en un proceso denominado poliadenilación. Se ha demostrado ampliamente que la cola poli-A mejora tanto la eficiencia traduccional como la estabilidad del ARNm (véanse Bernstein, P. y Ross, J., 1989, *Poly (A), poly (A) binding protein and the regulation of mRNA stability*, *Trends Bio Sci* v. 14 373-377; Guhaniyogi, J. y Brewer, G., 2001, *Regulation of mRNA stability in mammalian cells*, *Gene*, v. 265, 11-23; Dreyfus, M. y Regnier, P., 2002, *The poly (A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria*, *Cell*, v.111, 611- 613).

La cola poli (A) del ARNm transcrito *in vitro* puede conseguirse usando diversos enfoques, incluyendo, pero sin limitación, la clonación de una extensión poli (T) en el molde de ADN o mediante adición post-transcripcional usando Poli (A) polimerasa. El primer caso permite la transcripción *in vitro* del ARNm con colas poli (A) de longitud definida, dependiendo del tamaño de la extensión poli (T), pero requiere una manipulación adicional del molde. El último caso implica la adición enzimática de una cola poli (A) al ARNm transcrito *in vitro* usando poli (A) polimerasa que cataliza la incorporación de restos adenina en los extremos 3' del ARN, lo que no requiere ninguna manipulación adicional del molde de ADN, pero da como resultado un ARNm con colas poli(A) de longitud heterogénea. La incorporación de caperuza 5' y cola poli (A) 3' puede realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado incluyendo, pero no limitado a, el kit Poly (A) Polymerase Tailing kit (Epicenter), el kit mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra el kit de cola Poli (A) (Life Technologies) así como con reactivos disponibles en el mercado, diversos capuchones ARCA, Poli (A) polimerasa, etc.

Además del capuchón 5' y la poli-adenilación 3', se ha publicado que otras modificaciones de las transcritos *in vitro* proporcionan beneficios con respecto a la eficiencia de la traducción y la estabilidad. Es bien sabido en la técnica que el ADN y el ARN patógenos pueden reconocerse mediante una diversidad de sensores dentro de los eucariotas y desencadenan potentes respuestas inmunitarias innatas. Se ha demostrado que la capacidad de discriminar entre el ADN y el ARN patógenos y los propios se basa, al menos en parte, en modificaciones de la estructura y los nucleósidos, puesto que la mayoría de los ácidos nucleicos de fuentes naturales contienen nucleósidos modificados. Por el contrario, el ARN sintetizado *in vitro* carece de estas modificaciones, lo que lo convierte en inmunoestimulador, lo que a su vez puede inhibir la traducción eficaz del ARNm como se ha esbozado anteriormente. La introducción de nucleósidos modificados en el ARNm transcrito *in vitro* puede usarse para impedir el reconocimiento y la activación de los sensores de ARN, mitigando de esta manera esta actividad inmunoestimuladora no deseada y potenciando la capacidad de traducción (véanse, por ejemplo, Kariko, K. y Weissman, D. 2007, *Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development*, *Curr Opin Drug Discov Devel*, v.10 523-532; Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation* en *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013); Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F.A, Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D., 2008, *Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability*, *Mol Ther* v.16, 1833-1840. Los nucleósidos y nucleótidos modificados utilizados en la síntesis de ARN modificados pueden prepararse, controlarse y utilizarse usando métodos y procedimientos generales conocidos en la técnica. Está disponible una gran diversidad de modificaciones de nucleósidos que pueden incorporarse solos o en combinación con otros nucleósidos modificados en cierto grado en el ARNm transcrito *in vitro* (véase, por ejemplo, el documento US2012/0251618). Se ha publicado que la síntesis *in vitro* de ARNm con nucleósidos modificados ha reducido la capacidad de activar los sensores inmunitarios, con la consiguiente capacidad de traducción potenciada.

Otros componentes del ARNm que pueden modificarse para proporcionar beneficios en términos de traducibilidad y estabilidad incluyen las regiones de 5' y 3' sin traducir (UTR). Se ha demostrado que la optimización de las UTR (las UTR favorables 5' y 3' pueden obtenerse a partir de ARN celulares o víricos), ya sea ambas o independientemente, aumenta la estabilidad del ARNm y la eficiencia de traducción del ARNm transcrito *in vitro* (véase, por ejemplo, Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation* en *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

Además del ARNm, pueden usarse otras cargas útiles de ácido nucleico para las realizaciones de la presente invención. Para los oligonucleótidos, los métodos de preparación incluyen, pero sin limitación, la síntesis química y la escisión química y enzimática de un precursor más largo, la transcripción *in vitro* como se ha descrito anteriormente, etc. Los métodos de síntesis de nucleótidos de ADN y ARN se usan ampliamente y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gait, M. J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire],

Washington, D.C.: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications, Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

Para el ADN plasmídico, la preparación para su uso con realizaciones de la presente invención utiliza comúnmente, pero no se limita a, expansión y aislamiento del ADN plasmídico *in vitro* en un cultivo líquido de bacterias que contienen el plásmido de interés. La presencia de un gen en el plásmido de interés que codifica la resistencia a un antibiótico particular (penicilina, kanamicina, etc.) permite que las bacterias que contienen el plásmido de interés crezcan selectivamente en cultivos que contienen antibióticos. Los métodos de aislamiento de ADN plasmídico se usan ampliamente y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Heilig, J., Elbing, K. L. y Brent, R (2001) *Large-Scale Preparation of Plasmid DNA. Current Protocols in Molecular Biology*. 41:11:1.7.1-1.7.16; Rozkov, A., Larsson, B., Gillstrom, S., Bjornestedt, R. y Schmidt, S. R. (2008), *Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. Biotechnol. Bioeng.*, 99: 557-566; y el documento US6197553B1). El aislamiento de los plásmidos puede realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, Plasmid Plus (Qiagen), los kits GenJET plasmid MaxiPrep (Thermo) y PureYield MaxiPrep (Promega), así como con reactivos disponibles en el mercado.

Diversas realizaciones ilustrativas de los lípidos catiónicos de la presente invención, las nanopartículas lipídicas y las composiciones que las comprenden y su uso para suministrar principios activos (por ejemplo, agentes terapéuticos), tales como ácidos nucleicos, para modular la expresión de genes y proteínas, se describen con más detalle a continuación.

Como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen el significado que se les atribuye, a menos que se especifique otra cosa.

A menos que el contexto requiera otra cosa, a lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y variaciones de la misma, tales como, "comprende" y "que comprende" deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como "incluyendo, pero no limitado a".

La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "una realización" o "realización" significa que un rasgo, estructura o característica particulares descritas en relación con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Por tanto, las apariciones de la expresión "en una realización" en diversos lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren todas necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La expresión "inducir la expresión de una proteína deseada" se refiere a la capacidad de un ácido nucleico de aumentar la expresión de la proteína deseada. Para examinar el alcance de la expresión de proteínas, una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de células en cultivo que expresan la proteína deseada) o un mamífero de ensayo (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un modelo animal tal como un roedor (por ejemplo, un ratón) o un modelo en primate no humano (por ejemplo, un mono)) se ponen en contacto con un ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico en combinación con un lípido de la presente invención). La expresión de la proteína deseada en la muestra de ensayo o el animal de ensayo se compara con la expresión de la proteína deseada en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de células en cultivo que expresa la proteína deseada) o un mamífero de control (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un modelo animal tal como un modelo en roedor (por ejemplo, un ratón) o un primate no humano (por ejemplo, un mono)) que no se ponen en contacto o a los que no se les administra el ácido nucleico. Cuando la proteína deseada está presente en una muestra de control o un mamífero de control, a la expresión de una proteína deseada en una muestra de control o un mamífero de control se le puede asignar un valor de 1,0. En realizaciones particulares, la inducción de la expresión de una proteína deseada se consigue cuando la relación entre la expresión de la proteína deseada en la muestra de ensayo o el mamífero de ensayo y el nivel de expresión de la proteína deseada en la muestra de control o el mamífero de control es superior a 1, por ejemplo, aproximadamente 1,1, 1,5, 2,0, 5,0 o 10,0. Cuando una proteína deseada no está presente en una muestra de control o un mamífero de control, la inducción de la expresión de una proteína deseada se consigue cuando se detecta cualquier nivel medible de la proteína deseada en la muestra de ensayo o el mamífero de ensayo. Un experto habitual en la materia comprenderá los ensayos adecuados para determinar el nivel de expresión de proteína en una muestra, por ejemplo, transferencias puntuales, trasferencias Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática y ensayos fenotípicos, o ensayos basados en proteínas indicadoras que pueden producir fluorescencia o luminiscencia en condiciones adecuadas.

La expresión "inhibir la expresión de un gen diana" se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para silenciar, reducir o inhibir la expresión de un gen diana. Para examinar el alcance del silenciamiento génico, una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de células en cultivo que expresa el gen diana) o un mamífero de ensayo (por ejemplo, un

mamífero tal como un ser humano o un modelo animal tal como un roedor (por ejemplo, un ratón) o un modelo en primate no humano (por ejemplo, un mono)) se ponen en contacto con un ácido nucleico que silencia, reduce o inhibe la expresión del gen diana. La expresión del gen diana en la muestra de ensayo o el animal de ensayo se compara con la expresión del gen diana en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de células en cultivo que expresa el gen diana) o un mamífero de control (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un modelo animal tal como un modelo en roedor (por ejemplo, un ratón) o un primate no humano (por ejemplo, un mono)) que no se ponen en contacto o a los que no se les administra el ácido nucleico. A la expresión del gen diana en una muestra de control o un mamífero de control se le puede asignar un valor del 100 %. En realizaciones particulares, el silenciamiento, la inhibición o la reducción de la expresión de un gen diana se consigue cuando el nivel de expresión de un gen diana en la muestra de ensayo o el mamífero de ensayo con respecto al nivel de expresión de un gen diana en la muestra de control o el mamífero de control es de aproximadamente el 95 %, el 90 %, el 85 %, el 80 %, el 75 %, el 70 %, el 65 %, el 60 %, el 55 %, el 50 %, el 45 %, el 40 %, el 35 %, el 30 %, el 25 %, el 20 %, el 15 %, el 10 %, el 5 % o el 0 %. En otras palabras, los ácidos nucleicos son capaces de silenciar, reducir o inhibir la expresión de un gen diana en al menos aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % en una muestra de ensayo o un mamífero de ensayo con respecto al nivel de expresión del gen diana en una muestra de control o un mamífero de control que no se ponen en contacto o a los que no se les administra el ácido nucleico. Los ensayos adecuados para determinar el nivel de expresión de genes diana incluyen, sin limitación, el examen de los niveles de proteína o ARNm usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, transferencias puntuales, transferencias Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la materia.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un principio activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico terapéutico, es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, por ejemplo, un aumento o una inhibición de la expresión de una secuencia diana en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia del ácido nucleico. Se consigue un aumento de la expresión de una secuencia diana cuando se detecta cualquier nivel medible en el caso de un producto de expresión que no está presente en ausencia del ácido nucleico. En el caso de que el producto de la expresión esté presente en algún nivel antes del contacto con el ácido nucleico, se consigue un aumento de la expresión cuando el múltiplo del aumento del valor obtenido con un ácido nucleico como el ARNm con respecto al control es de aproximadamente 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 5000, 10000 o más. La inhibición de la expresión de un gen o secuencia diana se consigue cuando el valor obtenido con un ácido nucleico tal como un oligonucleótido antisentido con respecto al control es de aproximadamente el 95 %, el 90 %, el 85 %, el 80 %, el 75 %, el 70 %, el 65 %, el 60 %, el 55 %, el 50 %, el 45 %, el 40 %, el 35 %, el 30 %, el 25 %, el 20 %, el 15 %, el 10 %, el 5 % o el 0 %. Los ensayos adecuados para medir la expresión de un gen o secuencia diana incluyen, por ejemplo, el examen de los niveles de proteína o RNA usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como transferencias puntuales, transferencias Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, fluorescencia o luminiscencia de proteínas indicadoras adecuadas, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la materia.

La expresión "ácido nucleico" 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, el ARN e híbridos de los mismos. El ADN puede tener la forma de moléculas antisentido, ADN plasmídico, ADNc, productos de PCR o vectores. El ARN puede tener la forma de un ARN en horquilla corto (ARNhc), ARN mensajero (ARNm), ARN antisentido, miARN, micARN, ARN multivalente, ARN sustrato de Dicer o ARN vírico (ARNv), y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de la cadena principal modificados, 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, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). A menos que se limite específicamente, la expresión "ácido nucleico" abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, polimorfismos de un solo nucleótido y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degeneradas generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con restos de base mixta y/o 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 de fosfato. Los nucleótidos están unidos entre sí a través de los grupos fosfato. Las "bases" incluyen purinas y pirimidinas, que además incluyen 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 alquilhaluros.

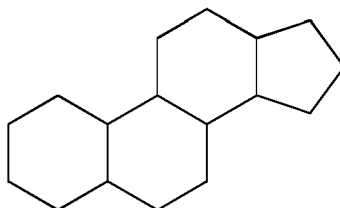
El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias codificantes de longitud parcial o total necesarias para la producción de un polipéptido o un polipéptido precursor.

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

- 5 El término "lípidio" se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que incluyen, pero sin limitación, ésteres de ácidos grasos, y se caracterizan generalmente por ser poco solubles en agua, pero solubles en muchos disolventes orgánicos. Los lípidos se dividen normalmente 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 esteroides.

10

Un "esteroide" es un compuesto que comprende la siguiente cadena principal de carbono:



- 15 Los ejemplos no limitantes de esteroides incluyen colesterol y similares.

Un "lípidio catiónico" se refiere a un lípidio capaz de tener carga positiva. Los lípidos catiónicos de ejemplo incluyen uno o más grupos amina que llevan la carga positiva. Los lípidos catiónicos ilustrativos son ionizables de tal manera que pueden existir en una forma neutra o cargada positivamente dependiendo del pH. La ionización del lípidio catiónico afecta a la carga superficial de la nanopartícula lipídica en diferentes condiciones de pH. Este estado de carga puede influir en la absorción de proteínas plasmáticas, el aclaramiento de la sangre y la distribución tisular (Semple, S.C., *et al.*, *Adv. Drug Deliv Rev* 32: 3-17 (1998)), así como en la capacidad de formar estructuras no de bicapa endosomolíticas (Hafez, I.M., *et al.*, *Gene Ther* 8: 1188-1196 (2001)) críticas para el suministro intracelular de ácidos nucleicos.

20

- 25 La expresión "nanopartícula lipídica" se refiere a partículas que tienen al menos una dimensión de orden nanométrico (por ejemplo, 1-1.000 nm) que incluyen uno o más de los compuestos de fórmula (I) u otros lípidos catiónicos especificados. En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se incluyen en una formulación que puede usarse para suministrar un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) a un sitio de interés (por ejemplo, una célula, tejido, órgano, tumor y similares). En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas de la invención comprenden un ácido nucleico. Tales nanopartículas lipídicas normalmente comprenden un compuesto de Fórmula (I) y uno o más excipientes seleccionados de lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides y lípidos conjugados con polímero. En algunas realizaciones, el agente activo o el agente terapéutico, tales como un ácido nucleico, pueden estar encapsulados en la porción lipídica de la nanopartícula lipídica o en un espacio acuoso envuelto por parte o por toda la porción lipídica de la nanopartícula lipídica, protegiéndolos de este modo de la degradación enzimática o de otros efectos no deseados inducidos por los mecanismos del organismo o las células del hospedador, por ejemplo, una respuesta inmunitaria adversa.

30

35

En diversas realizaciones, las nanopartículas lipídicas tienen un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 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, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm o de aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm o 150 nm y son sustancialmente atóxicas. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las nanopartículas lipídicas, son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Se divulgan nanopartículas lipídicas que comprenden ácidos nucleicos y su método de preparación en, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 2004/0142025, 2007/0042031 y las Pub. PCT. N.º WO 2013/016058 y WO 2013/086373.

40

45

50

Como se usa en el presente documento, "encapsulado en lípidos" se refiere a una nanopartícula lipídica que proporciona un principio activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm), con encapsulación total, encapsulación parcial, o ambas. En una realización, el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) está totalmente encapsulado en la nanopartícula lipídica.

55

La expresión "lípidio conjugado con polímero" se refiere a una molécula que comprende tanto una porción lipídica como una porción polimérica. Un ejemplo de un lípidio conjugado con polímero es un lípidio pegilado. La expresión "lípidio

pegilado" se refiere a una molécula que comprende tanto una porción de lípido como una porción de polietilenglicol. Los lípidos pegilados se conocen en la técnica e incluyen 1-(monometoxipolietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-DMG) y similares.

- 5 La expresión "lípido neutro" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma zwitteriónica sin carga o neutra a un pH seleccionado. A pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, pero sin limitación, fosfatidilcolinas tales como 1,2-Diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DSPC), 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DPPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DMPC), 1-Palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfolina (POPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DOPC), fosfatidiletanolaminas tales como 1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), esfingomielinas (SM), ceramidas, esteroides tales como esteroides y sus derivados. Los lípidos neutros pueden ser sintéticos o de origen natural.

- 15 La expresión "lípido cargado" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma con carga positiva o negativa independientemente del pH dentro de un intervalo fisiológico útil, por ejemplo, pH ~3 a pH ~9. Los lípidos cargados pueden ser sintéticos o de origen natural. Algunos ejemplos de lípidos cargados incluyen fosfatidil serinas, ácidos fosfatídicos, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositoles, hemisuccinatos de esteroles, dialquil trimetilamonio-propanos, (por ejemplo, DOTAP, DOTMA), dialquil dimetilaminopropanos, etil fosfolinas, dimetilaminoetano carbamoil esteroides (por ejemplo, DC-Col).

- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende agua.

- 25 "Estable en suero" con respecto a nanopartículas de ácido nucleico-lípido significa que el nucleótido no se degrada significativamente después de la exposición a un ensayo en suero o de nucleasa que degradaría significativamente el ADN o el ARN libres. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo en suero convencional, un ensayo de ADNasa o un ensayo de ARNasa.

- 30 "Suministro sistémico", como se usa en el presente documento, se refiere al suministro de un producto terapéutico que puede dar como resultado una amplia exposición de un agente activo dentro de un organismo.

- Algunas técnicas de administración pueden conducir al suministro sistémico de determinados agentes, pero no de otros. El suministro sistémico significa que una cantidad útil, preferentemente terapéutica, de un agente se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. El suministro sistémico de nanopartículas lipídicas puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, suministro intravenoso, intraarterial, subcutáneo e intraperitoneal. En algunas realizaciones, el suministro sistémico de nanopartículas lipídicas es por suministro intravenoso.

- 40 "Suministro local", como se usa en el presente documento, se refiere a el suministro de un agente activo directamente en un sitio diana dentro de un organismo. Por ejemplo, un agente puede suministrarse localmente por inyección directa en un sitio patológico tal como un tumor, otro sitio diana tal como un sitio de inflamación, o un órgano diana tal como el hígado, el corazón, el páncreas, el riñón y similares. El suministro local también puede incluir aplicaciones tópicas o técnicas de inyección localizada tales como la inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica. El suministro local no excluye un efecto farmacológico sistémico.

- 45 "Alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que está saturado o insaturado (es decir, contiene uno o más dobles y/o triples enlaces), que tiene, por ejemplo, de uno a veinticuatro átomos de carbono (alquilo C₁-C₂₄), de cuatro a veinte átomos de carbono (alquilo C₄-C₂₀), de seis a dieciséis átomos de carbono (alquilo C₆-C₁₆), de seis a nueve átomos de carbono (alquilo C₆-C₉), de uno a quince átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₅), de uno a doce átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₂), de uno a ocho átomos de carbono (alquilo C₁-C₈) o de uno a seis átomos de carbono (alquilo C₁-C₆) y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo, etenilo, prop 1-enilo, but 1-enilo, pent 1-enilo, penta 1,4-dienilo, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo y similares. Salvo se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo alquilo está opcionalmente sustituido.

- 55 "Alquilenos" o "cadena de alquilenos" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente, lineal o ramificada que enlaza el resto de la molécula a un grupo radical, que consiste únicamente en carbono e hidrógeno, que está saturado o insaturado (es decir, contiene uno o más dobles y/o triples enlaces) y que tiene, por ejemplo, de uno a veinticuatro átomos de carbono (alquilenos C₁-C₂₄), de uno a quince átomos de carbono (alquilenos C₁-C₁₅), de uno a doce átomos de carbono (alquilenos C₁-C₁₂), de uno a ocho átomos de carbono (alquilenos C₁-C₈), de uno a seis átomos de carbono (alquilenos C₁-C₆), de dos a cuatro átomos de carbono (alquilenos C₂-C₄), de uno a dos átomos de carbono (alquilenos C₁-C₂), por ejemplo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butenileno y similares. La cadena de alquilenos está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo o doble y al grupo radical a través de un enlace sencillo o doble. Los puntos de unión de la cadena de alquilenos al resto de la molécula y al grupo radical pueden ser a través de un carbono o cualquiera de dos carbonos en el interior de la cadena. Salvo se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, una cadena de alquilenos puede estar opcionalmente sustituida.

"Heterociclilo" o "anillo heterocíclico" se refiere a un radical de anillo no aromático estable de 3 a 18 miembros (por ejemplo, 5, 6 o 7 miembros) que tiene de uno a doce átomos de carbono en el anillo (por ejemplo, de dos a doce) y de uno a seis heteroátomos en el anillo seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. Salvo se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el radical heterociclilo puede ser un sistema de anillos monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados o puenteados; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterociclilo puede estar parcial o totalmente saturado. Los ejemplos de dichos radicales heterociclilo incluyen, pero sin limitación, dioxolanilo, tienil[1,3]ditanilo, decahidroisoquinolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, quinuclidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrofurilo, tritanilo, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, tiamorfolinilo, 1-oxo-tiomorfolinilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. Salvo se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo heterociclilo puede estar opcionalmente sustituido.

El término "sustituido" usado en el presente documento significa cualquiera de los grupos anteriores (por ejemplo, alquilo, alquileo o heterociclilo) en donde al menos un átomo de hidrógeno (por ejemplo, 1, 2, 3 o todos los átomos de hidrógeno) se reemplaza por un enlace a un átomo distinto de hidrógeno tal como, pero no limitado a: un átomo de halógeno tal como F, Cl, Br o I; grupos oxo (=O); grupos hidroxilo (-OH); grupos alquilo C₁-C₁₂; grupos cicloalquilo; -C(=O)OR'; -O(C=O)R'; -C(=O)R'; -OR'; -S(O)_xR'; -S-SR'; -C(=O)SR'; -SC(=O)R'; -NR'R'; -NR'C(=O)R'; -C(=O)NR'R'; -NR'C(=O)NR'R'; -OC(=O)NR'R'; -NR'C(=O)OR'; -NR'S(O)_xNR'R'; -NR'S(O)_xR'; y -S(O)_xNR'R', en donde: R' es, en cada aparición, independientemente H, alquilo o cicloalquilo C₁-C₁₅ y x es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, el sustituyente es un grupo alquilo C₁-C₁₂. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo cicloalquilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo halo, tal como fluoro. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo oxo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo hidroxilo.

En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo alcoxi. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo carboxilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo amino.

"Opcional" u "opcionalmente" (por ejemplo, opcionalmente sustituido) significa que el evento de circunstancias descrito posteriormente puede o no ocurrir, y que la descripción incluye los casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y los casos en los que no ocurre. Por ejemplo, "alquilo opcionalmente sustituido" significa que el radical alquilo puede o no estar sustituido y que la descripción incluye tanto radicales alquilo sustituidos o como radicales alquilo que no tienen sustitución.

"Profármaco" pretende indicar un compuesto que puede convertirse en condiciones fisiológicas o mediante solvolisis en un compuesto biológicamente activo de la invención. Por tanto, el término "profármaco" se refiere a un precursor metabólico de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede estar inactivo cuando se administra a un sujeto que lo necesita, pero se convierte *in vivo* a un compuesto activo de la invención. Los profármacos normalmente se transforman rápidamente *in vivo* para producir el compuesto original de la invención, por ejemplo, por hidrólisis en sangre. El compuesto profármaco a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o liberación retrasada en un organismo mamífero (véase, Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), pp. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam)). Se proporciona un análisis de profármacos en Higuchi, T., *et al.*, A.C.S. Symposium Series, vol. 14 y en Bioreversible Carriers in Drug Design, Ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

El término "profármaco" también pretende incluir cualquier vehículo unido covalentemente, que libera el compuesto activo de la invención *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de un compuesto de la invención (por ejemplo, el compuesto de fórmula (I)) pueden prepararse modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto de la invención de tal manera que las modificaciones se escindan, ya sea por manipulación rutinaria o *in vivo*, al compuesto original de la invención. Los profármacos incluyen compuestos de la invención en donde un grupo hidroxilo, amino o mercapto está unido a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto de la invención se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero sin limitación, acetato, derivados de formiato y benzoato de alcohol o derivados de amida de grupos funcionales amina en los compuestos de la invención y similares.

Las realizaciones de la invención divulgada en el presente documento también pretenden abarcar todos los compuestos farmacéuticamente aceptables del compuesto de Fórmula (I) que están marcados isotópicamente teniendo uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferentes. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos divulgados incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, cloro y yodo, tales como ²H, ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹³N, ¹⁵N, ¹⁵O, ¹⁷O, ¹⁸O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶Cl, ¹²³I y ¹²⁵I, respectivamente. Estos compuestos radiomarcados pueden ser útiles para ayudar a determinar o medir la eficacia de los compuestos, caracterizando, por ejemplo, el sitio o el modo de acción, o la afinidad de unión con el sitio de acción farmacológicamente importante. Determinados compuestos marcados isotópicamente que tienen una estructura de Fórmula (I) o (II), por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radioactivo, son útiles

en estudios de distribución tisular de fármaco y/o sustrato. Los isótopos radioactivos tritio, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente útiles para este fin en vista de su facilidad de incorporación y de los medios de detección disponibles.

- 5 La sustitución por isótopos más pesados tales como deuterio, es decir, ^2H , puede ofrecer determinadas ventajas terapéuticas derivadas de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una semivida *in vivo* aumentada o necesidades de dosis reducidas y, por tanto, puede preferirse en algunas circunstancias.

- 10 La sustitución con isótopos de emisión de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede resultar útil en estudios de Topografía de Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Los compuestos marcados isotópicamente de Fórmula (I) de (II) generalmente pueden prepararse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia o mediante procesos análogos a los descritos en las Preparaciones y los Ejemplos que se exponen a continuación usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado empleado anteriormente.

- 15 Los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos divulgados, que no forman parte de la invención reivindicada, puede resultar de, por ejemplo, la oxidación, la reducción, la hidrólisis, la amidación, la esterificación y similares del compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. En consecuencia, dichos productos pueden producirse mediante un proceso que comprende administrar un compuesto de esta invención a un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo. Dichos productos habitualmente se identifican administrando un compuesto radiomarcado de la invención en una dosis detectable a un animal, tal como una rata, un ratón, una cobaya, un mono o un ser humano, permitiendo un tiempo suficiente para que tenga lugar el metabolismo, y aislando sus productos de conversión de la orina, la sangre u otras muestras biológicas.

- 25 Con "compuesto estable" y "estructura estable" se pretende indicar un compuesto que es lo suficientemente sólido como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado de pureza útil de una mezcla de reacción y la formulación en un agente terapéutico eficaz.

- 30 "Mamífero" incluye seres humanos y tanto animales domésticos tales como animales de laboratorio como mascotas domésticas (por ejemplo, gatos, perros, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos, conejos) y animales no domésticos tales como animales salvajes y similares.

- 35 "Vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables" incluye sin limitación cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, sustancia de deslizamiento, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, potenciador de aroma, tensioactivo, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, estabilizante, agente isotónico, disolvente o emulsionante que haya sido aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos como aceptable para su uso en seres humanos o animales domésticos.

- 40 "Sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales de adición de ácido y sales de adición de base.

- 45 "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres, que no son biológicamente o de otra forma indeseables y que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como, pero sin limitación, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido alcanfórico, ácido alcanfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutarico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido láurico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebáico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico y similares.

- 60 "Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otra forma no deseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero sin limitación, las sales de sodio, de potasio, de litio, de amonio, de calcio, de magnesio, de hierro, de cinc, de cobre, de manganeso, de aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, de sodio, de potasio, de calcio y de magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como resinas de amoniaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina,

colina, betaína, benetamina, benzatina, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, *N*-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Son bases orgánicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitclohexilamina, colina y cafeína.

5 Con frecuencia las cristalizaciones producen un solvato del compuesto de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un agregado que comprende una o más moléculas de un compuesto de la invención con una o más moléculas de disolvente. El disolvente puede ser agua, en cuyo caso el solvato puede ser un hidrato. Como alternativa, el disolvente puede ser un disolvente orgánico. Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden existir como un hidrato, incluyendo un monohidrato, dihidrato, hemihidrato, sesquihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares, así como las correspondientes formas solvatadas. El compuesto de la invención puede ser un solvato verdadero, mientras que en otros casos, el compuesto de la invención puede simplemente retener agua adventicia o ser una mezcla de agua más algún disolvente adventicio.

15 Una "composición farmacéutica" se refiere a una formulación de un compuesto de la invención y un medio generalmente aceptado en la técnica para el suministro del compuesto biológicamente activo a mamíferos, por ejemplo, seres humanos. Un medio de este tipo incluye todos los vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para ello.

20 "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de un compuesto de la invención, o una nanopartícula lipídica que comprende el mismo, que, cuando se administra a un mamífero, preferentemente un ser humano, es suficiente para efectuar el tratamiento en el mamífero, preferentemente un ser humano. La cantidad de una nanopartícula lipídica de la invención que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la afección y su gravedad, la forma de administración y la edad del mamífero que ha de tratarse, pero puede determinarse rutinariamente por un experto habitual en la materia teniendo en cuenta su propio conocimiento y la presente divulgación.

"Tratar" o "tratamiento" como se usa en el presente documento abarca el tratamiento de la enfermedad o la afección de interés en un mamífero, preferentemente un ser humano, que tiene la enfermedad o afección de interés, e incluye:

30 (i) prevenir que la enfermedad o afección se produzca en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero está predispuesto a la afección pero aún no se le ha diagnosticado;
 (ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo;
 (iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir, provocar una regresión de la enfermedad o afección; o
 35 (iv) aliviar los síntomas resultantes de la enfermedad o afección, es decir, aliviar el dolor sin abordar la enfermedad o afección subyacente. Como se usa en el presente documento, los términos "enfermedad" y "afección" pueden usarse indistintamente o pueden ser diferentes en el sentido de que la enfermedad o afección concreta puede no tener un agente causal conocido (de manera que aún no se ha determinado su etiología) y, por tanto, no se reconoce aún como una enfermedad sino solamente como una afección o síndrome no deseable, en donde los médicos han identificado un conjunto más o menos específico de síntomas.

40 Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden contener uno o más centros asimétricos y pueden, por tanto, originar enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estequiometría absoluta, como (R)- o (S)- o, como (D)- o (L)- para los aminoácidos.

45 Las realizaciones de la presente invención pretenden incluir todos dichos isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Pueden prepararse isómeros (+) y (-), (R)- y (S)- o (D)- y (L)- ópticamente activos usando sintonos quirales o reactivos quirales, o pueden resolverse usando técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía y cristalización fraccionada. Las técnicas convencionales para la preparación/aislamiento de enantiómeros individuales incluyen la síntesis quiral a partir de un precursor ópticamente puro adecuado o la resolución del racemato (o el racemato de una sal o derivado) usando, por ejemplo, cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) quiral. Cuando los compuestos que se describen en el presente documento contienen dobles enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica y, a menos que se especifique otra cosa, se pretende que los compuestos incluyan los isómeros geométricos tanto E como Z. Análogamente, también se pretende incluir todas las formas tautoméricas.

55 Un "estereoisómero" se refiere a un compuesto formado por los mismos átomos unidos mediante los mismos enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables. Las realizaciones de la presente invención contemplan diversos estereoisómeros y mezclas de los mismos e incluyen "enantiómeros", que se refieren a dos estereoisómeros cuyas moléculas son imágenes especulares no superponibles entre sí.

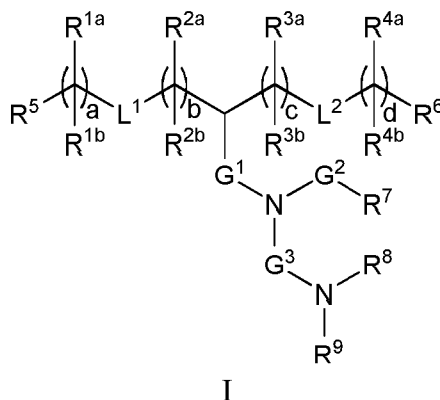
60 Un "tautómero" se refiere a un desplazamiento de un protón desde un átomo de una molécula hasta otro átomo de la misma molécula. Las realizaciones de la presente invención incluyen tautómeros de cualquiera de dichos compuestos.

Compuestos

65 En un aspecto, la invención proporciona nuevos compuestos lipídicos que son capaces de combinarse con otros

componentes lipídicos tales como lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides y/o lípidos conjugados con polímero para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que estas nanopartículas lipídicas protegen a los oligonucleótidos de la degradación en el suero y proporcionan un suministro eficaz de oligonucleótidos a células *in vitro* e *in vivo*.

5 Algunos compuestos lipídicos de la invención como se definen en las reivindicaciones adjuntas se encuentran dentro de la estructura de Fórmula (I):



10 o una sal, tautómero o estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde:

15 L¹ y L² son cada uno independientemente -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)_x-, -S-S-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -NR^aC(=O)-, -C(=O)NR^a-, -NR^aC(=O)NR^a-, -OC(=O)NR^a-, -NR^aC(=O)O- o un enlace directo;

G¹ es alquileo C₁-C₂-, -(C=O)-, -O(C=O)-, -SC(=O)-, -NR^aC(=O)- o un enlace directo;

G² es -C(=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)S-, -C(=O)NR^a- o un enlace directo;

G³ es alquileo C₁-C₆;

R^a es H o alquilo C₁-C₁₂;

20 R^{1a} y R^{1b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{1a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

25 R^{2a} y R^{2b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{2a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{2b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

R^{3a} y R^{3b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{3a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{3b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{3b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

30 R^{4a} y R^{4b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{4a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{4b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente H o metilo;

R⁷ es alquilo C₄-C₂₀;

35 R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente alquilo C₁-C₁₂; o R⁸ y R⁹, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, formar un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros;

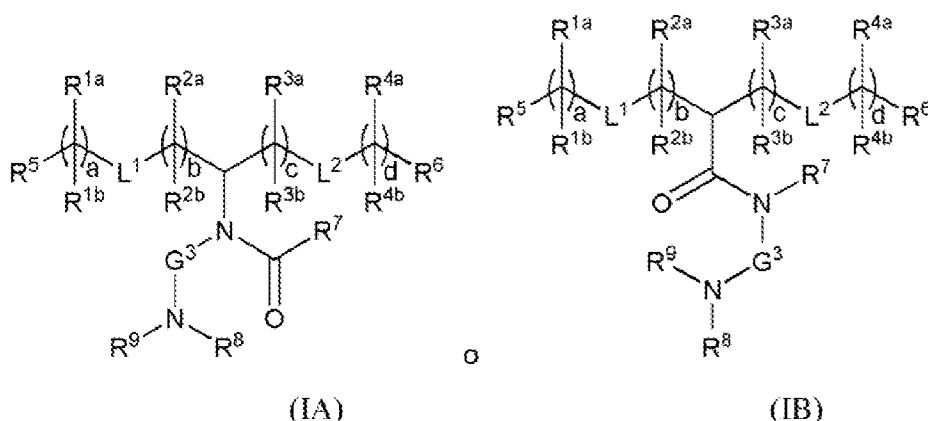
a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 1 a 24; y

x es 0, 1 o 2.

40 En algunas realizaciones, L¹ y L² son cada uno independientemente -O(C=O)-, -(C=O)O- o un enlace directo. En otras realizaciones, G¹ y G² son cada uno independientemente -(C=O)- o un enlace directo. En algunas realizaciones diferentes, L¹ y L² son cada uno independientemente -O(C=O)-, -(C=O)O- o un enlace directo; y G¹ y G² son cada uno independientemente -(C=O)- o un enlace directo.

45 En algunas realizaciones diferentes, L¹ y L² son cada uno independientemente -C(=O)-, -O-, -S(O)_x-, -S-S-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -NR^a-, -NR^aC(=O)-, -C(=O)NR^a-, -NR^aC(=O)NR^a-, -OC(=O)NR^a-, -NR^aC(=O)O-, -NR^aS(O)_xNR^a-, -NR^aS(O)_x- o -S(O)_xNR^a-.

En la presente invención, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IA) o (IB):



En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura (IA). En otras realizaciones, el compuesto tiene estructura (IB).

En cualquiera de las realizaciones anteriores, uno de L¹ o L² es -O(C=O)-. Por ejemplo, en algunas realizaciones cada uno de L¹ y L² son -O(C=O)-.

En algunas realizaciones diferentes de cualquiera de las anteriores, uno de L¹ o L² es -(C=O)O-. Por ejemplo, en algunas realizaciones cada uno de L¹ y L² son -O(C=O)-.

En diferentes realizaciones, uno de L¹ o L² es un enlace directo. Como se usa en el presente documento, un "enlace directo" significa que el grupo (por ejemplo, L¹ o L²) está ausente. Por ejemplo, en algunas realizaciones cada uno de L¹ y L² es un enlace directo.

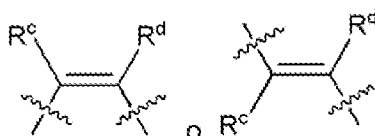
En algunas otras realizaciones diferentes de las anteriores, para al menos una aparición de R^{1a} y R^{1b}, R^{1a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono.

Aún en otras realizaciones diferentes, para al menos una aparición de R^{4a} y R^{4b}, R^{4a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{4b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono.

En más realizaciones, para al menos una aparición de R^{2a} y R^{2b}, R^{2a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{2b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono.

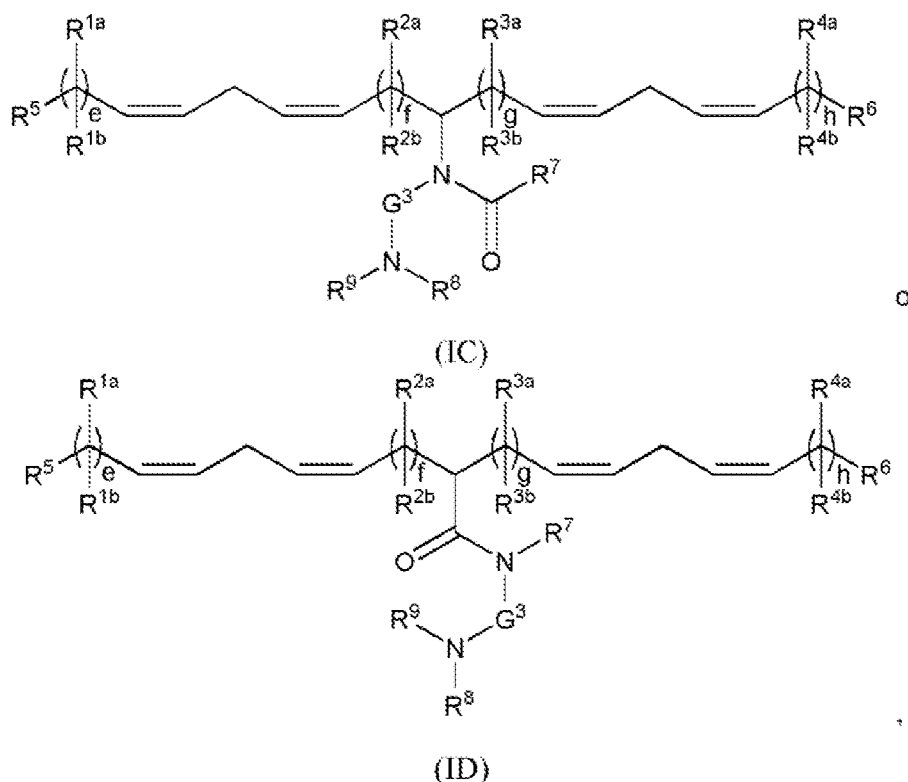
En otras realizaciones diferentes de cualquiera de los anteriores, para al menos una aparición de R^{3a} y R^{3b}, R^{3a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{3b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{3b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono.

Se entiende que el doble enlace "carbono-carbono" se refiere a una de las siguientes estructuras:



en donde R^c y R^d son, en cada aparición, independientemente H o un sustituyente. Por ejemplo, en algunas realizaciones R^c y R^d son, en cada aparición, independientemente H, alquilo o cicloalquilo C₁-C₁₂, por ejemplo, H o alquilo C₁-C₁₂.

En diversas realizaciones distintas, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IC) o (ID):



en donde e, f, g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 12.

- 5 En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura (IC). En otras realizaciones, el compuesto tiene la estructura (ID).

En diversas realizaciones de los compuestos de estructuras (IC) o (ID), e, f, g y h son cada uno independientemente un número entero de 4 a 10.

- 10 En determinadas realizaciones de lo anterior, a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 2 a 12 o un número entero de 4 a 12. En otras realizaciones, a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 8 a 12 o de 5 a 9. En algunas realizaciones determinadas, a es 0. En algunas realizaciones, a es 1. En otras realizaciones, a es 2. En más realizaciones, a es 3. En otras realizaciones más, a es 4. En algunas realizaciones, a es 5. En otras realizaciones, a es 6. En más realizaciones, a es 7. En otras realizaciones más, a es 8. En algunas realizaciones, a es 9. En otras realizaciones, a es 10. En más realizaciones, a es 11. En otras realizaciones más, a es 12. En algunas realizaciones, a es 13. En otras realizaciones, a es 14. En más realizaciones, a es 15.

En otras realizaciones más, a es 16.

- 20 En algunas realizaciones, b es 1. En otras realizaciones, b es 2. En más realizaciones, b es 3. En otras realizaciones más, b es 4. En algunas realizaciones, b es 5.

- 25 En otras realizaciones, b es 6. En más realizaciones, b es 7. En otras realizaciones más, b es 8. En algunas realizaciones, b es 9. En otras realizaciones, b es 10. En más realizaciones, b es 11. En otras realizaciones más, b es 12. En algunas realizaciones, b es 13. En otras realizaciones, b es 14. En más realizaciones, b es 15. En otras realizaciones más, b es 16.

- 30 En algunas realizaciones, c es 1. En otras realizaciones, c es 2. En más realizaciones, c es 3. En otras realizaciones más, c es 4. En algunas realizaciones, c es 5.

- En otras realizaciones, c es 6. En más realizaciones, c es 7. En otras realizaciones más, c es 8. En algunas realizaciones, c es 9. En otras realizaciones, c es 10. En más realizaciones, c es 11. En otras realizaciones más, c es 12. En algunas realizaciones, c es 13. En otras realizaciones, c es 14. En más realizaciones, c es 15. En otras realizaciones más, c es 16.

En algunas realizaciones determinadas, d es 0. En algunas realizaciones, d es 1. En otras realizaciones, d es 2. En más realizaciones, d es 3. En otras realizaciones más, d es 4. En algunas realizaciones, d es 5. En otras realizaciones,

d es 6. En más realizaciones, d es 7. En otras realizaciones más, d es 8. En algunas realizaciones, d es 9.

En otras realizaciones, d es 10. En más realizaciones, d es 11. En otras realizaciones más, d es 12. En algunas realizaciones, d es 13. En otras realizaciones, d es 14.

5

En más realizaciones, d es 15. En otras realizaciones más, d es 16.

En algunas realizaciones, e es 1. En otras realizaciones, e es 2. En más realizaciones, e es 3. En otras realizaciones más, e es 4. En algunas realizaciones, e es 5.

10

En otras realizaciones, e es 6. En más realizaciones, e es 7. En otras realizaciones más, e es 8. En algunas realizaciones, e es 9. En otras realizaciones, e es 10. En más realizaciones, e es 11. En otras realizaciones más, e es 12.

15

En algunas realizaciones, f es 1. En otras realizaciones, f es 2. En más realizaciones, f es 3. En otras realizaciones más, f es 4. En algunas realizaciones, f es 5. En otras realizaciones, f es 6. En más realizaciones, f es 7. En otras realizaciones más, f es 8. En algunas realizaciones, f es 9. En otras realizaciones, f es 10. En más realizaciones, f es 11. En otras realizaciones más, f es 12.

20

En algunas realizaciones, g es 1. En otras realizaciones, g es 2. En más realizaciones, g es 3. En otras realizaciones más, g es 4. En algunas realizaciones, g es 5.

En otras realizaciones, g es 6. En más realizaciones, g es 7. En otras realizaciones más, g es 8. En algunas realizaciones, g es 9. En otras realizaciones, g es 10. En más realizaciones, g es 11. En otras realizaciones más, g es 12.

25

En algunas realizaciones, h es 1. En otras realizaciones, e es 2. En más realizaciones, h es 3. En otras realizaciones más, h es 4. En algunas realizaciones, e es 5.

30

En otras realizaciones, h es 6. En más realizaciones, h es 7. En otras realizaciones más, h es 8. En algunas realizaciones, h es 9. En otras realizaciones, h es 10. En más realizaciones, h es 11. En otras realizaciones más, h es 12.

35

En algunas otras realizaciones diversas, a y d son iguales. En algunas otras realizaciones, b y c son iguales. En algunas otras realizaciones específicas a y d son iguales y b y c son iguales.

La suma de a y b y la suma de c y d son factores que pueden variarse para producir un lípido que tenga las propiedades deseadas. En una realización, a y b se eligen de tal manera que su suma sea un número entero que varíe de 14 a 24. En otras realizaciones, c y d se eligen de tal manera que su suma sea un número entero que varíe de 14 a 24. En una realización adicional, la suma de a y b y la suma de c y d son iguales. Por ejemplo, en algunas realizaciones la suma de a y b y la suma de c y d son ambas el mismo número entero que puede variar de 14 a 24. En aún más realizaciones, a, b, c y d se seleccionan de tal manera que la suma de a y b y la suma de c y d sea 12 o más.

40

45

Los sustituyentes en R^{1a}, R^{2a}, R^{3a} y R^{4a} no están particularmente limitados. En algunas realizaciones, al menos uno de R^{1a}, R^{2a}, R^{3a} y R^{4a} es H. En determinadas realizaciones R^{1a}, R^{2a}, R^{3a} y R^{4a} son H en cada aparición. En algunas otras realizaciones al menos uno de R^{1a}, R^{2a}, R^{3a} y R^{4a} es alquilo C₁-C₁₂. En algunas otras realizaciones al menos uno de R^{1a}, R^{2a}, R^{3a} y R^{4a} es alquilo C₁-C₈. En algunas otras realizaciones al menos uno de R^{1a}, R^{2a}, R^{3a} y R^{4a} es alquilo C₁-C₆. En algunas de las realizaciones anteriores, el alquilo C₁-C₈ es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, *tert*-butilo, n-hexilo o n-octilo.

50

En determinadas realizaciones de lo anterior, R^{1a}, R^{1b}, R^{4a} y R^{4b} son alquilo C₁-C₁₂ en cada aparición.

En realizaciones adicionales de lo anterior, al menos uno de R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} y R^{4b} es H o R^{1b}, R^{2b}, R^{3b} y R^{4b} son H en cada aparición.

55

En determinadas realizaciones de lo anterior, R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono. En otras realizaciones de lo anterior R^{4b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono.

60

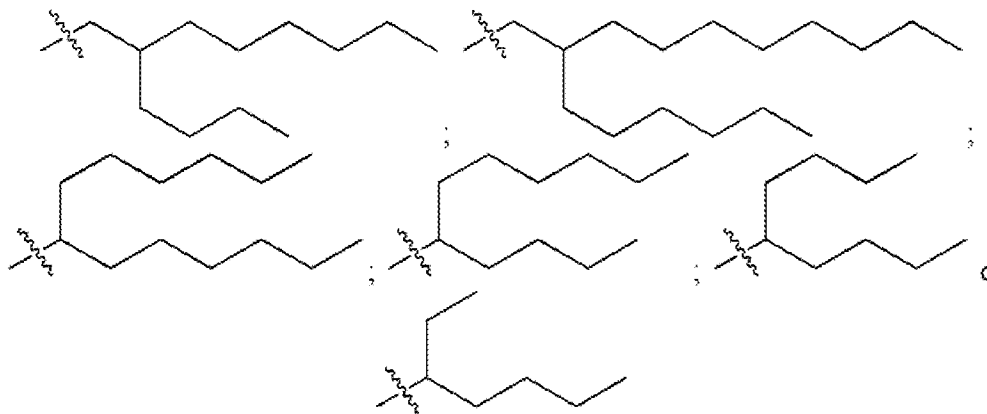
Los sustituyentes en R⁵ y R⁶ no se limitan particularmente en las realizaciones anteriores. En determinadas realizaciones uno de R⁵ o R⁶ es metilo. En otras realizaciones cada uno de R⁵ o R⁶ es metilo.

65

Los sustituyentes en R⁷ no están particularmente limitados en las realizaciones anteriores. En determinadas realizaciones R⁷ es alquilo C₆-C₁₆. En algunas otras realizaciones, R⁷ es alquilo C₆-C₉. En algunas de estas realizaciones, R⁷ está sustituido con -(C=O)O^b, -O(C=O)R^b, -C(=O)R^b, -OR^b, -S(O)_xR^b, -S-SR^b, -C(=O)SR^b, -SC(=O)R^b,

$-NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)R^b$, $-C(=O)NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)NR^aR^b$, $-OC(=O)NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)OR^b$, $-NR^aS(O)_xNR^aR^b$, $-NR^aS(O)_xR^b$ o $-S(O)_xNR^aR^b$, en donde: R^a es H o alquilo C_1-C_{12} ; R^b es alquilo C_1-C_{15} ; y x es 0, 1 o 2. Por ejemplo, en algunas realizaciones R^7 está sustituido con $-(C=O)O^b$ o $-O(C=O)R^b$.

- 5 En diversas de las realizaciones anteriores, R^b es alquilo C_1-C_{15} ramificado. Por ejemplo, en algunas realizaciones R^b tiene una de las siguientes estructuras:



- 10 En determinadas otras de las realizaciones anteriores, uno de R^8 o R^9 es metilo. En otras realizaciones, tanto R^8 como R^9 son metilo.

En algunas realizaciones diferentes, R^8 y R^9 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros. En algunas realizaciones de lo anterior, R^8 y R^9 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico de 5 miembros, por ejemplo, un anillo de pirrolidinilo. En algunas realizaciones diferentes de las anteriores, R^8 y R^9 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico de 6 miembros, por ejemplo, un anillo piperazinilo.

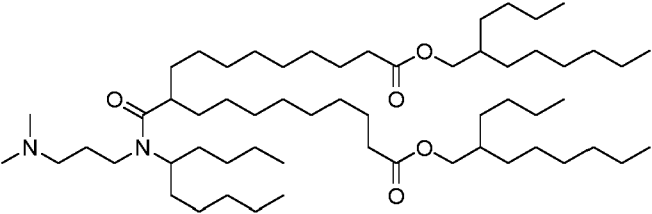
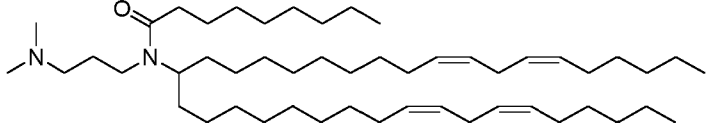
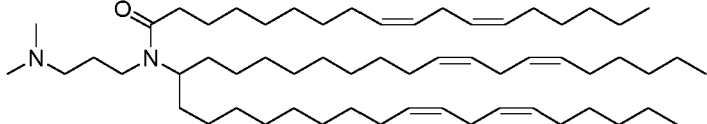
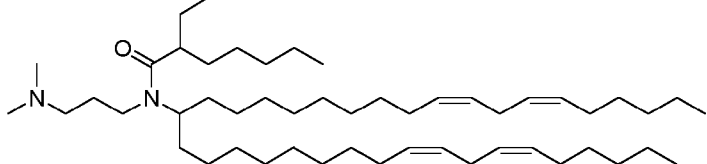
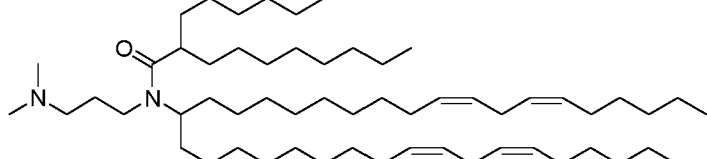
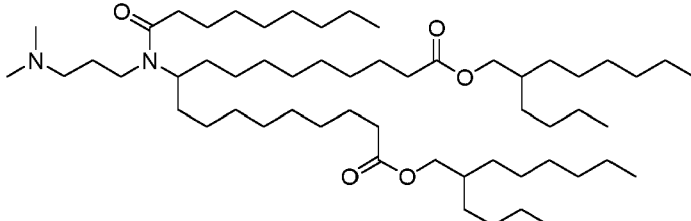
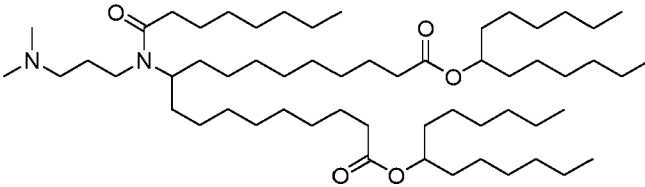
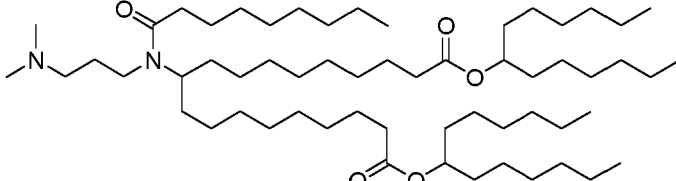
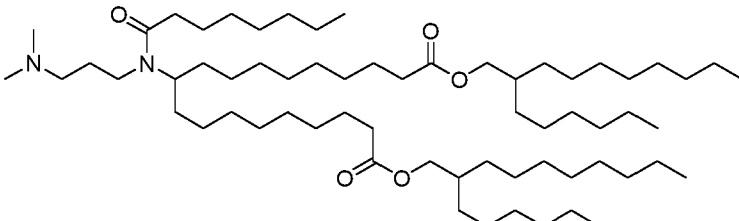
- 20 En otras realizaciones más de los compuestos anteriores, G^3 es alquileo C_2-C_4 , por ejemplo, alquileo C_3 .

En diversas realizaciones diferentes, el compuesto tiene una de las estructuras 4-46 expuestas en la Tabla 1 a continuación.

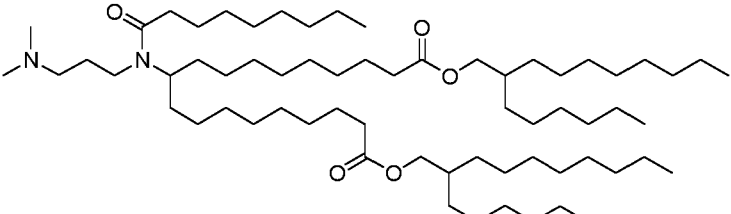
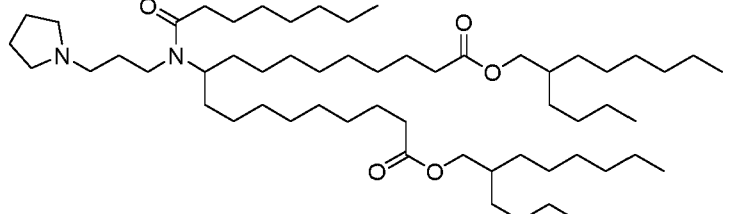
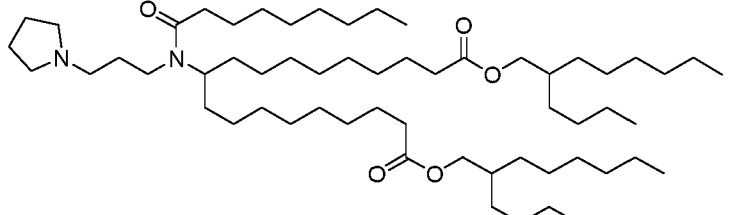
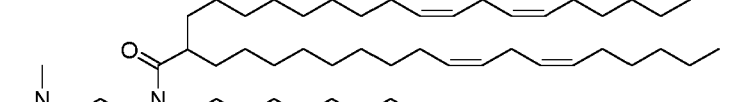
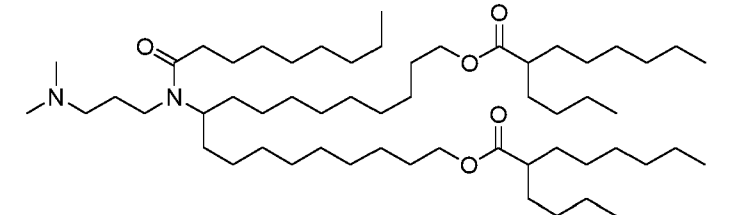
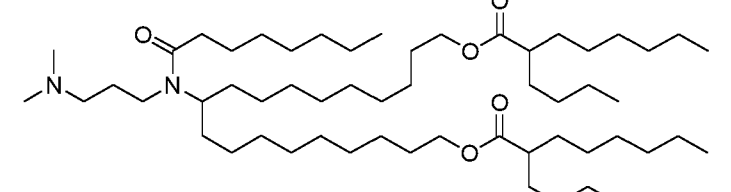
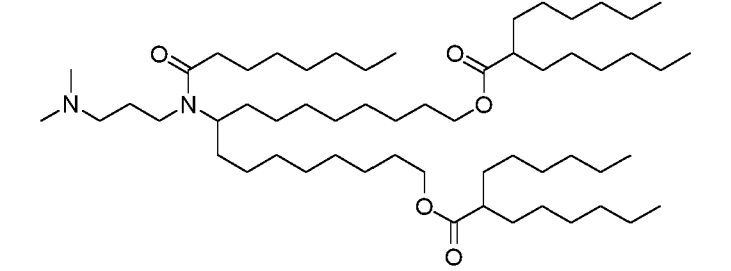
Tabla 1
Compuestos representativos
(los compuestos 1, 2, 3 y 6 no forman parte de la invención reivindicada)

N.º	Estructura	Método de preparación
1		A
2		A
3		A

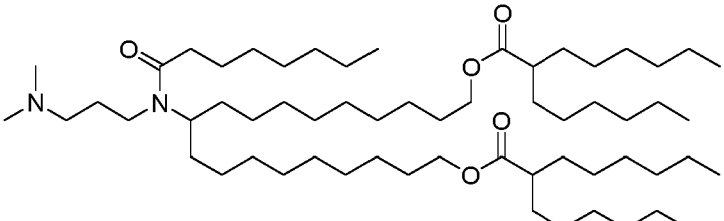
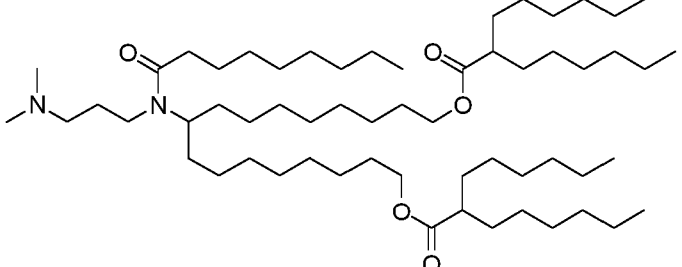
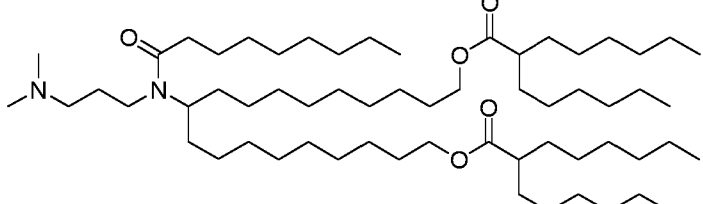
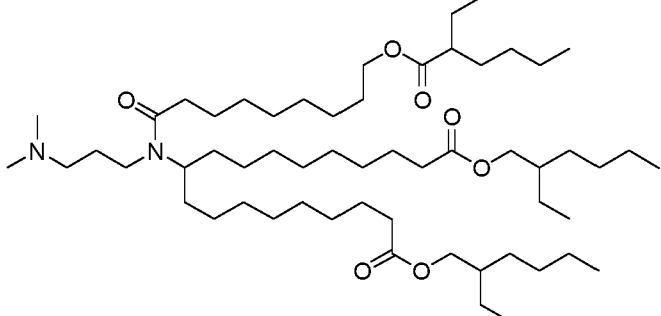
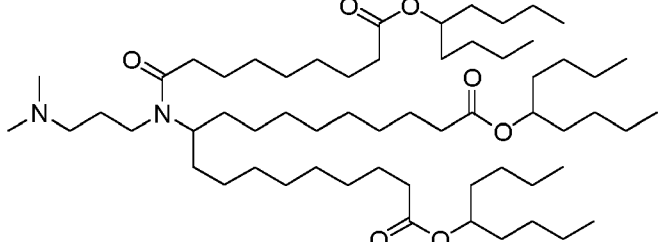
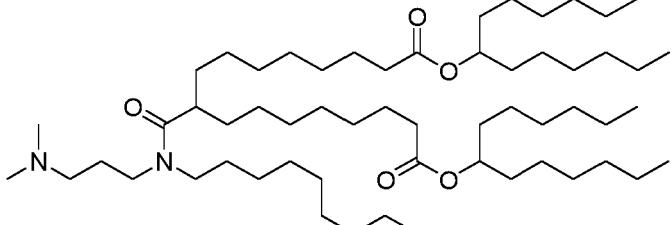
(continuación)

N.º	Estructura	Método de preparación
4		B
5		A
6		A
7		A
8		A
9		A
10		A
11		A
12		A

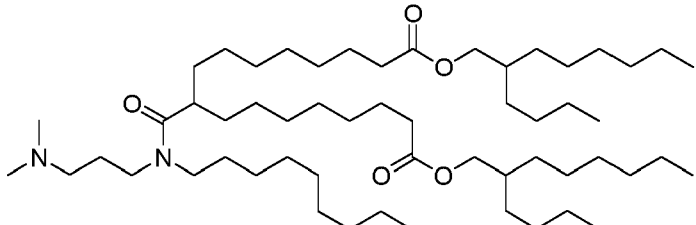
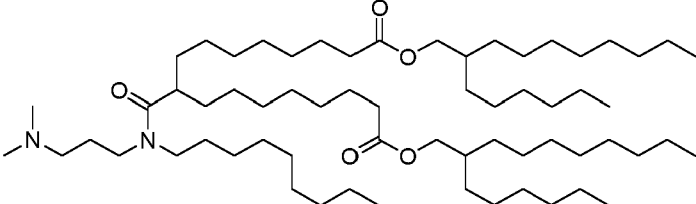
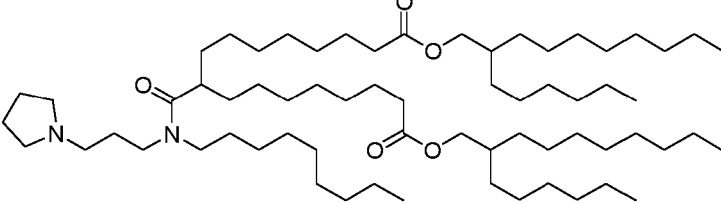
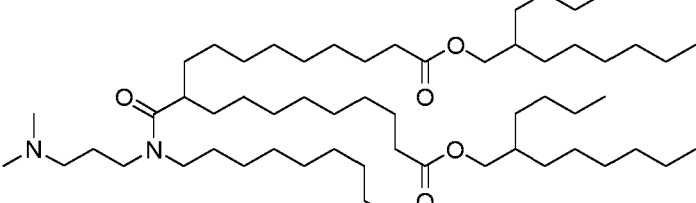
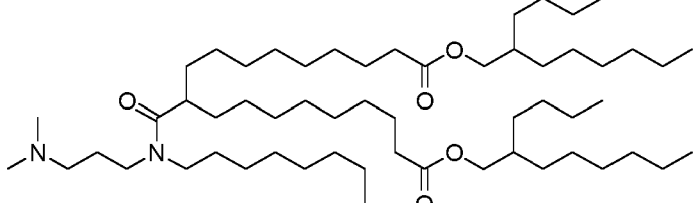
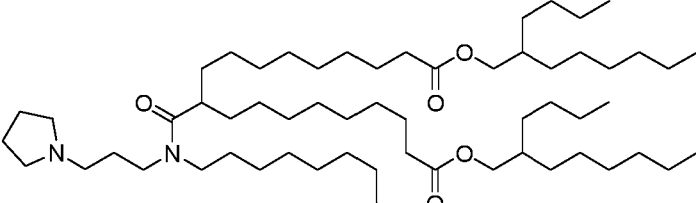
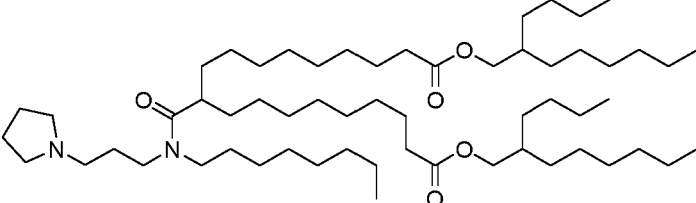
(continuación)

N.º	Estructura	Método de preparación
13		A
14		A
15		A
16		B
17		C
18		A
19		A

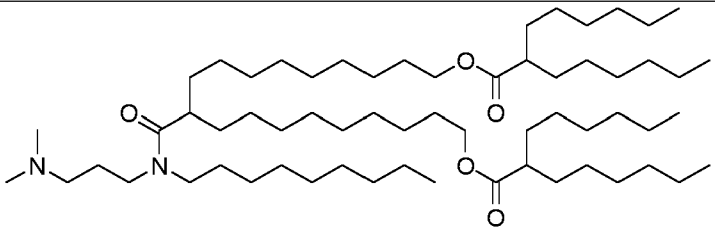
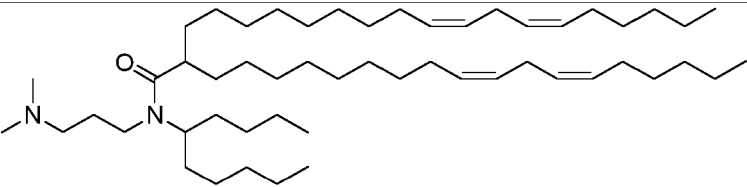
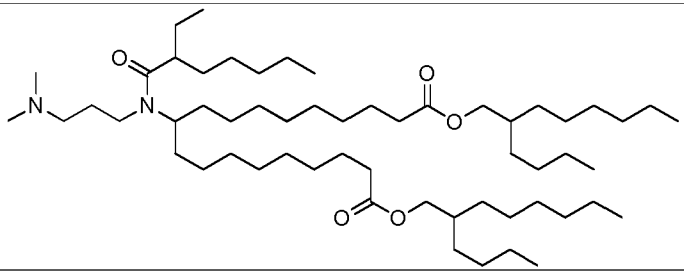
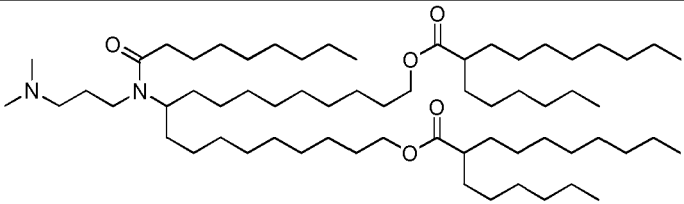
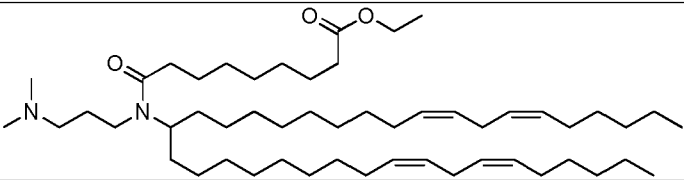
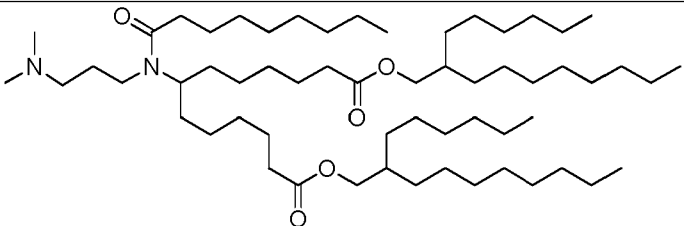
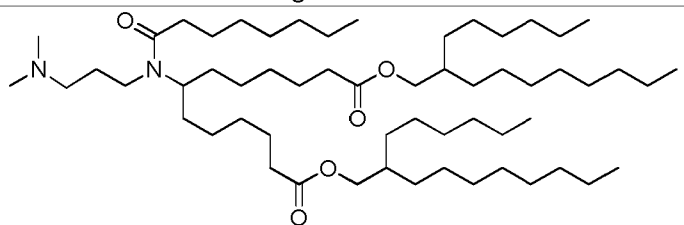
(continuación)

N.º	Estructura	Método de preparación
20		A
21		A
22		A
23		A
24		A
25		B

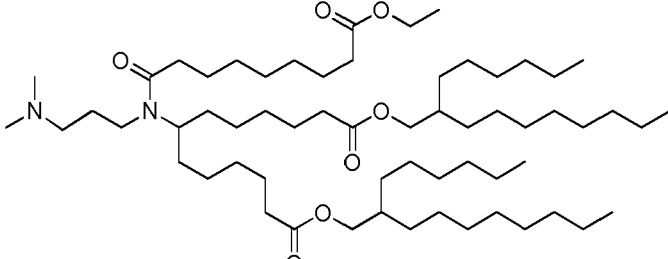
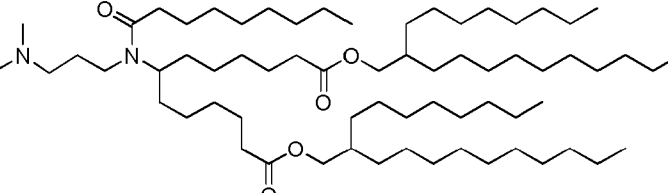
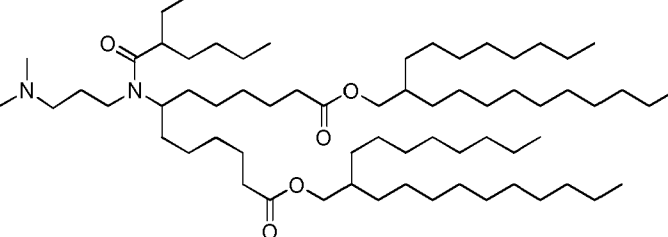
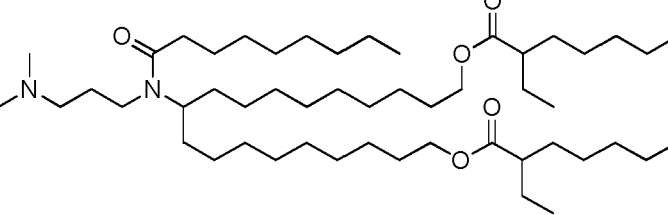
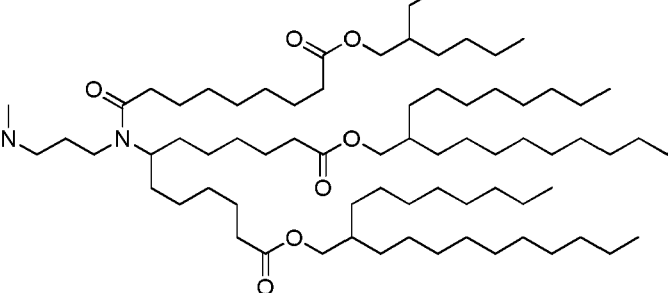
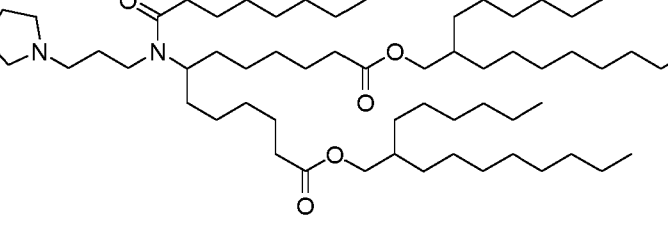
(continuación)

N.º	Estructura	Método de preparación
26		B
27		B
28		B
29		B
30		B
31		B
32		B

(continuación)

N.º	Estructura	Método de preparación
33		B
34		B
35		A
36		C
37		A
38		A
39		A

(continuación)

N.º	Estructura	Método de preparación
40		A
41		A
42		A
43		C
44		A
45		A

(continuación)

N.º	Estructura	Método de preparación
46		A

Se entiende que cualquier realización de los compuestos de Fórmula (IA) o (IB), como se establece anteriormente, y cualquier sustituyente y/o variable específica en el compuesto de Fórmula (IA) o (IB), como se establece anteriormente, pueden combinarse independientemente con otras realizaciones y/o sustituyentes y/o variables de los compuestos de Fórmula (I) para formar realizaciones de las invenciones que no se exponen anteriormente de forma específica. Además, en el caso de que se incluya una lista de sustituyentes y/o variables para cualquier grupo R, grupo L, Grupo G, o variables a-h particulares o x en una realización y/o reivindicación particular, se entiende que cada sustituyente y/o variable individual puede eliminarse de la realización y/o reivindicación particular y que la lista restante de sustituyentes y/o variables se considerará dentro del alcance de la invención.

Se entiende que en la presente descripción, solo se permiten las combinaciones de sustituyentes y/o variables de las fórmulas representadas si dichas contribuciones dan como resultado compuestos estables.

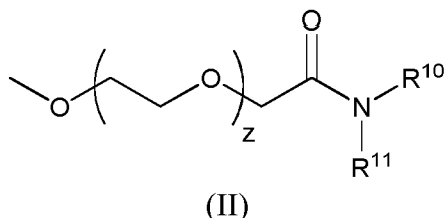
En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden uno cualquiera o más de los compuestos de Fórmula (I) y un agente terapéutico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones comprenden cualquiera de los compuestos de Fórmula (I) y un agente terapéutico y uno o más excipientes seleccionados de lípidos neutros, esteroides y lípidos conjugados con polímero. También se incluyen otros excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables en diversas realizaciones de las composiciones.

En algunas realizaciones, el lípido neutro se selecciona entre DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE y SM. En algunas realizaciones, el lípido neutro es DSPC. En diversas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido neutro varía de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 8:1.

En diversas realizaciones, las composiciones comprenden además un esteroide o un análogo de esteroide. En determinadas realizaciones, el esteroide o análogo de esteroide es colesterol. En algunas de estas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el colesterol varía de aproximadamente 2:1 a 1:1.

En diversas realizaciones, el lípido conjugado con polímero es un lípido pegilado. Por ejemplo, algunas realizaciones incluyen un diacilglicerol pegilado (PEG-DAG) tal como 1-(monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-DMG), una fosfatidiletanolamina pegilada (PEG-PE), un succinato de PEG diacilglicerol (PEG-S-DAG) tal como 4-O-(2',3'-di(tetradecanoiloxi)propil-1-O-(ω-metoxi(polietoxi)etil)butanodioato (PEG-S-DMG), una ceramida pegilada (PEG-cer) o un dialcoxipropilcarbamato de PEG tal como ω-metoxi(polietoxi)etil-N-(2,3-di(tetradecanoxi)propil)carbamato o 2,3-di(tetradecanoxi)propil-N-(ω-metoxi(polietoxi)etil)carbamato. En diversas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido pegilado varía de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 25:1.

En algunas realizaciones, la composición comprende un lípido pegilado que tiene la siguiente estructura (II):



o una sal, tautómero o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente una cadena de alquilo lineal o ramificada, saturada o insaturada que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, en donde la cadena de alquilo está opcionalmente interrumpida con uno o más enlaces éster; y

z tiene un valor medio que varía de 30 a 60.

En algunas realizaciones, R¹⁰ y R¹¹ son cada uno independientemente cadenas de alquilo lineales, saturadas que

contienen de 12 a 16 átomos de carbono. En otras realizaciones, el *z* promedio es de aproximadamente 45.

En algunas realizaciones de la composición anterior, el agente terapéutico comprende un ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico se selecciona de antisentido, ADN plasmídico y ARN mensajero.

En otras realizaciones diferentes, la invención se dirige a compuestos para uso en un método para administrar un agente terapéutico a un paciente que lo necesita, comprendiendo el método preparar o proporcionar cualquiera de las composiciones anteriores y administrar la composición al paciente. Para los fines de administración, los compuestos de la presente invención (normalmente en forma de nanopartículas lipídicas en combinación con un agente terapéutico) pueden administrarse como un producto químico en bruto o pueden formularse como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un compuesto de Fórmula (I) y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto de Fórmula (I) está presente en la composición en una cantidad que es eficaz para formar una nanopartícula lipídica y suministrar el agente terapéutico, por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o afección particular de interés. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las concentraciones y dosis adecuadas.

La administración de las composiciones de la invención puede realizarse a través de cualquiera de los modos de administración aceptados de agentes que sirvan para utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, suspensiones, supositorios, inyecciones, inhaladores, geles, microesferas y aerosoles. Las vías típicas de administración de dichas composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, oral, tópica, transdérmica, por inhalación, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, técnicas de inyección o de infusión intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraesternal. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan de manera que los principios activos contenidos en ellas estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente toman la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación única, y un recipiente de un compuesto de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación. Los procedimientos específicos de preparación de dichas formas farmacéuticas son conocidos, o resultarán evidentes, para los expertos en la materia; por ejemplo, véase *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición que ha de administrarse, en cualquier caso, contendrá una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección de interés de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un sólido o líquido. En un aspecto, el vehículo o vehículos son partículas, de manera que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimido o polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral, un líquido inyectable o un aerosol, que es útil en, por ejemplo, la administración por inhalación.

Cuando se destina a la administración oral, la composición farmacéutica está preferentemente en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen dentro de las formas consideradas en el presente documento sólidas o líquidas.

Como composición sólida para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en forma de polvo, gránulo, comprimido, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similares. Una composición sólida de este tipo normalmente contendrá uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, puede estar presente uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; sustancias de deslizamiento tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma a naranja; y un agente colorante.

Cuando la composición farmacéutica está en forma de cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol o aceite.

La composición farmacéutica puede estar en forma de líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para la administración oral o para el suministro por inyección, como dos ejemplos. Cuando se destina a la administración oral, las composiciones preferidas contienen, además de los presentes compuestos, uno o más de entre un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del aroma. En una composición destinada a ser administrada por inyección, pueden incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyecciones, suero salino, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles

- tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad
- 5 tales como cloruro de sodio o dextrosa; agentes que actúan como crioprotectores tales como sacarosa o trehalosa. La preparación parenteral puede estar encerrada en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.
- 10 Una composición farmacéutica líquida de la invención destinada a la administración parenteral u oral debe contener una cantidad de un compuesto de la invención de manera que se obtenga una dosis adecuada.
- La composición farmacéutica de la invención puede estar destinada a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede comprender adecuadamente una solución, emulsión, pomada o base de gel. La base, por ejemplo, puede
- 15 comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol y emulsionantes y estabilizadores. Puede haber presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica de administración tópica. Si está destinada a la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis.
- 20 La composición farmacéutica de la invención puede estar destinada a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio, que se derretirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para la administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.
- 25 La composición farmacéutica de la invención puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una capa de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la capa de recubrimiento son normalmente inertes, y pueden seleccionarse entre, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los principios activos pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina.
- 30 La composición farmacéutica de la invención en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se una al compuesto de la invención y, de este modo, ayude al suministro del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar con esta capacidad incluyen un anticuerpo monoclonal o policlonal, o una proteína.
- 35 La composición farmacéutica de la invención puede consistir en unidades de dosificación que pueden administrarse en forma de aerosol. El término aerosol se usa para designar una diversidad de sistemas que varían desde los de naturaleza coloidal hasta los sistemas que consisten en envases presurizados. El suministro puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dispense los principios activos. Los aerosoles de los compuestos de la invención pueden suministrarse en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos con
- 40 el fin de suministrar el principio o principios activos. El suministro del aerosol incluye el recipiente necesario, activadores, válvulas, subrecipientes y similares, que juntos pueden formar un kit. Un experto en la técnica, puede determinar sin experimentación indebida los aerosoles preferidos.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse mediante una metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica destinada a ser administrada por inyección puede prepararse combinando las nanopartículas lipídicas de la invención con agua destilada estéril u otro vehículo para formar una solución. Puede añadirse un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interactúan de forma no covalente con el compuesto de la invención para facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto en el sistema de suministro acuoso.
- 45 50 Las composiciones de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará en función de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del agente terapéutico específico empleado; la estabilidad metabólica y la duración de la acción del agente terapéutico; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el momento de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o afección particular; y el sujeto que se somete a la terapia.
- Las composiciones de la invención también pueden administrarse simultáneamente con, antes o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos. Dicha terapia de combinación incluye la administración de una
- 60 única formulación de dosificación farmacéutica de una composición de la invención y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración de la composición de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica. Por ejemplo, una composición de la invención y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composición de dosificación oral tal como un comprimido o cápsula, o cada agente se administra en formulaciones de dosificación oral separadas. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, los compuestos de la invención y uno o más agentes activos adicionales pueden administrarse
- 65 esencialmente al mismo tiempo, es decir, simultáneamente, o en momentos escalonados por separado, es decir,

secuencialmente; se entiende que la terapia de combinación incluye todas estas pautas posológicas.

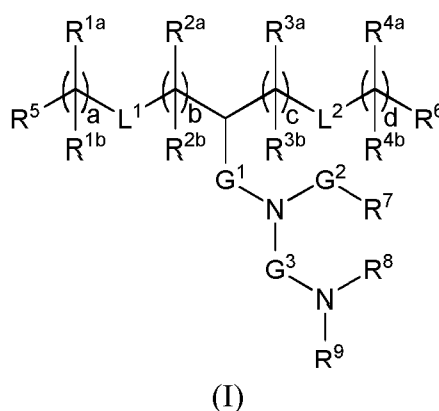
Se describen a continuación en el presente documento métodos de preparación para los compuestos y composiciones anteriores y/o se conocen en la técnica.

Los expertos en la materia apreciarán que en el proceso que se describe en el presente documento puede ser necesario proteger los grupos funcionales de los compuestos intermedios mediante grupos protectores adecuados. Dichos grupos funcionales incluyen hidroxilo, amino, mercapto y ácido carboxílico. Los grupos protectores adecuados para hidroxilo incluyen trialquilsililo o diarilalquilsililo (por ejemplo, *t*-butildimetilsililo, *t*-butildifenilsililo o trimetilsililo), tetrahidropiraniilo, bencilo y similares. Los grupos de protección adecuados para amino, amidino y guanidino incluyen *t*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares. Los grupos de protección adecuados para mercapto incluyen -C(O)-R" (donde R" es alquilo, arilo o arilalquilo), *p*-metoxibencilo, tritilo y similares. Los grupos protectores adecuados para el ácido carboxílico incluyen alquilo, ésteres de arilo o arilalquilo. Pueden añadirse o retirarse grupos protectores de acuerdo con técnicas convencionales, que los expertos en la materia conocen y que se describen en el presente documento. El uso de los grupos protectores se describe en detalle en Green, T.W. y P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3ª ed., Wiley. Como apreciará un experto en la materia, el grupo protector también puede ser una resina polimérica como una resina Wang, resina Rink o una resina de cloruro de 2-clorotritilo.

Los expertos en la materia también apreciarán que, aunque dichos derivados protegidos de los compuestos de esta invención pueden no poseer actividad farmacológica como tales, se pueden administrar a un mamífero y posteriormente metabolizarse en el cuerpo para formar los compuestos de la invención que son farmacológicamente activos. Dichos derivados pueden por lo tanto describirse como "profármacos".

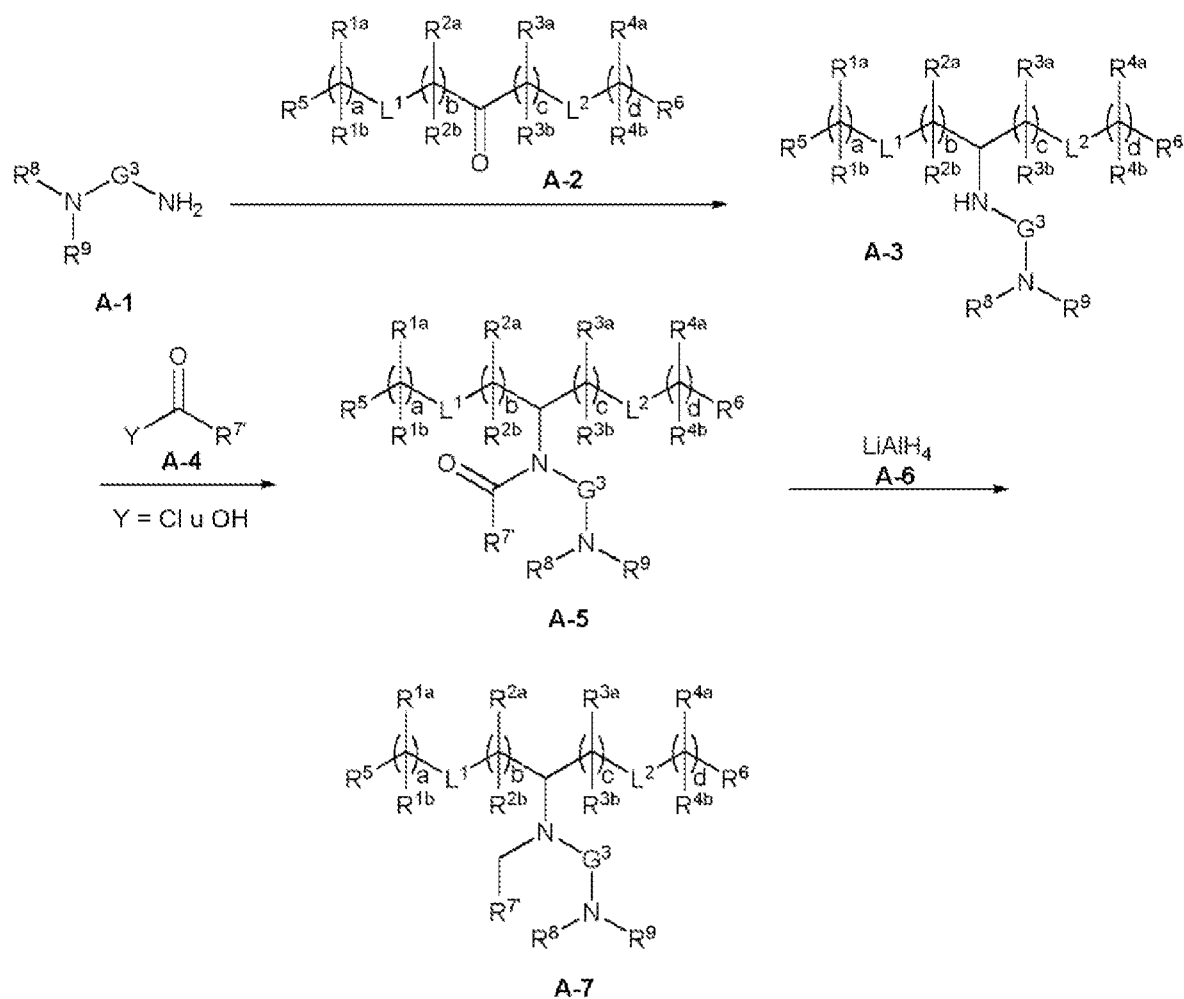
Además, todos los compuestos de la invención que existen en forma de base o ácido libre pueden convertirse en sus sales farmacéuticamente aceptables mediante tratamiento con la base o el ácido inorgánicos u orgánicos adecuados mediante métodos conocidos por un experto en la materia. Las sales de los compuestos de la invención pueden convertirse en su forma de base o de ácido libre mediante técnicas convencionales.

El siguiente Esquema de Reacción ilustra métodos para preparar compuestos de fórmula (I):



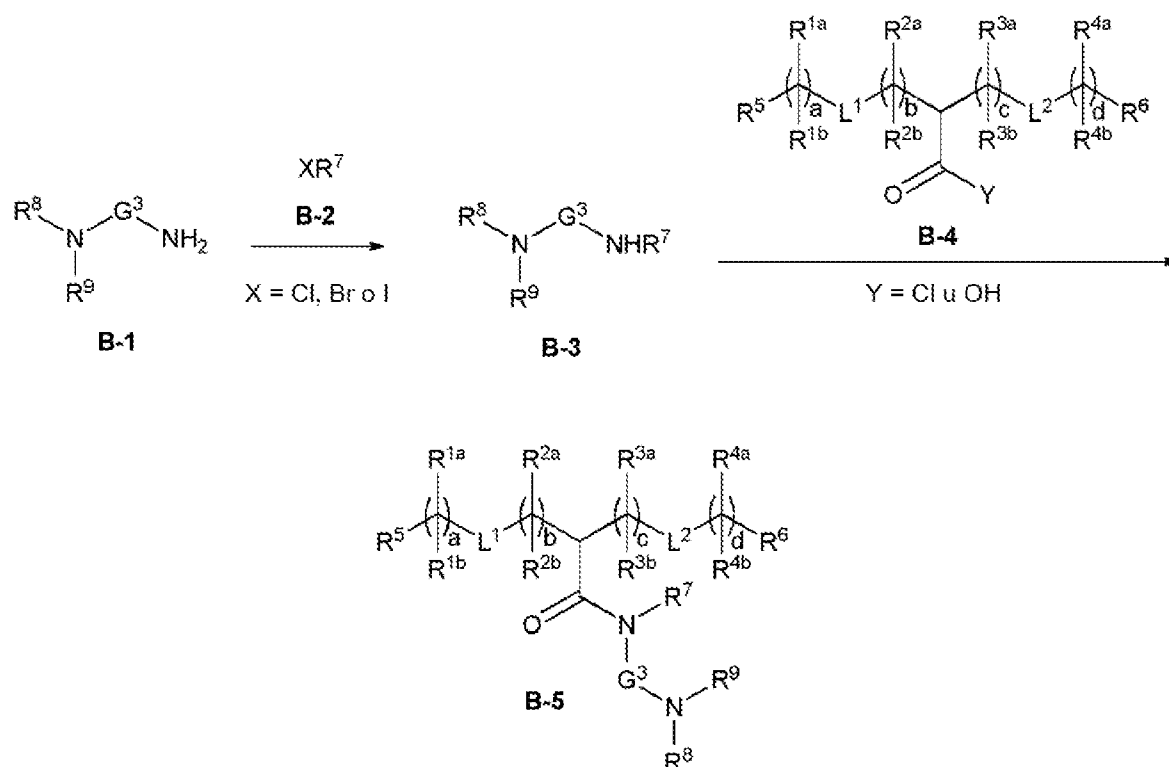
o una sal, tautómero o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, L¹, L², G¹, G², G³, a, b, c y d son como se definen en el presente documento. Se entiende que el experto en la materia puede ser capaz de fabricar estos compuestos por métodos similares o combinando otros métodos conocidos por el experto en la materia. También se entiende que un experto en la materia sería capaz de preparar, de manera similar a la que se describe a continuación, otros compuestos de Fórmula (I) que no están específicamente ilustrados a continuación usando los componentes de partida apropiados y modificando los parámetros de síntesis según sea necesario. En general, pueden obtenerse componentes de partida de fuentes tales como Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI y Fluorochem USA, etc. o bien pueden sintetizarse de acuerdo con fuentes conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5ª edición (Wiley, diciembre de 2000)) o pueden prepararse como se describe en la presente invención.

ESQUEMA DE REACCIÓN GENERAL 1



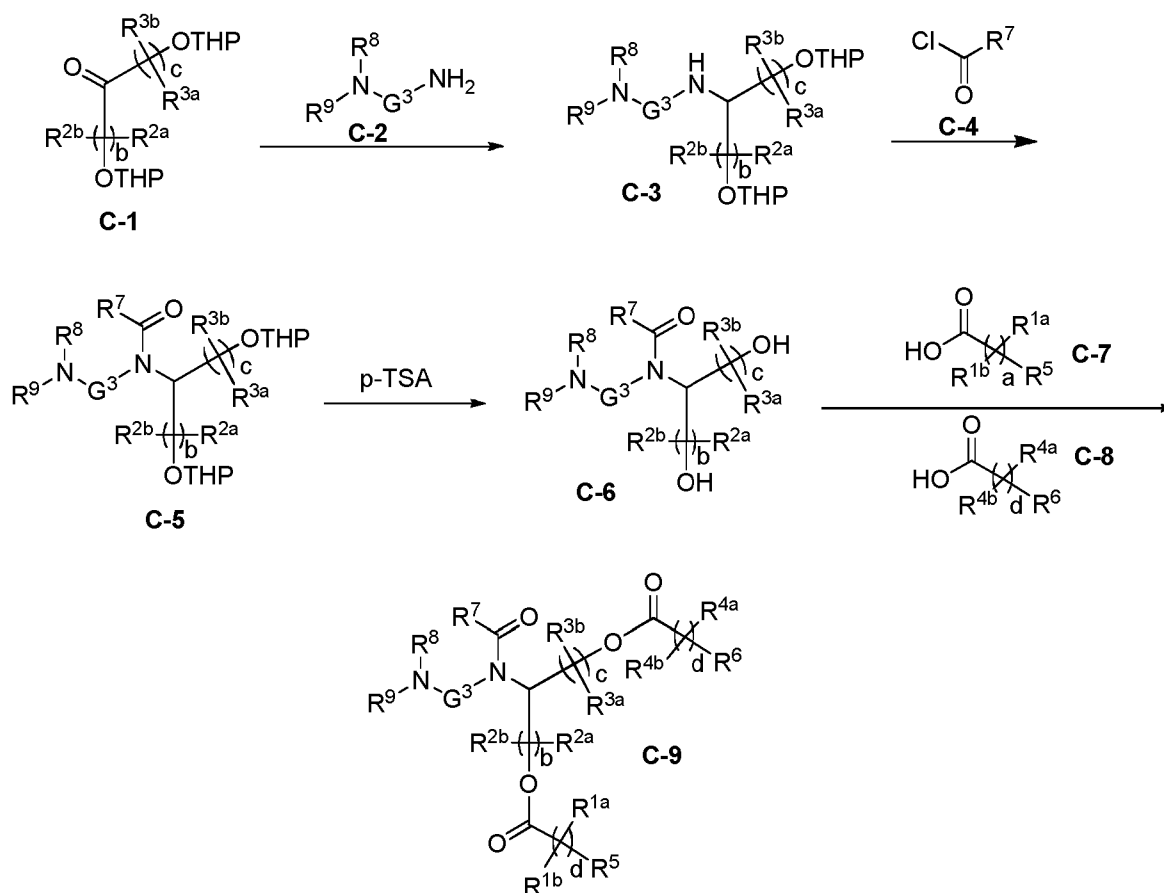
Las realizaciones del compuesto de estructura (I) (por ejemplo, los compuestos A-5 y A-7) pueden prepararse de acuerdo con el Esquema de Reacción General 1 ("Método A"), en donde R^{1a} , R^{1b} , R^{2a} , R^{2b} , R^{3a} , R^{3b} , R^{4a} , R^{4b} , R^5 , R^6 , R^8 , R^9 , L^1 , L^2 , G^1 , G^2 , G^3 , a, b, c y d son como se definen en el presente documento y R^7 representa R^7 o un alquilo C_3-C_{19} . Con referencia al Esquema de Reacción General 1, los compuestos de estructura A-1 y A-2 pueden adquirirse de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con métodos familiares para un experto en la materia. Una solución de A-1 y A-2 se trata con un agente reductor (por ejemplo, triacetoxiborohidruro sódico) para obtener A-3 después de cualquier tratamiento necesario. Una solución de A-3 y una base (por ejemplo, trimetilamina, DMAP) se trata con cloruro de acilo A-4 (o ácido carboxílico y DCC) para obtener A-5 después de cualquier tratamiento y/o purificación necesarios. A-5 puede reducirse con $LiAlH_4$ A-6 para dar A-7 después de cualquier tratamiento y/o purificación necesarios.

ESQUEMA DE REACCIÓN GENERAL 2



5 Pueden prepararse realizaciones del compuesto de estructura (I) (por ejemplo, compuesto B-5) de acuerdo con el Esquema de Reacción General 2 ("Método B"), en donde R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, L¹, L², G³, a, b, c y d son como se definen en el presente documento. Con referencia al Esquema de Reacción General 2, los compuestos de estructura B-1 y B-2 pueden adquirirse de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con métodos familiares para un experto en la materia. Una mezcla de B-1 (en exceso), B-2 y una base (por ejemplo, carbonato potásico) se calienta para obtener B-3 después de cualquier tratamiento necesario. Una solución de B-3 y una base (por ejemplo, trimetilamina, DMAP) se trata con cloruro de acilo B-4 (o ácido carboxílico y DCC) para obtener B-5 después de cualquier tratamiento y/o purificación necesarios.

ESQUEMA DE REACCIÓN GENERAL 3



Otras realizaciones del compuesto de Fórmula (I) (por ejemplo, C-9) se preparan de acuerdo con el Esquema de Reacción General 3. Como se ilustra en el Esquema de Reacción General 3, una cetona (C-1) apropiadamente protegida se hace reaccionar en condiciones de aminación reductora con la amina C-2 para producir C-3. La acilación de C-3 con cloruro de ácido C-4 produce el producto acilado C-5. La eliminación del grupo protector de alcohol en C-5 seguida de la reacción con C-7 y/o C-8 y el reactivo activador apropiado (por ejemplo, DCC) produce el compuesto C-9 deseado.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no de limitación.

EJEMPLO ILUSTRATIVO 1

SÍNTESIS DE COMPUESTO 1

El Compuesto 1 se preparó de acuerdo con el método A a partir del compuesto 5 para producir 240 mg de aceite incoloro, 0,32 mmol, 61 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 8H), 2,78 (t, 6,5 Hz, 4H), 2,39-2,25 (m, 7H), 2,22 (s, 6H), 2,06 (c, 6,8 Hz, 8H), 1,53 (quinteto, 7,3 Hz, 2H), 1,41-1,11 (54H), 0,92-0,87 (m, 9H).

EJEMPLO ILUSTRATIVO 2

SÍNTESIS DE COMPUESTO 2

El Compuesto 2 se preparó de acuerdo con el método A como sigue:

El Compuesto 7 (0,84 g, 0,96 mmol) se disolvió en THF (15 ml) y LAH (2 eq. 1,92 mmol, 73 mg, PM 37,95) se añadió en porciones a TA. Después de que la mezcla de reacción se calentara a 60 °C durante la noche, se añadió sulfato sódico hidrato. La mezcla se agitó durante 2 h y se filtró a través de una capa de gel de sílice. El filtrado se concentró para dar un aceite ligeramente amarillo (0,86 g). El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gravedad sobre gel de sílice (0 a 4 % de MeOH en cloroformo). Esto dio el producto deseado como un aceite incoloro (420 mg, 0,49 mmol, 51 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 12H), 2,78 (t, 6,4 Hz, 6H), 2,40-2,25 (m, 7H), 2,22 (s, 6H), 2,06 (c, 6,8 Hz, 12H), 1,53 (quinteto, 7,3 Hz, 2H), 1,41-1,10 (58H), 0,90 (t, 6,8 Hz, 9H).

EJEMPLO ILUSTRATIVO 3

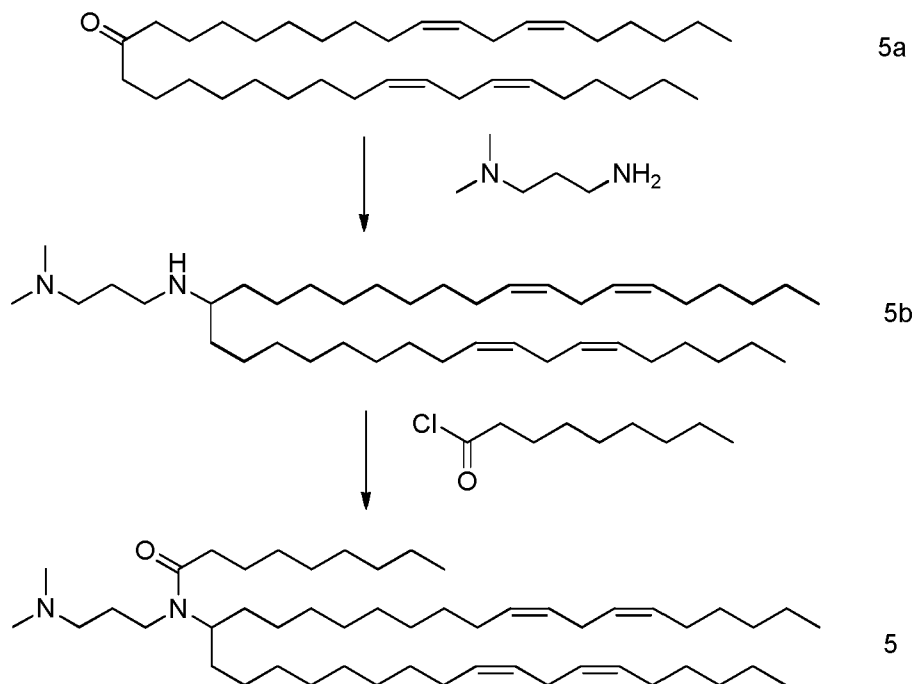
SÍNTESIS DE COMPUESTO 3

- 5 El Compuesto 3 se preparó de acuerdo con el método A a partir del compuesto 8 para producir 123 mg de aceite incoloro, 0,15 mmol, 41 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 8H), 2,78 (t, 6,5 Hz, 4H), 2,35-2,24 (m, 5H), 2,22 (s, 6H), 2,15 (d, 5,5 Hz, 2H), 2,06 (c, 6,8 Hz, 8H), 1,52 (quinteto, 7,3 Hz, 2H), 1,40-1,09 (65H), 0,92-0,87 (m, 12H).

EJEMPLO 4

10

SÍNTESIS DE COMPUESTO 5



- 15 El Compuesto 5 se preparó de acuerdo con el método A como sigue:

Etapa 1

- 20 3-dimetilamina-1-propilamina (6 mmol, 612 mg) y la cetona 5a (3,16 g, 6 mmol) se mezclaron en DCE (25 ml) y después se trataron con triacetoxiborohidruro sódico (8,49 mmol, 1,8 g) y AcOH (6 mmol, 0,36 g, 0,340 ml). La mezcla se agitó a ta en una atmósfera de Ar durante 2 días. La mezcla de reacción se inactivó añadiendo NaOH 1 N (aproximadamente 20 ml) y el producto se extrajo con una mezcla de hexano y acetato de etilo (aproximadamente 5 %). El extracto orgánico se lavó con agua/salmuera (1:1), salmuera y se secó (Na₂SO₄). Se concentró para dar el producto deseado 5b como un aceite amarillo (3,55 g). El producto bruto se usó para la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

Etapa 2

- 30 Se añadió una solución de cloruro de nonanoilo (212 mg, 1,2 mmol) en benceno (10 ml) a través de una jeringa a una solución del compuesto 5b (600 mg, 0,978 mmol) y trietilamina (5 mmol, 0,7 ml, 5 eq) y DMAP (20 mg) en benceno (10 ml) a TA en 10 min. Después de la adición, la mezcla se diluyó después con una mezcla de hexano y acetato de etilo (aproximadamente 5 %), se lavó con agua, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El producto bruto (0,77 g) se purificó mediante cromatografía en columna de gravedad sobre gel de sílice (gel de sílice de malla 230-400, 40 g, MeOH en cloroformo, del 0 al 4 %). Esto dio el producto 5 deseado como un
- 35 aceite incoloro (563 mg, 0,75 mmol, 76 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 8H), 4,56-4,36 (a., 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,64 (quinteto, 7 Hz, 0,7H), 3,12-3,09 (m, 2H), 2,78 (t, 6,4 Hz, 4H), 2,33-2,25 (m, 4H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 2,06 (tipo c, 6,8 Hz, 8H), 1,76-1,66 (m, 4H), 1,50-1,40 (m, 4H), 1,40-1,15 (46H), 0,90 (t, 6,7 Hz, 6H), 0,88 (t, 6,8 Hz, 3H).

- 40 EJEMPLO 5

SÍNTESIS DE COMPUESTO 6

El compuesto 6 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 0,98 g de aceite ligeramente amarillo, 1,13 mmol, 58 %. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 12H), 4,55-4,32 (a., 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,63 (tipo quinteto, 7 Hz, 0,7H), 3,15-3,09 (m, 2H), 2,78 (t, 6,4 Hz, 6H), 2,33-2,25 (m, 4H), 2,22, 2,23 (dos conjuntos de singlete, 6H), 2,06 (tipo c, 6,8 Hz, 12H), 1,76-1,60 (m, 4H), 1,49- 1,16 (54H), 0,90 (tipo t, 6,8 Hz, 9H).

EJEMPLO 6

SÍNTESIS DE COMPUESTO 7

El Compuesto 7 se preparó de acuerdo con el método A como sigue:

A una solución de ácido 2-etilheptanoico (1,5 eq. 0,83 mmol, 130 mg) en benceno (6 ml) y DMF (5-10 ul) se añadió cloruro de oxalilo (5 eq, 2,8 mmol, 349 mg, 0,24 ml) a TA. La mezcla se agitó a TA durante 30 min y después se calentó a 60 °C durante 2 h en Ar. La mezcla se concentró. El residuo se recogió en benceno (6 ml) y se concentró de nuevo para eliminar cualquier cloruro de oxalilo. El aceite residual (amarillo claro) se recogió en 4 ml de benceno y se añadió a través de una jeringa a una solución del compuesto 5b (1 eq., 0,55 mmol, 337 mg) y trietilamina (5 eq., 2,8 mmol, 283 mg, 390 ul) y DMAP (10 mg) en benceno (6 ml) a temperatura ambiente en 10 min. Después de la adición, la mezcla resultante se agitó a TA durante la noche. TLC mostró que no hubo mucha reacción. La reacción se concentró y se secó bien y se usó en lo siguiente. El residuo se recogió en DCM (20 ml). Se añadió DMAP (200 mg, 1,64 mmol), seguido de la adición de DCC (1,64 mmol, 338 mg). La mezcla se agitó durante 11 días y se filtró. El filtrado se lavó con NaOH al 5 % (100 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico. La filtración y la concentración dieron un aceite marrón claro (0,89 g). El producto bruto (0,89 g) se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (del 0 al 4 % de MeOH en cloroformo). Esto dio el producto deseado como un aceite incoloro (122 mg, 0,16 mmol, 29 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 8H), 4,69- 4,51 (muy a., estimado 0,4H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,72 (tipo quinteto, 6,9 Hz, 0,6H), 3,19-3,09 (m, 2H), 2,78 (t, 6,4 Hz, 4H), 2,55 (tipo quinteto, 6,5 Hz, 0,5H), 2,42 (tipo quinteto, 6,5 Hz, 0,5H), 2,29 (tipo c, pero podrían ser dos tripletes superpuestos, 6,9 Hz, 2H), 2,24, 2,23 (dos conjuntos de singletes, la relación de integración es aproximadamente 1:1, 6H), 2,09-2,02 (m, 8H), 1,77-1,58 (m, 4H), 1,55-1,15 (48H), 0,93-0,85 (m, 12H).

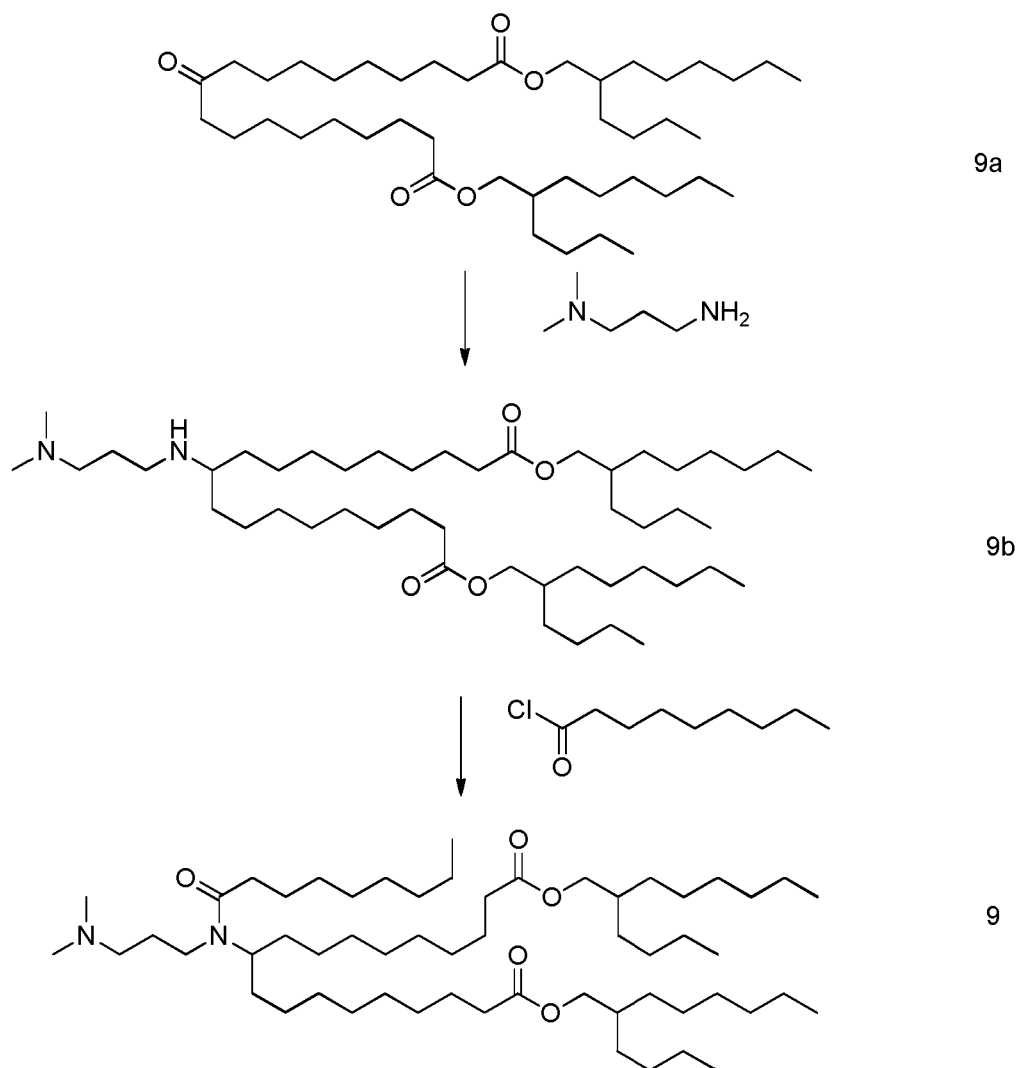
EJEMPLO 7

SÍNTESIS DE COMPUESTO 8

El compuesto 8 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 0,39 g de aceite incoloro, 0,46 mmol, 56 %. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 8H), 4,55-4,32 (muy a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,71 (tipo quinteto, 7 Hz, 0,7H), 3,17-3,08 (m, 2H), 2,78 (t, 6,4 Hz, 4H), 2,59 (tipo quinteto, 6,5 Hz, 0,5H), 2,46 (tipo quinteto, 6,5 Hz, 0,5H), 2,40 (t, 7 Hz, 1H), 2,31 (t, 7 Hz, 1H), 2,28, 2,25 (dos conjuntos de singletes, la relación de integración es aproximadamente 1:1, 6H), 2,09-2,02 (m, 8H), 1,79-1,69 (m, 2H), 1,66-1,57 (m, 2H), 1,55-1,16 (62H), 0,92-0,86 (m, 12H).

EJEMPLO 8

SÍNTESIS DE COMPUESTO 9



El Compuesto 9 se preparó de acuerdo con el método A como sigue:

5 Etapa 1

3-dimetilamina-1-propilamina (1 eq., 1,3 mmol, 133 mg, 163 μ l; PM 102,18, d 0,812) y la cetona 9a (1 eq., 0,885 g, 1,3 mmol) se mezclaron en DCE (8 ml) y después se trataron con triacetoxiborohidruro sódico (1,4 eq., 1,82 mmol, 386 mg; PM 211,94) y AcOH (1 eq., 1,3 mmol, 78 mg, 74 μ l, PM 60,05, d 1,06). La mezcla se agitó a TA en una atmósfera de Ar durante 2 días. La mezcla de reacción se diluyó con hexanos-EtOAc (9:1) y se inactivó añadiendo NaOH 0,1 N (20 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con NaHCO₃ saturado, salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se decantó y se concentró para dar el producto deseado 9b en forma de un aceite turbio ligeramente amarillo (1,07 g, 1,398 mmol).

15 Etapa 2

Una solución de cloruro de nonanoílo (1,3 eq., 1,27 mmol, 225 mg) en benceno (10 ml) se añadió a través de una jeringa a una solución del compuesto 9b de la etapa 1 (0,75 g, 0,98 mmol) y trietilamina (5 eq., 4,90 mmol, 0,68 ml) y DMAP (20 mg) en benceno (10 ml) a temperatura ambiente en 10 min. Después de la adición, la mezcla se agitó a TA durante la noche. Se añadió metanol (5,5 ml) para eliminar el exceso de cloruro de acilo. Después de 3 h, la mezcla se filtró a través de una capa de gel de sílice (1,2 cm). La concentración dio un aceite incoloro (0,70 g).

El producto bruto (0,70 g) se purificó por cromatografía en columna instantánea seca sobre gel de sílice (del 0 al 4 % de MeOH en cloroformo). Esto produjo 457 mg de aceite incoloro, 0,50 mmol, 51 %. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 4,54-4,36 (muy a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,977, 3,973 (dos conjuntos de dobletes, 5,8 Hz, 4H), 3,63 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,14-3,09 (m, 2H), 2,33-2,25 (m, 8H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,76-1,56 (m, 10H), 1,49-1,39 (m, 4H), 1,37-1,11 (62H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 9

SÍNTESIS DE COMPUESTO 10

5 El compuesto 10 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 245 mg de aceite incoloro, 0,27 mmol, rendimiento total del 53 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,87 (tipo quinteto, 6,3 Hz, 2H), 4,54-4,36 (muy a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,63 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,14-3,09 (m, 2H), 2,33-2,25 (m, 8H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,76-1,56 (m, 8H), 1,55-1,39 (m, 12H), 1,37-1,11 (60H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 10

SÍNTESIS DE COMPUESTO 11

15 El compuesto 11 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 239 mg de aceite incoloro, 0,26 mmol, rendimiento total del 52 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,87 (tipo quinteto, 6,3 Hz, 2H), 4,54-4,36 (muy a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,63 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,14-3,09 (m, 2H), 2,33-2,25 (m, 8H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,76-1,56 (m, 8H), 1,55-1,39 (m, 12H), 1,37-1,11 (62H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 11

SÍNTESIS DE COMPUESTO 12

25 El compuesto 12 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 198 mg de aceite incoloro, 0,20 mmol, rendimiento total del 46 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,54-4,36 (muy a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,974, 3,971 (dos conjuntos de dobletes, 5,8 Hz, 4H), 3,63 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,14-3,09 (m, 2H), 2,33-2,25 (m, 8H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,76-1,56 (m, 10H), 1,49-1,39 (m, 4H), 1,37-1,11 (76H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 12

SÍNTESIS DE COMPUESTO 13

35 El compuesto 13 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 217 mg de aceite incoloro, 0,21 mmol, rendimiento total del 49 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,54-4,36 (muy a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,973, 3,970 (dos conjuntos de dobletes, 5,8 Hz, 4H), 3,63 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,14-3,09 (m, 2H), 2,33-2,25 (m, 8H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,76-1,56 (m, 10H), 1,49-1,39 (m, 4H), 1,37-1,11 (78H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 13

SÍNTESIS DE COMPUESTO 14

45 El compuesto 14 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 263 mg de aceite incoloro, 0,29 mmol, rendimiento total del 39 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,54-4,36 (a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,977, 3,973 (dos conjuntos de dobletes, 5,8 Hz, 4H), 3,63 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,17-3,10 (m, 2H), 2,53-2,43 (m, 6H), 2,34-2,26 (m, 6H), 1,83-1,71 (m, 6H), 1,70-1,57 (m, 8H), 1,49-1,38 (m, 4H), 1,37-1,11 (60H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 14

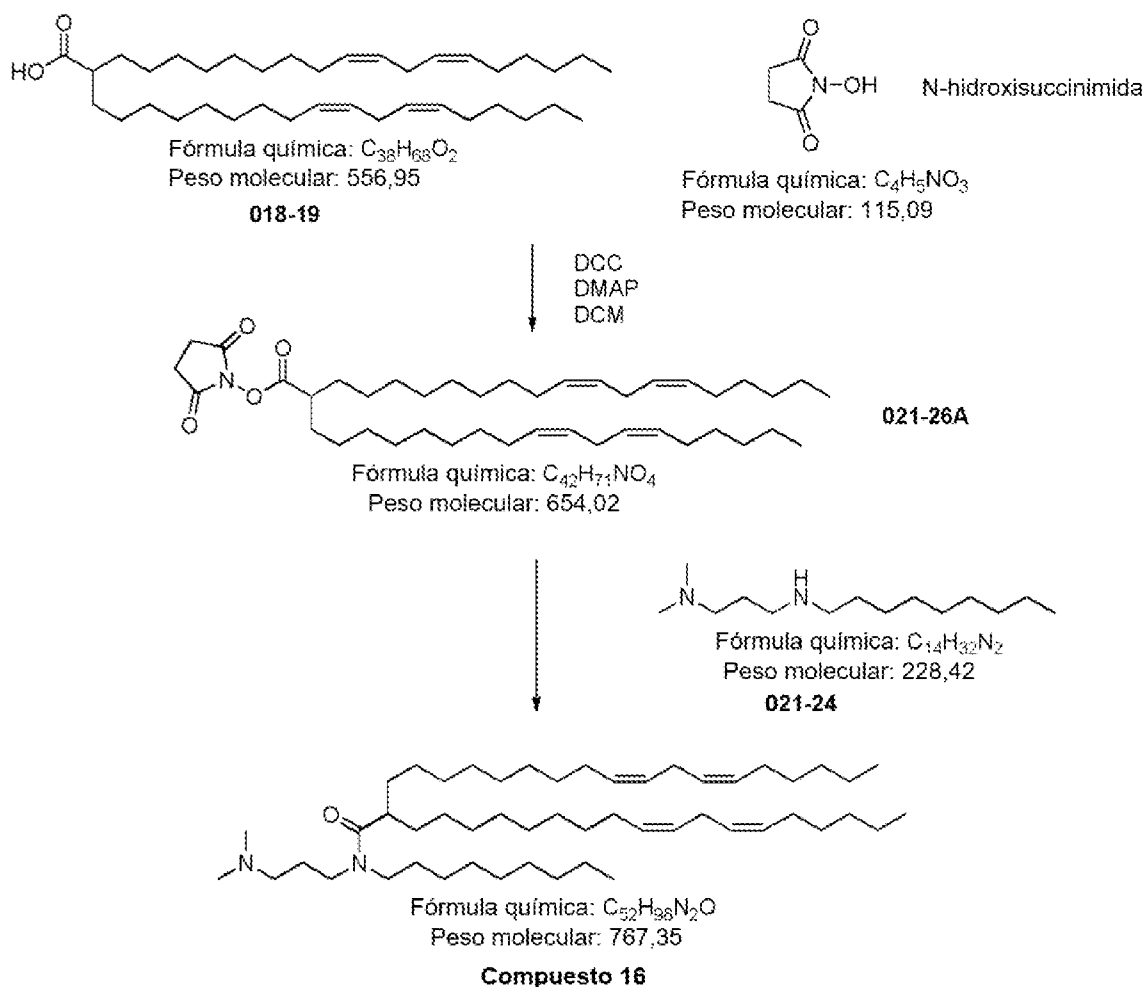
SÍNTESIS DE COMPUESTO 15

55 El compuesto 15 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 234 mg de aceite incoloro, 0,25 mmol, rendimiento total del 34 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,54-4,36 (a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,977, 3,973 (dos conjuntos de dobletes, 5,8 Hz, 4H), 3,63 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,17-3,10 (m, 2H), 2,53-2,43 (m, 6H), 2,34-2,26 (m, 6H), 1,83-1,71 (m, 6H), 1,70-1,57 (m, 8H), 1,49-1,38 (m, 4H), 1,37-1,11 (62H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 15

SÍNTESIS DE COMPUESTO 16

65



Se preparó Compuesto 16 de acuerdo con el método B como sigue:

- 5 A una solución del ácido 018-19 (0,5 g, 0,90 mmol), N-hidroxisuccinimida (1,2 eq., 1,08 mmol, 124 mg) y DMAP (0,3 eq, 0,27 mmol, 33 mg) en DCM (20 ml) se añadió DCC (2 eq, 1,8 mmol, 371 mg). La mezcla resultante se agitó a TA durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró después y se añadió a una solución de la amina 021-24 (1,26 mmol, 288 mg) en DCM (10 ml) y trietilamina (5 mmol, 696 ul). Después de 15 días, la mezcla se concentró. El residuo se recogió en hexano/acetato de etilo/Et3N (aproximadamente 9:1:0,3) y se filtró a través de una pequeña almohadilla de
- 10 gel de sílice, se lavó con una mezcla de hexano/acetato de etilo/Et3N (aproximadamente 9:1:0,3). El filtrado se concentró y se obtuvo un aceite amarillo (580 mg). El aceite amarillo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyendo con una mezcla en gradiente de MeOH en Cloroformo, del 0 al 4,2 %). Esto dio el producto deseado como un aceite incoloro (102 mg, 0,13 mmol, 14 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 8H), 3,38-3,29 (m, 3H), 3,28-3,23 (m, 1H), 2,78 (t, 6,4 Hz, 4H), 2,56-2,47 (m, 1H), 2,30-2,24 (m, 2H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 2,09-2,02 (m, 8H), 1,71 (tipo quinteto, 7,4 Hz, 2H), 1,66- 1,48 (superpuesto con agua; estimado 4H), 1,47-1,18 (m, 50H), 0,92-0,86 (m, 9H).
- 15

EJEMPLO 16

20 SÍNTESIS DE COMPUESTO 24

El compuesto 24 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 279 mg de aceite ligeramente amarillo, 0,29 mmol, rendimiento total del 44 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,88 (tipo quinteto, 6,3 Hz, 3H), 3,62 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 1H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,33-2,25 (m, 10H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,76-1,58 (m, 10H), 1,52 (tipo c, 6,7 Hz, 12H), 1,49-1,39 (m, 4H), 1,38-1,14 (50H), 0,89 (tipo t, 18H).

25

EJEMPLO 17

SÍNTESIS DE COMPUESTO 35

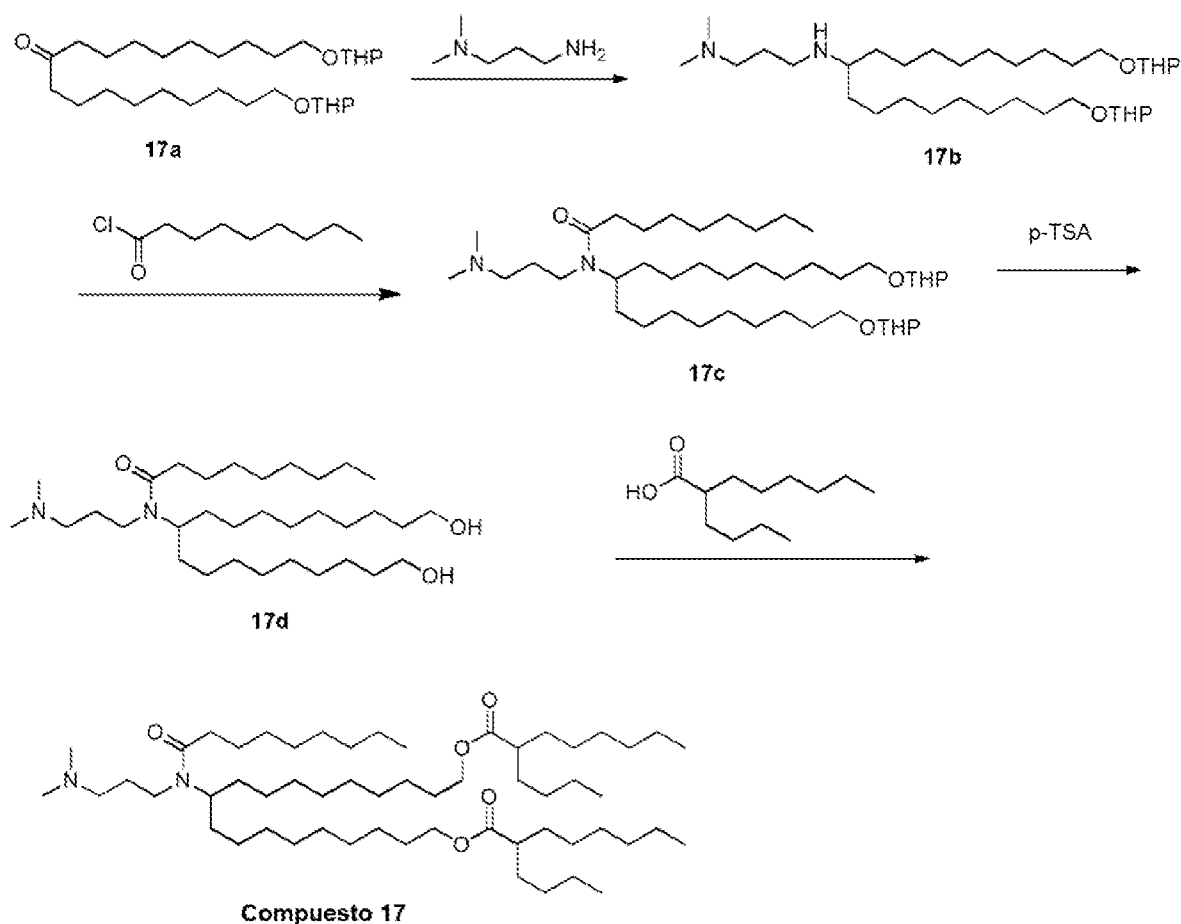
30

El compuesto 35 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 260 mg de aceite ligeramente

amarillo, 0,29 mmol, rendimiento total del 33 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,66-4,52 (muy a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,977, 3,973 (dos conjuntos de dobletes, 5,8 Hz, 4H), 3,71 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 0,7H), 3,19-3,09 (m, 2H), 2,54, 2,42 (dos conjuntos de tipo quinteto, 6,8 Hz, la relación de integración es aproximadamente 1:1,2, 1H), 2,33-2,25 (m, 6H), 2,24, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,77-1,11 (74H), 0,93-0,85 (m, 18H).

EJEMPLO 18

SÍNTESIS DE COMPUESTO 17



El compuesto 17 se preparó de acuerdo con el método C como sigue:

Etapa 1

3-dimetilamino-1-propilamina (1 eq. 4,14 mmol, 423 mg, 521 ul) y la cetona 17a (1 eq., 2,0 g, 4,14 mmol) se mezclaron en DCE (30 ml) y después se trataron con triacetoxiborohidruro sódico (1,4 eq., 5,80 mmol, 1,229 g) y AcOH (1 eq., 4,14 mmol, 249 mg, 235 ul). La mezcla se agitó a TA en atmósfera de Ar durante 2 días.

La mezcla de reacción se diluyó con una mezcla de hexanos y EtOAc (9:1, 200 ml) y se inactivó añadiendo solución diluida de NaOH (0,1 N, 270 ml). Se separaron las dos fases. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado, salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se filtró a través de una capa de gel de sílice. La almohadilla se lavó con 200 ml de una mezcla de hexano y EtOAc (9:1). Después la almohadilla se lavó con 200 ml de una mezcla de DCM/MeOH/Et₃N (85:15:1). El lavado de DCM/MeOH/Et₃N se concentró para dar el producto deseado (17b) como un aceite incoloro (1,749 g, 3,07 mmol, 74 %).

Etapa 2

Una solución de cloruro de nonanoilo (0,333 ml) en benceno (10 ml) se añadió a una solución del compuesto 17b (0,75 g) y trietilamina (0,92 ml) y DMAP (20 mg) en benceno (20 ml) a TA. La mezcla se agitó a TA durante la noche. Se añadió MeOH (1 ml) y la mezcla continuó agitando durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. La concentración del filtrado dio el producto deseado (17c) como un aceite amarillo.

(0,945 g).

Etapas 3

- 5 A un matraz que contenía 17c (0,945 g, 1,33 mmol y EtOH (25 ml) se le añadió hidrato de ácido p-toluenosulfónico (1,33 mmol, 253 mg) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó durante la noche a TA. La mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante 2 h. Se añadió más PTSA (160 mg) y la mezcla de reacción continuó calentándose a 75 °C durante la noche. La mezcla se concentró. El residuo se recogió en DCM y se lavó con solución diluida de NH₄OH. La fase orgánica se lavó con una mezcla de bicarbonato sódico saturado y salmuera; se secó sobre sulfato sódico. La concentración dio el producto deseado (17d) como un aceite viscoso ligeramente amarillo (0,799 g, 1,47 mmol). El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (del 0 al 15 % de metanol en DCM con trazas de trietilamina).

Esto dio 17d como un aceite incoloro (647 mg, 1,20 mmol, 90 %).

15 Etapas 4

- A una solución de 17d (216 mg, 0,40 mmol), ácido 2-butiloctanoico (5 eq, 2 mmol, 401 mg) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (5,5 eq, 2,2 mmol, 269 mg) en diclorometano (20 ml) se añadió DCC (5,5 eq, 2,2 mmol, 454 mg). Después de estar agitado durante 4 días, se añadieron 3 ml de MeOH. La mezcla continuó agitando durante otras 16 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta sequedad. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gravedad sobre gel de sílice (MeOH en DCM, del 0 al 6 %). Esto dio el compuesto deseado (17) como un aceite ligeramente amarillo (aceite incoloro, 175 mg, 0,19 mmol, 48 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,07, 4,06 (dos conjuntos de tripletes, 6,7 Hz, 4H), 3,64 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 1H), 3,21-3,09 (dos conjuntos de multipletes, 2H), 3,00-2,37 (a. 6H), 2,36-2,20 (m, 6H), 2,05-1,85 (m, 2H), 1,79-1,53 (m, 10H), 1,52-1,39 (m, 8H), 1,37-1,03 (58H), 0,91-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 19

30 SÍNTESIS DE COMPUESTO 36

- El compuesto 36 se preparó de acuerdo con el procedimiento general C para producir 156 mg de aceite incoloro, 0,15 mmol, 38 % para la última etapa. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,07 (tripletes, 6,7 Hz, 4H), 3,65 (tipo quinteto, 6,8 Hz, 1H), 3,21 (tipo t, 6,8 Hz, 2H), 3,10-3,03 (a. 2H), 2,79, 2,78 (dos conjuntos de singlete, 6H), 2,35-2,28 (m, 4H), 2,09 (tipo quinteto, 7,5 Hz, 2H), 1,67-1,54 (m, 10H), 1,54-1,38 (m, 8H), 1,38-1,03 (74H), 0,91-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 20

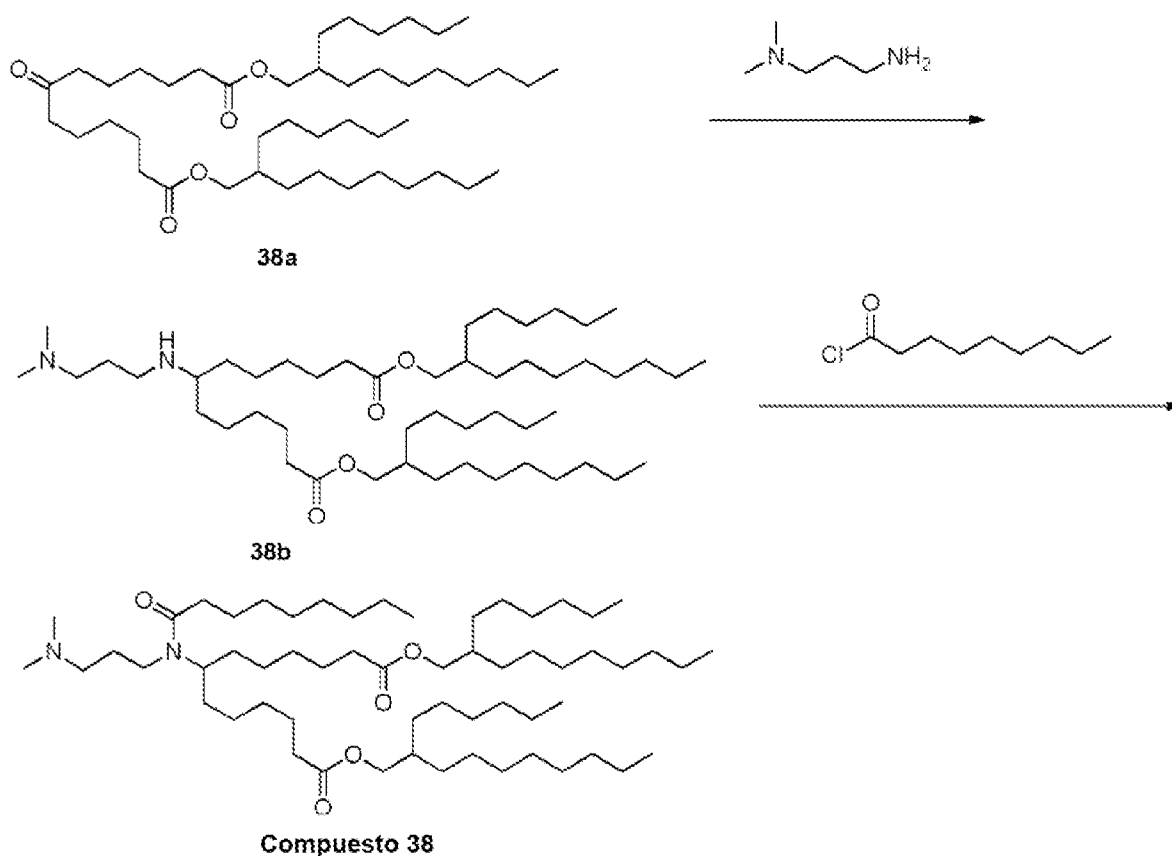
40 SÍNTESIS DE COMPUESTO 37

- El compuesto 37 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 397 mg de aceite incoloro, 0,49 mmol, rendimiento total del 60 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 8H), 4,13 (c, 7,1 Hz, 2H), 4,56-4,34 (a. 0,3H), 3,63 (tipo quinteto, 6,9 Hz, 0,7H), 3,15-3,08 (m, 2H), 2,78 (tipo t, 6,4 Hz, 4H), 2,39-2,21 (m, 12H), 2,06 (tipo c, 6,9 Hz, 8H), 1,79-1,55 (m, 6H), 1,50-1,40 (m, 4H), 1,40-1,15 (m, 45H), 0,90 (tipo t, 6,8 Hz, 6H).

45 EJEMPLO 21

SÍNTESIS DE COMPUESTO 38

- 50 El Compuesto 38 se preparó de acuerdo con el método A como sigue:



Etapa 1

- 5 A una solución de 38a (1 eq., 1,266 g, 1,79 mmol) en DCE (15 ml) se le añadió 3-dimetilamino-1-propilamina (1 eq., 1,79 mmol, 183 mg, 225 μ l), seguido de la adición de triacetoxiborohidruro sódico (1,4 eq., 2,51 mmol, 531 mg) y AcOH (1 eq., 1,79 mmol, 107 mg, 101 μ l). La mezcla se agitó a TA en atmósfera de Ar durante 3 días.
- 10 El residuo se diluyó con hexanos-EtOAc (9:1, 150 ml) y se lavó con solución diluida de NaOH (0,12 N, 100 ml), NaHCO₃ sat, salmuera y se secó sobre sulfato sódico. La fase orgánica se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se lavó con 200 ml de una mezcla de hexano y EtOAc (9:1). Después la almohadilla se lavó con 200 ml de una mezcla de DCM/MeOH/Et₃N (85:15:1). El lavado de DCM/MeOH/Et₃N se concentró y se secó en una línea de alto vacío para dar el producto deseado (38b) como un aceite incoloro (1,1 g, 1,38 mmol, 77 %).

Etapa 2

- Una solución de cloruro de nonanoilo (1,5 eq., 0,68 mmol, 120 mg) en benceno (5 ml) se añadió a una solución de 38b (0,45 mmol, 360 mg) y trietilamina (5 eq., 2,25 mmol, 228 mg, 314 μ l) y DMAP (10 mg) en benceno (10 ml) a TA en 2 min en Ar. Después de la adición, la mezcla se agitó a TA durante la noche. Se añadió MeOH (1 ml) y la mezcla continuó agitando 2 h. El producto bruto se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. El filtrado se concentró. El residuo (457 mg) se purificó mediante cromatografía en columna instantánea sobre gel de sílice (gel de sílice de malla 230-400, 40 g, MeOH en cloroformo, del 0 al 4,6 %). Esto dio el producto deseado (38) como un aceite incoloro (410 mg, 0,44 mmol, 98 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 4,61-4,35 (a., estimado 0,4H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,974, 3,964 (dos conjuntos de dobletes, 5,7 Hz, 4H), 3,64 (tipo quinteto, 7,0 Hz, 0,6H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,34-2,25 (m, 8H), 2,23 (s ancho, 6H), 1,77-1,58 (m, 10H), 1,53-1,39 (m, 4H), 1,37-1,15 (66H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 22

SÍNTESIS DE COMPUESTO 39

- El compuesto 39 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 370 mg de aceite incoloro, 0,40 mmol, rendimiento total del 69 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 4,61-4,35 (a., estimado 0,4H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,974, 3,964 (dos conjuntos de dobletes, 5,7 Hz, 4H), 3,64 (tipo quinteto, 7,0 Hz, 0,6H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,34-2,25 (m, 8H), 2,230, 2,221 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,75-1,58

(m, 10H), 1,51-1,39 (m, 4H), 1,37-1,15 (64H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 23

5 SÍNTESIS DE COMPUESTO 40

El compuesto 40 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 382 mg de aceite incoloro, 0,39 mmol, rendimiento total del 68 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,60-4,35 (a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 4,13 (c, 7,2 Hz, 2H), 3,973, 3,964 (dos conjuntos de dobletes, 5,7 Hz, 4H), 3,63 (tipo quinteto, 7,0 Hz, 0.7H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,34-2,25 (m, 10H), 2,229, 2,220 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,75-1,58 (m, 12H), 1,51-1,39 (m, 4H), 1,37-1,15 (64H), 0,89 (tipo t, 7,8 Hz, 12H).

EJEMPLO 24

15 SÍNTESIS DE COMPUESTO 41

El compuesto 41 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 309 mg de aceite incoloro, 0,30 mmol, rendimiento total del 73 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,60-4,35 (a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,972, 3,962 (dos conjuntos de dobletes, 5,7 Hz, 4H), 3,64 (tipo quinteto, 7,1 Hz, 0.7H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,34-2,25 (m, 8H), 2,23, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,75-1,58 (m, 10H), 1,51-1,39 (m, 4H), 1,35-1,21 (82H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 25

25 SÍNTESIS DE COMPUESTO 42

El compuesto 42 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 235 mg de aceite incoloro, 0,23 mmol, rendimiento total del 56 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,75-4,49 (a., estimado 0,4H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 3,97, 3,96 (dos conjuntos de dobletes, 5,3 Hz, 4H), 3,72 (tipo quinteto, 7 Hz, 0.6H), 3,21-3,05 (m, 2H), 2,53, 2,42 (dos conjuntos de tipo quinteto, 6,6 Hz, la relación de integración es aproximadamente 1:1,7, 1H), 2,32-2,25 (m, 6H), 2,24, 2,22 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,78-1,56 (m, 10H), 1,53-1,39 (m, 6H), 1,38-1,17 (76H), 0,93-0,85 (m, 18H).

EJEMPLO 26

35 SÍNTESIS DE COMPUESTO 43

El compuesto 43 se preparó de acuerdo con el procedimiento general C para producir 187 mg de aceite incoloro, 0,23 mmol, 57 % para la última etapa. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,077, 4,071 (dos conjuntos de tripletes, 6,7 Hz, 4H), 4,56-4,34 (a. 0.3H), 3,64 (tipo quinteto, 6,9 Hz, 0.7H), 3,15-3,09 (m, 2H), 2,34-2,24 (m, 6H), 2,234-2,224 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,76-1,58 (m, 10H), 1,55-1,39 (m, 8H), 1,39-1,10 (48H), 0,92-0,86 (m, 15H).

EJEMPLO 27

45 SÍNTESIS DE COMPUESTO 44

El compuesto 44 se preparó de acuerdo con el procedimiento general A para producir 260 mg de aceite incoloro, 0,22 mmol, rendimiento total del 53 % en 2 etapas. RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,59-4,35 (a., estimado 0,3H, debido a la lenta isomerización alrededor del enlace amida), 4,03-3,95 (m, 6H), 3,63 (tipo quinteto, 6,9 Hz, 0.7H), 3,14-3,08 (m, 2H), 2,33-2,24 (m, 10H), 2,229, 2,221 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,75-1,57 (m, 12H), 1,51-1,40 (m, 4H), 1,40-1,08 (87H), 0,92-0,86 (m, 18H).

EJEMPLO 28

55 EVALUACIÓN DE ARNm DE LUCIFERASA *IN VIVO* USANDO LA COMPOSICIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Se solubilizaron lípido catiónico (MC3), DSPC, colesterol y PEG-lípido en etanol en una relación molar de 50:10:38,5:1,5. Se prepararon nanopartículas lipídicas (NPL) con una relación total en peso entre el lípido y el ARNm de aproximadamente 10:1 a 30:1. Brevemente, el ARNm se diluyó a 0,2 mg/ml en tampón de citrato de 10 a 50 mM, pH 4. Se usaron bombas de jeringa para mezclar la solución lipídica etanólica con la solución acuosa de ARNm en una relación aproximada de 1:5 a 1:3 (vol/vol) con caudales totales superiores a 15 ml/min. Después, se retiró el etanol y el tampón externo se reemplazó por PBS mediante diálisis. Por último, las nanopartículas lipídicas se filtraron a través de un filtro estéril de poro de 0,2 µm. El tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas fue de 70-90 nm de diámetro como se determinó mediante dispersión de luz cuasielástica usando un medidor de partículas submicrométricas Nicomp 370 (Santa Bárbara, CA).

Se realizaron estudios en ratones C57BL/6 hembras de 6-8 semanas de edad (Charles River) de acuerdo con las directrices establecidas por un comité institucional de cuidado animal (ACC, por sus siglas en inglés) y el Consejo Canadiense de Cuidado Animal (CCAC, por sus siglas en inglés). Se administraron sistémicamente dosis variables de nanopartículas de ARNm-lípido mediante inyección en la vena de la cola y los animales fueron sacrificados en momentos específicos (1, 2, 4, 8 y 24 horas) después de la administración. Se recogieron el hígado y el bazo en tubos pesados previamente, se determinaron los pesos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento para su análisis.

Para el hígado, se disecaron aproximadamente 50 mg para su análisis en un tubo FastPrep de 2 ml (MP Biomedicals, Solon OH). Se añadió esfera de cerámica de 6,35 mm (1/4") (MP Biomedicals) a cada tubo y se añadieron 500 µl de tampón de lisis Glo - GLB (Promega, Madison WI) equilibrado a temperatura ambiente al tejido hepático. Los tejidos hepáticos se homogeneizaron con el instrumento FastPrep24 (MP Biomedicals) a 2 x 6,0 m/s durante 15 segundos. El homogeneizado se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de una dilución 1:4 en GLB y se evaluó usando el sistema de ensayo de luciferasa SteadyGlo (Promega). Específicamente, se hicieron reaccionar 50 µl de homogeneizado de tejido diluido con 50 µl de sustrato SteadyGlo, la mezcla se agitó durante 10 segundos seguido de 5 minutos de incubación y después se cuantificó con un luminómetro CentroXS³ LB 960 (Berthold Technologies, Alemania). La cantidad de proteína sometida a ensayo se determinó usando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford IL). Las unidades de luminiscencia relativa (ULR) se normalizaron después a los µg de proteína total ensayada. Para convertir ULR a ng de luciferasa se generó una curva patrón con luciferasa recombinante QuantiLum (Promega). Basándose en los datos proporcionados en la Figura 1, se eligió el momento de cuatro horas para la evaluación de la eficacia de las formulaciones de lípidos (véase el Ejemplo 29).

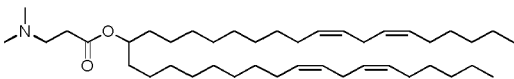
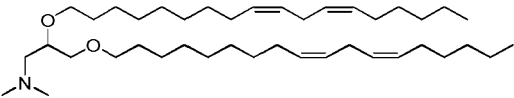
El ARNm de FLuc (L-6107) de Trilink Biotechnologies expresará una proteína luciferasa, originalmente aislada de la luciérnaga, *Photinus pyralis*. FLuc se usa habitualmente en el cultivo de células de mamíferos para medir tanto la expresión de los genes como la viabilidad de las células. Emite bioluminiscencia en presencia del sustrato, luciferina. Este ARNm con capuchón y poliadenilado está totalmente sustituido con 5-metilcitidina y pseudouridina.

EJEMPLO 29

DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS QUE CONTIENEN DIVERSOS LÍPIDOS CATIÓNICOS USANDO UN MODELO EN ROEDORES DE LA EXPRESIÓN *IN VIVO* DE ARNm DE LUCIFERASA MRNA

Los lípidos catiónicos que se muestran en la Tabla 2 se han sometido a ensayo previamente con ácidos nucleicos. Con fines comparativos, estos lípidos también se usaron para formular nanopartículas lipídicas que contenían el ARNm de FLuc (L-6107) usando un método de mezcla en línea, como se describe en el ejemplo 28 y en el documento PCT/US10/22614. Las nanopartículas lipídicas se formularon usando la siguiente relación molar: Lípido catiónico al 50 %/ diestearoilfosfatidilcolina al 10 % (DSPC) / Colesterol al 38,5 %/PEG lípido al 1,5 % ("PEG-DMG", es decir, (1-(monometoxi-poli(etilenglicol))-2,3-dimiristoilglicerol, con un peso molecular promedio de PEG de 2000). La actividad relativa se determinó midiendo la expresión de luciferasa en el hígado 4 horas después de su administración a través de inyección en la vena de la cola como se describe en el ejemplo 28. La actividad se comparó a una dosis de 0,3 y 1,0 mg de ARNm/kg y se expresó como ng de luciferasa/g de hígado medida 4 horas después de la administración, como se describe en el Ejemplo 28.

Tabla 2
Lípidos que muestran actividad con ARNm

Compuesto	Luc de hígado a una dosis de 0,3 mg/kg	Luc de hígado a una dosis de 1,0 mg/kg	Estructura
MC2	4 ± 1	N/D	
DLinDMA	13 ± 3	67 ± 20	

(continuación)

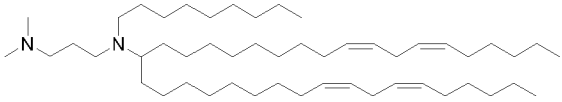
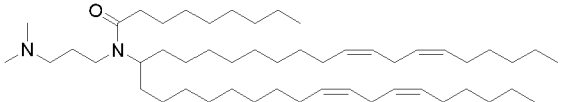
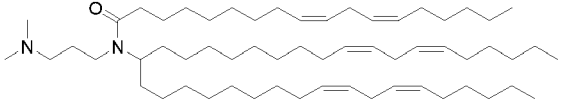
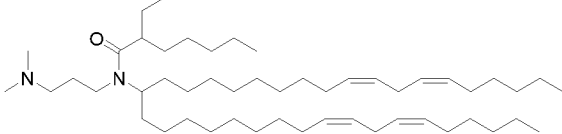
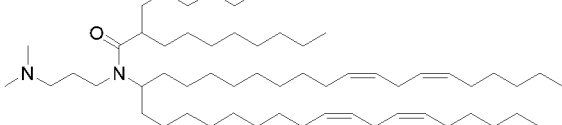
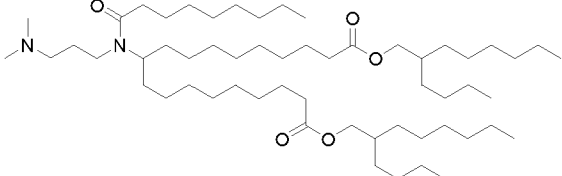
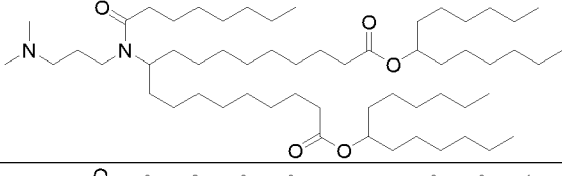
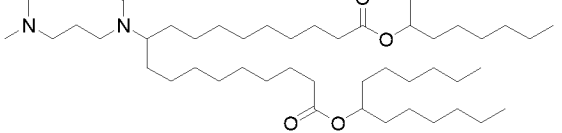
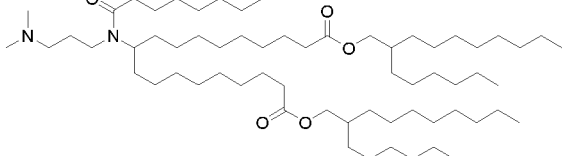
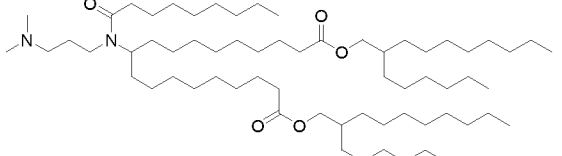
Compuesto	Luc de hígado a una dosis de 0,3 mg/kg	Luc de hígado a una dosis de 1,0 mg/kg	Estructura
MC4	41 ± 10	N/D	
XTC2	80 ± 28	237 ± 99	
MC3	198 ± 126	757 ± 528	
319 (2 % de PEG)	258 ± 67	681 ± 203	
137	281 ± 203	588 ± 303	

Los lípidos novedosos de la invención y los lípidos comparadores seleccionados que se muestran en la Tabla 3 se formularon usando la siguiente relación molar: lípido catiónico al 50 %/ diestearoilfosfatidilcolina al 10 % (DSPC) / Colesterol al 38,5 %/PEG lípido al 1,5 % ("PEG-DMA" 2-[2-(ω-metoxi(polietilenglicol₂₀₀₀)etoxi)-N,N-ditetradecilacetamida). La actividad relativa se determinó midiendo la expresión de luciferasa en el hígado 4 horas después de su administración a través de inyección en la vena de la cola como se describe en el Ejemplo 28. La actividad se comparó a una dosis de 0,3 y 1,0 mg de ARNm/kg y se expresó como ng de luciferasa/g de hígado medida 4 horas después de la administración, como se describe en el Ejemplo 28. Un gráfico de datos seleccionados se da en la Figura 3 (de arriba a abajo: círculo = compuesto 10; triángulo = compuesto 6; cuadrado = MC3).

Tabla 3
Lípidos catiónicos ilustrativos y Lípidos comparadores

N.º	pK _a	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura
MC3	6,09	603 ± 150	2876 ± 622	
A	7,05	*	*	
B	6,17	95 ± 41	1131 ± 384	
C	6,36	24 ± 4	77 ± 19	

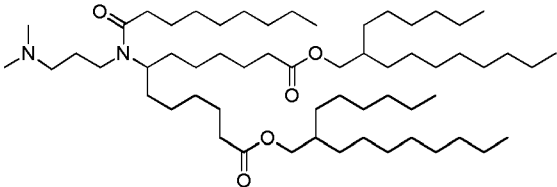
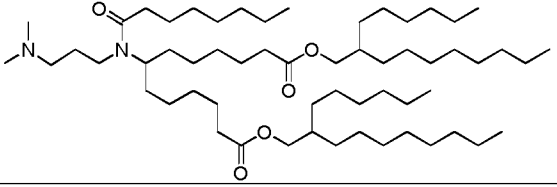
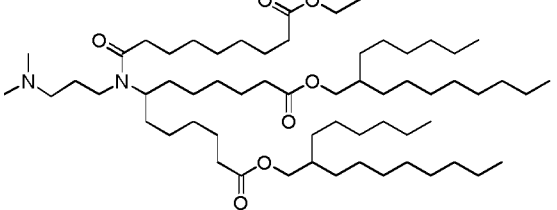
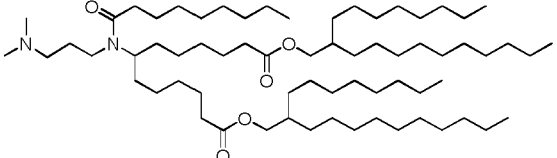
(continuación)

N.º	pK _a	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura
1	5,64	54 ± 8	226 ± 20	
5	6,27	603 ± 167	3640 ± 601	
6	6,14	19 ± 4	211 ± 119	
7	5,93	833 ± 401	8859 ± 780	
8	5,35	105 ± 98	1238 ± 153	
9	6,27	2381 ± 1162	17157 ± 2470	
10	6,16	2379 ± 93	26181 ± 2900	
11	6,13	2273 ± 294	16502 ± 4301	
12	6,21	3336 ± 1394	13577 ± 1948	
13	6,22	1537 ± 777	10907 ± 2032	

(continuación)

N.º	pK _a	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura
14	6,33	2851 ± 438	15445 ± 3693	
15	6,32	2708 ± 924	15930 ± 4711	
16	6,37	231 ± 100	1185 ± 838	
17	6,29	837 ± 260	6703 ± 689	
24	6,14	1120 ± 376	7425 ± 2810	
35	5,97	1083 ± 350	8554 ± 4587	
36	6,13	541 ± 91	4736 ± 980	
37	5,61	*	*	

(continuación)

N.º	pK _a	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura
38	6,45	905 ± 443	5353 ± 2082	
39	6,45	779 ± 82	5180 ± 2116	
40	6,57	753 ± 156	2203 ± 1555	
41	ND [†]	832 ± 298	7437 ± 1612	

* no probado; pK_a fuera de intervalo

† no determinado

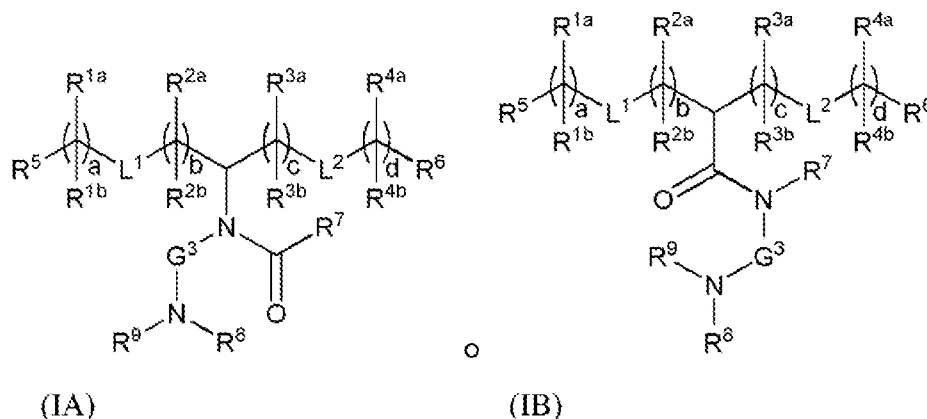
5 EJEMPLO 30

DETERMINACIÓN DEL PK_a DE LOS LÍPIDOS FORMULADOS

Como se describe en otra parte, el pK_a de los lípidos catiónicos formulados se correlaciona con la eficacia de las NPL para el suministro de ácidos nucleicos (véase Jayaraman *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edición Internacional (2012), 51 (34), 8529-8533; Semple *et al.*, *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010)). El intervalo preferido de pK_a es de ~5 a ~7. El pK_a de cada lípido catiónico se determinó en nanopartículas lipídicas usando un ensayo basado en la fluorescencia del ácido 2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfónico (TNS). Se preparan nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos catiónicos/DSPC/colesterol/PEG-lípido (50/10/38,5/1,5 % en moles) en PBS a una concentración de 0,4 mM total. Se preparan lípidos usando el proceso en línea que se describe en el Ejemplo 28. Se preparó TNS en forma de una solución madre 100 µM en agua destilada. Las vesículas se diluyeron a 24 µM de lípido en 2 ml de soluciones tamponadas que contenían, HEPES 10 mM, MES 10 mM, acetato de amonio 10 mM, NaCl 130 mM, donde el pH varió de 2,5 a 11. Se añadió una alícuota de la solución de TNS para proporcionar una concentración final de 1 µM y, después de mezclar con formación de vórtice, se midió la intensidad de fluorescencia a temperatura ambiente en un espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Serie 2 usando longitudes de onda de excitación y emisión de 321 nm y 445 nm. Se aplicó un análisis de mejor ajuste sigmoideo a los datos de fluorescencia y se midió el pK_a como el pH que origina la intensidad de fluorescencia semimáxima (véase la Figura 2).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura de Fórmula IA o IB: o una sal, tautómero o estereoisómero farmacéuticamente aceptable,



en donde:

- 10 L¹ y L² son cada uno independientemente -O(C=O)-, -(C=O)O-, -C(=O)-, -O-, -S(O)_x-, -S-S-, -C(=O)S-, -SC(=O)-, -NR^aC(=O)-, -C(=O)NR^a-, -NR^aC(=O)NR^a-, -OC(=O)NR^a-, -NR^aC(=O)O- o un enlace directo;
 G³ es alquileno C₁-C₆;
 R^a es H o alquilo C₁-C₁₂;
 R^{1a} y R^{1b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{1a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;
 15 R^{2a} y R^{2b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{2a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{2b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;
 20 R^{3a} y R^{3b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{3a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{3b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{3b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;
 R^{4a} y R^{4b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C₁-C₁₂; o (b) R^{4a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{4b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;
 25 R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente H o metilo;
 R⁷ es alquilo C₆-C₁₆;
 R⁸ y R⁹ son cada uno independientemente alquilo C₁-C₁₂; o R⁸ y R⁹, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, formar un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros;
 30 a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 1 a 24; y
 x es 0, 1 o 2,
 en donde alquilo se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que está saturado o insaturado y está opcionalmente sustituido y
 en donde alquileno se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente, lineal o ramificada que enlaza el resto de la molécula a un grupo radical, que consiste únicamente en carbono e hidrógeno, que está saturado o insaturado y está opcionalmente sustituido.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

- 40 a) uno de L¹ o L² es -O(C=O)-; o
 b) cada uno de L¹ y L² son -O(C=O)-; o
 c) uno de L¹ o L² es -(C=O)O-; o
 d) cada uno de L¹ y L² es -(C=O)O-; o
 e) uno de L¹ o L² es un enlace directo; o
 45 f) cada uno de L¹ y L² es un enlace directo.

3. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde:

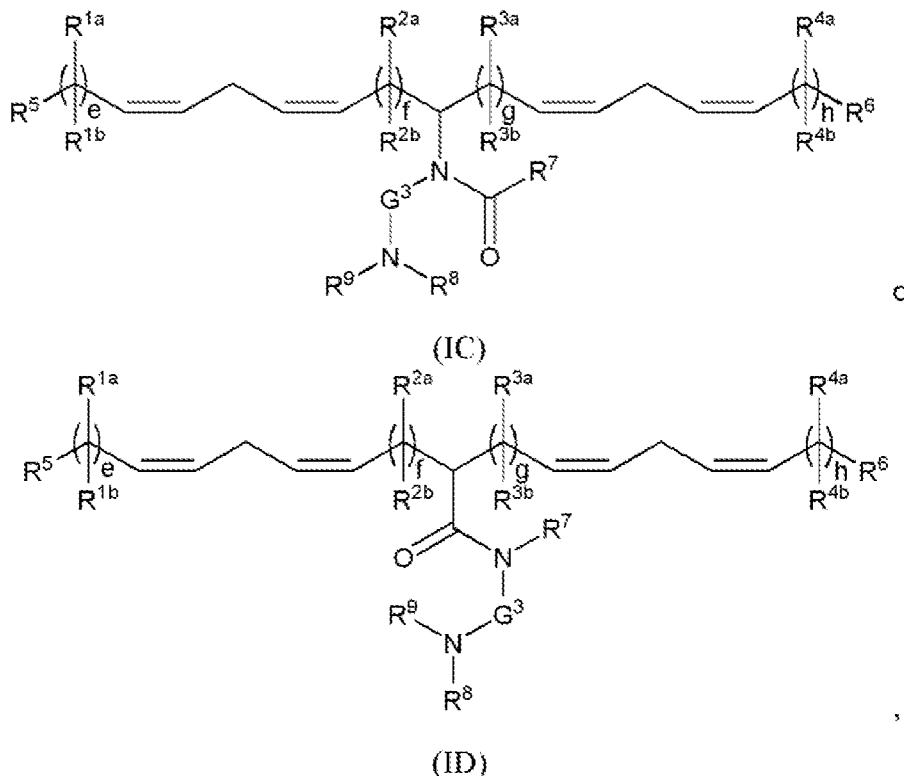
- 50 a) para al menos una aparición de R^{1a} y R^{1b}, R^{1a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono; o

b) para al menos una aparición de R^{4a} y R^{4b} , R^{4a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{4b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono; o

c) para al menos una aparición de R^{2a} y R^{2b} , R^{2a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{2b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono; o

d) para al menos una aparición de R^{3a} y R^{3b} , R^{3a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{3b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{3b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono.

4. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene una de las siguientes estructuras (IC) o (ID):



en donde e, f, g y h son cada uno independientemente un número entero de 1 a 12, preferentemente en donde e, f, g y h son cada uno independientemente un número entero de 4 a 10.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 2 a 12, preferentemente en donde a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 5 a 9.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde:

a) al menos uno de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} y R^{4a} es H; o

b) R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} y R^{4a} son H en cada aparición; o

c) al menos uno de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} y R^{4a} es alquilo C_1-C_8 , preferentemente en donde alquilo C_1-C_8 es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, *terc*-butilo, n-hexilo o n-octilo; o

d) al menos uno de R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} y R^{4b} es H; o

e) R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} y R^{4b} son H en cada aparición.

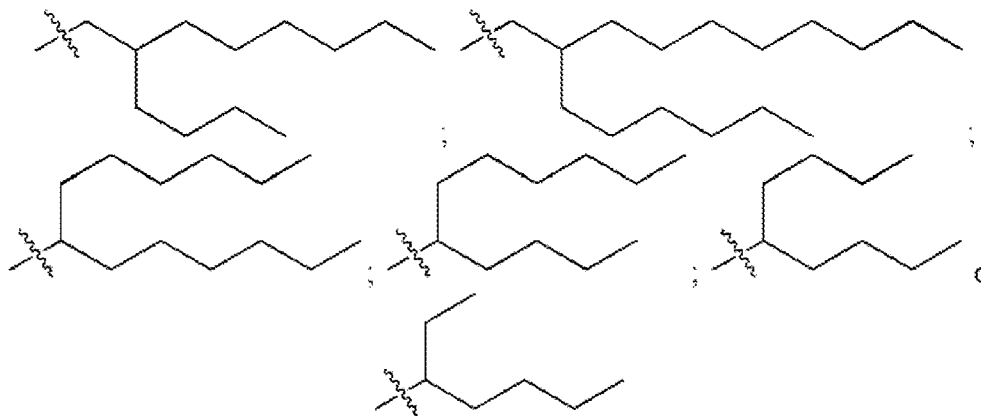
7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde uno de R^5 o R^6 es metilo, preferentemente en donde cada uno de R^5 y R^6 es metilo.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde:

a) R^7 es alquilo C_6-C_9 ; o

b) R^7 está sustituido con $-(C=O)O^b$, $-O(C=O)R^b$, $-C(=O)R^b$, $-OR^b$, $-S(O)_xR^b$, $-S-SR^b$, $-C(=O)SR^b$, $-SC(=O)R^b$, $-NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)R^b$, $-C(=O)NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)NR^aR^b$, $-OC(=O)NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)OR^b$, $-NR^aS(O)_xNR^aR^b$, $-NR^aS(O)_xR^b$ o

$-S(O)_xNR^aR^b$, en donde: R^a es H o alquilo C_1-C_{12} ; R^b es alquilo C_1-C_{15} ; y x es 0, 1 o 2, preferentemente en donde R^7 está sustituido con $-(C=O)OR^b$ o $-O(C=O)R^b$, más preferentemente en donde R^b es alquilo C_1-C_{15} , incluso más preferentemente en donde R^b tiene una de las siguientes estructuras:



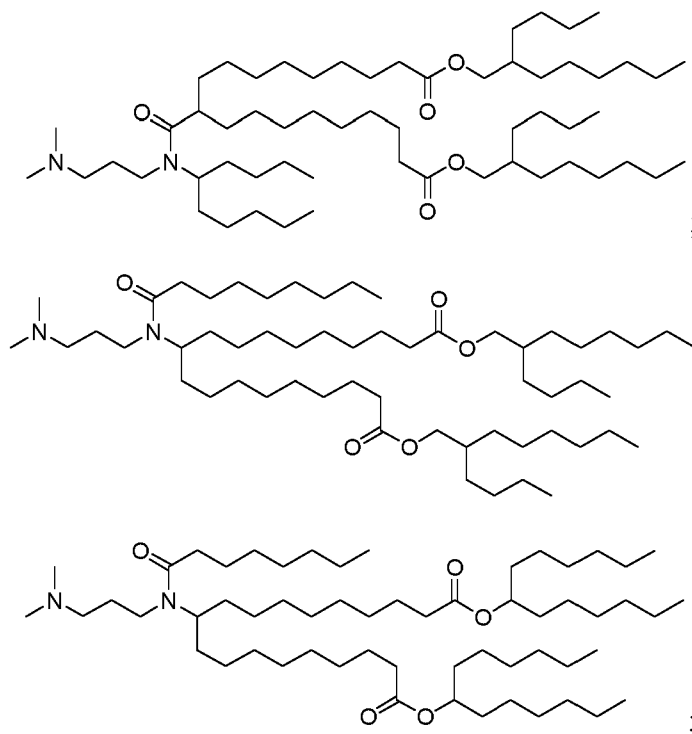
5

9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde:

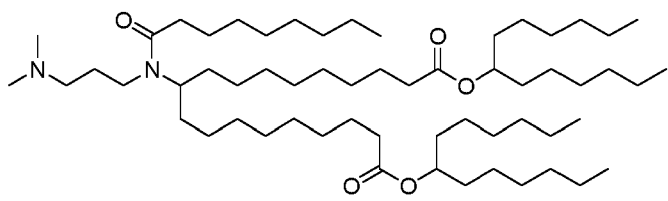
- 10 a) al menos uno de R^8 o R^9 es metilo; o
b) cada uno de R^8 y R^9 es metilo; o
c) R^8 y R^9 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, formar un anillo heterocíclico de 5, 6 o 7 miembros, preferentemente en donde el anillo heterocíclico es pirrolidinilo o piperazinilo.

15 10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde G^3 es alquileo C_2-C_4 , preferentemente alquileo C_3 .

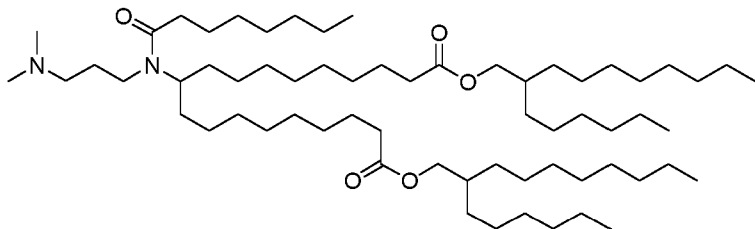
11. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene una de las estructuras siguientes:



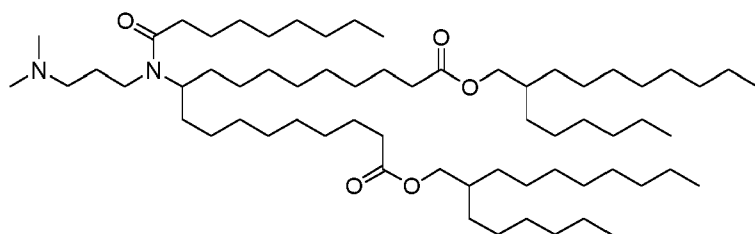
20



;

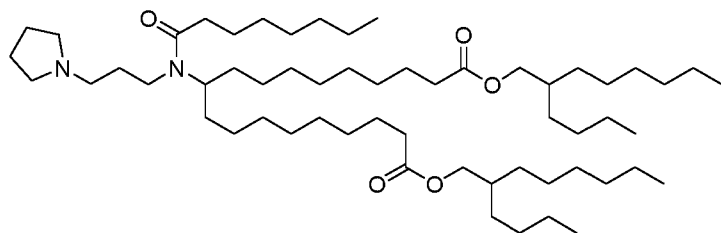


;

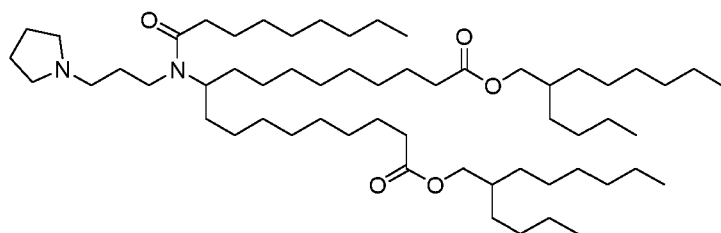


;

5

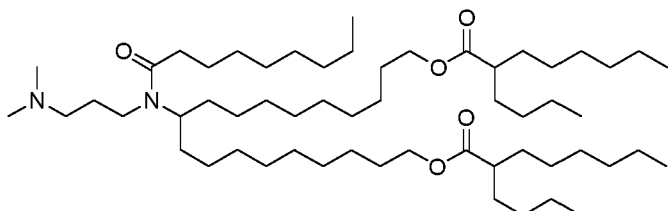


;

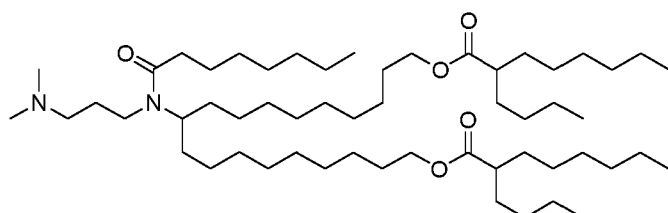


;

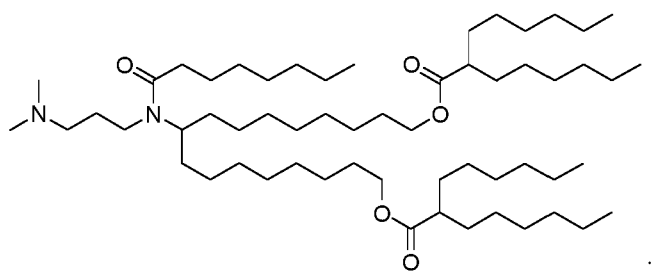
10



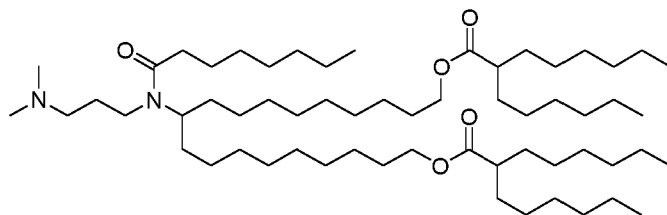
;



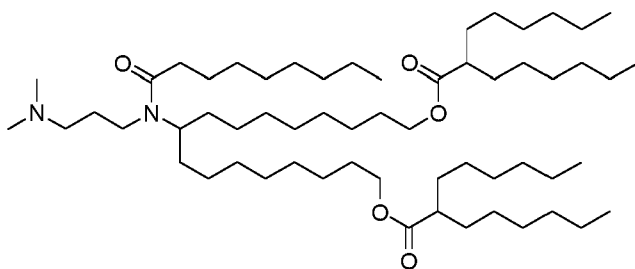
;



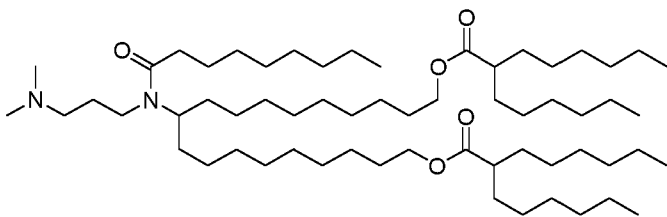
;



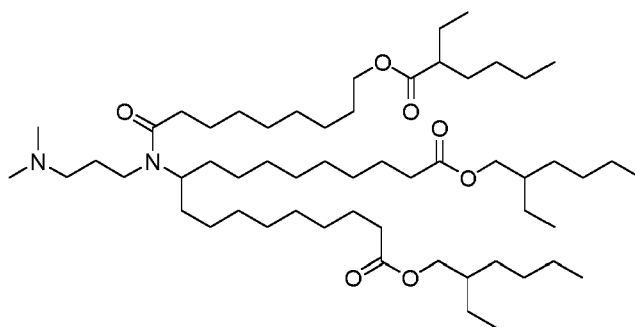
;



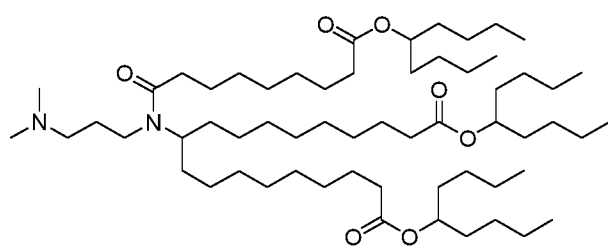
;



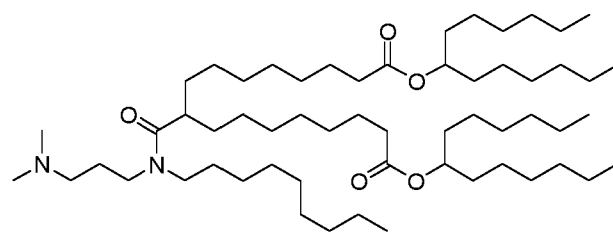
;



;

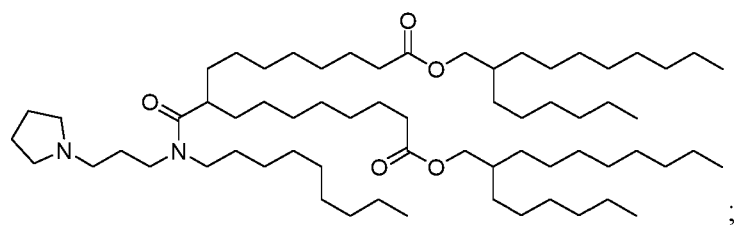
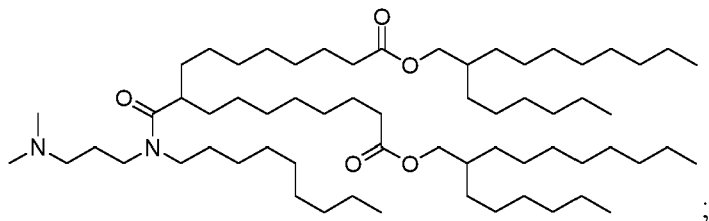
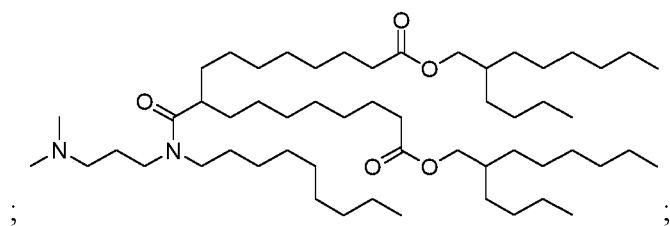


;

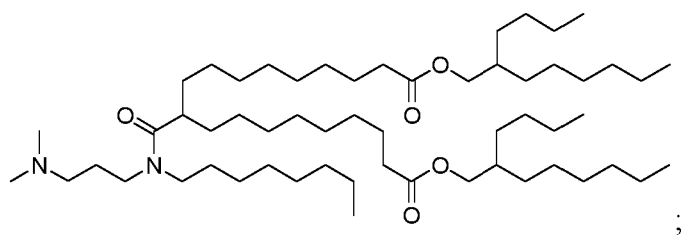
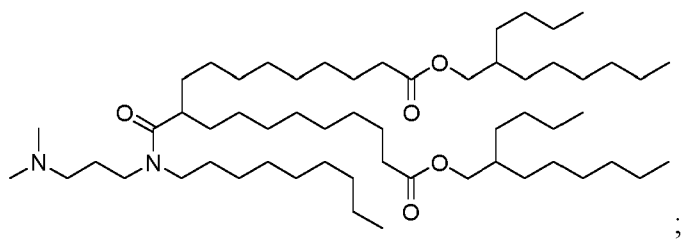


5

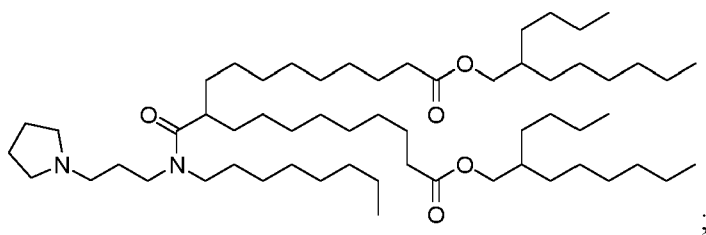
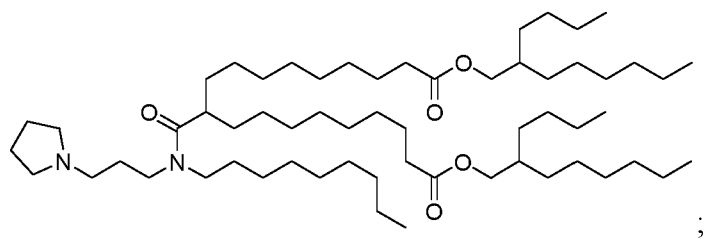
10

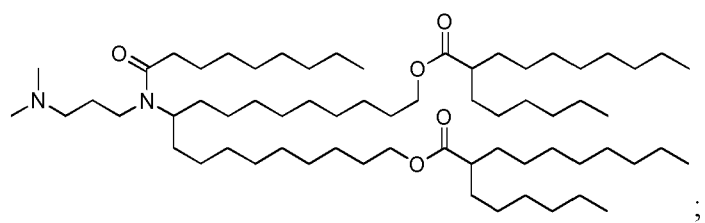
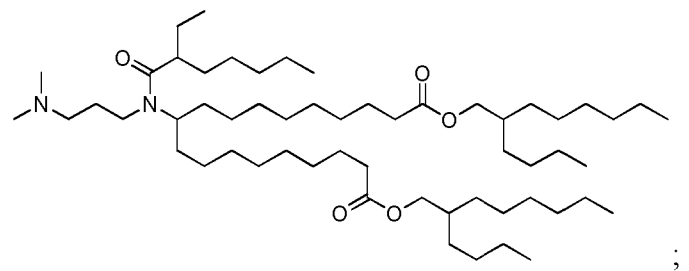
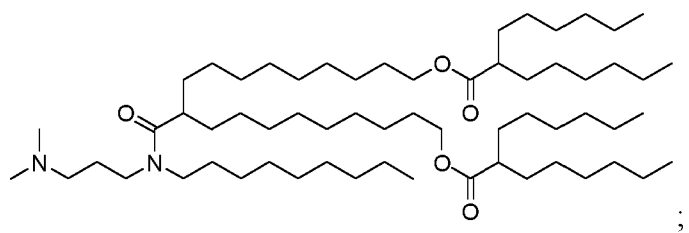


5

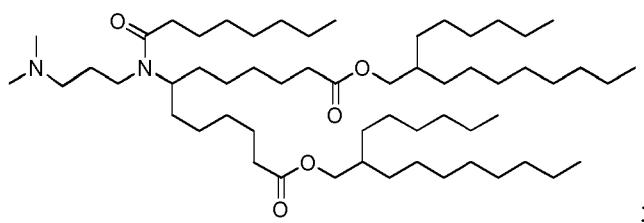
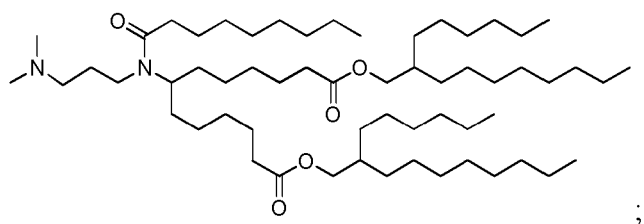


10

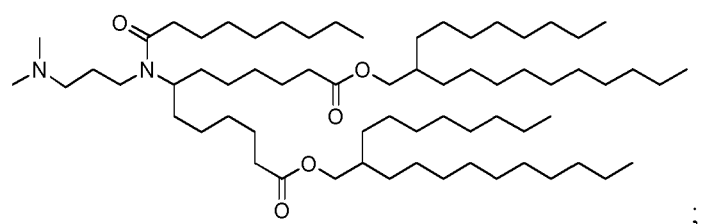
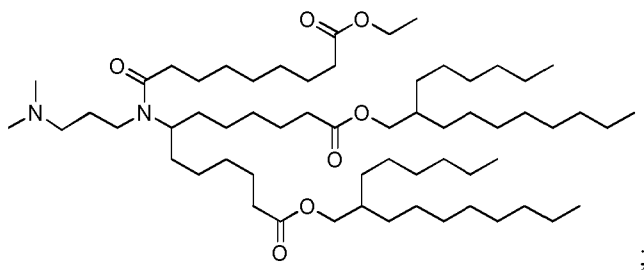


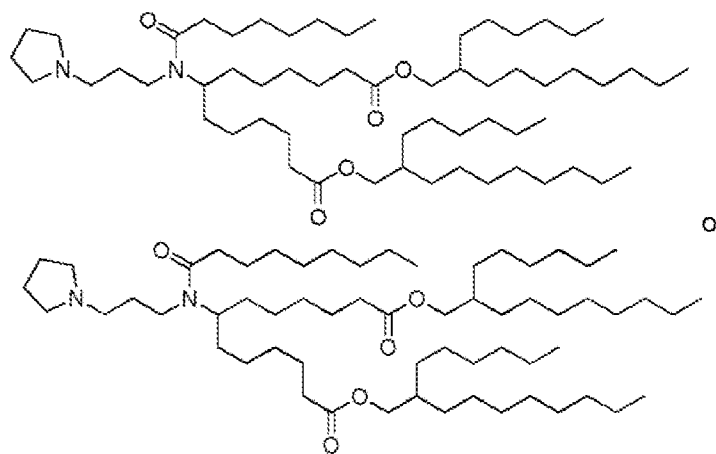
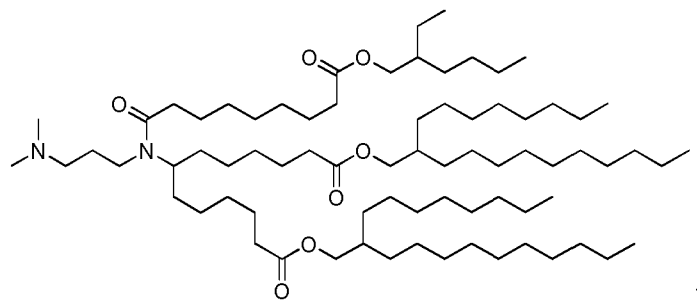
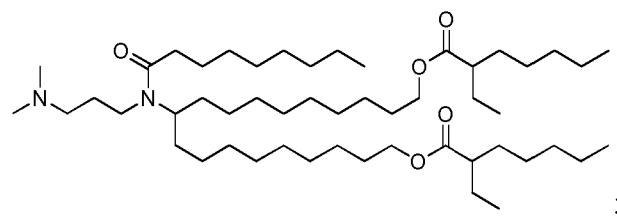
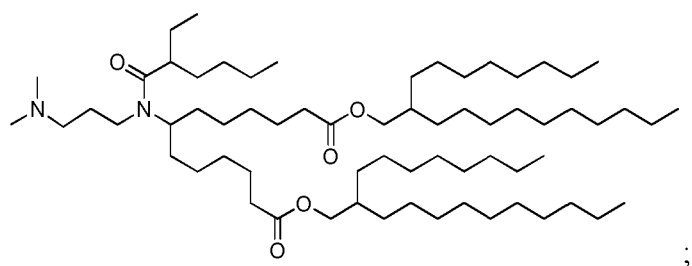


5



10



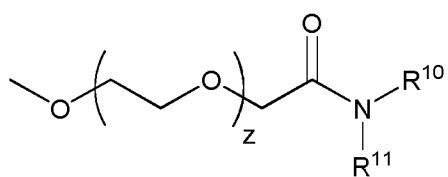


5

12. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un agente terapéutico, preferentemente que comprende uno o más excipientes seleccionados de lípidos neutros, esteroides y lípidos conjugados con polímero.

13. La composición de la reivindicación 12, en donde el lípido conjugado con polímero es un lípido pegilado que tiene la siguiente estructura (II):

15



(II)

o una sal farmacéuticamente aceptable, tautómero o estereoisómero del mismo, en donde:

- 5 R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente una cadena de alquilo lineal o ramificada, saturada o insaturada que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, en donde la cadena de alquilo está opcionalmente interrumpida con uno o más enlaces éster; y
 z tiene un valor medio que varía de 30 a 60.

14. La composición de la reivindicación 13, en donde:

- 10 a) R^{10} y R^{11} son cada uno independientemente cadenas de alquilo lineales, saturadas que contienen de 12 a 16 átomos de carbono; o
 b) el z promedio es aproximadamente 45.

- 15 15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el agente terapéutico comprende un ácido nucleico, preferentemente en donde el ácido nucleico se selecciona de antisentido y ARN mensajero.

16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15 para su uso en un método de administración del agente terapéutico a un paciente que lo necesita.

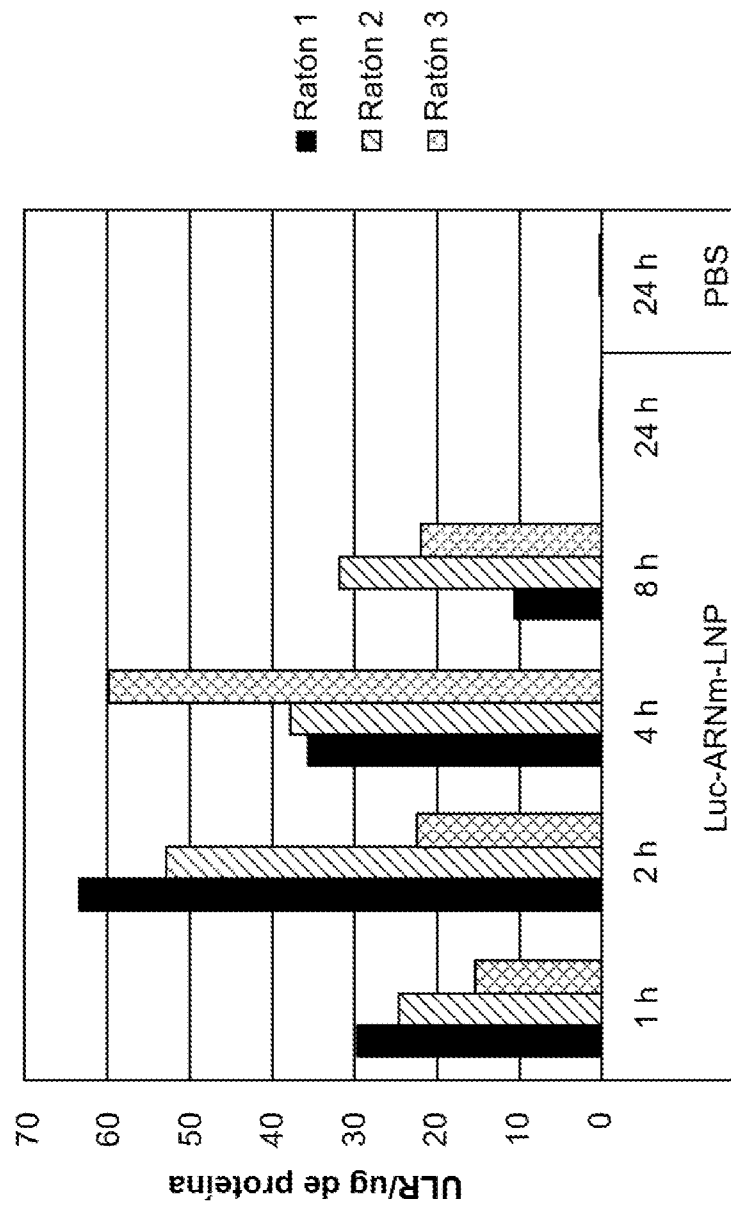
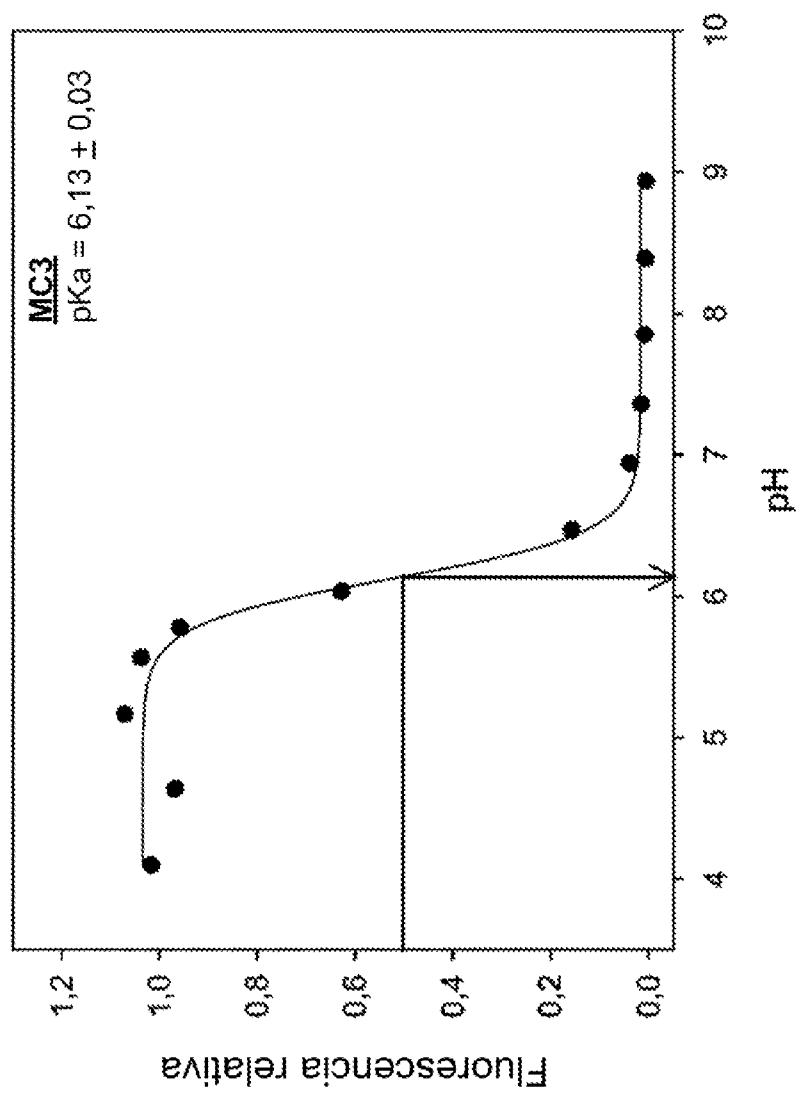
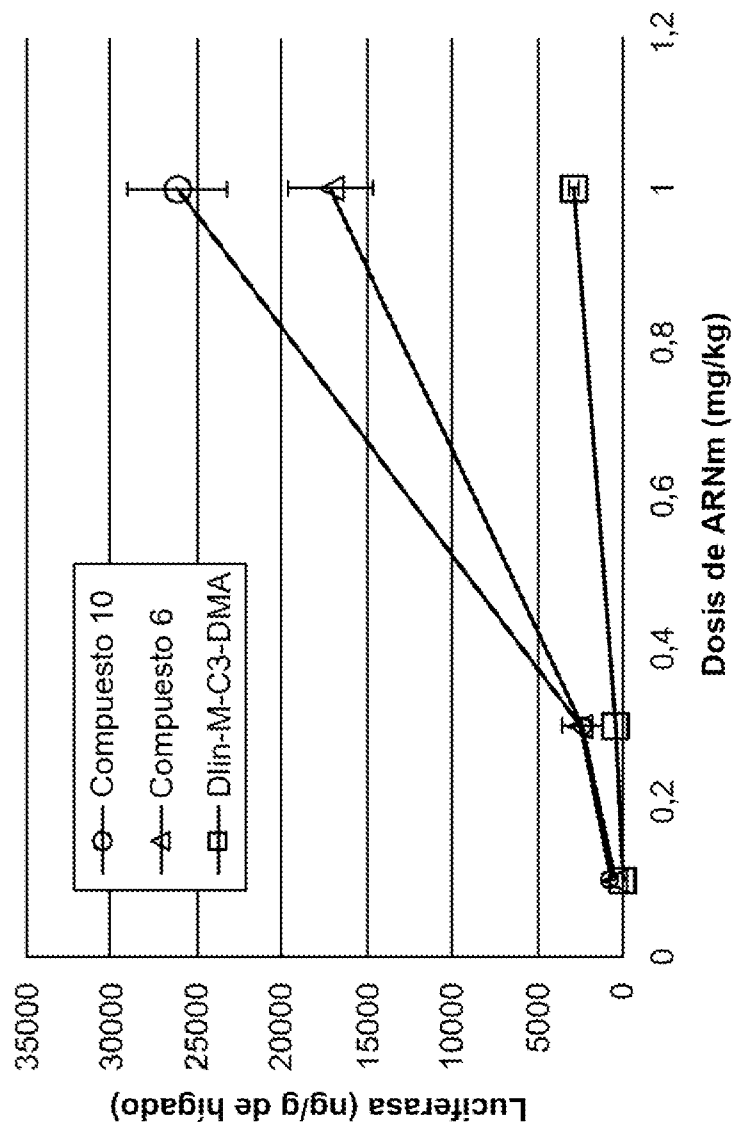


FIG. 1

**FIG. 2**

**FIG. 3**