

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 261**

51 Int. Cl.:

**C07C 229/12** (2006.01) **A61P 35/02** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**C12N 15/88** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**A61K 31/7105** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2018 PCT/JP2018/048054**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2019 WO19131839**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2018 E 18896553 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 3733641**

54 Título: **Lípidos catiónicos**

30 Prioridad:

**28.12.2017 JP 2017254667**

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

**09.09.2024**

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED  
(100.0%)  
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi  
Osaka 541-0045, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUMOTO, SATORU;  
OMORI, YOSHIMASA;  
MINENO, MASAHIRO y  
HOASHI, YASUTAKA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

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

ES 2 978 261 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lípidos catiónicos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un lípido catiónico que permite la introducción de ácidos nucleicos como principios activos en muchos tipos de células, tejidos u órganos. La presente invención se refiere además a una partícula lipídica que contiene el lípido catiónico y a una composición que contiene la partícula lipídica y un ácido nucleico.

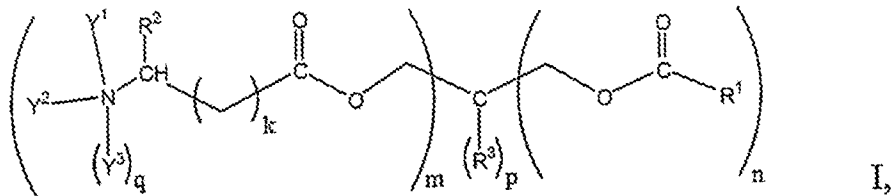
Antecedentes de la invención

10 En los últimos años se han realizado investigaciones y desarrollo intensivos de fármacos de ácidos nucleicos, que contienen un ácido nucleico como ingrediente activo. Por ejemplo, se han realizado varios estudios para fármacos de ácidos nucleicos que tienen efecto de descomposición o inhibidor de la función sobre ARNm dianas, que incluyen ácidos nucleicos tales como ARNip, miARN, miméticos de miARN y ácidos nucleicos antisentido. Además, se han llevado a cabo estudios para fármacos de ácidos nucleicos que contienen un ARNm o similar que codifica una proteína de interés para expresar la proteína de interés en células. En relación con tal investigación y desarrollo, se han desarrollado técnicas para introducir ácidos nucleicos en células, tejidos u órganos con alta eficacia como técnicas de sistemas de administración de fármacos (DDS).

15 Convencionalmente conocida como tal técnica de DDS es una técnica tal que un ácido nucleico y un lípido se mezclan para formar un complejo y se permite que las células incorporen el ácido nucleico a través del complejo. Como lípidos convencionalmente conocidos para su uso en la formación del complejo son los lípidos catiónicos, lípidos poliméricos hidrófilos, lípidos auxiliares, etc. Como tales lípidos catiónicos, por ejemplo, se conocen los compuestos descritos en documentos de la técnica anterior, como se muestra a continuación.

20 La Bibliografía de Patentes 1 describe un compuesto representado por la siguiente fórmula o una sal del mismo, y así sucesivamente.

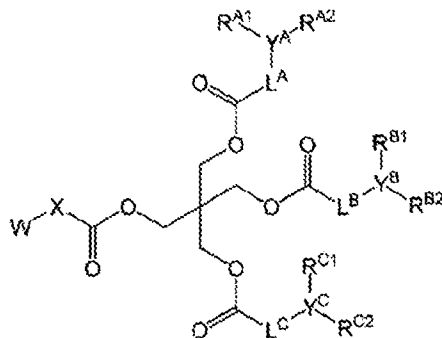
Fórmula 1



25 Para la fórmula se indica que R<sup>1</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido y alqueno C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido; cada R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, etc.; cada Y<sup>1</sup> y Y<sup>2</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, etc.; cada Y<sub>3</sub>, si está presente, se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, etc.; m es cualquier número entero de 1 a 4; n es cualquier número entero de 0 a 3; p es 0 ó 1; la suma de m, n y p es 4; k es cualquier número entero de 1 a 5; y q es 0 ó 1.

30 La Bibliografía de Patentes 2 describe un compuesto representado por la siguiente fórmula o una sal del mismo, y así sucesivamente.

35 Fórmula 2



En la fórmula, W denota la fórmula  $-NR^1R^2$  o la fórmula  $-N^+R^3R^4R^5(Z^-)$ ;  $R^1$  y  $R^2$  denotan, cada uno independientemente, un grupo alquilo  $C_{1-4}$  o un átomo de hidrógeno;  $R^3$ ,  $R^4$ , y  $R^5$  denotan, cada uno independientemente, un grupo alquilo  $C_{1-4}$ ;  $Z^-$  denota un ion negativo; X designa un grupo alquileo  $C_{1-6}$  que puede estar sustituido;  $Y^A$ ,  $Y^B$  e  $Y^C$  denotan, cada uno independientemente, un grupo metino que puede estar sustituido;  $L^A$ ,  $L^B$ , y  $L^C$  denotan, cada uno independientemente, un grupo metileno que puede estar sustituido o un enlace;  $R^{A1}$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{B1}$ ,  $R^{B2}$ ,  $R^{C1}$  y  $R^{C2}$  denotan, cada uno independientemente, un grupo alquilo  $C_{4-10}$  que puede estar sustituido.

Lista de citas

Bibliografía de patentes

Bibliografía de Patentes 1: Publicación Internacional No. WO 2003/102150

10 Bibliografía de Patentes 2: Publicación Internacional No. WO 2016/021683

**Sumario de la invención**

Problema técnico

15 Se espera que los lípidos catiónicos que permiten la introducción de ácidos nucleicos en células con alta eficacia contribuyan a la creación de fármacos de ácidos nucleicos que sean superiores en términos de manifestación de acción farmacológica, seguridad (baja toxicidad), etc., y exhiban un efecto terapéuticamente superior. Se espera que los lípidos catiónicos que permiten la introducción de ácidos nucleicos en diversas células permitan la creación de fármacos de ácidos nucleicos para enfermedades que se producen en diversos tejidos. Actualmente, sin embargo, no se ha encontrado ningún lípido catiónico que satisfaga suficientemente esos requisitos.

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar una técnica que permita la introducción de ácidos nucleicos en células con una eficiencia superior; y lípidos catiónicos, etc., para su uso en la técnica. Un objeto de la presente invención desde otro punto de vista es proporcionar una técnica que permita la introducción de ácidos nucleicos en diversas células; y compuestos, etc., para su uso en la técnica.

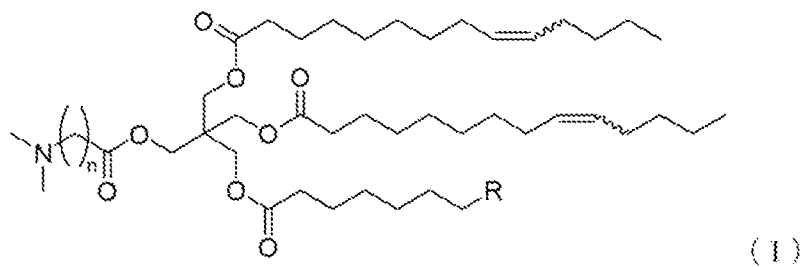
Solución al problema

25 Los presentes inventores han examinado diligentemente para resolver el problema y han encontrado que el problema se resuelve con éxito usando un compuesto, o una sal del mismo, representado por la fórmula siguiente, completando así la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere al menos a lo siguiente.

[1] Un compuesto representado por la fórmula (I):

Fórmula 3



30 en donde

n representa un número entero de 2 a 5,

R representa un grupo alquilo  $C_{1-5}$  lineal, un grupo alqueno  $C_{7-11}$  lineal, o un grupo alcadieno  $C_{11}$  lineal, y

las líneas onduladas representan cada una independientemente un enlace cis o un enlace trans,

35 o una sal del mismo.

[2] (9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo o una sal del mismo.

[3] (9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((5-(dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo o una sal del mismo.

[4] (9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((6-(dimetilamino)hexanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo o una sal del mismo.

[5] Una partícula lipídica que contiene el compuesto o una sal del mismo según el punto 1.

5 [6] Una composición para la introducción de un ácido nucleico que contiene un ácido nucleico y la partícula lipídica según el punto 5.

[7] La composición de acuerdo con el punto 6, en la que el ácido nucleico es un ARN.

[7a] La composición de acuerdo con el punto 6, en la que el ácido nucleico es un ADN.

[8] La composición de acuerdo con el punto 7, en la que el ARN es un ARNm o un ARNip.

10 En el presente documento, "el compuesto representado por la fórmula (I)" se denomina ocasionalmente "compuesto (I)". "El compuesto representado por la fórmula (I) o una sal del mismo" se denomina ocasionalmente "el compuesto de la presente invención". Una "partícula lipídica que contiene el compuesto representado por la fórmula (I) o una sal del mismo (el compuesto de la presente invención)" se denomina ocasionalmente "la partícula lipídica de la presente invención". Una "composición para la introducción de un ácido nucleico que contiene un ácido nucleico y la partícula lipídica de la presente invención" se denomina ocasionalmente "la composición de la presente invención".

15 Efectos ventajosos de la invención

La presente invención permite la introducción de ácidos nucleicos en células, tejidos u órganos con eficiencia superior. La presente invención permite la introducción de ácidos nucleicos en diversos tipos de células, tejidos u órganos (p. ej., células cancerosas). La presente invención permite la adquisición de fármacos o reactivos para investigación para introducir un ácido nucleico en diversos tipos de células, tejidos u órganos. Además, si se introduce un ácido nucleico en células, un tejido o un órgano a través de la presente invención, la eficacia de manifestación de la actividad (p. ej., acción farmacológica) poseída por el ácido nucleico es alta.

20

#### Descripción detallada de la invención

Ahora, se describirán en detalle las definiciones de los sustituyentes usados en el presente documento. Los sustituyentes tienen las siguientes definiciones, a menos que se especifique lo contrario.

25 Ejemplos del "grupo alquilo C<sub>1-5</sub> lineal" en el presente documento incluyen metilo, etilo, propilo, butilo y pentilo.

Ejemplos del "grupo alqueno C<sub>7-11</sub> lineal" en el presente documento incluyen 1-heptenilo, 2-heptenilo, 3-heptenilo, 4-heptenilo, 5-heptenilo, 6-heptenilo, 1-octenilo, 2-octenilo, 3-octenilo, 4-octenilo, 5-octenilo, 6-octenilo, 7-octenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 4-nonenilo, 5-nonenilo, 6-nonenilo, 7-nonenilo, 8-nonenilo, 1-decenilo, 2-decenilo, 3-decenilo, 4-decenilo, 5-decenilo, 6-decenilo, 7-decenilo, 8-decenilo, 9-decenilo, 1-undecenilo, 2-undecenilo, 3-undecenilo, 4-undecenilo, 5-undecenilo, 6-undecenilo, 7-undecenilo, 8-undecenilo, 9-undecenilo y 10-undecenilo. Mientras que cada uno de estos grupos alqueno C<sub>7-11</sub> lineales tienen un doble enlace carbono-carbono y, por lo tanto, el doble enlace carbono-carbono puede formar una estructura cis y una estructura trans, el doble enlace carbono-carbono puede formar cualquiera de las estructuras.

30

Ejemplos del "grupo alcadienilo C<sub>11</sub> lineal" incluyen en el presente documento 1,3-undecadienilo, 1,4-undecadienilo, 1,5-undecadienilo, 1,6-undecadienilo, 1,7-undecadienilo, 1,8-undecadienilo, 1,9-undecadienilo, 1,10-undecadienilo, 2,4-undecadienilo, 2,5-undecadienilo, 2,6-undecadienilo, 2,7-undecadienilo, 2,8-undecadienilo, 2,9-undecadienilo, 2,10-undecadienilo, 3,5-undecadienilo, 3,6-undecadienilo, 3,7-undecadienilo, 3,8-undecadienilo, 3,9-undecadienilo, 3,10-undecadienilo, 4,6-undecadienilo, 4,7-undecadienilo, 4,8-undecadienilo, 4,9-undecadienilo, 4,10-undecadienilo, 5,7-undecadienilo, 5,8-undecadienilo, 5,9-undecadienilo, 5,10-undecadienilo, 6,8-undecadienilo, 6,9-undecadienilo, 6,10-undecadienilo, 7,9-undecadienilo, 7,10-undecadienilo, y 8,10-undecadienilo. Mientras que cada uno de estos grupos alcadienilo C<sub>11</sub> lineales tienen dos dobles enlaces carbono-carbono, y por lo tanto, los dobles enlaces carbono-carbono pueden formar, cada uno de una forma independiente, una estructura cis y una estructura trans, cada doble enlace carbono-carbono puede formar cualquiera de las estructuras.

35

40

Los ejemplos preferidos de n y las líneas onduladas en la fórmula (I) son los siguientes.

45 n es preferiblemente un número entero de 3 a 5, y más preferiblemente 3.

Las líneas onduladas son preferiblemente cada una un enlace cis.

Los ejemplos específicos preferidos del compuesto (I) son los siguientes.

Compuesto (A): un compuesto tal que n es un número entero de 3 a 5, R es un grupo alqueno C<sub>7-11</sub> lineal en una estructura cis, y las líneas onduladas son cada una un enlace cis.

Compuesto (B): un compuesto tal que n es 4, R es un grupo alcadienilo C<sub>11</sub> lineal en el que dos dobles enlaces carbono-carbono forman cada uno una estructura cis, y las líneas onduladas son cada una un enlace cis.

Compuesto (C): un compuesto tal que n es 2 ó 3, R es un grupo alquilo C<sub>1-5</sub> lineal, y las líneas onduladas son cada una un enlace cis.

5 Los ejemplos específicos más preferidos del compuesto (I) son los siguientes.

Compuesto (A1): un compuesto tal que n es un número entero de 3 a 5, R es 5-heptenilo, 7-nonenilo o 9-undecenilo en la estructura cis, y las líneas onduladas son cada una un enlace cis.

Compuesto (B1): un compuesto tal que n es 4, R es 2,5-undecadienilo en el que dos dobles enlaces carbono-carbono forman cada uno una estructura cis, y las líneas onduladas son cada una un enlace cis.

10 Compuesto (C1): un compuesto tal que n es 2 ó 3, R es metilo, propilo o pentilo, y las líneas onduladas son cada una un enlace cis.

La sal del compuesto (I) es preferiblemente una sal farmacológicamente aceptable, y los ejemplos de la misma incluyen sales con una base inorgánica, sales con una base orgánica, sales con un ácido inorgánico, sales con un ácido orgánico y sales con un aminoácido básico o ácido.

15 Los ejemplos preferidos de sales con una base inorgánica incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales de aluminio; y sales de amonio. Se prefieren las sales de sodio, de potasio, de calcio y de magnesio, y se prefieren más las sales de sodio y de potasio.

20 Los ejemplos preferidos de sales con una base orgánica incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina[tris(hidroximetilo)metilamina], terc-butilamina, ciclohexilamina, bencilamina, dicitclohexilamina y N,N-dibenciletilendiamina.

Los ejemplos preferidos de sales con un ácido inorgánico incluyen sales con ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Se prefieren las sales con ácido clorhídrico y las sales con ácido fosfórico.

25 Los ejemplos preferidos de sales con un ácido orgánico incluyen sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido benenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico.

Los ejemplos preferidos de sales con un aminoácido básico incluyen sales con arginina, lisina y ornitina.

Los ejemplos preferidos de sales con un aminoácido ácido incluyen sales con ácido aspártico y ácido glutámico.

30 En la presente invención, el compuesto de la presente invención puede usarse como un lípido catiónico. El lípido catiónico puede formar un complejo con una pluralidad de moléculas en un disolvente o medio de dispersión. El complejo puede contener un componente adicional además del compuesto de la presente invención. Los ejemplos del componente adicional incluyen un componente lipídico adicional y un ácido nucleico.

35 Los ejemplos del componente lipídico adicional incluyen lípidos estructurales capaces de constituir una partícula lipídica. Para un lípido estructural de este tipo, por ejemplo, puede usarse al menos uno seleccionado del grupo que consiste en los siguientes:

Esteroles (p. ej., colesterol, éster de colesterilo, hemisuccinato de colesterilo);

40 Fosfolípidos (p. ej., fosfatidilcolina (p. ej., dipalmitoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, dilinolenoilfosfatidilcolina, MC-1010 (NOF CORPORATION), MC-2020 (NOF CORPORATION), MC-4040 (NOF CORPORATION)), fosfatidilserina (p. ej., dipalmitoilfosfatidilserina, diestearoilfosfatidilserina, dioleoilfosfatidilserina, palmitoiloleoilfosfatidilserina), fosfatidiletanolamina (p. ej., dipalmitoilfosfatidiletanolamina, diestearoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidiletanolamina, palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina), fosfatidilinositol, ácido fosfatídico); y

45 Lípidos de polietilenglicol (lípidos PEG) (p. ej., PEG-DAA, PEG-DAG, conjugado PEG-fosfolípido, PEG-Cer, PEG-colesterol, PEG-C-DOMG, 2KPEG-CMG, GM-020 (NOF CORPORATION), GS-020 (NOF CORPORATION), GS-050 (NOF CORPORATION)). En la presente invención, como lípido estructural se prefiere usar los tres, a saber, un esteroles (en particular, colesterol), un fosfolípido (en particular, fosfatidilcolina) y un lípido de polietilenglicol.

50 La relación entre el compuesto de la presente invención y el lípido estructural en el componente lipídico mixto que constituye la partícula lipídica de la presente invención puede controlarse apropiadamente según el propósito o uso. Por ejemplo, la relación del lípido estructural es típicamente de 0,008 a 4 moles y preferiblemente de 0,4 a 1,5 moles

por mol del compuesto de la presente invención. En otra definición de relaciones en el componente lipídico mixto, la cantidad del compuesto de la presente invención es normalmente de 1 a 4 moles, la del esteroles es normalmente de 0 a 3 moles, la del fosfolípido es normalmente 0 a 2 moles y la del lípido de polietilenglicol es normalmente 0 a 1 mol. En una realización más preferida con el uso de una mezcla del compuesto de la presente invención y componentes lipídicos adicionales, con respecto a las relaciones, la cantidad del compuesto de la presente invención es 1 a 1,5 moles, la del esteroles es 0 a 1,25 moles, la del fosfolípido es 0 a 0,5 moles, y la del lípido de polietilenglicol es 0 a 0,125 moles.

El compuesto de la presente invención puede usarse para producir la partícula lipídica de la presente invención. La partícula lipídica de la presente invención se refiere al complejo descrito anteriormente pero que no contiene ácido nucleico. La forma de la partícula lipídica de la presente invención no se limita a una forma particular y el alcance incluye un complejo en el que el compuesto de la presente invención y así sucesivamente se ensambla para formar una esfera; un complejo en el que el compuesto de la presente invención y así sucesivamente se ensamblan sin formar una forma particular; un complejo en el que el compuesto de la presente invención y así sucesivamente se disuelven en un disolvente; y un complejo en el que el compuesto de la presente invención y así sucesivamente se dispersan homogénea o heterogéneamente en un medio de dispersión.

La partícula lipídica de la presente invención (p. ej., una partícula lipídica compuesta por el compuesto de la presente invención y lípidos estructurales distintos del compuesto) puede usarse, por ejemplo, para producir la composición de la presente invención que contiene la partícula lipídica y un ácido nucleico (en particular, un ácido nucleico como sustancia útil para aplicaciones farmacéuticas o de investigación). La composición de la presente invención puede usarse como un fármaco o un reactivo. Para la composición de la presente invención se prefiere que la partícula lipídica encapsule un ácido nucleico en una proporción tan alta como sea posible (es decir, en una relación de encapsulación alta).

El "ácido nucleico" puede ser cualquier molécula en la que se polimerizan moléculas de nucleótidos o moléculas que tienen funciones equivalentes a las de los nucleótidos, y los ejemplos del mismo incluyen ARN, que es un polímero de ribonucleótidos; ADN, que es un polímero de desoxirribonucleótidos; un polímero de una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos; y un polímero de nucleótidos que incluye análogos de nucleótidos. Además, el ácido nucleico puede ser un polímero de nucleótidos que incluye un derivado de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario. El concepto del ácido nucleico bicatenario abarca un ácido nucleico bicatenario de manera que una hebra se hibrida con la otra hebra en condiciones rigurosas.

El análogo de nucleótido puede ser cualquier molécula obtenida modificando un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, ARN o ADN para mejorar la resistencia a las nucleasas, estabilizar, potenciar la afinidad con un ácido nucleico de cadena complementaria o potenciar la permeabilidad celular en comparación con ARN o ADN, o para visualización. El análogo de nucleótido puede ser una molécula de origen natural o una molécula no natural, y los ejemplos del mismo incluyen un análogo de nucleótido modificado con azúcar y un análogo de nucleótido modificado con un enlace fosfodiéster.

El análogo de nucleótido modificado con un azúcar puede ser uno cualquiera obtenido mediante la adición o sustitución con una sustancia que tiene una estructura química arbitraria para una parte o la totalidad de la estructura química del azúcar de un nucleótido. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-metilribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-propilribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-metoxietilribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-metoxietilribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-[2-(guanidinio)etil]ribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-fluorribosa, un ácido nucleico artificial reticulado provisto de dos estructuras cíclicas introduciendo una estructura reticulada en el resto azúcar (ácido nucleico puenteado) (BNA), más específicamente, un ácido nucleico artificial bloqueado en el que el átomo de oxígeno en la posición 2' y el átomo de carbono en la posición 4' están reticulados vía un grupo metileno (ácido nucleico bloqueado) (LNA) y un ácido nucleico artificial reticulado con etileno (ácido nucleico puenteado con etileno) (ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)], además, un ácido nucleico peptídico (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)], un ácido nucleico oxipeptídico (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)] y un ácido ribonucleico peptídico (ARNP) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)].

El análogo de nucleótido modificado con un enlace fosfodiéster puede ser uno cualquiera obtenido mediante la adición de o sustitución con una sustancia química arbitraria para una parte o la totalidad de la estructura química del enlace fosfodiéster de un nucleótido. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen un análogo de nucleótido sustituido con un enlace fosforotioato y un análogo de nucleótido sustituido con un enlace fosforamidato N3'-P5' [Saibo Kogaku (en japonés, título traducido: Cell Engineering), 16, 1463-1473 (1997)] [ARNi y estrategias antisentido, KODANSHA LTD. (2005)].

El derivado de ácido nucleico puede ser cualquier molécula obtenida añadiendo a un ácido nucleico otra sustancia química para mejorar la resistencia a nucleasas, estabilizar, potenciar la afinidad con un ácido nucleico de cadena complementaria, o potenciar la permeabilidad celular en comparación con el ácido nucleico, o para visualización. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen un derivado con 5'-poliamina añadida, un derivado con colesterol añadido, un derivado con esteroide añadido, un derivado con ácido biliar añadido, un derivado con vitamina añadida, un derivado con Cy5 añadido, un derivado con Cy3 añadido, un derivado con 6-FAM añadido, y un derivado con biotina añadida.

El ácido nucleico en la presente invención no se limita a un ácido nucleico particular, y puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, con el fin de mejorar una enfermedad, un síntoma, un trastorno o dolencia, y mitigar una enfermedad, un síntoma, un trastorno o una afección patológica o prevenir el inicio de la misma (en el presente documento, denominado ocasionalmente "tratamiento o similar de una enfermedad"), o un ácido nucleico para regular la expresión de una proteína deseada que es útil para investigación, incluso aunque la proteína no contribuya al tratamiento o similar de una enfermedad.

Los genes o polinucleótidos relacionados con enfermedades (en el presente documento, ocasionalmente denominados "genes relacionados con enfermedades") están disponibles, por ejemplo, en el Institute of Genetic Medicine de McKusick-Nathans, Universidad de Johns Hopkins (Baltimore, MD) y el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD).

Los ejemplos específicos del ácido nucleico en la presente invención incluyen ARNip, ARNsh, miARN, miméticos de miARN, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, ARNm, ácidos nucleicos señuelo, aptámeros, ADN plasmídicos, ADN cósmidos y ADN de BAC. El ácido nucleico es preferiblemente un ARN tal como un ARNip y un ARNm o un análogo o derivado obtenido modificando artificialmente un ARN.

En la presente invención, el "ARNip" se refiere a un ARN bicatenario o un ARN pariente del mismo que consiste en 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente en 15 a 25 nucleótidos, e incluye secuencias complementarias. El ARNip incluye nucleótidos salientes, preferiblemente de uno a tres nucleótidos, más preferiblemente de dos nucleótidos, en el extremo 3'. El resto de secuencias complementarias puede ser completamente complementario o incluir nucleótidos no complementarios, pero preferiblemente son completamente complementarios.

El ARNip en la presente invención no se limita a un ARNip particular y, por ejemplo, puede usarse un ARNip para la reducción de la expresión génica contra un gen relacionado con una enfermedad. Un gen relacionado con enfermedad se refiere a cualquier gen o polinucleótido que genera un producto de transcripción o traducción a un nivel anormal o en una forma anormal en células derivadas de tejido de un paciente, en comparación con tejido o células de un control libre de enfermedad. Para el ARNip en la presente invención, se puede usar un ARNip para regular la expresión de una proteína deseada útil para investigación.

En la presente invención, el "ARNm" se refiere a un ARN que incluye una secuencia de nucleótidos que puede traducirse en una proteína. El ARNm en la presente invención no se limita a un ARNm particular y puede ser cualquier ARNm capaz de expresar una proteína deseada en células. El ARNm es preferiblemente un ARNm útil para aplicaciones farmacéuticas (p. ej., aplicaciones de tratamiento de enfermedades) y/o aplicaciones para investigación, y los ejemplos de tales ARNm incluyen un ARNm para expresar una proteína marcadora, tal como la luciferasa, en células.

La enfermedad no se limita a una enfermedad particular, y los ejemplos de la enfermedad incluyen enfermedades enumeradas a continuación. Los contenidos en cada "(" son ejemplos del gen relacionado con la enfermedad correspondiente, excepto en el caso en el que se enumeran ejemplos específicos de enfermedad. Otro ejemplo del ácido nucleico en la presente invención es un ácido nucleico que regula el nivel de expresión de cualquiera de esos genes relacionados con la enfermedad (o una proteína codificada por el gen relacionado con la enfermedad).

(1) Enfermedades del sistema sanguíneo [anemia (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT), síndrome de linfocitos desnudos (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5), enfermedades hemorrágicas (TBXA2R, P2RX1, P2X1), deficiencias del factor H y del factor 1 similar a H (HF1, CFH, HUS), deficiencias del factor V y del factor VIII (MCFD2), deficiencia del factor VII (F7), deficiencia del factor X (F10), deficiencia de factor XI (F11), deficiencia de factor XII (F12, HAF), deficiencia de factor XIIIa (F13A1, F13A), deficiencia de factor XIIIb (F13B), anemia de Fanconi (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596), linfocitosis hemofagocítica (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3), Hemofilia A (F8, F8C, HEMA), hemofilia B (F9, HEMB), trastornos hemorrágicos (PI, ATT, F5), deficiencia de leucocitos (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4), anemia de células falciformes (HBB), talasemia (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1), etc];

(2) Enfermedades inflamatorias/inmunológicas [SIDA (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1), síndrome linfoproliferativo autoinmune (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A), inmunodeficiencia combinada (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4), infección por VIH (CCL5, SCYA5, D17S135E, TCP228, IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, DMKBR5, CCKR5, CCR5), inmunodeficiencia (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI), inflamación (IL10, IL-1, IL-13, IL-17, IL-23, CTLA4), inmunodeficiencia combinada grave (JAK3, JAKL, DCLRE1C, ATREMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4), artritis reumatoide, psoriasis, enfermedades inflamatorias del intestino (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de Sjogren, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, lupus eritematoso discoide, enfermedad de Castleman, espondilitis anquilosante, polimiositis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, dermatoesclerosis, lupus profundus, tiroiditis crónica, enfermedad de Graves,

gastritis autoinmune, diabetes mellitus de tipo I y tipo II, anemia hemolítica autoinmune, neutropenia autoinmune, trombocitopenia, dermatitis atópica, hepatitis activa crónica, miastenia grave, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Addison, respuesta inmune anormal, artritis, dermatitis, radiodermatitis, cirrosis biliar primaria, etc];

5 (3) Enfermedades metabólicas/hepáticas/reñales [neuropatía amiloide (TTR, PALB), amiloidosis (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB), esteatohepatitis no alcohólica y fibrosis hepática (COL1A1), cirrosis (KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988), fibrosis quística (CFTR, ABCG7, CF, MRP7), enfermedad de almacenamiento de glucógeno (SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PERM), adenoma hepatocelular (TCF1, HFN1A, MODY3), insuficiencia hepática (SCOD1, SCO1), deficiencia de lipasa hepática (LIPC), hepatoblastoma (CTNBN1, PDFGRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5), enfermedad renal quística medular (UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2), fenilcetonuria (PAH, PKU1, QDPR, DHP, PTS), enfermedades reñales y hepáticas multiquísticas (FCYT, PKHD1, APRKD, PDK1, PDK2, PDK4, PDKTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63), etc];

10 (4) Enfermedades del sistema nervioso [ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF), enfermedad de Alzheimer (APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLA2, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3), autismo (BZRAP1, MDGA2, GLO1, MECF2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2), síndrome X frágil (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5), enfermedad de Huntington (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17), enfermedad de Parkinson (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, DBH, NDUFV2), síndrome de Rett (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9), esquizofrenia (GSK3, 5-HTT, COMT, DRD, SLC6A3, DAOA, DTNBP1), trastorno relacionado con secretasa (APH-1), etc];

15 (5) Enfermedades oculares [degeneración macular asociada a la edad (Abcr, Ccl2, cp, Timp3, catepsina D, Vldlr, Ccr2), cataratas (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BSFP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1), opacidad corneal (APOA1, TGFB1, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TASTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD), córnea plana hereditaria congénita (KERA, CNA2), glaucoma (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A), amaurosis congénita de Leber (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3), distrofia macular (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2), etc.]; y

20 (6) Enfermedades neoplásicas [tumor maligno, glaucoma neovascular, hemangioma infantil, mieloma múltiple, sarcoma crónico, melanoma metastásico, sarcoma de Kaposi, angioproliferación, caquexia, metástasis o similares de cáncer de mama, cáncer (p. ej., cáncer colorrectal (p. ej., cáncer colorrectal familiar, cáncer colorrectal no polipósico hereditario, tumor del estroma gastrointestinal), cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno), mesotelioma, cáncer pancreático (p. ej., carcinoma ductal pancreático), cáncer gástrico (p. ej., adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso), cáncer de mama (p. ej., carcinoma ductal invasivo de mama, carcinoma ductal no invasivo de mama, carcinoma inflamatorio de mama), cáncer de ovario (p. ej., cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales ováricas, tumor ovárico de bajo grado), cáncer de próstata (p. ej., cáncer de próstata dependiente de hormonas, cáncer de próstata independiente de hormonas), cáncer de hígado (p. ej., cáncer de hígado primario, cáncer de conducto biliar extrahepático), cáncer de tiroides (p. ej., cáncer de tiroides medular), cáncer de riñón (p. ej., carcinoma de células reñales, carcinoma de células transicionales de pelvis renal y uréter), cáncer uterino, tumor cerebral (p. ej., astrocitoma pineal, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico), melanoma, sarcoma, cáncer de vejiga, cáncer hematológico o similares que incluyen mieloma múltiple, adenoma pituitario, glioma, neurinoma acústico, sarcoma retiniano, cáncer faríngeo, cáncer de laringe, cáncer de lengua, timoma, carcinoma esofágico, cáncer duodenal, cáncer de colon, cáncer rectal, carcinoma hepatocelular, tumor endocrino pancreático, cáncer de conducto biliar, cáncer de vesícula biliar, cáncer de pene, cáncer ureteral, tumor testicular, carcinoma vulvar, cáncer de cuello uterino, carcinoma de cuerpo uterino, sarcoma uterino, enfermedad trofoblástica, cáncer vaginal, cáncer de piel, micosis fungoide, basalioma, sarcoma de partes blandas, linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, síndrome mielodisplásico, leucemia de células T del adulto, enfermedad mieloproliferativa crónica, tumor endocrino pancreático, histiocitoma fibroso, leiomiomasarcoma, el rhabdomiomasarcoma, carcinoma de sitio primario desconocido), leucemia (p. ej., leucemia aguda (p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda), leucemia crónica (p. ej., leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica), síndrome mielodisplásico), sarcoma uterino (p. ej., tumor mixto mesodérmico uterino, leiomiomasarcoma uterino, tumor del estroma endometrial), mielofibrosis, etc.].

La composición de la presente invención como fármaco puede producirse usando un método conocido en la técnica de la formulación de fármacos con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de la forma de dosificación del fármaco incluyen formulaciones para administración parenteral (p. ej., un líquido tal como una inyección) mezcladas con un agente auxiliar convencional tal como un agente tamponante y/o un estabilizante; y formulaciones para administración tópica, tales como una pomada, una crema, un líquido y un emplastro, mezcladas con un vehículo farmacéutico convencional.

La composición de la presente invención puede usarse para la introducción de un ingrediente activo en diversos tipos de células, tejidos u órganos. Los ejemplos de células a las que se puede aplicar la composición de la presente invención incluyen células madre mesenquimatosas, células madre neurales, células madre de la piel, esplenocitos, células nerviosas, células gliales, células B pancreáticas, células de la médula ósea, células mesangiales, células de Langerhans, células epidérmicas, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, células de fibra, células musculares (p. ej., células del músculo esquelético, células del músculo cardíaco, mioblastos, células satélite musculares, células del músculo liso), células grasas, células sanguíneas (p. ej., macrófagos, células T, células B, células asesinas naturales, mastocitos, leucocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, megacariocitos, células madre hematopoyéticas), sinoviocitos, condrocitos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células mamarias, hepatocitos o células estromales, óvulos, espermátidas, o células precursoras capaces de inducir la diferenciación en estas células, células madre (p. ej., incluyendo células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre embrionarias (células ES)), células germinales primordiales, ovocitos y óvulos fertilizados. Los ejemplos de tejidos u órganos a los que se puede aplicar la composición de la presente invención incluyen todos los tejidos u órganos en los que están presentes las células anteriores, por ejemplo, cerebro, sitios del cerebro (p. ej., bulbo olfativo, amígdala, ganglio basal, hipocampo, tálamo, hipotálamo, núcleo subtalámico, corteza cerebral, médula oblonga, cerebelo, lóbulo occipital, lóbulo frontal, lóbulo temporal, putamen, núcleo caudado, calloso, sustancia negra), médula espinal, glándula pituitaria, estómago, páncreas, riñón, hígado, gónadas, tiroides, vesícula biliar, médula ósea, glándula suprarrenal, piel, pulmón, tracto digestivo (p. ej., intestino grueso, intestino delgado), vaso sanguíneo, corazón, timo, bazo, glándula submandibular, sangre periférica, células sanguíneas periféricas, próstata, placenta, útero, huesos, articulaciones y músculos (p. ej., músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco). Esas células, tejidos u órganos pueden ser células cancerosas, tejidos cancerosos o similares que han sufrido un proceso canceroso.

La composición de la presente invención es particularmente superior en eficiencia para introducir un ácido nucleico en células cancerosas.

El compuesto, la partícula lipídica y la composición de la presente invención son estables y tienen baja toxicidad y pueden usarse de manera segura. Al usar la composición de la presente invención in vivo, o al usar la composición como un fármaco, la composición se administra adecuadamente a un sujeto (p. ej., un ser humano o un mamífero no humano (preferiblemente, un ser humano)) de modo que pueda administrarse a las células diana una cantidad eficaz del ácido nucleico.

Al usar la composición de la presente invención in vivo, o al usar la composición como un fármaco, la composición puede administrarse por vía oral o parenteral (p. ej., administración local, rectal o intravenosa) de una manera segura en forma de una formulación farmacéutica tal como comprimidos (incluyendo comprimidos recubiertos de un azúcar, comprimidos recubiertos con una película, comprimidos sublinguales, comprimidos que se disgregan por vía oral), polvos, gránulos, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas, microcápsulas), líquidos, trociscos, jarabes, emulsiones, suspensiones, inyecciones (p. ej., inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraperitoneales), formulaciones tópicas (p. ej., formulaciones para administración nasal, formulaciones transdérmicas, pomadas), supositorios (p. ej., supositorios rectales, supositorios vaginales), pelets, formulaciones nasales, formulaciones pulmonares (inhalaciones) e infusiones. Cada formulación puede ser una formulación de liberación controlada tal como una formulación de liberación rápida y una formulación de liberación sostenida (p. ej., una microcápsula de liberación sostenida).

Ahora, se describirá un método para producir el compuesto de la presente invención.

Las materias primas y los reactivos usados en cada etapa del método de producción a continuación, y el compuesto resultante puede formar cada uno una sal. Ejemplos de tales sales son las mismas que las sales mencionadas anteriormente para el compuesto de la presente invención.

Cuando el compuesto obtenido en cada etapa es un compuesto libre, el compuesto puede convertirse en una sal deseada usando un método conocido. Por el contrario, cuando el compuesto obtenido en cada etapa es una sal, el compuesto puede convertirse en una forma libre u otra sal deseada usando un método conocido.

El compuesto obtenido en cada etapa puede usarse para la reacción posterior directamente como una solución de reacción, o puede obtenerse un producto bruto a partir de la misma y usarse para la reacción posterior. Alternativamente, el compuesto obtenido en cada etapa puede aislarse y/o purificarse a partir de una mezcla de reacción según un método convencional usando un medio de separación tal como concentración, cristalización, recristalización, destilación, extracción con disolventes, destilación fraccionada y cromatografía.

Si un compuesto que es materia prima o reactivo en cada etapa está disponible en el mercado, el producto disponible en el mercado puede usarse directamente.

El tiempo de reacción para la reacción en cada etapa, que puede variar dependiendo de los reactivos y disolventes a usar, es típicamente de 1 minuto a 48 horas, y preferiblemente de 10 minutos a 8 horas, a menos que se especifique lo contrario.

La temperatura de reacción para la reacción en cada etapa, que puede variar dependiendo de los reactivos y disolventes a usar, es típicamente de -78 °C a 300 °C, y preferiblemente de -78 °C a 150 °C, a menos que se especifique lo contrario.

5 La presión para la reacción en cada etapa, que puede variar dependiendo de los reactivos y disolventes a usar, es típicamente de 101 kPa a 2026 kPa (1 atm a 20 atm) y preferiblemente de 101 kPa a 303 kPa (1 atm a 3 atm) a menos que se especifique lo contrario.

10 Un aparato de síntesis con microondas tal como un iniciador producido por Biotage se usa ocasionalmente en la reacción en una etapa. La temperatura de reacción, que puede variar dependiendo de los reactivos y disolventes a usar, es típicamente de temperatura ambiente a 300 °C, preferiblemente de temperatura ambiente a 250 °C, y más preferiblemente de 50 °C a 250 °C, a menos que se especifique lo contrario. El tiempo de reacción, que puede variar dependiendo de los reactivos y disolventes a usar, es típicamente de 1 minuto a 48 horas, y preferiblemente de 1 minuto a 8 horas, a menos que se especifique lo contrario.

15 En la reacción en cada etapa, se usa un reactivo en una cantidad de 0,5 equivalentes a 20 equivalentes, preferiblemente en una cantidad de 0,8 equivalentes a 5 equivalentes, con respecto a la cantidad de sustrato, a menos que se especifique lo contrario. Cuando se usa un reactivo como catalizador, el reactivo se usa en una cantidad de 0,001 equivalentes a 1 equivalente, preferiblemente en una cantidad de 0,01 equivalentes a 0,2 equivalentes, con respecto a la cantidad de sustrato, a menos que se especifique lo contrario. Si un reactivo sirve como disolvente de reacción en combinación con su propio papel, el reactivo se usa en una cantidad como disolvente.

20 En la reacción en cada etapa, la reacción se realiza sin disolvente, o en un disolvente apropiado que disuelva o suspenda los reactivos en el mismo, a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos del disolvente incluyen los disolventes descritos en los Ejemplos y los siguientes disolventes.

Alcoholes: metanol, etanol, isopropanol, isobutanol, alcohol terc-butílico, 2-metoxietanol, etc.;

Éteres: éter dietílico, éter diisopropílico, éter difenílico, tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano, etc.;

Hidrocarburos aromáticos: clorobenceno, tolueno, xileno, etc.;

25 Hidrocarburos saturados: ciclohexano, hexano, heptano, etc.;

Amidas: N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, etc.;

Hidrocarburos halogenados: diclorometano, tetracloruro de carbono, etc.;

Nitrilos: acetonitrilo y así sucesivamente;

Sulfóxidos: dimetilsulfóxido y similares;

30 Bases orgánicas aromáticas: piridina, etc.;

Anhídridos de ácidos: anhídrido acético, etc.;

Ácidos orgánicos: ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, etc.;

Ácidos inorgánicos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, etc.;

Ésteres: acetato de etilo, acetato de isopropilo, etc.;

35 Cetonas: acetona, metil etil cetona, etc.; y

Agua.

Dos o más de estos disolventes pueden mezclarse para su uso con una relación apropiada.

Cuando se usa una base en cada etapa de la reacción, por ejemplo, se usa cualquiera de las bases enumeradas a continuación o las bases descritas en los Ejemplos.

40 Bases inorgánicas: hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido magnésico, etc.;

Sales básicas: carbonato de sodio, carbonato de calcio, hidrogenocarbonato de sodio, etc.;

Bases orgánicas: trietilamina, dietilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina, N,N-dimetilanilina, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno, imidazol, piperidina, etc.;

Alcóxidos metálicos: etóxido sódico, terc-butóxido potásico, terc-butóxido sódico, etc.;

45 Hidruros de metales alcalinos: hidruro sódico, etc.;

Amidas metálicas: amida de sodio, diisopropilamida de litio, hexametildisilazida de litio, etc.; y

Compuestos tipo organolitio: n-butil-litio, sec-butil-litio, etc.

Cuando se usa un ácido o un catalizador ácido en cada etapa de la reacción, por ejemplo, se usa cualquiera de los ácidos y catalizadores ácidos enumerados a continuación y los ácidos y catalizadores ácidos descritos en los Ejemplos.

Ácidos inorgánicos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, etc.;

Ácidos orgánicos: ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido p-toluenosulfónico, ácido 10-canforsulfónico, etc.; y

Ácidos de Lewis: complejo de trifluoruro de boro-éter dietílico, yoduro de cinc, cloruro de aluminio anhidro, cloruro de cinc anhidro, cloruro de hierro anhidro, etc.

A menos que se especifique lo contrario, cada etapa de la reacción se realiza de acuerdo con un método conocido tal como un método descrito en The Fifth Series of Experimental Chemistry, Vol. 13 a 19 (The Chemical Society of Japan (ed.)); Shin Jikken Kagaku Koza (en japonés, título traducido: New Experimental Chemistry), Vol. 14 y 15 (The Chemical Society of Japan (ed.)); Seimitsu Yuki Kagaku (en japonés, título traducido: Precise Organic Chemistry, título original: Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium ) 2a edición revisada (L.F. Tietze, Th. Eicher, Nankodo Co., Ltd.); Organic Name Reaction; The Reaction Mechanism and Essence Revised Edition (TOGO, Hideo, KODANSHA LTD.); ORGANIC SYNTHESIS Collective Volume I a VII (John Wiley & Sons Inc.); Modern Organic Synthesis in the Laboratory: A Collection of Standard Experimental Procedures (Jie Jack Li, Oxford University Press); Comprehensive Heterocyclic Chemistry III, Vol. 1 a Vol. 14 (Elsevier Japan K.K.); Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis (supervisor de la traducción: TOMIOKA, Kiyoshi, editorial: Kagaku-Dojin Publishing Company, INC.); Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc.) (1989); o similares, o de acuerdo con un método descrito en los Ejemplos.

La reacción de protección o desprotección para un grupo funcional en cada etapa se realiza de acuerdo con un método conocido tal como un método descrito en "Protective Groups in Organic Synthesis, 4a Ed." (Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts) publicado por Wiley-Interscience Publication, 2007; "Protecting Groups 3a Ed." (P.J. Kocienski) publicado por Thieme Medical Publishers, 2004; o similares, o de acuerdo con un método descrito en los Ejemplos.

Los ejemplos de grupos protectores de un grupo hidroxilo de alcoholes o similares y grupos hidroxilo fenólicos incluyen grupos protectores de tipo éter tales como metoximetil éter, bencil éter, p-metoxibencil éter, t-butildimetilsilil éter, t-butildifenilsilil éter y tetrahidropiranil éter; grupos protectores de tipo carboxilato tales como acetato; ésteres de tipo sulfonato tales como metanosulfonato; y grupos protectores de tipo carbonato tales como t-butilcarbonato.

Los ejemplos de grupos protectores para un grupo carbonilo de aldehídos incluyen grupos protectores de tipo acetal tales como dimetilacetal; y grupos protectores de tipo acetal cíclico tales como 1,3-dioxano cíclico.

Los ejemplos de grupos protectores de un grupo carbonilo de cetonas incluyen grupos protectores de tipo cetal tales como dimetilcetal; grupos protectores de tipo cetal cíclico tales como 1,3-dioxano cíclico; grupos protectores de tipo oxima tales como O-metiloxima; y grupos protectores de tipo hidrazona tales como N,N-dimetilhidrazona.

Los ejemplos de grupos protectores para un grupo carboxi incluyen grupos protectores de tipo éster tales como éster metílico; y grupos protectores de tipo amida tales como N,N-dimetilamida.

Los ejemplos de grupos protectores de tiol incluyen grupos protectores de tipo éter tales como bencil tioéter y grupos protectores de tipo éster tales como tioacetato, tiocarbonato y tiocarbamato.

Los ejemplos de grupos protectores de un grupo amino y heterociclos aromáticos tales como imidazol, pirrol e indol incluyen grupos protectores de tipo carbamato tales como bencilcarbamato; grupos protectores de tipo amida tales como acetamida; grupos protectores de tipo alquilamina tales como N-trifenilmetilamina; y grupos protectores de tipo sulfonamida tales como metanosulfonamida.

La eliminación de un grupo protector se puede realizar usando un método conocido tal como un método que usa un ácido, una base, luz ultravioleta, hidrazina, fenilhidrazina, N-metilditiocarbamato de sodio, fluoruro de tetrabutilamonio, acetato de paladio o haluro de trialkilsililo (p. ej., yoduro de trimetilsililo, bromuro de trimetilsililo), o usando un método de reducción.

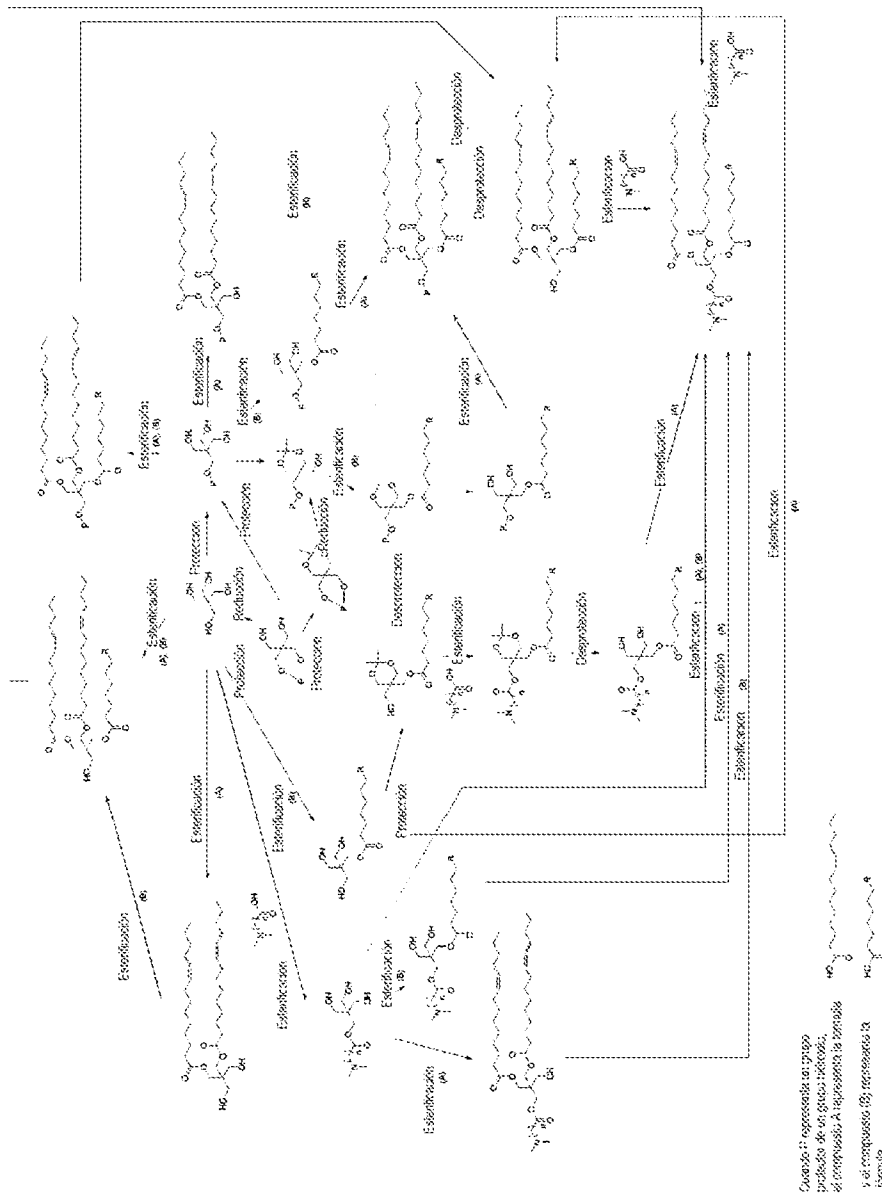
Los ejemplos de reductores a usar cuando se realiza la reacción de reducción en cada etapa incluyen hidruros metálicos tales como hidruro de litio y aluminio, triacetoxiborohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H), borohidruro de sodio y triacetoxiborohidruro de tetrametilamonio; boranos tales como un complejo de borano-tetrahidrofurano; níquel Raney; cobalto Raney; hidrógeno y ácido fórmico. Por ejemplo, se puede usar níquel Raney o cobalto Raney en presencia de hidrógeno o ácido fórmico. Cuando se reduce un doble enlace o triple enlace carbono-carbono, se puede usar un método que use un catalizador tal como paladio-carbono y un catalizador de Lindlar.

- 5 Los ejemplos de oxidantes a usar cuando se realiza la reacción de oxidación en cada etapa incluyen perácidos tales como ácido m-cloroperbenzoico (MCPBA), peróxido de hidrógeno e hidroperóxido de t-butilo; percloratos tales como perclorato de tetrabutilamonio; cloratos tales como clorato de sodio; cloritos tales como clorito de sodio; peryodatos tales como peryodato de sodio; reactivos de yodo hipervalentes tales como yodosilbenceno; reactivos que contienen manganeso tales como dióxido de manganeso y permanganato de potasio; reactivos de plomo tales como tetraacetato de plomo; reactivos que contienen cromo tales como clorocromato de piridinio (PCC), dicromato de piridinio (PDC) y el reactivo de Jones; compuestos halogenados tales como N-bromosuccinimida (NBS); oxígeno; ozono; un complejo de trióxido de azufre-piridina; tetróxido de osmio; dióxido de selenio; y 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ).
- 10 Los ejemplos de iniciadores de radicales a usar cuando se realiza la reacción de ciclación de radicales en cada etapa incluyen compuestos azo tales como azobisisobutironitrilo (AIBN); iniciadores de radicales solubles en agua tales como ácido 4-4'-azobis-4-cianopentanoico (ACPA); trietilboro en presencia de aire u oxígeno; y peróxido de benzoilo. Los ejemplos de reactivos de reacción de radicales a usar incluyen tributilestannano, tris(trimetilsilil)silano, 1,1,2,2-tetrafenildisilano, difenilsilano y yoduro de samario.
- 15 Los ejemplos de reactivos de Wittig a usar cuando la reacción de Wittig se realiza en cada etapa incluyen alquilideno fosforanos. Los alquilideno fosforanos se pueden preparar usando un método conocido tal como la reacción de una sal de fosfonio y una base fuerte.
- 20 Los ejemplos de reactivos a usar cuando se realiza la reacción de Horner-Emmons en cada etapa incluyen fosfonoacetatos tales como dimetilfosfonoacetato de metilo y dietilfosfonoacetato de etilo; y bases tales como hidruros de metales alcalinos y organolitios.
- Los ejemplos de reactivos a usar cuando la reacción de Friedel-Crafts se realiza en cada etapa incluyen un ácido de Lewis con un cloruro de ácido o un agente alquilante (p. ej., un alquilo halogenado, un alcohol, una olefina). Alternativamente, se puede usar un ácido orgánico o un ácido inorgánico en lugar de un ácido de Lewis, y en lugar de un cloruro de ácido se puede usar un anhídrido de ácido tal como anhídrido acético.
- 25 Cuando se realiza una reacción de sustitución nucleófila aromática en cada etapa, como reactivos se usan un nucleófilo (p. ej., una amina, imidazol) y una base (p. ej., una sal básica, una base orgánica).
- 30 Los ejemplos de bases usadas para generar un carbanión cuando se realiza una reacción de adición nucleófila con un carbanión, una reacción nucleófila de adición 1,4 con un carbanión (reacción de adición de Michael) o una reacción de sustitución nucleófila con un carbanión en cada etapa, incluyen organolitios, alcóxidos metálicos, bases inorgánicas y bases orgánicas.
- 35 Los ejemplos de reactivos de Grignard que se usan cuando la reacción de Grignard se realiza en cada etapa incluyen haluros de arilmagnesio tales como bromuro de fenilmagnesio; y haluros de alquilmagnesio tales como bromuro de metilmagnesio y bromuro de isopropilmagnesio. Los reactivos de Grignard se pueden preparar usando un método conocido tal como la reacción de un alquilo halogenado o arilo halogenado y magnesio metálico en un disolvente del tipo éter o en tetrahidrofurano.
- 40 Cuando se realiza la reacción de condensación de Knoevenagel en cada etapa, se usan como reactivos un compuesto de metileno activo intercalado entre dos grupos extractores de electrones (p. ej., ácido malónico, malonato de dietilo, malononitrilo) y una base (p. ej., una base orgánica, un alcóxido metálico, una base inorgánica).
- 45 Cuando se realiza la reacción de Vilsmeier-Haack en cada etapa, se usan cloruro de fosforilo y un derivado de amida (p. ej., N,N-dimetilformamida) como reactivos.
- Los ejemplos de agentes azidantes a usar cuando se realiza la reacción de azidación para un alcohol, un haluro de alquilo o un sulfonato incluyen en cada etapa difenilfosforilazida (DPPA), trimetilsililazida y azida sódica. Cuando se azida un alcohol, por ejemplo, se puede usar un método que usa difenilfosforilazida y 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) o un método que usa trimetilsililazida y un ácido de Lewis.
- 50 Los ejemplos de reductores a usar cuando se realiza la reacción de aminación reductora en cada etapa incluyen triacetoxiborohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, hidrógeno y ácido fórmico. Los ejemplos de compuestos carbonilo a usar cuando el sustrato es un compuesto tipo amina incluyen aldehídos tales como paraformaldehído, así como acetaldehído, y cetonas tales como ciclohexanona. Los ejemplos de aminas a usar cuando el sustrato es un compuesto carbonilo incluyen amoniaco; aminas primarias, tales como metilamina, y aminas secundarias tales como dimetilamina.
- 55 Cuando se realiza la reacción de Mitsunobu en cada etapa, como reactivos se usan un azodicarboxilato (p. ej., azodicarboxilato de dietilo (DEAD), azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD)) y trifenilfosfina.
- Los ejemplos de reactivos a usar cuando se realiza la reacción de esterificación, la reacción de amidación o la reacción de formación de urea en cada etapa incluyen formas de acilo halogenadas tales como cloruros de ácido y bromuros de ácido; y ácidos carboxílicos activados tales como anhídridos de ácido, formas de éster activadas y formas de

- 5 sulfato. Los ejemplos de activadores de ácidos carboxílicos incluyen agentes de condensación de carbodiimida tales como hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSCD); agentes de condensación basados en triazina tales como cloruro-n-hidrato de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM); agentes de condensación de carbonato tales como 1,1-carbonildiimidazol (CDI); difenilfosforilazida (DPPA); sal de benzotriazol-1-iloxi-trisdimetilaminofosfonio (reactivo BOP); yoduro de 2-cloro-1-metil-piridinio (reactivo Mukaiyama); cloruro de tionilo; haloformatos de alquilo inferior tales como cloroformiato de etilo; hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU); ácido sulfúrico; y cualquier combinación de los mismos. Cuando se usa un agente de condensación tipo carbodiimida, se puede añadir adicionalmente a la reacción un aditivo tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N-hidroxisuccinimida (HOSu) y dimetilaminopiridina (DMAP).
- 10 Los ejemplos de catalizadores metálicos a usar cuando se realiza la reacción de acoplamiento en cada etapa incluyen compuestos de paladio tales como acetato de paladio (II), cloruro de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0), diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II), diclorobis(trietilfosfina)paladio(II), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0), 1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocenopaladio(II) y acetato de paladio (II); compuestos de níquel tales como tetrakis(trifenilfosfina)níquel (0); compuestos de rodio tales como cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(III); compuestos de cobalto; compuestos de cobre tales como óxido de cobre y yoduro de cobre (I); y compuestos de platino. Además, se puede añadir una base a la reacción, y los ejemplos de la base incluyen bases inorgánicas y sales básicas.
- 15 Cuando se realiza la reacción de tiocarbonilación en cada etapa, como agente de tiocarbonilación se usa típicamente pentasulfuro de difósforo; sin embargo, puede usarse no sólo pentasulfuro de difósforo, sino también un reactivo que tiene estructura de 1,3,2,4-ditiadifosfetano-2,4-disulfuro, tal como 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetano-2,4-disulfuro (reactivo de Lowesson).
- 20 Los ejemplos del tipo agentes halogenantes a usar cuando se realiza la reacción de Wohl-Ziegler en cada etapa incluyen N-yodosuccinimida, N-bromosuccinimida (NBS), N-clorosuccinimida (NCS), bromo y cloruro de sulfurilo. Además, la reacción puede acelerarse mediante la adición de calor, luz o un iniciador de radicales tal como peróxido de benzoilo y azobisisobutironitrilo.
- 25 Los ejemplos de agentes halogenantes a usar cuando se realiza la reacción de halogenación para un grupo hidroxilo en cada etapa incluyen ácidos hidrohálidos y haluros de ácido de ácidos inorgánicos, específicamente, ácido clorhídrico, cloruro de tionilo, oxiclorigenado de fósforo para cloración, y ácido bromhídrico al 48% para bromación. Se puede usar un método en el que se obtiene una forma de alquilo halogenado a partir de un alcohol por la acción de trietilfosfina y tetracloruro de carbono, tetrabromuro de carbono, o similares. Alternativamente, se puede usar un método en el que se sintetiza una forma de alquilo halogenado a través de una reacción de dos etapas de manera que un alcohol se convierte en un sulfato y luego se hace reaccionar con bromuro de litio, cloruro de litio o yoduro de sodio.
- 30 Los ejemplos de reactivos a usar cuando la reacción de Arbuzov se realiza en cada etapa incluyen alquilos halogenados tales como acetato de bromoetilo; y fosfitos tales como trietilfosfito y tri(isopropil)fosfito.
- 35 Los ejemplos de agentes de sulfonación a usar cuando se realiza la reacción de sulfonación en cada etapa incluyen cloruro de metanosulfonilo, cloruro de p-toluenosulfonilo, anhídrido metanosulfónico, anhídrido p-toluenosulfónico y anhídrido trifluorometanosulfónico.
- 40 Cuando se realiza la reacción de hidrólisis en cada etapa, se usa un ácido o una base como reactivo. Cuando se realiza la reacción de hidrólisis ácida para un éster t-butílico, se añade ácido fórmico o trietilsilano en algunos casos para atrapar reductoramente cationes t-butílicos producidos como subproductos.
- 45 Los ejemplos de agentes deshidratantes a usar cuando se realiza la reacción de deshidratación en cada etapa incluyen ácido sulfúrico, pentóxido de difósforo, oxiclorigenado de fósforo, N,N'-díciclohexilcarbodiimida, alúmina y ácido polifosfórico.
- El compuesto (I) puede producirse, por ejemplo, usando un método de producción mostrado a continuación. Entre los compuestos (I), un compuesto en el que cada una de las líneas onduladas forma una estructura cis y un compuesto en el que una o ambas líneas onduladas forman una estructura trans pueden producirse usando el mismo método de producción que el método de producción mostrado a continuación. En la presente invención, el compuesto (I) con una estructura deseada puede sintetizarse usando una materia prima apropiada para la estructura deseada del compuesto (I) particularmente en esterificación. Una sal del compuesto (I) se puede obtener mediante mezcla apropiada con una base inorgánica, una base orgánica, un ácido orgánico o un aminoácido básico o ácido.

50

Fórmula 4



Ahora, se describirá un método para producir una partícula lipídica que contiene el compuesto de la presente invención y el de producir una composición que contiene la partícula lipídica y un ácido nucleico para la introducción de un ácido nucleico.

- 5 La partícula lipídica de la presente invención puede producirse mezclando el compuesto de la presente invención (lípido catiónico) y, según sea necesario, un componente lipídico adicional, y luego aplicando un método conocido para preparar una partícula lipídica a partir de un componente lipídico. Por ejemplo, la partícula lipídica puede producirse como una dispersión de partículas lipídicas disolviendo el componente lipídico (mezclado) en un disolvente orgánico y mezclando la disolución de disolvente orgánico resultante con agua o un tampón (p. ej., a través de un método emulsionante). La mezcla puede realizarse usando un sistema de mezclado de microfluidos (p. ej., el aparato NanoAssemblr (Precision NanoSystems)). La partícula lipídica obtenida puede someterse a desalación o diálisis y filtración estéril. Según sea necesario, se puede realizar el ajuste del pH o el ajuste de la presión osmótica.

15 El compuesto (I) puede formar diferentes estructuras dependiendo de la combinación de las definiciones de n, R y las líneas onduladas de fórmula (I). Para producir la partícula lipídica, puede usarse un compuesto que tiene una estructura específica solo como compuesto (I), y puede usarse una mezcla de una pluralidad de compuestos de diferentes estructuras como compuesto (I).

Los ejemplos del "componente lipídico adicional" incluyen los lípidos estructurales mencionados anteriormente tales como esteroides, fosfolípidos y lípidos de polietilenglicol. El "componente lipídico adicional" se usa, por ejemplo, en una

- cantidad de 0,008 a 4 moles por mol del compuesto de la presente invención. El compuesto de la presente invención se usa preferiblemente como una mezcla con el componente lipídico adicional (en particular, colesterol, fosfatidilcolina y un lípido de polietilenglicol). En una realización preferida que usa una mezcla del compuesto de la presente invención y el componente lipídico adicional, la mezcla es una mezcla de 1 a 4 moles del compuesto de la presente invención, de 0 a 3 moles de un esteroles, de 0 a 2 moles de un fosfolípido y de 0 a 1 mol de un lípido de polietilenglicol. En una realización más preferida que usa una mezcla del compuesto de la presente invención y el componente lipídico adicional, la mezcla es una mezcla de 1 a 1,5 moles del compuesto de la presente invención, de 0 a 1,25 moles de un esteroles, de 0 a 0,5 moles de un fosfolípido y de 0 a 0,125 moles de un lípido de polietilenglicol.
- La concentración del compuesto de la presente invención o la mezcla del compuesto de la presente invención y el componente lipídico adicional en la disolución de disolvente orgánico es preferiblemente de 0,5 a 100 mg/mL.
- Los ejemplos del disolvente orgánico incluyen metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, terc-butanol, acetona, acetonitrilo, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido y mezclas de los mismos. El disolvente orgánico puede contener de 0 a 20% de agua o un tampón.
- Los ejemplos del tampón incluyen tampones ácidos (p. ej., tampón de acetato, tampón de citrato, tampón de 2-morfolinoetanosulfonato (MES), tampón de fosfato) y tampones neutros (p. ej., tampón de 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato (HEPES), tampón de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), tampón de fosfato, solución salina tamponada con fosfato (PBS)).
- Si la mezcla se realiza usando un sistema de mezclado de microfluidos, se prefiere mezclar de 1 a 5 partes en volumen de agua o el tampón por parte en volumen de la solución de disolvente orgánico. El caudal de la solución mixta (solución mixta de la solución de disolvente orgánico y agua o el tampón) en el sistema es preferiblemente de 0,1 a 10 mL/min, y la temperatura es preferiblemente de 15 a 45 °C.
- La composición de la presente invención puede producirse como una dispersión de partículas lipídicas que contiene un ingrediente activo añadiendo de antemano un ácido nucleico como ingrediente activo al agua o al tampón en la producción de la partícula lipídica o de una dispersión de partículas lipídicas. El ingrediente activo se añade preferiblemente de manera que la concentración de ingrediente activo en el agua o el tampón sea de 0,05 a 2,0 mg/mL.
- Además, la composición de la presente invención puede producirse como una dispersión de partículas lipídicas que contiene un ingrediente activo mezclando la partícula lipídica o una dispersión de partículas lipídicas y un ingrediente activo o una solución acuosa del ingrediente activo por medio de un método conocido. La dispersión de partículas lipídicas se puede preparar dispersando la partícula lipídica en un medio de dispersión apropiado. La solución acuosa del ingrediente activo se puede preparar disolviendo el ingrediente activo en un disolvente apropiado.
- El contenido del compuesto de la presente invención en la composición de la presente invención con el medio de dispersión y el disolvente excluido es preferiblemente 40 a 70% en peso.
- El contenido del ingrediente activo en la composición de la presente invención con el medio de dispersión y el disolvente excluido es preferiblemente de 1 a 20% en peso.
- El medio de dispersión de la dispersión de partículas lipídicas o la dispersión que contiene la composición se puede reemplazar con agua o un tampón mediante diálisis. La diálisis se realiza con una membrana de ultrafiltración que tiene un peso molecular de corte de 10 a 20 K a 4 °C a temperatura ambiente. La diálisis puede realizarse repetidamente. Para la sustitución del medio de dispersión, se puede usar filtración de flujo tangencial (TFF). Después de la sustitución del medio de dispersión, se puede realizar el ajuste del pH o el ajuste de la presión osmótica, según sea necesario.
- Ahora, se describirán métodos para analizar una partícula lipídica que contiene el compuesto de la presente invención, y una composición que contiene la partícula lipídica y un ácido nucleico como ingrediente activo.
- El tamaño de partícula de la partícula lipídica (en la composición) puede medirse usando un medio conocido. Por ejemplo, se puede usar un aparato Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited), un analizador de tamaño de partícula basado en una técnica NIBS (retrodispersión no invasiva), para calcular el tamaño de partícula como un tamaño de partícula promedio en z a través del análisis acumulativo de la función de autocorrelación. El tamaño de partícula (tamaño de partícula promedio) de la partícula lipídica (en la composición) es preferiblemente de 10 a 200 nm.
- La concentración y la relación de encapsulación de un ácido nucleico (p. ej., un ARNip, un ARNm) como ingrediente activo en la composición de la presente invención se puede medir usando un medio conocido. Por ejemplo, después de marcar con fluorescencia el ácido nucleico con el kit Quant-iT (TM) RiboGreen (R) (Invitrogen), la concentración y la relación de encapsulación pueden determinarse midiendo la intensidad de fluorescencia. La concentración del ácido nucleico en la composición puede calcularse usando una curva de calibrado preparada a partir de disoluciones acuosas del ácido nucleico con concentraciones conocidas, y la razón de encapsulación puede calcularse basándose en la diferencia de la intensidad de fluorescencia dependiendo de la presencia o ausencia de adición de Triton-X100 (un tensioactivo para desintegrar la partícula lipídica). La concentración del ácido nucleico en la composición se refiere

a la concentración total de moléculas del ácido nucleico encapsulado en la partícula lipídica y de moléculas del ácido nucleico no encapsulado en la partícula lipídica, y la relación de encapsulación se refiere a la fracción de moléculas del ácido nucleico encapsulado en la partícula lipídica con respecto a todas las moléculas del ácido nucleico en la composición.

## 5 Ejemplos

La presente invención se describirá adicionalmente en detalle con referencia a los Ejemplos, Ejemplos de Ensayo y Ejemplos de Formulación;

10 "Temperatura ambiente" en los ejemplos a continuación indica típicamente de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 35 °C. Cada relación mostrada para un disolvente mixto indica una relación en volumen, a menos que se indique lo contrario. % indica % en peso, a menos que se indique lo contrario.

15 La elución en cromatografía en columna se realizó bajo observación con TLC (cromatografía de capa fina), a menos que se describa otra cosa. En la observación por TLC, se usó como placa de TLC una placa de gel de sílice 60 con indicador fluorescente F<sub>254</sub> producida por Merck KGaA, y como eluyente se usó un disolvente usado como disolvente de elución en cromatografía en columna. Se empleó un detector de UV para la detección, y se realizó la observación con un reactivo colorante de TLC, según fuera necesario. En la descripción de la cromatografía en columna de gel de sílice, NH indica que se usó gel de sílice enlazado a aminopropilsilano, y Diol indica que se usó gel de sílice enlazado a 3-(2,3-dihidroxipropoxi)propilsilano. En la descripción de HPLC preparativa (cromatografía de líquidos de alta resolución), C18 indica que se usó gel de sílice enlazado a octadecilo. Cada relación mostrada para el disolvente de elución indica una relación en volumen, a menos que se indique lo contrario.

20 Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN se midieron usando un aparato de RMN con transformada de Fourier. Para el análisis de <sup>1</sup>H-RMN se utilizó el software ACD/SpecManager (nombre del producto) y así sucesivamente. Ocasionalmente se omite la descripción para los picos de un grupo hidroxilo, un grupo amino, etc., con un pico protónico muy amplio.

25 La EM se midió a través de una CL/EM y una MALDI/TOFMS. Para el método de ionización, se usó un método ESI, un método APCI o un método MALDI. Se usó CHCA para la matriz. Los valores medidos (encontrados) se reportaron como datos. En casos típicos, algunos picos de iones moleculares se observan como iones de fragmentos. En el caso de una sal, se observa típicamente un pico de ion molecular para la forma libre, o picos de iones catiónicos, aniónicos o de fragmentos.

En los Ejemplos que siguen, se usan las siguientes abreviaturas.

- EM: Espectro de masas
- 30 M: Concentración molar
- N: Normalidad
- CDCl<sub>3</sub>: Cloroformo deuterado
- DMSO-d<sub>6</sub>: Dimetilsulfóxido deuterado
- <sup>1</sup>H-RMN: Resonancia magnética nuclear de protones
- 35 LC/EM: Cromatógrafo de líquidos/espectrómetro de masas
- ESI: Ionización por electropulverización
- APCI: Ionización química a presión atmosférica
- MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz
- TOFMS: Espectrometría de masas de tiempo de vuelo
- 40 CHCA: Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico
- DMF: N,N-dimetilformamida
- THF: Tetrahidrofurano
- DMAP: 4-Dimetilaminopiridina
- TBAF: Fluoruro de tetrabutilamonio

45

Ejemplo 1. (9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo

A) 2-(((terc-Butildimetilsilil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

5 A una mezcla de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol (5,45 g), 1H-imidazol (2,72 g) y DMF (190 mL), se añadió una solución de terc-butilclorodimetilsilano (3,01 g) en DMF (10 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 24 horas, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó tres veces con agua y una vez con salmuera saturada, y después se secó sobre sulfato sódico anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (2,25 g). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,08 (6H, s), 0,90 (9H, s), 2,53 (3H, t, J = 5,5 Hz), 3,66 (2H, s), 3,73 (6H, d, J = 5,5 Hz).

10 B) (9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((terc-butil(dimetil)silil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo

15 A una solución de 2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (258 mg), ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (769 mg) y DMAP (126 mg) en DMF (3 mL), se añadió hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (790 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y después se secó sobre sulfato sódico anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (860 mg). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,03 (6H, s), 0,81-0,96 (18H, m), 1,18-1,41 (36H, m), 1,53-1,67 (6H, m), 1,91-2,10 (12H, m), 2,29 (6H, t, J = 7,6 Hz), 3,58 (2H, s), 4,08 (6H, s), 5,27-5,43 (6H, m).

C) (9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-hidroxi-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo

20 A una solución de (9Z)-tetradec-9-enoato de 3-((terc-butil(dimetil)silil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo (5,91 g) en THF (120 mL) se añadió una mezcla de una solución en THF de TBAF (1 M, 14,85 mL) y ácido acético (4,91 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 días, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó una vez con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico y una vez con salmuera saturada, y después se secó sobre sulfato sódico anhidro, y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (4,96 g). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,82-0,97 (9H, m), 1,16-1,42 (36H, m), 1,52-1,68 (6H, m), 1,90-2,12 (12H, m), 2,32 (6H, t, J = 7,6 Hz), 2,52 (1H, t, J = 7,0 Hz), 3,49 (2H, d, J = 7,0 Hz), 4,11 (6H, s), 5,26-5,42 (6H, m).

D) (9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo

30 A una solución de (9Z)-tetradec-9-enoato de 3-hidroxi-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo (4,96 g), DMAP (796 mg) e hidrocioruro de ácido 4-(dimetilamino)butanoico (2,19 g) en DMF (20 mL) se añadió hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,50 g) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó una vez con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (5,31 g). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,82-0,94 (9H, m), 1,20-1,42 (36H, m), 1,50-1,66 (6H, m), 1,69-1,83 (2H, m), 1,90-2,10 (12H, m), 2,20 (6H, s), 2,23-2,41 (10H, m), 4,11 (8H, s), 5,23-5,44 (6H, m).

Ejemplo 4. (9Z)-Hexadec-9-enoato de 3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo

40 A) 2-(((terc-butil(difenil)silil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

45 A una mezcla de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol (5,0 g), 1H-imidazol (2,5 g) y DMF (200 mL) se añadió una solución de terc-butilclorodifenilsilano (5,1 g) en DMF (10 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó tres veces con agua y una vez con salmuera saturada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (6,4 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,07 (9H, s), 2,34 (3H, t, J = 5,5 Hz), 3,67 (2H, s), 3,74 (6H, d, J = 5,5 Hz), 7,39-7,48 (6H, m), 7,63-7,67 (4H, m).

B) (5-(((terc-Butil(difenil)silil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol

50 A una solución de 2-(((terc-butil(difenil)silil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (3,5 g) y 2,2-dimetoxipropano (1,5 g) en acetona (35 mL) se añadió ácido p-toluenosulfónico monohidrato (88,9 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, se añadió a la mezcla de reacción una disolución acuosa diluida de amoníaco para neutralizar la mezcla de reacción y después se separó por destilación el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (2,7 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 1,07 (9H, s), 1,27 (3H, s), 1,41 (3H, s), 2,12-2,18 (1H, m), 3,69-3,78 (8H, m), 7,38-7,47 (6H, m), 7,65-7,69 (4H, m).

55

## C) (9Z)-Hexadec-9-enoato de 5-(((terc-butil(difenil)silil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo

A una solución de 5-(((terc-butil(difenil)silil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol (910 mg), DMAP (215 mg) y ácido (9Z)-hexadec-9-enoico (838 mg) en DMF (10 mL) se añadió hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (757 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 6 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y después se secó sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (1,43 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,84 - 0,91 (3H, m), 1,03 - 1,07 (9H, m), 1,22 - 1,35 (16H, m), 1,40 (6H, d, J = 17,0 Hz), 1,49 - 1,63 (2H, m), 2,01 (4H, q, J = 6,5 Hz), 2,24 (2H, t, J = 7,6 Hz), 3,65 (2H, s), 3,73 (2H, d, J = 11,7 Hz), 3,80 (2H, d, J = 12,0 Hz), 4,17 (2H, s), 5,29 - 5,39 (2H, m), 7,35 - 7,46 (6H, m), 7,65 (4H, d, J = 6,9 Hz).

## D) (9Z)-Hexadec-9-enoato de 5-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo

A una solución de (9Z)-hexadec-9-enoato de 5-(((terc-butil(difenil)silil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo (1,43 g) en THF (4 mL) se añadió una solución en THF de TBAF (1 M, 2,64 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 horas, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó una vez con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (0,82 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,85 - 0,91 (3H, m), 1,24 - 1,36 (16H, m), 1,42 (6H, s), 1,58 - 1,66 (2H, m), 2,01 (4H, q, J = 6,5 Hz), 2,30 (1H, t, J = 6,6 Hz), 2,35 (2H, t, J = 7,6 Hz), 3,48 (2H, d, J = 6,6 Hz), 3,69 - 3,75 (4H, m), 4,25 (2H, s), 5,31 - 5,38 (2H, m).

## E) (9Z)-Hexadec-9-enoato de 5-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo

A una solución de (9Z)-hexadec-9-enoato de 5-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo (410 mg), DMAP (97 mg) e hidrocloreto de ácido 4-(dimetilamino)butírico (250 mg) en DMF (4 mL) se añadió hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (343 mg) a 50 °C. Después de agitar durante 4 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y después se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (NH<sub>3</sub>, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (430 mg). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,86 - 0,91 (3H, m), 1,24 - 1,36 (16H, m), 1,42 (6H, s), 1,53 - 1,69 (2H, m), 1,78 (2H, m), 1,98 - 2,04 (4H, m), 2,21 (6H, s), 2,29 (4H, m), 2,37 (2H, t, J = 7,6 Hz), 3,74 (4H, s), 4,11 (4H, d, J = 5,7 Hz), 5,31 - 5,38 (2H, m).

## F) (9Z)-Hexadec-9-enoato de 3-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo

Se añadieron ácido acético (2 mL) y agua (1 mL) a (9Z)-hexadec-9-enoato de 5-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo (430 mg) y el resultante se agitó a 75 °C durante 2 horas, y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadieron acetato de etilo y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y el resultante se agitó durante 2 horas. Después de realizar dos lavados con agua, el resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego el disolvente se separó por destilación a presión reducida. A una solución del residuo resultante se añadieron DMAP (201 mg) y ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (466 mg) en DMF (4 mL), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (458 mg) a 50 °C. Después de agitar durante 4 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y después se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (NH<sub>3</sub>, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (604 mg). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0,85 - 0,92 (9H, m), 1,24 - 1,36 (40H, m), 1,55 - 1,64 (6H, m), 1,73 - 1,80 (2H, m), 1,98 - 2,05 (12H, m), 2,20 (6H, s), 2,24 - 2,33 (8H, m), 2,36 (2H, t, J=7,6 Hz), 4,09 - 4,13 (8H, m), 5,31 - 5,38 (6H, m).

## Ejemplo 8. (9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((N,N-dimetil-β-alanil)oxi)metil)-2-((octanoiloxi)metil)propano-1,3-diilol

## A) (2-(4-Metoxifenil)-1,3-dioxano-5,5-diil)dimetanol

Se agitó a 50 °C una solución de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol (506 g) en agua (2,0 L). Se añadió ácido clorhídrico concentrado (18 mL) a la misma, a la cual se añadió gota a gota p-metoxibenzaldehído (474 mL) a aproximadamente 30 °C durante 3 horas. Después, la temperatura de la solución de reacción se ajustó a 25 °C y la solución de reacción se agitó durante 5 horas. A esto se añadió una solución acuosa 2 N de hidróxido sódico (120 mL) y el resultado se agitó durante 1 hora. Los cristales se recogieron mediante filtración y se lavaron con agua y luego se realizó la recristalización con acetato de etilo/hexano para proporcionar el compuesto del título (769 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,24 (2H, d, J = 5,0 Hz), 3,67 (2H, d, J = 5,4 Hz), 3,74 (3H, s), 3,77 (2H, d, J = 11,3 Hz), 3,88 (2H, t, J = 11,3 Hz), 4,53 (1H, t, J = 5,4 Hz), 4,62 (1H, t, J = 5,0 Hz), 5,34 (1H, s), 6,90 (2H, d, J = 8,9 Hz), 7,33 (2H, d, J = 8,9 Hz).

## B-1) 2-(Hidroximetil)-2-(((4-metoxibencil)oxi)metil)propano-1,3-diol

A una solución en suspensión de 2-(4-metoxifenil)-1,3-dioxano-5,5-diildimetanol (10,0 g) en tolueno (100 mL), se añadió gota a gota una solución de DIBAL-H 1,5 M (105 mL) a temperatura ambiente y el resultado se agitó durante 5 horas. Se añadió metanol (30 mL) y luego se añadieron ácido clorhídrico 2 N (20 mL) y una solución acuosa 4 N de hidróxido de sodio (240 mL) y el resultado se agitó durante 2 horas, y después se separó la capa de tolueno. Después de neutralizar la capa acuosa con ácido clorhídrico, se realizó la extracción con acetato de etilo y el extracto se lavó dos veces con salmuera saturada y se filtró a través de Celite. El disolvente se separó por destilación a presión reducida y el residuo se recristalizó con acetato de etilo/hexano para dar el compuesto del título (6,6 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,32 (2H, s), 3,39 (6H, d, J = 5,4 Hz), 3,74 (3H, s), 4,21 (3H, t, J = 5,4 Hz), 4,36 (2H, s), 6,90 (2H, similar a d, J = 7,8 Hz), 7,23 (2H, similar a d, J = 7,8 Hz).

## C-1) 5-(((4-Metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol

A una solución de 2-(hidroximetil)-2-(((4-metoxibencil)oxi)metil)propano-1,3-diol (1,00 g) y 2,2-dimetoxipropano (1,22 g) en DMF (5 mL), se añadió p-toluenosulfonato de piridinio (10 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó una vez con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y dos veces con una solución salina al 5 %, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se separó por destilación en atmósfera de presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (426 mg). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,29 (3H, s), 1,29 (3H, s), 3,35 (2H, s), 3,39 (2H, d, J = 5,1 Hz), 3,61 (4H, s), 3,74 (3H, s), 4,38 (2H, s), 4,59 (1H, t, J = 5,1 Hz), 6,90 (2H, similar a d, J = 7,5 Hz), 7,24 (2H, similar a d, J = 7,5Hz)

## B-2) 9-(4-Metoxifenil)-3,3-dimetil-2,4,8,10-tetraoxaespиро[5,5]undecano

A una solución de 2-(4-metoxifenil)-1,3-dioxano-5,5-diildimetanol (2,00 g) y 2,2-dimetoxipropano (2,46 g) en DMF (8 mL) se añadió p-toluenosulfonato de piridinio (20 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 4 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó dos veces con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y dos veces con salmuera saturada, y después se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se separó el disolvente por destilación a presión reducida. El residuo se recristalizó con acetato de etilo/hexano para dar el compuesto del título (1,62 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,34 (6H, s), 3,33 (2H, s), 3,63 (2H, d, J = 11,7 Hz), 3,74 (3H, s), 3,99 (2H, s), 4,12 (2H, d, J = 11,7 Hz), 5,37 (1H, s), 6,90 (2H, d, J = 8,8 Hz), 7,34 (2H, d, J = 8,8 Hz).

## C-2) 5-(((4-Metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol

A una solución en suspensión de 9-(4-metoxifenil)-3,3-dimetil-2,4,8,10-tetraoxaespиро[5,5]undecano (22,0 g) en tolueno (200 mL) se añadió gota a gota una solución de DIBAL-H (60 mL) a de 5 a 20 °C y el resultado se agitó a 15 °C durante 3 horas. Se añadió metanol (22 mL) y después se añadió gota a gota una solución acuosa 2 N de hidróxido sódico (100 mL) y una solución acuosa 4 N de hidróxido sódico (200 mL) en el orden presentado. Después de agitar durante 1,5 horas, la capa de tolueno se separó y se lavó con una solución salina al 5%. El disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (14,7 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,29 (3H, s), 1,29 (3H, s), 3,35 (2H, s), 3,39 (2H, d, J = 5,1 Hz), 3,61 (4H, s), 3,74 (3H, s), 4,38 (2H, s), 4,59 (1H, t, J = 5,1 Hz), 6,90 (2H, similar a d, J = 7,5 Hz), 7,24 (2H, similar a d, J = 7,5Hz).

## D) Octanoato de 5-(((4-metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo

A una solución de 5-(((4-metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol (2,00 g), DMAP (412 mg) y ácido octanoico (1,27 g) en DMF (20 mL) se añadió hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,94 g) a 50 °C. Después de agitar durante 4 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y después se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (2,78 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,84 - 0,91 (3H, m), 1,22 - 1,33 (8H, m), 1,40 (6H, s), 1,53 - 1,61 (2H, m), 2,26 (2H, t, J = 7,6 Hz), 3,39 (2H, s), 3,68 - 3,74 (2H, m), 3,76 - 3,80 (2H, m), 3,80 (3H, s), 4,15 (2H, s), 4,42 (2H, s), 6,87 (2H, d, J = 7,8 Hz), 7,20 - 7,24 (2H, m).

## E) Octanoato de 5-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo

A una solución de octanoato de 5-(((4-metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo (2,78 g) en etanol (30 mL) se añadió Pd-carbono (840 mg) a temperatura ambiente y el resultado se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 5 horas. Después de la reacción, el Pd-carbono se separó mediante filtración y luego el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (1,35 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,85 - 0,91 (3H, m), 1,23 - 1,34 (8H, m), 1,38 - 1,44 (6H, m), 1,63 (2H, m), 2,30 - 2,38 (3H, m), 3,48 (2H, d, J = 6,6 Hz), 3,68 - 3,75 (4H, m), 4,25 (2H, s).

## F) Octanoato de (5-(((N,N-dimetil-β-alanil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo

A una solución de octanoato de (5-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo (400 mg), DMAP (129 mg) e hidrocloreuro del ácido 3-(dimetilamino)propanoico (305 mg) en DMF (4 mL) se añadió hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (456 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 4 horas se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y después se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (320 mg). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,84 - 0,92 (3H, m), 1,21 - 1,33 (8H, m), 1,42 (6H, s), 1,61 (2H, br), 2,23 (6H, s), 2,32 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,47 - 2,51 (2H, m), 2,57 - 2,61 (2H, m), 3,75 (4H, s), 4,13 (4 H, d, J = 11,7 Hz).

## G) (9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((N,N-dimetil-β-alanil)oxi)metil)-2-((octanoiloxi)metil)propano-1,3-diilo

Se añadieron ácido acético (1,6 mL) y agua (0,8 mL) a octanoato de (5-(((N,N -dimetil-β-alanil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metilo (320 mg) y el resultante se agitó a 65 °C durante 3,5 horas y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo se añadieron acetato de etilo y una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y el resultante se agitó durante 2 horas. Después de realizar el lavado dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, el resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego el disolvente se separó por destilación a presión reducida. A una solución del residuo resultante (150 mg), DMAP (101 mg) y ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (235 mg) en DMF (4,5 mL) se añadió hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (231 mg) a 50 °C. Después de agitar durante 8 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (230 mg). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,84 - 0,93 (9H, m), 1,24 - 1,36 (30H, m), 1,53 - 1,65 (8H, m), 1,98 - 2,05 (8H, m), 2,22 (6H, s), 2,30 (6H, t, J = 7,6 Hz), 2,48 (2H, t, J = 6,9 Hz), 2,58 (2H, t, J = 6,8 Hz), 4,06 - 4,22 (8H, m), 5,31 - 5,38 (4H, m).

Ejemplo 11. (9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2-((dodecanoiloxi)metil)propano-1,3-diilo

## A) Dodecanoato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo

A una solución de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol (5,00 g), DMAP (2,24 g) y ácido láurico (3,68 g) en DMF (150 mL) se añadió hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (7,04 g) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 20 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y después se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (1,79 g). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,85 - 0,91 (3H, m), 1,22 - 1,33 (16H, m), 1,59 - 1,66 (3H, m), 2,36 (2H, t, J = 7,6 Hz), 2,51 (2H, t, J = 5,8 Hz), 3,65 (6H, d, J = 5,7 Hz), 4,23 (2H, s).

## B) (9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-((dodecanoiloxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diilo

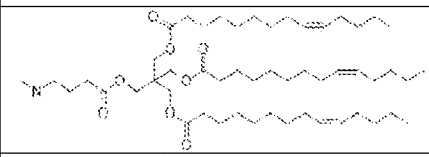
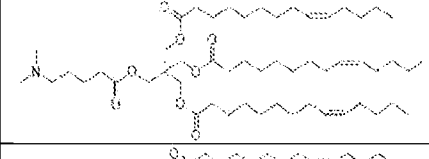
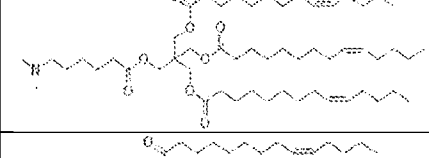
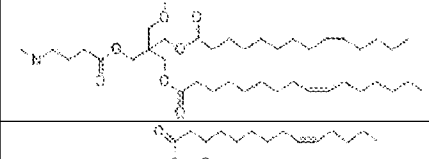
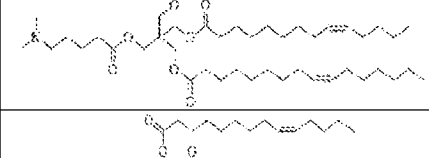
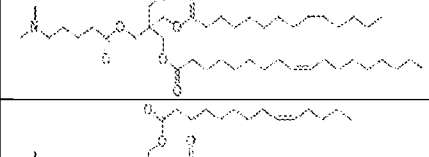
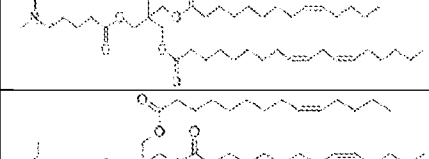
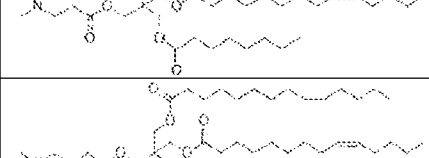
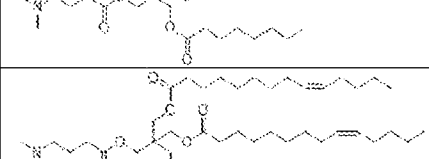
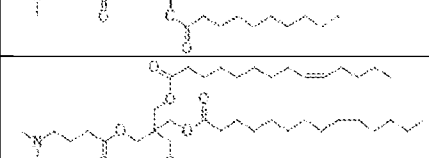
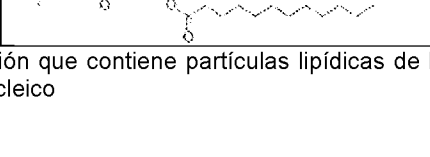
A una solución de dodecanoato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo (400 mg), DMAP (153 mg) y ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (569 mg) en DMF (4 mL) se añadió hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (602 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 8 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (230 mg). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,85 - 0,93 (9H, m), 1,22 - 1,36 (40H, m), 1,58 - 1,65 (6H, m), 1,99 - 2,05 (8H, m), 2,32 (6H, t, J = 7,6 Hz), 2,52 (1H, t, J = 7,1 Hz), 3,48 (2H, d, J = 6,9 Hz), 4,09 - 4,14 (6H, m), 5,31 - 5,38 (4H, m).

## C) (9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2-((dodecanoiloxi)metil)propano-1,3-diilo

A una solución de (9Z,9'Z)bis-tetradec-9-enoato de 2-((dodecanoiloxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diilo (230 mg), DMAP (38 mg) e hidrocloreuro de ácido 4-(dimetilamino)butírico (105 mg) en DMF (4 mL) se añadió hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (150 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 horas se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada y después se secó sobre sulfato sódico anhidro y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (100 mg). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,85 - 0,93 (9H, m), 1,23 - 1,35 (40H, m), 1,55 - 1,67 (6H, m), 1,77 (2H, m), 1,98 - 2,05 (8H, m), 2,20 (6H, s), 2,24 - 2,33 (8H, m), 2,36 (2H, t, J = 7,6 Hz), 4,09 - 4,13 (8H, m), 5,31 - 5,38 (4H, m).

Los ejemplos 2 y 3, 5 a 7 y 9 y 10 en la siguiente tabla se produjeron de acuerdo con cualquiera de los métodos mostrados en los ejemplos anteriores y los métodos conformes a los mismos. La Tabla 1 muestra nombres de compuestos, estructuras y números de masa observados en la producción (indicados como EM en la tabla) para esos Ejemplos junto con los Ejemplos 1, 4, 8 y 11.

Tabla 1

Número de ejemplo	Nombre IUPAC	Fórmula estructural	EM: $m/z$ (M+H)
1	(9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo		874,75
2	(9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((5-(dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo		888,73
3	(9Z)-Tetradec-9-enoato de 3-((6-(dimetilamino)hexanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo		902,74
4	(9Z)-Hexadec-9-enoato de 3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo		902,74
5	(9Z)-Hexadec-9-enoato de 3-((5-(dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo		916,76
6	(9Z)-Octadec-9-enoato de 3-((5-(dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo		944,79
7	(9Z,12Z)-Octadec-9,12-dienoato de 3-((5-(dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo		942,77
8	(9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((N,N-dimetil-beta-alanil)oxi)metil)-2-((octanoiloxi)metil)propano-1,3-diilo		778,62
9	(9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2-((octanoiloxi)metil)propano-1,3-diilo		792,63
10	(9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((decanoiloxi)metil)-2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diilo		820,67
11	(9Z,9'Z)bis-Tetradec-9-enoato de 2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2-(((dodecanoiloxi)metil)propano-1,3-diilo		848,70

Ejemplo de producción y ejemplo de ensayo para una composición que contiene partículas lipídicas de la presente invención y un ácido nucleico para la introducción de un ácido nucleico

Ejemplo de producción 1

Se disolvió una mezcla de lípidos (lípidos catiónicos producido en los ejemplos: DPPC:colesterol:GM-020 = 60:10,6:28:1,4, en relación molar) en EtOH al 90 %/agua exenta de RNasa al 10% para proporcionar una solución de lípidos de 8,5 mg/mL. Se disolvió ARNm de luciferasa (TriLink Bio Technologies) en tampón de 2-morfolinoetanosulfonato (MES) 10 mM a pH 4,0 para proporcionar una solución de ácido nucleico de 0,22 mg/mL. La solución de lípidos y la solución de ácido nucleico obtenidas se mezclaron usando el aparato NanoAssemblr (Precision Nanosystems) a temperatura ambiente con una relación de caudal de 3 mL/min:6 mL/min para proporcionar una dispersión que contenía una partícula lipídica que encapsulaba el ácido nucleico. Utilizando un Slyde-A-Lyzer (límite de peso molecular: 20 k, Thermo Fisher Scientific), la dispersión obtenida se dializó con agua a temperatura ambiente durante 1 hora y con PBS a 4°C durante 48 horas. Posteriormente, se realizó la filtración con un filtro de jeringa de 0,2 µm (IWAKI CO., LTD.) para preparar una composición para la introducción de un ácido nucleico y, posteriormente, la composición se almacenó a 4 °C. El tamaño de partícula de la partícula lipídica se midió utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited). La concentración de ARNm y la relación de encapsulación de la partícula lipídica se midieron utilizando un kit de ensayo Quant-iT (TM) RiboGreen (R) (Invitrogen). La Tabla 2 muestra los resultados de los análisis.

[Tabla 2]

Lípido catiónico	Tamaño de partícula (nm)	Concentración de ARNm (µg/mL)	Relación de encapsulación (%)
Ejemplo 1	71	136	96
Ejemplo 2	90	73	96
Ejemplo 3	93	87	96
Ejemplo 4	76	113	97
Ejemplo 5	91	96	98
Ejemplo 8	67	84	94
Ejemplo 9	108	129	62
Ejemplo 10	92	86	84
Ejemplo 11	83	85	92

Ejemplo de ensayo 1. Ensayo de transfección de ARNm en células cultivadas

Se cultivaron células del linaje HCT116 derivadas de cáncer colorrectal de ser humano en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de 6000 células/pocillo y 24 horas después se añadieron al medio 10 µL de la composición que contenía 10 ng de ARNm de luciferasa para la introducción de ácido nucleico (una solución obtenida diluyendo el producto del Ejemplo de producción 1 con una concentración de ARNm de 10 ng/10 µL). El nivel de luciferasa expresada en HCT116 24 horas después de la adición de ARNm se midió usando un kit Picagene LT2.0 (TOYOBO CO., LTD.). Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados de las mediciones.

Tabla 3

Lípido catiónico	Valor medio de luminiscencia (cps) de 3 pocillos
Control de PBS	560
Ejemplo 1	227720
Ejemplo 2	570027
Ejemplo 3	412187
Ejemplo 4	407547
Ejemplo 5	545507
Ejemplo 8	3853
Ejemplo 10	1203467

Ejemplo 11	953520
------------	--------

Tabla 4

Lípido catiónico	Valor medio de luminiscencia (cps) para 3 pocillos
Control de PBS	627
Ejemplo 9	549893

5 Ejemplo de producción y ejemplo de ensayo para una composición que contiene partículas lipídicas de la presente invención y un ácido nucleico para la introducción de un ácido nucleico

Ejemplo de producción 2

10 Se disolvió una mezcla de lípidos (lípido catiónico producido en los ejemplos: DPPC:colesterol:GM-020 = 60:10,6:28:1,4, en relación molar) en EtOH al 90 %/agua exenta de RNasa al 10 % para proporcionar una solución lipídica de aproximadamente de 7 mg/mL. Se mezclaron cantidades iguales de un ARNip para Col1a1 y un ARNip para el Factor VII (FVII) y la mezcla se disolvió en tampón acetato 25 mM a pH 4,0 para proporcionar una solución de ácido nucleico de 0,2 mg/mL. La información de secuencia de los ARNip se muestra en la siguiente tabla. La solución de lípidos y la solución de ácido nucleico obtenidas se mezclaron usando el aparato NanoAssemblr (Precision Nanosystems) a temperatura ambiente con una relación de caudales de 3 mL/min:9 mL/min para proporcionar una dispersión que contenía una partícula lipídica que incluía los ácidos nucleicos. Utilizando un Slyde-A-Lyzer (peso molecular de corte: 20 k, Thermo Fisher Scientific), la dispersión obtenida se dializó con agua a temperatura ambiente durante 1 hora y con PBS a 4 °C durante 48 horas. Posteriormente, se realizó la filtración con un filtro de jeringa de 0,2 µm (IWAKI CO., LTD.) para preparar una composición para la introducción de ácido nucleico y, posteriormente, la composición se almacenó a 4 °C. El tamaño de partícula de la partícula lipídica se midió utilizando un aparato Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited). La concentración de ARNm y la relación de encapsulación de la partícula lipídica se midieron utilizando un kit Quant-iT (TM) RiboGreen (R) (Invitrogen). La Tabla 6 muestra los resultados de los análisis.

Tabla 5

ARNip Col1a1 (citado de Calvente et al. Hepatology 2015, 62:4)

Sentido	5' - G[mU][mC][mU]AGA[mC]A[mU]G[mU][mU][mC]AG[mC][mU][mU][ts]t - 3'
Antisentido	5' - AAGCUGAA[mC]AUGUC[mU]AGAC[ts]t - 3'

ARNip del factor VII (citado por Landesman et al. Silence 2010, 1:16)

Sentido	5' - [mC][mU]A[mC]GAAAG[mC]A[mU][mC][mC][mU][mU][mC]A[mU][ts]t - 3'
Antisentido	5' - AUGAAGGAUGCUUUCG[mU]AG[ts]t - 3'

N: ARN

n: ADN

[mN]: ARN 2'-OMe

[ns]: Fosforotioato

25

Tabla 6

Compuesto	Tamaño de partícula (nm)	Concentración de ARNip (µg/mL)	Relación de encapsulación (%)
Ejemplo 2	104	251	98
Ejemplo 3	117	196	95
Ejemplo 10	88	307	90
Ejemplo 11	85	402	91

Ejemplo 4	90	355	89
Ejemplo 5	103	367	94
Ejemplo 6	87	333	98
Ejemplo 7	102	320	96

Ejemplo de ensayo 2. Ensayo de administración de ARNip a células estrelladas hepáticas en ratones modelo con trastorno hepático causado por tetracloruro de carbono

5 La dispersión en PBS de la partícula lipídica que incluye el ARNip de Col1a1 y el ARNip de FVII se diluyó con PBS hasta concentraciones respectivas de ARNip de 40 µg/mL y 120 µg/mL, y se administró al seno orbital de cada ratón Balb/c para lograr dosis respectivas de ARNip de 0,2 mg/kg y 0,6 mg/kg. Tres horas después de la administración de los ARNip, se administró tetracloruro de carbono por vía oral para lograr una dosis de 0,1 mL/kg. Cuatro días después de la administración de tetracloruro de carbono, cada ratón fue sacrificado mediante sangrado bajo anestesia con isoflurano y se extrajo el hígado. Del hígado obtenido se extrajo el ARN total con un kit RNeasy Mini (QIAGEN) y se midieron los niveles de ARNm de Col1a1, ARNm de FVII y ARNm de GAPDH mediante un método de PCR cuantitativa. 10 Las tasas de reducción de la expresión del ARNm de Col1a1 y el ARNm de FVII normalizadas frente al nivel de ARNm de GAPDH se calcularon con referencia a las de ratones sin administración de ARNip, y la siguiente tabla muestra los resultados del cálculo.

Tabla 7

Compuesto	Eficiencia de la reducción de la expresión génica de COL1A1 (%)	Eficiencia de la reducción de la expresión de FVII (%)
Ejemplo 2	73	0
Ejemplo 3	81	0
Ejemplo 10	31	0
Ejemplo 11	60	0
Ejemplo 4	67	19
Ejemplo 5	83	14
Ejemplo 6	86	27
Ejemplo 7	85	24

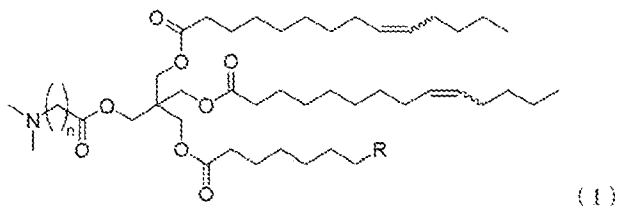
15

#### Aplicabilidad industrial

El compuesto, la partícula lipídica o la composición de la presente invención permiten la introducción de ácidos nucleicos en diversos tipos de células, tejidos u órganos. Por consiguiente, el compuesto, la partícula lipídica o la composición de la presente invención están disponibles como técnica DDS para fármacos de ácidos nucleicos. 20 Además, el compuesto, la partícula lipídica o la composición de la presente invención están disponibles como reactivos para la introducción de ácidos nucleicos para investigación.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (I):



en donde

5 n representa un número entero de 2 a 5,

R representa un grupo alquilo C<sub>1-5</sub> lineal, un grupo alquenoilo C<sub>7-11</sub> lineal o un grupo alcadienilo C<sub>11</sub> lineal, y

Las líneas onduladas representan cada una independientemente un enlace cis o un enlace trans,

o una sal del mismo.

10 2. Un compuesto según la reivindicación 1, que es (9Z)-tetradec-9-enoato de 3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo o una sal del mismo.

3. Un compuesto según la reivindicación 1, que es (9Z)-tetradec-9-enoato de 3-((5-(dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo o una sal del mismo.

4. Un compuesto según la reivindicación 1, que es (9Z)-tetradec-9-enoato de 3-((6-(dimetilamino)hexanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propilo o una sal del mismo.

15 5. Una partícula lipídica, que comprende el compuesto o una sal del mismo según la reivindicación 1.

6. Una composición para la introducción de un ácido nucleico, que comprende un ácido nucleico y la partícula lipídica según la reivindicación 5.

7. La composición según la reivindicación 6, en la que el ácido nucleico es un ARN.

8. La composición según la reivindicación 7, en la que el ARN es un ARNm o un ARNip.