

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 938 557**

(51) Int. Cl.:

**C07C 219/06** (2006.01)  
**C07C 229/16** (2006.01)  
**C07C 233/18** (2006.01)  
**C07C 255/24** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2016 PCT/US2016/059575**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17075531**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2016 E 16794175 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2022 EP 3368507**

---

(54) Título: **Lípidos y formulaciones de nanopartículas lipídicas novedosas para la entrega de ácidos nucleicos**

(30) Prioridad:

**28.10.2015 US 201562247616 P**  
**27.04.2016 US 201662328244 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.04.2023**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**ANSELL, STEVEN, M. y**  
**DU, XINYAO**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 938 557 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Lípidos y formulaciones de nanopartículas lipídicas novedosas para la entrega de ácidos nucleicos

**5 Campo técnico**

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

**Descripción de la técnica relacionada**

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

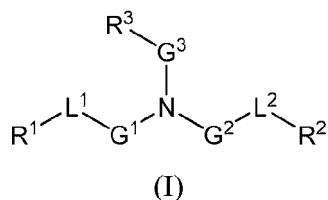
Algunos ácidos nucleicos, tales como los inhibidores de miARN, pueden usarse para efectuar la expresión de productos celulares específicos que están regulados por miARN como sería útil en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades relacionadas con una deficiencia de proteína o enzima. Las aplicaciones terapéuticas de la inhibición de miARN son sumamente amplias, ya que pueden sintetizarse construcciones para inhibir uno o más miARN que, a su vez, regularían la expresión de productos de ARNm. La inhibición del miARN endógeno puede aumentar su expresión de proteínas endógenas diana en dirección 3' y restablecer la función adecuada en una célula u organismo como medio para tratar enfermedades asociadas a un miARN específico o a un grupo de miARN.

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

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

El documento EP 2 567 951 A1 divulga un lípido catiónico.

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



o una sal, tautómero o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{L}^1$ ,  $\text{L}^2$ ,  $\text{G}^1$ ,  $\text{G}^2$  y  $\text{G}^3$  son como se definen en el presente documento.

5 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos anteriores de estructura (I) y un agente terapéutico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden además uno o más componentes seleccionados de lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides y lípidos conjugados con polímero. Tales composiciones son útiles para la formación de nanopartículas lipídicas para la entrega del 10 agente terapéutico.

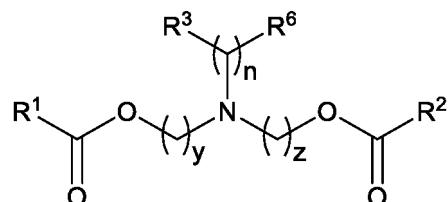
En otras realizaciones, la presente invención proporciona un método para administrar un agente terapéutico a un paciente que lo necesite, comprendiendo el método preparar una composición de nanopartículas lipídicas que comprenden el compuesto de estructura (I) y un agente terapéutico y entregar la composición al paciente.

15 Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada.

#### Breve sumario

20 La materia objeto de la invención es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto de la invención se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura (IG):



25 (IG)  
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

30  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  son cada uno independientemente alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub> o alquenilo C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>;  
 $\text{R}^3$  es OR<sup>5</sup>, CN, -C(=O)OR<sup>4</sup>, -OC(=O)R<sup>4</sup> o -NR<sup>5</sup>C(=O)R<sup>4</sup>;  
 $\text{R}^4$  es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;  
 $\text{R}^5$  es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 $\text{R}^6$  es, en cada aparición, H;  
 $n$  es un número entero que varía de 2 a 12; e  
35 y  $z$  son cada uno independientemente un número entero que varía de 6 a 9.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende el compuesto de la invención y un agente terapéutico, preferentemente que comprende además uno o más excipientes seleccionados de lípidos neutros, esteroides y lípidos conjugados con polímero.

40 Las realizaciones preferidas se establecen en las reivindicaciones dependientes.

En resumen, la presente invención proporciona compuestos lipídicos, incluyendo estereoisómeros, sales farmacéuticamente aceptables o tautómeros de los mismos, que pueden usarse solos o en combinación con otros 45 componentes lipídicos tales como lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides (incluyendo, por ejemplo, todos los esteroles) y/o sus análogos, y/o lípidos conjugados con polímeros para formar nanopartículas lipídicas para la entrega de agentes terapéuticos.

50 Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En algunos casos, las nanopartículas lipídicas se usan para entregar ácidos nucleicos tales como ARN antisentido

y/o mensajero. Los métodos para el uso de dichas nanopartículas lipídicas para el tratamiento de diversas enfermedades o afecciones, tales como aquellas provocadas por entidades infecciosas y/o insuficiencia de una proteína, también se proporcionan.

- 5 En una realización, se proporcionan compuestos que tienen la siguiente estructura (I) (no de acuerdo con la invención a menos que estén incluidos en las reivindicaciones):

#### Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

- 10 En las figuras, números de referencia idénticos identifican elementos similares. Los tamaños y las posiciones relativas de los elementos en las figuras no se dibujan necesariamente a escala y algunos de esos elementos se amplían y positionan arbitrariamente para mejorar la legibilidad de la figura. Además, las formas particulares de los elementos tal como están dibujados no pretenden transmitir ninguna información con respecto a la forma real de los elementos particulares, y se han seleccionado únicamente para facilitar su reconocimiento en las figuras.

15 La Figura 1 muestra el curso temporal de la expresión de luciferasa en hígado de ratón.

La Figura 2 ilustra el cálculo de pKa para MC3 como ejemplo representativo pertinente para los lípidos divulgados.

La Figura 3 proporciona datos comparativos de la actividad de la luciferasa para lípidos seleccionados.

#### 20 Descripción detallada

En la siguiente descripción, se exponen determinados detalles específicos para proporcionar una comprensión exhaustiva de diversas realizaciones de la invención. Sin embargo, un experto en la materia entenderá que la invención puede ponerse en práctica sin estos detalles.

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

30 35 En realizaciones particulares, la presente invención proporciona lípidos catiónicos novedosos que permiten la formulación de composiciones mejoradas para la entrega *in vitro* e *in vivo* de ARNm y/u otros oligonucleótidos. En algunas realizaciones, estas composiciones de nanopartículas lipídicas mejoradas son útiles para la expresión de la proteína codificada por el ARNm. En otras realizaciones, estas composiciones de nanopartículas lipídicas mejoradas son útiles para la regulación positiva de la expresión de proteínas endógenas mediante la entrega de inhibidores de miARN dirigidos a un miARN específico o a un grupo de miARN que regulan un ARNm diana o varios ARNm. En otras realizaciones, estas composiciones de nanopartículas lipídicas mejoradas son útiles para regular negativamente (por ejemplo, silenciar) los niveles de proteína y/o los niveles de ARNm de los genes diana. En algunas otras realizaciones, las nanopartículas lipídicas también son útiles para la entrega de ARNm y plásmidos para la expresión de transgenes. En otras realizaciones más, las composiciones de nanopartículas lipídicas son útiles para inducir un efecto farmacológico resultante de la expresión de una proteína, por ejemplo, una producción aumentada de glóbulos rojos a través de la entrega de un ARNm de eritropoyetina adecuado, o la protección contra la infección a través de la entrega de ARNm que codifica un anticuerpo o un antígeno adecuado.

40 45 50 Las nanopartículas lipídicas y las composiciones de la presente invención pueden usarse para una diversidad de fines, incluyendo la entrega de agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos, encapsulados o asociados (por ejemplo, formando complejos) a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, las realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para tratar o prevenir enfermedades o trastornos en un sujeto que los necesita poniendo en contacto al sujeto con una nanopartícula lipídica que encapsula o está asociada a un agente terapéutico adecuado, en donde la nanopartícula lipídica comprende uno o más de los lípidos catiónicos novedosos descritos en el presente documento.

55 60 65 Como se describe en el presente documento, las realizaciones de las nanopartículas lipídicas de la presente invención son particularmente útiles para la entrega de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, ARNm, oligonucleótido antisentido, ADN plasmídico, microARN (miARN), inhibidores de miARN (antagomirs/antimirs), ARN complementario que interfiere con el ARN mensajero (ARNcim), ADN, ARN multivalente, ARN sustrato de Dicer, ADN complementario (ADNc), etc. Por tanto, las nanopartículas lipídicas y las composiciones de la presente invención pueden usarse para inducir la expresión de una proteína deseada tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos catiónicos novedosos que se describen en el presente documento, en donde la nanopartícula lipídica encapsula o está asociada a un ácido nucleico que se expresa para producir la proteína deseada (por ejemplo, un ARN mensajero o un plásmido que

codifica la proteína deseada) o inhibe los procesos que terminan la expresión del ARNm (por ejemplo, inhibidores de miARN). Como alternativa, las nanopartículas lipídicas y las composiciones de la presente invención pueden usarse para disminuir la expresión de genes diana y proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos catiónicos novedosos que se describen en el presente documento, en donde la nanopartícula lipídica encapsula o se asocia a un ácido nucleico que reduce la expresión de genes diana (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido o ARN de interferencia pequeño (ARNip)). Las nanopartículas lipídicas y las composiciones de la presente invención también pueden usarse para la entrega conjunta de diferentes ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm y ADN plasmídico) por separado o en combinación, tal como puede ser útil para proporcionar un efecto que requiere la colocalización de diferentes ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima modificadora de genes adecuada y un segmento o segmentos de ADN para su incorporación en el genoma del hospedador).

Los ácidos nucleicos para su uso con la presente invención pueden prepararse de acuerdo con cualquier técnica disponible. Para el ARNm, la metodología primaria de preparación es, pero sin limitación, la síntesis enzimática (también denominada transcripción *in vitro*) que actualmente representa el método más eficiente para producir ARNm específico de secuencia larga. La transcripción *in vitro* describe un proceso de síntesis dirigida por moldes de moléculas de ARN a partir de un molde de ADN modificado por ingeniería genética compuesto por una secuencia promotora de bacteriófago en dirección 5' (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, la del copolífago T7, T3 y SP6) unida a una secuencia en dirección 3' que codifica el gen de interés. El ADN molde puede prepararse para la transcripción *in vitro* a partir de varias fuentes con técnicas adecuadas que son bien conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa y ADN plasmídico (véase Linpinsel, J.L y Conn, G.L., *General protocols for preparation of plasmid DNA template* y Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P. y Williams, L.D. en *RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE en Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods* v. 941 Conn G.L. (ed), Nueva York, N.Y. Humana Press, 2012)

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

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

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

Pardi, N., Muramatsu, H. y Kariko, K., *HPLC Purification of in vitro transcribed long RNA in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation en Methods in Molecular Biology v.969* (Rabinovich, P.H. Ed), 2013). Se ha publicado que el ARNm purificado por HPLC se traduce a niveles mucho mayores, particularmente en células primarias e *in vivo*.

5 Se ha descrito en la técnica una diversidad significativa de modificaciones que se usan para alterar propiedades específicas del ARNm transcripto *in vitro* y mejorar su utilidad. Éstas incluyen, pero sin limitación, modificaciones de los extremos 5' y 3' del ARNm. Los ARNm eucariotas endógenos contienen normalmente una estructura de capuchón en el extremo 5' de una molécula madura que desempeña una función importante en la mediación de la 10 unión de la proteína de unión al capuchón (CBP) del ARNm, que a su vez es responsable de potenciar la estabilidad del ARNm en la célula y la eficiencia de la traducción del ARNm. Por tanto, los niveles más altos de expresión de 15 proteínas se consiguen con transcripciones de ARNm con capuchón. El capuchón en 5' contiene un enlace 5'-5'- trifosfato entre el nucleótido más hacia el extremo 5' y un nucleótido de guanina. El nucleótido de guanina conjugado está metilado en la posición N7. Las modificaciones adicionales incluyen la metilación de los nucleótidos último y penúltimo más hacia el extremo 5' en el grupo 2'-hidroxilo.

Pueden usarse múltiples estructuras de capuchón distintas para generar el capuchón en 5' de ARNm sintético transcripto *in vitro*. La colocación del capuchón en 5' del ARNm sintético puede realizarse cotranscripcionalmente con 20 análogos químicos de capuchón (es decir, colocación del capuchón durante la transcripción *in vitro*). Por ejemplo, el capuchón Anti-Análogo de Capuchón Inverso (ARCA) contiene un enlace de 5'-5'-trifosfato guanina-guanina donde una guanina contiene un grupo metilo N7 así como un grupo 3'-O-metilo. Sin embargo, hasta el 20 % de los 25 transcritos permanecen sin capuchón durante este proceso cotranscripcional y el análogo de capuchón sintético no es idéntico a la estructura de tapón 5' de un ARNm celular auténtico, reduciendo potencialmente la traducibilidad y la estabilidad celular. Como alternativa, a las moléculas de ARNm sintéticas también se les puede poner el capuchón 30 enzimáticamente después de la transcripción. Esto puede generar una estructura de capuchón 5' más auténtica que imita más estrechamente, ya sea estructural o funcionalmente, el capuchón 5' endógeno que tiene una unión potenciada de las proteínas de unión al capuchón, semivida aumentada, una susceptibilidad reducida a las endonucleasas 5' y/o una eliminación del capuchón 5' reducida. Se han desarrollado numerosos análogos sintéticos 35 de capuchón 5' y se sabe la técnica que potencian la estabilidad y la traducibilidad del ARNm (véase, por ejemplo, Grudzien-Nogalska, E., Kowalska, J., Su, W., Kuhn, A.N., Slepakov, S.V., Darynkiewicz, E., Sahin, U., Jemielity, J. y Rhoads, R.E., *Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation en Methods in Molecular Biology v.969* (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

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

45 La cola poli (A) del ARNm transcripto *in vitro* puede conseguirse usando diversos enfoques, incluyendo, pero sin limitación, la clonación de una extensión poli (T) en el molde de ADN o mediante adición post-transcripcional usando Poli (A) polimerasa. El primer caso permite la transcripción *in vitro* del ARNm con colas poli (A) de longitud definida, dependiendo del tamaño de la extensión poli (T), pero requiere una manipulación adicional del molde. El último caso implica la adición enzimática de una cola poli (A) al ARNm transcripto *in vitro* usando poli (A) polimerasa que cataliza la incorporación de restos adenina en los extremos 3' del ARN, lo que no requiere ninguna manipulación adicional del molde de ADN, pero da como resultado un ARNm con colas poli(A) de longitud heterogénea. La incorporación de 50 capuchón 5' y cola poli (A) 3' puede realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, el kit de colas poli (A) polimerasa (Poly (A) Polymerase Tailing, EpiCenter), el kit mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra el kit de cola Poli (A) (Life Technologies) así como con reactivos disponibles en el mercado, diversos capuchones ARCA, Poli (A) polimerasa, etc.

55 Además del capuchón 5' y la poli-adenilación 3', se ha publicado que otras modificaciones de los transcritos *in vitro* proporcionan beneficios con respecto a la eficiencia de la traducción y la estabilidad. Es bien sabido en la técnica que el ADN y el ARN patógenos pueden reconocerse mediante una diversidad de sensores dentro de los eucariotas y desencadenan potentes respuestas inmunitarias innatas. Se ha demostrado que la capacidad de discriminar entre el ADN y el ARN patógenos y los propios se basa, al menos en parte, en modificaciones de la estructura y los nucleósidos, puesto que la mayoría de los ácidos nucleicos de fuentes naturales contienen nucleósidos modificados. Por el contrario, el ARN sintetizado *in vitro* carece de estas modificaciones, lo que lo convierte en inmunoestimulador, lo que a su vez puede inhibir la traducción eficaz del ARNm como se ha esbozado anteriormente. La introducción de nucleósidos modificados en el ARNm transcripto *in vitro* puede usarse para impedir el reconocimiento y la activación de los sensores de ARN, mitigando de esta manera esta actividad inmunoestimuladora no deseada y mejorando la capacidad de traducción (véase, por ejemplo, Kariko, K. y Weissman, D. 2007, *Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA*:

*implication for therapeutic RNA development, Curr Opin Drug Discov Devel, v.10 523-532; Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation en Methods in Molecular Biology v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013); Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F.A, Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D., 2008, Incorporation of Pseudouridine*

5 *Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability, Mol Ther v.16, 1833-1840.* Los nucleósidos y nucleótidos modificados utilizados en la síntesis de ARN modificados pueden prepararse, controlarse y utilizarse usando métodos y procedimientos generales conocidos en la técnica. Se dispone de una gran diversidad de modificaciones de nucleósidos que pueden incorporarse solos o en combinación con otros nucleósidos modificados en cierto grado en el ARNm transcrita *in vitro* (véase, por ejemplo, el documento 10 US2012/0251618). Se ha publicado que la síntesis *in vitro* de ARNm con nucleósidos modificados ha reducido la capacidad de activar los sensores inmunitarios, con la consiguiente capacidad de traducción potenciada.

Otros componentes del ARNm que pueden modificarse para proporcionar beneficios en términos de traducibilidad y estabilidad incluyen las regiones de 5' y 3' sin traducir (UTR). Se ha demostrado que la optimización de las UTR (las 15 UTR favorables 5' y 3' pueden obtenerse a partir de ARN celulares o víricos), ya sea ambas o independientemente, aumenta la estabilidad del ARNm y la eficiencia de traducción del ARNm transcrita *in vitro* (véase, por ejemplo, Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., *In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation en Methods in Molecular Biology v.969* (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

20 Además del ARNm, pueden usarse otras cargas útiles de ácido nucleico para la presente invención. Para los oligonucleótidos, los métodos de preparación incluyen, pero sin limitación, la síntesis química y la escisión química y enzimática de un precursor más largo, la transcripción *in vitro* como se ha descrito anteriormente, etc. Los métodos de síntesis de nucleótidos de ADN y ARN se usan ampliamente y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gait, M. J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: 25 1RL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications, Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

30 Para el ADN plasmídico, la preparación para su uso con la presente invención utiliza habitualmente, pero sin limitación, la expansión y aislamiento del ADN plasmídico *in vitro* en un cultivo líquido de bacterias que contienen el plásmido de interés. La presencia de un gen en el plásmido de interés que codifica la resistencia a un antibiótico particular (penicilina, kanamicina, etc.) permite que las bacterias que contienen el plásmido de interés crezcan selectivamente en cultivos que contienen antibióticos. Los métodos de aislamiento de ADN plasmídico se usan ampliamente y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Heilig, J., Elbing, K. L. y Brent, R (2001) *Large-Scale Preparation of Plasmid DNA. Current Protocols in Molecular Biology*. 41:II:1.7.1-1.7.16; Rozkov, A., Larsson, B., Gillstrom, S., Bjornestedt, R. y Schmidt, S. R. (2008), *Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. Biotechnol. Bioeng.*, 99: 557-566; y el documento US6197553B1). El aislamiento de los plásmidos puede realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, Plasmid Plus (Qiagen), los kits GenJET plasmid MaxiPrep (Thermo) y PureYield 40 MaxiPrep (Promega), así como con reactivos disponibles en el mercado.

Diversas realizaciones ilustrativas de los lípidos catiónicos de la presente invención, las nanopartículas lipídicas y las 45 composiciones que las comprenden y su uso para entregar principios activos (por ejemplo, agentes terapéuticos), tales como ácidos nucleicos, para modular la expresión de genes y proteínas, se describen con más detalle a continuación.

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

50 A menos que el contexto requiera otra cosa, a lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, la palabra "comprender" y variaciones de la misma, tales como, "comprende" y "que comprende" deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como "incluyendo, pero sin limitación".

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

60 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

65 La expresión "inducir la expresión de una proteína deseada" se refiere a la capacidad de un ácido nucleico de

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

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

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

La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que contiene al

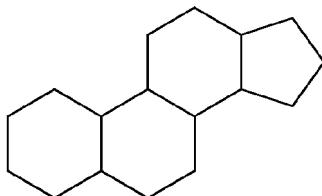
menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria e incluye el ADN, el ARN e híbridos de los mismos. El ADN puede tener la forma de moléculas antisentido, ADN plasmídico, ADNc, productos de PCR o vectores. El ARN puede tener la forma de un ARN en horquilla corto (ARNhc), ARN mensajero (ARNm), ARN antisentido, miARN, miARN, ARN multivalente, ARN sustrato de Dicer o ARN vírico (ARNv), y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de la cadena principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, y que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). A menos que se limite específicamente, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, polimorfismos de un solo nucleótido y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degeneradas generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res., 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem., 260: 2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes, 8: 91-98 (1994)). Los "nucleótidos" contienen un azúcar desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), una base y un grupo de fosfato. Los nucleótidos están unidos entre sí a través de los grupos fosfato. Las "bases" incluyen las purinas y las pirimidinas, que además incluyen los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales, y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, pero sin limitación, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, pero sin limitación, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y alquilhaluros.

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

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

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

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



Los ejemplos no limitantes de esteroides incluyen colesterol y similares.

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

La expresión "lípido conjugado con polímero" se refiere a una molécula que comprende tanto una porción lipídica como una porción polimérica. Un ejemplo de un lípido conjugado con polímero es un lípido pegilado. La expresión "lípido pegilado" se refiere a una molécula que comprende tanto una porción de lípido como una porción de polietilenglicol. Se conocen en la técnica lípidos pegilados e incluyen 1-(monometoxipolietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-DMG) y similares.

La expresión "lípido neutro" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma zwitteriónica sin carga o neutra a un pH seleccionado. A pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, pero sin limitación, fosfatidilcolinas tales como 1,2-Diestearoyl-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

(DPPC), 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1-Palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), fosfatidiletanolaminas tales como 1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), esfingomielinas (SM), ceramidas, esteroides tales como esteroles y sus derivados. Los lípidos neutros pueden ser sintéticos o de origen natural.

- 5 La expresión "lípido cargado" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma con carga positiva o negativa independientemente del pH dentro de un intervalo fisiológico útil, por ejemplo, pH ~3 a pH ~9. Los lípidos cargados pueden ser sintéticos o de origen natural. Los ejemplos de lípidos cargados incluyen fosfatidilserinas, ácidos fosfatídicos, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles, hemisuccinatos de esterol, dialquil trimetilamonio-propanos, (por ejemplo, DOTAP, DOTMA), dialquil dimetilaminopropanos, etil fosfocolinas, dimetilaminoetano carbamoil esteroides (por ejemplo, DC-Col).
- 10 La expresión "nanopartícula lipídica" se refiere a partículas que tienen al menos una dimensión de orden nanométrico (por ejemplo, 1-1.000 nm) que incluyen uno o más de los compuestos de estructura (I) u otros lípidos catiónicos especificados. En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se incluyen en una formulación que puede usarse para entregar un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) a un sitio de interés (por ejemplo, una célula, tejido, órgano, tumor y similares). En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas de la invención comprenden un ácido nucleico. Tales nanopartículas lipídicas normalmente comprenden un compuesto de estructura (I) y uno o más excipientes seleccionados de lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides y lípidos conjugados con polímero. En algunas realizaciones, el agente activo o el agente terapéutico, tales como un ácido nucleico, pueden estar encapsulados en la porción lipídica de la nanopartícula lipídica o en un espacio acuoso envuelto por parte o por toda la porción lipídica de la nanopartícula lipídica, protegiéndolos de este modo de la degradación enzimática o de otros efectos no deseados inducidos por los mecanismos del organismo o las células del hospedador, por ejemplo, una respuesta inmunitaria adversa.
- 15 25 La expresión "nanopartícula lipídica" se refiere a partículas que tienen al menos una dimensión de orden nanométrico (por ejemplo, 1-1.000 nm) que incluyen uno o más de los compuestos de estructura (I) u otros lípidos catiónicos especificados. En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se incluyen en una formulación que puede usarse para entregar un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) a un sitio de interés (por ejemplo, una célula, tejido, órgano, tumor y similares). En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas de la invención comprenden un ácido nucleico. Tales nanopartículas lipídicas normalmente comprenden un compuesto de estructura (I) y uno o más excipientes seleccionados de lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides y lípidos conjugados con polímero. En algunas realizaciones, el agente activo o el agente terapéutico, tales como un ácido nucleico, pueden estar encapsulados en la porción lipídica de la nanopartícula lipídica o en un espacio acuoso envuelto por parte o por toda la porción lipídica de la nanopartícula lipídica, protegiéndolos de este modo de la degradación enzimática o de otros efectos no deseados inducidos por los mecanismos del organismo o las células del hospedador, por ejemplo, una respuesta inmunitaria adversa.
- 20 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 101

- 5 "Alquilo" se refiere un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que está saturada o insaturada (es decir, contiene uno o más dobles (alquenilo) y/o triples (alquinilo) enlaces), que tiene, por ejemplo, de uno a veinticuatro átomos de carbono (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>), de cuatro a veinte átomos de carbono (alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>), de seis a diecisésis átomos de carbono (alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>), de seis a nueve átomos de carbono (alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub>), de uno a quince átomos de carbono (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>), de uno a doce átomos de carbono (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), de uno a ocho átomos de carbono (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) o de uno a seis átomos de carbono (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y que está unido al resto de la molécula por un enlace simple, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletil (t-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo y similares. A menos que se indique específicamente otra cosa en la memoria descriptiva, un grupo alquilo está opcionalmente sustituido. La definición de "alquilo" no está de acuerdo con la invención en la medida en que se refiere a alquilo insaturado o alquilo opcionalmente sustituido.
- 10 15 "Alquileno" o "cadena de alquileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada que une el resto de la molécula a un grupo radical, que consiste únicamente en carbono e hidrógeno, que está saturado o no saturado (es decir,, contiene uno o más enlaces dobles (alquenileno) y/o triples (alquinileno)), y que tiene, por ejemplo, de uno a veinticuatro átomos de carbono (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>), de uno a quince átomos de carbono (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>), de uno a doce átomos de carbono (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), de uno a ocho átomos de carbono (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), de uno a seis átomos de carbono (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), de dos a cuatro átomos de carbono (alquileno C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), de uno a dos átomos de carbono (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>), por ejemplo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno y similares. La cadena de alquileno está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo o doble y al grupo radical a través de un enlace sencillo o doble. Los puntos de unión de la cadena de alquileno al resto de la molécula y al grupo radical pueden ser a través de un carbono o cualquiera de dos carbonos en el interior de la cadena.
- 20 25

30 El término "sustituido" usado en el presente documento significa cualquiera de los grupos anteriores (por ejemplo, alquilo, alquileno, cicloalquilo o cicloalquileno) en donde al menos un átomo de hidrógeno está reemplazado por un enlace a un átomo distinto de hidrógeno tales como, pero no limitado a: un átomo de halógeno tal como F, Cl, Br o I; grupos oxo (=O); grupos hidroxilo (-OH); grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; grupos cicloalquilo; -(C=O)OR'; -

35 O(C=O)R'; -C(=O)R'; -OR'; -S(O)xR'; -S-SR'; -C(=O)SR'; -SC(=O)R'; -NR'R'; -NR'C(=O)R'; -C(=O)NR'R'; -NR'C(=O)NR'R'; -OC(=O)NR'R'; -NR'C(=O)OR'; -NR'S(O)xNR'R'; -NR'S(O)xR'; y -S(O)xNR'R', en donde: R' es, en cada aparición, independientemente H, alquilo o cicloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> y x es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, el sustituyente es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo cicloalquilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo halo, tal como fluoro. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo oxo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo hidroxilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo alcoxi (-OR). En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo carboxilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo amina (-NR'R').

40 45 "Opcional" u "opcionalmente" (por ejemplo, opcionalmente sustituido) significa que el evento de circunstancias descrito posteriormente puede o no ocurrir, y que la descripción incluye los casos en los que dicho evento o circunstancia ocurre y los casos en los que no ocurre. Por ejemplo, "alquilo opcionalmente sustituido" significa que el radical alquilo puede o no estar sustituido y que la descripción incluye tanto radicales alquilo sustituidos o como radicales alquilo que no tienen sustitución.

50 55 "Profármaco" pretende indicar un compuesto que puede convertirse en condiciones fisiológicas o mediante solvólisis en un compuesto biológicamente activo de la invención. Por tanto, el término "profármaco" se refiere a un precursor metabólico de un compuesto de la invención que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede estar inactivo cuando se administra a un sujeto que lo necesita, pero se convierte *in vivo* a un compuesto activo de la invención. Los profármacos normalmente se transforman rápidamente *in vivo* para producir el compuesto original de la invención, por ejemplo, por hidrólisis en sangre. El compuesto profármaco a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad con los tejidos o liberación retrasada en un organismo mamífero (véase, Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), pp. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam)). Se proporciona un análisis de profármacos en Higuchi, T., *et al.*, A.C.S. Symposium Series, vol. 14 y en Bioreversible Carriers in Drug Design, Ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

60 65 El término "profármaco" también pretende incluir cualquier vehículo unido covalentemente, que libera el compuesto activo de la invención *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de un compuesto de la invención pueden prepararse modificando los grupos funcionales presentes en el compuesto de la invención de tal manera que las modificaciones se escindan, ya sea por manipulación rutinaria o *in vivo*, al compuesto original de la invención. Los profármacos incluyen compuestos de la invención en donde un grupo hidroxi, amino o mercapto está unido a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto de la invención se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxi libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero sin limitación, acetato, derivados de formiato y benzoato de alcohol o derivados de amida de grupos funcionales amina en los compuestos de la invención y

similares. Los profármacos no están de acuerdo con la invención.

La presente memoria descriptiva divulga además compuestos farmacéuticamente aceptables del compuesto de estructura (I) marcados isotópicamente al tener uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente (no de acuerdo con la invención). Los ejemplos de isótopos que pueden

5 incorporarse en los compuestos divulgados incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, cloro y yodo, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{123}\text{I}$  y  $^{125}\text{I}$ , respectivamente. Estos compuestos radiomarcados podrían ser útiles para ayudar a determinar o medir la eficacia de los compuestos, caracterizando, por ejemplo, el sitio o el modo de acción, o la afinidad de unión con el sitio de acción farmacológicamente importante. Determinados compuestos marcados isotópicamente de estructura (I) o (II),

10 por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radioactivo, son útiles en estudios de distribución tisular de fármaco y/o sustrato. Los isótopos radioactivos tritio, es decir,  $^3\text{H}$ , y carbono-14, es decir,  $^{14}\text{C}$ , son particularmente útiles para este fin en vista de su facilidad de incorporación y de los medios de detección disponibles.

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

20 La sustitución con isótopos de emisión de positrones, tales como  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{13}\text{N}$ , puede resultar útil en estudios de Topografía de Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Los compuestos de estructura (I) marcados isotópicamente generalmente se pueden preparar por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o por procesos análogos a los descritos en la sección de preparaciones y ejemplos como se indica a continuación usando un reactivo apropiado marcado isotópicamente en lugar del reactivo no marcado empleado anteriormente.

25 La presente invención describe además productos metabólicos *in vivo* de los compuestos divulgados (no de acuerdo con la invención). Dichos productos pueden ser el resultado de, por ejemplo, la oxidación, la reducción, la hidrólisis, la amidación, la esterificación y similares del compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. En consecuencia, la memoria descriptiva divulga compuestos producidos mediante un proceso que comprende administrar un compuesto de esta invención a un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo. Dichos productos normalmente se identifican administrando un compuesto radiomarcado de la invención en una dosis detectable a un animal, tal como una rata, un ratón, una cobaya, un mono o un ser humano, permitiendo un tiempo suficiente para que tenga lugar el metabolismo, y aislando sus productos de conversión de la orina, la sangre u otras muestras biológicas.

35 Por "compuesto estable" y "estructura estable" se entiende un compuesto que es suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción y a su formulación en un agente terapéutico eficaz.

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

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

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

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

- "Sales de adición de base farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia y las propiedades biológicas de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otra forma no deseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero sin limitación, las sales de sodio, de potasio, de litio, de amonio, de calcio, de magnesio, de hierro, de cinc, de cobre, de manganeso, de aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las de sales de amonio, de sodio, de potasio, de calcio y de magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como resinas de amoníaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, benetamina, benzatina, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, *M*-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Son bases orgánicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.
- Con frecuencia las cristalizaciones producen un solvato del compuesto de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un agregado que comprende una o más moléculas de un compuesto de la invención con una o más moléculas de disolvente. El disolvente puede ser agua, en cuyo caso el solvato puede ser un hidrato. Como alternativa, el disolvente puede ser un disolvente orgánico. Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden existir como un hidrato, incluyendo un monohidrato, di hidrato, hemihidrato, sesquihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares, así como las correspondientes formas solvatadas. El compuesto de la invención puede ser un solvato verdadero, mientras que en otros casos, el compuesto de la invención puede simplemente retener agua adventicia o ser una mezcla de agua más algún disolvente adventicio.
- Una "composición farmacéutica" se refiere a la formulación de un compuesto de la invención y un medio generalmente aceptado en la técnica para la entrega del compuesto biológicamente activo a mamíferos, por ejemplo, seres humanos. Un medio de este tipo incluye todos los vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para ello.
- "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto de la invención que, cuando se administra a un mamífero, preferentemente un ser humano, es suficiente para efectuar el tratamiento en el mamífero, preferentemente un ser humano. La cantidad de una nanopartícula lipídica de la invención que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la afección y su gravedad, la forma de administración y la edad del mamífero que ha de tratarse, pero puede determinarse rutinariamente por un experto habitual en la materia teniendo en cuenta su propio conocimiento y la presente divulgación.
- "Tratamiento" o "tratamiento" como se usa en el presente documento abarca el tratamiento de la enfermedad o afección de interés en un mamífero, preferentemente un ser humano, que tiene la enfermedad o afección de interés, e incluye:
- (i) prevenir que la enfermedad o afección se produzca en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero está predisposto a la afección pero aún no se le ha diagnosticado;
  - (ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo;
  - (iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir, provocar una regresión de la enfermedad o afección;
  - (iv) aliviar los síntomas resultantes de la enfermedad o afección, es decir, aliviar el dolor sin abordar la enfermedad o afección subyacente. Como se usan en el presente documento, los términos "enfermedad" y "afección" pueden usarse indistintamente o pueden ser diferentes en el sentido de que la enfermedad o afección concreta puede no tener un agente causal conocido (de manera que aún no se ha determinado su etiología) y, por tanto, no se reconoce aún como una enfermedad sino solamente como una afección o síndrome no deseable, en donde los médicos han identificado un conjunto más o menos específico de síntomas.
- Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden contener uno o más centros asimétricos y pueden, por tanto, originar enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoquímicas que pueden definirse, en términos de estequiometría absoluta, como (R)- o (S)-, o, como (D)- o (L)- para los aminoácidos. La presente invención pretende incluir todos esos isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras. Los isómeros (+) y (-), (R)- y (S)-, o (D)- y (L)- ópticamente activos, pueden prepararse usando sintones quirales o reactivos quirales o resolverse usando técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía y cristalización fraccionada. Las técnicas convencionales para la preparación/aislamiento de enantiómeros individuales incluyen la síntesis quiral a partir de un precursor ópticamente puro adecuado o la resolución del racemato (o el racemato de una sal o derivado) usando, por ejemplo, cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) quiral. Cuando los compuestos que se describen en el presente documento contienen dobles enlaces olefínicos u otros centros de simetría geométrica y, a menos que se especifique otra cosa, se pretende que los compuestos incluyan los isómeros geométricos tanto E como Z. Análogamente, también se pretende incluir todas las formas tautoméricas.
- Un "estereoisoámero" se refiere a un compuesto constituido por los mismos átomos unidos por los mismos enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables. La presente invención

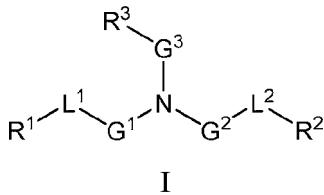
contempla diversos estereoisómeros y mezclas de los mismos e incluye "enantiómeros", que se refieren a dos estereoisómeros cuyas moléculas son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Un "tautómero" se refiere a un desplazamiento de protón de un átomo de una molécula a otro átomo de la misma molécula. La presente invención incluye tautómeros de cualquiera de dichos compuestos.

#### Compuestos

En un aspecto, la invención proporciona nuevos compuestos lipídicos que son capaces de combinarse con otros componentes lipídicos tales como lípidos neutros, lípidos cargados, esteroideos y/o lípidos conjugados con polímero para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que estas nanopartículas lipídicas protegen a los oligonucleótidos de la degradación en el suero y proporcionan una entrega eficaz de oligonucleótidos a células *in vitro* e *in vivo*. En una realización, los compuestos tienen la siguiente estructura (I) (no de acuerdo con la invención a menos que estén incluidos en las reivindicaciones):

15



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

uno de  $\text{L}^1$  o  $\text{L}^2$  es  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{=O})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{x}-$ ,  $-\text{S}-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{=O})\text{S}-$ ,  $\text{SC}(\text{=O})-$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})-$ ,  $-\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$ ,  $\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$ ,  $-\text{OC}(\text{=O})\text{NR}^a-$  o  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{O}-$  y el otro de  $\text{L}^1$  o  $\text{L}^2$  es  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{=O})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{x}-$ ,  $-\text{S}-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{=O})\text{S}-$ ,  $\text{SC}(\text{=O})-$ ,  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})-$ ,  $-\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$ ,  $\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$ ,  $-\text{OC}(\text{=O})\text{NR}^a-$  o  $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{O}-$  o un enlace directo;

25

$\text{G}^1$  y  $\text{G}^2$  son cada uno independientemente alquíleno  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  o alquenileno  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ;

$\text{G}^3$  es alquíleno  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , alquenileno  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ , cicloalquíleno  $\text{C}_3\text{-C}_8$ , cicloalquenileno  $\text{C}_3\text{-C}_8$ ;

$\text{R}^a$  es H o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ;

$\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  son cada uno independientemente alquilo  $\text{C}_6\text{-C}_{24}$  o alquenilo  $\text{C}_6\text{-C}_{24}$ ;

$\text{R}^3$  es H,  $\text{OR}^5$ ,  $\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{=O})\text{OR}^4$ ,  $-\text{OC}(\text{=O})\text{R}^4$  o  $-\text{NR}^5\text{C}(\text{=O})\text{R}^4$ ;

$\text{R}^4$  es alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ ;

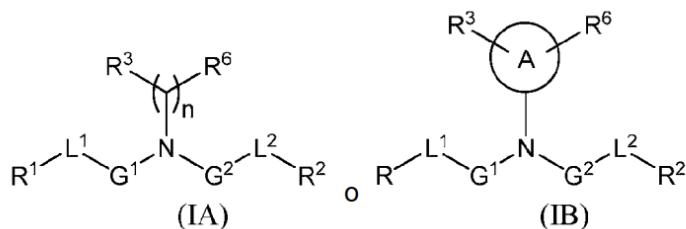
30

$\text{R}^5$  es H o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ; y

x es 0, 1 o 2.

En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IA) o (IB) (no de acuerdo la invención a menos que esté incluido en las reivindicaciones):

35



en donde:

A es un anillo de cicloalquilo o de cicloalquieno de 3 a 8 miembros;

40

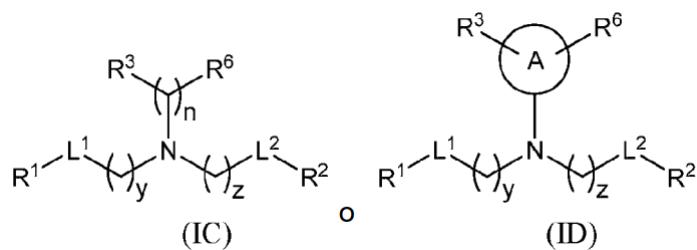
$\text{R}^6$  es, en cada aparición, independientemente H, OH o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ ;

n es un número entero que varía de 1 a 15.

En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto tiene estructura (IA) y, en otras realizaciones, el compuesto tiene estructura (IB).

45

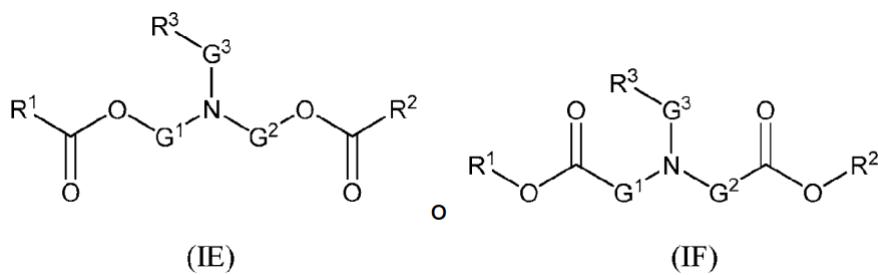
En otras realizaciones de lo anterior, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IC) o (ID) (no de acuerdo la invención a menos que esté incluido en las reivindicaciones):



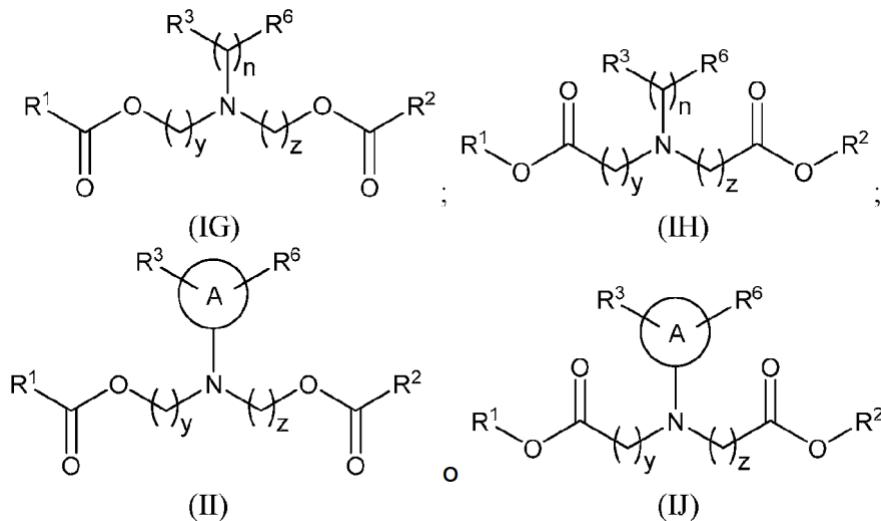
en donde y y z son cada uno independientemente números enteros que varían de 1 a 12.

- 5 En cualquiera de las realizaciones anteriores, uno de L<sup>1</sup> o L<sup>2</sup> es -O(C=O). Por ejemplo, en algunas realizaciones cada uno de L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son -O(C=O)-. En algunas realizaciones diferentes de cualquiera de las anteriores, L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son cada uno independientemente -(C=O)O- o -O(C=O)-. Por ejemplo, en algunas realizaciones cada uno de L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son -O(C=O)-.

10 En algunas realizaciones diferentes de las anteriores, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IE) o (IF) (no de acuerdo la invención a menos que esté incluido en las reivindicaciones):



- 15 En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IG) (de acuerdo con la invención), (IH), (II) o (IJ) (no de acuerdo con la invención):



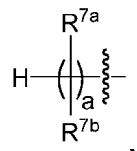
- 20 En algunas de las realizaciones anteriores,  $n$  es un número entero que varía de 2 a 12, por ejemplo, de 2 a 8 o de 2 a 4. Por ejemplo, en algunas realizaciones,  $n$  es 3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones,  $n$  es 3. En algunas realizaciones,  $n$  es 4. En algunas realizaciones,  $n$  es 5. En algunas realizaciones,  $n$  es 6.

25 En alguna otra de las realizaciones anteriores,  $y$  y  $z$  son cada uno independientemente un número entero que varía de 2 a 10 (no de acuerdo con la invención si es distinto de un número entero que varía de 6 a 9). Por ejemplo, en algunas realizaciones,  $y$  y  $z$  son cada uno independientemente un número entero que varía de 4 a 9 o de 4 a 6.

En algunas de las realizaciones anteriores de la invención, R<sub>6</sub> es H. En otras de las realizaciones anteriores, R<sub>6</sub> es alquilo C<sub>1-24</sub> (no de acuerdo con la invención). En otras realizaciones, R<sub>6</sub> es OH (no de acuerdo con la invención).

En algunas realizaciones, G<sup>3</sup> no está sustituido. En otras realizaciones, G<sup>3</sup> está sustituido. En diversas realizaciones diferentes, G<sup>3</sup> es alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> lineal o alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> lineal.

- 5 En algunas otras realizaciones anteriores, R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> o ambos, es alquenilo C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> cada uno, independientemente tienen la siguiente estructura:



- 10 en donde:

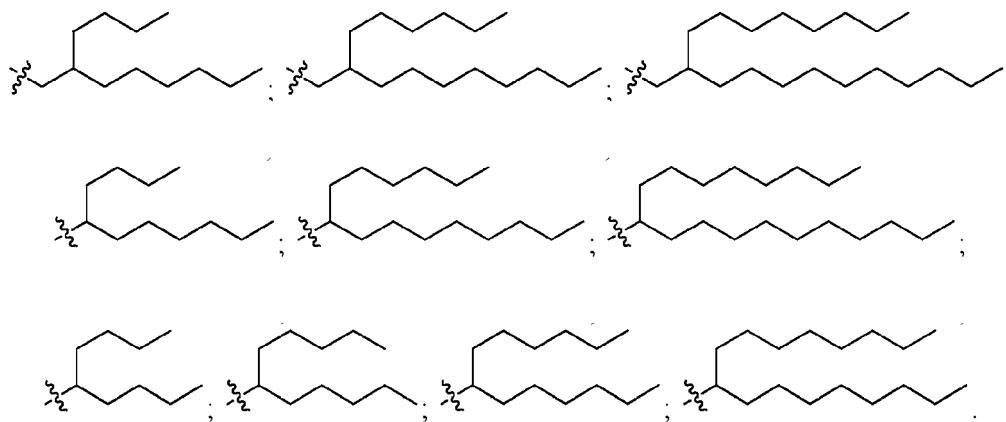
R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> son, en cada aparición, independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; y a es un número entero de 2 a 12,

- 15 en donde R<sup>7a</sup>, R<sup>7b</sup> y a se selecciona cada uno de tal manera que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> cada uno comprende independientemente de 6 a 20 átomos de carbono. Por ejemplo, en algunas realizaciones, a es un número entero que varía de 5 a 9 o de 8 a 12.

- 20 En algunas de las realizaciones anteriores, al menos una aparición de R<sup>7a</sup> es H. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R<sup>7a</sup> es H en cada aparición. En algunas otras realizaciones diferentes de las anteriores, al menos una aparición de R<sup>7b</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>. Por ejemplo, en algunas realizaciones, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-hexilo o n-octilo.

En diferentes realizaciones, R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> o ambos, tiene una de las estructuras siguientes:

- 25



- 30

En algunas de las realizaciones anteriores, R<sup>3</sup> es OH, CN, -C(=O)OR<sup>4</sup>, -OC(=O)R<sup>4</sup> o -NHC(=O)R<sup>4</sup>. En algunas realizaciones, R<sup>4</sup> es metilo o etilo.

- 35 En diversas realizaciones diferentes, el compuesto tiene una de las estructuras expuestas en la Tabla 1 a continuación (no de acuerdo con la invención a menos que esté incluido en las reivindicaciones).

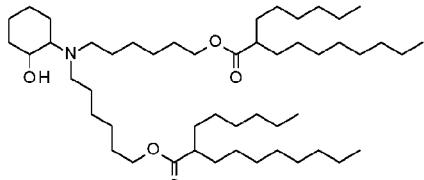
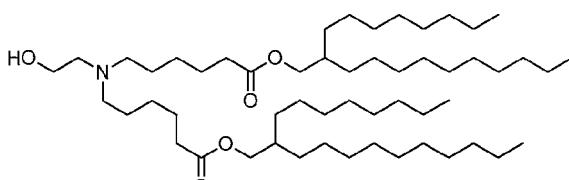
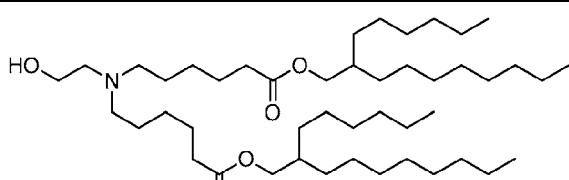
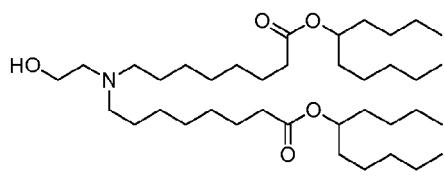
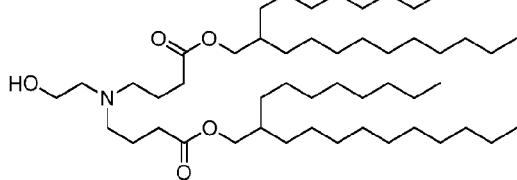
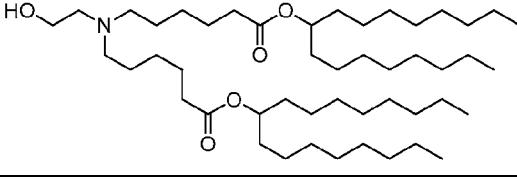
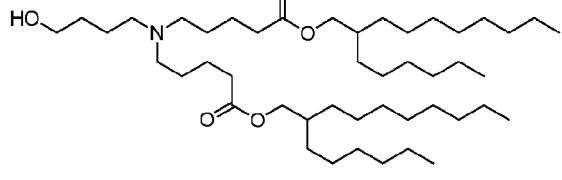
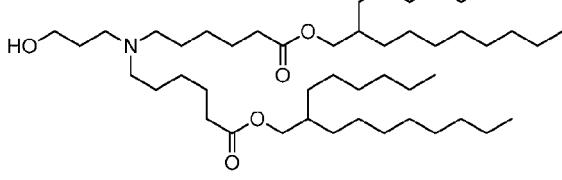
Tabla 1 Compuestos representativos

N. <sup>o</sup>	Estructura
1	

(continuación)

N.º	Estructura
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

(continuación)

N. <sup>o</sup>	Estructura
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

(continuación)

N. <sup>o</sup>	Estructura
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	

(continuación)

N.º	Estructura
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	

(continuación)

N. <sup>o</sup>	Estructura
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	

(continuación)

N.º	Estructura
39	
40	
41	
42	
43	
44	
45	

(continuación)

N.º	Estructura
46	
47	
48	
49	

Se entiende que cualquier realización de los compuestos de estructura (I), como se establece anteriormente, y cualquier sustituyente específico y/o variable en la estructura del compuesto (I), como se establece anteriormente, pueden combinarse independientemente con otras realizaciones y/o sustituyentes y/o variables de los compuestos de estructura (I) para formar realizaciones de las invenciones que no se exponen anteriormente de forma específica.

5 Además, en el caso de que se incluya una lista de sustituyentes y/o variables para cualquier grupo R, grupo L, grupo G, grupo A particulares o variables a, n, x, y o z en una realización particular y/o reivindicación, se entiende que cada sustituyente y/o variable individual puede eliminarse de la realización y/o reivindicación particular y que la lista restante de sustituyentes y/o variables se considerará dentro del alcance de la invención.

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

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

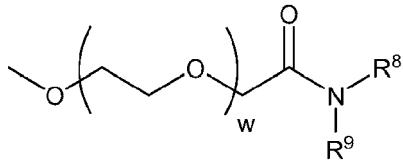
20 En algunas realizaciones, el lípido neutro se selecciona entre DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE y SM. En algunas realizaciones, el lípido neutro es DSPC. En diversas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido neutro varía de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 8:1.

25 En diversas realizaciones, las composiciones comprenden además un esteroide o un análogo de esteroide. En determinadas realizaciones, el esteroide o análogo de esteroide es colesterol. En algunas de estas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el colesterol varía de aproximadamente 5:1 a 1:1.

En diversas realizaciones, el lípido conjugado con polímero es un lípido pegilado. Por ejemplo, algunas realizaciones incluyen un diacilglicerol (PEG-DAG) tal como 1-(monometoxi-poliétilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-

DMG), una fosfatidiletanolamina pegilada (PEG-PE), un succinato de PEG diacilglicerol (PEG-S-DAG) tal como 4-O-(2',3'-di(tetradecanoiloxy)propil-1-O-( $\omega$ -metoxi(polietoxi)etil)butanodioato (PEG-S-DMG), una ceramida pegilada (PEG-cer) o un dialcoxipropilcarbamato de PEG tal como  $\omega$ -metoxi(polietoxi)etil-N-(2,3-di(tetradecanoxi)propil)carbamato o 2,3-di(tetradecanoxi)propil-N- ( $\omega$ -metoxi(polietoxi)etil)carbamato. En diversas 5 realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido pegilado varía de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 20:1.

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



10

(II)

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

15 R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son cada uno independientemente una cadena alquílica lineal o ramificada, saturada o insaturada que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, en donde la cadena de alquilo está opcionalmente interrumpida con uno o más enlaces éster; y  
w tiene un valor medio que varía de 30 a 60.

20 En algunas realizaciones, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son cada uno independientemente cadenas alquílicas lineales saturadas que contiene de 12 a 16 átomos de carbono. En algunas realizaciones, w tiene un valor medio que varía de 43 a 53. En otras realizaciones, el w promedio es de aproximadamente 45. En otras realizaciones diferentes, el w promedio es de 25 aproximadamente 49.

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

30 En otras realizaciones diferentes, la invención se dirige a un método para administrar un agente terapéutico a un paciente que lo necesite, comprendiendo el método preparar o proporcionar cualquiera de las composiciones anteriores y administrar la composición al paciente

35 Con fines de administración, los compuestos de la presente invención (normalmente en forma de nanopartículas lipídicas en combinación con un agente terapéutico) pueden administrarse como un producto químico en bruto o pueden formularse como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un compuesto de estructura (I) y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto de estructura (I) está presente en la composición en una cantidad que es eficaz para formar una nanopartícula lipídica y entregar el agente terapéutico, por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o afección particular de interés. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las concentraciones y dosis adecuadas.

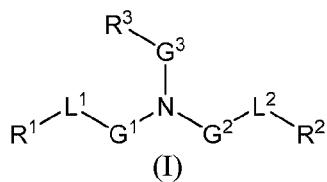
40 La administración de las composiciones de la invención puede realizarse a través de cualquiera de los modos de administración aceptados de agentes que sirvan para utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas,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

La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un sólido o líquido. En un aspecto, el vehículo

o vehículos son partículas, de manera que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimido o polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral, un líquido inyectable o un aerosol, que es útil en, por ejemplo, la administración por inhalación.

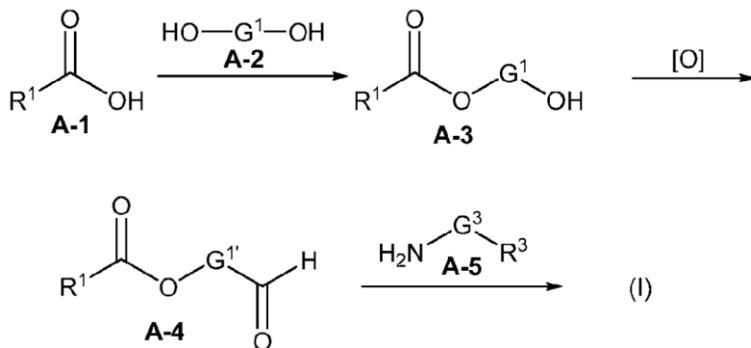
- 5 Cuando se destina a la administración oral, la composición farmacéutica está preferentemente en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen dentro de las formas consideradas en el presente documento sólidas o líquidas.
- 10 Como composición sólida para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en forma de polvo, gránulo, comprimido, píldora, cápsula, chicle, oblea o similares. Una composición sólida de este tipo normalmente contendrá uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, puede estar presente uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; sustancias de deslizamiento tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma a naranja; y un agente colorante.
- 15 Cuando la composición farmacéutica está en forma de cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol o aceite.
- 20 La composición farmacéutica puede estar en forma de líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para la administración oral o para la entrega por inyección, como dos ejemplos. Cuando se destina a la administración oral, las composiciones preferidas contienen, además de los presentes compuestos, uno o más de entre un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del aroma. En una composición destinada a ser administrada por inyección, puede incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.
- 25 Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyecciones, suero salino, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicos, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa; agentes que actúan como crioprotectores tales como sacarosa o trehalosa. La preparación parenteral puede estar encerrada en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.
- 30 Una composición farmacéutica líquida de la invención destinada a la administración parenteral u oral debe contener una cantidad de un compuesto de la invención de manera que se obtenga una dosis adecuada.
- 35 45 La composición farmacéutica de la invención puede estar destinada a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede comprender adecuadamente una solución, emulsión, pomada o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicos, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol y emulsionantes y estabilizadores. Puede haber presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica de administración tópica. Si está destinada a la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoporesis.
- 50 55 La composición farmacéutica de la invención puede estar destinada a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un suppositorio, que se derretirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para la administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.
- 60 65 La composición farmacéutica de la invención puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una capa de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la capa de recubrimiento son normalmente inertes, y pueden seleccionarse entre, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los principios activos pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina. La composición farmacéutica de la invención en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une al compuesto de la invención y, de este modo, ayude a la entrega del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar con esta capacidad incluyen un anticuerpo monoclonal o policlonal, o una proteína.

- La composición farmacéutica de la invención puede consistir en unidades de dosificación que pueden administrarse en forma de aerosol. El término aerosol se usa para designar una diversidad de sistemas que varían desde los de naturaleza coloidal hasta los sistemas que consisten en envases presurizados. La entrega puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dispense los principios activos. Los aerosoles de los compuestos de la invención pueden entregarse en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos con el fin de entregar el o los principios activos. La entrega del aerosol incluye el recipiente necesario, activadores, válvulas, subrecipientes y similares, que juntos pueden formar un kit. Un experto en la técnica, puede determinar sin experimentación indebida los aerosoles preferidos.
- 5      10      15      Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse mediante una metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica destinada a ser administrada por inyección puede prepararse combinando las nanopartículas lipídicas de la invención con agua destilada estéril u otro vehículo para formar una solución. Puede añadirse un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interactúan de forma no covalente con el compuesto de la invención para facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto en el sistema de entrega acuoso.
- 20      Las composiciones de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará en función de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del agente terapéutico específico empleado; la estabilidad metabólica y la duración de la acción del agente terapéutico; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el momento de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o afección particular; y el sujeto que se somete a la terapia.
- 25      30      35      Las composiciones de la invención también pueden administrarse simultáneamente con, antes o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos. Dicha terapia de combinación incluye la administración de una única formulación de dosificación farmacéutica de una composición de la invención y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración de la composición de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica. Por ejemplo, una composición de la invención y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una única composición de dosificación oral tal como un comprimido o cápsula, o cada agente se administra en formulaciones de dosificación oral separadas. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, los compuestos de la invención y uno o más agentes activos adicionales pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo, es decir, simultáneamente, o en momentos escalonados por separado, es decir, secuencialmente; se entiende que la terapia de combinación incluye todas estas pautas posológicas.
- 35      Se describen a continuación en el presente documento métodos de preparación para los compuestos y composiciones anteriores y/o se conocen en la técnica.
- 40      45      50      Los expertos en la materia apreciarán que en el proceso que se describe en el presente documento puede ser necesario proteger los grupos funcionales de los compuestos intermedios mediante grupos protectores adecuados. Dichos grupos funcionales incluyen hidroxi, amino, mercapto y ácido carboxílico. Los grupos protectores adecuados para hidroxi incluyen trialquilsililo o diarilalquilsililo (por ejemplo, *t*-butildimetsililo, *t*-butildifenilsililo o trimetsiloso), tetrahidropiranilo, bencilo y similares. Los grupos de protección adecuados para amino, amidino y guanidino incluyen *t*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares. Los grupos de protección adecuados para mercapto incluyen -C(O)-R" (donde R" es alquilo, arilo o arilalquilo), *p*-metoxibencilo, tritilo y similares. Los grupos protectores adecuados para el ácido carboxílico incluyen alquilo, ésteres de arilo o arilalquilo. Pueden añadirse o retirarse grupos protectores de acuerdo con técnicas convencionales, que los expertos en la materia conocen y que se describen en el presente documento. El uso de los grupos protectores se describe en detalle en Green, T.W. y P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3<sup>a</sup> ed., Wiley. Como apreciará un experto en la materia, el grupo protector también puede ser una resina polimérica como una resina Wang, resina Rink o una resina de cloruro de 2-clorotritilo.
- 55      Los expertos en la materia también apreciarán que, aunque dichos derivados protegidos de los compuestos de esta invención pueden no poseer actividad farmacológica como tales, se pueden administrar a un mamífero y posteriormente metabolizarse en el cuerpo para formar los compuestos de la invención que son farmacológicamente activos. Dichos derivados pueden por lo tanto describirse como "profármacos".
- 60      Además, todos los compuestos de la invención que existen en forma de base o ácido libre pueden convertirse en sus sales farmacéuticamente aceptables mediante tratamiento con la base o el ácido inorgánicos u orgánicos adecuados mediante métodos conocidos por un experto en la materia. Las sales de los compuestos de la invención pueden convertirse en su forma de base o de ácido libre mediante técnicas convencionales.
- El siguiente Esquema de Reacción General 1 ilustra métodos para producir compuestos de esta invención, es decir, compuestos de estructura (I):



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

#### ESQUEMA DE REACCIÓN GENERAL I



- El esquema de reacción general I proporciona un método ilustrativo para la preparación de compuestos de estructura (I).  $\text{G}^1$ ,  $\text{G}^3$ ,  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^3$  en el esquema de reacción general 1 son como se define en el presente documento y  $\text{G}^1$  se refiere a un homólogo más corto de un carbono de  $\text{G}^1$ . Los compuestos de estructura A-1 se compran o se preparan de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. La reacción de A-1 con diol A-2 en condiciones de condensación apropiadas (por ejemplo, DCC) produce el éster/alcohol A-3, que luego puede oxidarse (por ejemplo, PCC) a aldehído A-4. La reacción de A-4 con la amina A-4 en condiciones de aminación reductora produce un compuesto de estructura (I).
- Cabe señalar que los expertos en la materia disponen de diversas estrategias alternativas para la preparación de compuestos de estructura (I). Por ejemplo, otros compuestos de estructura (I) en donde  $\text{L}^1$  y  $\text{L}^2$  son distintos del éster pueden prepararse de acuerdo con métodos análogos usando el material de partida apropiado. Además, el Esquema de reacción general 1 representa la preparación de un compuesto de estructura (I), en donde  $\text{G}^1$  y  $\text{G}^2$  son lo mismo; sin embargo, este no es un aspecto requerido de la invención y son posibles modificaciones al esquema de reacción anterior para producir compuestos en donde  $\text{G}^1$  y  $\text{G}^2$  son diferentes. El uso de grupos protectores según sea necesario y otras modificaciones al Esquema General de Reacción anterior serán fácilmente evidentes para un experto en la materia.

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

#### EJEMPLO 1

#### EVALUACIÓN DE ARNm DE LUCIFERASA IN VIVO USANDO LA COMPOSICIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

- Lípido catiónico, DSPC, colesterol y PEG-lípido en etanol en una relación molar de 50:10:38,5:1,5 o 47,5:10:40,8:1,7. Se prepararon nanopartículas lipídicas (NPL) con una relación total en peso entre el lípido y el ARNm de aproximadamente 10:1 a 30:1. Brevemente, el ARNm se diluyó a 0,2 mg/ml en tampón de citrato de 10 a 50 mM, pH 4. Se usaron bombas de jeringa para mezclar la solución lipídica etanólica con la solución acuosa de ARNm en una relación aproximada de 1:5 a 1:3 (vol/vol) con caudales totales superiores a 15 ml/min. Después, se retiró el etanol y

el tampón externo se reemplazó por PBS mediante diálisis. Por último, las nanopartículas lipídicas se filtraron a través de un filtro estéril de poro de 0,2 µm. El tamaño de las partículas de nanopartículas de lípidos tenía un diámetro de aproximadamente 55-95 nm y, en algunos casos, diámetro de aproximadamente 70-90 nm, como se determina por la dispersión de luz casi elástica con un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, RU).

5 Se realizaron estudios en ratones C57BL/6 hembras de 6-8 semanas de edad (Charles River) ratones CD-1 (Harlan) de 8-10 semanas de edad (Charles River) de acuerdo con las directrices establecidas por un comité institucional de cuidado animal (ACC, por sus siglas en inglés) y el Consejo Canadiense de Cuidado Animal (CCAC, por sus siglas en inglés). Se administraron sistemáticamente dosis variables de nanopartículas de ARNm-lípido mediante inyección  
10 en la vena de la cola y se sacrificaron los animales en un punto temporal específico (por ejemplo, 4 h) después de la administración. El hígado y el bazo se recogieron en tubos pesados previamente, se determinaron los pesos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento para su análisis.

15 Para el hígado, se disecaron aproximadamente 50 mg para su análisis en un tubo FastPrep de 2 ml (MP Biomedicals, Solon OH). Se añadió esfera de cerámica de 6,35 mm (1/4 ") (MP Biomedicals) a cada tubo y se añadieron 500 µl de tampón de lisis Glo - GLB (Promega, Madison WI) equilibrado a temperatura ambiente al tejido hepático. Los tejidos hepáticos se homogeneizaron con el instrumento FastPrep24 (MP Biomedicals) a 2 x 6,0 m/s durante 15 segundos. El homogeneizado se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de una dilución 1:4 en GLB y se evaluó usando el sistema de ensayo de luciferasa SteadyGlo (Promega). Específicamente, se hicieron reaccionar 50 µl de homogeneizado de tejido diluido con 50 µl de sustrato SteadyGlo, la mezcla se agitó durante 10 segundos seguido de 5 minutos de incubación y después se cuantificó con un luminómetro CentroXS<sup>3</sup> LB 960 (Berthold Technologies, Alemania). La cantidad de proteína sometida a ensayo se determinó usando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford IL). Las unidades de luminiscencia relativa (ULR) se normalizaron después a los ug de proteína total ensayada. Para convertir ULR a ng de luciferasa se generó una curva patrón con luciferasa recombinante QuantiLum (Promega). Basándose en los datos proporcionados en la Figura 1, se eligió el punto temporal de cuatro horas para la evaluación de la eficacia de las formulaciones de lípidos.  
20  
25

El ARNm de FLuc (L-6107) de Trilink Biotechnologies expresará una proteína luciferasa, originalmente aislada de la luciérnaga, *Photinus pyralis*. FLuc se usa habitualmente en el cultivo de células de mamíferos para medir tanto la expresión de los genes como la viabilidad de las células. Emite bioluminiscencia en presencia del sustrato, luciferina. Este ARNm con capuchón y poliadenilado está totalmente sustituido con 5-metilcitidina y pseudouridina.  
30

## EJEMPLO 2

### 35 DETERMINACIÓN DEL PK<sub>A</sub> DE LOS LÍPIDOS FORMULADOS

Como se describe en otra parte, el pKa de los lípidos catiónicos formulados se correlaciona con la eficacia de las NPL para la entrega de ácidos nucleicos (véase Jayaraman *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edición Internacional (2012), 51 (34), 8529-8533; Semple *et al.*, *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010)). El intervalo preferido de pKa es 40 de ~5 a ~7. El pKa de cada lípido catiónico se determinó en nanopartículas lipídicas usando un ensayo basado en la fluorescencia del ácido 2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfónico (TNS). Se preparan nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos catiónicos/DSPC/colesterol/PEG-lípido (50/10/38,5/1,5 % en moles) en PBS a una concentración de 0,4 mM total. Se preparan lípidos usando el proceso en línea que se describe en el Ejemplo 1. Se preparó TNS en forma de una solución madre 100 µM en agua destilada. Se diluyeron vesículas a 24 µM de lípido en 2 ml de soluciones tamponadas que contenían, HEPES 10 mM, MES 10 mM, acetato de amonio 10 mM, NaCl 130 mM, donde el pH varió de 2,5 a 11. Se añadió una alícuota de la solución de TNS para proporcionar una concentración final de 1 µM y, después de mezclar con formación de vórtice, se midió la intensidad de fluorescencia a temperatura ambiente en un espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Serie 2 usando longitudes de onda de excitación y emisión de 321 nm y 445 nm. Se aplicó un análisis de mejor ajuste sigmoidal a los datos de fluorescencia y se midió el pKa como el pH que origina a la intensidad de fluorescencia semimáxima (véase la Figura 2).  
45  
50

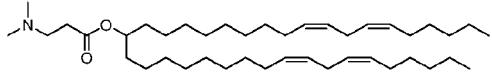
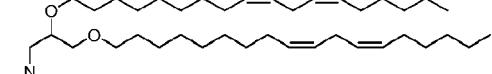
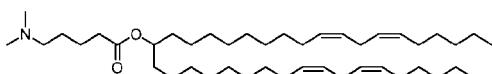
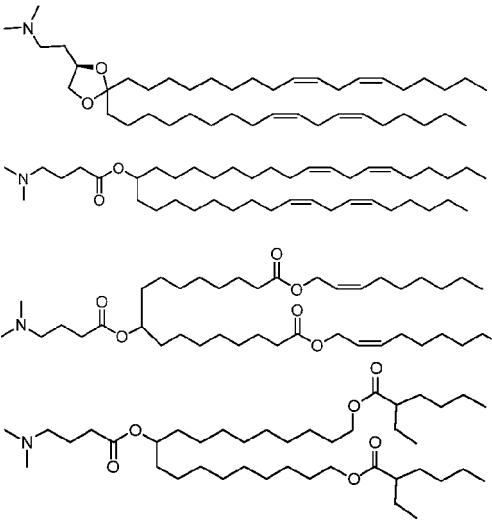
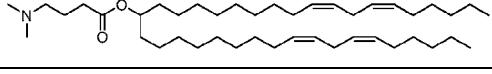
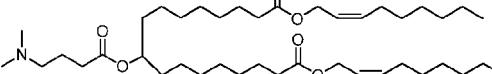
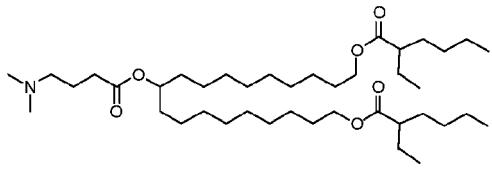
## EJEMPLO 3

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

Los lípidos catiónicos que se muestran en la Tabla 2 se han sometido a ensayo previamente con ácidos nucleicos. Con fines comparativos, estos lípidos también se usaron para formular nanopartículas lipídicas que contenían el ARNm de FLuc (L-6107) usando un método de mezcla en línea, como se describe en el Ejemplo 1 y en el documento PCT/US10/22614. Las nanopartículas lipídicas se formularon usando la siguiente relación molar: 50 % de Lípido catiónico/10 % de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC)/38,5 % de Colesterol/ 1,5 % de lípido PEGilado ("PEG-DMG", es decir, (1-monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol, con un peso molecular promedio de PEG de 2000). Se determinó la actividad relativa midiendo la expresión de luciferasa en el hígado 4 horas después de su administración a través de inyección en la vena de la cola, como se describe en el Ejemplo 1. La actividad se comparó a una dosis de 0,3 y 1,0 mg de ARNm/kg y se expresó como ng de luciferasa/g de hígado medida 4 horas  
60  
65

después de la administración, como se describe en el Ejemplo 1.

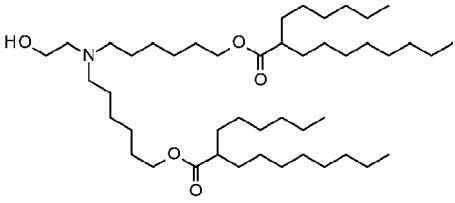
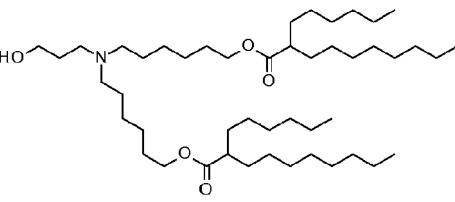
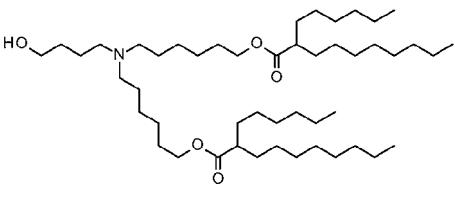
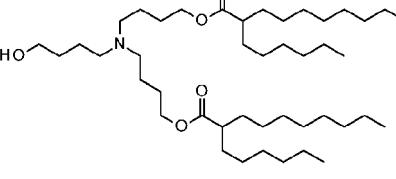
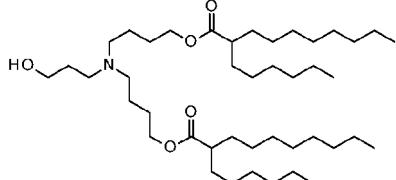
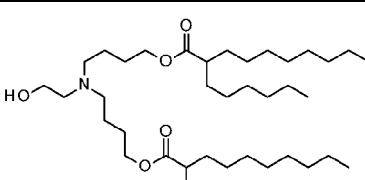
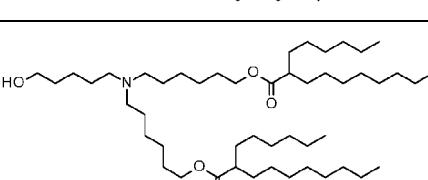
Tabla 2

Lípidos comparadores que muestran actividad con ARNm			
Compuesto	Luc de hígado a una dosis de 0,3 mg/kg	Luc de hígado a una dosis de 1,0 mg/kg	Estructura
<b>MC2</b>	4 ± 1	N/D	
<b>DLinDMA</b>	13 ± 3	67 ± 20	
<b>MC4</b>	41 ± 10	N/D	
<b>XTC2</b>	80 ± 28	237 ± 99	
<b>MC3</b>	198 ± 126	757 ± 528	
<b>319 (2 % de PEG)</b>	258 ± 67	681 ± 203	
<b>137</b>	281 ± 203	588 ± 303	

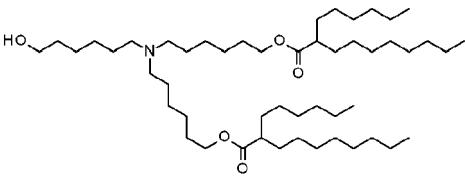
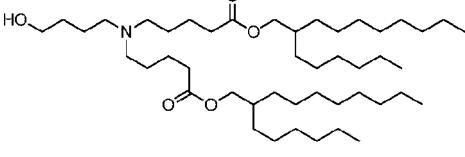
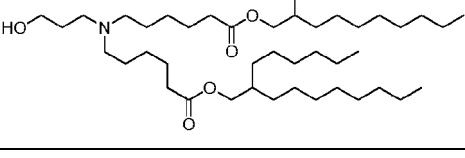
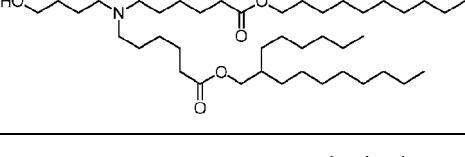
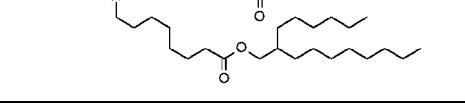
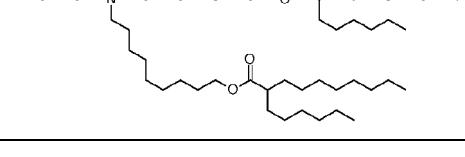
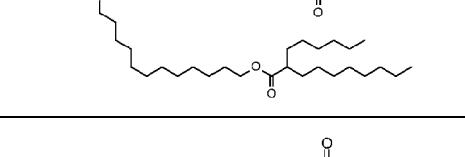
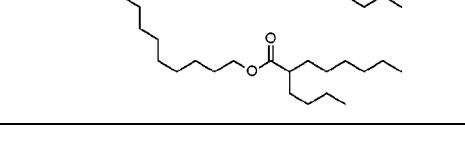
- 5 Los compuestos representativos de la invención que se muestran en la Tabla 3 se formularon usando la siguiente relación molar: A) lípido catiónico al 50 % / diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) al 10 % / Colesterol al 38,5 % / PEG lípido al 1,5 % ("PEG-DMA" 2-[2-( $\omega$ -metoxi)polietilenglicol<sub>2000</sub>)etoxi]-N,N-ditetradecilacetamida) o B) lípido catiónico al 47,5 % / DSPC al 10 % / Colesterol al 40,8 % / PEG lípido al 1,7 %. Se determinó la actividad relativa midiendo la expresión de luciferasa en el hígado 4 horas después de su administración a través de inyección en la vena de la cola, como se describe en el Ejemplo 1. La actividad se comparó a una dosis de 0,3 y 1,0 mg de ARNm/kg y se expresó como ng de luciferasa/g de hígado medida 4 horas después de la administración, como se describe en el Ejemplo 1. Un gráfico de datos seleccionados se da en la Figura 3 (de arriba a abajo: triángulo = compuesto 3; círculo = compuesto 2; cruz = compuesto 1; cuadrado = MC3).
- 10

Tabla 3

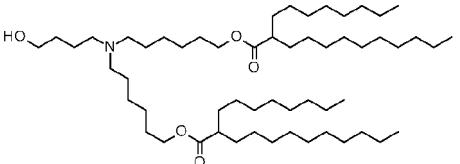
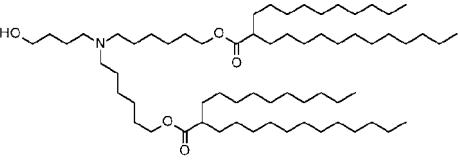
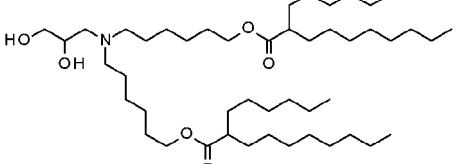
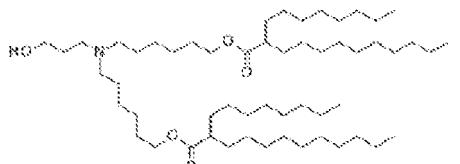
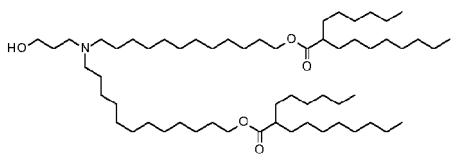
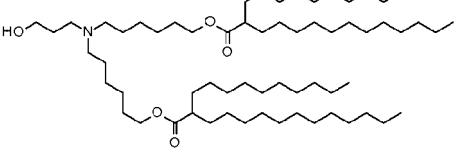
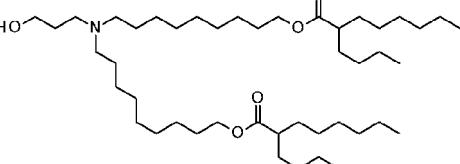
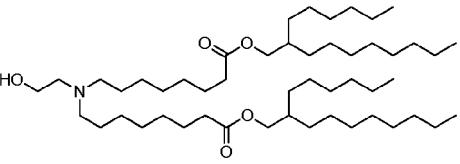
Lípidos catiónicos novedosos y actividad asociada

N. <sup>o</sup>	pK <sub>a</sub>	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura	Relación de lípidos
1	5,89	467±72	3780±210		A
2	6,05	1195±245	10059±383 3		A
3	6,09	1275±410	10643±185 8		A
4	5,60	378±82	1952±940		A
5	5,59	183±45	713±298		A
6	5,42	122±49	520±365		A
7	6,11	1158±136	8406±2335		A

(continuación)

Lípidos catiónicos novedosos y actividad asociada					
N. <sup>o</sup>	pK <sub>a</sub>	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura	Relación de lípidos
8	5,84	1467±943	7230±2290		A
15	6,14	247±25	1633±449		A
16	6,31	344±133	2633±1140		A
17	6,28	275±139	1554±761		A
20	6,36	691±150	4279±2226		B
22	6,10	660±184	7533±4499		A
23	5,98	137±51	487±209		A
25	6,22	1648±534	13880±5083		A

(continuación)

Lípidos catiónicos novedosos y actividad asociada					
N. <sup>o</sup>	pK <sub>a</sub>	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura	Relación de lípidos
26	5,84	1143±782	1238±1686		A
27	5,77	110±42	1088±802		A
30	6,09	49±17	297±92		A
37	5,89	1244±907	2035±498		A
38	6,10	60±5	365±181		A
44	5,79	23±11	342±229		B
45	6,25	1026±199	8806±2836		B
46	6,06	4±2	5±3		B

**EJEMPLO 4****SÍNTESIS DE 6-(2'-HEXILDECANOLOXI)HEXAN-1-AL**

- 5 Una solución de hexano-1,6-diol (27,6 g) en cloruro de metileno (475 ml) se trató con ácido 2-hexildecanoico (19,8 g), DCC (18,2 g) y DMAP (11,3 g). La solución se agitó durante tres días. La mezcla de reacción se filtró y se añadió hexano (500 ml) al filtrado. La mezcla se agitó y se dejó que los precipitados se asentaran. El sobrenadante se decantó y se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró, produciendo 30 g de producto en bruto.
- 10 El producto en bruto se disolvió en cloruro de metileno (200 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (15 g) durante dos horas. Se añadió dietil éter (600 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un tapón de gel de sílice y el disolvente se retiró. El residuo se pasó por una columna de gel de sílice (80 g) usando hexano, seguido de cloruro de metileno, como eluyente. Se obtuvo 6-(2'-hexildecanoiloxy)hexan-1-al (24 g) como un aceite incoloro.
- 15

**EJEMPLO 5****SÍNTESIS DE 4-(2'-HEXILDECANOLOXI)BUTAN-1-AL**

Una solución de butan-1,4-diol (12,5 g) en cloruro de metileno (200 ml) se trató con ácido 2-hexildecanoico (9,2 g), DCC (8,8 g) y DMAP (4,9 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró.

25 El producto en bruto se disolvió en cloruro de metileno (150 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (6 g) durante una hora. Se añadió dietil éter (450 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 4-(2'-hexildecanoiloxy)butan-1-al (11 g) como un aceite incoloro.

30

**EJEMPLO 6****SÍNTESIS DE COMPUESTO 1**

35 Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxy)hexan-1-al (3,0 g), ácido acético (0,21 g) y etanolamina (0,14 g) en cloruro de metileno (50 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,4 g) durante la noche. La solución se lavó con una solución acuosa diluida de hidróxido de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %), produciendo compuesto 1 en forma de un aceite incoloro (0,63 g).

**EJEMPLO 7****SÍNTESIS DE COMPUESTO 2**

45 Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxy)hexan-1-al (3,0 g), ácido acético (0,33 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,17 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante una hora. La solución se lavó con una solución acuosa diluida de hidróxido de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %), produciendo compuesto 2 en forma de un aceite incoloro (1,1 g).

50

**EJEMPLO 8****SÍNTESIS DE COMPUESTO 3**

Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxy)hexan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,33 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,23 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante dos horas. La solución se lavó con una solución acuosa de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %), produciendo compuesto 3 en forma de un aceite incoloro (0,4 g).

55

60

## EJEMPLO 9

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 4

Una solución de 4-(2'-hexildecanoiloxi)butan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,30 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,22 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante dos horas. La solución se lavó con una solución acuosa diluida de hidróxido de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %). Las fracciones parcialmente purificadas se pasaron por una segunda columna usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-10/98-90 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 4 en forma de un aceite incoloro (0,9 g)

## EJEMPLO 10

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 5

Una solución de 4-(2'-hexildecanoiloxi)butan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,31 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,17 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,4 g) durante una hora. La solución se lavó con una solución acuosa de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %). Las fracciones parcialmente purificadas se pasaron por una segunda columna usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-92 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 5 en forma de un aceite incoloro (0,57 g).

## EJEMPLO 11

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 6

Una solución de 4-(2'-hexildecanoiloxi)butan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,30 g) y etanolamina (0,14 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante dos horas. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-10/100-90 %). Las fracciones parcialmente purificadas se pasaron por una segunda columna usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-9/98-92 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 6 en forma de un aceite incoloro (0,2 g).

## EJEMPLO 12

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 7

Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,14 g) y 5-aminopentan-1-ol (0,24 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante dos horas. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %), produciendo compuesto 7 en forma de un aceite incoloro (0,5 g)

## EJEMPLO 13

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 8

Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,17 g) y 6-aminohexan-1-ol (0,26 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante dos horas. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %), produciendo compuesto 8 en forma de un aceite incoloro (0,5 g)

## EJEMPLO 14

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 9

Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (2,4 g) y clorhidrato de trans-2-aminociclohexanol (0,35 g) en cloruro de metileno (10 ml)/tetrahidrofurano (10 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante 1,5 horas. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8/100-92 %), produciendo compuesto 9 en forma

de un aceite incoloro (0,6 g).

#### EJEMPLO 15

##### 5 SÍNTESIS DE COMPUESTO 10

A una solución de 2-aminoetanol (106 mg, 1,75 mmol) en THF anh. (15 ml), 6-bromohexanoato de 2-octildodecilo (2 eq, 1,66 g, 3,5 mmol), carbonato de potasio (2 eq, 3,5 mmol, 477 mg.) y carbonato de cesio (0,3 eq, 0,525 mmol, 171 mg,) se añadieron y se calentó a 63 C (baño de aceite) durante 16 h. Se añadieron trazas de yoduro de tetrabutilamonio a la mezcla y la mezcla se calentó a reflujo durante otros 4 días. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se recogió en una mezcla de hexanos y acetato de etilo (aprox. 9:1) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un aceite (1,6 g). El residuo (1,6 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 4 %). Esto dio el compuesto 10 como un aceite incoloro (700 mg, 0,82 mmol, 47 %).

#### EJEMPLO 16

##### 20 SÍNTESIS DE COMPUESTO 11

A una solución de 2-aminoetanol (116 mg, 1,9 mmol, 115 ul) en 15 ml de THF anhídro, 6-bromohexanoato de 2-hexildecilo (1,9 eq, 1,52 g, 3,62 mmol), carbonato de potasio (1,9 eq, 3,62 mmol, 500 mg), carbonato de cesio (0,3 eq, 0,57 mmol, 186 mg,) y yoduro de sodio (10 mg) y se calentó a reflujo durante 6 días en Ar. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se recogió en hexanos y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un aceite incoloro. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 4 %) para producir el compuesto 11 como un aceite incoloro (936 mg, 1,27 mmol, 70 %).

#### EJEMPLO 17

##### 30 SÍNTESIS DE COMPUESTO 12

El Compuesto 12 se preparó de manera análoga al procedimiento del Compuesto 11 para producir 538 mg de aceite incoloro, 0,86 mmol, 57 %.

#### EJEMPLO 18

##### SÍNTESIS DE COMPUESTO 13

A una solución de 2-aminoetanol (171 mg, 2,81 mmol, 169 ul) en THF anh. (30 ml), 4-bromobutirato de 2-octildodecilo (1,9 eq, 2,386 g, 5,33 mmol), carbonato de potasio (1,9 eq, 5,33 mmol, 736 mg), carbonato de cesio (0,3 eq, 0,84 mmol, 275 mg) y yoduro de sodio (10 mg) y se calentó a reflujo durante 16 h en Ar. TLC (hexano/acetato de etilo = 9:1, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 19:1) mostró que se producía una cantidad significativa de 2-octil-1-dodecanol. La mezcla se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se disolvió en 2-octil-1-dodecanol (2,1 g). Unas gotas de tamices moleculares de 4 A y N,N-diisopropiletamina (1,9 equiv., 5,33 mmol, 683 mg, 0,92 ml). La mezcla se selló y se calentó a 62 C durante otros 4 días. La mezcla de reacción se enfrió. Se añadió hexano. La solución de hexano se decantó y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 4 %) para producir el compuesto 13 como un aceite incoloro (282 mg, 0,35 mmol, 13 %).

#### EJEMPLO 19

##### SÍNTESIS DE COMPUESTO 14

A una solución de 6-bromohexanoato de heptadecan-9-ilo (2 eq, 1,13 g, 2,61 mmol) en THF anhídrido (15 ml), se añadió 2-aminoetanol (1 eq, 1,31 mmol, 79,7 mg), carbonato de potasio (2 eq, 2,61 mmol, 361 mg.), carbonato de cesio (0,3 eq, 0,39 mmol, 128 mg) y yoduro de sodio (6 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 7 días en Ar. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se recogió en hexanos/acetato de etilo (aprox. 10 %) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un aceite (1 g). El residuo (1 g) se purificó mediante cromatografía en columna de gravedad sobre gel de sílice (MeOH en DCM, del 0 al 4 %). Esto dio el compuesto 14 como un aceite incoloro (757 mg, 0,99 mmol, 76 %).

## EJEMPLO 20

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 15

- 5 A una solución de 5-bromopentanoato de 2-hexildecilo (2 eq, 1,22 g, 3 mmol) en 15 ml de THF anh. (abierto durante 2 meses), se añadió 4-amino-1-butanol (1 eq. 1,5 mmol, 0,134 mg, 139 ul), carbonato de potasio (2 eq, 3 mmol, 415 mg), carbonato de cesio (0,3 eq, 0,45 mmol, 146 mg) y yoduro de sodio (6 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 6 días en Ar. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se recogió en una mezcla de hexanos y acetato de etilo (aprox. 10 %) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un aceite (1,12 g). El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %). Esto dio el compuesto 15 como un aceite incoloro (487 mg, 0,66 mmol, 44 %). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,99 (s, 1H), 3,98 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,56 (tipo t, 4,8 Hz, 2H), 2,48-2,41 (m, 6H), 2,33 (t, 7,4 Hz, 4H), 1,70-1,57 (m, 10H), 1,55-1,47 (m, 4H), 1,35-1,21 (48H), 0,89 (tipo t, 6,8 Hz, 12H).

15 EJEMPLO 21

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 16

- 20 A una solución de 3-amino-1-propanol (0,37 mmol, 28 mg) en acetonitrilo anhidro (15 ml), 6-bromohexanoato de 2-hexildecilo (1,9 eq, 294 mg, 0,7 mmol), N,N-diisopropiletilamina (2 equiv., 0,74 mmol, 96 m) y yoduro de sodio (5 mg) y la mezcla (dos capas) se calentó durante 3 días en un matraz a presión a 59 °C (baño de aceite). La mezcla se concentró y el residuo se recogió en una mezcla de hexano y acetato de etilo (aprox. 5:1, 100 ml), se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. Se obtuvo un aceite ligeramente amarillo (aprox. 300 mg). El producto bruto (300 mg) se purificó mediante cromatografía en columna instantánea sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 4,4 %). Esto dio el compuesto 16 como un aceite incoloro (95 mg, 0,13 mmol, 36 %). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,61-5,44 (s a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,80 (tipo t, 5,1 Hz, 2H), 2,63 (tipo t, 5,6 Hz, 2H), 2,43-2,39 (m, 4H), 2,32 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,70-1,59 (m, 8H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,36-1,21 (52H), 0,89 (tipo t, 6,8 Hz, 12H).

30 EJEMPLO 22

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 17

- 35 A una solución de 6-bromohexanoato de 2-hexildecilo (2 eq, 1,32 g, 3,14 mmol) en 15 ml de THF anhidro, se añadieron 4-amino-1-butanol (1 eq. 1,57 mmol, 140 mg, 145 ul), carbonato de potasio (2 eq, 3,14 mmol, 434 mg), carbonato de cesio (0,3 eq, 0,47 mmol, 153 mg) y yoduro de sodio (6 mg). La mezcla se calentó en un matraz de fondo redondo a presión en Ar a 75 °C (baño de aceite) durante 6 días. La mezcla de reacción se enfrió y se concentró. El residuo se recogió en una mezcla de hexano y acetato de etilo (aprox. 9:1), se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a sequedad (1,28 g de aceite incoloro). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna instantánea sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %). Esto dio el compuesto 17 como un aceite incoloro (581 mg, 0,76 mmol, 48 %). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,43-6,17 (s a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,55 (tipo t, 4,7 Hz, 2H), 2,46-2,40 (m, 6H), 2,31 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,70-1,59 (m, 10H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,36-1,21 (52H), 0,89 (tipo t, 6,7 Hz, 12H).

45 EJEMPLO 23

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 20

- 50 A una solución de 8-bromoocanoato de 2-hexildecilo (2 eq, 3,09 g, 6,9 mmol) en 30 ml de THF anhidro, se añadieron 4-amino-1-butanol (1 eq. 3,45 mmol, 308 mg), carbonato de potasio (2 eq, 6,9 mmol, 954 mg), carbonato de cesio (0,3 eq, 1,04 mmol, 337 mg) y yoduro de sodio (10 mg). La mezcla en un matraz de fondo redondo a presión en Ar se calentó a 64-70 °C (baño de aceite) durante 6 días. La mezcla se enfrió y se concentró. El residuo se recogió en una mezcla de hexano y acetato de etilo (9:1), se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a sequedad (aceite incoloro). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna instantánea seca sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 4,2 %). Esto dio el compuesto 20 como un aceite incoloro (1,28 g, 1,56 mmol, 45 %). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,64-6,45 (s a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,62-3,51 (a, 2H), 3,07-2,34 (a, 6H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,71-1,40 (m, 14H), 1,39-1,19 (m, 60H), 0,89 (tipo t, 6,8 Hz, 12H).

60 EJEMPLO 24

## SÍNTESIS DE 9-(2'-ETILHEXANOLOXI)NONAN-1-AL

- 65 Una solución de nonano-1,9-diol (10,1 g) en cloruro de metileno (150 ml) se trató con ácido 2-etilhexanoico (9,0 g), DCC (14,3 g) y DMAP (9,1 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente

se retiró. El residuo se suspendió en hexano y se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró. El producto bruto se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8 %), para producir 9-(2'-etilhexanoiloxi)nonan-1-ol (7,2 g) como un aceite.

- 5 El 9-(2'-etilhexanoiloxi)nonan-1-ol se disolvió en cloruro de metileno (100 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (7,5 g) durante una hora. Se añadió hexano (400 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 9-(2'-etilhexanoiloxi)nonan-1-al (6 g) como un aceite incoloro.

#### EJEMPLO 25

##### SÍNTESIS DE 9-(2'-BUTYLOCTANOILOXI)NONAN-1-AL

- 15 Una solución de nonano-1,9-diol (12,0 g) en cloruro de metileno (150 ml) se trató con ácido 2-butiloctanoico (5,0 g), DCC (7,7 g) y DMAP (4,5 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se suspendió en hexano y se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró. El producto bruto se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-4 %), para producir 9-(2'-butiloctanoiloxi)nonan-1-ol (6 g) como un aceite.

- 20 El 9-(2'-butiloctanoiloxi)nonan-1-ol se disolvió en cloruro de metileno (100 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (3,8 g) durante la noche. Se añadió hexano (300 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 9-(2'-butiloctanoiloxi)nonan-1-al (3,1 g) como un aceite incoloro.

#### EJEMPLO 26

##### SÍNTESIS DE 6-(2'-BUTYLOCTANOILOXI)HEXAN-1-AL

- 30 Una solución de hexan-1,6-diol (9,4 g) en cloruro de metileno (150 ml) se trató con ácido 2-butiloctanoico (5,0 g), DCC (7,6 g) y DMAP (4,8 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se suspendió en hexano y se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró. El producto bruto se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-4 %), para producir 6-(2'-butiloctanoiloxi)hexan-1-ol (4,5 g) como un aceite.

- 35 40 El 6-(2'-butiloctanoiloxi)hexan-1-ol se disolvió en cloruro de metileno (100 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (4,8 g) durante dos horas. Se añadió hexano (300 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 6-(2'-butiloctanoiloxi)hexan-1-al (3,9 g) como un aceite incoloro.

#### EJEMPLO 27

##### SÍNTESIS DE 6-(2'-OCTILDODECANOILOXI)HEXAN-1-AL

- 45 50 Una solución de hexan-1,6-diol (11,5 g) en cloruro de metileno (150 ml)/THF (20 ml) se trató con ácido 2-octildodecanoico (9,9 g), DCC (7,5 g) y DMAP (4,7 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se suspendió en hexano y se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró. El producto bruto se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-4 %), para producir 6-(2'-octildodecanoiloxi)hexan-1-ol (7,4 g) como un aceite.

- 55 60 El 6-(2'-octildodecanoiloxi)hexan-1-ol se disolvió en cloruro de metileno (100 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (4,0 g) durante dos horas. Se añadió dietil éter (300 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 6-(2'-octildodecanoiloxi)hexan-1-al (5,3 g) como un aceite incoloro.

## EJEMPLO 28

## SÍNTESIS DE 6-(2'-DECILTETRADECANOIOLOXI)HEXAN-1-AL

- 5 Una solución de hexano-1,6-diol (9,6 g) en cloruro de metileno (150 ml) se trató con ácido 2-deciltetradecanoico (6,1 g), DCC (4,9 g) y DMAP (3,1 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se suspendió en hexano y se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró. El producto bruto se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-4 %), para producir 6-(2'-deciltetradecanoiloxi)hexan-1-ol (4,6 g).

10 El 6-(2'-deciltetradecanoiloxi)hexan-1-ol se disolvió en cloruro de metileno (100 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (3,2 g) durante dos horas. Se añadió hexano (300 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el producto resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 6-(2'-deciltetradecanoiloxi)hexan-1-al (4,2 g).

## EJEMPLO 29

## SÍNTESIS DE 12-(2'-HEXILDECANOIOLOXI)DODECAN-1-AL

- 20 Una solución de dodecan-1,12-diol (25,0 g) en cloruro de metileno (300 ml)/THF (100 ml) se trató con ácido 2-hexildecanoico (10,6 g), DCC (10,2 g) y DMAP (7,5 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se suspendió en hexano y se filtró. El filtrado se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró. El producto bruto se pasó por una columna de gel de sílice usando hexano seguido de cloruro de metileno, para producir 12-(2'-hexildecanoiloxi)dodecan-1-ol (7,9 g) como un aceite.

25 El 12-(2'-hexildecanoiloxi)dodecan-1-ol se disolvió en cloruro de metileno (150 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (4,0 g) durante tres horas. Se añadió hexano (300 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 12-(2'-hexildecanoiloxi)dodecan-1-al (3,9 g) como un aceite incoloro.

## EJEMPLO 30

## SÍNTESIS DE 9-(2'-HEXILDECANOIOLOXI)NONAN-1-AL

- 30 Una solución de nonano-1,9-diol (46,8 g) en cloruro de metileno (600 ml) se trató con ácido 2-hexildecanoico (25,0 g), DCC (22,0 g) y DMAP (15,0 g). La solución se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se suspendió en hexano y se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró. El producto bruto se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando hexano seguido de un gradiente de metanol/cloruro de metileno (0-8 %), para producir 9-(2'-hexildecanoiloxi)nonan-1-ol (22 g) como un aceite.

35 45 El 9-(2'-hexildecanoiloxi)nonan-1-ol (5,0 g) se disolvió en cloruro de metileno (50 ml) y se trató con clorocromato de piridinio (2,7 g) durante una hora. Se añadió hexano (200 ml) y el sobrenadante se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El disolvente se retiró del filtrado y el aceite resultante se disolvió en hexano. La suspensión se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el disolvente se retiró, produciendo 9-(2'-hexildecanoiloxi)nonan-1-al (3,6 g) como un aceite incoloro.

## EJEMPLO 31

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 22

- 50 55 Una solución de 9-(2'-hexildecanoiloxi)nonan-1-al (2,2 g), ácido acético (0,15 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,20 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,30 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-12/98-88 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 22 en forma de un aceite incoloro (0,93 g).

## EJEMPLO 32

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 23

- 5 Una solución de 12-(2'-hexildecanoiloxi)dodecan-1-al (2,0 g), ácido acético (0,09 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,14 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (0,71 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-12/98-88 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 23 en forma de un aceite incoloro (1,0 g).

## EJEMPLO 33

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 24

- 15 Una solución de 9-(2'-etilhexanoiloxi)nonan-1-al (3,0 g), ácido acético (0,11 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,17 g) en cloruro de metileno (50 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (0,89 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-10/98-90 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 24 en forma de un aceite incoloro (0,69 g).

## EJEMPLO 34

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 25

- 25 Una solución de 9-(2'-butiloctanoiloxi)nonan-1-al (2,6 g), ácido acético (0,20 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,26 g) en cloruro de metileno (50 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,42 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-12/98-88 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 25 en forma de un aceite incoloro (0,82 g).

## EJEMPLO 35

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 26

- 35 Una solución de 6-(2'-octildodecanoiloxi)hexan-1-al (2,7 g), ácido acético (0,20 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,20 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,30 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-12/98-88 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 26 en forma de un aceite incoloro (0,21 g).

## 45 EJEMPLO 36

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 27

- 50 Una solución de 6-(2'-deciltetradecanoiloxi)hexan-1-al (2,1 g), ácido acético (0,11 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,13 g) en cloruro de metileno (30 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (0,70 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-12/98-88 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 27 en forma de un aceite incoloro (0,90 g).

## 55 EJEMPLO 37

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 28

- 60 Una solución de 6-(2'-butiloctanoiloxi)hexan-1-al (2,0 g), ácido acético (0,13 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,13 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,0 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-92 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 28 en forma de un aceite incoloro (0,77 g).

## EJEMPLO 38

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 30

- 5 Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,15 g) y 3-aminopropan-1,2-diol (0,21 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,76 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-12/98-88 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 30 en forma de un aceite incoloro (0,60 g).

## EJEMPLO 39

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 31

- 15 Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,15 g) y 2-aminobutan-1-ol (0,20 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,1 g) durante dos horas. La solución se lavó con una solución acuosa diluida de hidróxido de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-4/98-96 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 31 en forma de un aceite incoloro (0,31 g).

## EJEMPLO 40

## 25 SÍNTESIS DE COMPUESTO 37

- Una solución de 6-(2'-octildodecanoiloxi)hexan-1-al (2,7 g), ácido acético (0,20 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,17 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-12/98-88 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 37 en forma de un aceite incoloro (0,22 g).

## EJEMPLO 41

## 35 SÍNTESIS DE COMPUESTO 38

- Una solución de 12-(2'-hexildecanoiloxi)dodecan-1-al (1,8 g), ácido acético (0,08 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,11 g) en cloruro de metileno (10 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (0,64 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-10/98-90 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 38 en forma de un aceite incoloro (0,83 g).

## 45 EJEMPLO 42

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 39

- Una mezcla (dos capas) de sal clorhidrato de 4-aminobutirato de etilo (1,28 mmol, 214 mg), 6-bromohexanoato de 2-hexildecilo (1,9 eq, 2,43 mmol, 1,02 g), N,N-diisopropiletilamina (3,5 equiv., 4,48 mmol, 579 mg) y yoduro de sodio (5 mg) en acetonitrilo anhidro (15 ml) se calentó a 60 °C durante 2 días en un matraz a presión. La mezcla se enfrió y se concentró. El residuo se recogió en una mezcla de hexano y acetato de etilo (aprox. 5:1, 100 ml), se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. Se obtuvo un aceite marrón (aprox. 1,04 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna instantánea sobre gel de sílice (MeOH en DCM, del 0 al 3,5 %). Esto dio el compuesto 39 como un aceite incoloro (334 mg, 0,41 mmol, 43 %). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,13 (c, 7,1 Hz, 2H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 2,43-2,34 (m, 6H), 2,33-2,28 (m, 6H), 1,73 (quinteto, 7,3 Hz, 2H), 1,68-1,58 (m, 6H), 1,47-1,37 (m, 4H), 1,36-1,20 (54H), 0,89 (tipo t, 6,8 Hz, 12H).

## EJEMPLO 43

## 60 SÍNTESIS DE COMPUESTO 40

- Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,15 g) y 1-aminobutan-2-ol (0,10 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,8 g) durante dos horas. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un

gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-92 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 40 en forma de un aceite incoloro (0,85 g).

**EJEMPLO 44**

5                   **SÍNTESIS DE COMPUESTO 41**

Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (2,4 g), ácido acético (0,19 g) y 3-metoxipropilamina (0,21 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,8 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-92 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 41 en forma de un aceite incoloro (0,77 g).

10                  **EJEMPLO 45**

**SÍNTESIS DE COMPUESTO 42**

20                  Una solución de 6-(2'-butiloctanoiloxi)hexan-1-al (2,0 g), ácido acético (0,13 g) y 4-aminobutan-1-ol (0,20 g) en cloruro de metileno (20 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,03 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-92 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 42 en forma de un aceite incoloro (0,54 g).

25                  **EJEMPLO 46**

**SÍNTESIS DE COMPUESTO 43**

30                  Una solución de 9-(2'-ethylhexanoiloxi)nonan-1-al (3,0 g), ácido acético (0,11 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,14 g) en cloruro de metileno (50 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (0,91 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-6/98-94 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 43 en forma de un aceite incoloro (1,01 g).

**EJEMPLO 47**

**SÍNTESIS DE COMPUESTO 44**

40                  Una solución de 6-(2'-deciltetradecanoiloxi)hexan-1-al (2,1 g), ácido acético (0,11 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,11 g) en cloruro de metileno (30 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (0,71 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-96 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 44 en forma de un aceite incoloro (1,07 g).

**EJEMPLO 48**

**SÍNTESIS DE COMPUESTO 45**

50                  Una solución de 9-(2'-butiloctanoiloxi)nonan-1-al (2,6 g), ácido acético (0,17 g) y 3-aminopropan-1-ol (0,21 g) en cloruro de metileno (50 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,34 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-96 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 45 en forma de un aceite incoloro (1,1 g).

**EJEMPLO 49**

**SÍNTESIS DE COMPUESTO 46**

60                  A una solución de 2-aminoetanol (96,5 mg, 1,58 mmol, 95,4 ul, MW 61,08, d 1,012) en 15 ml de 2-propanol, 8-bromooctanoato de 2-hexildecilo (1,8 eq, 1,27 g, 2,84 mmol), carbonato de potasio (1,9 eq, 3 mmol, 414 mg), carbonato de cesio (0,3 eq, 0,47 mmol, 154 mg) y yoduro de sodio (10 mg) se añadieron y se calentó durante 3 días (baño de aceite 60 °C). La mezcla se concentró y el residuo se recogió en THF (10 ml). A esta mezcla se añadió

más aminoetanol (80 mg, 1,3 mmol). El calentamiento se continuó a 70 °C durante otros 3 días. Después de un total de 6 días, la mezcla de reacción se enfrió, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna instantánea seca sobre gel de sílice (metanol en cloroformo, del 1 al 4,2 %). Esto dio el compuesto 46 como un aceite incoloro (334 mg, 0,42 mmol, 30 %). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,09-4,06 (m, 2H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 5 3,39-3,36 (m, 2H), 3,31-3,23 (m, 4H), 2,31 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,88-1,56 (m, 12H), 1,43-1,19 (59H), 0,89 (tipo t, 6,8 Hz, 12H).

## EJEMPLO 50

## 10 SÍNTESIS DE COMPUESTO 47

Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (3,0 g), ácido acético (0,20 g) y 3-aminopropionitrilo (0,21 g) en cloruro de metileno (30 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,3 g) durante la noche. La solución se lavó con solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, 15 se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-6/98-94 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 47 en forma de un aceite incoloro (0,29 g).

## EJEMPLO 51

## 20 SÍNTESIS DE COMPUESTO 48

Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (3,0 g) y clorhidrato de 4-aminobutirato de etilo (0,46 g) en cloruro de metileno (30 ml) se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (1,4 g) durante la noche. La solución se lavó con 25 solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice usando un gradiente de ácido acético/metanol/cloruro de metileno (2-0/0-8/98-92 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 48 en forma de un aceite incoloro (0,80 g).

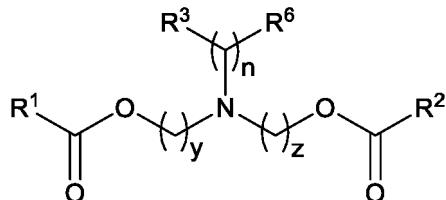
## 30 EJEMPLO 52

## SÍNTESIS DE COMPUESTO 49

A una solución de 8-bromoctanoato de 2-butiloctilo (2 eq, 1,877 g, 4,8 mmol) en 20 ml de THF anhidro, se 35 añadieron 4-amino-1-butanol (1 eq, 2,4 mmol, 214 mg, 221 ul), carbonato de potasio (2 eq, 4,8 mmol, 664 mg), carbonato de cesio (0,3 eq, 0,72 mmol, 234 mg) y yoduro de sodio (aprox. 5 mg). La mezcla en un matraz de fondo redondo a presión se calentó (baño de aceite, 80 °C) durante 6 días. La mezcla de reacción se enfrió y se concentró. El residuo se recogió en una mezcla de hexano y acetato de etilo (aprox. 5:1), se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna instantánea 40 sobre gel de sílice (metanol en cloroformo, del 1 al 4 %). Esto dio el compuesto 49 como un aceite incoloro (857 mg, 1,21 mmol, 50 %). RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,55 (s a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,55 (triplete no bien resuelto, 2H), 2,45-2,40 (m, 6H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,71-1,58 (m, 10 H), 1,51-1,42 (m, 4H), 1,39-1,19 (m, 44H), 0,93-0,87 (m, 12H).

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente estructura (IG):



(IG)

5

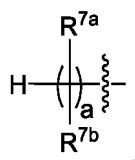
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno independientemente alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub> o alquenilo C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>;  
 10 R<sup>3</sup> es OR<sup>5</sup>, CN, -C(=O)OR<sup>4</sup>, -OC(=O)R<sup>4</sup> o -NR<sup>5</sup>C(=O)R<sup>4</sup>;  
 R<sup>4</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>;  
 R<sup>5</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 R<sup>6</sup> es, en cada aparición, H;  
 n es un número entero que varía de 2 a 12; e  
 15 y y z son cada uno independientemente un número entero que varía de 6 a 9.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde n es 3, 4, 5 o 6.

3. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> o ambos, es alquenilo C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>.  
 20 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> o ambos, es alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> cada uno independientemente tiene  
 25 la siguiente estructura:



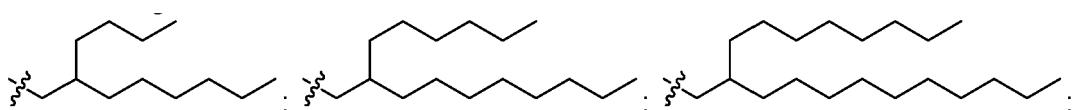
en donde:

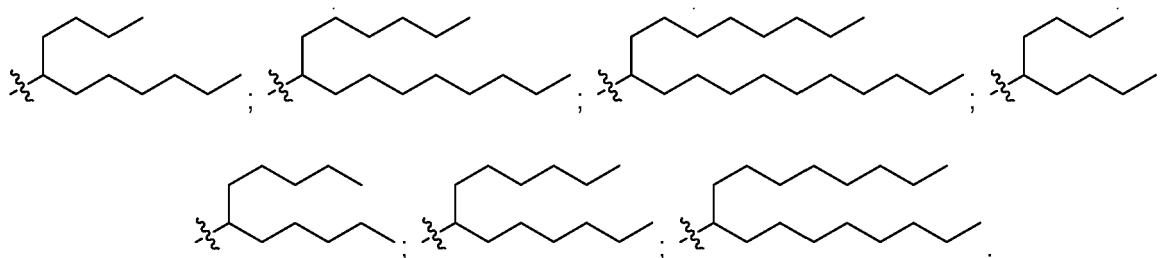
- 30 R<sup>7a</sup> y R<sup>7b</sup> son, en cada aparición, independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>; y  
 a es un número entero de 2 a 12, preferentemente de 8 a 12,  
 en donde R<sup>7a</sup>, R<sup>7b</sup> y a se selecciona cada uno de tal manera que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> cada uno comprende  
 independientemente de 6 a 20 átomos de carbono.

- 35 6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde:

- a) al menos una aparición de R<sup>7a</sup> es H; o  
 b) R<sup>7a</sup> es H en cada aparición; o  
 c) al menos una aparición de R<sup>7b</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; o  
 40 d) al menos una aparición de R<sup>7b</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo,  
 iso-butilo, terc-butilo, n-hexilo o n-octilo.

- 45 7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> o ambos, tiene una de las  
 estructuras siguientes:



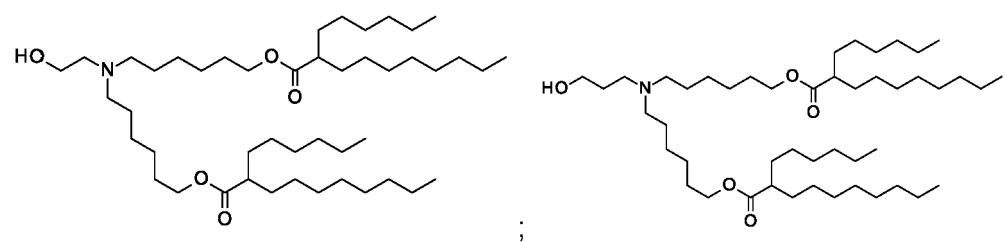


5 8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde R<sup>3</sup> es OH.

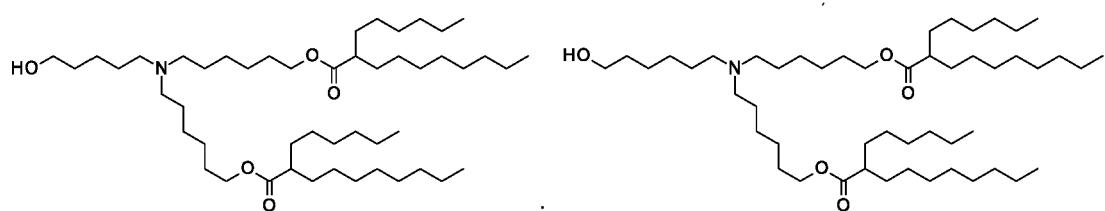
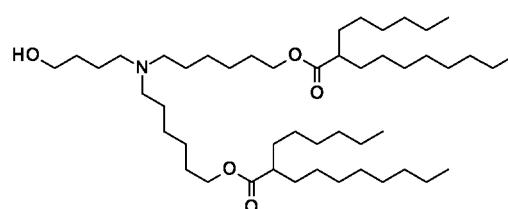
9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde:

- 10 a) R<sup>3</sup> es CN; o  
b) R<sup>3</sup> es -C(=O)OR<sup>4</sup>, -OC(=O)R<sup>4</sup> o -NHC(=O)R<sup>4</sup>, preferentemente en donde R<sup>4</sup> es metilo o etilo.

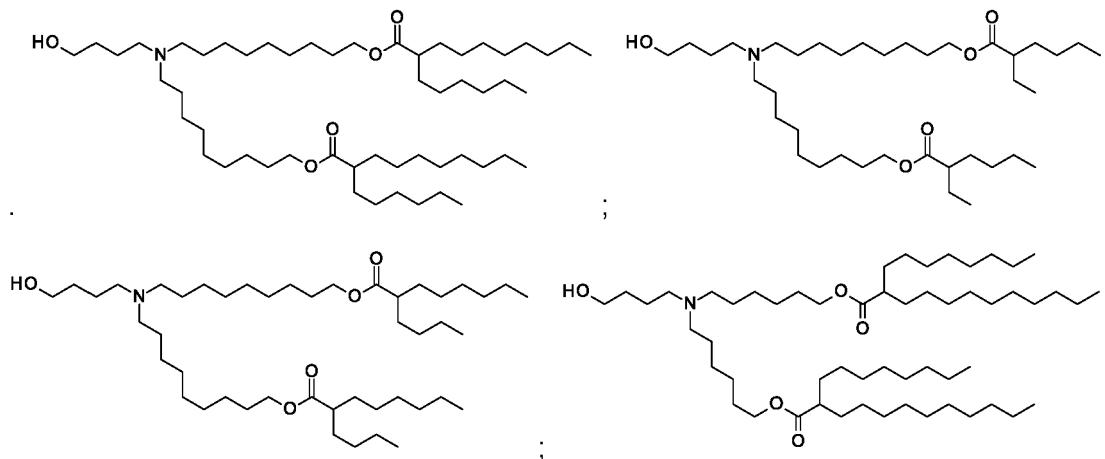
10. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene una de las estructuras siguientes:

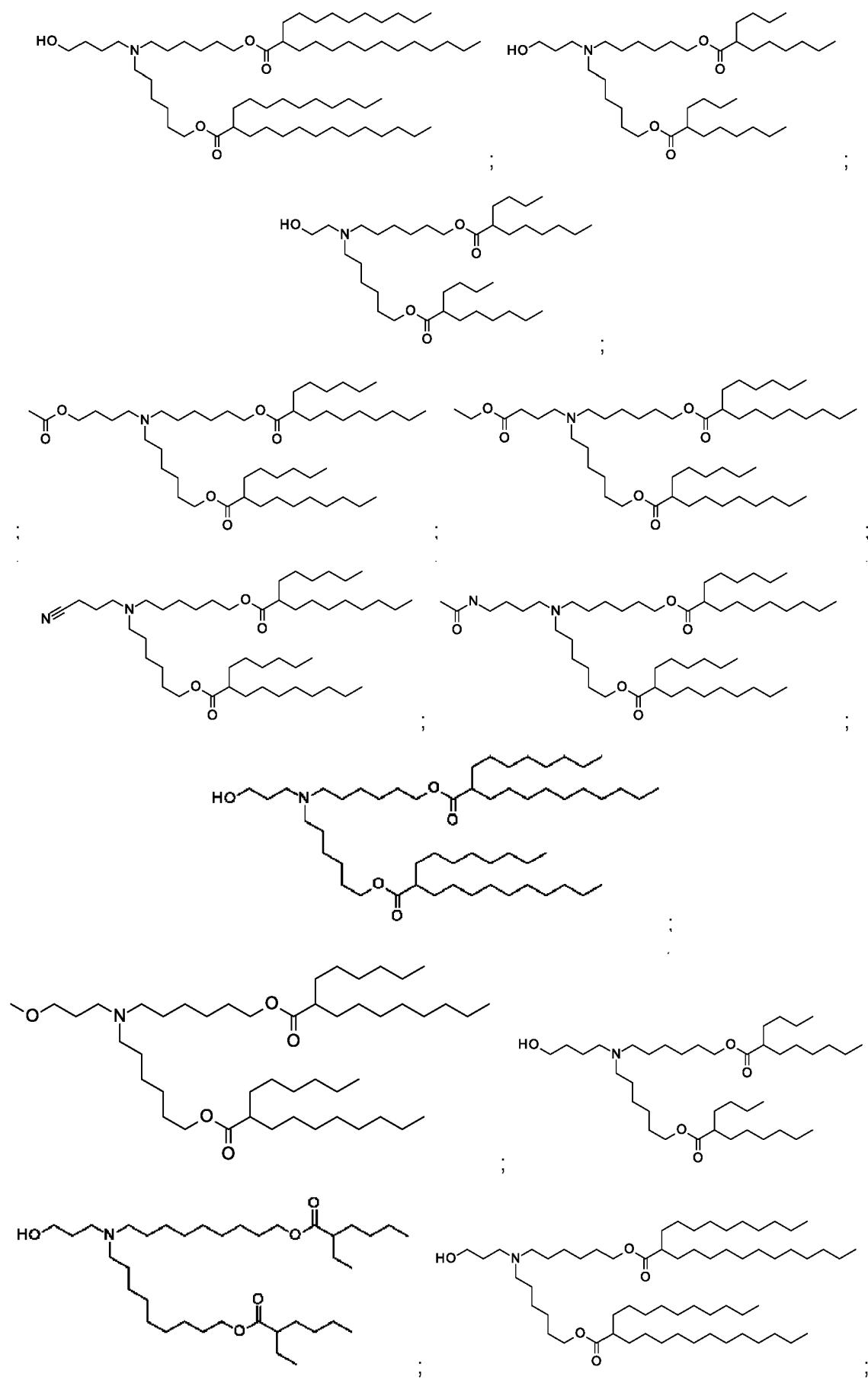


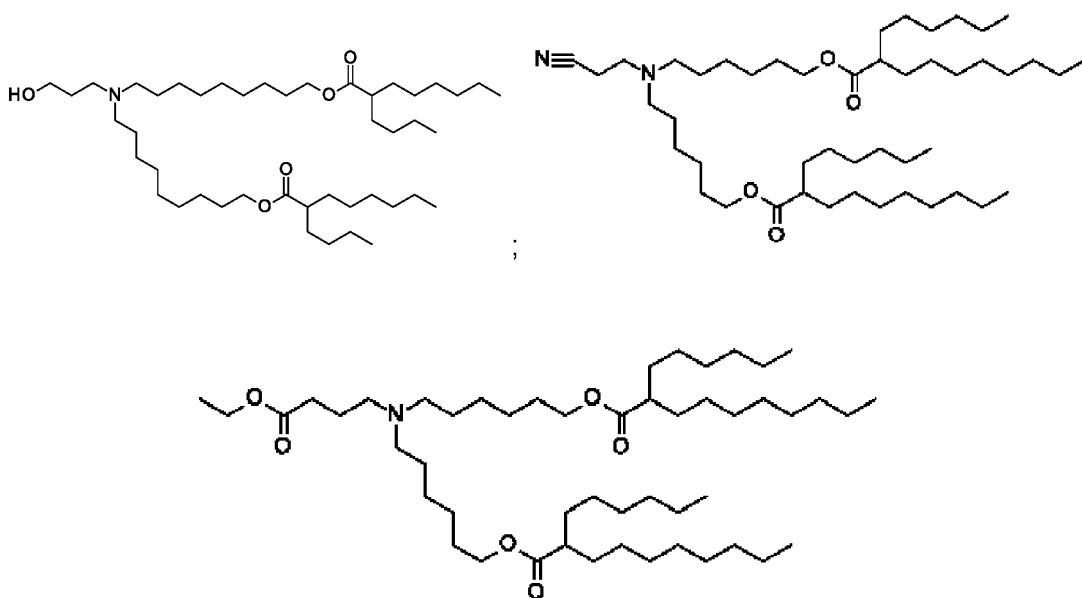
15



20

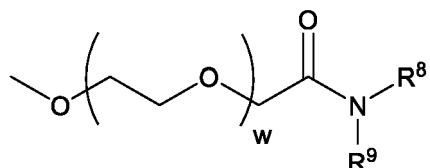






11. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un agente terapéutico, preferentemente que comprende además uno o más excipientes seleccionados de lípidos neutros, esteroides y lípidos conjugados con polímero.

12. La composición de la reivindicación 11, en donde el lípido conjugado con polímero es un lípido pegilado que tiene la siguiente estructura (II):



15

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

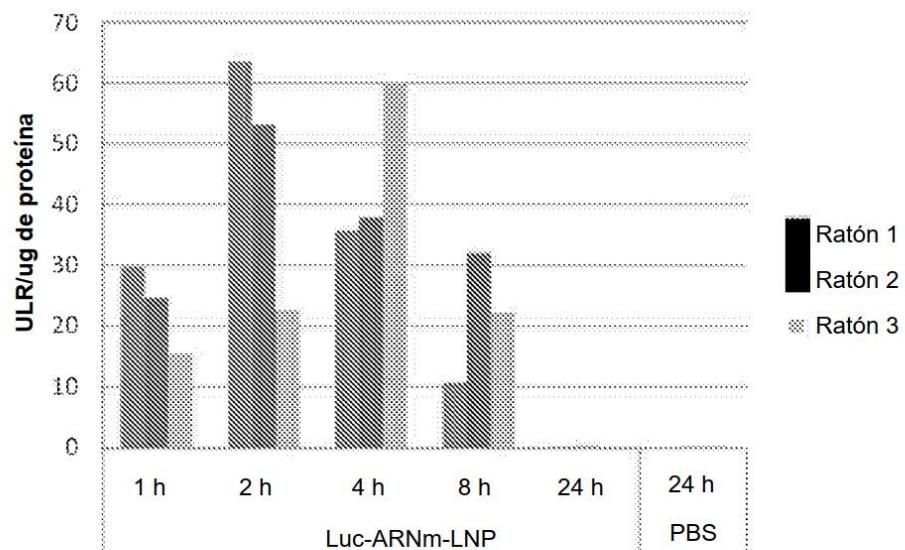
20 R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son cada uno independientemente una cadena alquílica lineal o ramificada, saturada o insaturada que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, en donde la cadena de alquilo está opcionalmente interrumpida con uno o más enlaces éster; y  
w tiene un valor medio que varía de 30 a 60.

25 13. La composición de la reivindicación 12, en donde:

- a) R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> son cada uno independientemente cadenas alquílicas lineales saturadas que contiene de 12 a 16 átomos de carbono; o  
b) el w promedio es de aproximadamente 49.

30 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde el agente terapéutico comprende un ácido nucleico, preferentemente en donde el ácido nucleico se selecciona de antisentido y ARN mensajero.

35 15. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, para su uso en un método para administrar un agente terapéutico a un paciente que lo necesite.



*Figura 1*

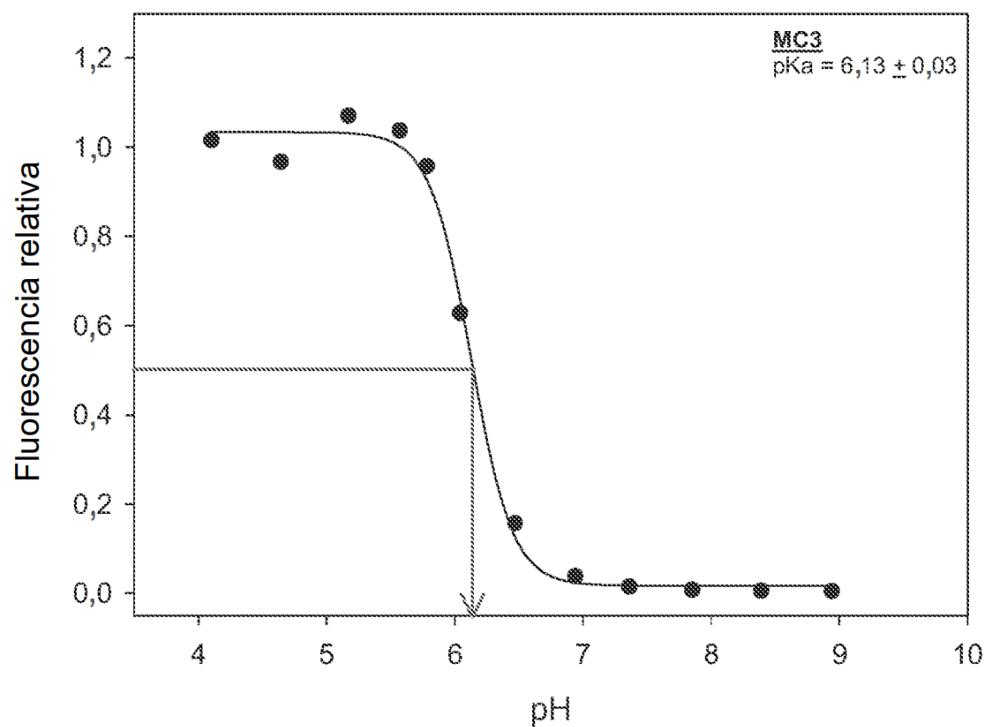
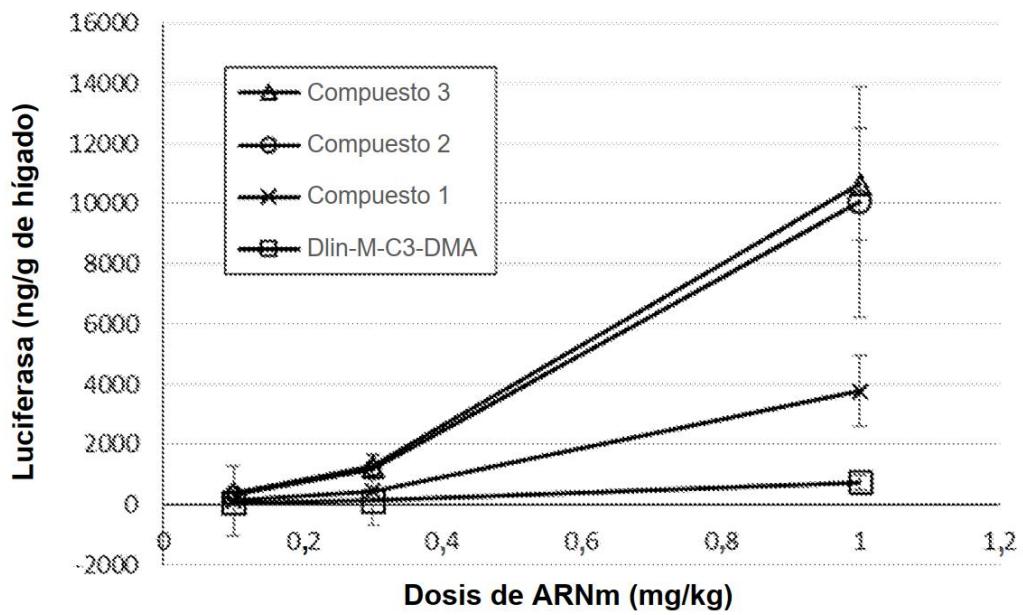


Figura 2



*Figura 3*