

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 novedosos 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 novedosos 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, antagomir, antimir, mimético, supermir y aptámeros. Algunos ácidos nucleicos, tales como el ARNm o los plásmidos, puede usarse para efectuar la expresión de productos celulares específicos como sería útil en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades relacionadas con una deficiencia de una proteína o enzima. Las aplicaciones terapéuticas 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.

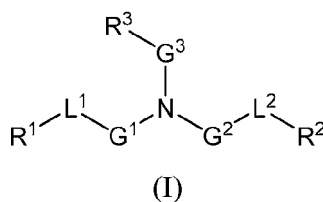
Algunos ácidos nucleicos, tales como los inhibidores de miARN, pueden usarse para efectuar la expresión de productos celulares específicos que están regulados por miARN como sería útil en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades relacionadas con una deficiencia de proteína o enzima. Las aplicaciones 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 afin 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 R^1 , R^2 , R^3 , L^1 , L^2 , G^1 , G^2 y G^3 son como se definen en el presente documento.

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 agente terapéutico.

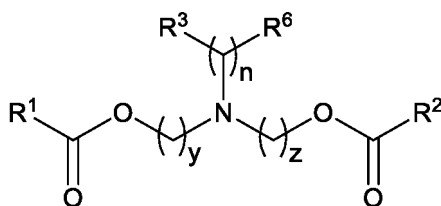
En otras realizaciones, la presente invención proporciona un método para administrar un agente terapéutico a un paciente que lo necesite, comprendiendo el método preparar una composición de nanopartículas lipídicas que comprenden el compuesto de estructura (I) y un agente terapéutico y entregar la composición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

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

Breve resumen

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):



(IG)

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

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

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

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

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

R^6 es, en cada aparición, H;

n es un número entero que varía de 2 a 12; e

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.

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 componentes lipídicos tales como lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides (incluyendo, por ejemplo, todos los esteroides) y/o sus análogos, y/o lípidos conjugados con polímeros para formar nanopartículas lipídicas para la entrega de agentes terapéuticos.

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 posicionan 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.

Descripción detallada

- 25 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.

La presente invención se basa, en parte, en el 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.

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.

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.

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 colocación 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 in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods* v. 941 Conn G.L. (ed), Nueva York, N.Y. Humana Press, 2012)

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

El ARNm transcrito *in vitro* deseado después se purifica de los componentes no deseados de la transcripción o reacciones asociadas (incluyendo los rNTP no incorporados, enzima proteínica, sales, oligómeros de ARN cortos, etc.). Las técnicas para el aislamiento de los transcritos de ARNm son bien conocidas en la técnica. Los procedimientos bien conocidos incluyen la extracción con fenol/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 poli(acrilamida) (Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P. y Williams, L.D. en *RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods* v. 941 Conn G.L. (ed), Nueva York, N.Y. Humana Press, 2012). La purificación puede realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, el Sistema de Aislamiento Total SV (SV Total Isolation System, Promega) y el Kit de Limpieza y Concentración de Transcripción *In Vitro* (*In Vitro* Transcription Cleanup and Concentration Kit, Norgen Biotek).

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

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

Pueden usarse múltiples estructuras de capuchón distintas para generar el capuchón en 5' de ARNm sintético transcrito *in vitro*. La colocación del capuchón en 5' del ARNm sintético puede realizarse cotranscripcionalmente con 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 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 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 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., Slepnev, 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).

En el extremo 3', normalmente se añade una cadena larga de nucleótidos de adenina (cola poli-A) a las moléculas de ARNm durante el procesamiento del ARN. Inmediatamente después de la transcripción, el extremo 3' del transcrito se escinde para liberar un hidroxilo 3' al que la poli-A polimerasa le añade una cadena de nucleótidos de adenina al ARN en un proceso denominado poliadenilación. Se ha demostrado ampliamente que la cola poli-A 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).

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

Además del capuchón 5' y la poli-adenilación 3', se ha publicado que otras modificaciones de las transcritos *in vitro* proporcionan beneficios con respecto a la eficiencia de la traducción y la estabilidad. Es bien sabido en la técnica que el ADN y el ARN patógenos pueden reconocerse mediante una diversidad de sensores dentro de los eucariotas y desencadenan potentes respuestas inmunitarias innatas. Se ha demostrado que la capacidad de discriminar entre el ADN y el ARN patógenos y los propios se basa, al menos en parte, en modificaciones de la estructura y los nucleósidos, puesto que la mayoría de los ácidos nucleicos de fuentes naturales contienen nucleósidos modificados. Por el contrario, el ARN sintetizado *in vitro* carece de estas modificaciones, lo que lo convierte en inmunoestimulador, lo que a su vez puede inhibir la traducción eficaz del ARNm como se ha esbozado anteriormente. La introducción de nucleósidos modificados en el ARNm transcrito *in vitro* puede usarse para impedir el reconocimiento y la activación de los sensores de ARN, mitigando de esta manera esta actividad inmunoestimuladora no deseada y 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 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 transcrito *in vitro* (véase, por ejemplo, el documento US2012/0251618). Se ha publicado que la síntesis *in vitro* de ARNm con nucleósidos modificados ha reducido la capacidad de activar los sensores inmunitarios, con la consiguiente capacidad de traducción potenciada.

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

Además del ARNm, pueden usarse otras cargas útiles de ácido nucleico para 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.: 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).

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:1.7:1.7.1-1.7.16; Rozkov, A., Larsson, B., Gillstrom, S., Bjornstedt, R. y Schmidt, S. R. (2008), *Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. Biotechnol. Bioeng.*, 99: 557-566; y el documento US6197553B1). El aislamiento de los plásmidos puede realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado, incluyendo, pero sin limitación, Plasmid Plus (Qiagen), los kits GenJET plasmid MaxiPrep (Thermo) y PureYield MaxiPrep (Promega), así como con reactivos disponibles en el mercado.

Diversas realizaciones ilustrativas de los lípidos catiónicos de la presente invención, las nanopartículas lipídicas y las composiciones que las comprenden y su uso para 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.

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".

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.

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.

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, transferencias 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, transferencias Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la materia.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un 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, transferencias Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, fluorescencia o luminiscencia de proteínas indicadoras adecuadas, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la materia.

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

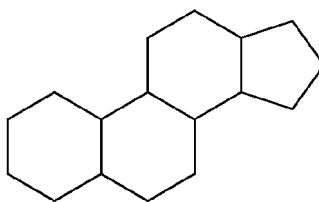
menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria e incluye el ADN, el ARN e híbridos de los mismos. El ADN puede tener la forma de moléculas antisentido, ADN plasmídico, ADNc, productos de PCR o vectores. El ARN puede tener la forma de un ARN en horquilla corto (ARNhc), ARN mensajero (ARNm), ARN antisentido, miARN, micARN, ARN multivalente, ARN sustrato de Dicer o ARN vírico (ARNv), y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de la cadena principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, y que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). A menos que se limite específicamente, la expresión 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 transcrito de ARN o un polipéptido.

El término "lípidos" 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 "esteroide" es un compuesto que comprende la siguiente cadena principal de carbono:



Los ejemplos no limitantes de esteroides incluyen colesterol y similares.

Un "lípidos 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 "lípidos 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 "lípidos 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 "lípidos 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 esteroides y sus derivados. Los lípidos neutros pueden ser sintéticos o de origen natural.

5 La expresión "lípidos cargados" 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, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, hemisuccinatos de colesterol, dialquil trimetilamonio-propanos, (por ejemplo, DOTAP, DOTMA), dialquil dimetilaminopropanos, etil fosfocolinas, dimetilaminoetano carbamoil esteroides (por ejemplo, DC-Col).

15 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.

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

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

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

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

55 "Entrega sistémica", como se usa en el presente documento, se refiere a la entrega de un producto terapéutico que puede dar como resultado una amplia exposición de un agente activo dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden conducir a la entrega sistémica de determinados agentes, pero no de otros. La entrega sistémica significa que una cantidad útil, preferentemente terapéutica, de un agente se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. La entrega sistémica de nanopartículas lipídicas puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, entrega intravenosa, intraarterial, subcutánea e intraperitoneal. En algunas realizaciones, la entrega sistémica de nanopartículas lipídicas es por entrega intravenosa.

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

"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 (alqueno) y/o triples (alquino) enlaces), que tiene, por ejemplo, de uno a veinticuatro átomos de carbono (alquilo C₁-C₂₄), de cuatro a veinte átomos de carbono (alquilo C₄-C₂₀), de seis a dieciséis átomos de carbono (alquilo C₆-C₁₆), de seis a nueve átomos de carbono (alquilo C₆-C₉), de uno a quince átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₅), de uno a doce átomos de carbono (alquilo C₁-C₁₂), de uno a ocho átomos de carbono (alquilo C₁-C₈) o de uno a seis átomos de carbono (alquilo C₁-C₆) y que está unido al resto de la molécula 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.

"Alquilenos" o "cadena de alquilenos" 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 (alqueno) y/o triples (alquino)), y que tiene, por ejemplo, de uno a veinticuatro átomos de carbono (alquilenos C₁-C₂₄), de uno a quince átomos de carbono (alquilenos C₁-C₁₅), de uno a doce átomos de carbono (alquilenos C₁-C₁₂), de uno a ocho átomos de carbono (alquilenos C₁-C₈), de uno a seis átomos de carbono (alquilenos C₁-C₆), de dos a cuatro átomos de carbono (alquilenos C₂-C₄), de uno a dos átomos de carbono (alquilenos C₁-C₂), por ejemplo, metileno, etileno, propileno, n-butileno, etenileno, propenileno, n-butenileno, propinileno, n-butinileno y similares. La cadena de alquilenos está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo o doble y al grupo radical a través de un enlace sencillo o doble. Los puntos de unión de la cadena de alquilenos al resto de la molécula y al grupo radical pueden ser a través de un carbono o cualquiera de dos carbonos en el interior de la cadena.

El término "sustituido" usado en el presente documento significa cualquiera de los grupos anteriores (por ejemplo, alquilo, alquilenos, cicloalquilo o cicloalquilenos) 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 C₁-C₁₂; grupos cicloalquilo; -(C=O)OR'; -

O(C=O)R'; -C(=O)R'; -OR'; -S(O)_xR'; -S-SR'; -C(=O)SR'; -SC(=O)R'; -NR'R'; -NR'C(=O)R'; -C(=O)NR'R'; -NR'C(=O)NR'R'; -OC(=O)NR'R'; -NR'C(=O)OR'; -NR'S(O)_xNR'R'; -NR'S(O)_xR'; y -S(O)_xNR'R', en donde: R' es, en cada aparición, independientemente H, alquilo o cicloalquilo C₁-C₁₅ y x es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, el sustituyente es un grupo alquilo C₁-C₁₂. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo cicloalquilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo halo, tal como fluro. 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').

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

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

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

similares. 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 incorporarse en los compuestos divulgados incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, cloro y yodo, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I y ^{125}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), por ejemplo, aquellos que incorporan un isótopo radioactivo, son útiles en estudios de distribución tisular de fármaco y/o sustrato. Los isótopos radioactivos tritio, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente útiles para este fin en vista de su facilidad de incorporación y de los medios de detección disponibles.

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

La sustitución con isótopos de emisión de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede resultar útil en estudios de Topografía de Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Los compuestos 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.

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 período 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.

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.

"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.

"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.

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

"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 adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido alcanfórico, ácido alcanfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfónico, 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 málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidrox-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 sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiocianico, 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 amoniaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, benetamina, benzatina, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, *N*-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Son bases orgánicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitlohexilamina, 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 predispuesto a la afección pero aún no se le ha diagnosticado;
- (ii) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo;
- (iii) aliviar la enfermedad o afección, es decir, provocar una regresión de la enfermedad o afección; o
- (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 estereoisoméricas 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 asimetría geométrica y, a menos que se especifique otra cosa, se pretende que los compuestos incluyan los isómeros geométricos tanto *E* como *Z*. Análogamente, también se pretende incluir todas las formas tautoméricas.

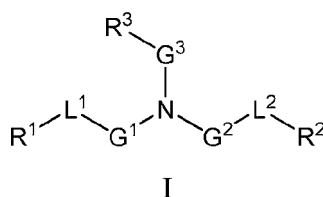
Un "estereoisómero" se refiere a un compuesto constituido por los mismos átomos unidos por los mismos enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables. La presente invención

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, esteroides y/o lípidos conjugados con polímero para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que estas nanopartículas lipídicas protegen a los oligonucleótidos de la degradación en el suero y proporcionan 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):



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

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

G^1 y G^2 son cada uno independientemente alquileo C_1-C_{12} o alquenileo C_1-C_{12} ;

G^3 es alquileo C_1-C_{24} , alquenileo C_1-C_{24} , cicloalquileo C_3-C_8 , cicloalquenileo C_3-C_8 ;

R^a es H o alquilo C_1-C_{12} ;

R^1 y R^2 son cada uno independientemente alquilo C_6-C_{24} o alquenilo C_6-C_{24} ;

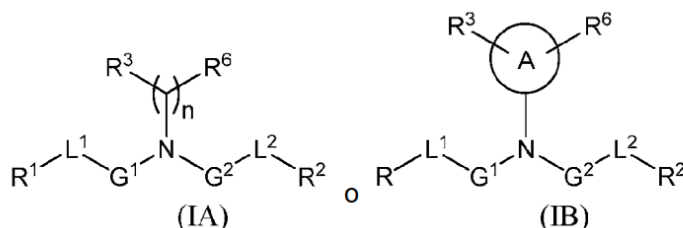
R^3 es H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ o $-NR^5C(=O)R^4$;

R^4 es alquilo C_1-C_{12} ;

R^5 es H o alquilo C_1-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):



en donde:

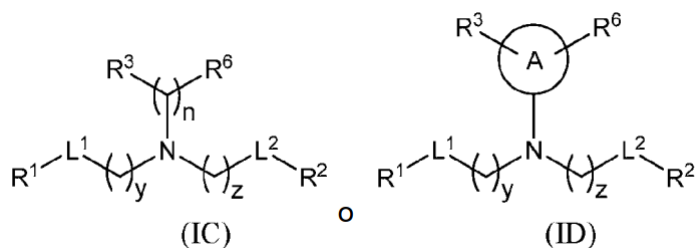
A es un anillo de cicloalquilo o de cicloalquileo de 3 a 8 miembros;

R^6 es, en cada aparición, independientemente H, OH o alquilo C_1-C_{24} ;

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

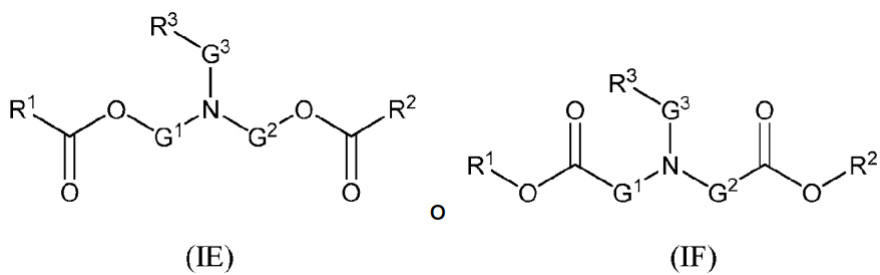
En algunas de las realizaciones anteriores, el compuesto tiene estructura (IA) y, en otras realizaciones, el compuesto tiene estructura (IB).

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):

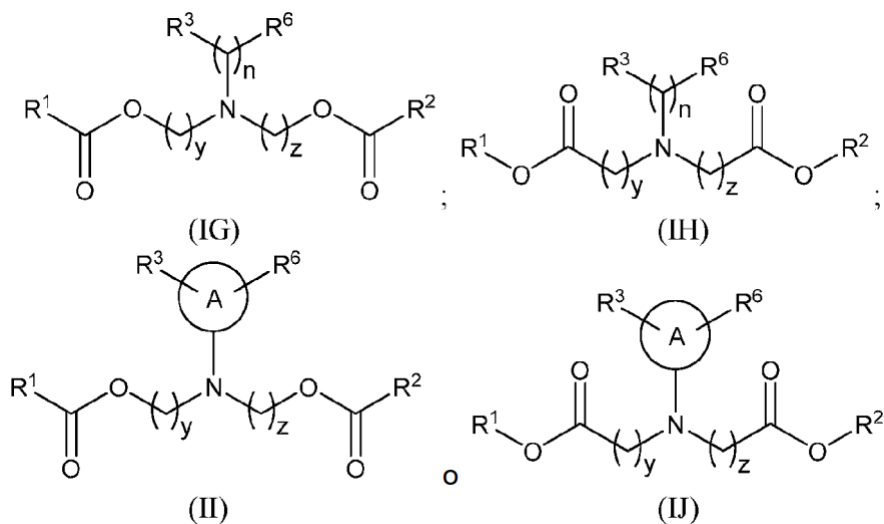


en donde y y z son cada uno independientemente números enteros que varían de 1 a 12.

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



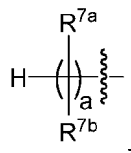
- 20 En algunas de las realizaciones anteriores, n es un número entero que varía de 2 a 12, por ejemplo, de 2 a 8 o de 2 a 4. Por ejemplo, en algunas realizaciones, n es 3, 4, 5 o 6. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, n es 4. En algunas realizaciones, n es 5. En algunas realizaciones, 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, R₆ es H. En otras de las realizaciones anteriores, R₆ es alquilo C₁-C₂₄ (no de acuerdo con la invención). En otras realizaciones, R₆ es OH (no de acuerdo con la invención).

En algunas realizaciones, G^3 no está sustituido. En otras realizaciones, G^3 está sustituido. En diversas realizaciones diferentes, G^3 es alquileo C_1 - C_{24} lineal o alquenilo C_1 - C_{24} lineal.

- 5 En algunas otras realizaciones anteriores, R^1 o R^2 o ambos, es alquenilo C_6 - C_{24} . Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^1 y R^2 cada uno, independientemente tienen la siguiente estructura:



- 10 en donde:

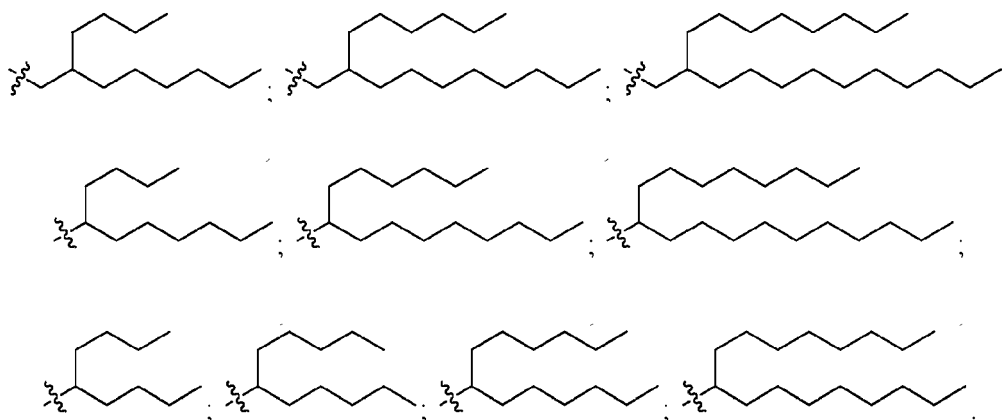
R^{7a} y R^{7b} son, en cada aparición, independientemente H o alquilo C_1 - C_{12} ; y a es un número entero de 2 a 12,

- 15 en donde R^{7a} , R^{7b} y a se selecciona cada uno de tal manera que R^1 y R^2 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^{7a} es H. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{7a} es H en cada aparición. En algunas otras realizaciones diferentes de las anteriores, al menos una aparición de R^{7b} es alquilo C_1 - C_8 . Por ejemplo, en algunas realizaciones, alquilo C_1 - C_8 es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, *terc*-butilo, n-hexilo o n-octilo.

En diferentes realizaciones, R^1 o R^2 o ambos, tiene una de las estructuras siguientes:

25



30

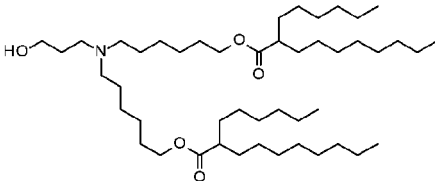
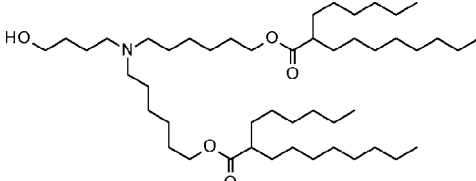
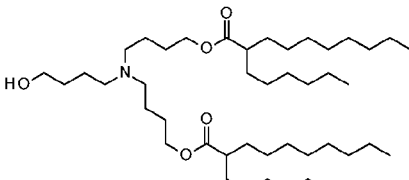
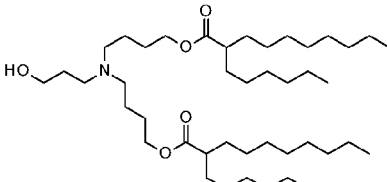
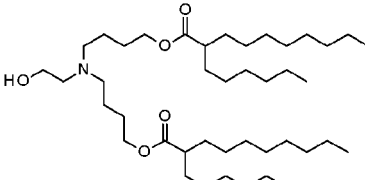
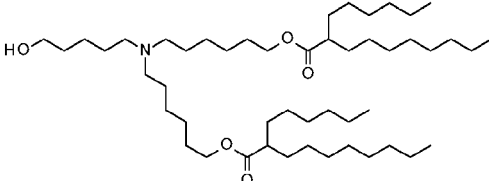
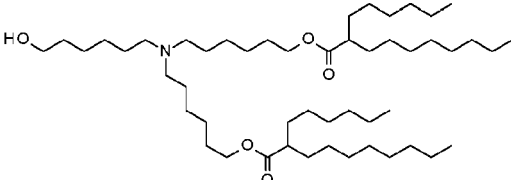
En algunas de las realizaciones anteriores, R^3 es OH, CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ o $-NHC(=O)R^4$. En algunas realizaciones, R^4 es metilo o etilo.

- 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).

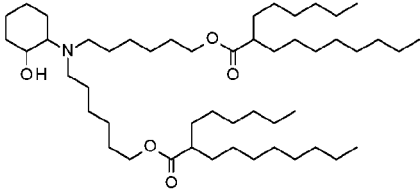
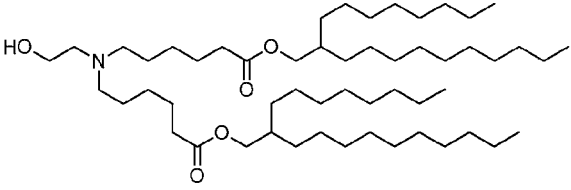
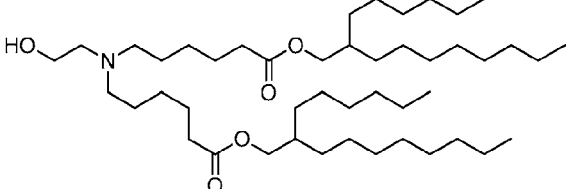
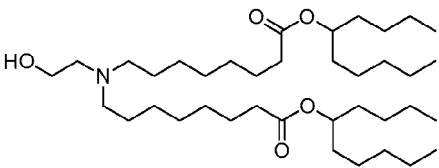
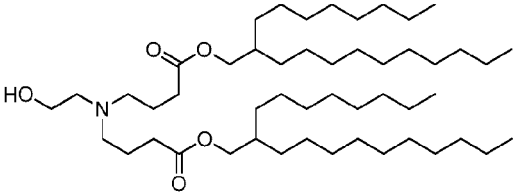
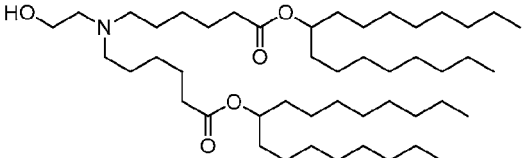
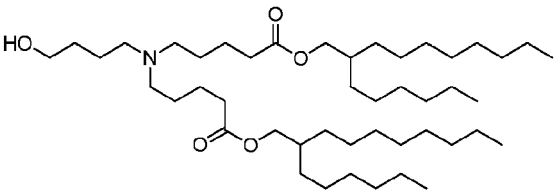
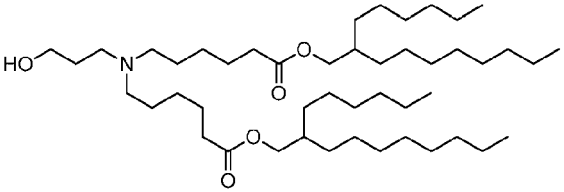
Tabla 1 Compuestos representativos

N.º	Estructura
1	

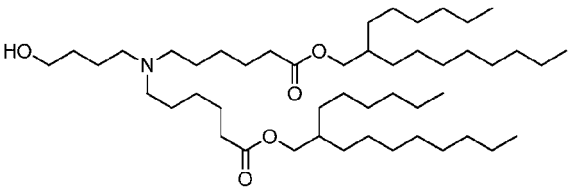
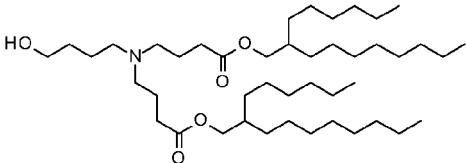
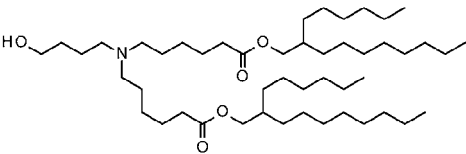
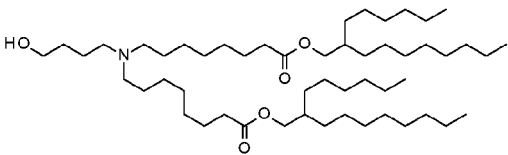
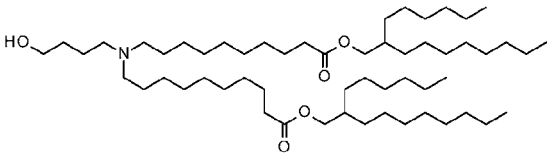
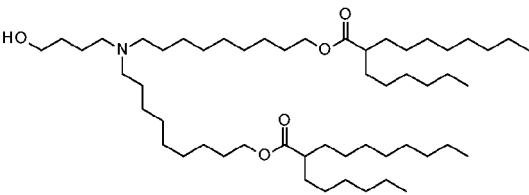
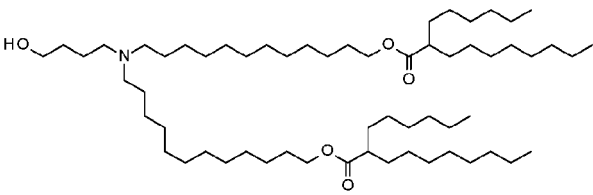
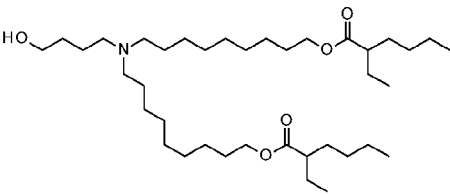
(continuación)

N.º	Estructura
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

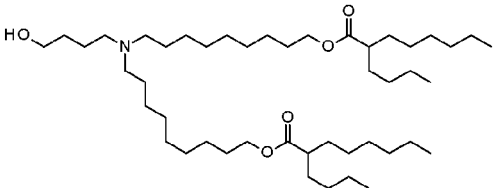
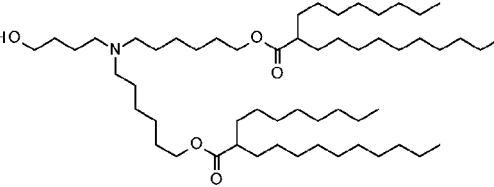
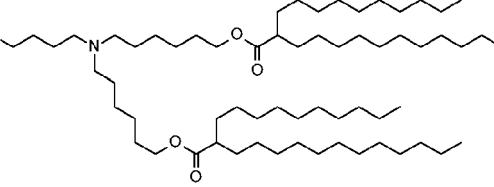
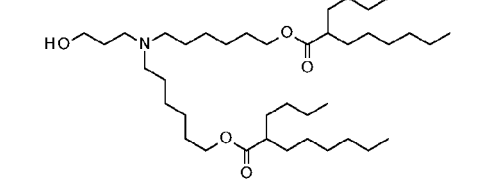
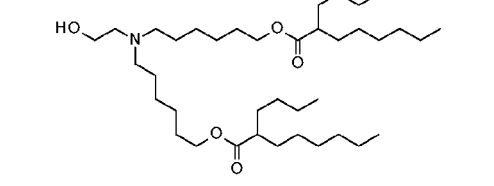
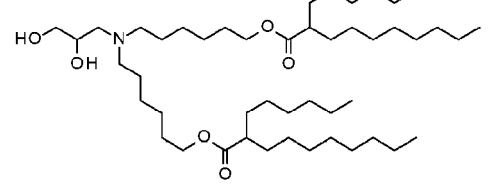
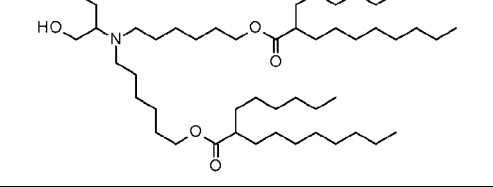
(continuación)

N.º	Estructura
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

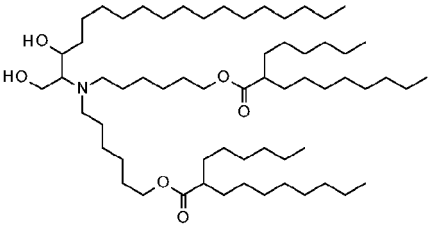
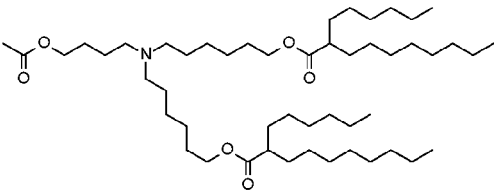
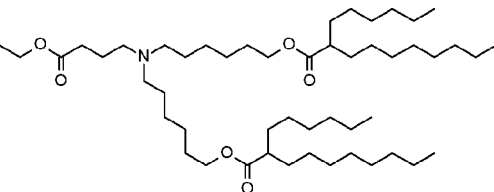
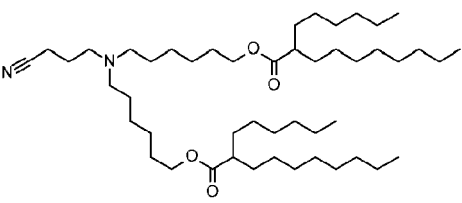
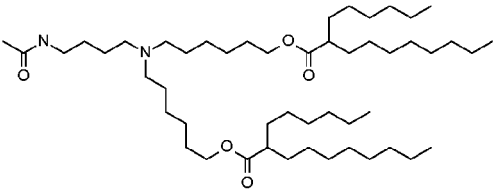
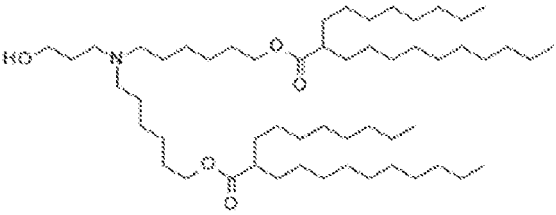
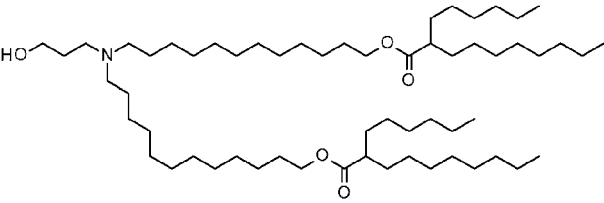
(continuación)

N.º	Estructura
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	

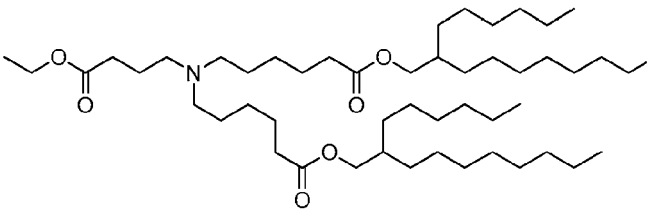
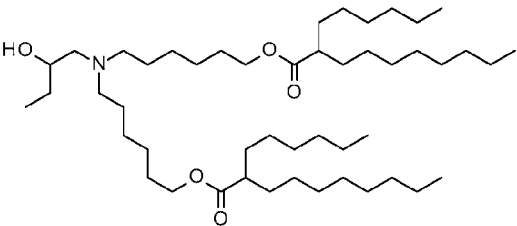
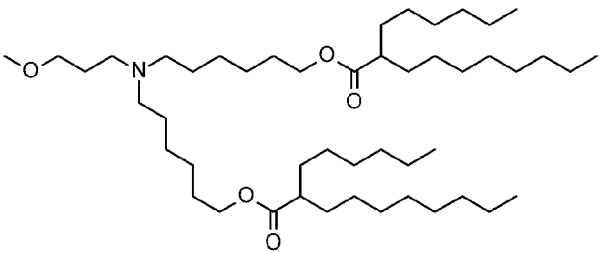
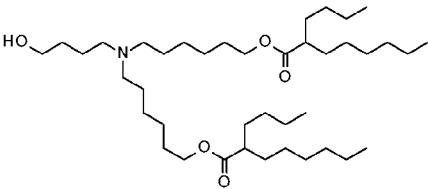
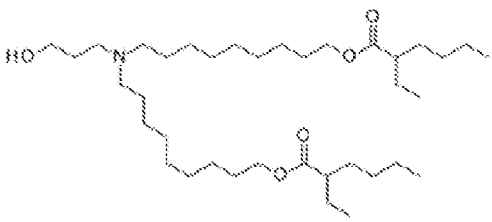
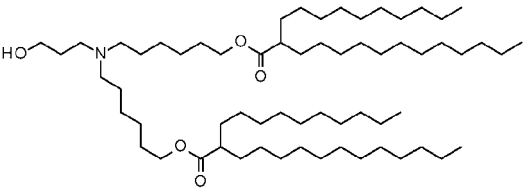
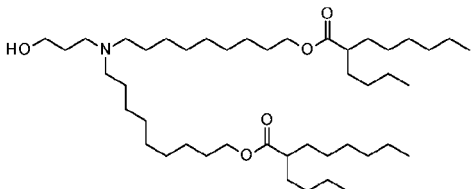
(continuación)

N.º	Estructura
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	

(continuación)

N.º	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. 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.

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

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden uno cualquiera o más de los compuestos de 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, esteroides y lípidos conjugados con polímero. También se incluyen otros excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables en diversas realizaciones de las composiciones.

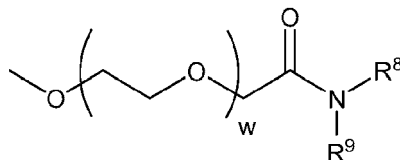
En algunas realizaciones, el lípido neutro se selecciona entre DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE y SM. En algunas realizaciones, el lípido neutro es DSPC. En diversas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido neutro varía de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 8:1.

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

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

DMG), una fosfatidiletanolamina pegilada (PEG-PE), un succinato de PEG diacilglicerol (PEG-S-DAG) tal como 4-O-(2',3'-di(tetradecanoiloxi)propil-1-O-(ω -metoxi(polietoxi)etil)butanodioato (PEG-S-DMG), una ceramida pegilada (PEG-cer) o un dialcoxipropilcarbamato de PEG tal como ω -metoxi(polietoxi)etil-N-(2,3-di(tetradecanoxi)propil)carbamato o 2,3-di(tetradecanoxi)propil-N-(co-metoxi(polietoxi)etil)carbamato. En diversas 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):



(II)

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

R^8 y R^9 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.

En algunas realizaciones, R^8 y R^9 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 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.

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

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.

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*, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición que ha de administrarse, en cualquier caso, contendrá una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección de interés de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

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

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

- 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.

- 20 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.

- 25 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.

- 30 Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyecciones, suero salino, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad 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.

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.

- 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, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol y emulsionantes y estabilizadores. Puede haber presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica de administración tópica. Si está destinada a la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis.

- 50 La composición farmacéutica de la invención puede estar destinada a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio, que se derretirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para la administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Dichas bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.

- 60 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.

- 65 La composición farmacéutica de la invención en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se una al compuesto de la invención y, de este modo, ayude 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.

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.

Las composiciones de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará en función de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del agente terapéutico específico empleado; la estabilidad metabólica y la duración de la acción del agente terapéutico; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el momento de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o afección particular; y el sujeto que se somete a la terapia.

Las composiciones de la invención también pueden administrarse simultáneamente con, antes o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos. Dicha terapia de combinación incluye la administración de una 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.

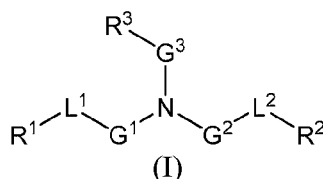
Se describen a continuación en el presente documento métodos de preparación para los compuestos y composiciones anteriores y/o se conocen en la técnica.

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

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

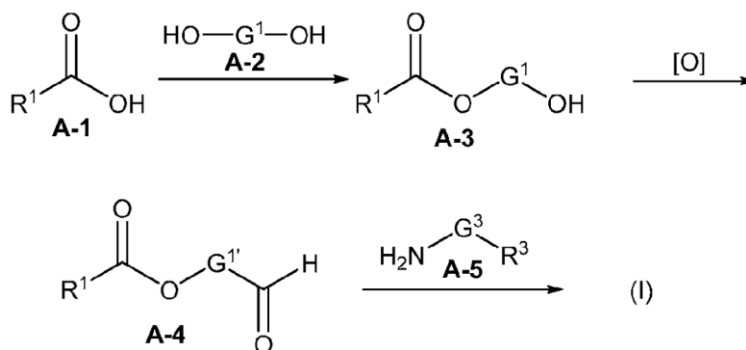
Además, todos los compuestos de la invención que existen en forma de base o ácido libre pueden convertirse en sus sales farmacéuticamente aceptables mediante tratamiento con la base o el ácido inorgánicos u orgánicos adecuados mediante métodos conocidos por un experto en la materia. Las sales de los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

El siguiente Esquema de Reacción 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 R^1 , R^2 , R^3 , L^1 , L^2 , G^1 , G^2 y 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*, 5ª 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). G^1 , G^3 , R^1 y R^3 en el esquema de reacción general 1 son como se define en el presente documento y G^1 se refiere a un homólogo más corto de un carbono de 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 L^1 y 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 G^1 y 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 G^1 y 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).

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 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.

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

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

EJEMPLO 2

DETERMINACIÓN DEL PK_a DE LOS LÍPIDOS FORMULADOS

Como se describe en otra parte, el pK_a de los lípidos catiónicos formulados se correlaciona con la eficacia de las NPL para 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 pK_a es de ~5 a ~7. El pK_a de cada lípido catiónico se determinó en nanopartículas lipídicas usando un ensayo basado en la fluorescencia del ácido 2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfónico (TNS). Se preparan nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos catiónicos/DSPC/colesterol/PEG-lípido (50/10/38,5/1,5 % en moles) en PBS a una concentración de 0,4 mM total. Se preparan lípidos usando el proceso en línea que se describe en el Ejemplo 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 sigmoideo a los datos de fluorescencia y se midió el pK_a como el pH que origina a la intensidad de fluorescencia semimáxima (véase la Figura 2).

EJEMPLO 3

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-poli(etilenglicol))-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

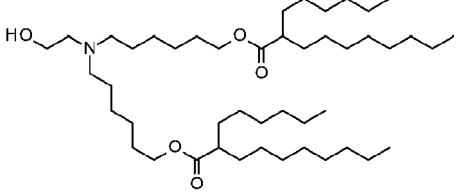
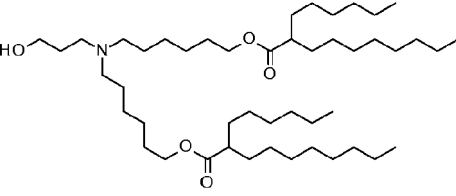
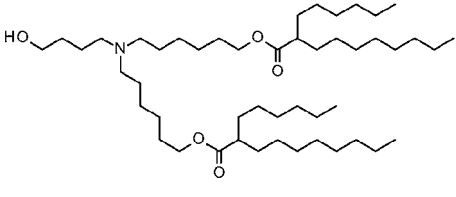
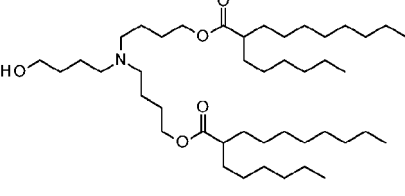
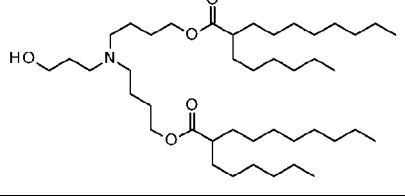
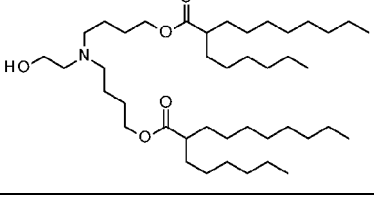
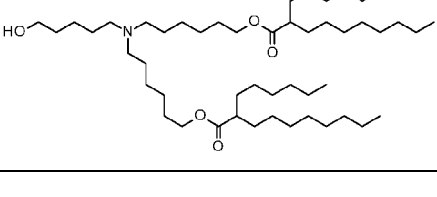
después de la administración, como se describe en el Ejemplo 1.

Tabla 2

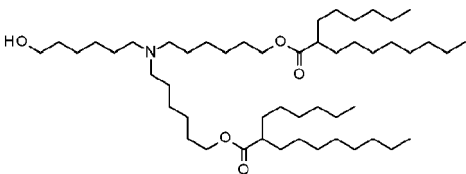
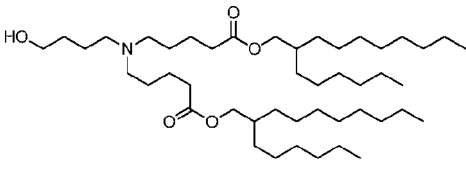
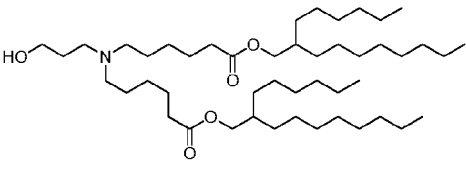
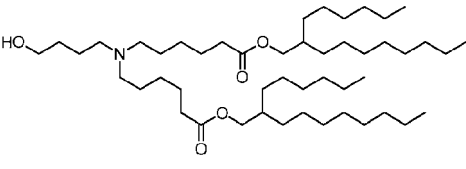
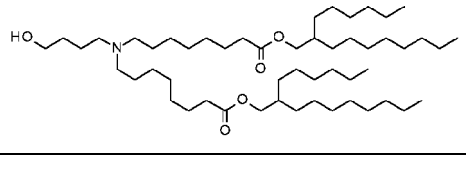
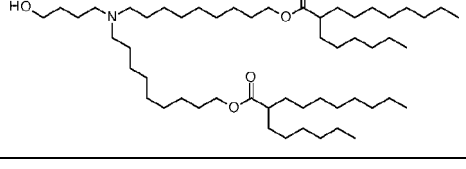
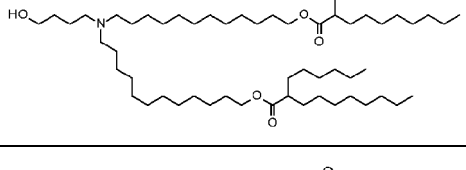
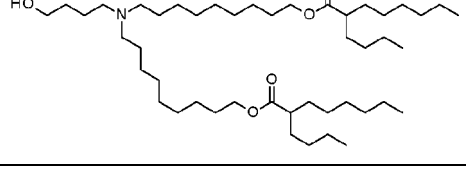
Lípidos comparadores que muestran actividad con ARNm			
Compuesto	Luc de hígado a una dosis de 0,3 mg/kg	Luc de hígado a una dosis de 1,0 mg/kg	Estructura
MC2	4 ± 1	N/D	
DLinDMA	13 ± 3	67 ± 20	
MC4	41 ± 10	N/D	
XTC2	80 ± 28	237 ± 99	
MC3	198 ± 126	757 ± 528	
319 (2 % de PEG)	258 ± 67	681 ± 203	
137	281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

- 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-(ω-metoxi(polietilenglicol₂₀₀₀)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

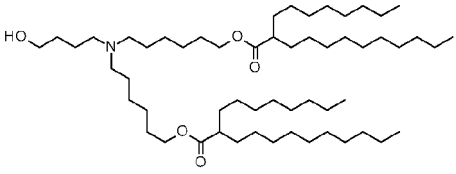
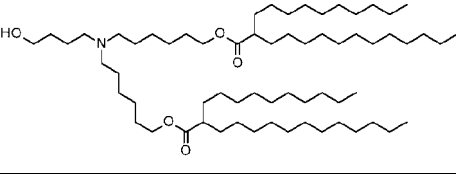
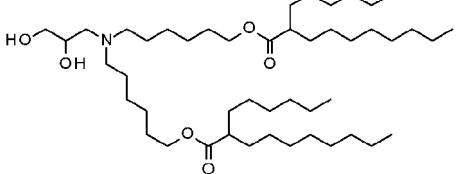
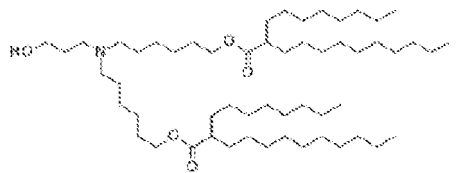
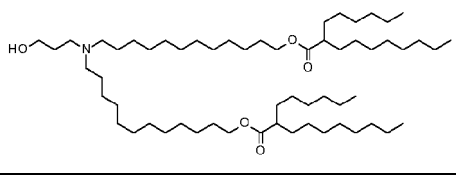
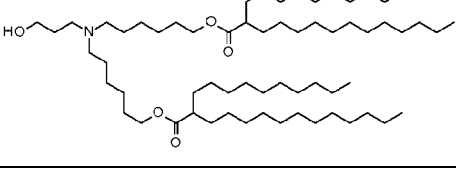
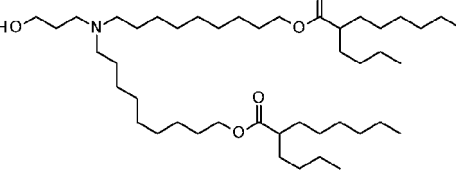
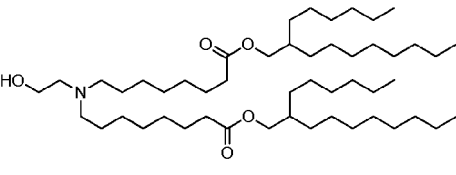
Tabla 3

Lípidos catiónicos novedosos y actividad asociada					
N.º	pK _a	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura	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.º	pK _a	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura	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.º	pK _a	Luc de hígado a 0,3 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Luc de hígado a 1,0 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura	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'-HEXILDECANOILOXI)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'-hexildecanoiloxi)hexan-1-al (24 g) como un aceite incoloro.

EJEMPLO 5

20 SÍNTESIS DE 4-(2'-HEXILDECANOILOXI)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.

30 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'-hexildecanoiloxi)butan-1-al (11 g) como un aceite incoloro.

EJEMPLO 6

SÍNTESIS DE COMPUESTO 1

35 Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)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'-hexildecanoiloxi)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).

EJEMPLO 8

55 SÍNTESIS DE COMPUESTO 3

60 Una solución de 6-(2'-hexildecanoiloxi)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).

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 anhidro, 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, CHCl₃/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-diisopropiletilamina (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 μ l), 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 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) 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).

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 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) 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).

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 μ l), 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 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) 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).

EJEMPLO 23

SÍNTESIS DE COMPUESTO 20

- 50 A una solución de 8-bromooctanoato 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 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) 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).

EJEMPLO 24

SÍNTESIS DE 9-(2'-ETILHEXANOILOXI)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.

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

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.

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

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.

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

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.

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'-DECILTETRADECANOILOXI)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).

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'-HEXILDECANOILOXI)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.

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'-HEXILDECANOILOXI)NONAN-1-AL

35 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.

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

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
10 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
20 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

- 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,
30 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

- 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
40 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).

EJEMPLO 36

SÍNTESIS DE COMPUESTO 27

- 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
50 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).

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
65 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
10 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
20 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

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,
30 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

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
40 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).

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
50 0 al 3,5 %). Esto dio el compuesto 39 como un aceite incoloro (334 mg, 0,41 mmol, 43 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) 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

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
65 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).

EJEMPLO 45

SÍNTESIS DE COMPUESTO 42

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

Una solución de 9-(2'-etilhexanoiloxi)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 (2-0/0-8/98-94 %). Las fracciones puras se lavaron con solución acuosa de bicarbonato de sodio, produciendo compuesto 43 en forma de un aceite incoloro (1,01 g).

35

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).

45

EJEMPLO 48

SÍNTESIS DE COMPUESTO 45

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).

55

EJEMPLO 49

60

SÍNTESIS DE COMPUESTO 46

A una solución de 2-aminoetanol (96,5 mg, 1,58 mmol, 95,4 μ l, 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

65

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 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,09-4,06 (m, 2H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 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, 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 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).

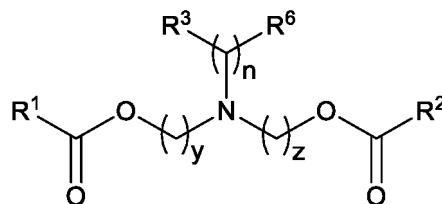
30 EJEMPLO 52

SÍNTESIS DE COMPUESTO 49

A una solución de 8-bromooctanoato de 2-butiloctilo (2 eq, 1,877 g, 4,8 mmol) en 20 ml de THF anhidro, se 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 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 %). RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) 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)

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

R¹ y R² son cada uno independientemente alquilo C₆-C₂₄ o alquenoilo C₆-C₂₄;

R³ es OR⁵, CN, -C(=O)OR⁴, -OC(=O)R⁴ o -NR⁵C(=O)R⁴;

R⁴ es alquilo C₁-C₁₂;

R⁵ es H o alquilo C₁-C₆;

R⁶ es, en cada aparición, H;

n es un número entero que varía de 2 a 12; e

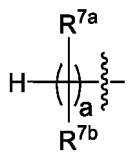
y y z son cada uno independientemente un número entero que varía de 6 a 9.

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 R¹ o R² o ambos, es alquenoilo C₆-C₂₄.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde R¹ o R² o ambos, es alquilo C₆-C₂₄.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde R¹ y R² cada uno independientemente tiene la siguiente estructura:



en donde:

R^{7a} y R^{7b} son, en cada aparición, independientemente H o alquilo C₁-C₁₂; y

a es un número entero de 2 a 12, preferentemente de 8 a 12,

en donde R^{7a}, R^{7b} y a se selecciona cada uno de tal manera que R¹ y R² cada uno comprende independientemente de 6 a 20 átomos de carbono.

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

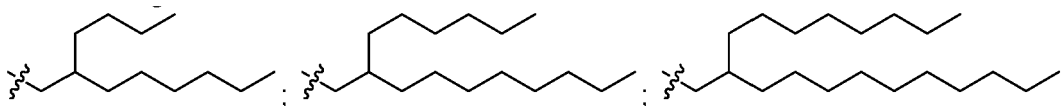
a) al menos una aparición de R^{7a} es H; o

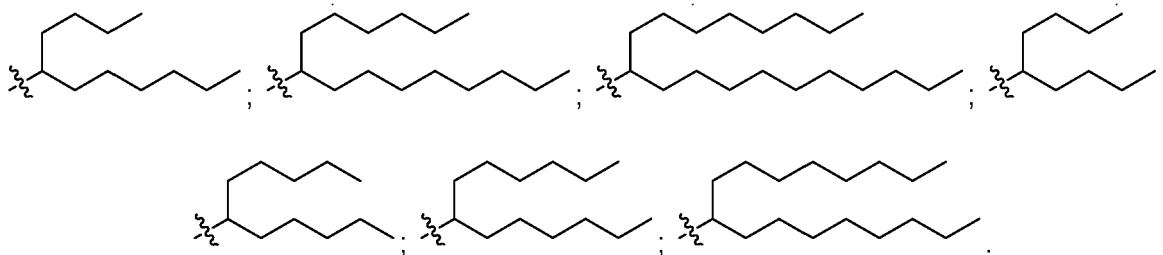
b) R^{7a} es H en cada aparición; o

c) al menos una aparición de R^{7b} es alquilo C₁-C₈; o

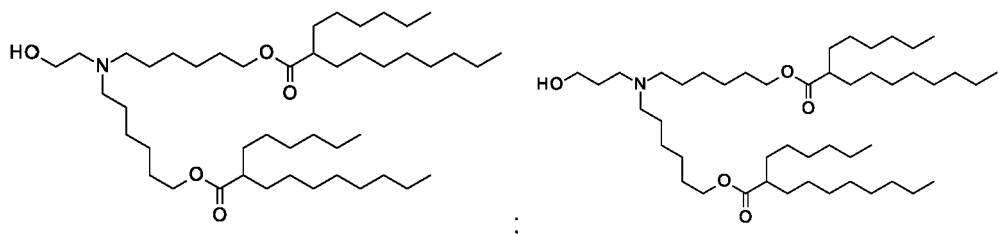
d) al menos una aparición de R^{7b} es alquilo C₁-C₈ y alquilo C₁-C₈ es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, *terc*-butilo, n-hexilo o n-octilo.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde R¹ o R² o ambos, tiene una de las estructuras siguientes:

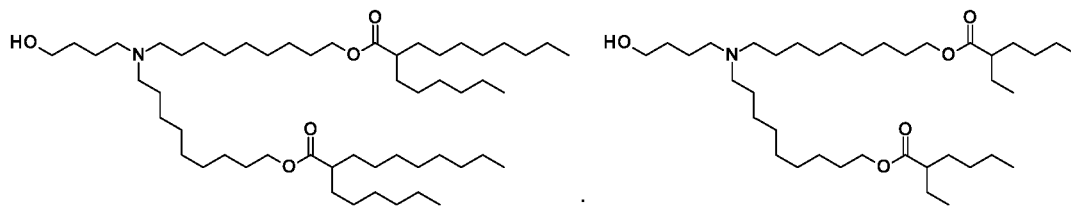
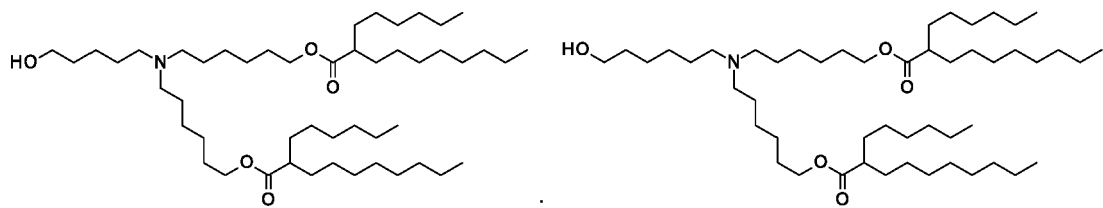
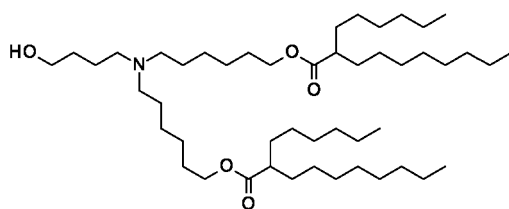




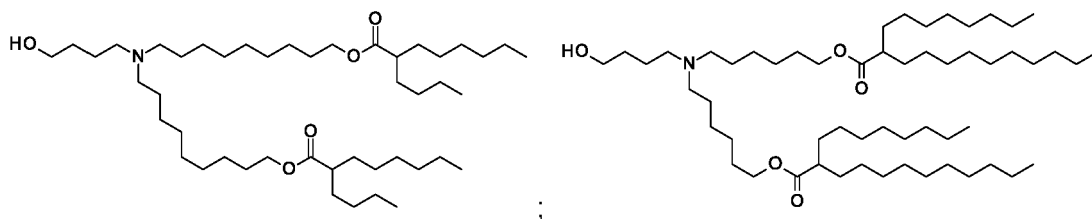
- 5 8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde R^3 es OH.
9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde:
- a) R^3 es CN; o
- 10 b) R^3 es $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ o $-NHC(=O)R^4$, preferentemente en donde R^4 es metilo o etilo.
10. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene una de las estructuras siguientes:

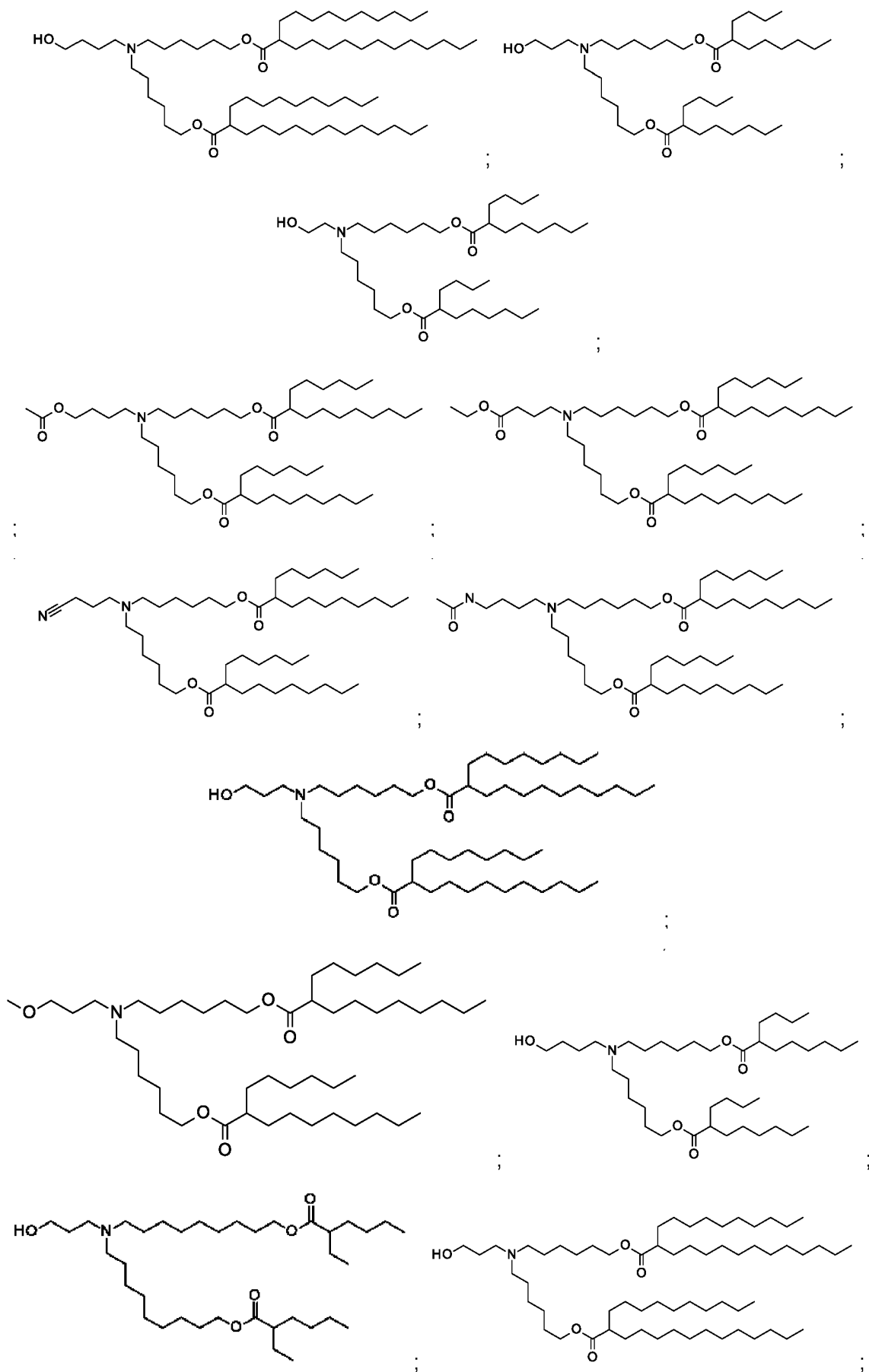


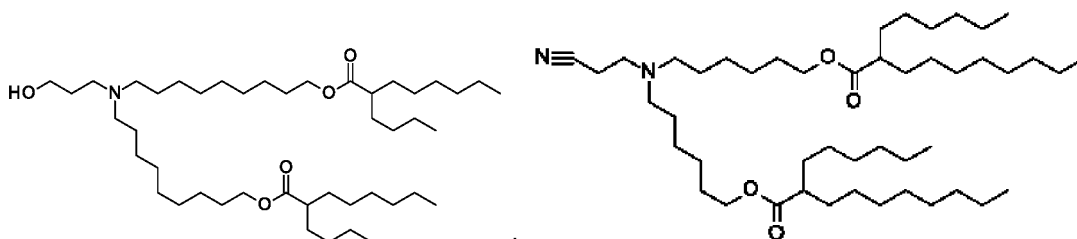
15



20

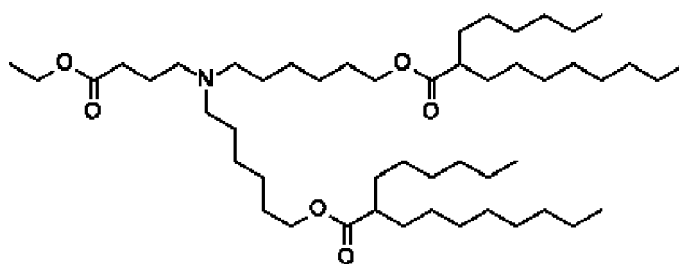






o

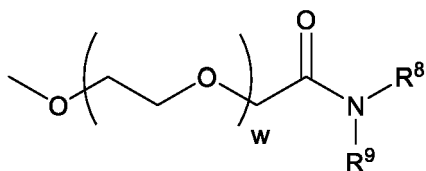
5



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.

10

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



(II)

15

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

R⁸ y R⁹ 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

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

25

- a) R⁸ y R⁹ 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.

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 antisense y ARN mensajero.

30

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.

35

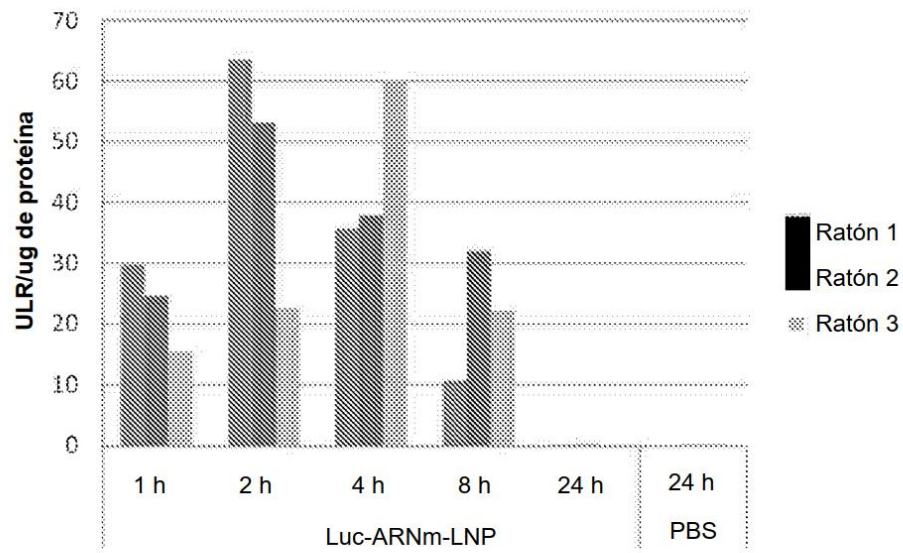


Figura 1

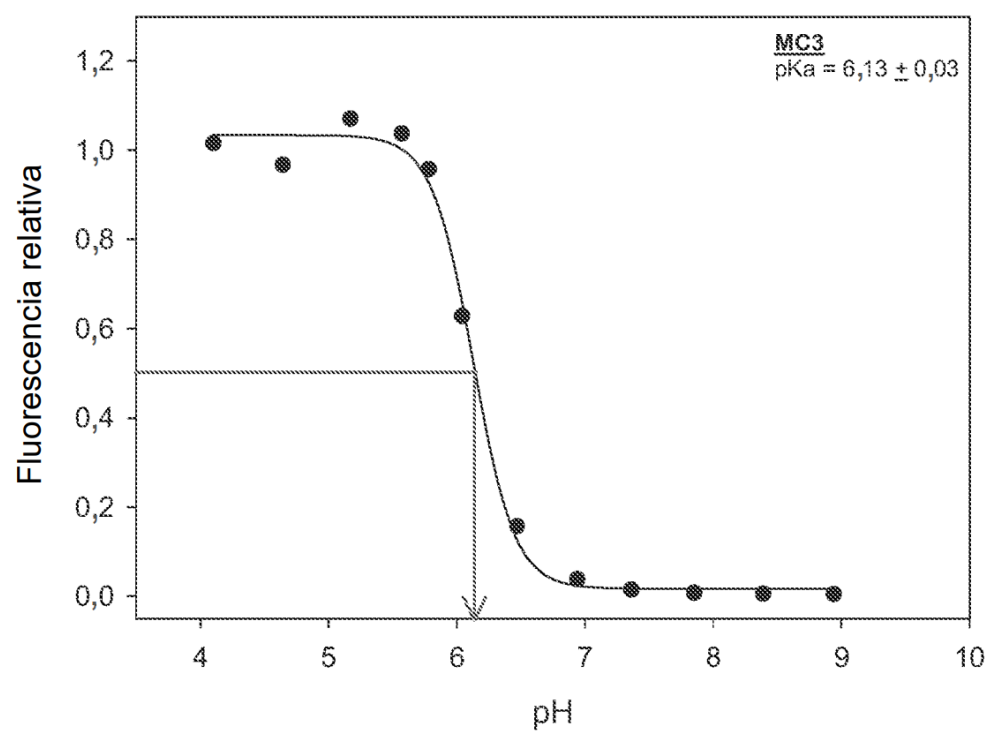
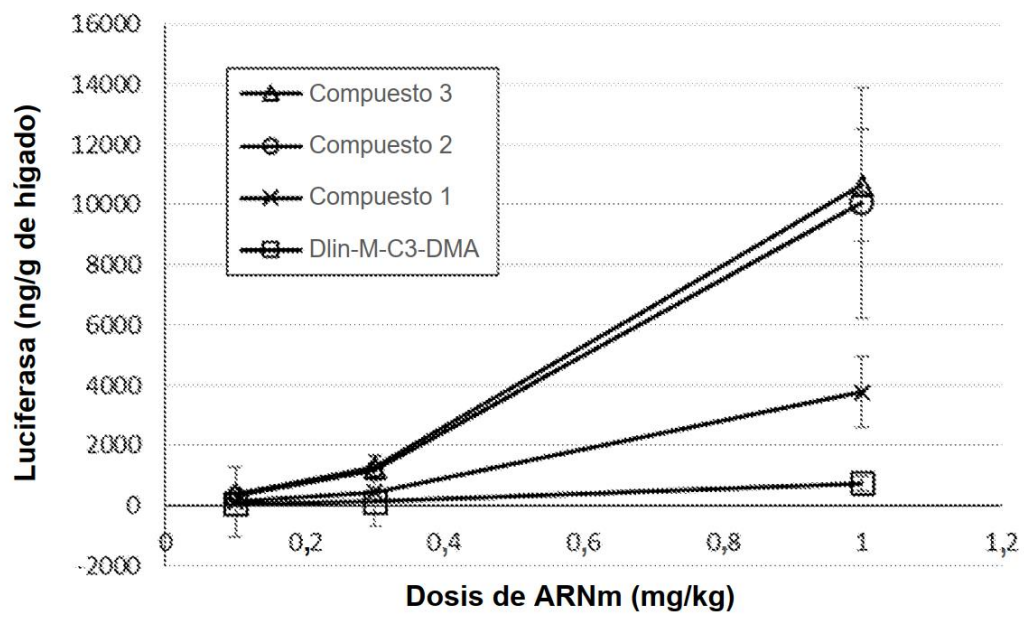


Figura 2

*Figura 3*