

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 124**

51 Int. Cl.:

C07C 229/24 (2006.01)
C07C 233/36 (2006.01)
C07C 233/47 (2006.01)
C07C 237/06 (2006.01)
C07C 237/08 (2006.01)
A61K 31/164 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2018** **PCT/US2018/000284**
87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2019** **WO19036000**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2018** **E 18780258 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** **EP 3668834**

54 Título: **Lípidos para su uso en formulaciones de nanopartículas lipídicas**

30 Prioridad:

17.08.2017 US 201762546887 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2025

73 Titular/es:

ACUITAS THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
6190 Agronomy Road Suite 402 University of
British Columbia - KETR
Vancouver, British Columbia V6T 1W5, CA

72 Inventor/es:

DU, XINYAO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 997 124 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 para su uso en formulaciones de nanopartículas lipídicas

5 **Campo técnico**

Las realizaciones de la presente invención se refieren en general a novedosos lípidos que pueden usarse en combinación con otros componentes lipídicos, tales como lípidos neutros, colesterol y lípidos conjugados con polímeros, para formar nanopartículas lipídicas para la administración de agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos (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 administración 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, p. ej., ARN mensajero (ARNm), oligonucleótidos de sentido contrario, ribozimas, ADNzimas, plásmidos, ácidos nucleicos inmunoestimuladores, antagomir, antimir, mimético, supermir y aptámeros. Algunos ácidos nucleicos, tales como el ARNm o los plásmidos, pueden usarse para efectuar la expresión de productos celulares específicos como sería útil en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades relacionadas con una deficiencia de una proteína o enzima. Las aplicaciones terapéuticas del suministro de nucleótidos traducibles son sumamente amplias, ya que pueden sintetizarse construcciones para producir cualquier secuencia de proteína elegida, sea o no autóctona del sistema. Los productos de expresión del ácido nucleico pueden aumentar los niveles existentes de proteína, reemplazar las versiones faltantes o no funcionales de una proteína, o introducir una nueva proteína y funcionalidad asociada en una célula u organismo.

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

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

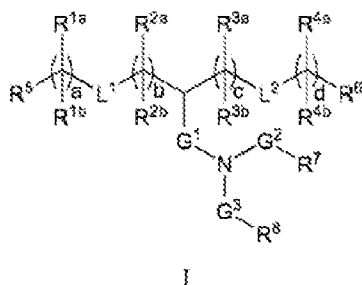
Sin embargo, actualmente se enfrenta a dos problemas el uso de oligonucleótidos en contextos terapéuticos. En primer lugar, los ARN libres son susceptibles de digestión por nucleasas en el plasma. En segundo lugar, los ARN libres tienen una capacidad limitada para acceder al compartimento intracelular donde reside la maquinaria de traducción pertinente. Se han usado nanopartículas lipídicas formadas a partir de lípidos 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. Los lípidos útiles para el suministro de productos terapéuticos se conocen a partir del documento US 2016/376224, el documento WO 2016/176330, el documento WO 2014/153163, el documento WO 2013/059496, el documento WO2011/075656 y el documento WO 2017/075531.

Sigue existiendo la necesidad de lípidos catiónicos y nanopartículas lipídicas mejorados para el suministro de oligonucleótidos. Preferentemente, estas nanopartículas lipídicas proporcionarían relaciones fármaco:lipido óptimas, protegerían el ácido nucleico de la degradación y el aclaramiento en suero, serían adecuadas para la administración sistémica o local y proporcionarían una administración intracelular del ácido nucleico. De manera adicional, estas partículas de lipido-ácido nucleico deben ser bien toleradas y proporcionar un índice terapéutico adecuado, de tal 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.

Breve resumen

La materia objeto de la invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto de la invención se refiere a un compuesto que tiene una estructura de Fórmula I:



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

L^1 y L^2 son cada uno independientemente $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ o un enlace directo;

G^1 es $-(C=O)-$ o un enlace directo;

G^2 es un enlace directo;

G^3 es alquileo C_2-C_5 ;

R^{1a} y R^{1b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{1a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

R^{2a} y R^{2b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{2a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{2b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

R^{3a} y R^{3b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{3a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{3b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{3b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

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

R^5 y R^6 son cada uno independientemente H o metilo;

R^7 es alquilo C_1-C_2 ;

R^8 es OH; y

a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 4 a 12.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende el compuesto de la invención y:

i) un agente terapéutico;

ii) un agente terapéutico que comprende un ácido nucleico; o

iii) un agente terapéutico que comprende un ácido nucleico seleccionado de ARN antisentido y ARN mensajero.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso en un método para administrar el agente terapéutico a un paciente que lo necesita.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una nanopartícula lipídica que comprende un compuesto de la invención.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula lipídica de la invención y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente especificación divulga y proporciona compuestos lipídicos, incluyendo estereoisómeros, sales

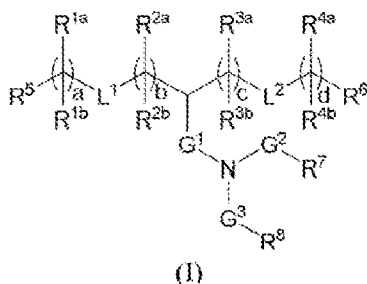
farmacéuticamente aceptables, profármacos o tautómeros de los mismos, que pueden usarse solos o en combinación con otros componentes lipídicos tales como lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides (incluyendo, por ejemplo, todos los esteroides) y/o sus análogos, y/o lípidos conjugados con polímeros para formar nanopartículas lipídicas para el suministro de agentes terapéuticos. Los compuestos lipídicos son de acuerdo con la invención en la medida en que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones. En algunos casos, las nanopartículas lipídicas se usan para suministrar ácidos nucleicos tales como ARN antisentido v/o mensajero. <insertar página 3a>

Los lípidos de la presente divulgación que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones se desvelan únicamente con fines ilustrativos.

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.

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.

En una realización, se divulgan compuestos que tienen la siguiente estructura (I):



o una sal, tautómero, profármaco o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, L¹, L², G¹, G², G³, a, b, c y d son como se definen en el presente documento. Los compuestos son de acuerdo con la invención en la medida en que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos anteriores de estructura (I) y un agente terapéutico. También se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) que comprenden uno o más compuestos de estructura (I). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y/o LNP comprenden además uno o más componentes seleccionados de lípidos neutros, lípidos cargados, esteroides y lípidos conjugados con polímero. Las composiciones divulgadas son útiles para la formación de nanopartículas lipídicas para el suministro del agente terapéutico. En otras realizaciones, se describe 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 suministrar la composición al paciente. En algunas realizaciones el método para administrar un agente terapéutico a un paciente que lo necesita comprende administrar un LNP que comprende uno o más compuestos de estructura (I) y el agente terapéutico al paciente.

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

Descripción detallada

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

Las realizaciones de la presente invención se basan, en parte, en el descubrimiento de lípidos novedosos que proporcionan ventajas cuando se usan en nanopartículas lipídicas para el suministro *in vivo* de un principio activo o agente 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 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. Por ejemplo, las realizaciones proporcionan una nanopartícula lipídica que comprende uno o más compuestos de estructura (I).

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

Las nanopartículas lipídicas y las composiciones de las realizaciones de la presente invención pueden usarse para una diversidad de fines, incluyendo el suministro de agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos, encapsulados o asociados (por ejemplo, formando complejos) a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, las realizaciones de la presente invención 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 novedosos descritos en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, las realizaciones de las nanopartículas lipídicas de la presente invención son particularmente útiles para el suministro de ácidos nucleicos, incluyendo, p. ej., 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 lo tanto, las nanopartículas lipídicas y las composiciones de las realizaciones de la presente invención pueden usarse para inducir la expresión de una proteína deseada tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos 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 realizaciones de la presente invención pueden usarse para disminuir la expresión de genes diana y proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos novedosos (por ejemplo, un compuesto de estructura (I)) descritos en el presente documento, en donde la nanopartícula lipídica encapsula o se asocia a un ácido nucleico que reduce la expresión de genes diana (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido o ARN de interferencia pequeño (ARNip)). Las nanopartículas lipídicas y las composiciones de realizaciones de la presente invención también pueden usarse para la administración 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 realizaciones de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con cualquier técnica disponible. Para el ARNm, la metodología primaria de preparación es, aunque 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 no limitado a la del colífago 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, aunque 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 y 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).

Se produce la transcripción del ARN *in vitro* usando el molde de ADN linealizado en presencia de la correspondiente ARN polimerasa y adenosina, guanosina, uridina y citidina ribonucleósido trifosfatos (rNTP) en condiciones que apoyan la actividad de la polimerasa y al mismo tiempo minimizan la degradación potencial 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, p. ej., Losick, R., 1972, *In vitro transcription*, *Ann Rev Biochem* v.41 409-46; Kamakaka, R. T. y Kraus, W. L. 2001. *In Vitro Transcription. Current Protocols in Cell Biology*. 2:11.6:11.6.1-11.6.17; Beckert, B. y Masquida, B., (2010) *Synthesis of RNA by In Vitro Transcription in RNA in Methods in Molecular Biology* v. 703 (Neilson, H. Ed), Nueva

York, N. Y. Humana Press, 2010; Brunelle, J.L. y Green, R., 2013, Capítulo cinco - *In vitro transcription from plasmid or PCR-amplified DNA*, *Methods in Enzymology* v. 530, 101-114).

El ARNm transcrito *in vitro* deseado después se purifica de los componentes no deseados de la transcripción o reacciones asociadas (incluyendo los rNTP no incorporados, enzima proteínica, sales, oligos de ARN cortos, etc.). Las técnicas para el aislamiento de los transcritos de ARNm son bien conocidas en la técnica. Los procedimientos bien conocidos incluyen la extracción con fenol/cloroformo o la precipitación con alcohol (etanol, isopropanol) en presencia de cationes monovalentes o cloruro de litio. Adicionalmente, los ejemplos no limitantes de procedimientos de purificación que pueden usarse incluyen cromatografía de exclusión por tamaño (Lukavsky, P.J. y Puglisi, J.D., 2004, *Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides*, *RNA* v.10, 889-893), cromatografía de afinidad a base de sílice y electroforesis en gel de poliácridamida (Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P. y Williams, L.D. en *RNA in vitro transcription y 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).

Por otra parte, 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 lo 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, p. ej., 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 lo tanto, los niveles más altos de expresión de proteínas se consiguen con transcritos 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 capuchón 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 mejora tanto la eficiencia traduccional como la estabilidad del ARNm (véanse Bernstein, P. y Ross, J., 1989, *Poly (A), poly (A) binding protein and the regulation of mRNA stability*, *Trends Bio Sci* v. 14 373-377; Guhaniyogi, J. y Brewer, G., 2001, *Regulation of mRNA stability in mammalian cells*, *Gene*, v. 265, 11-23; Dreyfus, M. y Regnier, P., 2002, *The poly (A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria*, *Cell*, v.111, 611-613).

La cola poli (A) del ARNm transcrito *in vitro* puede conseguirse usando diversos enfoques, incluyendo, aunque 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 mMMESSAGE 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 los transcritos *in vitro* proporcionan beneficios con respecto a la eficiencia de la traducción y la estabilidad. Es bien sabido en la técnica que el ADN y el ARN patógenos pueden reconocerse mediante una diversidad de sensores dentro de los eucariotas y desencadenan potentes respuestas inmunitarias innatas. Se ha demostrado que la capacidad de discriminar entre el ADN y el ARN patógenos y los propios se basa, al menos en parte, en modificaciones de la estructura y los nucleósidos, puesto que la mayoría de los ácidos nucleicos de fuentes naturales contienen nucleósidos modificados. Por el contrario, el ARN sintetizado *in vitro* carece de estas modificaciones, lo que lo convierte en inmunoestimulador, lo que a su vez puede inhibir la traducción eficaz del ARNm como se ha esbozado anteriormente. La introducción de nucleósidos modificados en el ARNm 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 in *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 in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013).

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

Para el ADN plasmídico, la preparación para su uso con realizaciones de la presente invención utiliza 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*. 41:11.1.7.1-1.7.16; Rozkov, A., Larsson, B., Gillstrom, S., Björnstedt, 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 de la presente divulgación, las nanopartículas lipídicas y las composiciones que las comprenden y su uso para suministrar principios activos (por ejemplo, agentes terapéuticos), tales como ácidos nucleicos, para modular la expresión de genes y proteínas, se describen con más detalle a continuación.

Como se usa 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, aunque 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. Por otra parte, 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. A la expresión del gen diana en una muestra de control o un mamífero de control se le puede asignar un valor del 100 %. En realizaciones particulares, el silenciamiento, la inhibición o la reducción de la expresión de un gen diana se consigue cuando el nivel de expresión de un gen diana en la muestra de ensayo o el mamífero de ensayo con respecto al nivel de expresión de un gen diana en la muestra de control o el mamífero de control es de aproximadamente el 95 %, el 90 %, el 85 %, el 80 %, el 75 %, el 70 %, el 65

%, el 60 %, el 55 %, el 50 %, el 45 %, el 40 %, el 35 %, el 30 %, el 25 %, el 20 %, el 15 %, el 10 %, el 5 % o el 0 %. En otras palabras, los ácidos nucleicos son capaces de silenciar, reducir o inhibir la expresión de un gen diana en al menos aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % en una muestra de ensayo o un mamífero de ensayo con respecto al nivel de expresión del gen diana en una muestra de control o un mamífero de control que no se ponen en contacto o a los que no se les administra el ácido nucleico. Los ensayos adecuados para determinar el nivel de expresión de genes diana incluyen, sin limitación, el examen de los niveles de proteína o ARNm usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como, p. ej., 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, p. ej., 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.

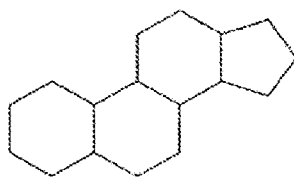
La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria e incluye el ADN, el ARN e híbridos de los mismos. El ADN puede tener la forma de moléculas antisentido, 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. Salvo que se indique lo contrario, 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, pueden conseguirse 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, aunque 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.

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

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

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

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

- 35 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 suministrar un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) a un sitio de interés (por ejemplo, una célula, tejido, órgano, tumor y similares). En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas de la invención comprenden un ácido nucleico. Tales nanopartículas lipídicas normalmente comprenden un compuesto de 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, tal 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.

- 50 En diversas realizaciones, las nanopartículas lipídicas tienen un diámetro promedio 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 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. Las nanopartículas lipídicas que comprenden ácidos nucleicos y su método de preparación se divulgan en, p. ej., las Publicaciones de Patente de EE.UU. N.º 2004/0142025, 2007/0042031 y las Pub. PCT. N.º WO 2017/004143, WO 2015/199952, WO 2013/016058 y WO 2013/086373

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.

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

10 "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.

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

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

30 "Alquilo" se refiere un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que está saturado, 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 uno a veinte átomos de carbono (alquilo C₁-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 sencillo, p. ej., metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletil (t-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo.

40 "Alquilenos" o "cadena 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, 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 cuatro a seis átomos de carbono (alquilenos C₄-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. La cadena alquilenos está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo y al grupo radical a través de un enlace sencillo. 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.

50 "Ariolo" se refiere a un radical de sistema anular carbocíclico que comprende hidrógeno, de 6 a 18 átomos de carbono y al menos un anillo aromático. Para los fines de la presente invención, el radical ariolo es un sistema anular monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados o puenteados. Los radicales ariolo incluyen, pero sin limitación, radicales ariolo derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenaftileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, fenaleno, fenantreno, pleiadenos, pireno y trifenileno. Salvo que se indique lo contrario específicamente en la memoria descriptiva, el término "ariolo" o el prefijo "ar-" (tal como en "aralquilo") pretende incluir radicales ariolo que están opcionalmente sustituidos.

60 "Aralquilo" se refiere a un radical de fórmula -R_b-R_c donde R_b es una cadena de alquilenos o alquilenos como se ha definido anteriormente y R_c es uno o más radicales ariolo como se han definido anteriormente, por ejemplo, bencilo, difenilmetilo. Salvo que se indique lo contrario específicamente en la memoria descriptiva, un grupo aralquilo está opcionalmente sustituido.

El término "sustituido" usado en el presente documento significa cualquiera de los grupos anteriores (por ejemplo, alquilalquilenos, ariolo y aralquilo), en donde al menos un átomo de hidrógeno está reemplazado por un enlace a un átomo distinto de hidrógeno tal como, aunque sin limitación: 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'; -NRC(=O)NR'R'; -OC(=O)NR'R'; -

NR'C(=O)OR'; -NR'S(O)_xNR'R'; -NR'S(O)_xR'; y -S(O)_xNR'R', en donde: R' es, en cada aparición, independientemente H, alquilo o cicloalquilo C₁-C₁₅ y x es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, el sustituyente es un grupo alquilo C₁-C₁₂. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo cicloalquilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo halo, tal como fluoro. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo oxo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo hidroxilo. En otras realizaciones, el sustituyente es un grupo alcoxi (-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 estructura (I). Por tanto, el término "profármaco" se refiere a un precursor metabólico de un compuesto de estructura (I) que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede estar inactivo cuando se administra a un sujeto que lo necesita, pero se convierte *in vivo* en un compuesto activo de estructura (I). Los profármacos normalmente se transforman rápidamente *in vivo* para producir el compuesto original de estructura (I), 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), págs. 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 estructura (I) *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de un compuesto de estructura (I) pueden prepararse modificando grupos funcionales presentes en el compuesto de estructura (I) de tal manera que las modificaciones se escindan, ya sea por manipulación rutinaria o *in vivo*, en el compuesto original de estructura (I). Los profármacos incluyen compuestos de estructura (I) en donde un grupo hidroxilo, amino o mercapto está unido a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto de estructura (I) 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 estructura (I). Los profármacos no forman parte de la invención reivindicada.

Las realizaciones de la invención divulgada en el presente documento también pretenden abarcar todos los compuestos farmacéuticamente aceptables del compuesto de Fórmula (I) que están marcados isotópicamente teniendo uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferentes. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos divulgados incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, cloro y yodo, tales como ²H, ³H, ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹³N, ¹⁵N, ¹⁵O, ¹⁷O, ¹⁸O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶Cl, ¹²³I y ¹²⁵I, respectivamente. Estos compuestos radiomarcados 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, aquellas que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución tisular de fármaco y/o sustrato. Los isótopos radioactivos tritio, es decir, ³H, y carbono-14, es decir, ¹⁴C, 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 ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O y ¹³N, 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 pueden prepararse mediante 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 memoria descriptiva también divulga los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos divulgados. Dichos productos pueden resultar de, por ejemplo, la oxidación, la reducción, la hidrólisis, la amidación, la esterificación y similares del compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. La presente memoria descriptiva también divulga compuestos producidos mediante un proceso que comprende administrar un compuesto de esta invención a un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo. Dichos productos se identifican normalmente administrando un compuesto radiomarcado de estructura (I) 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, ganado, ovejas, cabras, caballos, conejos) como 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, aunque sin limitación, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido alginico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido alcanfórico, ácido alcanfor-10-sulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-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 mícico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido propiónico, ácido piroglutámico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido tiocianico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido undecilénico.

"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, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, sales de aluminio. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como resinas de amoníaco, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, dietanolamina, etanolamina, deanol, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betafina, benetamina, benzatina, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, trietanolamina, trometamina, purinas, piperazina, piperidina, *N*-etilpiperidina, resinas de poliamina. Son bases orgánicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

A menudo las cristalizaciones producen un solvato del compuesto de estructura (I). 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 estructura (I) con una o más moléculas de disolvente. El disolvente puede ser agua, en cuyo caso el solvato puede ser un hidrato. Como alternativa, el disolvente puede ser un disolvente orgánico. Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden existir como un hidrato, incluyendo un monohidrato, dihidrato, hemihidrato, sesquihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares, así como las correspondientes formas solvatadas. En algunas realizaciones, el compuesto de estructura (I) puede existir como un verdadero solvato, mientras que en otros casos, el compuesto de estructura (I) 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 estructura (I) y un medio generalmente aceptado en la técnica para la administración del compuesto biológicamente activo a mamíferos, p. ej., 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 estructura (I) 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 realizaciones de la invención que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la afección y su gravedad, la forma de administración y la edad del mamífero que ha de tratarse, pero puede determinarse rutinariamente por un

experto habitual en la materia teniendo en cuenta su propio conocimiento y la presente divulgación.

"Tratar" o "tratamiento" como se usa en el presente documento abarca el tratamiento de la enfermedad o 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 usa en el presente documento, los términos "enfermedad" y "afección" pueden usarse indistintamente o pueden ser diferentes en el sentido de que la enfermedad o afección concreta puede no tener un agente causal conocido (de manera que aún no se ha determinado su etiología) y, por tanto, no se reconoce aún como una enfermedad sino solamente como una afección o síndrome no deseable, en donde los médicos han identificado un conjunto más o menos específico de síntomas.

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

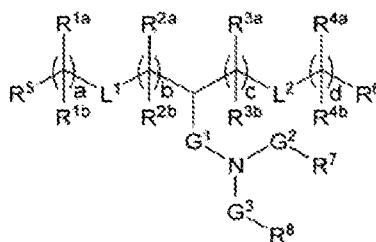
Un "estereoisómero" se refiere a un compuesto constituido por los mismos átomos unidos por los mismos enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables. La presente invención contempla diversos estereoisómeros y mezclas de los mismos e incluye los "enantiómeros", que se refieren a dos estereoisómeros cuyas moléculas son imágenes especulares no superponibles entre sí.

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

Compuestos

En un aspecto, la invención proporciona compuestos lipídicos novedosos 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 administración eficaz de oligonucleótidos a células *in vitro* e *in vivo*.

La presente memoria descriptiva divulga compuestos que tienen la siguiente estructura (I): (los compuestos son de acuerdo con la invención en la medida en que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones):



I

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

L^1 y L^2 son cada uno independientemente $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)O-$ o un enlace directo;

G^1 es alquileo C_1-C_2 , $-(C=O)-$, $-O(C=O)-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$ o un enlace directo;

5 G^2 es $-C(=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)S-$, $-C(=O)NR^a-$ o un enlace directo;

G^3 es alquileo C_1-C_6 ;

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

R^{1a} y R^{1b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{1a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

15 R^{2a} y R^{2b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{2a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{2b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{2b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

20 R^{3a} y R^{3b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{3a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{3b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{3b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

25 R^{4a} y R^{4b} son, en cada aparición, independientemente cualquiera de: (a) H o alquilo C_1-C_{12} ; o (b) R^{4a} es H o alquilo C_1-C_{12} y R^{4b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{4b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono;

R^5 y r^6 son cada uno independientemente H o metilo;

30 R^7 es H o alquilo C_1-C_{20} ;

R^8 es OH, $-N(R^9)(C=O)R^{10}$, $-(C=O)NR^9R^{10}$, $-NR^9R^{10}$, $-(C=O)OR^{11}$ o $-O(C=O)R^{11}$, siempre que G^3 sea alquileo C_4-C_6 cuando R^8 sea $-NR^9R^{10}$;

35 R^9 y R^{10} son cada uno independientemente H o alquilo C_1-C_{12} ;

R^{11} es aralquilo;

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

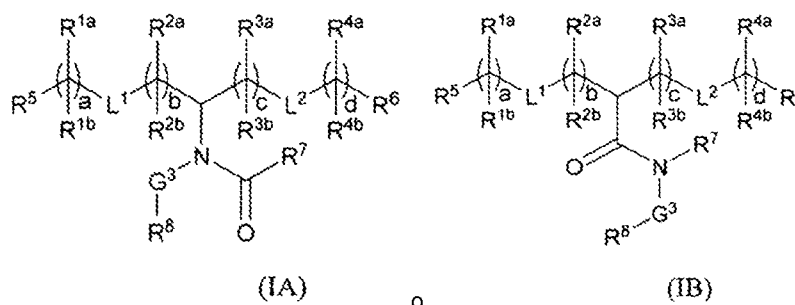
40 x es 0, 1 o 2,

en donde cada alquilo, alquileo y aralquilo está opcionalmente sustituido.

45 En algunas realizaciones, L^1 y L^2 son cada uno independientemente $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ o un enlace directo. En otras realizaciones, G^1 y G^2 son cada uno independientemente $-(C=O)-$ o un enlace directo. En algunas realizaciones diferentes, L^1 y L^2 son cada uno independientemente $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ o un enlace directo; y G^1 y G^2 son cada uno independientemente $-(C=O)-$ o un enlace directo.

50 En algunas realizaciones diferentes, L^1 y L^2 son cada uno independientemente $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^a-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)O-$, $-NR^aS(O)_xNR^a-$, $-NR^aS(O)_x-$ o $-S(O)_xNR^a-$.

55 En otras de las realizaciones anteriores, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IA) (no de acuerdo con la invención) o (IB) (de acuerdo con la invención):



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

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

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

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

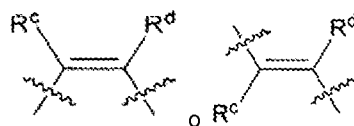
En algunas otras realizaciones diferentes de las anteriores, para al menos una aparición de R^{1a} y R^{1b}, R^{1a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace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

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

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

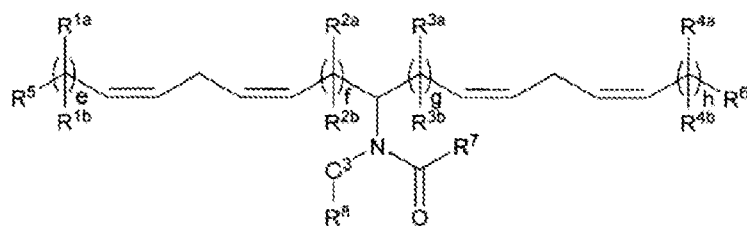
En otras realizaciones diferentes de cualquiera de los anteriores, para al menos una aparición de R^{3a} y R^{3b}, R^{3a} es H o alquilo C₁-C₁₂ y R^{3b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{3b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace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

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



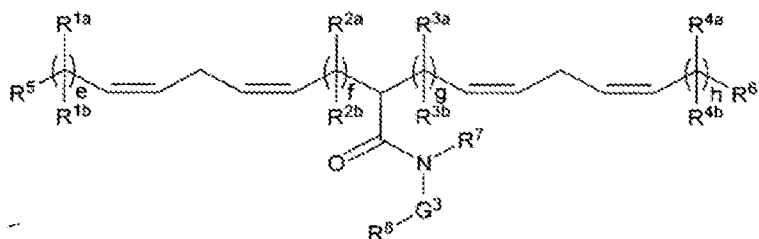
en donde R^c y R^d son, en cada aparición, independientemente H o un sustituyente. Por ejemplo, en algunas realizaciones R^c y R^d son, en cada aparición, independientemente H, alquilo C₁-C₁₂ o cicloalquilo, por ejemplo, H o alquilo C₁-C₁₂.

En diversas realizaciones distintas, el compuesto tiene una de las siguientes estructuras (IC) (no de acuerdo con la invención) o (ID) (de acuerdo con la invención en la medida en que sean estructuras comprendidas por las reivindicaciones):



(IC)

o

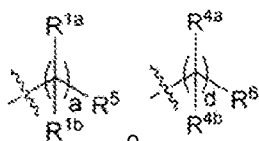


(ID)

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

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

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



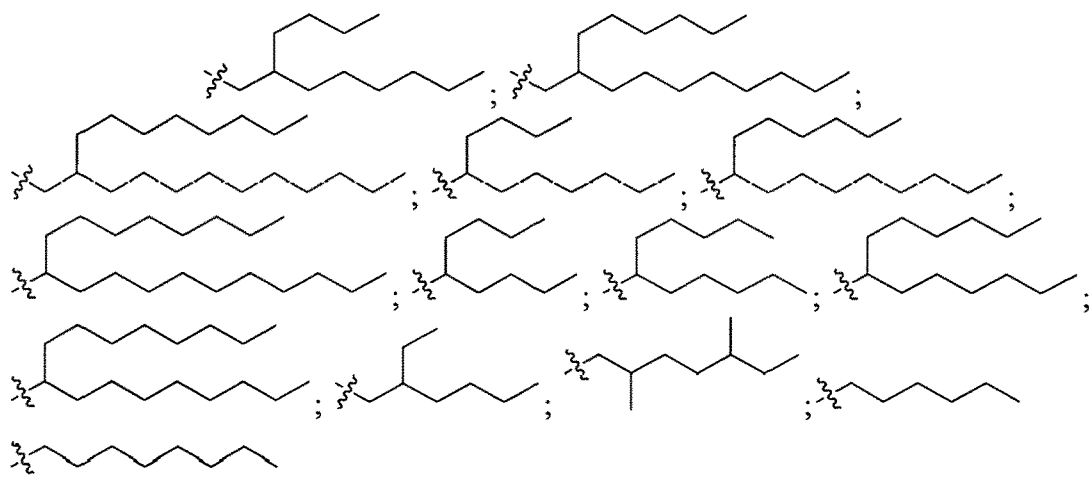
En otras realizaciones diferentes,

o

o ambas, tienen independientemente una de las estructuras

siguientes:

15



o

20 A, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 4 a 12. En otras realizaciones, a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 8 a 12 o de 5 a 9.

En otras realizaciones más, a es 4. En algunas realizaciones, a es 5. En otras realizaciones, a es 6. En más realizaciones, a es 7. En otras realizaciones más, a es 8. En algunas realizaciones, a es 9. En otras realizaciones, a es 10. En más realizaciones, a es 11. En otras realizaciones más, a es 12.

25

En otras realizaciones más, b es 4. En algunas realizaciones, b es 5. En otras realizaciones, b es 6. En más

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

En otras realizaciones más, c es 4. En algunas realizaciones, c es 5.

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

10 En otras realizaciones más, d es 4. En algunas realizaciones, d es 5. En otras realizaciones, d es 6. En más realizaciones, d es 7. En otras realizaciones más, d es 8. En algunas realizaciones, d es 9. En otras realizaciones, d es 10. En más realizaciones, d es 11. En otras realizaciones más, d es 12.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

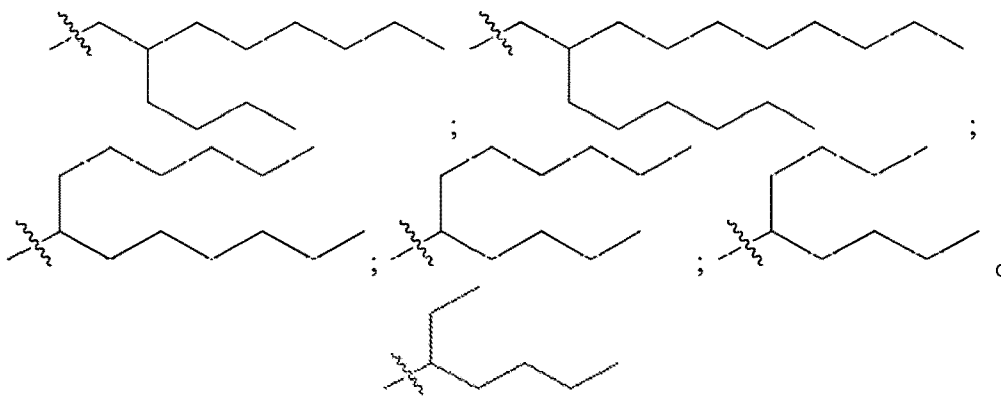
55 En determinadas realizaciones de lo anterior, R^{1b} junto con el átomo de carbono al que está unido se toma junto con un R^{1b} adyacente y el átomo de carbono al que está unido para formar un doble enlace carbono-carbono. En otras realizaciones de lo anterior R^{4b} junto con el átomo de carbono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

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

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

-NR^aR^b, -NR^aC(=O)R^b, -C(=O)NR^aR^b, -NR^aC(=O)NR^aR^b, -OC(=O)NR^aR^b, -NR^aC(=O)OR^b, -NR^aS(O)_xNR^aR^b, -NR^aS(O)_xR^b o -S(O)_xNR^aR^b, en donde: R^a es H o alquilo C₁-C₁₂; R^b es alquilo C₁-C₁₅; y x es 0, 1 o 2. Por ejemplo, en algunas realizaciones R⁷ está sustituido con -(C=O)O^b o -O(C=O)R^b.

- 5 En diversas de las realizaciones anteriores, R^b es alquilo C₃-C₁₅ ramificado. Por ejemplo, en algunas realizaciones R^b tiene una de las siguientes estructuras:

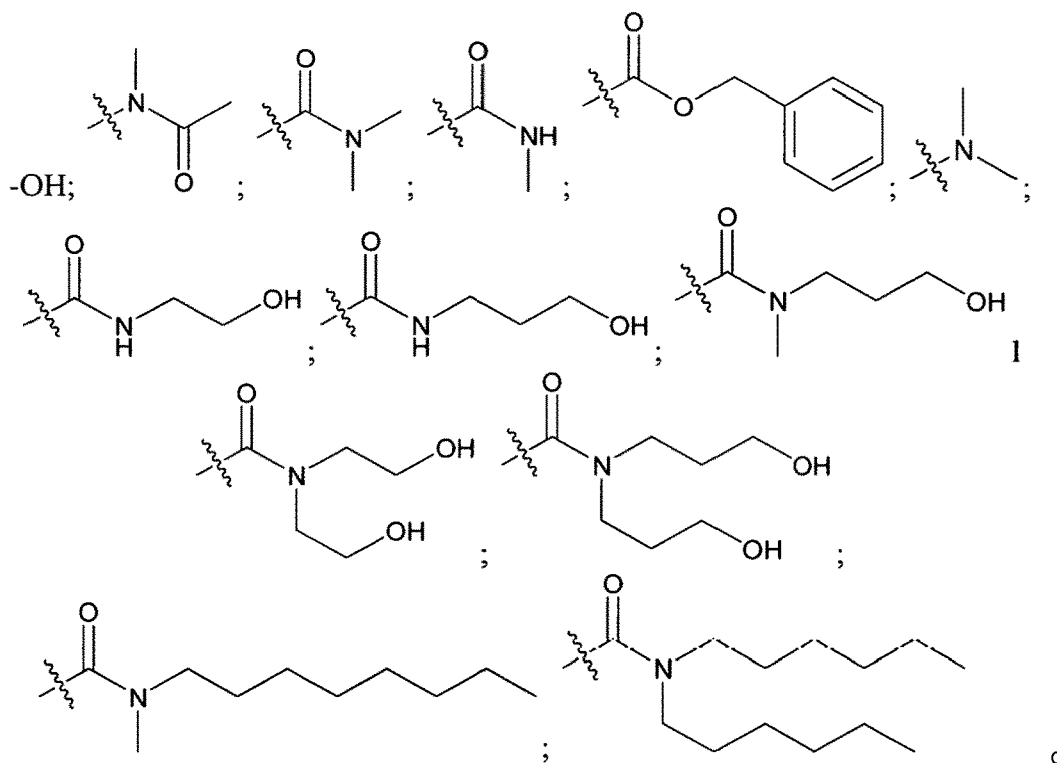


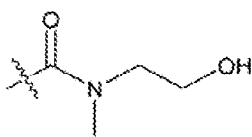
En determinadas realizaciones, R⁸ es OH.

- En otras realizaciones, R^8 es $-N(R^9)(C=O)R^{10}$. En algunas otras realizaciones, R^8 es $-(C=O)NR^9R^{10}$. En aún más realizaciones, R^8 es $-NR^9R^{10}$. En algunas de las realizaciones anteriores, R^9 y R^{10} son cada uno independientemente H o alquilo C_1-C_8 , por ejemplo, H o alquilo C_1-C_3 . En una forma más específica de estas realizaciones, el alquilo C_1-C_8 o el alquilo C_1-C_3 no está sustituido o está sustituido con hidroxilo. En otras de estas realizaciones, R^9 y R^{10} son cada uno metilo.

- 20 En aún más realizaciones, R^8 es $-(C=O)OR^{11}$. En algunas de estas realizaciones R^{11} es bencilo.

En realizaciones aún más específicas, R⁸ tiene una de las estructuras siguientes: -OH;





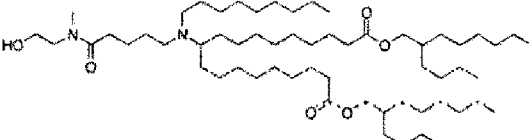
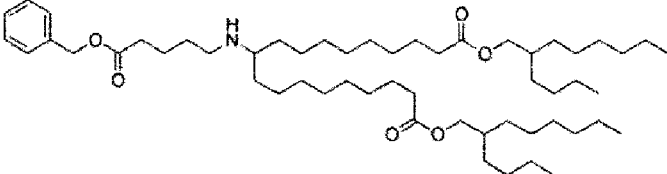
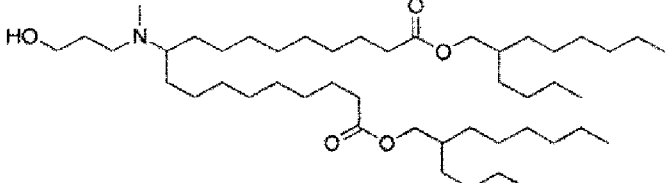
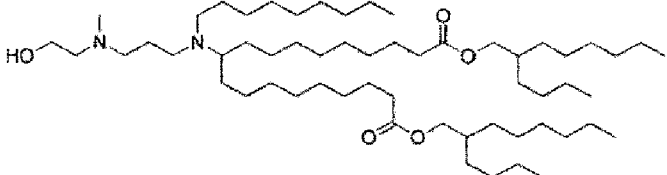
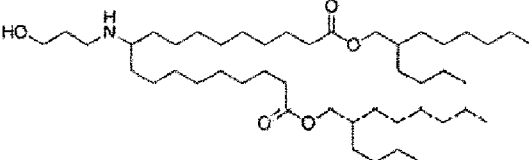
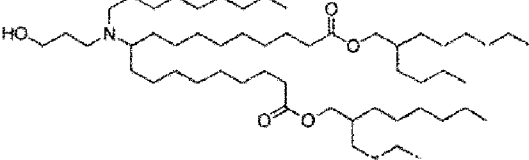
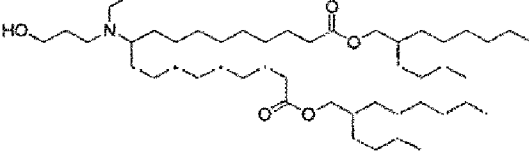
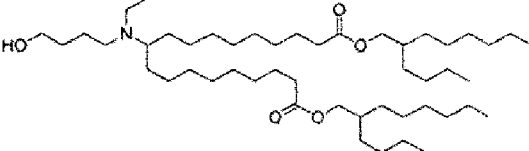
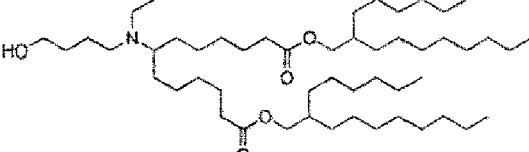
En otras realizaciones más de los compuestos anteriores, G^3 es alquileo C_2-C_6 , por ejemplo, alquileo C_2-C_4 , alquileo C_3 o alquileo C_4 . En algunas de estas realizaciones, R^8 es OH. En otras realizaciones, G^2 está ausente y R^7 es alquileo C_1-C_2 , tal como metilo.

En diversas realizaciones diferentes, el compuesto tiene una de las estructuras que se exponen en la Tabla 1 a continuación. Las estructuras son de acuerdo con la invención en la medida en que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones.

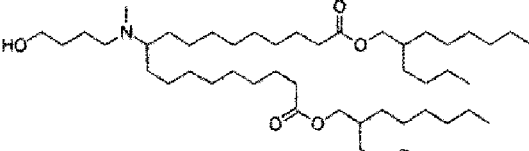
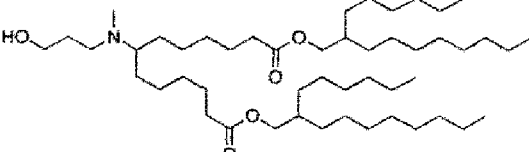
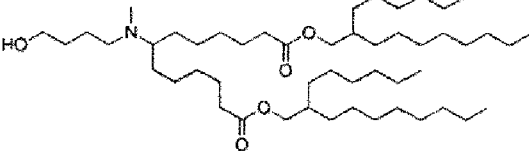
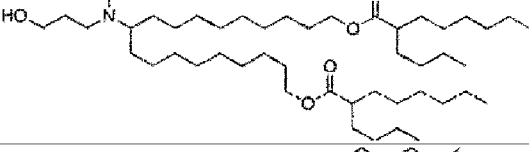
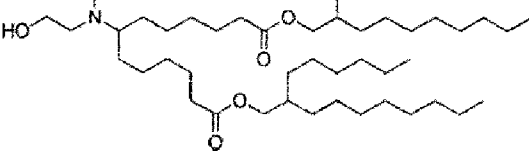
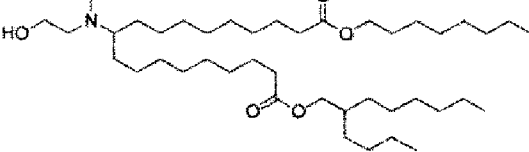
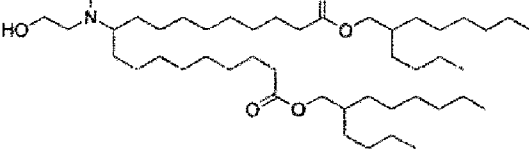
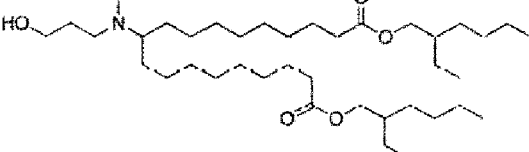
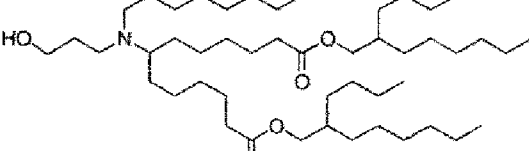
Tabla 1
Compuestos representativos

N.º	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	
6	

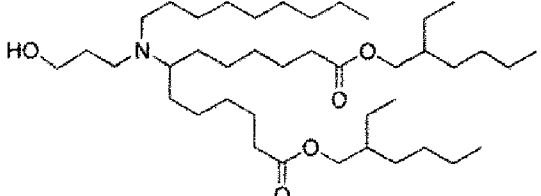
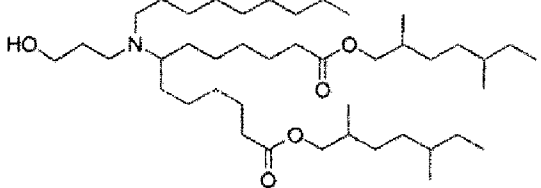
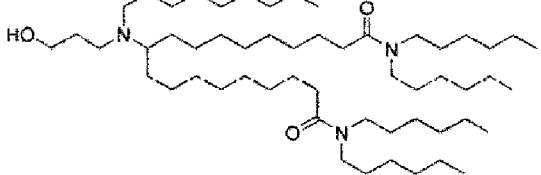
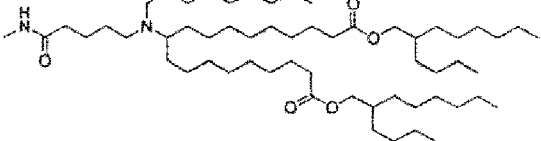
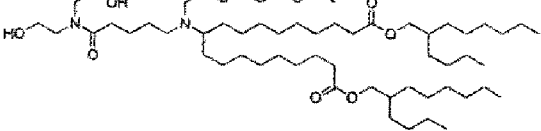
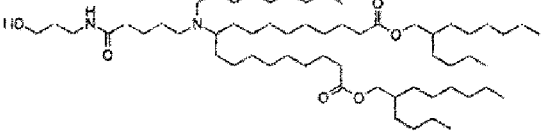
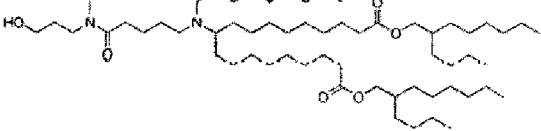
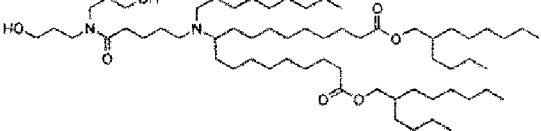
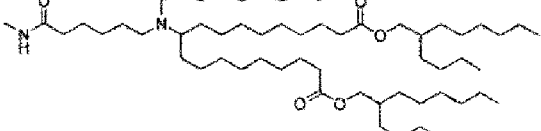
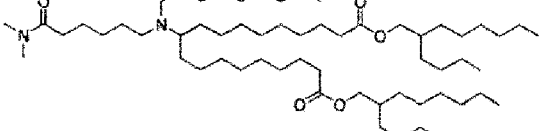
(continuación)

N.º	Estructura
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	

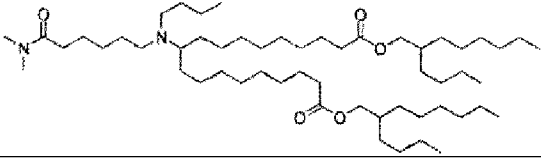
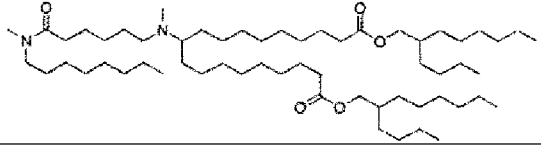
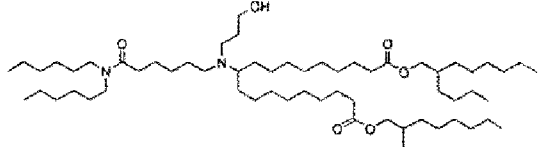
(continuación)

N.º	Estructura
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	

(continuación)

N.º	Estructura
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	

(continuación)

N.º	Estructura
35	
36	
37	

(Los Compuestos 9 y 13-22 son de acuerdo con la invención, los demás compuestos son compuestos de referencia).

Los compuestos de la Tabla 1 se prepararon y se probaron de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos métodos generales que se describen a continuación en el presente documento.

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. De manera adicional, en el caso de que se incluya una lista de sustituyentes y/o variables para cualquier grupo R, Grupo L, Grupo G en particular, o variables a, x, y o z en una realización y/o reivindicación particular, se entiende que cada sustituyente y/o variable individual puede eliminarse de la realización y/o reivindicación particular y que la lista restante de sustituyentes y/o variables se considerará dentro del alcance de las realizaciones 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.

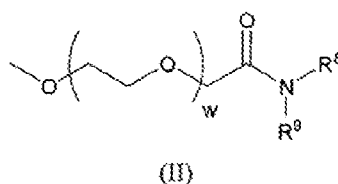
En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden uno cualquiera o más de los compuestos de estructura (I) y un agente terapéutico. En algunas realizaciones se proporciona una nanopartícula lipídica que comprende uno o más compuestos de estructura (I). Por ejemplo, en algunas realizaciones, 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 de 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-(ω-metoxi(polietoxi)etil)carbamato. En diversas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido pegilado varía de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 20:1.

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



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

- 5 R^8 y R^9 son cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquino recto o ramificado que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, en donde el alquilo, alqueno o alquino está opcionalmente interrumpido por uno o más enlaces éster; y

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

- 10 En algunas realizaciones, R^8 y R^9 son cada uno independientemente alquilo lineal 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.

- 15 En algunas realizaciones, se proporcionan nanopartículas lipídicas (LNP) que comprenden uno cualquiera o más de los compuestos de estructura (I) y un agente terapéutico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las LNP 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.

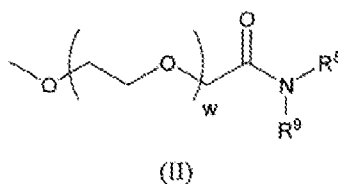
- 20 En algunas realizaciones de las LNP, el lípido neutro se selecciona de DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE y SM. En algunas realizaciones, el lípido neutro es DSPC. En diversas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido neutro varía de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 8:1.

En diversas realizaciones de las LNP, las composiciones comprenden además un esteroide o un análogo de esteroide.

- 25 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 de las LNP, el lípido conjugado con polímero es un lípido pegilado. Por ejemplo, algunas realizaciones incluyen un diacilglicerol pegilado (PEG-DAG) tal como 1-(monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-DMG), una fosfatidiletanolamina pegilada (PEG-PE), un succinato de PEG diacilglicerol (PEG-S-DAG) tal como 4-O-(2',3'-di(tetradecanoiloxi)propil-1-O-(ω -metoxi(polietoxi)etil)butanodioato (PEG-S-DMG), una ceramida pegilada (PEG-cer) o un dialcoxipropilcarbamato de PEG tal como ω -metoxi(polietoxi)etil-N-(2,3-di(tetradecanoxi)propil)carbamato o 2,3-di(tetradecanoxi)propil-N-(ω -metoxi(polietoxi)etil)carbamato. En diversas realizaciones, la relación molar entre el compuesto y el lípido pegilado varía de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 20:1.

En algunas realizaciones, las LNP comprenden un lípido pegilado que tiene la siguiente estructura (II):



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

R^8 y R^9 son cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquino recto o ramificado que contiene de 10 a 30 átomos de carbono, en donde el alquilo, alqueno o alquino está opcionalmente interrumpido por 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 alquilo lineal 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.

Los métodos de preparación para los lípidos, las nanopartículas lipídicas y las composiciones anteriores se describen a continuación en el presente documento y/o se conocen en la técnica, por ejemplo, en la Publ. PCT. N.º WO

2015/199952, WO 2017/004143 y WO 2017/075531.

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

5 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.

10 Con fines de administración, los compuestos de la estructura (I) (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 las realizaciones de la presente invención comprenden un compuesto de estructura (I) (por ejemplo, como componente en una LNP) y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto de estructura (I) está presente en la
15 composición en una cantidad que es eficaz para formar una nanopartícula lipídica y suministrar el agente terapéutico, p. ej., 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 y/o LNP de las realizaciones 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 las realizaciones 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
25 inhalación, peritoneal, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal. El término peritoneal 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 estructura (I) 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 esta técnica; 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
35 cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de estructura (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección de interés de acuerdo con las enseñanzas de las realizaciones de la presente invención.

Una composición farmacéutica de las realizaciones 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, jarabe oral, un líquido inyectable o un aerosol, que es útil en, por ejemplo, la administración por inhalación.

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

Como composición sólida para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en forma de polvo, gránulo, comprimido obtenido por compresión, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o forma similar. Una
50 composición sólida de este tipo normalmente contendrá uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. De manera adicional, 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.

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

La composición farmacéutica puede estar en forma de líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para la administración oral o para la administración por inyección, como dos ejemplos. Cuando se destina a la administración oral, las composiciones preferidas contienen, además de los presentes compuestos o LNP, uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del aroma. En
65 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, estabilizador y agente isotónico.

- Las composiciones farmacéuticas líquidas de las realizaciones 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 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 peritoneal 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 las realizaciones de la invención destinada a la administración peritoneal u oral debe contener una cantidad de un compuesto de estructura (I) de tal manera que se obtenga una LNP adecuada.
- La composición farmacéutica de las realizaciones de la invención puede estar destinada a 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.
- La composición farmacéutica de las realizaciones de la invención puede estar destinada a 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.
- La composición farmacéutica de las realizaciones 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 de, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los principios activos pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina.
- La composición farmacéutica de las realizaciones de la invención en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se una al compuesto de estructura (I) y, de este modo, ayude al suministro del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar con esta capacidad incluyen un anticuerpo monoclonal o policlonal, o una proteína.
- La composición farmacéutica de las realizaciones de la invención puede consistir en unidades de dosificación que pueden administrarse como un aerosol. El término aerosol se usa para designar una diversidad de sistemas que varían desde aquellos de naturaleza coloidal hasta 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 estructura (I) pueden entregarse en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos con el fin de suministrar el principio o principios activos. El suministro del aerosol incluye el recipiente necesario, activadores, válvulas, subrecipientes y similares, que juntos pueden formar un kit. Un experto en la materia, puede determinar sin experimentación indebida los aerosoles preferidos.
- Las composiciones farmacéuticas de las realizaciones 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 estructura (I) para facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto en el sistema de administración acuoso.
- Las composiciones de las realizaciones 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 las realizaciones 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 realizaciones de la

invención y uno o más principios 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 las realizaciones de la invención y el otro principio 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 estructura (I) 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.

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

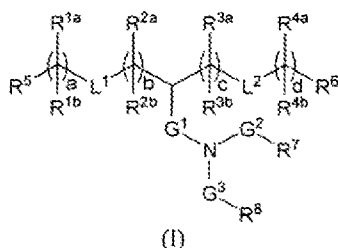
Los expertos en la materia apreciarán que en el proceso que se describe en el presente documento puede ser necesario proteger los grupos funcionales de los compuestos intermedios mediante grupos protectores adecuados. Dichos grupos funcionales incluyen hidroxí, amino, mercapto y ácido carboxílico. Los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

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

Por otra parte, todos los compuestos de estructura (I) 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 estructura (I) pueden convertirse en su forma de base o de ácido libre mediante técnicas convencionales.

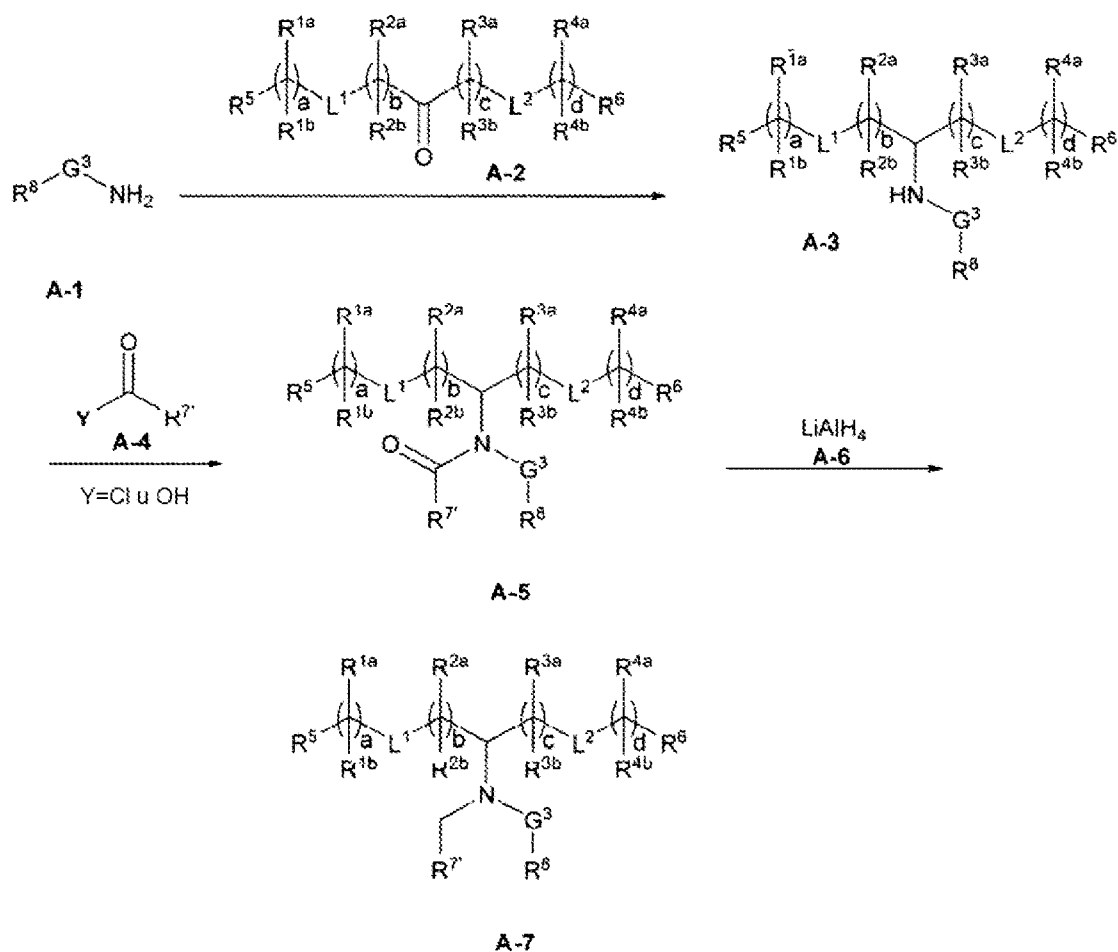
Los compuestos de estructura (I) y las nanopartículas lipídicas que comprenden los mismos, pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos o derivables por un experto habitual en la materia, por ejemplo, aquellos métodos divulgados en la Publ. PCT. N.º WO 2015/199952, WO 2017/004143 y WO 2017/075531

Los siguientes esquemas de reacción generales ilustran métodos ilustrativos para preparar compuestos de estructura (I):



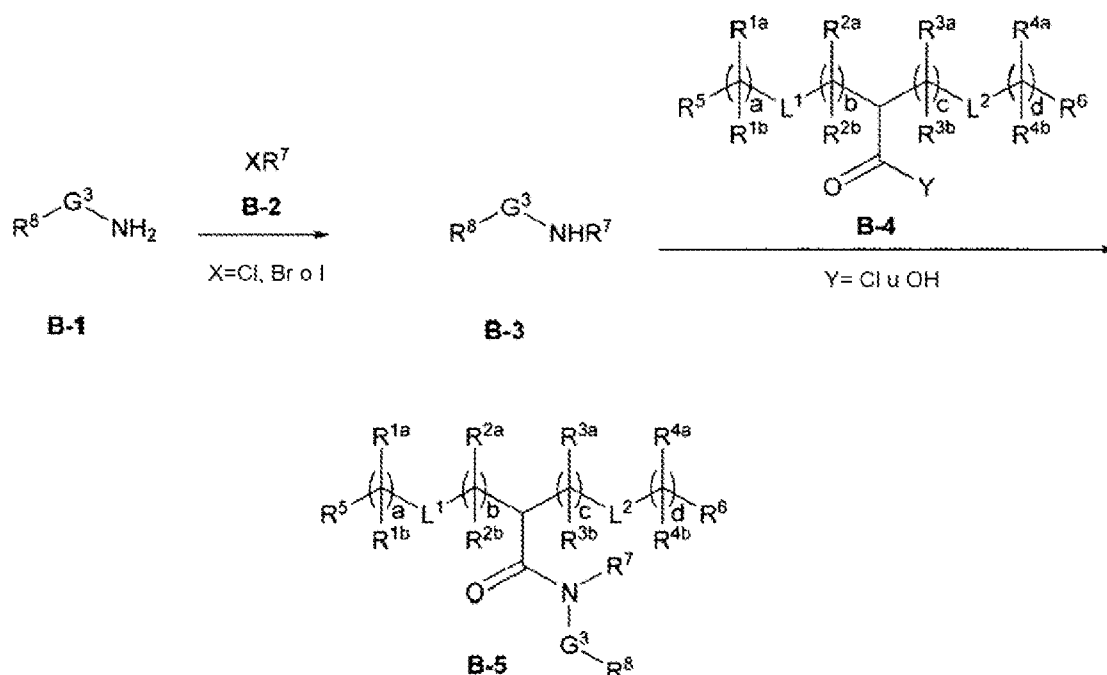
o una sal, tautómero o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, L¹, L², G¹, G², G³, a, b, c y d son como se definen en el presente documento. Se entiende que el experto en la materia puede ser capaz de fabricar estos compuestos por métodos similares o combinando otros métodos conocidos por el experto en la materia. También se entiende que un experto en la materia sería capaz de preparar, de manera similar a la que se describe a continuación, otros compuestos de 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 pueden sintetizarse de acuerdo con fuentes conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5ª edición (Wiley, diciembre de 2000)) o pueden prepararse como se describe en la presente invención.

ESQUEMA DE REACCIÓN GENERAL 1



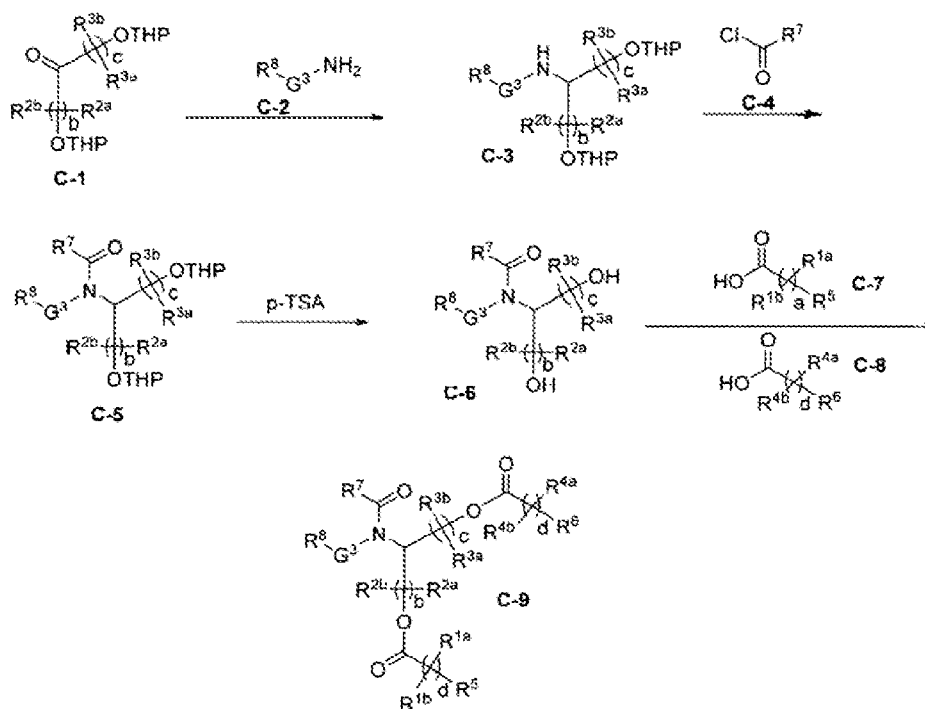
Las realizaciones del compuesto de estructura (I) (por ejemplo, los compuestos A-5 y A-7) pueden prepararse de acuerdo con el Esquema de Reacción General 1 ("Método A"), en donde $\text{R}^{1a}, \text{R}^{1b}, \text{R}^{2a}, \text{R}^{2b}, \text{R}^{3a}, \text{R}^{3b}, \text{R}^{4a}, \text{R}^{4b}, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^8, \text{R}^9, \text{L}^1, \text{L}^2, \text{G}^1, \text{G}^2, \text{G}^3, \text{a}, \text{b}, \text{c}$ y d son como se definen en el presente documento y $\text{R}^{7'}$ representa R^7 o un alquilo $\text{C}_3\text{--C}_{19}$. Con referencia al Esquema de Reacción General 1, los compuestos de estructura A-1 y A-2 pueden adquirirse de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con métodos familiares para un experto en la materia. La fracción R^8 puede protegerse adecuadamente según sea necesario o se puede instalar una funcionalidad en diferentes puntos de la síntesis para evitar reacciones no deseadas. Una solución de A-1 y A-2 se trata con un agente reductor (por ejemplo, triacetoxiborohidruro sódico) para obtener A-3 después de cualquier tratamiento necesario. Una solución de A-3 y una base (por ejemplo, trimetilamina, DMAP) se trata con cloruro de acilo A-4 (o ácido carboxílico y DCC) para obtener A-5 después de cualquier tratamiento y/o purificación necesarios. A-5 puede reducirse con LiAlH_4 A-6 para dar A-7 después de cualquier tratamiento y/o purificación necesarios.

ESQUEMA DE REACCIÓN GENERAL 2



Pueden prepararse realizaciones del compuesto de estructura (I) (por ejemplo, compuesto B-5) de acuerdo con el Esquema de Reacción General 2 ("Método B"), en donde $R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, L^1, L^2, G^3, a, b, c$ y d son como se definen en el presente documento. Con referencia al Esquema de Reacción General 2, los compuestos de estructura B-1 y B-2 pueden adquirirse de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con métodos familiares para un experto en la materia. La fracción R^8 puede protegerse adecuadamente según sea necesario o se puede instalar una funcionalidad en diferentes puntos de la síntesis para evitar reacciones no deseadas. Una mezcla de B-1 (en exceso), B-2 y una base (por ejemplo, carbonato potásico) se calienta para obtener B-3 después de cualquier tratamiento necesario. Una solución de B-3 y una base (por ejemplo, trimetilamina, DMAP) se trata con cloruro de acilo B-4 (o ácido carboxílico y DCC) para obtener B-5 después de cualquier tratamiento y/o purificación necesarios.

ESQUEMA DE REACCIÓN GENERAL 3



Otras realizaciones del compuesto de Fórmula (I) (por ejemplo, C-9) se preparan de acuerdo con el Esquema de Reacción General 3. La fracción R⁸ puede protegerse adecuadamente según sea necesario o se puede instalar una funcionalidad en diferentes puntos de la síntesis para evitar reacciones no deseadas. Como se ilustra en el Esquema de Reacción General 3, una cetona (C-1) apropiadamente protegida se hace reaccionar en condiciones de aminación reductora con la amina C-2 para producir C-3. La acilación de C-3 con cloruro de ácido C-4 produce el producto acilado C-5. La eliminación del grupo protector de alcohol en C-5 seguida de la reacción con C-7 y/o C-8 y el reactivo activador apropiado (por ejemplo, DCC) produce el compuesto C-9 deseado.

Cabe señalar que los expertos en la materia disponen de diversas estrategias alternativas para la preparación de compuestos de estructura (I). Por ejemplo, la fracción R⁸ puede incluir un sustituyente, tal como hidroxilo, y pueden requerirse grupos protectores apropiados para enmascarar el sustituyente, o el sustituyente puede añadirse después de R⁸ se añada al resto de la molécula. El uso de grupos protectores según sea necesario y otras modificaciones a los Esquemas Generales de Reacción 1-3 anteriores serán fácilmente evidentes para un experto en la materia. Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no de limitación.

Ejemplo 1

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE ARNm DE LUCIFERASA USANDO COMPOSICIONES DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Un lípido de estructura (I), DSPC, colesterol y PEG-lípido se solubilizaron 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 (LNP) 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 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. Finalmente, las nanopartículas lipídicas se filtraron a través de un filtro estéril de poro de 0,2 µm.

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 Canadian Council on Animal Welfare (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 horas) 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 (¼") (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 × 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).

El ARNm de FLuc (por ejemplo, L-6107 o L-7602) de Trilink Biotechnologies expresará una proteína luciferasa, originalmente aislada de la luciérnaga, *Photinus pyralis*. FLuc se usó 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 se sustituyó totalmente con 5-metilcitidina y pseudouridina.

Ejemplo 2

DETERMINACIÓN DEL pK_a DE LOS LÍPIDOS FORMULADOS

Como se describe en cualquier otro sitio, el pK_a de los lípidos formulados se correlacionó con la eficacia de las LNP para la administración de ácidos nucleicos (véase Jayaraman et al, *Angewandte Chemie, International Edition* (2012), 51(34), 8529-8533; Semple et al, *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010)). En algunas realizaciones, el intervalo preferido de pK_a era de ~5 a ~7. El pK_a de cada lípido se determinó en nanopartículas lipídicas usando un ensayo basado en la fluorescencia del ácido 2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfónico (TNS). Las nanopartículas lipídicas que comprenden el compuesto de estructura (I)/DSPC/colesterol/PEG-lípido (50/10/38,5/1,5 o 47,5:10:40,8:1,7 % mol) en PBS a una concentración de 0,4 mM de lípidos totales se preparan usando el proceso en línea como se describe en

el Ejemplo 1. Se preparó TNS en forma de una solución madre 100 μ M en agua destilada. Se diluyeron vesículas a 24 μ M de lípido en 2 ml de soluciones tamponadas que contenían HEPES 10 mM, MES 10 mM, acetato de amonio 10 mM y 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 μ M y, después de mezclar con formación de vórtice, se midió la intensidad de fluorescencia a temperatura ambiente en un espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Serie 2 usando longitudes de onda de excitación y emisión de 321 nm y 445 nm. Se aplicó un análisis de mejor ajuste sigmoideo a los datos de fluorescencia y se midió el pK_a como el pH que origina la intensidad de fluorescencia semimáxima.

El tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas tenía un diámetro de aproximadamente 55-95 nm y, en algunos casos, un diámetro de aproximadamente 70-90 nm, como se determina por la dispersión de luz casi elástica con un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, RU). Los diámetros dados son medias ponderadas por intensidad. La encapsulación se determinó usando un ensayo basado en colorante intercalante fluorescente (Ribogreen).

Los compuestos de estructura (I) se formularon usando la siguiente relación molar: lípido catiónico al 47,5 %/ diestearoilfosfatidilcolina al 10 % (DSPC) / Colesterol al 40,8 %/PEG lípido al 1,7 % ("PEG-DMA" 2-[2-(ω -metoxi(polietilenglicol₂₀₀₀)etoxi]-N,N-ditetradecilacetamida). 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.

Usando los métodos anteriores, se determinó que el pK_a de los compuestos 3, 4 y 5 era 6,53, 6,49 y 6,69, respectivamente.

Se determinó que la actividad relativa en el ensayo de luciferasa para los compuestos 3 y 5 fue 3,68 y 6,4, respectivamente, relativo a MC3.



"MC3"

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

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 pueden formularse usando la siguiente relación molar: Lípido catiónico al 50 %/ diestearoilfosfatidilcolina al 10 % (DSPC) / Colesterol al 38,5 %/PEG lípido al 1,5 % ("PEG-DMG", es decir, 1-(monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol, con un peso molecular promedio de PEG de 2000). En realizaciones alternativas, el lípido catiónico, DSPC, el colesterol y el PEG-lípido se formulan en una relación molar de aproximadamente 47,5:10:40,8:1,7. 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.

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 \pm 1	N/D	
DLinDMA	13 \pm 3	67 \pm 20	

(continuación)

Compuesto	Luc de hígado a una dosis de 0,3 mg/kg	Luc de hígado a una dosis de 1,0 mg/kg	Estructura
MC4	41 ± 10	N/D	
XTC2	80 ± 28	237 ± 99	
MC3	198 ± 126	757 ± 528	
319 (2 % de PEG)	258 ± 67	681 ± 203	
137	281 ± 203	588 ± 303	
A	77 ± 40	203 ± 122	

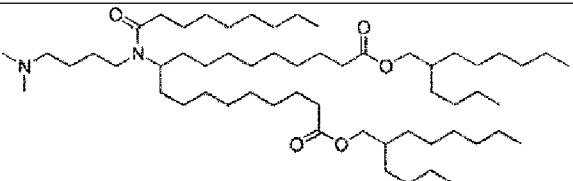
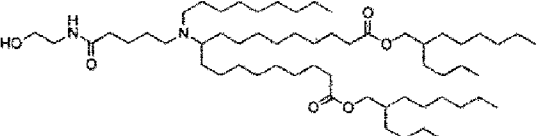
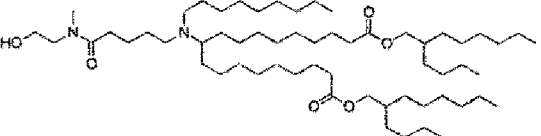
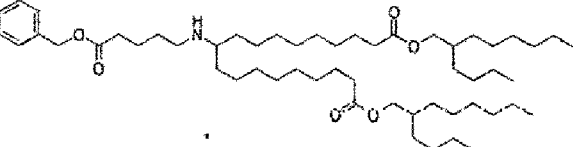
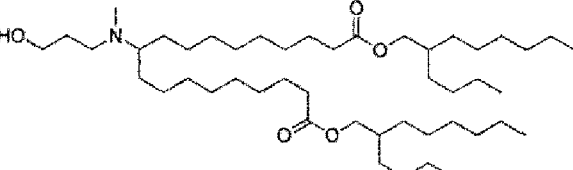
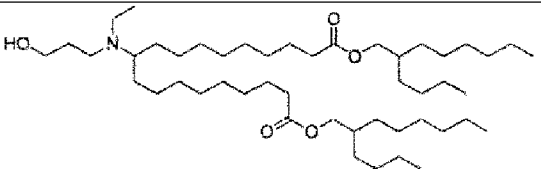
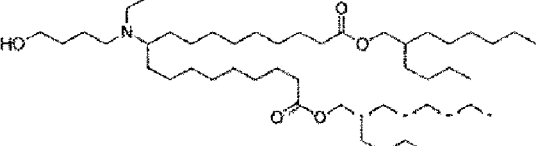
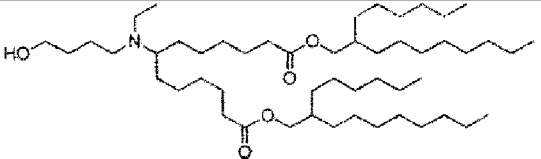
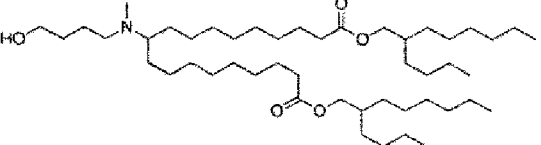
Los compuestos representativos de la invención que se muestran en la Tabla 3 se formularon usando la siguiente relación molar: lípido catiónico al 50 %/ diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) al 10 % / Colesterol al 38,5 %/ PEG lípido al 1,5 % ("PEG-DMA" 2-[2-(ω-metoxi(polietilenglicol₂₀₀₀)etoxi]-N,N-ditetradecilacetamida) o 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 0,5 mg de ARNm/kg a menos que se indique lo contrario y se expresó como ng de luciferasa/g de hígado medido 4 horas después de la administración, como se describe en el Ejemplo 1. Los números compuestos en la Tabla 3 se refieren a los números compuestos de la Tabla 1. Los compuestos son de acuerdo con la invención en la medida en que estén abarcados por las reivindicaciones.

Tabla 3

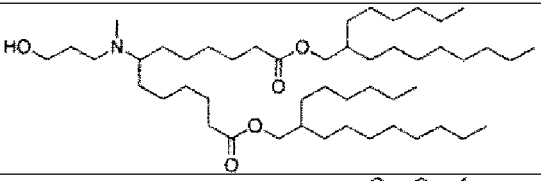
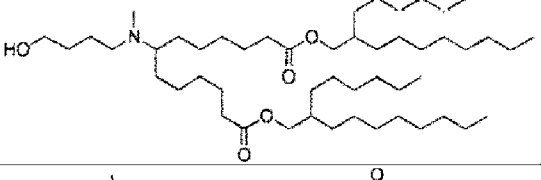
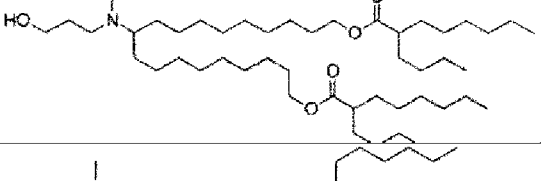
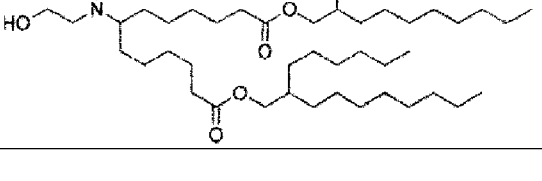
Lípidos catiónicos novedosos y actividad asociada

Cmp. N.º	pKa	Luc de hígado a 0,5 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura
3	6,38	1370 ± 674*	
4	6,37	1213 ± 702*	

(continuación)

Cmp. N.º	pKa	Luc de hígado a 0,5 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura
5	6,69	1422 ± 372*	
6	6,10	318 ± 222*	
7	5,83	33 ± 18*	
8	6,09	550 ± 164*	
9	6,29	7628 ± 3298*	
13	6,03	514 ± 297	
14	6,19	238 ± 70	
15	6,12	345 ± 141	
16	6,43	2004 ± 582	

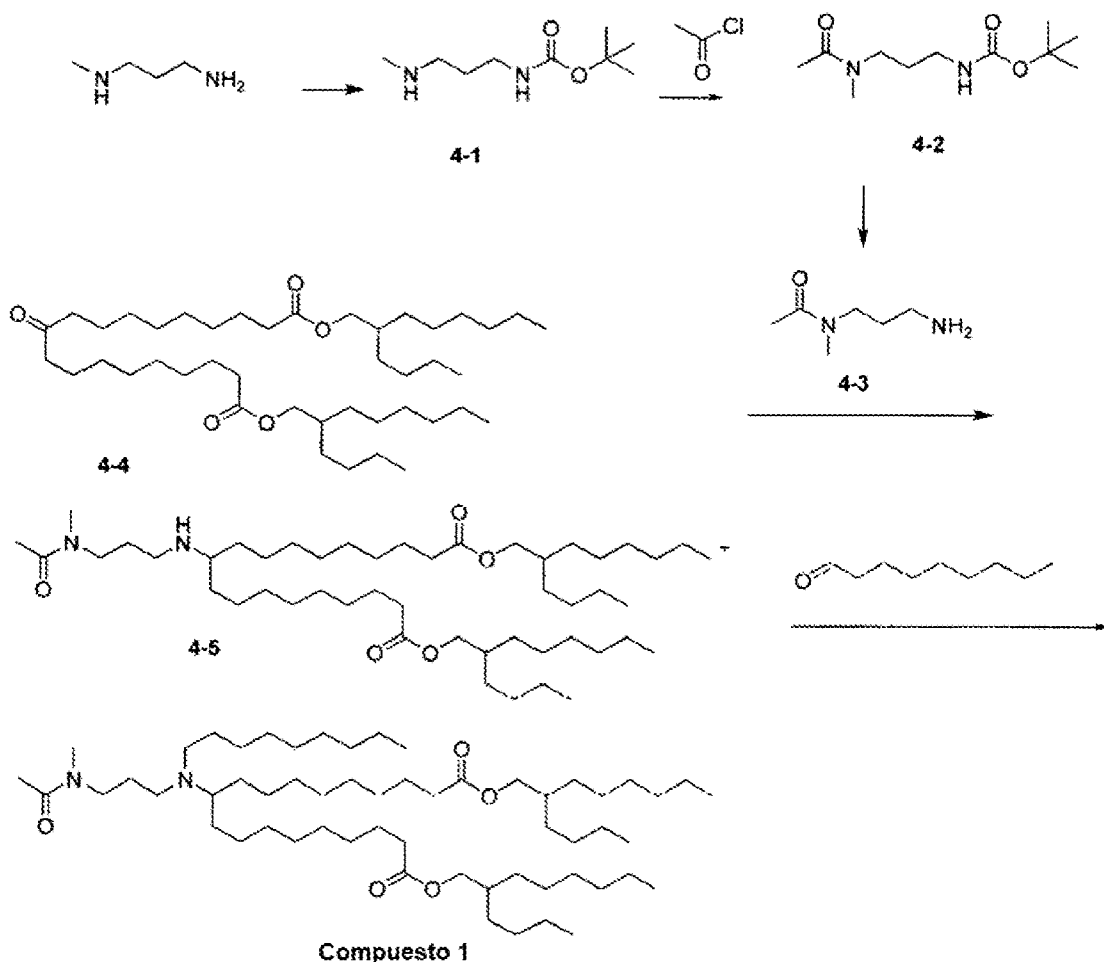
(continuación)

Cmp. N.º	pKa	Luc de hígado a 0,5 mg/kg (ng de luc/g de hígado)	Estructura
17	6,39	405 ± 227	
18	6,45	1506 ± 429	
19	6,31	216 ± 85	
20	6,25	92 ± 48	

* dosificado a 1,0 mg/kg

EJEMPLO 4 (referencia)

5 SÍNTESIS DEL COMPUESTO 1



Síntesis de 4-1

- 5 Una mezcla de polvo de KOH (168 mg), CDI (2,43 g, 15 mmol) y alcohol *t*-butilico (15 mmol, 1,112 g) en tolueno seco (76 ml), se calentó a 60 °C con agitación durante 3 h en atmósfera de argón; a continuación se añadió *N*-metil-1,3-diaminopropano (15 mmol, 1,322 g) gota a gota y la mezcla resultante se calentó a 60 °C durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente (durante la noche), se añadió agua a la mezcla. Las dos capas se separaron. La fase de tolueno se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se concentró a sequedad, proporcionando un aceite ligeramente amarillo (0,966 g, el producto deseado). La fase acuosa se extrajo con DCM (4 × 30 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron (aceite ligeramente amarillo, 0,941 g, ligeramente menos puro que el aceite obtenido mediante extracción con tolueno). La cantidad total del producto obtenido fue 1,9 g, 10 mmol, 67 %. El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

15 Síntesis de 4-2

- Se añadió una solución de cloruro de acetilo (3,25 mmol, 255 mg) en DCM (10 ml) a una solución de 4-1 (2,50 mmol, 470 mg) y trietilamina (1,74 ml) y DMAP (10 mg) en DCM (15 ml) a temperatura ambiente en 5 min. Después de 4 horas, se añadió MeOH (1 ml) a la mezcla. La mezcla resultante se agitó durante otra 1 h. La mezcla se concentró. El residuo se filtró en DCM (aproximadamente 10 ml) a través de una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se lavó con una mezcla de DCM y metanol (100:0 a 95:5). El lavado se concentró para dar el producto bruto (sólido amarillo) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de 4-3

- 25 A una solución de 4-2 de la reacción anterior en DCM (16 ml) se añadió TFA (4,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió tolueno (aproximadamente 15-20 ml) y se concentró. Se añadió más tolueno y se concentró. El residuo se recogió en HCl 2 M (13 ml) y se concentró. El sólido residual se lavó con DCM. El sólido se trata a continuación en una mezcla de CHCl₃/EtOH/H₂O/NH₄OH = 30:25:3:2 (4 ml) y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se lavó con la misma mezcla de disolventes. El lavado se concentró para dar el producto deseado como una película amarilla (128 mg, 0,98 mmol, 0,39 % para dos etapas).

Síntesis de 4-5

- Una solución de **4-4** (1 equivalente, 1,0 mmol, 679 mg; preparada de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía) y **4-3** (1 eq. 128 mg, 0,98 mmol) en DCE (15 ml) se agitó a temperatura ambiente en Ar durante 30 min. A la solución se le añadió triacetoxiborohidruro sódico (1,5 eq., 1,5 mmol, 318 mg) y AcOH (1 eq., 1,0 mmol, 60 mg). La mezcla se agitó a TA en atmósfera de Ar durante 9 días. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se diluyó con una mezcla de hexanos y EtOAc (aproximadamente 19:1) y se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico y salmuera. El extracto (aproximadamente 200 ml) se secó sobre sulfato sódico. El extracto seco se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. A continuación la almohadilla se eluyó con una mezcla de hexano y EtOAc (95:5 a 90:10). A continuación la almohadilla se lavó con una mezcla de DCM/MeOH/Et₃N (85:15:1). El lavado de DCM/MeOH/Et₃N se concentró a sequedad, proporcionando el producto deseado como un aceite incoloro (302 mg, 0,38 mmol, 38 %).

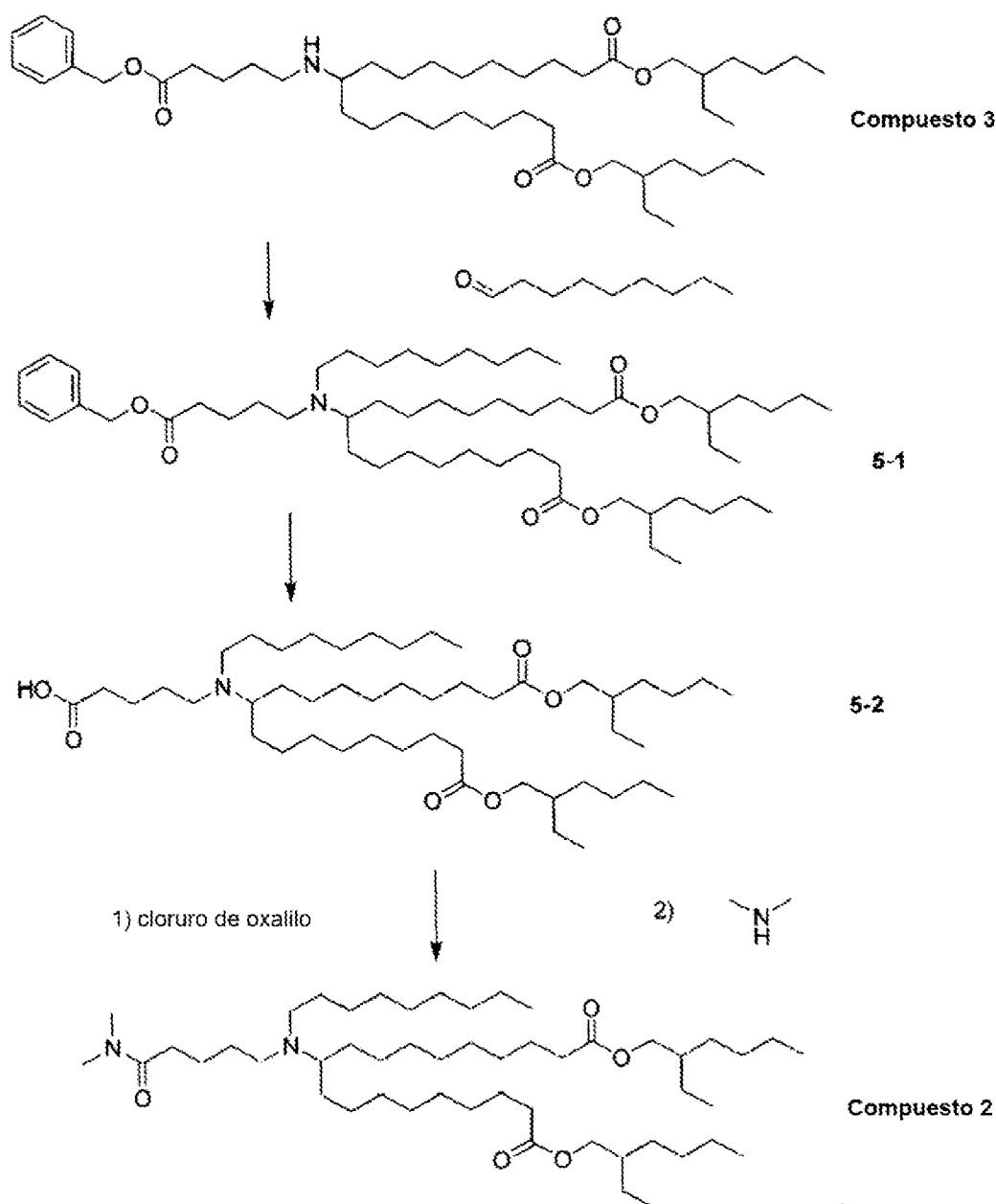
Síntesis del Compuesto 1

- Una solución de nonanal (3,5 eq, 1,33 mmol, 189 mg) y **4-5** (302 mg, 0,38 mmol) en 1,2-dicloroetano (5 ml) se agitó durante 15 min, después de lo cual triacetoxiborohidruro sódico (3,5 eq., (1,33 mmol, 282 mg) se añadió en una sola porción. La agitación se continuó a TA durante 16 horas. La mezcla se concentró. El residuo se llevó a una mezcla de hexano y acetato de etilo (ca 96:4), seguida de la adición de solución acuosa saturada de NaHCO₃ y de la separación de las dos fases. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró a través de una capa de gel de sílice. La almohadilla se lavó con una mezcla de hexano/acetato de etilo/trietilamina (80:20:1). El lavado se concentró para obtener el producto bruto deseado.

- El producto bruto (390 mg) se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna seca instantánea sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %). Esto dio el producto deseado como un aceite incoloro (117 mg, 0,13 mmol, 33 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 3,98 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,39-3,34 (m, 1H), 3,31-3,27 (m, 1H), 2,98, 2,92 (dos conjuntos de singlete, 3H en total), 2,40-2,28 (m, 9H), 2,09, 2,07 (dos conjuntos de singlete, 3H en total), 1,67-1,55 (m, 8H), 1,19-1,03 (70H), 0,93-0,86 (m, 15H). Usando los métodos descritos en el Ejemplo 2, se determinó que el pKa de este compuesto era 4,69.

- Ejemplo 5 (referencia)**

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 2



Síntesis de 5-1

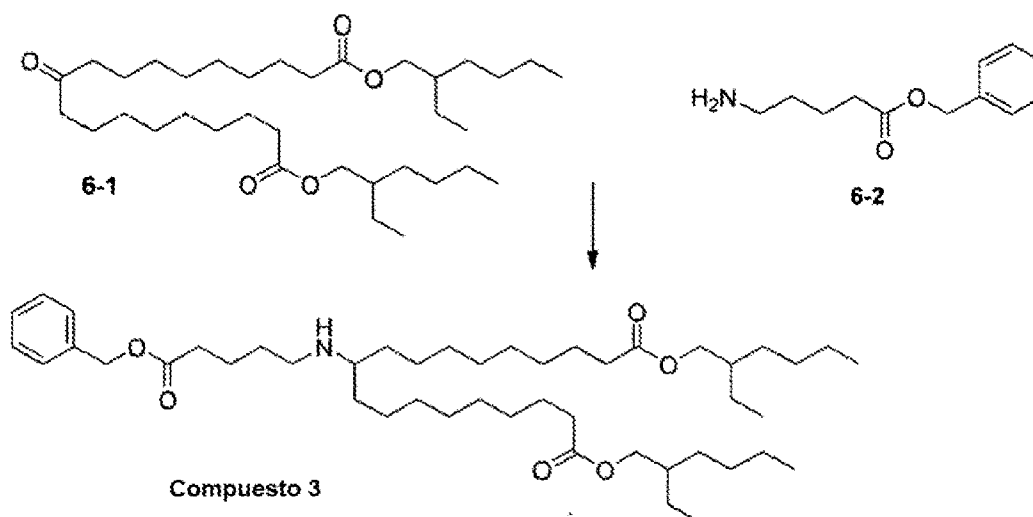
- 5 Una solución de nonanal (1,47 mmol, 209 mg) y **Compuesto 3** (245 mg, 0,32 mmol) en 1,2-dicloroetano (10 ml) se agitó durante 15 min, después de ese tiempo se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,47 mmol, 312 mg) en una sola porción. La agitación se continuó a TA durante 16 horas. La mezcla se concentró. El residuo se llevó a una mezcla de hexano y acetato de etilo (96:4), seguida de la adición de solución acuosa saturada de NaHCO_3 y de la separación de las dos fases. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró (410 mg, aceite incoloro). El producto bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de 5-2

- 15 Una solución de **5-1** (410 mg) que contenía Pd/C al 10 % (12 mg) en EtOH/EtOAc (1:10 ml) se agitó en hidrógeno durante 16 h. La reacción se diluyó con una mezcla de hexano y acetato de etilo (98:2) y se filtró a través de una almohadilla de Celite®. El filtrado se concentró (400 mg de aceite incoloro). El producto bruto (400 mg) se purificó de nuevo mediante cromatografía en columna seca sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 9 %). El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (245 mg de aceite incoloro, 0,31 mmol, 96 % para 2 etapas del **Compuesto 3**). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,03-3,95 (m, 4H), 2,85-2,76 (a, 1H), 2,69 (tipo t, 5,8 Hz, 2H), 2,63-2,57 (m, 2H), 2,36 (tipo t, 5,8 Hz, 2H), 2,31 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,74-1,52 (m, 12H), 1,45-1,15 (m, 52H), 0,93-0,86 (m, 15H).

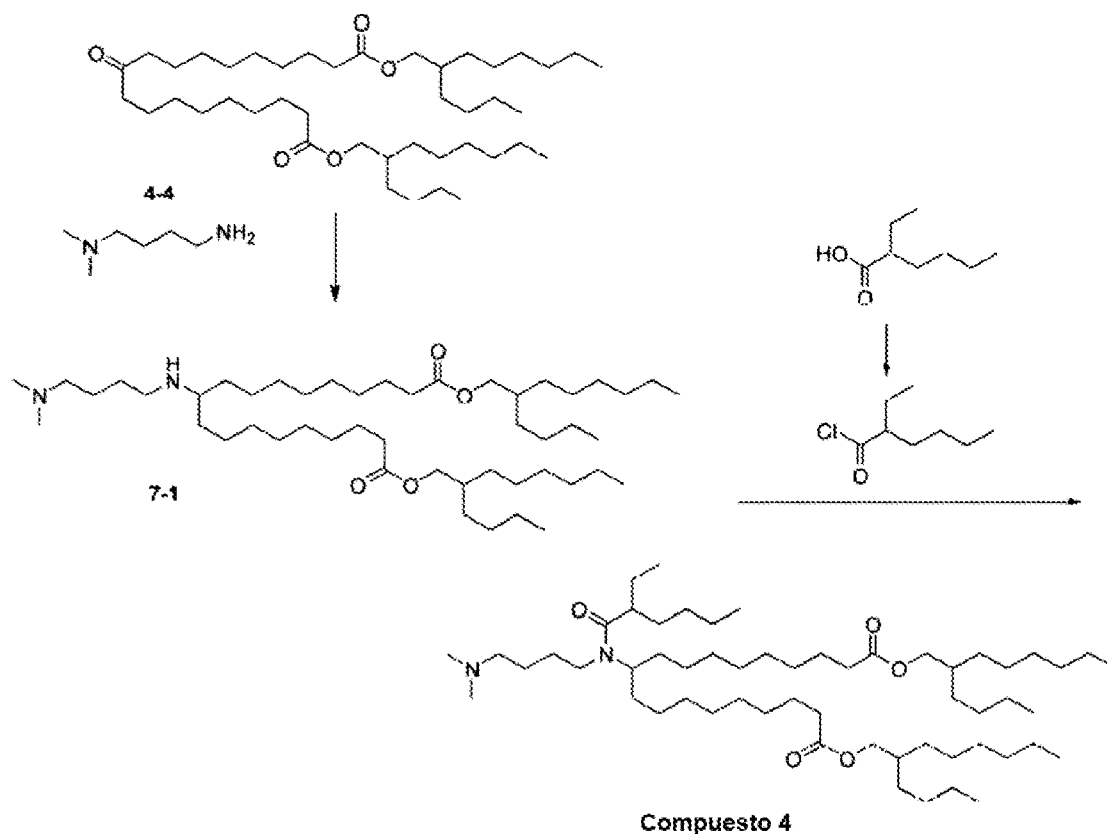
Síntesis del Compuesto 2

A una solución de **5-2** (200 mg, 0,252 mmol) en DCM (5 ml) y DMF (8 mg) se añadió cloruro de oxalilo (5 eq., 1,26 mmol, 160 mg) a TA en Ar. La mezcla se agitó a TA durante 3 h. La mezcla se concentró. El residuo se recogió en DCM (5 ml) y se concentró nuevamente hasta sequedad. El aceite residual (aceite amarillo) se disolvió en 5 ml de DCM y la solución se añadió gota a gota a una solución de dimetilamina (1 mmol, 0,5 ml de solución 2 M en THF) y trietilamina (1 mmol, 0,140 ml) y DMAP (2 mg) en DCM (5 ml) a temperatura ambiente. Después de la adición, la mezcla resultante se agitó a TA durante la noche, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se recogió en una mezcla de hexano/EtOAc/Et₃N (20 ml 70:30:1) y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se lavó con la misma mezcla de disolventes. El filtrado y el lavado combinados se concentraron para dar el producto deseado como un aceite incoloro (aceite incoloro, 133 mg, 0,16 mmol, 65 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,03-3,95 (m, 4H), 3,01 (s, 3H), 2,95 (s, 3H), 2,38-2,28 (m, 11H), 1,67-1,54 (m, 8H), 1,45-1,10 (m, 56H), 0,92-0,86 (m, 15H). Usando los métodos descritos en el Ejemplo 2, se determinó que el pKa de este compuesto era 4,74.

Ejemplo 6 (referencia)**SÍNTESIS DEL COMPUESTO 3**

Una solución de **6-1** (1 eq., 2,32 mmol, 1,315 g; preparada de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía) y **6-2** (1,1 eq. 2,55 mmol, 529 mg; preparada a partir de ácido 5-aminovalérico y alcohol bencílico) en DCE (20 ml) se agitó a TA en Ar durante 15 min. A la solución se le añadió triacetoxiborohidruro sódico (1,5 eq., 3,48 mmol, 738 mg) y AcOH (1,1 eq., 2,55 mmol, 153 mg; 0,144 ml). Después la mezcla se agitó a TA en atmósfera de Ar durante 2 días, se añadieron más **6-2** (500 mg) y triacetoxiborohidruro sódico (500 mg). Después de otro día, la mezcla de reacción se concentró. El residuo se diluyó con una mezcla de hexanos y EtOAc (19:1) y se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico y salmuera. El extracto (120 ml) se secó sobre sulfato de sodio durante la noche a TA. El extracto seco se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. A continuación la almohadilla se eluyó con una mezcla de hexano/EtOAc/Et₃N (90:10:0 a 80:20:1,5). El producto deseado se obtuvo como un aceite ligeramente amarillo (346 mg). El producto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna seca instantánea sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %). El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (317 mg, 0,42 mmol, 18 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,40-7,30 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 3,98 (d, 5,8 Hz, 4H), 2,56 (tipo t, 7,2 Hz, 2H), 2,46-2,36 (m, 3H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,75-1,44 (m, 10H), 1,40-1,14 (m, 40H), 0,92-0,87 (m, 12H), 0,84-0,72 (a. 0,9H).

Ejemplo 7 (referencia)**SÍNTESIS DEL COMPUESTO 4**



Síntesis de 7-1

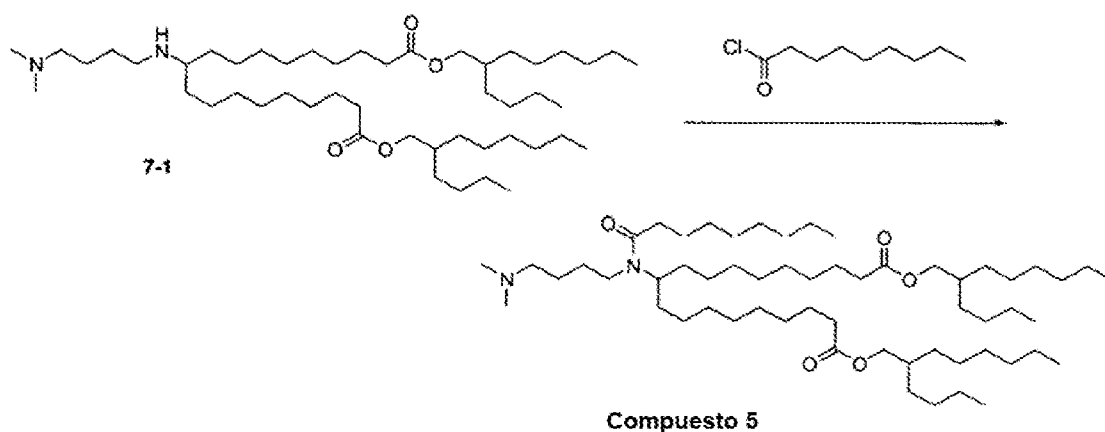
- 5 Una solución de **4-4** (1 eq., 1,657 g, 2,44 mmol) y 4-dimetilamino-1-butilamina (1,4 eq. 3,42 mmol, 397 mg) en DCE (15 ml) se agitó a TA en Ar durante 30 min. A la solución se le añadió triacetoxiborohidruro sódico (1,5 eq., 3,66 mmol, 776 mg) y AcOH (1,4 eq., 3,42 mmol, 205 mg). La mezcla se agitó a TA en atmósfera de Ar durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se diluyó con hexano-EtOAc (19:1, 150 ml) y se lavó con NaOH diluido, solución saturada de NaHCO₃ y salmuera. El extracto después de secarse sobre sulfato sódico se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se lavó con una mezcla de Hexano y EtOAc (9:1). A continuación la almohadilla se lavó con una mezcla de DCM/MeOH/Et₃N (85:15:1). El lavado de DCM/MeOH/Et₃N se concentró a sequedad, proporcionando el producto deseado como un aceite incoloro (1,642 g, 2,11 mmol, 86 %).

Síntesis del Compuesto 4

- 15 A una solución de ácido 2-etilhexanoico (1,32 mmol, 190 mg) en DCM (10 ml) y DMF (8 mg) se añadió cloruro de oxalilo (5,28 mmol, 671 mg) a TA. La mezcla se agitó a TA durante 16 h. La mezcla se concentró. El residuo se recogió en DCM (5 ml) y se concentró nuevamente a presión reducida (aproximadamente 40 mmHg) a 30 °C. El aceite residual (amarillo claro) se recogió en 5 ml de benceno y se añadió a una solución del compuesto **7-1**. (0,33 mmol, 257 mg) y trietilamina (0,3 ml) y DMAP (5 mg) en benceno (5 ml) a TA en 1 min. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. Se añadió MeOH (1 ml) para eliminar cualquier exceso de cloruro de acilo. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se lavó con una mezcla de hexano/EtOAc/Et₃N (70:30:1). La concentración del filtrado y el lavado dieron un aceite incoloro. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna instantánea seca sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %).
- 25 El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (264 mg, aceite incoloro, 0,29 mmol, 88 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,67-4,45 (a, estimado 0,4H, debido a la isomerización lenta alrededor del enlace amida), 3,97, 3,98 (dos conjuntos de doblete, 5,8 Hz, 4H), 3,70 (tipo quinteto, 7,0 Hz, 0,7H), 3,17-3,03 (m, 2H), 2,53 (tipo quinteto, 6,4 Hz, 0,4H), 2,42 (tipo quinteto, 6,4 Hz, 0,6 H), 2,32-2,25 (m, 6H), 2,23, 2,21 (dos conjuntos de singlete, 6H), 1,69-1,52 (m, 10H), 1,52-1,37 (m, 8H), 1,37-1,12 (56H), 0,92-0,85 (m, 18H).

Ejemplo 8 (referencia)

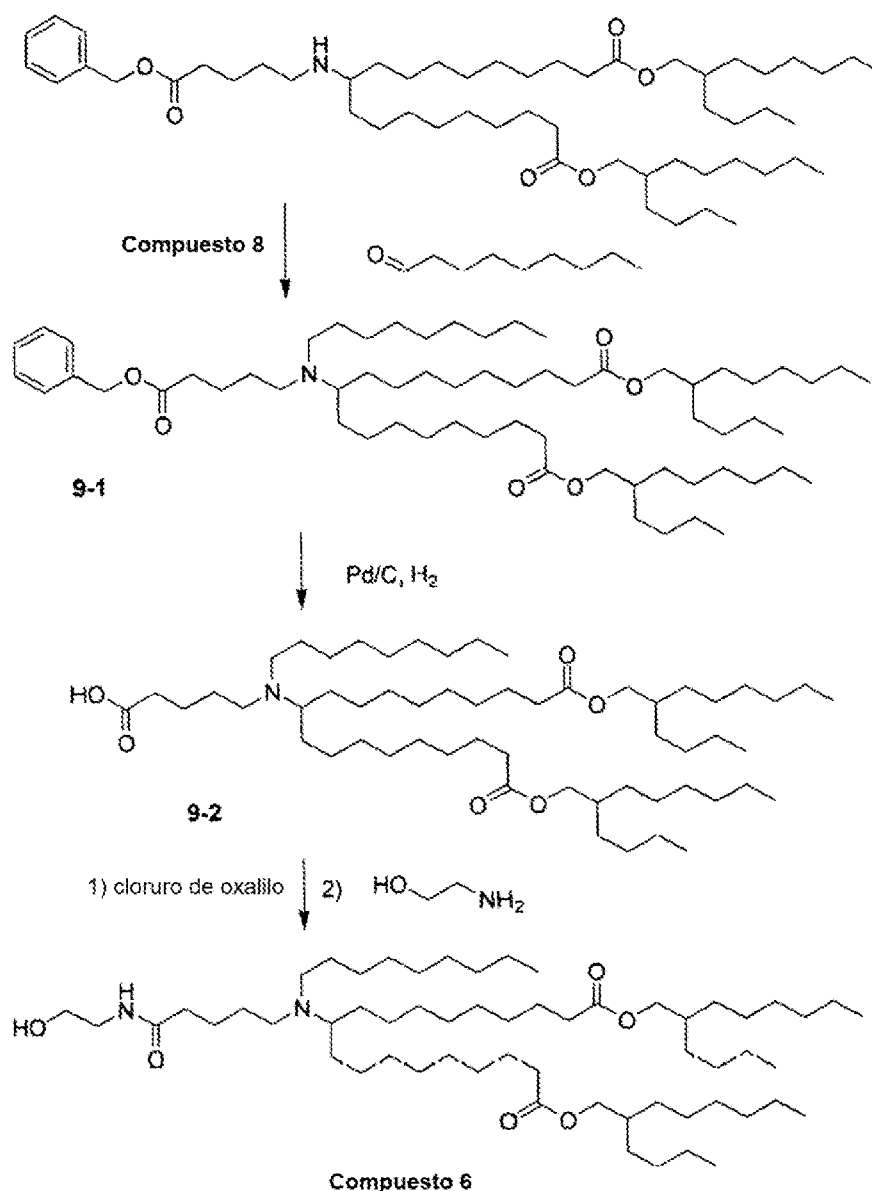
SÍNTESIS DEL COMPUESTO 5



Una solución de cloruro de nonanoílo (1,4 eq., 0,42 mmol, 74 mg) en benceno (5 ml) se añadió a una solución de compuesto **7-1** (0,3 mmol, 234 mg) y trietilamina (5 eq, 1,5 mmol, 152 mg) y DMAP (5 mg) en benceno (5 ml) a TA en 2 min. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. Se añadió MeOH (0,5 ml) para eliminar cualquier exceso de cloruro de acilo. Después de 16 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se lavó con una mezcla de hexano/EtOAc/Et₃N (70:30:1). La concentración del filtrado y el lavado dieron un aceite incoloro. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna instantánea seca sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %). El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (224 mg, aceite incoloro, 0,24 mmol, 81 %).

Ejemplo 9 (referencia)

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 6



Síntesis de 9-1

- 5 Una solución de nonanal (3,5 eq, 2,66 mmol, 377 mg) y **Compuesto 8** (660 mg, 0,76 mmol) en 1,2-dicloroetano (10 ml) se agitó durante 15 min, después de lo cual triacetoxiborohidruro sódico (3,5 eq., (2,66 mmol, 564 mg) se añadió en una sola porción. La agitación se continuó a TA durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se llevó a una mezcla de hexano y acetato de etilo (96:4, 150 ml), seguida de la adición de NaHCO₃ acuoso saturado y de la separación de las dos fases. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró (1,042 g, aceite incoloro). El producto bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de 9-2

- 15 Una solución del producto bruto (**9-1**, 1,0 g) del compuesto anterior que contenía Pd/C al 10 % (21 mg) en EtOH/EtOAc (20 ml, 2:18) se agitó en hidrógeno durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con una mezcla de hexano y acetato de etilo (98:2) y se filtró a través de una almohadilla de Celite®. El filtrado se concentró (940 mg de aceite incoloro). El producto bruto (940 mg) se purificó mediante cromatografía en columna seca sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 9 %). El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (618 mg de aceite incoloro, 0,68 mmol, rendimiento del 90 % para dos etapas).

Síntesis del Compuesto 6

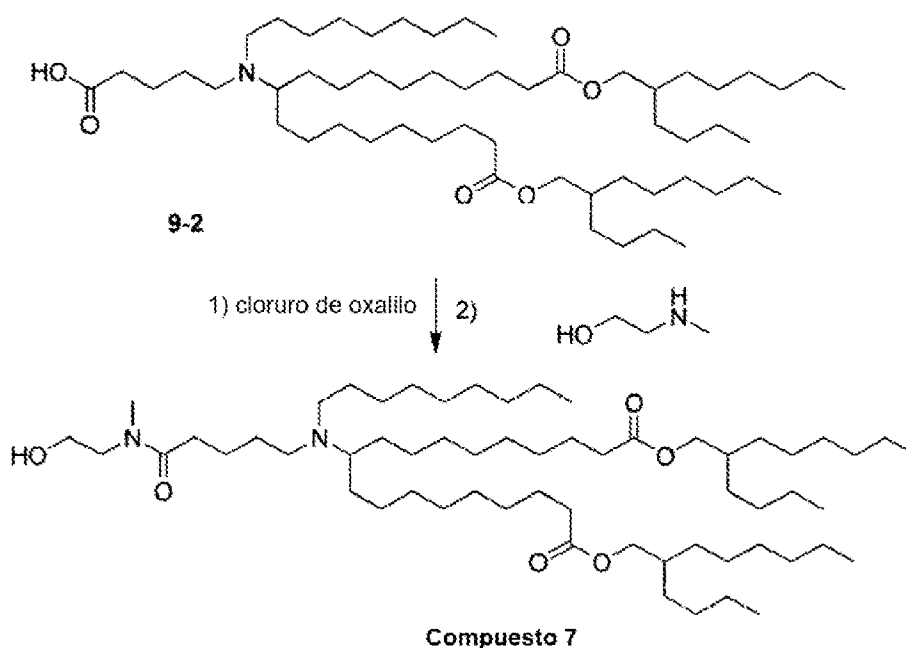
A una solución de **9-2** (618 mg, 0,68 mmol) en DCM (10 ml) y DMF (8 mg) se añadió cloruro de oxalilo (5 eq., 3,4 mmol, 431 mg, 0,297 ml) a TA en Ar. Después de que la mezcla de reacción se agitara a TA durante 16 h, la mezcla se

concentró a presión reducida. El residuo se recogió en DCM (5 ml) y se concentró nuevamente para eliminar cualquier cloruro de oxalilo a presión reducida. El aceite residual (amarillo) se disolvió en 16 ml de DCM. La mitad de la solución se añadió a una solución de 2-aminoetanol (1,5 mmol, 91,5 mg) y trietilamina (0,140 ml) y DMAP (2 mg) en DCM (5 ml) a -10 C (temperatura del baño de enfriamiento) en 2 min. Después de la adición, se dejó que el baño de enfriamiento alcanzara la temperatura ambiente durante la noche.

La mezcla de reacción se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna seca sobre gel de sílice (hexano-EtOAc-Et₃N, 95:5:0 a 80:20:0,5). El producto deseado se obtuvo como un aceite ligeramente amarillo (241 mg, 0,25 mmol, rendimiento del 75 % para dos etapas). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 6,00 (triplete no bien resuelto, 5,0 Hz, 1H), 3,98 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,73 (tipo t, 5,4 Hz, 2H), 3,43 (tipo c, promedio 5,2 Hz, 2H), 2,90-2,63 (a. 1H), 2,37-2,28 (m, 9H), 2,22 (tipo t, 7,6 Hz, 2H), 1,69-1,57 (m, 8H), 1,44-1,18 (72H), 0,92-0,87 (m, 15H).

Ejemplo 10 (referencia)

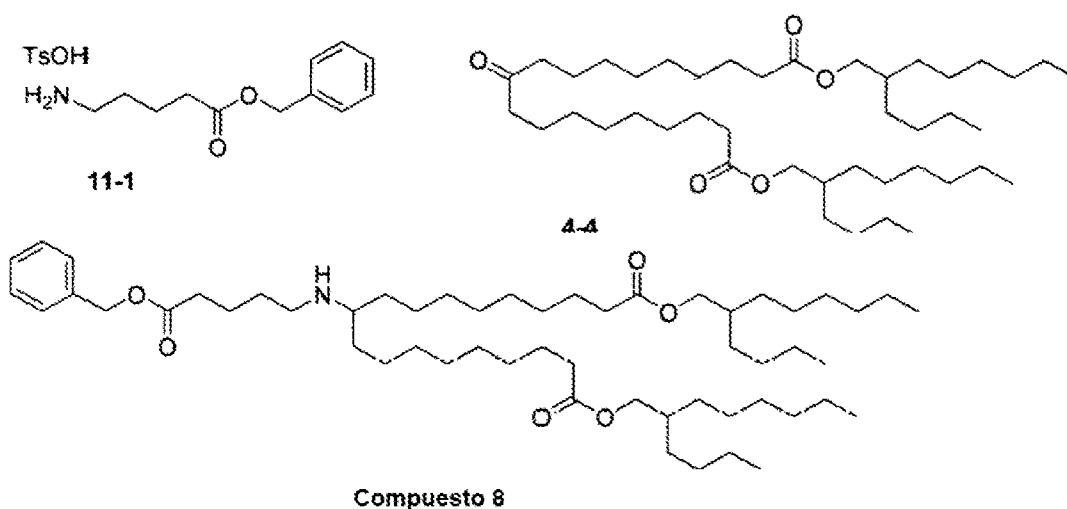
SÍNTESIS DEL COMPUESTO 7



La otra mitad del cloruro de acilo del Ejemplo 9 se añadió a una solución de 2-(metilamino)etanol (1,5 mmol, 113 mg, 0,120 ml) y trietilamina (0,140 ml) y DMAP (2 mg) en DCM (5 ml) a -10 C (temperatura del baño de enfriamiento) en 2 min. Después de la adición, se dejó que el baño de enfriamiento alcanzara la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna seca sobre gel de sílice (hexano-EtOAc-Et₃N, 95:5:0 a 80:20:0,5). El producto deseado se obtuvo como un aceite ligeramente amarillo (273 mg, 0,28 mmol, rendimiento del 83 % para dos etapas). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 3,98 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,79 (tipo c, promedio 4,8 Hz, 2H), 3,56 (tipo t, promedio 5,0 Hz, 1,6H), 3,48 (tipo t, promedio 5,7 Hz, 0,4H), 3,18 (t, 4,8 Hz, 1H, OH), 3,08 (s, 2,3H), 2,97 (s, 0,7H), 2,42-2,28 (m, 11H), 1,68-1,57 (m, 8H), 1,49-1,18 (72H), 0,92-0,87 (m, 15H).

Ejemplo 11 (referencia)

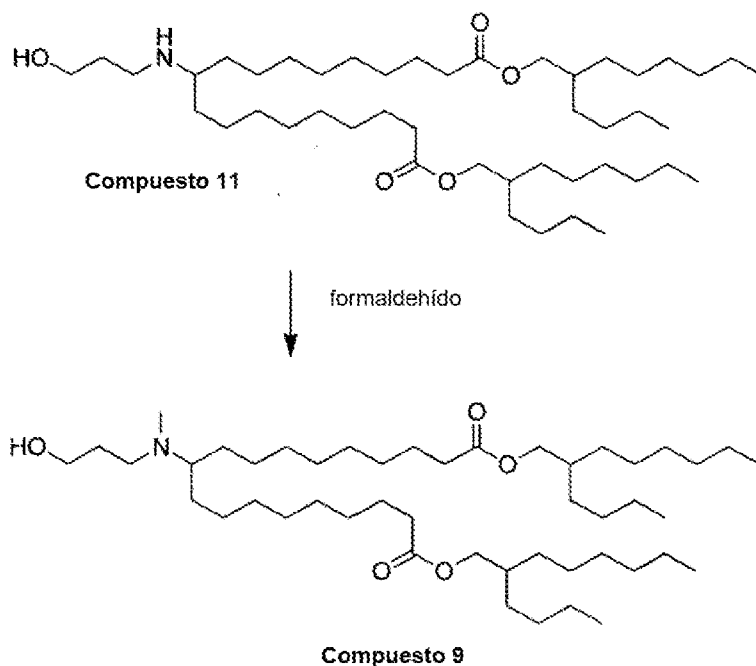
SÍNTESIS DEL COMPUESTO 8



Una solución de **4-4** (2,8 mmol, 1,92 g) y **11-1** como sal de ácido tolueno sulfónico (4,7 mmol, 1,79 g) en DCE (20 ml) se agitó a temperatura ambiente en Ar durante 15 min. A la solución se le añadió triacetoxiborohidruro sódico (1,2 g) y AcOH (2,55 mmol, 153 mg). La mezcla se agitó a TA en atmósfera de Ar durante 2 días. Se añadió más triacetoxiborohidruro sódico (500 mg). La agitación se continuó durante otros 3 días. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se diluyó con hexanos/EtOAc (19:1, 110 ml) y se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico y salmuera. El extracto se secó sobre sulfato de sodio durante la noche a TA. El extracto seco se cargó sobre una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se eluyó con una mezcla de hexano/EtOAc/Et₃N (95:5:0 a 80:20:0,5). El producto deseado se obtuvo como un aceite ligeramente amarillo (766 mg, 0,88 mmol, 31 % de rendimiento junto con 58 % de **4-4** recuperado, o 73 % de rendimiento basado en el material de partida recuperado). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,40-7,30 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 3,98 (d, 5,8 Hz, 4H), 2,56 (tipo t, 7,2 Hz, 2H), 2,46-2,36 (m, 3H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,75-1,44 (m, 10H), 1,40-1,14 (m, 56H), 0,92-0,87 (m, 12H), 0,84-0,72 (a. 0,9H).

Ejemplo 12

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 9

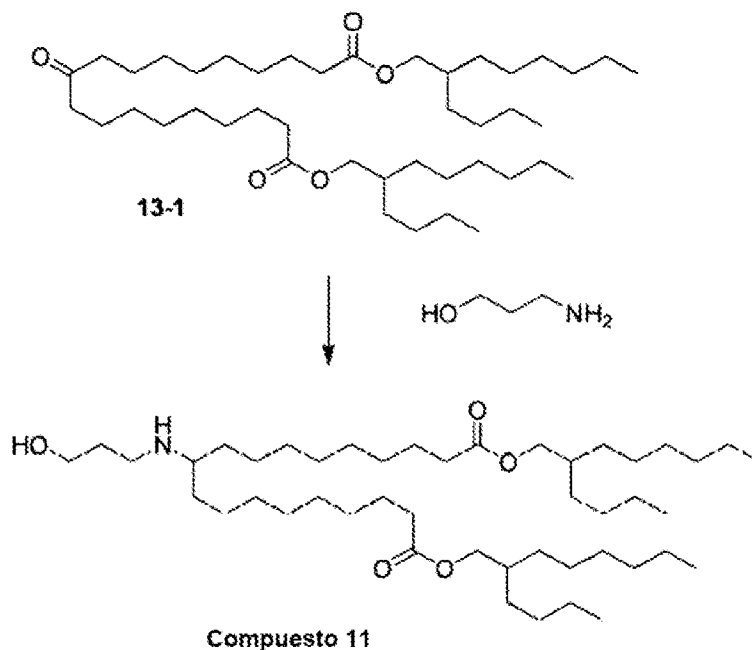


A una solución de **Compuesto 11** (250 mg, 0,34 mmol) en THF (5 ml) se añadió solución de formaldehído (570 mg de solución al 37 % en agua) a TA. La mezcla resultante se agitó durante 30 min antes de introducir triacetoxiborohidruro sódico (5 eq., 1,7 mmol, 360 mg). Se continuó la agitación en Ar a TA durante la noche. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se tomó en una mezcla de hexano y acetato de etilo (95:5) y se lavó con solución

saturada de bicarbonato sódico. Después de secarse sobre sulfato sódico, la solución se concentró y se obtuvo un aceite incoloro. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna instantánea seca sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %). El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (217 mg de aceite incoloro, 0,29 mmol, 85 % de rendimiento). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,83-5,42 (a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,80 (t, 5,1 Hz, 2H), 2,69 (t, 5,4 Hz, 2H), 2,49-2,40 (m, 1H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 2,19 (s, 3H), 1,71-1,58 (m, 8H), 1,48-1,38 (m, 2H), 1,38-1,18 (54H), 0,92-0,87 (m, 12H).

Ejemplo 13 (referencia)

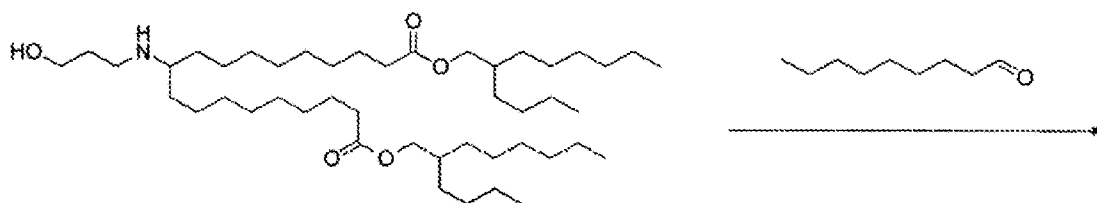
10 SÍNTESIS DEL COMPUESTO 11



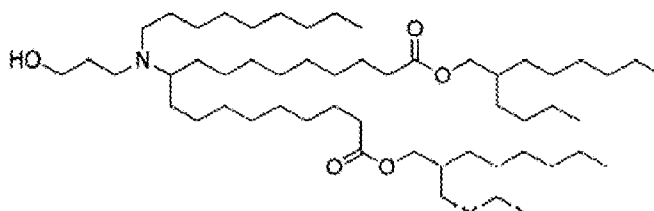
Una solución de **13-1** (1 eq., 1,36 g, 2 mmol; preparada de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía) y 3-amino-1-propanol (1,4 eq., 2,8 mmol, 210 mg) en DCE (12 ml) se agitó a temperatura ambiente en Ar durante aproximadamente 15 min. A la solución se le añadió triacetoxiborohidruro sódico (2 eq., 4 mmol, 0,848 g) y AcOH (1,4 eq., 2,8 mmol, 168 mg). La mezcla se agitó a TA en atmósfera de Ar durante 1 días. Se añadió más triacetoxiborohidruro sódico (0,4 g). Después de continuar agitando durante otro día, se añadió más triacetoxiborohidruro sódico (0,4 g). Después de agitar la mezcla durante 7 días en total, la mezcla de reacción se concentró. El residuo se diluyó con hexanos (200 ml) y se lavó con NaOH diluido, solución saturada de NaHCO_3 . El extracto (secado sobre sulfato sódico) se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. El **13-1** sin reaccionar (0,495 g, aceite incoloro, 0,73 mmol, 36 % de recuperación) se recuperó lavando la almohadilla con una mezcla de hexano y EtOAc (95:5). El producto deseado se obtuvo como un aceite ligeramente amarillo (782 mg, 1,06 mmol, 52 %) lavando posteriormente la almohadilla con una mezcla de DCM/MeOH/Et3N (94:6:0,5). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 6,05-5,37 (a, 1H), 3,98 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,86 (tipo t, 5,3 Hz, 2H), 3,03 (tipo t, 5,5 Hz, 2H), 2,75 (tipo quinteto, 5,9 Hz, 1H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,89 (tipo quinteto, 5,3 Hz, 2H), 1,68-1,49 (m, 11H), 1,41-1,20 (52H), 0,92-0,86 (m, 12H). Usando los métodos descritos en el Ejemplo 2, se determinó que el pKa de este compuesto era 8,04.

Ejemplo 14 (referencia)

30 SÍNTESIS DEL COMPUESTO 12



Compuesto 11

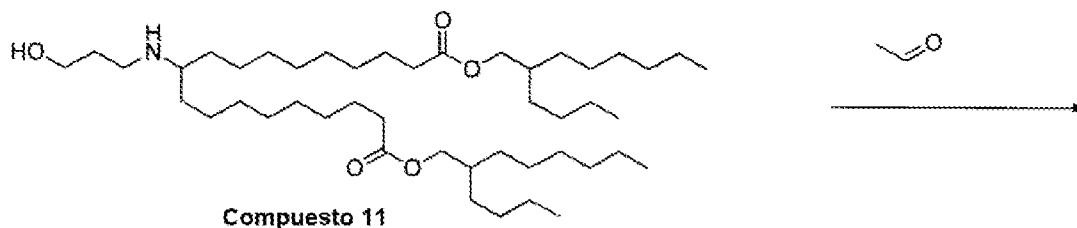


Compuesto 12

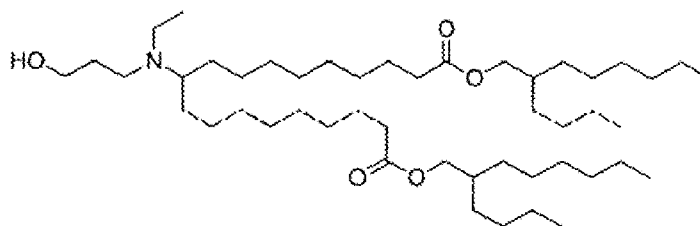
Una solución de nonanal (1,2 eq, 0,24 mmol, 34 mg) y Compuesto 11 (150 mg, 0,20 mmol) en 1,2-dicloroetano (5 ml) se agitó durante 15 min, después de lo cual se añadió triacetoxiborohidruro sódico (1,1 eq., (0,22 mmol, 46 mg) se añadió en una sola porción. La agitación se continuó a TA durante 16 horas. Se añadió más nonanal (0,082 ml) y borohidruro (92 mg). El calentamiento se continuó a TA durante otros 3 días. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se diluyó con hexanos y se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico y salmuera. El extracto se secó sobre sulfato sódico. El extracto seco se cargó sobre una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se eluyó con una mezcla de hexano/EtOAc/Et₃N (95:5:0 a 80:20:0,5). El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (130 mg, 0,15 mmol, rendimiento del 75 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,28 (a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,78 (t, 4,9 Hz, 2H), 2,63 (t, 5,5 Hz, 2H), 2,49 (quinteto, 6,1 Hz, 1H), 2,39-2,34 (m, 2H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,68-1,58 (m, 8H), 1,50-1,40 (m, 4H), 1,38-1,10 (66H), 0,93-0,87 (m, 15H). Usando los métodos descritos en el Ejemplo 2, se determinó que el pKa de este compuesto era 4,84.

Ejemplo 15

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 13



Compuesto 11



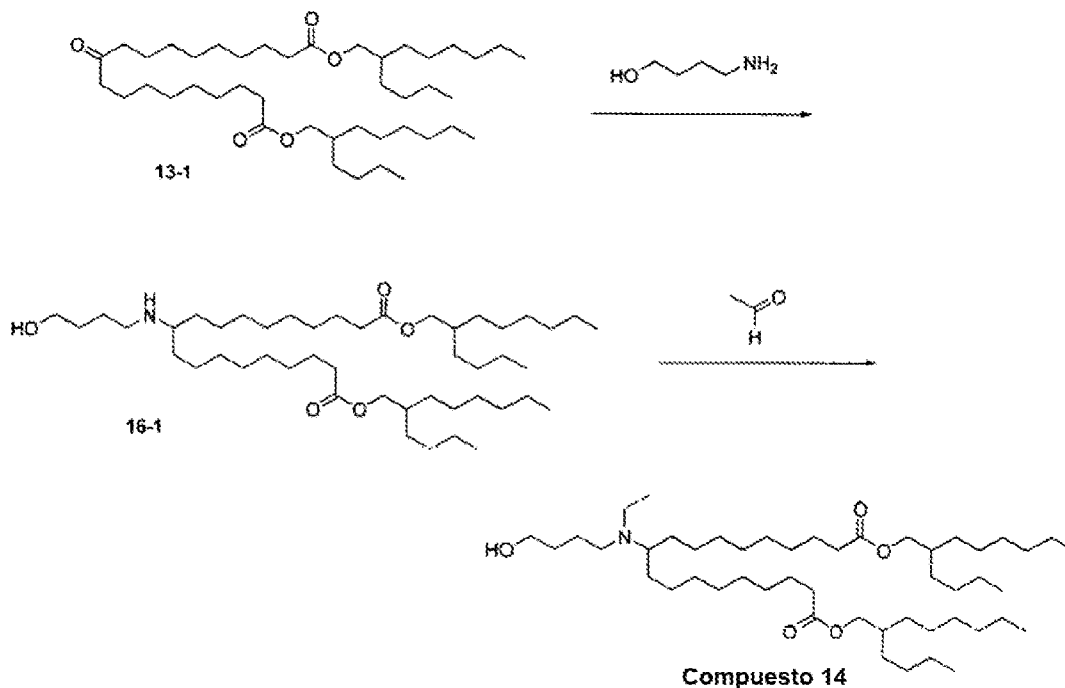
Compuesto 13

A una solución de Compuesto 11 (250 mg, 0,34 mmol) en DCE (5 ml) se añadió acetaldehído (4 mmol, 176 mg, 0,22 ml, d 0,785) a TA. La mezcla resultante se agitó durante 15 min antes de introducir triacetoxiborohidruro sódico (5 eq., 1,7 mmol, 360 mg). La mezcla se agitó a TA durante la noche. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se tomó en una mezcla de hexano y acetato de etilo (95:5) y se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico.

Después de secarse sobre sulfato sódico, la solución se concentró y se obtuvo un aceite incoloro. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna instantánea seca sobre gel de sílice (MeOH en cloroformo, del 0 al 5 %). El producto deseado se obtuvo como un aceite incoloro (155 mg, 0,2 mmol, rendimiento del 60 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,51-5,37 (a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,79 (t, 5,1 Hz, 2H), 2,65 (t a., 5,0 Hz, 2H), 2,56-2,42 (m, 3H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,70-1,58 (m, 8H), 1,49-1,39 (m, 2H), 1,38-1,17 (54H), 1,07 (t, 7,0 Hz, 3H), 0,92-0,87 (m, 12H).

Ejemplo 16

10 SÍNTESIS DEL COMPUESTO 14



Síntesis de 16-1

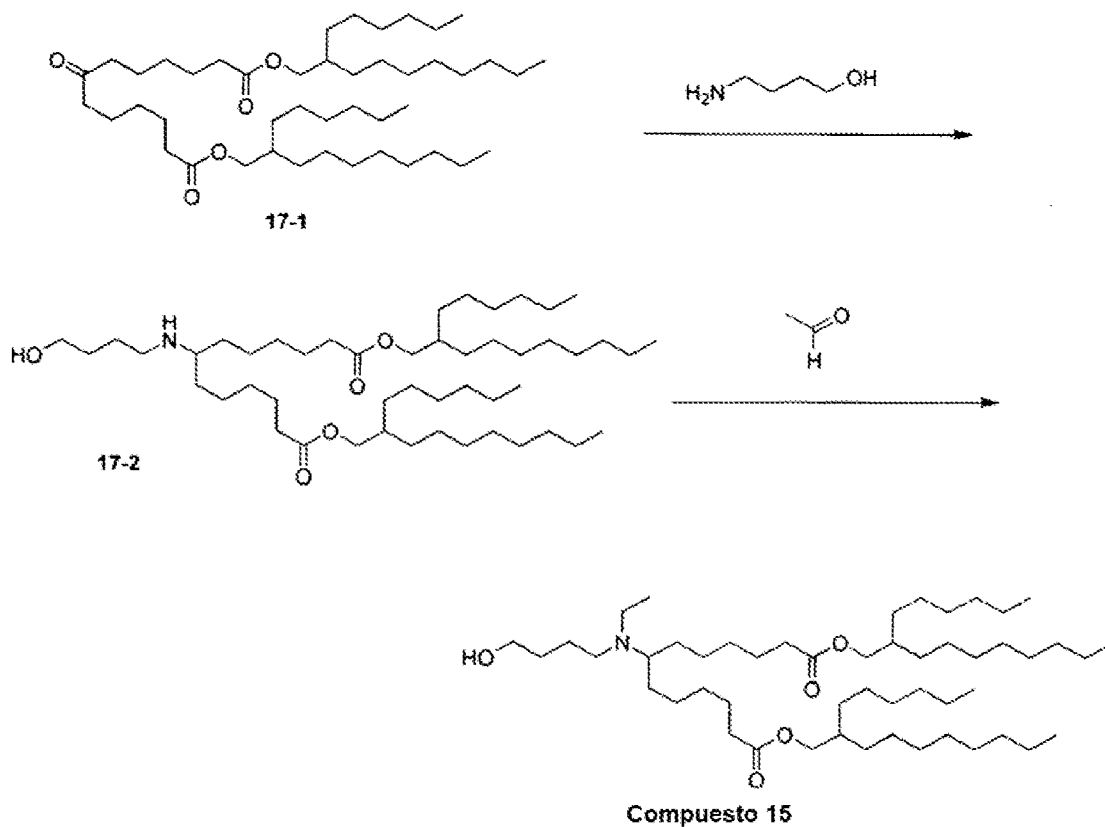
15 **16-1** (aceite incoloro, 681 mg, 0,91 mmol, 68 %) se preparó a partir de **13-1** y 4-amino-1-butanol de manera similar a la descrita para el Compuesto 11.

Síntesis del Compuesto 14

20 El Compuesto 14 (aceite ligeramente amarillo, 197 mg, 0,25 mmol, 56 %) se preparó a partir de **16-1** y acetaldehído de manera similar a la descrita para el Compuesto 13. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,99 (s a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,57 (t, 5,2 Hz, 2H), 2,54-2,39 (m, 5H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,69-1,56 (m, 10H), 1,51-1,41 (m, 2H), 1,38-1,12 (54H), 1,04 (t, 7,2 Hz, 3H), 0,92-0,87 (m, 12H).

Ejemplo 17

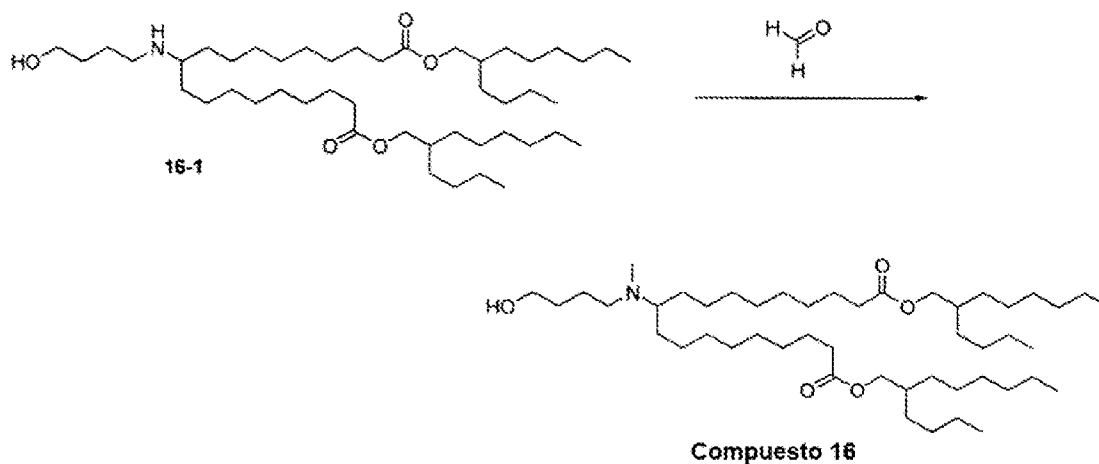
SÍNTESIS DEL COMPUESTO 15

**Síntesis de 17-2**

- 5 **17-2** (aceite incoloro, 295 mg 0,39 mmol, 29 %) se preparó a partir de **17-1** (preparado de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía) y 4-amino-1-butanol de manera similar a la descrita para el Compuesto 11.

Síntesis del Compuesto 15

- 10 El Compuesto 15 (72 mg, aceite incoloro, 0,09 mmol, 47 %) se preparó a partir de **17-2** y acetaldehído de manera similar a la descrita para el Compuesto 13. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,73-4,57 (a. 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,58 (a. tipo t, 5,0 Hz, 2H), 2,62-2,36 (m, 5H), 2,31 (t, 7,5 Hz, 4H), 1,70-1,56 (m, 10H), 1,51-1,41 (m, 2H), 1,40-1,17 (58H), 1,04 (t, 6,8 Hz, 3H), 0,91-0,87 (m, 12H).

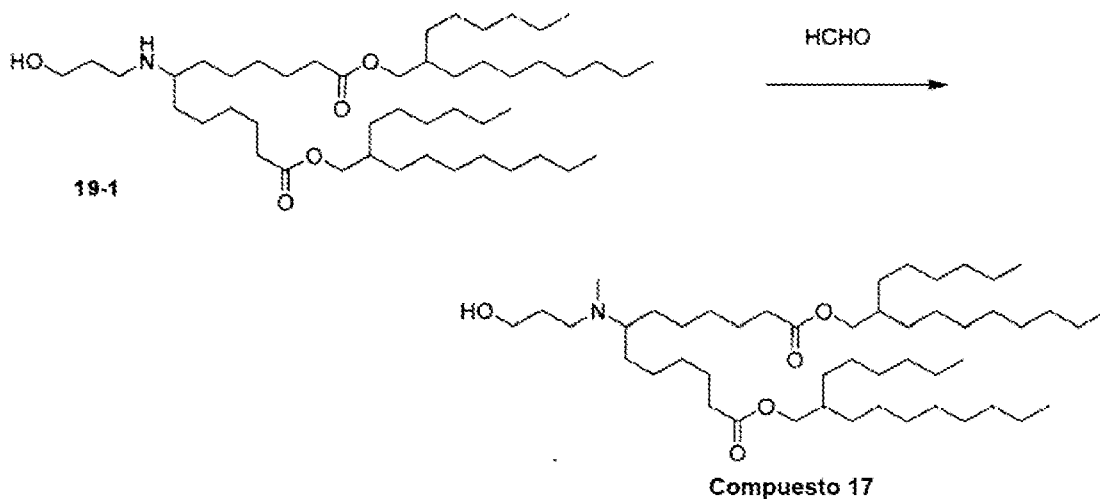
15 Ejemplo 18**SÍNTESIS DEL COMPUESTO 16**

El Compuesto 16 (219 mg, aceite incoloro, 0,28 mmol, 64 %) se preparó a partir de **16-1** y formaldehído de manera similar a la descrita para el Compuesto 9. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 6,10-5,80 (a. 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,61-3,55 (a. 2H), 2,60-2,33 (a. 3H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 2,23-2,10 (a. 3H), 1,70-1,58 (m, 10H), 1,52-1,40 (m, 2H), 1,38-1,17 (54H), 0,92-0,87 (m, 12H).

5

Ejemplo 19

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 17



10

Síntesis de 19-1

19-1 (ligeramente amarillo, 211 mg, 0,28 mmol, 46 %) se preparó a partir de **17-1** y 3-amino-1-propanol de manera similar a la descrita para el Compuesto 11.

15

Síntesis del Compuesto 17

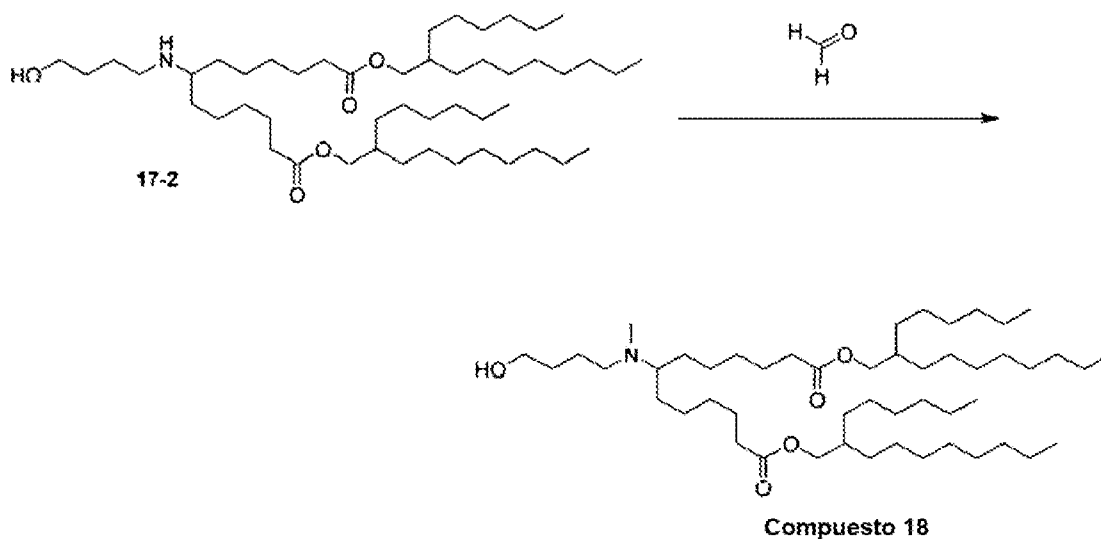
El compuesto 17 (aceite incoloro, 39 mg) se preparó a partir de **19-1** y formaldehído de manera similar a la descrita para el Compuesto 9. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,47 (s a, 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,80 (t, 5,1 Hz, 2H), 2,68 (t, 5,5 Hz, 2H), 2,45 (quinteto, 6,4 Hz, 1H), 2,31 (t, 7,5 Hz, 4H), 2,18 (s, 3H), 1,71-1,58 (m, 8H), 1,49-1,39 (m, 2H), 1,38-1,18 (54H), 0,92-0,87 (m, 12H).

20

Ejemplo 20

25

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 18



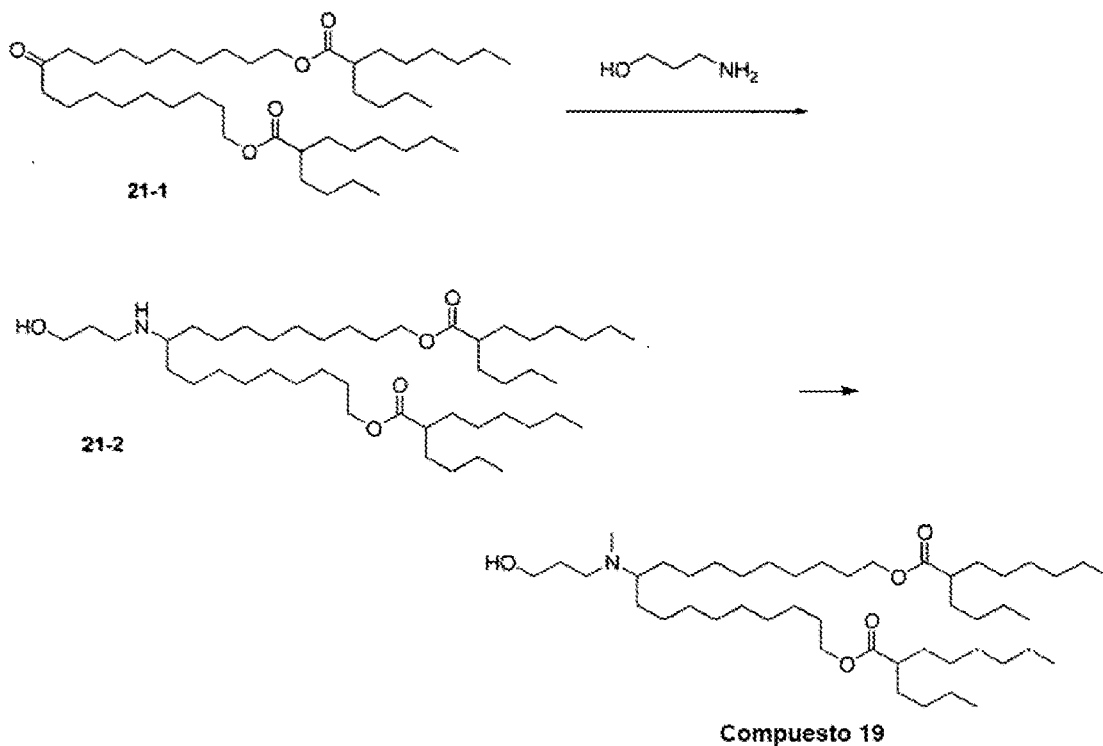
El Compuesto 18 (96 mg, aceite incoloro, 0,12 mmol, 64 %) se preparó a partir de **17-2** y formaldehído de manera

30

similar a la descrita para el Compuesto 9. RMN ^1H (400 MHz, CDC13) δ : 5,81-5,51 (a. 1H), 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,64-3,54 (a. 2H), 2,60-2,33 (a. 3H), 2,30 (t, 7,5 Hz, 4H), 2,23-2,10 (a. 3H), 1,70-1,43 (m, 12H), 1,43-1,17 (58H), 0,91-0,87 (m, 12H).

5 Ejemplo 21

SÍNTESIS DEL COMPUESTO 19



10

Síntesis de 21-2

21-2 (aceite incoloro, 338 mg 0,46 mmol, 47 %) se preparó a partir de **21-1** (preparado de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía) y 3-amino-1-propanol de manera similar a la descrita para el Compuesto 11.

15

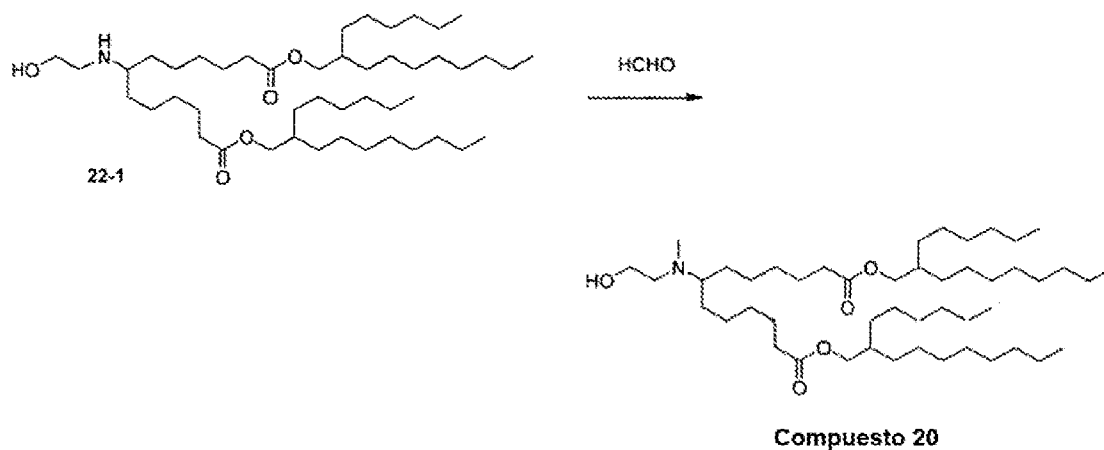
Síntesis del Compuesto 19

El Compuesto 19 (aceite incoloro, 318 mg, 0,42 mmol, 92 %) se preparó a partir de **21-2** y formaldehído de manera similar a la descrita para el Compuesto 9. RMN ^1H (400 MHz, CDC13) δ : 5,65-5,61 (a. 1H), 4,07 (t, 6,6 Hz, 4H), 3,80 (t, 5,1 Hz, 2H), 2,69 (t, 5,4 Hz, 2H), 2,49-2,40 (m, 1H), 2,35-2,28 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 1,71-1,54 (m, 12H), 1,49-1,38 (m, 6H), 1,38-1,10 (48H), 0,91-0,87 (m, 12H).

20

Ejemplo 22

25 SÍNTESIS DEL COMPUESTO 20



Síntesis de 22-1

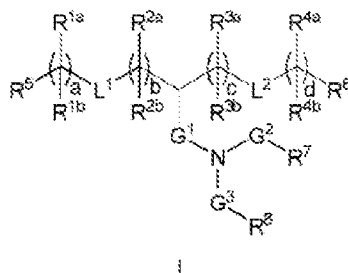
- 5 **22-1** (ligeramente amarillo, 385 mg, 0,51 mmol, 85 %) se preparó a partir de **17-90** (preparado de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía) y etanolamina de manera similar a la descrita para el Compuesto 11.

Síntesis del Compuesto 20

- 10 El Compuesto 20 (aceite incoloro, 250 mg, 0,33 mmol, 64 %) se preparó a partir de **22-1** y formaldehído de manera similar a la descrita para el Compuesto 9. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,97 (d, 5,8 Hz, 4H), 3,53 (t, 5,4 Hz, 2H), 3,14-2,99 (a., 1H), 2,59 (t, 5,4 Hz, 2H), 2,36 (quinteto, 6,4 Hz, 1H), 2,31 (t, 7,5 Hz, 4H), 2,16 (s, 3H), 1,67-1,39 (m, 10H), 1,38-1,18 (5611), 0,89 (tipo t, 6,8 Hz, 12H).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura de Fórmula I:



5

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

L¹ y L² son cada uno independientemente -O(C=O)-, -(C=O)O- o un enlace directo;

G¹ es -(C=O)- o un enlace directo;

10 G² es un enlace directo;

G³ es alquileo C₂-C₅;

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

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

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

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

R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente H o metilo;

25 R⁷ es alquilo C₁-C₂;

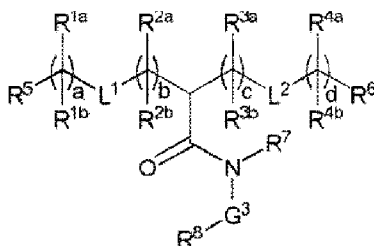
R⁸ es OH; y

a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 4 a 12.

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

30 L¹ y L² son cada uno independientemente -O(C=O)- o -(C=O)O-.

3. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la siguiente estructura (IB):



(IB)

35

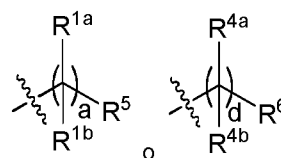
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:

i) uno de L¹ o L² es -O(C=O)-;

ii) cada uno de L¹ y L² son -O(C=O)-;

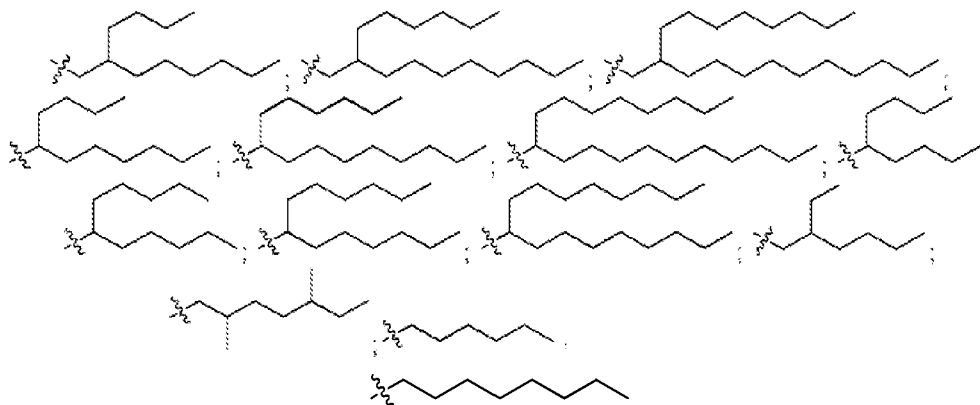
iii) uno de L¹ o L² es -(C=O)O-; o

40 iv) cada uno de L¹ y L² es -(C=O)O-.



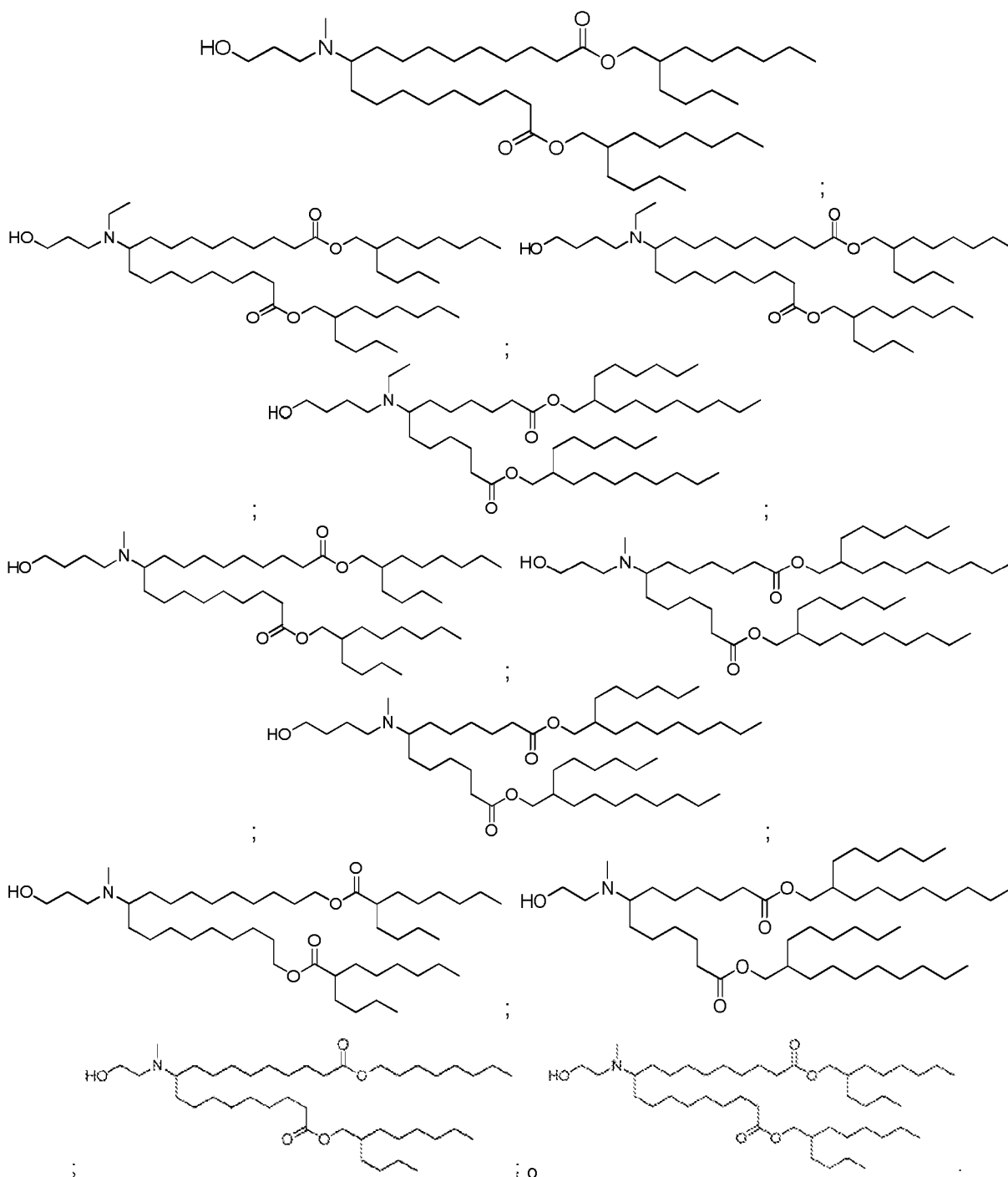
5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde

independientemente una de las estructuras siguientes:



o

- 5
6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:
- i) a, b, c y d son cada uno independientemente un número entero de 5 a 9;
 - ii) al menos uno de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} y R^{4a} es H;
 - iii) R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} y R^{4a} son H en cada aparición;
- 10 iv) al menos uno de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} y R^{4a} es alquilo C_1 - C_8 , preferentemente el alquilo C_1 - C_8 es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, *terc*-butilo, n-hexilo o n-octilo;
- b) al menos uno de R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} y R^{4b} es H; o
 - vi) R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} y R^{4b} son H en cada aparición.
- 15
7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:
- i) uno de R^5 o R^6 es metilo; o
 - ii) cada uno de R^5 y R^6 es metilo.
- 20
8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde:
- i) G^3 es alquileno C_2 - C_4 ;
 - ii) G^3 es alquileno C_3 ; o
 - ii) G^3 es alquileno C_4 .
- 25
9. El compuesto de la reivindicación 8, en donde R^7 es metilo.
10. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene una de las estructuras siguientes:



11. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y:

- i) un agente terapéutico;
- ii) un agente terapéutico que comprende un ácido nucleico; o
- iii) un agente terapéutico que comprende un ácido nucleico seleccionado de ARN antisentido y ARN mensajero.

12. La composición de la reivindicación 11 para su uso en un método para administrar el agente terapéutico a un paciente que lo necesita.

13. Una nanopartícula lipídica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

14. Una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula lipídica de la reivindicación 13 y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.