



MD/EP 3386484 T2 2022.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3386484 (13) T2

(51) Int. Cl: A61K 9/127 (2006.01.01)  
A61K 9/133 (2006.01.01)  
C12N 15/88 (2006.01.01)  
A61K 31/7088 (2006.01.01)  
A61K 47/14 (2017.01.01)  
A61K 47/18 (2017.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2018 0986</p> <p>(22) Data de depozit: 2016.12.10</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16873489.5, 2016.12.10</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3386484, 2018.10.17</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201562265973 P; 201562266581 P; 201662311388 P; 201662311386 P; 201662311380 P; 201662350172 P; 201662350165 P; 201662413027 P; 201662413050 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.12.10; 2015.12.12; 2016.03.21; 2016.03.21; 2016.03.21; 2016.06.14; 2016.06.14; 2016.10.26; 2016.10.26</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US; US; US; US; US; US; US; US; US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 11/2022, 2022.11.30</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 13/2022, 2022.03.30</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 11/2018, 2018.11.30</p>
<p>(71) Solicitant: MODERNATX, INC., US</p> <p>(72) Inventatori: BESIN Gilles, US; HOGE Stephen, US; SENN Joseph, US; BENENATO Kerry, US; SABNIS Staci, US</p> <p>(73) Titular: MODERNATX, INC., US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia</p>	

(54) Compoziții și metode de livrare a unor agenți terapeutici

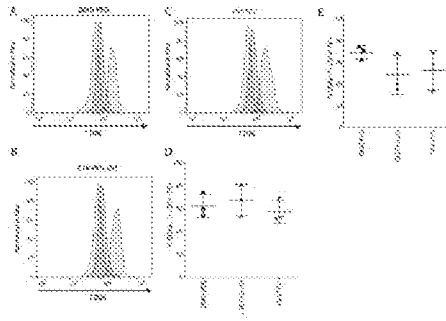
(57) Rezumat:

1  
Această dezvăluire furnizează compoziții îmbunătățite pe bază de lipide, inclusiv compoziții de nanoparticule lipidice și metode de utilizare a acestora pentru eliberarea de agenți in vivo, inclusiv acizi nucleici și

2  
proteine. Aceste compoziții nu sunt supuse clearance-ului sanguin accelerat și au un profil de toxicitate îmbunătățit in vivo.

Revendicări: 19  
Figuri: 93

MD/EP 3386484 T2 2022.11.30



## (54) Compositions and methods for delivery of therapeutic agents

### (57) Abstract:

1  
This disclosure provides improved lipid-based compositions, including lipid nanoparticle compositions, and methods of use thereof for delivering agents in vivo including nucleic acids and proteins. These compositions are not subject to accelerated blood clearance

2  
and they have an improved toxicity profile in vivo.

Claims: 19

Fig.: 93

**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****BAZELE INVENȚIEI**

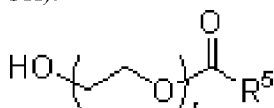
5 Eficiența livrării *in vivo* a unor agenți activi, cum ar fi medicamente cu molecule mici, proteine, peptide și acizi nucleici reprezintă o provocare medicală continuă. Unii agenți activi sunt recunoscuți de sistemul imunitar, ceea ce conduce la scăderea eficacității. Pentru a aborda această problemă, anumite formulări de agenți activi au polimeri încorporați, cum ar fi polietilen glicolul, despre care se credea că îmbracă sau maschează agentul, reducând astfel antigenitatea și imunogenitatea acestuia. Cu toate acestea, chiar și aceste formulări "ascunse" au limitările lor, incluzând incapacitatea de a fi dozate repetat și frecvent, de exemplu, pe o perioadă de zile fără pierderea activității.

10 În plus, unii agenți sau formulări atunci când se administrează *in vivo* pot interacționa cu una sau mai multe celule sau factori, interferând potențial cu funcțiile lor și, în cele din urmă, conducând la efecte adverse. Astfel de efecte adverse pot limita frecvența de administrare și/sau doza administrată a agentului sau pot împiedica total utilizarea *in vivo*.

15 WO2013/086373 se referă la lipide pentru eliberarea de agenți activi. WO2015/058069 se referă la compoziții și metode pentru tolerarea sistemelor celulare. WO2015/199952 se referă la noi lipide pentru livrarea acizilor nucleici.

**REZUMAT**

20 Pe baza dezvoltării care este conținută aici, prezenta invenție furnizează o nanoparticulă lipidică (LNP) care încapsulează un ARNm care codifică o proteină terapeutică, în care LNP-ul cuprinde o lipidă cationică, o lipidă helper, o lipidă structurală și un stabilizator, în care lipida cationică este o lipidă ionizabilă, în care stabilizatorul este o lipidă PEG și în care lipida PEG este un compus cu Formula (V-OH):



(V-OH),

25 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care: r este un număr întreg cuprins între 1 și 100, inclusiv; și R<sup>5</sup> este alchil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, sau alchilul C<sub>10-40</sub> opțional substituit; și în care LNP-ul nu declanșează clearance-ul accelerat al sângelui.

30 Într-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o nanoparticulă lipidică (LNP) pentru utilizarea într-o metodă de livrare a unui nivel terapeutic al unei proteine de interes pentru un subiect, în care LNP-ul este LNP-ul conform invenției, în care metoda cuprinde administrarea unei prime doze și a unei a doua doze de LNP la subiect; și în care prima doză de LNP nu induce un răspuns imun care promovează clearance-ul accelerat al sângelui (ABC) la administrarea unei a doua doze de LNP.

35 Prezenta invenție este definită în revendicările independente și anumite caracteristici opționale ale acesteia sunt definite în revendicările dependente. În măsura în care sunt utilizați aici termenii "invenție", "exemplu" și "variantă de realizare", aceștia vor fi interpretați în așa fel încât singura protecție considerată este cea pentru invenția așa cum este revendicată.

40 Prezenta dezvoltare se bazează, cel puțin parțial, pe descoperirile că, componentele nanoparticulelor lipidice (LNP-uri) pot induce un răspuns imun înăscut. În unele variante de realizare, componentele LNP-urilor, cum ar fi fosfatidilcolina, pot induce producerea de molecule IgM și/sau IgG naturale, care pot fi mediate de activarea celulelor B1, cum ar fi celulele B1a și/sau B1b. Aceste mecanisme biologice pot contribui la răspunsurile la medicamente cauzate de LNP-uri, inclusiv clearance-ul accelerat al sângelui (ABC) și toxicitatea limitatoare de doză, cum ar fi răspunsul în fază acută (APR) și pseudoalergia legată de activarea complementului (CARPA). Atât celulele B1a, cât și

45 trombocitele exprimă CD36, care poate lega fosfatidilcolina. Activarea celulelor B1 și a trombocitelor de către LNP-uri poate fi mediată de activarea receptorului de CD36 de către o componentă a LNP-urilor cum ar fi fosfatidilcolina. În plus, lipida PEG de pe LNP-uri poate contribui la producerea de IgM și/sau IgG și IgM anti-PEG naturale. În consecință, sunt furnizate aici metode și compoziții pentru eliberarea LNP-urilor la un subiect fără a promova același grad de răspunsuri la medicamente legate de LNP-uri cum sunt cele menționate aici, prin utilizarea de

50 LNP-uri care nu declanșează un răspuns imun înăscut caracterizat prin producție naturală de IgM, producție naturală de IgG, IgM anti-PEG, IgG anti-PEG, activare a celulelor B1a, activare a celulelor B1b, activare a celulelor pDC și/sau agregarea și/sau activarea trombocitelor și/sau utilizarea agenților

secundari, în special, agenți farmacologici, care inhibă producerea acestui răspuns imun înăscut, precum și suprimarea căilor de semnalizare din aval care conduc la răspunsurile medicamentoase legate de LNP.

Această dezvăluire furnizează, parțial, noi nanoparticule lipidice (LNP) și formulări de LNP care sunt mai puțin susceptibile la recunoaștere și, prin urmare, la clearance, de către sistemul imunitar. LNP-ul furnizat aici are clearance-ul și în unele cazuri, profiluri de toxicitate surprinzător de îmbunătățite. Deși nu intenționează să fie legați de niciun mecanism sau teorie particulară, se crede că profilurile de clearance îmbunătățite au o recunoaștere și/sau legare redusă la anumite celule imune și un efect general mai scăzut asupra acelor și altor celule și factori imunitari. Mai specific, unele dintre LNP-urile furnizate aici nu au nicio legare sau legare scăzută la celulele B1a și/sau B1b, activitate de activare B1a și/sau B1b, activitate de activare a pDC, activitate de agregare a trombocitelor și/sau activitate de activare a trombocitelor. Această activitate se poate datora, cel puțin în parte, componentelor LNP-ului sau unui agent care inhibă răspunsurile imune induse de componentele LNP-ului. Un astfel de agent poate fi încorporat în LNP-ul administrat sau formulat separat.

De asemenea, în această dezvăluire sunt furnizați compuși și compoziții, incluzând formulări, care modulează răspunsurile imune la nanoparticulele administrate, cum ar fi LNP. De asemenea, sunt furnizate aici metode de utilizare a unor astfel de compuși și compoziții, în special referitoare la modularea imună in vivo. De asemenea, sunt furnizate metode de utilizare a LNP-urilor împreună cu anumite clase de agenți secundari, incluzând, de exemplu, utilizarea LNP-urilor la subiecții care au fost co-medicați, de exemplu, premedicați cu anumiți agenți secundari. De asemenea, sunt furnizate metode de screening pre-administrare și/sau pre-tratament care identifică pacienții care răspund la administrarea de LNP și, opțional, clasifică astfel de pacienți în funcție de gradul răspunsului lor. Identificarea unor astfel de subiecți poate conduce, în unele cazuri, la un regim de tratament modificat.

Unele dintre LNP-urile furnizate aici cuprind o lipidă cationică, o lipidă helper, o lipidă structurală și un stabilizator care poate fi furnizat sau nu conjugat cu o altă lipidă.

Lipida cationică poate fi, dar nu se limitează la, DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA și DODMA. Lipida cationică poate fi o lipidă ionizabilă.

Lipida structurală poate fi, dar nu este limitată la, un sterol, cum ar fi, de exemplu, colesterolul.

Lipida helper este o lipidă activă de suprafață amfifilă sau un agent activ de suprafață. În unele variante de realizare este o lipidă ne-cationică. Lipida helper poate cuprinde cel puțin un lanț nepolar și cel puțin un fragment de grup de cap polar. O lipidă helper poate fi denumită, de asemenea, o lipidă complementară, adică lipidele funcționează pentru a "complementa" amino lipida și pentru a crește fusogenitatea bistratului pentru a ajuta la evacuarea endozomală. În unele variante de realizare, lanțul nepolar este o lipidă. În alte variante de realizare este un acid gras de cel puțin 8C. În variante de realizare exemplificative, lipida helper apare nenatural (de exemplu, nu apare natural la subiecții umani) sau este exogenă.

Unele dintre LNP-uri nu au nicio lipidă de fosfatidil colină (PC) (adică sunt libere de fosfatidil colină (PC)). Unora dintre LNP-urile furnizate aici le lipsesc lipide de fosfatidil colină specifice, cum ar fi, dar fără a se limita la DSPC. Unele dintre LNP-uri cuprind un analog de fosfatidil colină, astfel de analogi cuprinzând grupări de cap modificate (de exemplu, o grupare de cap de amină cuaternară modificată), o grupare de miez modificat și/sau o grupare de coadă lipidă modificată. Astfel de analogi pot cuprinde o grupare zwitterionică care este o grupare zwitterionă non-PC. Lipida helper poate fi o lipidă a oricărei combinații de Formule I, I-a, I-b, I-b-1, I-b-2, I-b-3, I-b-4, I-c, I-c-1, I-c-2, I-c-3, sau II așa cum este redat aici.

Anumite LNP-uri cuprind alte lipide necationice helper incluzând, de exemplu, acid oleic sau analogi ai acidului oleic. Lipida helper poate fi o lipidă cu Formula IV, așa cum este furnizată aici.

Stabilizatorul poate fi polietilen glicol (PEG). PEG-ul poate fi conjugat la o lipidă și astfel poate fi furnizat, de exemplu, ca PEG-c-DOMG sau PEG-DMG. Stabilizatorul, indiferent dacă este furnizat într-o formă conjugată sau neconjugată, poate cuprinde 1,5 mol% din LNP sau poate cuprinde mai puțin de 0,5 mol% din LNP. De exemplu, poate cuprinde mai puțin de 0,4 % mol, mai puțin de 0,3 % mol, mai puțin de 0,2 % mol sau mai puțin de 0,1 % mol.

LNP-ul poate cuprinde o lipidă PEGilată cu Formula III, incluzând Formulele III-OH, III-a-1, III-a-2, III-b-1, III-b-2, III-b-1-OH, III-b-2-OH, V, V-OH.

Unele dintre LNP-urile furnizate aici cuprind niveluri scăzute sau sunt lipsite, de lipide PEGilate, incluzând niveluri scăzute sau fiind lipsite de lipide alchil-PEGilate, și pot fi denumite aici ca fiind libere de PEG sau lipide PEGilate. Astfel, unele LNP-uri cuprind mai puțin de 0,5 % mol de lipide PEGilate. În unele cazuri, PEG-ul poate fi un alchil-PEG cum ar fi metoxi-PEG. Încă alte LNP-uri cuprind non-alchil-PEG, cum ar fi hidroxi-PEG, și/sau lipide non-alchil-PEGilate, cum ar fi lipidele hidroxi-PEGilate.

Lipida PEGilată poate fi un Cmpd420, un Cmpd396, un Cmpd394, Cmpd397, Cmpd395, Cmpd417, Cmpd418, sau Cmpd419.

În unele cazuri, LNP-ul poate cuprinde aproximativ 50 % mol, 10 % mol lipidă helper, 1,5 % mol lipidă PEGilată și 38,5 % mol lipidă structurală.



enzimei COX. Anumiți agenți secundari care pot fi utilizați au funcționalitate dublă (adică sunt capabili să inhibe agregarea trombocitelor, în întregime sau parțial, și au, de asemenea, un efect antiinflamator general). Un astfel de exemplu este aspirina.

5 În unele aspecte ale invenției este furnizată o nanoparticulă lipidică (LNP) care încapsulează un ARNm care codifică o proteină. LNP-ul are o lipidă cationică, o lipidă helper necationică care cuprinde cel puțin un lanț de acizi grași de cel puțin 8C și cel puțin un fragment de grupare cap polară, și în care lipidă helper nu este o fosfatidil colină (PC), o lipidă PEG, și un sterol. În unele aspecte, LNP-ul mai cuprinde în plus un agent care inhibă răspunsurile imune la LNP. În alte aspecte, lipidă helper necationică este o lipidă helper necationică zwitterionică, un analog de DSPC, acid oleic, un analog acid oleic sau un

10 1,2-distearoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolină substituie (DSPC). În anumite variante de realizare, lipidele necationice utile în prezenta invenției sunt analogi de DSPC în care fragmentul de fosfocolină este înlocuit cu o grupare zwitterionică diferită. În anumite variante de realizare, gruparea zwitterionică diferită nu este o grupare fosfocolină. În anumite variante de realizare, o lipidă necationică utilă în prezenta invenției este un compus cu Formula (II). Sunt furnizați aici compuși cu Formula (II):

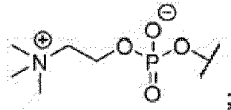


(II),

sau săruri ale acestora în care:

Z este un fragment zwitterionic,

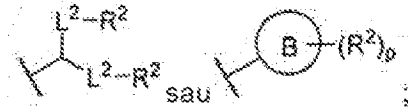
în care fragmentul zwitterionic nu are formula:



20

m este 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10;

A are formula :



25

fiecare caz de L<sup>2</sup> este independent o legătură sau alchilen C<sub>1-6</sub> opțional substituit, în care o unitate de metilen a alchilenului C<sub>1-6</sub> opțional substituit este opțional înlocuită cu -O-, -N(R<sup>N</sup>)-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, sau -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-;

30

fiecare caz R<sup>2</sup> este independent alchil C<sub>1-30</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>1-30</sub> opțional substituit, sau alchil C<sub>1-30</sub> opțional substituit; în care opțional una sau mai multe unități de metilen ale lui R<sup>2</sup> sunt înlocuite independent cu carbociclic opțional substituit, heterociclic opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit, -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-, -OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, sau -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-;

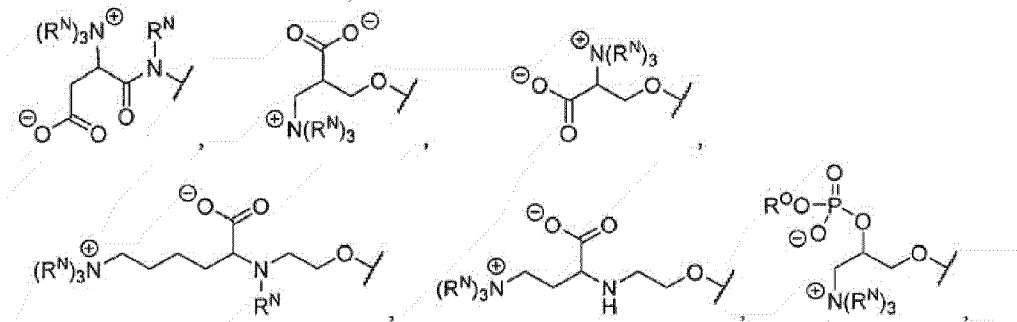
35

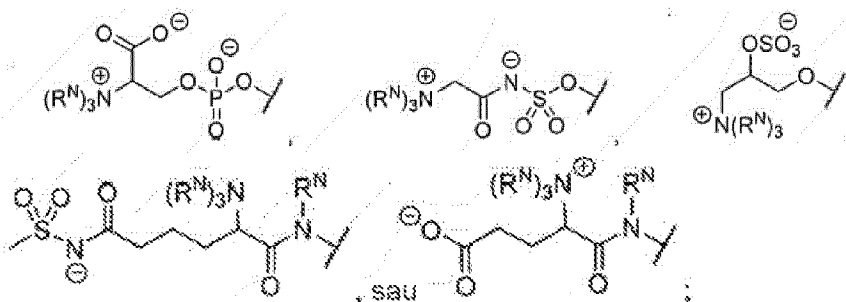
fiecare caz R<sup>N</sup> este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului;

Inelul B este carbociclic opțional substituit, heterociclic opțional substituit, aril opțional substituit, sau heteroaril opțional substituit; și

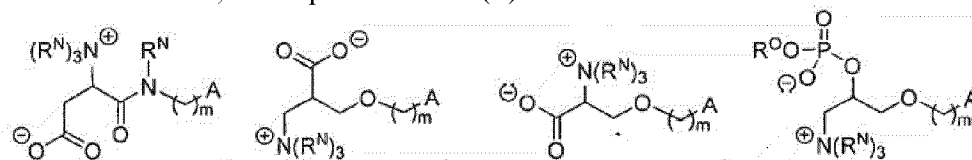
40

p este 1 sau 2. În anumite variante de realizare, Z este un aminoacid sau un derivat al acestuia. În anumite variante de realizare, Z are una dintre următoarele formule:

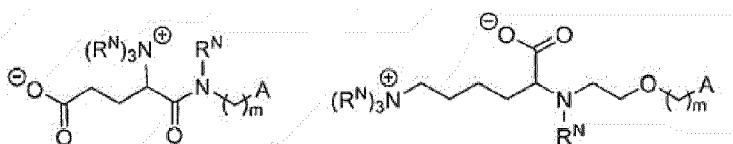
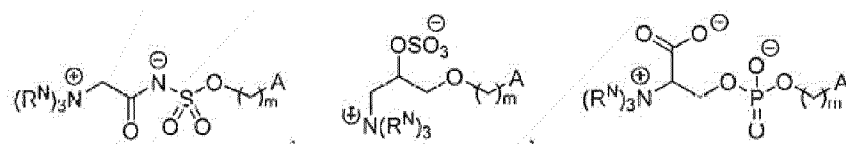




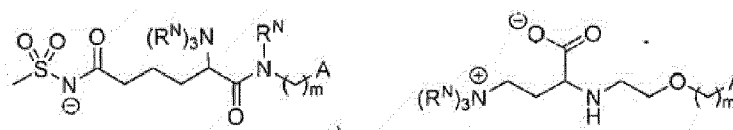
în care  $R^o$  este hidrogen, alchil opțional substituit sau o grupare protectoare a oxigenului. În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (II) are una dintre următoarele formule:



5

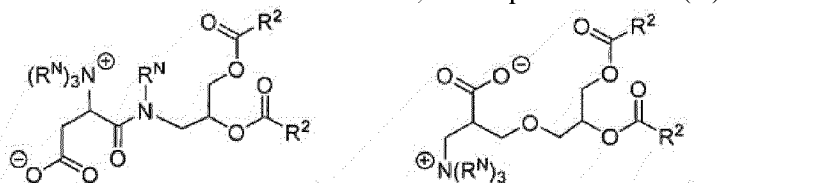


10

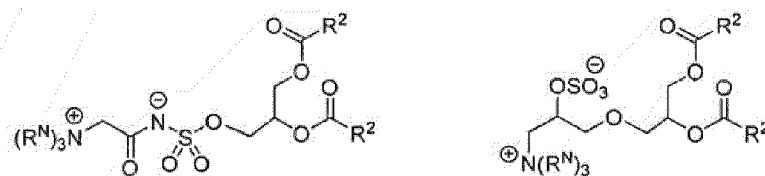
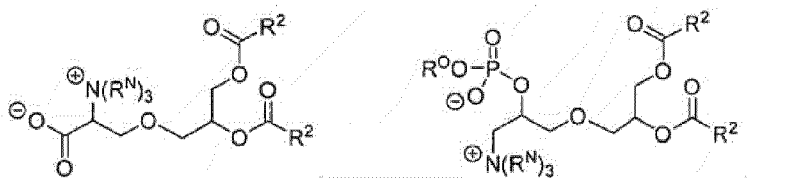


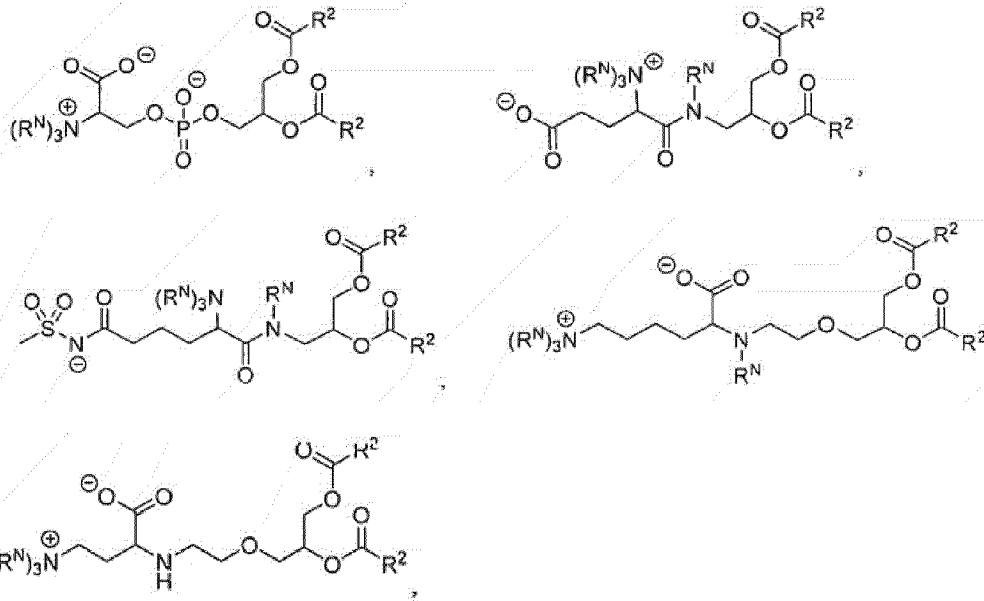
sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (II) are una dintre următoarele formule:



15

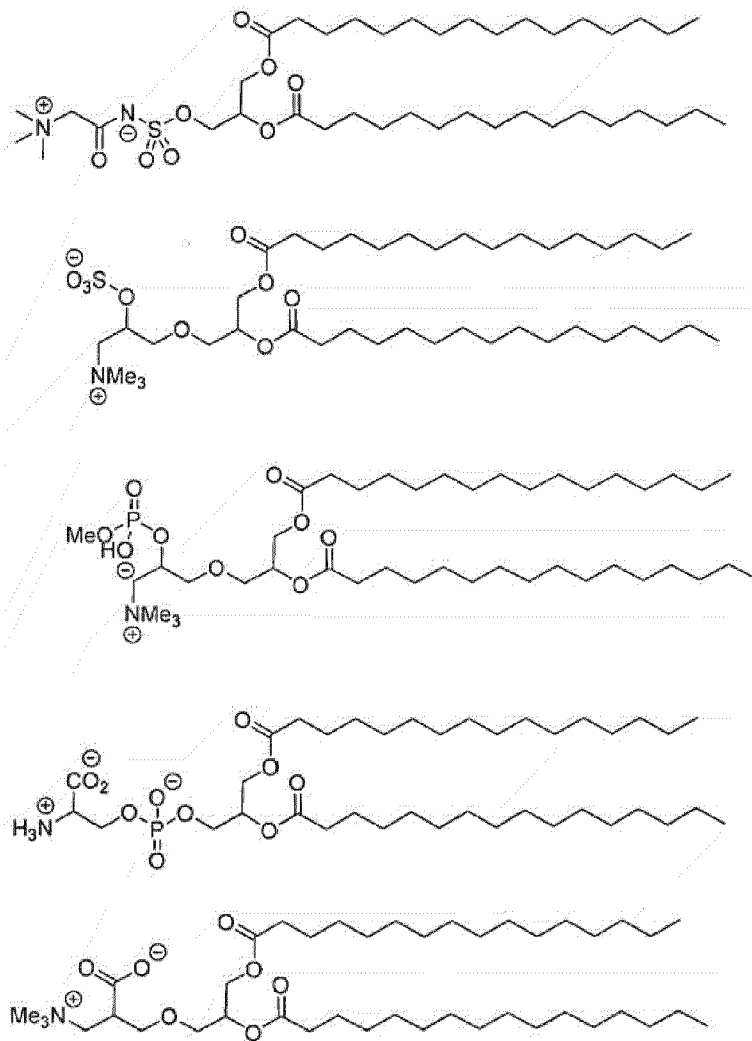




5

sau o sare a acestuia.

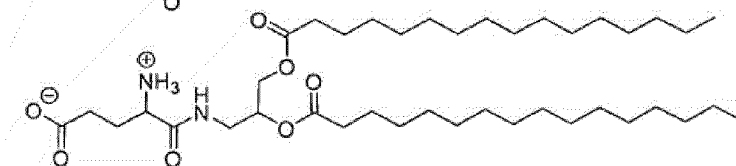
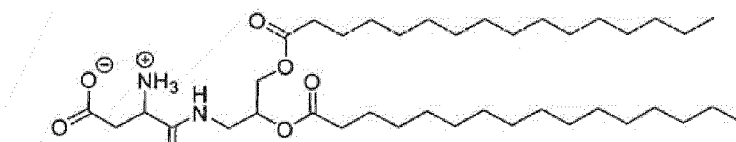
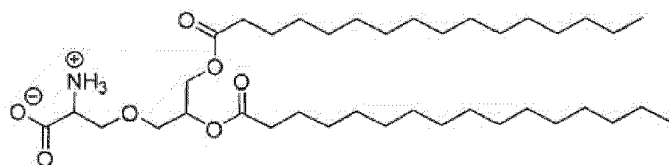
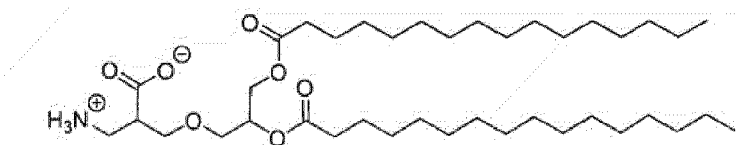
De exemplu, în anumite variante de realizare, un compus cu Formula (II) este unul dintre următorii:



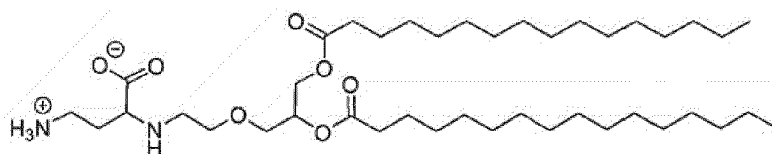
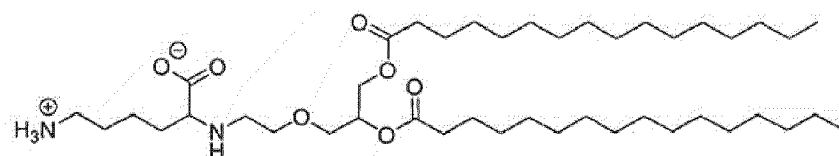
10

15

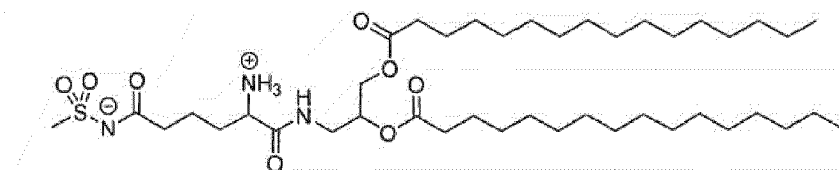




5

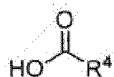


10



sau săruri ale acestora.

15 Lipide necationice utile în prezenta invenție includ, de asemenea, analogi ai acidului oleic. Așa cum este descris aici, un analog de acid oleic poate cuprinde o coadă de acid oleic modificată, un fragment de acid carboxilic modificat sau ambele. În anumite variante de realizare, un analog de acid oleic este un compus cu Formula (IV). Sunt redați aici compuși cu Formula (IV):



(IV),

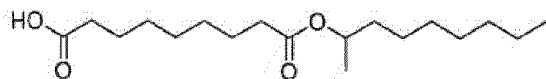
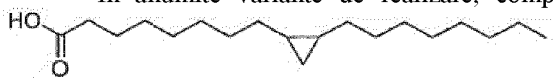
sau o sare a acestuia, în care:

20  $R^4$  este, alchil  $C_{10-40}$  opțional substituit; alchenil  $C_{10-40}$  opțional substituit; alchilul  $C_{10-40}$  opțional substituit; în care cel puțin o grupare metilen a  $R^4$  este înlocuită independent cu carbociclicul opțional substituit, heterociclicul opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  $-N(R^N)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-NR^N C(O)N(R^N)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(=NR^N)-$ ,  $-C(-NR^N)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(-NR^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(S)-$ ,  $-NR^N C(S)N(R^N)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-OS(O)-$ ,  $-S(O)O-$ ,  $-OS(O)O-$ ,  $-OS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2O-$ ,  $-OS(O)_2O-$ ,  $-N(R^N)S(O)-$ ,  $-S(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ ,

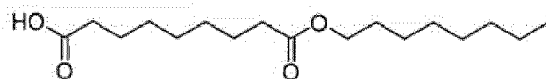
25

-OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, sau -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-; și fiecare caz R<sup>N</sup> este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului.

5 În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (IV) este unul dintre următorii:

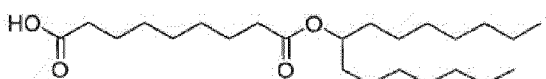
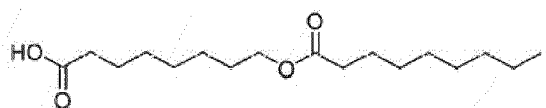


(Compus 148),

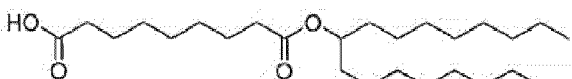


(Compus 149),

10



15



(Compus 159),

sau săruri ale acestora.

20 În anumite variante de realizare, un analog de acid oleic este un compus în care fragmentul de acid carboxilic al acidului oleic este înlocuit cu o grupare diferită. În anumite variante de realizare, un analog de acid oleic util în prezenta invenției este unul dintre următorii:

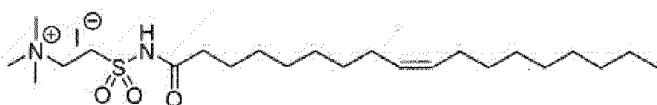
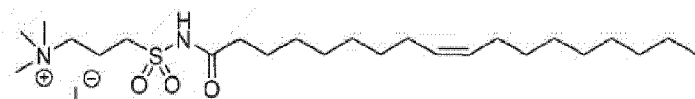


(Compus 157),

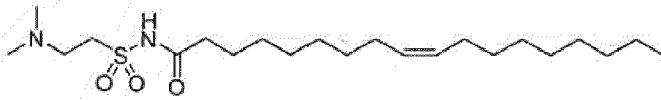
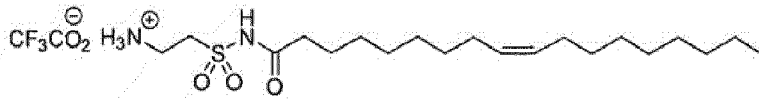


(Compus 158),

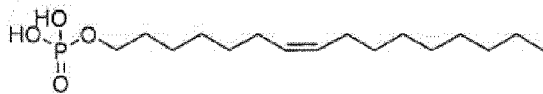
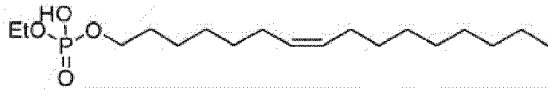
25



30



5



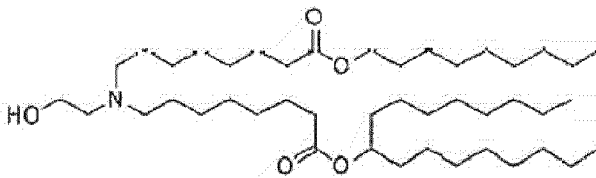
10



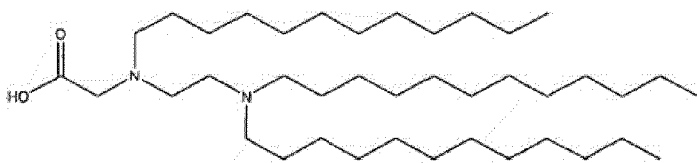
sau săruri ale acestora.

15

Exemple de lipide necationice includ, dar nu se limitează la cele care urmează:

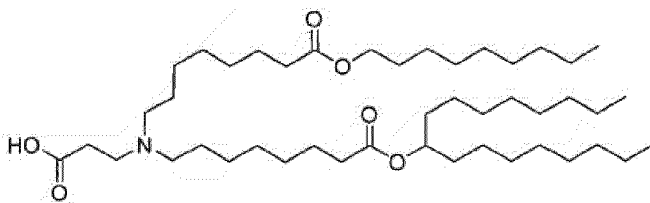


(Compus 8),

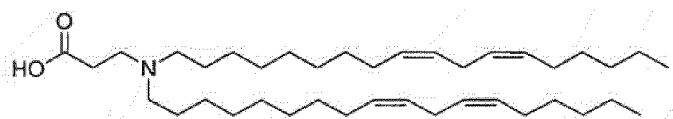
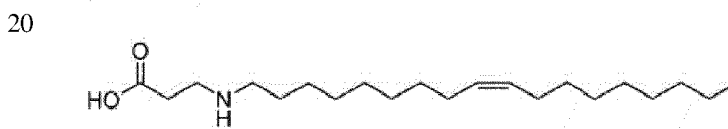
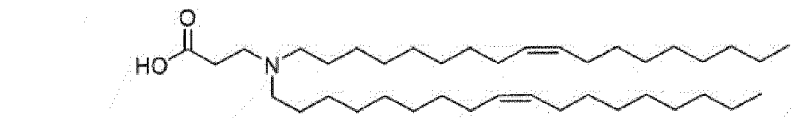
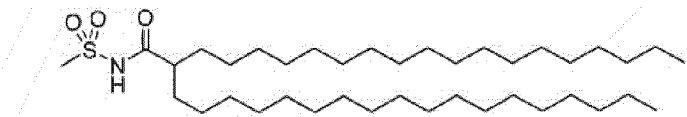
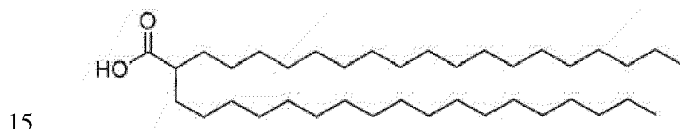
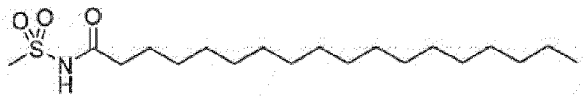
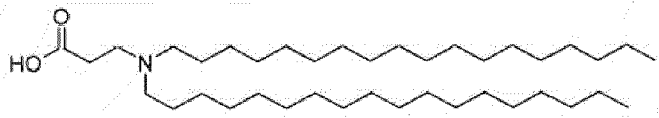
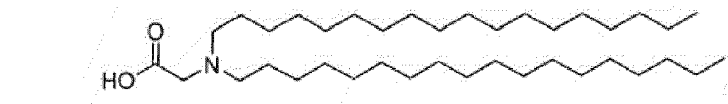
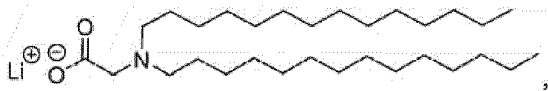
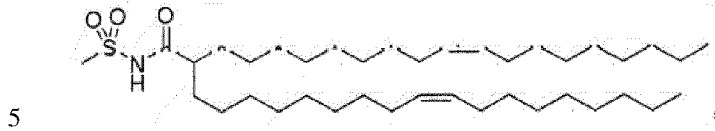
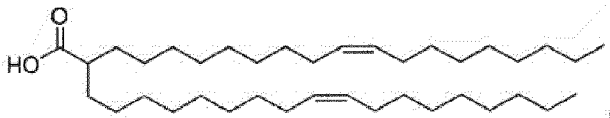
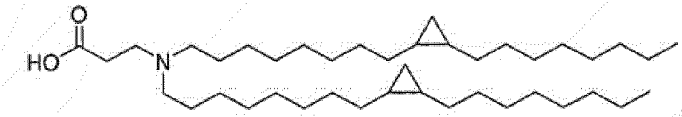


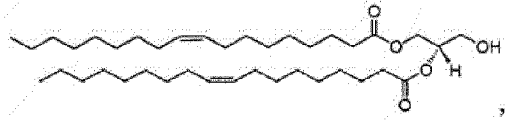
(Compus 393),

20

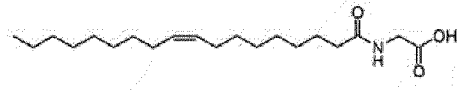


(Compus 125),

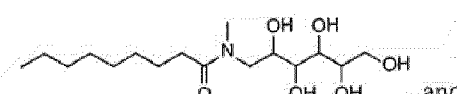
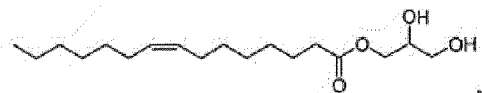
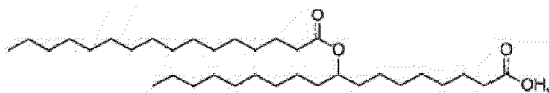
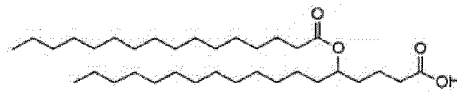




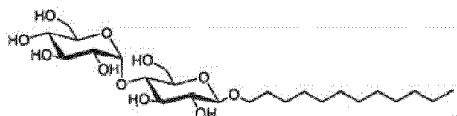
5



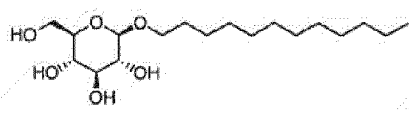
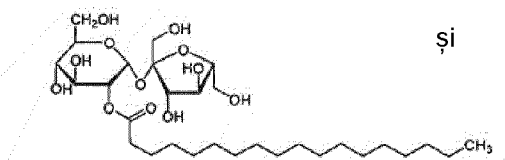
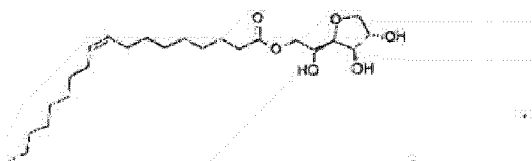
10



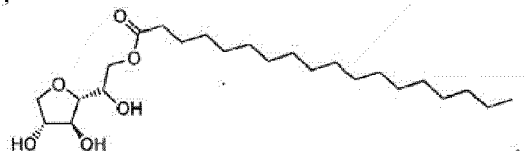
15



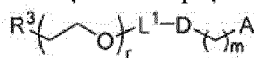
20



și



În unele aspecte ale invenției este furnizată o nanoparticulă lipidică (LNP) care încapsulează un ARNm care codifică o proteină. LNP-ul are o lipidă cationică, o lipidă helper necationică care cuprinde cel puțin un lanț de acid gras de cel puțin 8C și cel puțin un fragment de grupare polară, o lipidă PEG și un sterol. În unele aspecte, LNP-ul mai cuprinde în plus un agent care inhibă răspunsurile imune ale LNP-ului. În unele variante de realizare, lipida PEG este o lipidă alchil-PEGilată, non-alchil-PEG cum ar fi hidroxi-PEG, o lipidă non-alchil-PEGilată cum ar fi lipide hidroxi-PEGilate, un Cmpd420, un Cmpd396, un Cmpd394, Cmpd395, Cmpd395, Cmpd417, Cmpd418 sau Cmpd419, Cmpd421, Cmpd422 sau în care lipida PEG conține un raport molar mai mic de 0,5% dintre lipidele PEG și celelalte componente. În anumite variante de realizare, o lipidă PEG utilă în prezenta dezvăluire este un compus cu Formula (III). Sunt redați aici compuși cu Formula (III):



(III).

sau săruri ale acestora, în care:

R<sup>3</sup> este -OR<sup>o</sup>;R<sup>o</sup> este hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a oxigenului;

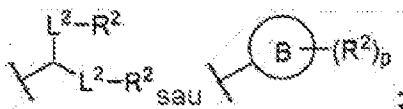
r este un întreg cuprins între 1 și 100, inclusiv;

L<sup>1</sup> este alchilen C<sub>1-10</sub> opțional substituit, în care cel puțin un metilen din alchilenul C<sub>1-10</sub> opțional substituit este înlocuit independent cu carbocicililen opțional substituit, heterocicililen opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit, -O-, -N(R<sup>N</sup>)-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, sau -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-;

D este un fragment obținut prin chimie click sau un fragment scindabil în condiții fiziologice;

m este 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10;

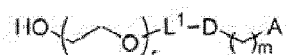
A are formula :

fiecare caz de L<sup>2</sup> este independent o legătură sau alchilen C<sub>1-6</sub> opțional substituit, în care o unitate de metilen din alchilenul C<sub>1-6</sub> opțional substituit este opțional înlocuită cu -O-, -N(R<sup>N</sup>)-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, sau -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-;fiecare caz R<sup>2</sup> este independent alchil C<sub>1-30</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>1-30</sub> opțional substituit, sau alchilul C<sub>1-30</sub> opțional substituit; opțional în care una sau mai multe unități de metilen ale lui R<sup>2</sup> sunt înlocuite independent cu carbocicililen opțional substituit, heterocicililen opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit. -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-, -OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, sau -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-;fiecare caz de R<sup>N</sup> este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului;

Inelul B este carbocicililen opțional substituit, heterocicililen opțional substituit, arilen opțional substituit, sau heteroarilen opțional substituit; și

p este 1 sau 2.

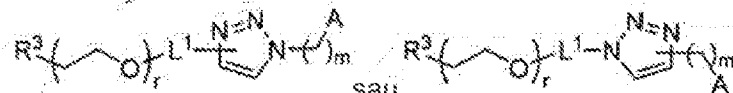
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) este o lipidă PEG-OH (adică, R<sup>3</sup> este -OR<sup>o</sup>, și R<sup>o</sup> este hidrogen). În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) este cu Formula (III-OH):



(III-OH),

sau o sare a acestuia.

- 5 În anumite variante de realizare, D este un fragment obținut prin chimie click (de exemplu, triazol). În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are Formula (III-a-1) sau (III-a-2):

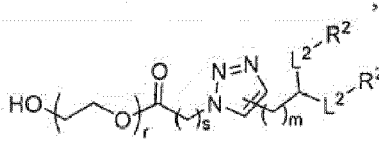
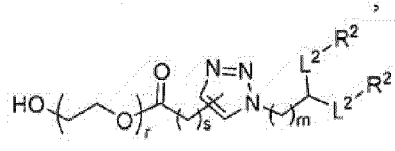
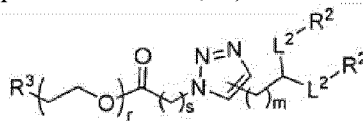
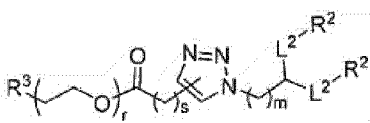


(III-a-1)

(III-a-2),

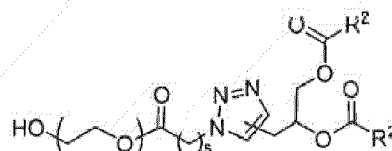
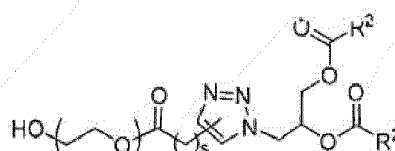
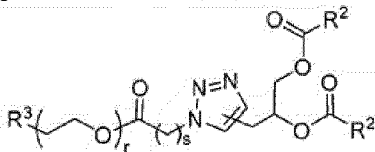
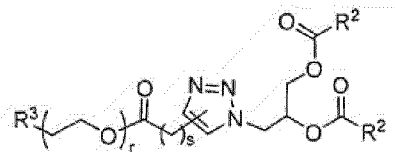
sau o sare a acestuia.

- 10 În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



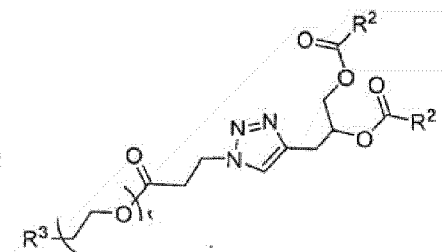
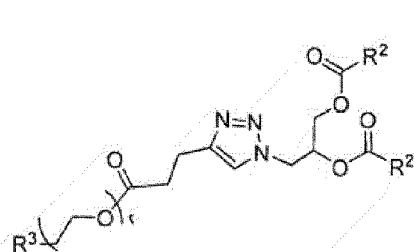
sau o sare a acestuia, în care  
s este 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10.

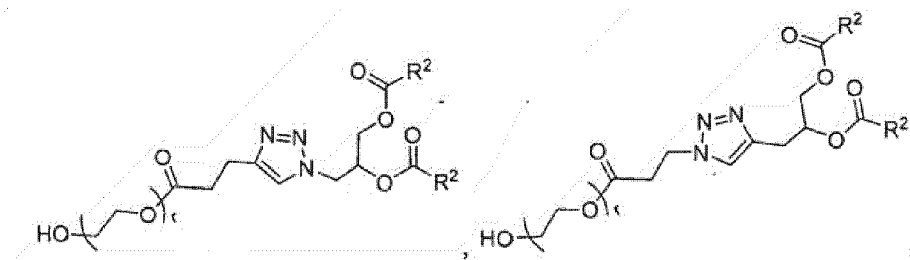
- 15 În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



sau o sare a acestuia.

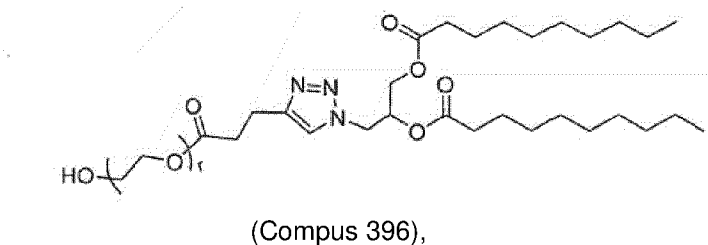
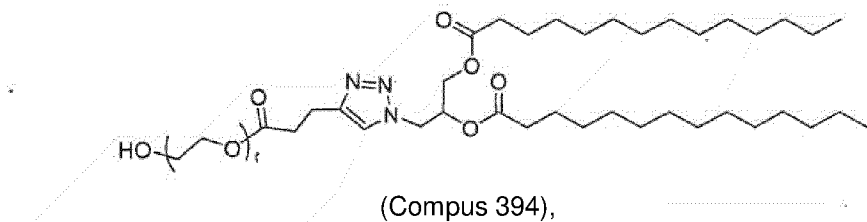
- 20 În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



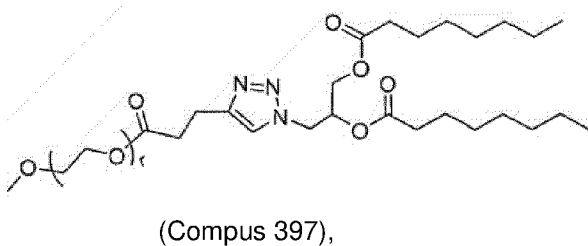
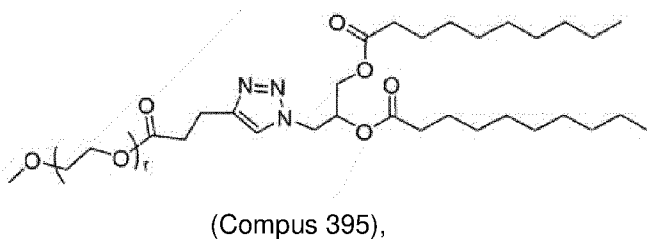


sau o sare a acestuia.

5 În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:

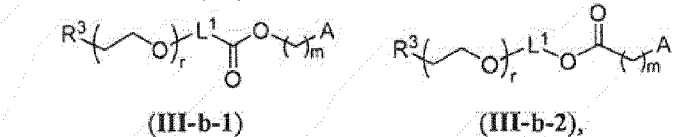


10



15 sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, D este un fragment scindabil în condiții fiziologice (de exemplu, ester, amidă, carbonat, carbamat, ureea). În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are Formula (III-b-1) sau (III-b-2):

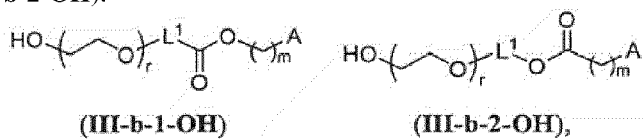


20

sau o sare a acestuia.

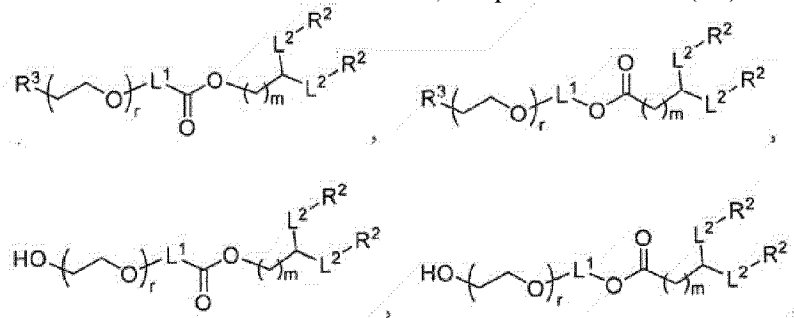


În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are Formula (III-b-1-OH) sau (III-b-2-OH):



5 sau o sare a acestuia.

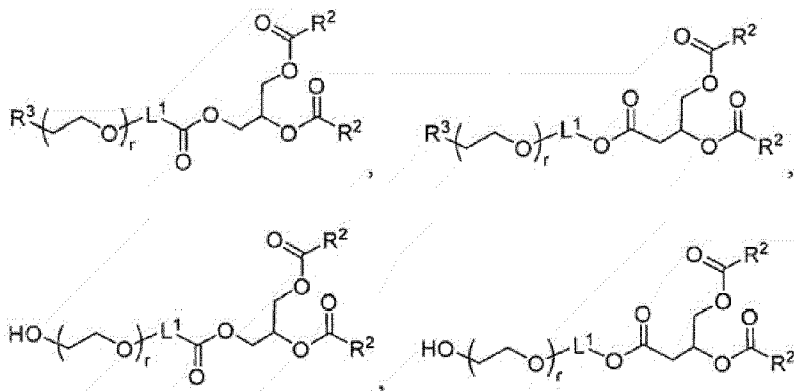
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



10 sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:

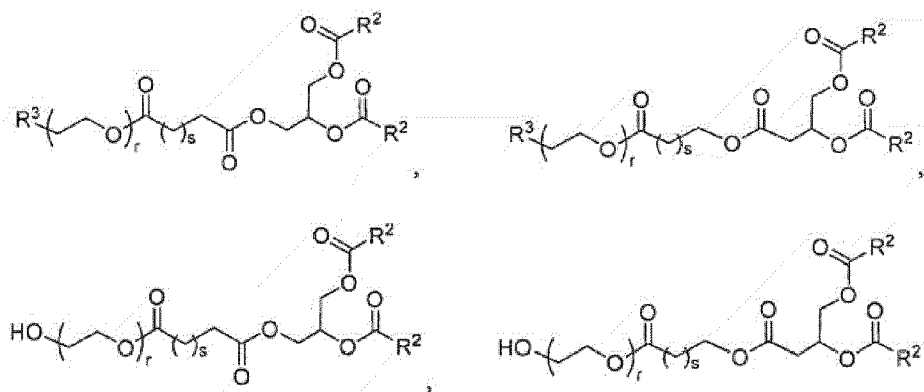
15



20 sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:

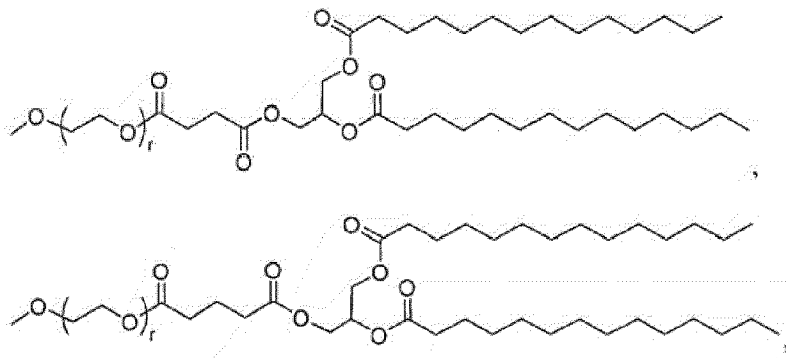
25



sau o sare a acestuia.

30

În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:

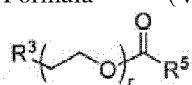


5

sau săruri ale acestora.

În anumite variante de realizare, o lipidă PEG utilă în prezenta dezvoltare este un acid gras PEGilat. În anumite variante de realizare, o lipidă PEG utilă în prezenta dezvoltare este un compus cu

10 Formula (V). Sunt redați aici compuși cu Formula (V):



(V),

sau săruri ale acestora, în care:

R<sup>3</sup> este-OR<sup>o</sup>;R<sup>o</sup> este hidrogen, alchil opțional substituit sau o grupare protectoare a oxigenului;

15

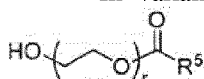
r este un întreg cuprins între 1 și 100, inclusiv;

R<sup>5</sup> este alchil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, sau alchilul C<sub>10-40</sub> opțional substituit; și opțional una sau mai multe grupări metilen ale lui R<sup>5</sup> sunt înlocuite cu carbociclieni opțional substituit, heterociclieni opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit, -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NRC(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-, -OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, sau -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-; și

25

fiecare caz de R<sup>N</sup> este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului.

În variante de realizare ale invenției, compusul cu Formula (V) are Formula (V-OH):



(V-OH),

30

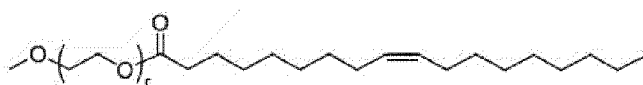
sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (V) are una dintre următoarele formule:



(Compus 400),

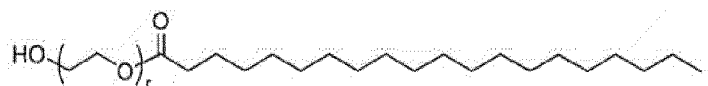
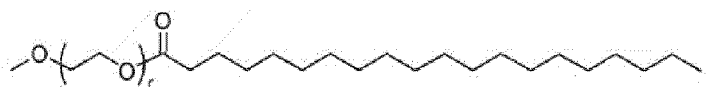
35



(Compus 401),



(Compus 402),



10 sau o sare a acestuia.

În alte aspecte, lipida helper necationică este o lipidă helper necationică zwitterionică, o lipidă care nu este o fosfatidil colina (PC), un analog de DSPC, acid oleic, un analog de acid oleic, sau o 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină substituită (DSPC).

În unele variante de realizare, agentul care inhibă răspunsurile imune la LNP cuprinde un situs de legare miR. În alte variante de realizare, situsul de legare a miR este selectat dintre miR 126, miR 155, și miR 142 3p. Situsul de legare a miR este încorporat într-un ARNm. În alte variante de realizare, situsul de legare a miR este separat de ARNm.

În unele variante de realizare, agentul care inhibă răspunsurile imune de către LNP cuprinde un ARNm care cuprinde un situs de legare miR. În diferite variante de realizare, ARNm-ul cuprinde 1-4, unul, două, trei sau patru situsuri de legare miR, în care cel puțin unul dintre situsurile de legare a miR este un situs de legare a miR-126. Într-o variantă de realizare, ARNm-ul, cuprinde cel puțin două situsuri de legare a microARN, în care cel puțin unul dintre situsurile de legare a microARN-ului este un situs de legare a miR-126. Într-o variantă de realizare, ARNm-ul, de exemplu, ARNm<sub>mm</sub>, cuprinde un situs de legare a miR-126 și un al doilea situs de legare a microARN-ului pentru un miR selectat din grupul constând din miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 și miR-27. Într-o altă variantă de realizare, ARNm-ul, cuprinde un situs de legare a miR-126 (de exemplu, miR-126-3p) și un situs de legare a miR-142 (de exemplu, miR-142-3p). Un miR la care se face referire aici prin număr se poate referi la oricare dintre cele două microARN-uri mature care provin din brațele opuse ale aceluiași pre-miARN (de exemplu, fie microARN 3p, fie 5p). Toate miR-urile la care se face referire aici prin număr sunt destinate să includă ambele brațe/secvențe 3p și 5p. S-a descoperit acum că încorporarea a cel puțin unui situs de legare a microARN pentru un microARN exprimat în celulele imune (de exemplu, miR-126, miR-142, miR-155 și combinații ale acestora) într-un construct de ARNm poate reduce sau inhiba ABC atunci când compusul sau compoziția care conține lipide care cuprind ARNm este administrată unui subiect. Într-o variantă de realizare, mecanismul de acțiune al situsului(lor) de legare a miARN este un "burete" de microARN, în care situsul(rile) de legare a miARN din construct sau LNP "absoarbe" microARN-urile care se leagă la situsul(rile) de legare.

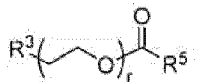
Analogul de DSPC poate avea o grupare de cap modificată care este o grupare de cap de amină cuaternară modificată, o grupare de miez modificată sau o grupare de coadă lipidică modificată. În unele variante de realizare. În alte variante de realizare lipida PEG conține cel puțin 0,0001%, cel puțin 0,0005%, cel puțin 0,001%, cel puțin 0,005%, cel puțin 0,01%, cel puțin 0,05%, cel puțin 0,1%, cel puțin 0,15%, cel puțin 0,2 %, cel puțin 0,25%, cel puțin 0,3%, cel puțin 0,35%, cel puțin 0,4%, cel puțin 0,45% și mai puțin de 0,5% raport molar al lipidei PEG față de celelalte componente.

În unele variante de realizare, LNP-ul poate avea un raport molar de aproximativ 45-65% lipide cationice, aproximativ 0,15-15% lipide PEG, aproximativ 15-45% colesterol și aproximativ 5-25% lipide

auxiliare necationice sau un raport molar de aproximativ 55% lipide cationice, aproximativ 2,5% lipide PEG, aproximativ 32,5% colesterol și aproximativ 10% lipide necationice.

- 5 În alte variante de realizare, lipida cationică este selectată dintre DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA sau DODMA. În alte variante de realizare, lipida cationică este selectată dintre numerele Cmpd lipidici furnizați aici.

Dezvăluirea furnizează o lipidă PEG care cuprinde un compus cu Formula (V):

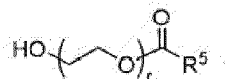


(V),

- 10 sau săruri ale acestora, în care:  
 $\text{R}^3$  este-OR<sup>o</sup>;  
 $\text{R}^o$  este hidrogen, alchil opțional substituit sau o grupare protectoare a oxigenului;  
 $r$  este un întreg cuprins între 1 și 100, inclusiv;  
 $\text{R}^5$  este alchil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, sau alchinil C<sub>10-40</sub> opțional substituit; și opțional una sau mai multe grupări metilen ale lui  $\text{R}^5$  sunt înlocuite cu carbociclilen opțional substituit, heterociclilen opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  
 15 -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-,  
 -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-,  
 -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-,  
 20 -OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-,  
 -OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-,  
 -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, sau -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-; și  
 fiecare caz de R<sup>N</sup> este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului.

25

În variante de realizare ale invenției compusul cu Formula (V) are Formula (V-OH):



(V-OH),

sau o sare a acestuia.

30

În alte variante de realizare compusul cu Formula (V) are una dintre următoarele formule:



(Compus 400),

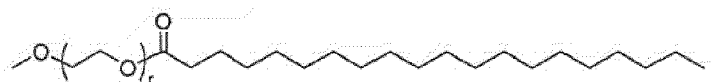


(Compus 401),

35



(Compus 402),



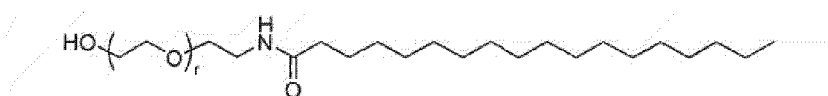
(Compus 450),



(Compus 451),



(Compus 452),



(Compus 453),



(Compus 454),

10 sau o sare a acestuia.

Încă în alte variante de realizare compusul cu Formula (V) este:



(Compus 403),

15 sau o sare a acestuia.

Acestea și alte variante de realizare și aspecte vor fi discutate mai detaliat aici.

### SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Următoarele figuri sunt furnizate în scară de gri.

20 **FIG. 1:** Fluorescența ficoeritrinei (PE) a celulelor T CD3+ și a celulelor B CD19+ după incubarea cu PE-LNP, PE+ LNP sau mediu singur. Datele arată absorbția LNP-urilor de către celulele B, dar nu și celulele T splenice în condiții de cultură *ex vivo*.

25 **Fig. 2A-2B:** Fluorescența ficoeritrinei (PE) a celulelor T CD3+ și a celulelor B CD19+ în funcție de timpul de incubare cu PE- LNP, PE+ LNP sau mediu singur. Datele arată că absorbția LNP de către celulele B, dar nu și celulele T, are loc rapid în aceste condițiile de cultură *ex vivo*.

**FIG. 3:** Fluorescența EGFP a celulelor CD19+ în funcție de timpul de incubare cu PE+ LNP cuprinzând ARNm EGFP. Nu se observă nicio exprimare a EGFP de către celulele B în orice moment, în pofida absorbției masive a LNP de către acele celule.

30 **Fig. 4A-4B:** Concentrația de hEPO și nivelurile de IgM anti-PEG in vivo după administrarea primei, a doua și a treia doze (hEPO) și a primei și a doua (IgM) de LNP care transportă încărcătura ARNm hEPO la șoarecii CD-1 nesplenectomiizați (CD-1) și splenectomiizați.

**FIG. 5:** Fluorescența PE-Rodamină în celulele B circulante CD19+ după incubarea timp de 2, 4, 6 și 24 de ore cu PE+ și PE- LNP

35 **Fig. 6A-6B:** Absorbția de LNP (FIG. 6A) și exprimarea EGFP (FIG. 6B) de celulele B circulante în funcție de timpul de incubare.

**FIG. 7:** Exprimarea CD86 în celulele B splenice și circulante după incubarea cu PE- și PE+ LNP. Celulele B splenice și circulante care preiau LNP-urile sunt activate.

**FIG. 8:** Exprimarea CD86 în celulele B splenice și circulante care preiau sau nu reușesc să preia LNP-urile PE+. Celulele B splenice și circulante care preiau LNP-urile sunt activate, așa cum este demonstrat de creșterea exprimării CD86.

5 **FIG. 9:** Exprimarea CD86 ca o funcție a captării LNP de către celulele B splenice la diferiți timpi de incubare.

**FIG. 10:** Secreția de IL-6 și TNF-alfa de către celulele B incubate cu PE+ și PE-LNP timp de 24 de ore.

**Fig. 11A-11B:** Absorbția LNP de PE+ gol de către celulele B CD19+ la 24 de ore (FIG. 11A) și cursul de timp la 4 și 24 de ore (FIG. 11B).

10 **Fig. 12A-12B:** Exprimarea CD86 în celulele B care au preluat LNP PE+ gol (FIG. 12A). Celulele B splenice sunt activate de LNP-uri goale într-o manieră dependentă de doză. Secreția de IL-6 și TNF-alfa de către celulele B incubate cu LNP PE+ gol (FIG. 12B).

**Fig. 13A-13D:** Absorbția și secreția de citokine de către celulele B de la șoareci de tip sălbatic (WT), cu deficit de ApoE și cu deficit de receptor de LDL în LNP-uri PE+ (FIG. 13A) și LNP-uri PE- (FIG. 13B). Sunt de asemenea date procentul de celule CD19+ PE+ (FIG. 13C) și nivelurile de citokine în pg/ml (FIG. 13D).

15 **FIG. 14:** Absorbția LNP-urilor după pre-incubarea celulelor B cu PEG liber sau IgG anti-PEG.

**FIG. 15:** Absorbția LNP-urilor cuprinzând PEG sau PEG-OH sau lipsite de PEG (fără PEG) de către celulele B.

20 **FIG. 16:** Absorbția LNP-urilor cuprinzând PEG sau PEG-OH sau lipsite de PEG (fără PEG) de către celulele B.

**FIG. 17:** Exprimarea CD86 în celulele B incubate cu LNP fără PEG sau LNP PEG-OH, în funcție de absorbția LNP.

**FIG. 18:** Absorbția LNP în funcție de conținutul de fosfolipide al LNP.

25 **FIG. 19:** Absorbția de LNP în funcție de conținutul de fosfolipide și PEG al LNP în celulele B CD19+ și celulele B CD5+.

**FIG. 20:** Absorbția LNP de către celulele CD19+, CD19+CD5+ sau CD19+CD5-B în funcție de conținutul de fosfolipide și PEG.

**FIG. 21:** Exprimarea EGFP în celule T (CD3-) și B (CD19-) neconvenționale din splină la 1 și 4 ore după administrarea de LNP-uri care cuprind DMG-PEG sau PEG-OH și LNP-uri fără PEG.

30 **Fig. 22A-22B:** Absorbția de LNP de către celulele B *in vivo* în funcție de conținutul de fosfolipide și PEG.

**Fig. 23A-23E:** Nivelurile de exprimare a CD86 în celule B după injectarea de LNP-uri cuprinzând DMG-PEG (FIG. 23A) sau Cmpd418 (FIG. 23B), sau LNP fără PEG (FIG. 23C). Nivelul de exprimare a CD86 a fost evaluat la 1 oră (FIG. 23D) și la 4 ore (FIG. 12E) după injectarea de LNP.

35 **Fig. 24A-24B:** Absorbția de PE+ LNP de către celulele B *in vivo* 1 oră (FIG. 24A) și 4 ore (FIG. 24B) după injectarea de LNP cuprinzând DMG-PEG sau PEG OH sau LNP-uri fără PEG.

**FIG. 25:** Absorbția de LNP în celulele B în funcție de conținutul DMG-PEG din LNP (studiu de conținut intermediar).

40 **FIG. 26:** Activarea celulelor B după absorbția de LNP ca o funcție a conținutului de DMG-PEG din LNP. Datele sunt prezentate în seturi de 4 bare, cele patru bare din fiecare set reprezentând LNP PE negativ, LNP-PE pozitiv scăzut, LNP-PE intermediar pozitiv și, respectiv, LNP-PE pozitiv ridicat, de la stânga la dreapta. Astfel, barele reprezintă populații de celule care au asociat sau au preluat o cantitate în creștere de LNP-uri.

45 **FIG. 27:** Absorbția de LNP în celulele B ca o funcție a conținutului de DMG-PEG în LNP (studiu de conținut scăzut).

**Fig. 28:** Colorarea cu PE+ a celulelor B CD19+ contactate cu Cmpd395, Cmpd404 și acid oleic cuprinzând LNP-uri.

**Fig. 29A-29B:** Activarea celulelor B măsurată printr-o creștere a populației de celule B activate (CD19+CD86+CD69+). FIG. 29A prezintă activarea celulelor B în funcție de % mol de DMG-PEG fără Imiquimod și FIG. 29B prezintă activarea celulelor B în funcție de % mol de DMG-PEG cu Imiquimod.

50 **Fig. 30A-30B:** Eliberarea de citokine proinflamatorii (IFN- $\gamma$  în FIG. 30A, TNF- $\alpha$  în FIG. 30B) într-o cultura de celule B umane *ex vivo* în funcție de % mol de DMG-PEG în prezență sau absență de Imiquimod.

55 **Fig. 31A-31D:** Modele de fosfolipide ale lipidelor auxiliare care sunt analogi și înlocuitori ai fosfatidilcolinei (PC) și DSPC. Modificările reduc asocierea, recunoașterea de exemplu de către receptori și/sau absorbția LNP prin, de exemplu, modificarea grupării de cap PC (FIG. 31A), miezului de PC (FIG. 31B) sau prin reducerea planarității lipidei (FIG. 31C). Este de asemenea furnizată o variantă cu acid oleic (FIG. 31D).

60 **Fig. 32A-32C:** Exemple de lipide PEGilate cuprinzând cozi lipidice scurte, un linker cu clic și o grupare terminală PEG hidroxil (OH). FIG. 32A prezintă Cmpd394, Cmpd395, Cmpd396, și Cmpd397. FIG. 32B prezintă Cmpd398 și Cmpd399. FIG. 32C prezintă Cmpd400-403.

**FIG. 33:** Răspunsul IgM anti-PEG sau anti-DSPC măsurat prin citometrie în flux (mărgelile) la 96 de ore după administrarea celei de-a doua doze. Răspunsurile IgM împotriva DSPC sau PEG sunt măsurate identic atunci când mărgelile sunt utilizate singure sau împreună. LNP-urile PEG DMG, PEG DSPE sau Cmpd430 au indus răspunsuri anti-LNP. IgM anti-PEG și IgM anti DSPC au fost ambele observate, sugerând că răspunsul IgM este un răspuns de IgM natural.

**FIG. 34:** IgM anti-PEG măsurată prin ELISA și IgM anti-PEG sau anti-DSPC măsurată prin citometrie în flux (mărgelile) la 96 de ore după administrarea celei de-a doua doze. IgM anti-PEG măsurat prin ELISA și mărgelile sunt similare și nu au fost detectate diferențe semnificative.

**FIG. 35:** Asocierea LNP cu trombocite în funcție de timp și compoziția LNP. Procentul de LNP asociat cu trombocite (așa cum este indicat de fluorescența ficoeritrinei (PE)) este prezentată la trei momente de timp (15, 60 și 240 de minute) după administrarea de PBS, DMG-PEG care conține LNP, PEG-OH care conține LNP și LNP fără PEG (de la stânga la dreapta pentru fiecare moment de timp). Aceste experimente au fost efectuate pe trombocite purificate recoltate de la subiect la diferitele momente de timp prezentate.

**FIG. 36:** Activarea trombocitelor în funcție de compoziția LNP. Activarea trombocitelor (așa cum este indicată de exprimarea markerului de activare a trombocitelor CD62P (MFI)) a fost măsurată la trei momente de timp (15, 60 și 240 de minute) după administrarea de PBS, DMG-PEG LNP, PEG-OH LNP și LNP fără PEG (stânga la dreapta).

**Fig. 37A-37B:** Prezența celulelor B B220+ și a macrofagelor F4/80+ în agregatele trombocitare in vivo în funcție de timp și de compoziția LNP. Sunt prezentate procentul de celule B (așa cum este indicat prin colorarea B220+, FIG. 37A) și procentul de macrofage (așa cum este indicat prin colorarea F4/80+, FIG. 37B) la trei momente de timp (15, 60 și 240 de minute) după administrarea de PBS, DMG-PEG LNP, PEG-OH LNP și LNP fără PEG (de la stânga la dreapta).

**FIG. 38:** Activarea in vitro a trombocitelor, așa cum a fost evaluată prin reglarea în sus a markerilor de activare CD31 și CD62P, după contactul cu LNP-uri.

**Fig. 39A-39D:** Activarea in vitro a trombocitelor, așa cum este indicată prin creșterea exprimării CD31 față de martor (mediu), la 10 minute (FIG. 39A), 30 minute (FIG. 39B), 60 minute (FIG. 39C) și 120 minute (FIG. 39D) după administrarea mediului, LPS și LNP cuprinzând DSPC.

**Fig. 40A-40B:** Agregarea trombocitelor in vitro folosind un test de sânge integral. Celulele agregate au fost colectate și încadrate pe baza exprimării CD41 (prima coloană), împrăștierii ridicate înainte și împrăștierii laterale (a doua coloană) și exprimării F4/80 (axa y) și CD11b (axa x) (a treia coloană) după contactul cu mediu (primul rând), LPS (al doilea rând) și DSPC LNP (al treilea rând). Agregatele trombocitare au fost izolate pe baza exprimării CD41+ și FCS ridicat și SSC ridicat, așa cum este prezentat în a doua coloană pentru FIG. 40A. Este prezentat procentul de celule agregate care sunt CD11b+ F4/80+ dublu pozitive după administrarea de mediu, LPS și DSPC LNP (de la stânga la dreapta) (FIG. 40B).

**Fig. 41A-41B:** Agregarea plachetară in vitro cu celule B (CD19+) și macrofage (CD11b+ și F4/80+) după incubarea sângelui integral cu mediu, LPS și DSPC LNP (de la stânga la dreapta) timp de 30 de minute (FIG. 41A) și 120 de minute (FIG. 41B).

**Fig. 42A-42C:** Agregarea plachetară in vitro cu macrofage (FIG. 42A și 42B) și celule B (FIG. 42C) după incubarea sângelui integral cu mediu, LPS și DSPC LNP (de la stânga la dreapta) timp de 30 de minute și 120 de minute.

**Fig. 43A-43B:** Reglarea în sus a markerilor de activare a trombocitelor CD31 (FIG. 43A) și CD62P (FIG. 43B) după incubarea trombocitelor cu mediu (martor), DSPC LNP, DOPC LNP, DOPG LNP, DMG-PEG LNP, și LPS (de la stânga la dreapta) in vitro, timp de 0, 10, 30 și 60 de minute, măsurată prin citometrie în flux.

**Fig. 44A-44B:** Reglarea în sus a markerilor de activare CD31 (FIG. 44A) și CD62P (FIG. 44B) după incubarea trombocitelor in vitro cu mediu (martor), DSPC LNP, DOPC LNP, DOPG LNP, DMG-PEG LNP și LPS, timp de 0, 10, 30 și 60 de minute, măsurată prin citometrie în flux.

**FIG. 45:** Model al efectului LNP-urilor asupra trombocitelor. DMG-PEG LNP se asociază fizic și activează trombocitele. DSPC LNP nu se asociază fizic cu trombocitele, dar cu toate acestea sunt capabile să activeze trombocitele. Ambele tipuri de LNP-uri determină agregarea trombocitelor cu recrutarea concomitentă de celule B și macrofage. PEG-OH și LNP-urile fără PEG nu se asociază detectabil cu trombocite, sugerând un rol al DMG-PEG în asocierea LNP-trombocite. Chiar și în absență de DMG-PEG, există totuși activarea trombocitelor, ceea ce sugerează o interacțiune între trombocite și componenta fosfolipidică, și în special gruparea de cap PC, în LNP.

**FIG. 46A-46B:** Celulele B1a și B1b necesită splina. FIG. 46A prezintă nivelurile celulare B1a (sus) și B2b (jos) după splenectomie sau o operație simulată. FIG. 46B prezintă nivelurile de anticorpi B1a (sus) și B2b (jos) după splenectomie. Celulele B1b își pierd capacitatea de a secreta anticorpi.

**FIG. 47:** Numărul de reticulocite la primate non-umane (NHP-uri) intacte și splenectomizate.

**FIG. 48:** Hematocritul este menținut în NHP-urile splenectomizate.

- Fig. 49A-49D:** Rezultatele studiului de splenectomie la NHP. Figurile. 49A-49B prezintă aria de sub curbă (AUC) rezultate din hEPO-ARNm-MC3 (FIG. 49A) și hEPO (FIG. 49B). Valorile  $C_{max}$  sunt de asemenea prezentate pentru hEPO-ARNm-MC3 (FIG. 49C) și hEPO (FIG. 49D).
- Fig. 50A-50B:** Suprimarea activării complementului la NHP splenectomizate, așa cum este demonstrat de nivelurile indicatorilor de activare a complementului, C3a (FIG. 50A) și C5b9 (FIG. 50B).
- Fig. 51A-51B:** Exprimarea citokinelor în NHP-uri splenectomizate. Sunt date nivelurile de IL-6 (FIG. 51A) și IL-10 (FIG. 51B).
- Fig. 52A-52B:** Nivelurile de IgM anti-PEG (FIG. 52A) și IgG anti-PEG (FIG. 52B) sunt mult reduse în absența splinei.
- Fig. 53A-53B** este un set de grafice care ilustrează producția de IgM anti-PEG după administrarea formulărilor de LNP.
- FIG. 54** este o ilustrare schematică a înlocuirii unei fosfolipide cu o grupare zwitterionică diferită.
- Fig. 55A -55B** sunt un set de grafice care ilustrează exprimarea ARNm Luc (FIG. 55A) și activarea celulelor B (FIG. 55B) după administrarea formulărilor de LNP la șoareci CD-1. Șoarecii CD-1 li s-au administrat 0,05 mg/kg ARNm Luc și exprimarea Luc a fost măsurată cu șase ore mai târziu.
- Fig. 56A-56E** ilustrează efectele formulării de LNP asupra exprimării Luc și activării celulelor B. FIG. 56B este un grafic care ilustrează exprimarea CD86 (activarea celulelor B) și FIG. 56C este un grafic care ilustrează nivelurile de exprimare ale Luc, măsurate prin fluxul total. Structurile sunt prezentate în fig. 56A, 56D și 56E.
- Fig. 57A-57C** descriu efectele diferitelor formulări de LNP asupra celulelor B și a trombocitelor. FIG. 57A este un grafic care ilustrează frecvențele celulelor B activate la 24 de ore după doză. FIG. 57B este un grafic care ilustrează agregarea trombocitelor la 15 minute după doză. FIG. 57C este un grafic care ilustrează recrutarea celulelor în agregatul plachetar.
- Fig. 58A-58B** ilustrează efectele pozitive ale acidului oleic într-un LNP. FIG. 58A ilustrează nivelurile de exprimare a luciferazei măsurat prin fluxul total la 6 ore după livrare la șoareci CD-1. FIG. 58B ilustrează activarea *in vivo* a celulelor B în splenocite de șoarece la 24 de ore după administrare.
- FIG. 59** este un grafic care ilustrează concentrația de hEPO în timp. O marjă de exprimare îmbunătățită cu o particulă conform invenției, spre deosebire de MC3, a fost demonstrată cu ARNm modificat chimic.
- Fig. 60A-60C** este un set de grafice care ilustrează un profil de activare imun îmbunătățit cu ARNm modificat chimic în formulările de LNP conform invenției. FIG. 60A este un grafic care ilustrează activarea *in vivo* a celulelor B la 24 de ore după administrarea particulelor încărcate cu hEPO sau PBS. FIG. 60B este un grafic care ilustrează concentrația de IL-6 la 6 ore după administrarea particulelor încărcate cu hEPO sau PBS. FIG. 60C este un grafic care ilustrează concentrația de IP-10 la 6 ore după administrarea de particule încărcate cu hEPO sau PBS.
- FIG. 61** este un grafic care ilustrează absorbția de LNP de către celulele B măsurată prin procentul de celule B PE+ CD19+.
- FIG. 62** este un grafic care ilustrează activarea celulelor B de către LNP, măsurată prin exprimarea CD86 pe celule D.
- Fig. 63A-63B** sunt un set de grafice care ilustrează cantitatea de IgM PEG produsă la 96 de ore după o a doua doză de LNP (FIG. 63A) sau la 96 de ore după o a treia doză de LNP (FIG. 63B).
- FIG. 64** este un grafic care ilustrează exprimarea hEPO la 6 ore după administrarea o dată pe săptămână prin IV a formulărilor de ARNm hEPO - LNP în săptămânile 1, 2, 3 și 4.
- FIG. 65** este un grafic care ilustrează producția de IgM anti-PEG la 96 de ore după o a treia doză de formulări de ARNm - LNP hEPO.
- FIG. 66** este un grafic care ilustrează datele dintr-un studiu cu doză unică de LNP având diverse fosfolipide cu diferite grupări de cap injectate prin IV la șoareci CD-1. Fiecare fosfolipidă este măsurată la trei momente de timp (3, 6 și 24 de ore) după injectare. Structurile fosfolipidelor sunt prezentate în FIG. 69.
- Fig. 67A-67C** sunt un set de grafice care ilustrează eliberarea de citokine ca măsură a activării *ex vivo* a celulelor B umane. Au fost măsurate nivelurile de IFN-gama (FIG. 67A), LI-6 (FIG. 67) și TNF-alfa (FIG. 67C).
- FIG. 68** este un grafic care ilustrează nivelul de activare a celulelor B ca rezultat al diferitelor formulări de LNP. Formulările de LNP, inclusiv acidul oleic, au demonstrat o activare redusă a celulelor B splenice.
- FIG. 69** prezintă structuri de fosfolipide.
- FIG. 70** este un grafic care ilustrează nivelurile de exprimare a Luc după administrarea de LUC ARNm încapsulat în diferite formulări de LNP compuse din PC noi și derivați de acid oleic la 3, 6 și 24 de ore în continuare.
- Fig. 71A-71B** sunt un set de grafice care ilustrează interacțiunea/asocierea celulelor B cu diferite formulări de LNP, așa cum este evaluată printr-un procent de celule CD19+PE+. Mai multe formulări de LNP sunt ilustrate în FIG. 71A. Acidul oleic și Cmpd125 sunt reprezentați în FIG. 71B.



**FIG. 72** este un set de grafice care ilustrează activarea celulelor B cu diferite formulări LNP, așa cum este evaluată prin intensitatea mediană a fluorescenței de exprimare a CD86. Mai multe formulări de LNP sunt descrise în FIG. 72A. Acidul oleic și Cmpd125 sunt ilustrați în FIG. 72B.

**Fig. 73A-73C** sunt un set de grafice care ilustrează exprimarea Luc cu diferite formulări de LNP, așa cum este evaluată printr-o măsurare a fluxului total la 3 ore (FIG. 73A), 6 ore (FIG. 73B) și 24 de ore (FIG. 73C) după o doză.

**Fig. 74A-74B** sunt grafice care ilustrează exprimarea hEPO (pg/mL) la 6 ore după administrarea IV o dată pe săptămână a formulărilor ARNm-LNP hEPO în săptămânile 1, 2 și 3.

**FIG. 75** este un grafic care ilustrează producția de IgM anti-PEG (ng/mL) la 96 de ore după administrarea celei de-a doua doze de formulări de LNP.

**FIG. 76** este un grafic care ilustrează exprimarea Luc a diferitelor formulări de LNP. Exprimarea Luc a fost evaluată printr-o măsurare a fluxului total (p/s) la 3 ore după o doză, utilizând imagistica BLI a întregului corp.

**FIG. 77** este un grafic care ilustrează activarea celulelor B. S-a măsurat procentul de celule B activate (CD86+ CD69+) în celulele CD19+ splenice pentru formulările de LNP.

**FIG. 78** este un grafic care ilustrează exprimarea EPO. Concentrația de EPO (ng/mL) a fost măsurată la presângere, 6 ore și 24 de ore, la fiecare dintre cele 6 săptămâni.

**FIG. 79** este un grafic care ilustrează exprimarea hEPO (ng/mL) la predoză, 2 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore și 72 de ore după administrarea IV o dată pe săptămână a formulărilor hEPO ARNm-LNP.

**FIG. 80** este un grafic care ilustrează nivelurile de IgM anti-PEG (U/mL) după administrarea IV o dată pe săptămână a formulărilor hEPO ARNm-LNP.

**FIG. 81** este un grafic care ilustrează nivelurile de IgG anti-PEG (U/mL) după administrarea IV o dată pe săptămână a formulărilor de hEPO ARNm - LNP.

**FIG. 82** este un grafic care ilustrează activarea celulelor B. S-a măsurat procentul de celule B activate (CD86+ CD27+) în celulele CD19+ pentru formulările de LNP.

**FIG. 83** este un grafic care ilustrează activarea monocitelor măsurată pentru formulările de LNP.

**Fig. 84A-84B** sunt grafice care ilustrează exprimarea EPO. Concentrația de EPO (ng/mL) a fost măsurată la 2 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore și 48 de ore după prima injecție și a cincea injecție.

**Fig. 85A-85E** sunt grafice care ilustrează exprimarea EPO. Concentrația de EPO (ng/mL) a fost măsurată în ziua 1 și ziua 29 la 2 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore și 48 de ore pentru fiecare grup de co-medicație.

**Fig. 86A-86C** sunt grafice care ilustrează populații de celule imune. Ilustrează procentul de celule B (FIG. 86A), celule B1a (FIG. 86B) și monocite (FIG. 86C) în PBMC-uri pentru fiecare grup de co-medicație în ziua -7, la 24 de ore după prima injecție și la 24 de ore după a cincea injecție.

**FIG. 87** este un grafic care ilustrează activarea celulelor B. Procentul de celule B activate în celulele B circulante a fost măsurat pentru fiecare grup de co-medicație în ziua -7, la 24 de ore după prima injecție și la 24 de ore după a cincea injecție.

**FIG. 88** este un grafic care ilustrează activarea monocitelor. Procentul de monocite/macrofage activate în PBMC circulante a fost măsurat pentru fiecare grup de co-medicație în ziua -7, la 24 de ore după prima injecție și la 24 de ore după a cincea injecție.

**Fig. 89A-89B** sunt grafice care ilustrează răspunsul anti-PEG. Nivelurile de IgM anti-PEG (U/mL) (FIG. 89A) și nivelurile de IgG anti-PEG (U/mL) (FIG. 89B) au fost măsurate pentru fiecare grup de co-medicație la momentul inițial, ziua 9 după prima injecție și ziua 34 după a cincea injecție.

**Fig. 90A-90B** sunt două grafice care ilustrează nivelurile de IgM anti-PEG (U/mL) și nivelurile de EPO (ng/mL) în două dintre grupurile din FIG. 78: C57Bl6J (FIG. 90A) și slgM-/- (FIG. 90B). În FIG. 90A, nivelurile de IgM anti-PEG sunt reprezentate grafic cu cercuri gri deschis; în FIG. 90B, ele sunt reprezentate cu cercuri negre. Concentrațiile de EPO sunt indicate prin cercuri negre (FIG. 90A) și pătrate negre (FIG. 90B).

**Fig. 91A-91B:** Efectul co-medicației asupra ABC în NHP. Co-medicația ameliorează producția de citokine (IL-6) în NHP-uri (FIG. 91A) și co-medicația cu Gilcnya reduce producția de IgM anti-PEG, în concordanță cu ABC redus (FIG. 91B).

**FIG. 92:** Celulele B proliferază în prezența LNP-urilor DSPC. Celulele splenice au fost colorate cu CFSE și după spălare, incubate cu IL-6, anti-BCR, lipozomi DOPC, LNP DSPC care conține ARNm, LNP DSPC care conține ARNs sau LNP gol timp de 4 zile la 37°C. În ziua 4, celulele au fost recoltate, spălate și colorate pentru markerii de suprafață (CD19 și CD3) înainte de a fi măsurate pe un citometru în flux BDFortessa și analizate cu software-ul ModFit 4.1.

**FIG. 93:** LNP-urile DSPC induc eliberarea de calciu în celulele B. Celulele splenice au fost colorate cu Calcium Sensor Dye eFluor<sup>®</sup> 514, CD19 și CD3. După spălare, s-a obținut o linie de bază pentru calciu timp de 30 de secunde pe un citometru în flux BDFortessa. Imediat după aceasta, celulele au fost incubate cu LNP-uri DSPC conținând ARNm, lipozomi DOPC, LNP-uri oleice sau anti BCR și semnalul de calciu a fost achiziționat timp de 360 de secunde. Apoi, la celule a fost adăugat un cocktail de stimulare celulară

și semnalul a fost achiziționat pentru încă 30 de secunde. Analiza a fost efectuată folosind software-ul ModFit 4.1.

#### DESCRIEREA DETALIATĂ

Această dezvoltare furnizează compuși și compoziții care cuprind lipide care nu sunt supuși la ABC și/sau care au o toxicitate redusă, precum și metode de administrare a LNP-urilor unui subiect fără a promova răspunsuri la medicamente legate de LNP, inclusiv ABC și toxicitatea indusă de LNP (de exemplu, coagulopatie, coagulare intravasculară diseminată, tromboză vasculară, CARPA, APR sau o combinație a acestora).

Compușii și compozițiile care cuprind lipide sunt compuși și compoziții care cuprind sau sunt conjugați la una sau mai multe lipide. Acești agenți pot fi denumiți aici ca agenți conjugați cu lipide sau agenți lipidați. Alternativ, astfel de lipide pot încapsula agenți cum ar fi agenți profilactici, terapeutici și de diagnostic. Acești agenți pot fi denumiți aici agenți încapsulați în lipide sau agenți încapsulați în nanoparticule lipidice (LNP).

Astfel, trebuie să se înțeleagă că această dezvoltare furnizează compuși și compoziții îmbunătățite pentru reducerea sau eliminarea ABC-ului și a toxicității la administrarea *in vivo*. Pentru conciziune, această dezvoltare se poate referi totuși, în unele cazuri, la compoziții sau formulări cum ar fi nanoparticule lipidice sau LNP-uri. Aceasta este destinată unor scopuri de exemplificare și trebuie înțeles că diferențele învățături furnizate aici se aplică în mod egal compușilor individuali, cum ar fi compușii conjugați cu lipide, cu excepția cazului în care se specifică altfel în mod explicit.

#### *Clearance-ul accelerat al sângelui*

Invenția furnizează compuși, compoziții și metode de utilizare a acestora pentru reducerea efectului de ABC asupra unui agent activ administrat repetat, cum ar fi un agent activ biologic. După cum va fi evident, reducerea sau eliminarea totală a efectului ABC-ului asupra unui agent activ administrat crește eficient timpul de înjumătățire și astfel eficacitatea acestuia.

În unele variante de realizare, termenul de reducere a ABC-ului se referă la orice reducere a ABC-ului în comparație cu un LNP martor de referință pozitiv care induce ABC, cum ar fi un LNP MC3. LNP-urile care induc ABC determină o reducere a nivelurilor circulante ale unui agent activ la o a doua administrare sau la o administrare ulterioară într-un interval de timp dat. Astfel, o reducere a ABC se referă la un clearance mai scăzut al agentului circulant la o a doua doză sau o doză ulterioară de agent, comparativ cu un LNP standard. Reducerea poate fi, de exemplu, de cel puțin 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, sau 100%. În unele variante de realizare reducerea este de 10-100%, 10-50%, 20-100%, 20-50%, 30-100%, 30-50%, 40%-100%, 40-80%, 50-90%, sau 50-100%. Alternativ, reducerea ABC-ului poate fi caracterizată ca având cel puțin un nivel detectabil de agent circulant după o a doua administrare sau o administrare ulterioară sau o creștere de cel puțin 2 ori, 3 ori, 4 ori, 5 ori a agentului circulant în raport cu agentul circulant după administrarea unui LNP standard. În unele variante de realizare reducerea este de 2-100 ori, 2-50 ori, 3-100 ori, 3-50 ori, 3-20 ori, 4-100 ori, 4-50 ori, 4-40 ori, 4-30 ori, 4-25 ori, 4-20 ori, 4-15 ori, 4-10 ori, 4-5 ori, 5 - 100 ori, 5-50 ori, 5-40 ori, 5-30 ori, 5-25 ori, 5-20 ori, 5-15 ori, 5-10 ori, 6-100 ori, 6-50 ori, 6-40 ori, 6-30 ori, 6-25 ori, 6-20 ori, 6-15 ori, 6-10 ori, 8-100 ori, 8-50 ori, 8-40 ori, 8-30 ori, 8-25 ori, 8-20 ori, 8-15 ori, 8-10 ori, 10-100 ori, 10-50 ori, 10-40 ori, 10-30 ori, 10-25 ori, 10-20 ori, 10-15 ori, 20-100 ori, 20-50 ori, 20-40 ori, 20-30 ori, sau 20-25 ori.

Dezvoltarea furnizează compuși și compoziții care conțin lipide care sunt mai puțin susceptibili la clearance și, prin urmare, au un timp de înjumătățire mai lung *in vivo*. Acesta este în special cazul în care compozițiile sunt destinate administrării repetate, inclusiv administrării cronice, și chiar mai particular atunci când o astfel de administrare repetată are loc în câteva zile sau săptămâni.

Semnificativ, aceste compoziții sunt mai puțin susceptibile sau ocolesc cu totul fenomenul observat de clearance accelerat a sângelui (ABC). ABC-ul este un fenomen în care anumiți agenți administrați exogen sunt îndepărtați rapid din sânge la a doua administrare și cele ulterioare. Acest fenomen a fost observat, parțial, pentru o varietate de compoziții care conțin lipide, incluzând, dar fără a se limita la, agenți lipidați, lipozomi sau alte vehicule de livrare pe bază de lipide și agenți încapsulați în lipide. Până acum, baza ABC-ului a fost slab înțeleasă și, în unele cazuri, atribuită unui răspuns imun umoral și, în consecință, strategiile pentru limitarea impactului său *in vivo*, în special într-un cadru clinic, au rămas evazive.

Această dezvoltare furnizează compuși și compoziții care sunt mai puțin sensibile, dacă nu sunt

deloc sensibile, la ABC. În unele aspecte importante, astfel de compuși și compoziții sunt compuși sau compoziții care cuprind lipide. Compușii sau compozițiile care conțin lipide din această dezvoltare, în mod surprinzător, nu prezintă ABC la a doua administrare și una ulterioară *in vivo*. Această rezistență la ABC face ca acești compuși și compoziții să fie deosebit de adecvați pentru utilizare repetată *in vivo*, inclusiv pentru utilizarea repetată în perioade scurte de timp, inclusiv zile sau 1-2 săptămâni. Această stabilitate și/sau timp de înjumătățire îmbunătățite se datorează, în parte, incapacității acestor compoziții de a activa celulele B1a și/sau B1b și/sau celulele B convenționale, pDC-urile și/sau trombocitele.

Prin urmare, această dezvoltare asigură o elucidare a mecanismului care stă la baza clearance-ului accelerat al sângelui (ABC). S-a descoperit, în conformitate cu această dezvoltare și invențiile furnizate aici, că fenomenul de ABC cel puțin în ceea ce privește lipidele și nanoparticulele lipidice este mediat, cel puțin parțial, de un răspuns imun înăscut care implică celule B1a și/sau B1b, pDC și/sau trombocite. Celulele B1a sunt în mod normal responsabile pentru secretarea de anticorpi naturali, sub formă de IgM circulantă. Această IgM este poli-reactivă, ceea ce înseamnă că este capabilă să se lege la o varietate de antigeni, deși cu o afinitate relativ scăzută pentru fiecare.

S-a descoperit, în conformitate cu invenția, că unii agenți lipidați sau formulări care conțin lipide, cum ar fi nanoparticulele lipidice administrate *in vivo* declanșează și sunt supuse la ABC. S-a descoperit acum, în conformitate cu invenția, că la administrarea unei prime doze de LNP, una sau mai multe celule implicate în generarea unui răspuns imun înăscut (denumite aici senzori) leagă un astfel de agent, sunt activate și apoi inițiază o cascadă de factori imuni (denumiți aici efectori) care promovează ABC-ul și toxicitatea. De exemplu, celulele B1a și B1b se pot lega de LNP, se pot activa (individual sau în prezența altor senzori, cum ar fi pDC și/sau efectori precum IL6) și secreta IgM naturală care se leagă de LNP. IgM naturală preexistentă la subiect se poate, de asemenea, să recunoască și să se lege de LNP, declanșând astfel fixarea complementului. După administrarea primei doze, producerea de IgM naturală începe în 1-2 ore de la administrarea LNP-ului. Tipic, în aproximativ 2-3 săptămâni, IgM naturală este eliminată din sistem datorită timpului de înjumătățire natural al IgM. IgG naturală este produsă începând cu aproximativ 96 de ore după administrarea LNP-ului. Agentul, atunci când este administrat într-un cadru naiv, își poate exercita efectele biologice relativ neîngreunat de IgM naturală produsă după activarea celulelor B1a sau a celulelor B1b sau a IgG naturală. IgM naturală și IgG naturală sunt nespecifice și, prin urmare, sunt diferite de IgM anti-PEG și IgG anti-PEG.

Deși solicitantul nu este legat de mecanism, se propune că LNP-urile declanșează ABC-ul și/sau toxicitatea prin următoarele mecanisme. Se crede că atunci când un LNP este administrat unui subiect, LNP-ul este transportat rapid prin sânge la splină. LNP-urile pot întâlni celule imune în sânge și/sau splină. Un răspuns imun înăscut rapid este declanșat ca răspuns la prezența LNP-ului în sânge și/sau splină. Solicitantul a arătat aici că, în câteva ore de la administrarea unui LNP, mai mulți senzori imuni au reacționat la prezența LNP-ului. Acești senzori includ, dar nu sunt limitați la, celule imune implicate în generarea unui răspuns imun, cum ar fi celulele B, pDC și trombocitele. Senzorii pot fi prezenți în splină, cum ar fi în zona marginală a splinei și/sau în sânge. LNP-ul poate interacționa fizic cu unul sau mai mulți senzori, care pot interacționa cu alți senzori. Într-un astfel de caz, LNP-ul interacționează direct sau indirect cu senzorii. Senzorii pot interacționa direct unul cu celălalt ca răspuns la recunoașterea LNP-ului. De exemplu, mulți senzori sunt localizați în splină și pot interacționa cu ușurință unul cu celălalt. Alternativ, unul sau mai mulți senzori pot interacționa cu LNP-ul din sânge și pot deveni activați. Senzorul activat poate interacționa apoi direct cu alți senzori sau indirect (de exemplu, prin stimularea sau producerea unui mesager, cum ar fi o citokină, de exemplu, IL6).

În unele variante de realizare, LNP-ul poate interacționa direct cu și activa fiecare dintre următorii senzori: pDC, celule B1a, celule B1b, și trombocite. Aceste celule pot interacționa apoi direct sau indirect una cu cealaltă pentru a iniția producerea de efectori care conduc în cele din urmă la ABC și/sau toxicitate asociată cu doze repetate de LNP. De exemplu, solicitantul a arătat că administrarea de LNP conduce la activarea pDC, agregarea și activarea trombocitelor și activarea celulelor B. Ca răspuns la LNP, trombocitele de asemenea, se agregează și sunt activate și se agregează cu celule B. Celulele pDC sunt activate. S-a descoperit că LNP-ul interacționează relativ rapid cu suprafața trombocitelor și a celulelor B. Blocarea activării oricărui dintre acești senzori sau combinații ca răspuns la LNP este utilă pentru atenuarea răspunsului imun care ar avea loc în mod obișnuit. Această atenuare a răspunsului imun are ca rezultat evitarea ABC-ului și/sau a toxicității.

Senzorii odată activați produc efectori. Un efector, așa cum este utilizat aici, este o moleculă imună produsă de o celulă imunitară, cum ar fi o celulă B. Efectorii includ, dar nu se limitează la, imunoglobulină cum ar fi IgM naturală și IgG naturală și citokine cum ar fi IL6. Celulele B1a și B1b

stimulează producția de IgM naturale în 2-6 ore după administrarea unui LNP. IgG naturală poate fi detectată în 96 de ore. Nivelurile de IL6 cresc în câteva ore. IgM și IgG naturale circulă în organism timp de câteva zile până la câteva săptămâni. În acest timp, efectorii circulanți pot interacționa cu LNP-urile nou administrate, declanșând eliminarea de către organism a acestor LNP-uri. De exemplu, un efector

5 poate recunoaște și se poate lega de un LNP. Regiunea Fc a efectorului poate fi recunoscută și poate declanșa absorbția LNP-ului decorat de către macrofage. Macrofagele sunt apoi transportate în splină. Producerea de efectori de către senzorii imuni este un răspuns tranzitoriu care se corelează cu sincronizarea observată pentru ABC.

10 Dacă doza administrată este a doua doză administrată sau următoarea și dacă o astfel de a doua doză sau următoarea doză este administrată înainte ca IgM și/sau IgG naturale induse anterior să fie eliminate din sistem (de exemplu, înainte de perioada de timp fereastră 2-3), atunci o astfel de a doua doză sau o doză ulterioară este vizată de IgM naturală circulantă și/sau IgG naturală sau Fc care declanșează activarea căii alternative a complementului și este ea însăși eliminată rapid. Când LNP-urile

15 sunt administrate după ce efectorii s-au eliminat din organism sau sunt reduse ca număr, ABC nu este observat.

Astfel, este util în conformitate cu aspectele invenției să se inhibe interacțiunea dintre LNP și unul sau mai mulți senzori, să se inhibe activarea unuia sau mai multor senzori de către LNP (direct sau

20 indirect), să se inhibe producerea unuia sau mai multor efectori, și/sau să se inhibe activitatea unuia sau mai multor efectori. În unele variante de realizare, LNP-ul este proiectat pentru a limita sau bloca interacțiunea LNP-ului cu un senzor. De exemplu, LNP-ul poate avea un PC și/sau PEG modificat pentru a preveni interacțiunile cu senzorii. Alternativ sau suplimentar, un agent care inhibă răspunsurile imune induse de LNP-uri poate fi utilizat pentru a se obține unul sau mai multe dintre aceste efecte.

25 De asemenea, s-a determinat faptul că, celulele B convenționale sunt, de asemenea, implicate în ABC. Specific, la prima administrare a unui agent, celulele B convenționale, denumite aici CD19(+), se leagă la agent și reacționează împotriva acestuia. Spre deosebire de celulele B1a și B1b, celulele B convenționale sunt capabile să creeze mai întâi un răspuns de IgM (începând la aproximativ 96 de ore după administrarea LNP-urilor) urmat de un răspuns de IgG (începând la aproximativ 14 zile după administrarea LNP-urilor) concomitent cu un răspuns de memorie. Astfel, celulele B convenționale reacționează împotriva agentului administrat și contribuie la IgM (și eventual IgG) care mediază ABC-ul. IgM-ul și IgG-ul sunt tipic IgM anti-PEG și IgG anti-PEG.

35 Este avut în vedere că, în unele cazuri, cea mai mare parte a răspunsului de ABC este mediat de celulele B1a și prin răspunsurile imune mediate de B1a. Este avut în plus în vedere că, în unele cazuri, răspunsul de ABC este mediat atât de IgM cât și de IgG, atât cu celule B convenționale cât și celule B1a mediind astfel de efecte. Încă în și alte cazuri, răspunsul de ABC este mediat de molecule IgM naturale, dintre care unele sunt capabile să se lege la IgM natural, care poate fi produs de celulele B1a activate.

40 IgM-urile naturale se pot lega la una sau mai multe componente ale LNP-urilor, de exemplu, legarea la o componentă de fosfolipidă a LNP-urilor (cum ar fi legarea la fragmentul PC al fosfolipidei) și/sau legarea la o componentă PEG-lipidă a LNP-urilor (cum ar fi legarea la PEG-DMG, în special, legarea la fragmentul PEG al PEG-DMG). Deoarece B1a exprimă CD36, la care fosfatidilcolina este un ligand, se consideră că receptorul de CD36 poate media activarea celulelor B1a și astfel producția de IgM naturală.

45 Încă în alte cazuri, răspunsul de ABC este mediat în primul rând de celule B convenționale.

S-a constatat, în conformitate cu invenția, că fenomenul de ABC poate fi redus sau abrogat, cel puțin parțial, prin utilizarea compușilor și compozițiilor (cum ar fi agenți, vehicule de livrare și formulări) care nu activează celulele B1a. Compușii și compozițiile care nu activează celulele B1a pot fi denumiți

50 aici compuși și compoziții inerți la B1a. S-a descoperit, în plus, în conformitate cu invenția, că fenomenul de ABC poate fi redus sau abrogat, cel puțin parțial, prin utilizarea unor compuși și compoziții care nu activează celulele B convenționale. Compușii și compozițiile care nu activează celulele B convenționale pot fi denumite aici, în unele variante de realizare, compuși și compoziții inerte la CD19. Astfel, în unele variante de realizare furnizate aici, compușii și compozițiile nu activează celulele B1a și nu activează

55 celulele B convenționale. Compușii și compozițiile care nu activează celulele B1a și celulele B convenționale pot fi denumite aici, în unele variante de realizare, compuși și compoziții inerți la B1a/CD19.

Aceste mecanisme subiacente nu au fost înțelese până acum și rolul celulelor B1a și B1b și de asemenea, nu a fost apreciată interacțiunea lor cu celulele B convenționale în acest fenomen.

60

În consecință, această dezvăluire furnizează compuși și compoziții care nu promovează ABC-ul. Acestea pot fi caracterizate în plus, ca fiind incapabile de a activa celulele B1a și/sau B1b, trombocitele și/sau pDC și, opțional, celulele B convenționale. Acești compuși (de exemplu, agenți, incluzând agenți biologic activi, cum ar fi agenți profilactici, agenți terapeutici și agenți de diagnostic, vehicule de livrare, inclusiv lipozomi, nanoparticule lipidice și alte structuri de încapsulare pe bază de lipide, *etc.*) și compoziții (*de exemplu*, formulări, *etc.*) sunt de dorit în special pentru aplicațiile care necesită administrarea repetată, și în special administrări repetate care au loc în perioade scurte de timp (de exemplu, în 1-2 săptămâni). Acesta este cazul, de exemplu, dacă agentul este un medicament pe bază de acid nucleic care este furnizat unui subiect la intervale regulate, apropiate Descoperirile furnizate aici pot fi aplicate acestor și altor agenți care sunt administrați similar și/sau care sunt supuși ABC-ului.

De interes deosebit sunt compușii care cuprind lipide, particule care cuprind lipide și compozițiile care cuprind lipide, deoarece acestea sunt cunoscute a fi sensibile la ABC. Astfel de compuși și compoziții care cuprind particule de lipide au fost utilizate pe scară largă ca agenți biologic activi sau ca vehicule de livrare pentru astfel de agenți. Astfel, capacitatea de a-și îmbunătăți eficacitatea unor astfel de agenți, fie prin reducerea efectului ABC asupra agentului în sine, fie asupra vehiculului său de livrare, este benefică pentru o mare varietate de agenți activi.

De asemenea, aici sunt furnizate compoziții care nu stimulează sau nu amplifică un răspuns în fază acută (ARP) asociat cu administrarea de doze repetate a unuia sau mai multor agenți biologic activi.

Compoziția, în unele cazuri, poate să nu se lege la IgM, incluzând, dar fără a se limita la IgM naturală.

Compoziția, în unele cazuri, poate să nu se lege la o proteină de fază acută, cum ar fi, dar fără a se limita la, proteina C-reactivă.

Compoziția, în unele cazuri, poate să nu declanșeze un răspuns imun mediat de CD5(+). Așa cum este utilizat aici, un răspuns imun mediat de CD5(+) este un răspuns imun care este mediat de celulele B1a și/sau B1b. Un astfel de răspuns poate include un răspuns ABC, un răspuns în fază acută, inducerea de IgM și/sau IgG naturale și altele asemenea.

Compoziția, în unele cazuri, poate să nu declanșeze un răspuns imun mediat de CD19(+). Așa cum este utilizat aici, un răspuns imun mediat de CD19(+) este un răspuns imun care este mediat de celulele B CD19(+), CD5(-) convenționale. Un astfel de răspuns poate include inducerea de IgM, inducerea de IgG, inducerea celulelor B de memorie, un răspuns ABC, un răspuns de anticorp antimedicament (ADA) incluzând un răspuns anti-proteic în care proteina poate fi încapsulată într-un LNP și altele asemenea.

Celulele B1a sunt un subset de celule B implicate în imunitatea înăscută. Aceste celule sunt sursa de IgM circulant, denumit anticorp natural sau anticorp seric natural. Anticorpii IgM naturali sunt caracterizați ca având o afinitate slabă pentru un număr de antigeni și, prin urmare, sunt denumiți "poli-specifici" sau "poli-reactivi", indicând capacitatea lor de a se lega la mai mult de un antigen. Celulele B1a nu sunt capabile să producă IgG. În plus, ele nu se dezvoltă în celule cu memorie și, prin urmare, nu contribuie la un răspuns imun adaptativ. Cu toate acestea, ele sunt capabile să secrete IgM la activare. IgM secretată este de obicei eliminată în aproximativ 2-3 săptămâni, moment în care sistemul imunitar devine relativ naiv față de antigenul administrat anterior. Dacă același antigen este prezentat după această perioadă de timp (de exemplu, la aproximativ 3 săptămâni după expunerea inițială), antigenul nu este curățat rapid. În orice caz, semnificativ, dacă antigenul este prezentat în acea perioadă de timp (de exemplu, în decurs de 2 săptămâni, inclusiv în decurs de 1 săptămână sau în câteva zile), atunci antigenul este eliminat rapid. Această întârziere între doze consecutive a făcut ca anumiți agenți terapeutici sau de diagnostic care conțin lipide să fie inadecvați pentru utilizare.

La oameni, celulele B1a sunt CD19(+), CD20(+), CD27(+), CD43(+), CD70(-) și CD5(+). La șoareci, celulele B1a sunt CD19(+), CD5(+), și CD45 celulă B izoformă B220(+). Expriarea CD5 este cea care distinge de obicei celulele B1a de alte celule B convenționale. Celulele B1a pot exprima niveluri ridicate de CDS și, pe această bază, pot fi distinse de alte celule B-1, cum ar fi celulele B-1b, care exprimă niveluri scăzute sau nedetectabile de CDS. CDS este o glicoproteină de suprafață a celulei panT. Celulele B1a exprimă, de asemenea, CD36, cunoscut și sub numele de translocază a acizilor grași. CD36 este un membru al familiei de receptori scavenger de clasă B. CD36 poate lega mulți liganzi, inclusiv

lipoproteinele oxidate cu densitate joasă, lipoproteinele native, fosfolipidele oxidate și acizii grași cu lanț lung.

5 Celulele B1b sunt un alt subset de celule B implicate în imunitatea înăscută. Aceste celule sunt o altă sursă de IgM naturală circulantă. Mai mulți antigeni, inclusiv PS, sunt capabili să inducă imunitate independent de celulele T prin activarea B1b. CD27 este de obicei reglat ascendent pe celulele B1b ca răspuns la activarea antigenului. Similar cu celulele B1a, celulele B1b sunt de obicei localizate în anumite locații ale corpului, cum ar fi splina și cavitatea peritoneală și au o abundență foarte scăzută în sânge. IgM naturală secretată de B1b este de obicei eliminată în aproximativ 2-3 săptămâni, moment în care sistemul imunitar devine relativ naiv față de antigenul administrat anterior. Dacă același antigen este prezentat după această perioadă de timp (de exemplu, la aproximativ 3 săptămâni după expunerea inițială), antigenul nu este curățat rapid. Cu toate acestea, este semnificativ că, dacă antigenul este prezentat în aceeași perioadă de timp (de exemplu, în decurs de 2 săptămâni, inclusiv în decurs de 1 săptămână sau în câteva zile), atunci antigenul este eliminat rapid. Această întârziere între doze consecutive a făcut ca anumiți agenți terapeutici sau de diagnostic care conțin lipide să fie inadecvați pentru utilizare.

În unele variante de realizare este de dorit să se blocheze activarea celulelor B1a și/sau B1b. O strategie pentru blocarea activării celulelor B1a și/sau B1b implică, determinarea componentelor unei nanoparticule lipidice care promovează activarea celulelor B și neutralizarea acelor componente. S-a descoperit aici că cel puțin PEG și fosfatidilcolina (PC) contribuie la interacțiunea celulelor B1a și B1b cu alte celule și/sau la activare. PEG poate juca un rol în promovarea agregării dintre celulele B1 și trombocite, ceea ce poate conduce la activare. PC (o lipidă helper în LNP-uri) este, de asemenea, implicată în activarea celulelor B1, probabil prin interacțiunea cu receptorul CD36 de pe suprafața celulei B. Numeroase particule care au alternative PEG-lipidice, lipide fără PEG și/sau înlocuitori de PC (de exemplu, acid oleic sau analogi ai acestuia) au fost proiectate și testate. Solicitantul a stabilit că înlocuirea uneia sau mai multor dintre aceste componente într-un LNP care altfel ar promova ABC la administrarea repetată, este utilă în prevenirea ABC-ului prin reducerea producției de IgM naturale și/sau activarea celulelor B. Astfel, invenția cuprinde LNP-uri care au un ABC redus ca rezultat al unui model care elimină includerea declanșatorilor de celule B.

O altă strategie pentru blocarea activării celulelor B1a și/sau B1b implică utilizarea unui agent care inhibă răspunsurile imune induse de LNP-uri. Aceste tipuri de agenți sunt discutate mai detaliat mai jos. În unele variante de realizare, acești agenți blochează interacțiunea dintre celulele B1a/B1b și LNP-ul sau trombocite sau pDC. De exemplu, agentul poate fi un anticorp sau un alt agent de legare care blochează fizic interacțiunea. Un exemplu în acest sens este un anticorp care se leagă de CD36 sau CD6. Agentul poate fi, de asemenea, un compus care previne sau dezactivează semnalizarea celulei B1a/B1b odată activată sau înainte de activare. De exemplu, este posibil să se blocheze una sau mai multe componente din cascada de semnalizare B1a/B1b care rezultă din interacțiunea celulelor B cu LNP sau alte celule imune. În alte variante de realizare, agentul poate acționa unul sau mai mulți efectori produși de celulele B1a/B1b după activare. Acești efectori includ, de exemplu, IgM naturale și citokine.

S-a demonstrat, în conformitate cu aspectele invenției, că atunci când activarea celulelor pDC este blocată, activarea celulelor B ca răspuns la LNP este scăzută. Astfel, pentru a evita ABC-ul și/sau toxicitatea, poate fi de dorit să se prevină activarea pDC. Similar cu strategiile discutate mai sus, activarea celulelor pDC poate fi blocată de agenți care interferează cu interacțiunea dintre pDC și LNP și/sau celulele B/trombocite. Alternativ, unii agenți care acționează asupra pDC pentru a bloca capacitatea acestuia de a se activa sau asupra efectorilor săi pot fi utilizați împreună cu LNP pentru a evita ABC-ul.

Trombocitele joacă, de asemenea, un rol important în ABC și toxicitate. Foarte rapid, după ce o primă doză de LNP este administrată unui subiect, trombocitele se asociază cu LNP-ul, se agreghează și sunt activate. În unele variante de realizare este de dorit să se blocheze agregarea și/sau activarea trombocitelor. O strategie pentru blocarea agregării și/sau activării trombocitelor implică determinarea componentelor unei nanoparticule lipidice care promovează agregarea și/sau activarea trombocitelor și neutralizarea respectivei componente. S-a descoperit aici că, cel puțin PEG contribuie la agregarea, activarea și/sau interacțiunea trombocitelor cu alte celule. Au fost proiectate și testate numeroase particule alternative PEG-lipidă și fără PEG. Solicitantul a stabilit că înlocuirea uneia sau mai multora dintre aceste componente într-un LNP care altfel ar promova ABC-ul la administrarea repetată, este utilă în prevenirea ABC-ului prin reducerea producției de IgM naturale și/sau agregării trombocitelor. Astfel, invenția cuprinde LNP-uri care au un ABC redus ca rezultat al unui model care elimină includerea declanșatorilor de trombocite. Alternativ, agenții care acționează asupra trombocitelor pentru a le bloca activitatea odată ce sunt activate sau asupra efectorilor acestora pot fi utilizați împreună cu LNP-ul pentru a evita ABC-ul.

**Măsurarea activității ABC și activităților înrudite**

Diferiți compuși și compoziții furnizate aici, inclusiv LNP-uri, nu promovează activitatea ABC la administrare in vivo. Aceste LNP-uri pot fi caracterizate și/sau identificate prin oricare dintre numeroase teste, cum ar fi, dar fără a se limita la cele descrise mai jos, precum și oricare dintre testele dezvoltate în secțiunea Exemple, care include subsecțiunea de metode din Exemple

În unele variante de realizare, metodele implică administrarea unui LNP fără a produce un răspuns imun care promovează ABC-ul. Un răspuns imun care promovează ABC-ul implică activarea unuia sau mai multor senzori, cum ar fi celulele B1, pDC sau trombocitele, și unuia sau mai multor efectori, cum ar fi IgM naturală, IgG naturală sau citokine cum ar fi IL6. Astfel, administrarea unui LNP fără a produce un răspuns imun care promovează ABC-ul, implică cel puțin administrarea unui LNP fără activarea semnificativă a unuia sau mai multor senzori și producerea semnificativă a unuia sau mai multor efectori. Semnificativ, utilizat în acest context, se referă la o cantitate care ar conduce la consecința fiziologică a clearance-ului sanguin accelerat a totalității sau a unei părți a unei a doua doze în raport cu nivelul de clearance sanguin așteptat pentru o a doua doză de LNP care declanșează un ABC. De exemplu, răspunsul imun ar trebui să fie atenuat astfel încât ABC-ul observat după a doua doză să fie mai mic decât ar fi așteptat pentru un LNP care declanșează ABC.

**Testul de activare a B1a sau B1b**

Anumite compoziții furnizate în această dezvoltare nu activează celulele B, cum ar fi celulele B1a sau B1b (CD19+ CD5+) și/sau celulele B convenționale (CD19+ CD5-). Activarea celulelor B1a, a celulelor B1b sau a celulelor B convenționale poate fi determinată într-un număr de modalități, dintre care unele sunt furnizate mai jos. Populația de celule B poate fi furnizată ca populații de celule B fracționate sau nefracționate de populații splenocite sau celule mononucleare din sânge periferic (PBMC). Dacă este aceasta din urmă, populația de celule poate fi incubată cu LNP-ul ales pentru o perioadă de timp și apoi recoltată pentru analiza ulterioară. Alternativ, supernatantul poate fi recoltat și analizat.

**Reglarea ascendentă a activării exprimării unui marker de suprafață a celulei**

Activarea celulelor B1a, a celulelor B1b sau a celulelor B convenționale poate fi demonstrată ca exprimare crescută a markerilor de activare a celulelor B, incluzând markeri de activare tardivă, cum ar fi CD86. Într-un test exemplificativ nelimitator, celulele B nefracționate sunt furnizate ca o populație de splenocite sau ca o populație de PBMC, incubate cu un LNP la alegere pentru o anumită perioadă de timp și apoi colorate cu un marker de celule B standard, cum ar fi CD19 și cu un marker de activare cum ar fi CD86 și analizate utilizând, de exemplu, citometria în flux. Un martor negativ adecvat implică incubarea aceleiași populații cu mediu și apoi efectuarea aceluiași etape de colorare și vizualizare. O creștere a exprimării CD86 în populația de testat în comparație cu martorul negativ indică activarea celulelor B

**Eliberarea de citokine proinflamatorii**

Activarea celulelor B poate fi, de asemenea, evaluată printr-un test de eliberare a citokinelor. De exemplu, activarea poate fi evaluată prin producerea și/sau secreția de citokine cum ar fi IL-6 și/sau TNF-alfa la expunerea cu LNP-uri de interes.

Astfel de teste pot fi efectuate utilizând teste de rutină de secreție de citokine bine cunoscute în domeniu. O creștere a secreției de citokine indică activarea celulelor B.

**Legarea/asocierea LNP la și /sau absorbția de celulele B**

Asocierea LNP sau legarea la celulele B poate fi, de asemenea, utilizată pentru a se evalua un LNP de interes și pentru a caracteriza în continuare un astfel de LNP. Asocierea/legarea și/sau absorbția/internalizarea pot fi evaluate utilizând un LNP etichetat detectabil, cum ar fi etichetat fluorescent și urmărirea locației unui astfel de LNP în sau pe celulele B după diferite perioade de incubație.

Invenția are în vedere în plus, faptul că, compozițiile furnizate aici pot fi capabile să evite recunoașterea sau detectarea și opțional să lege de mediatorii din aval ai ABC, cum ar fi IgM circulant și/sau mediatorii de răspuns în fază acută, cum ar fi proteinele de fază acută (de exemplu, proteina C reactivă (CRP)).

**Metode de utilizare pentru reducerea ABC**

De asemenea, sunt furnizate aici metode pentru eliberarea LNP-urilor, care pot încapsula un agent, cum ar fi un agent terapeutic, la un subiect fără a promova ABC.

În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea oricăruia dintre LNP-urile descrise aici, care nu promovează ABC, de exemplu, nu induce producerea de IgM naturală care se leagă la LNP-uri, nu activează celulele B1a și/sau B1b. Așa cum este utilizat aici, un LNP care "nu promovează ABC" se referă la un LNP care nu induce răspunsuri imune care să conducă la un ABC substanțial sau la un nivel substanțial scăzut de răspunsuri imune care nu este suficient pentru a conduce la un ABC substanțial. Un LNP care nu induce producerea de IgM naturale care se leagă de LNP se referă la LNP-uri care nu induc fie nicio IgM naturală care se leagă la LNP, fie un nivel substanțial scăzut al moleculelor naturale de IgM, care este insuficient pentru a conduce la un ABC substanțial. Un LNP care nu activează celulele B1a și/sau B1b se referă la LNP-uri care nu induc niciun răspuns al celulelor B1a și/sau B1b pentru a produce legarea IgM naturală la LNP-uri sau un nivel substanțial scăzut de răspunsuri B1a și/sau B1b, ceea ce este insuficient pentru a conduce la un ABC substanțial.

În unele variante de realizare, termenii nu activează și nu induc producția reprezintă o reducere relativă la o valoare sau condiție de referință. În unele variante de realizare, valoarea sau condiția de referință este cuantumul de activare sau inducere a producerii unei molecule cum ar fi IgM de către un LNP standard, cum ar fi un LNP MC3. În unele variante de realizare, reducerea relativă este o reducere de cel puțin 30%, de exemplu cel puțin 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, sau 100%. În alte variante de realizare, termenii nu activează celule cum ar fi celulele B și nu induc producerea unei proteine precum IgM se pot referi la o cantitate nedetectabilă de celule active sau de proteină specifică.

În unele cazuri, LNP-urile descrise aici pot fi lipsite de un epitop care activează celulele B1a, de exemplu, lipsite de un epitop care activează sau interacționează cu CD36 sau CD6. Astfel de LNP-uri nu conțin nici epitopi capabili să activeze celulele B1a sau CD36, fie conțin astfel de epitopi într-o cantitate substanțial scăzută, ceea ce nu este suficient pentru a activa B1a sau CD36 la un nivel suficient de mare pentru a induce un ABC substanțial. În alte variante de realizare, LNP-urile descrise aici pot fi lipsite de un epitop care activează celulele B1b. Prin substanțial lipsit se înțelege, clasic, că un LNP include mai puțin de 99% din agentul menționat. În unele variante de realizare, LNP-ul poate să nu includă niciun agent menționat. În unele cazuri, LNP-urile descrise aici pot conține una sau mai multe lipide helper așa cum este descris aici, care poate cuprinde cel puțin un lanț de acid gras de cel puțin 8C și cel puțin un fragment polar. În unele exemple, lipida helper nu activează celulele B1a și/sau B1b. În alte exemple, lipida helper nu se leagă sau are afinitate de legare scăzută la CD36. Alternativ, lipida helper poate inhiba competitiv fosfatidilcolina de la legarea la CD36.

Alternativ, LNP-ul poate fi coadministrat (administrat împreună cu, înainte sau după) sau coformulat cu un agent care îndepărtează sau țintește celulele B sau B1a. Un agent care elimină sau țintește celulele B sau B1a poate fi Rituximab. Rituximab (RITUXAN<sup>®</sup>, GenentechBiogen) este un anticorp monoclonal împotriva proteinei CD20, care se găsește în principal pe suprafața celulelor B ale sistemului imunitar. Rituximabul interacționează cu CD20 de pe suprafața celulelor B și distruge celulele B. După cum este prezentat în exemple, combinația de Rituximab și LNP a redus semnificativ ABC-ul la administrarea ulterioară de LNP.

În alte variante de realizare, agentul se poate lega și/sau inhiba CD6 pe celulele B1a. Un exemplu de agent care leagă și/sau inhibă CD6 pe celulele B1a este un anticorp anti-CD6, cum ar fi Alzumab. Alzumab (itolizumab, Biocon) este un anticorp monoclonal umanizat IgG1 care vizează selectiv CD6, un marker de celule T pan implicat în co-stimularea, aderența și maturarea celulelor T. Alzumab se leagă și de CD6 de pe suprafața celulelor B1a.

În unele cazuri, astfel de metode pot cuprinde

- (i) administrarea unei prime doze de agent unui subiect,
- (ii) administrarea unei a doua doze sau a unei doze ulterioare de agent la subiect, în care a doua doză sau următoarea este administrată în decurs de 2 săptămâni de la prima sau doza anterioară și
- (iii) repetarea etapei (II) o dată sau de mai multe ori,

în care agentul este formulat cu un LNP care nu promovează ABC.

O altă metodă de livrare a unui agent la un subiect implică

- (i) administrarea unei prime doze de agent unui subiect,
- (ii) administrarea unei a doua doze sau a unei doze ulterioare de agent la un subiect, în care a doua doză sau următoarea este administrată în decurs de 2 săptămâni de la prima sau doza anterioară și
- (iii) repetarea etapei (ii) o dată sau de mai multe ori,



în care timpul de înjumătățire al agentului după a doua doză și doza ulterioară este de cel puțin 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% sau mai mult din timpul de înjumătățire al agentului după prima doză.

Încă o altă metodă de livrare a unui agent la un subiect implică

- 5 (i) administrarea unei prime doze de agent unui subiect,  
 (ii) administrarea unei a doua doze sau a unei doze ulterioare de agent unui subiect, în care a doua doză sau următoarea este administrată în decurs de 2 săptămâni de la prima doză sau anterioară și  
 (iii) repetarea etapei (ii) o dată sau de mai multe ori,  
 10 în care activitatea sau concentrația sanguină a agentului după a doua doză și doza ulterioară este de cel puțin 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% sau mai mult din activitatea sau concentrația sanguină a agentului după prima doză.

15 A doua doză sau dozele ulterioare pot fi administrate în decurs de 1 săptămână, sau în decurs de 6 zile, sau în decurs de 5 zile, sau în decurs de 4 zile, sau în decurs de 3 zile, sau în decurs de 2 zile, sau în decurs de 1 zi de la prima doză sau anterioară.

Agentul poate fi un agent biologic activ, cum ar fi un agent de diagnostic sau un agent terapeutic, deși nu este atât de limitat.

20 Agenții pot fi administrați de două sau mai multe ori, de trei sau de mai multe ori, de patru sau de mai multe ori etc. Prin urmare, administrarea agentului poate fi repetată o dată, de două ori, de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau de mai multe ori. Agentul poate fi administrat cronic sau acut, în funcție de scopul intenționat.

25 Metoda poate fi o metodă de tratare a unui subiect care are sau riscă să aibă o afecțiune care beneficiază de agentul activ biologic, în special dacă agentul activ din punct de vedere biologic este un agent terapeutic. Alternativ, metoda poate fi o metodă de diagnosticare a unui subiect, caz în care agentul activ biologic este un agent de diagnostic.

30 A doua și dozele ulterioare de agent biologic activ pot menține o activitate de cel puțin 50% din activitatea primei doze, sau cel puțin 60% din prima doză, sau cel puțin 70% din prima doză, sau cel puțin 75% din prima doză, sau cel puțin 80% din prima doză, sau cel puțin 85% din prima doză, sau cel puțin 90% din prima doză, sau cel puțin 95% din prima doză, sau mai mult, pentru cel puțin 1 zi, 2 zile, 3 zile, 4 zile, 5 zile, 6 zile sau 7 zile după administrarea celei de-a doua doze sau a dozei ulterioare.

35 Când agentul biologic activ este un ARNm (un ARNm terapeutic sau un ARNm care codifică un antigen de vaccin), o metodă pentru reducerea ABC a LNP-urilor care încapsulează ARNm poate fi efectuată utilizând o cantitate mică de LNP-uri pentru prima doză și/sau a doua doză (precum și dozele ulterioare). Dozele mici pot fi egale cu sau mai mici de 0,3 mg/kg, de exemplu, 0,2 mg/kg sau 0,1 mg/kg. În unele cazuri, prima doză, a doua doză sau ambele variază de la 0,1 la 0,3 mg/kg.

40 Intervalul dintre prima doză și a doua doză în oricare dintre metodele descrise aici poate fi egal cu sau mai mic de două săptămâni, de exemplu, mai mic de 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 sau 1 zile. În unele cazuri, subiectului i se poate administra o doză o dată pe zi, la fiecare 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau 21 de zile în oricare dintre metodele descrise aici.

45 Mai mult, inhibarea ABC a LNP-urilor la un subiect poate fi realizată prin utilizarea unuia sau mai multor agenți secundari care inhibă răspunsurile imune induse de LNP-uri, de exemplu, inhibă legarea sau activitatea senzorilor, de exemplu, producția de IgM naturală, producția de IgG naturală, activarea celulelor B1a, activarea celulelor B1b și/sau activarea trombocitelor și/sau a celulelor dendritice sau activitatea sau producerea oricăror efectori. Agenții secundari sunt denumiți alternativ ca agenți care inhibă răspunsurile imune induse de LNP-uri. În unele cazuri, agentul secundar poate inhiba producerea de IgM-uri naturale care leagă LNP-urile sau poate neutraliza astfel de IgM-uri naturale. În alte cazuri, agentul secundar poate inhiba activarea celulelor B1a sau poate elimina celulele B1a. De exemplu, un astfel de agent secundar poate inhiba un receptor de suprafață al celulelor B1a, incluzând, dar fără a se limita la CD36. Alternativ sau în plus, agentul secundar poate interfera cu legarea IgM la ținta sa. În alte variante de realizare, agentul secundar poate inhiba producerea de IgG naturală care leagă LNP-urile sau poate neutraliza astfel de IgG-uri naturale sau poate interfera cu legarea IgG la ținta sa. În alte cazuri, agentul secundar poate inhiba activarea celulelor B1b sau poate elimina celulele B1b.

60

**Efecte trombotice și toxicitate**

Invenția se bazează suplimentar, în parte, pe elucidarea mecanismului care stă la baza toxicității limitatoare de doză asociată cu administrarea de LNP. O astfel de toxicitate poate implica coagulopatie, coagulare intravasculară diseminată (DIC, denumită și coagulopatie consumativă), fie acută fie cronică și/sau tromboză vasculară. În unele cazuri, toxicitatea limitatoare de doză asociată cu LNP-urile este răspunsul în fază acută (APR) sau pseudoalergia legată de activarea complementului (CARPA).

Așa cum este utilizată aici, coagulopatia se referă la coagularea crescută (coagularea sângelui) in vivo. Descoperirile raportate în această dezvoltare sunt în concordanță cu o astfel de coagulare crescută și oferă semnificativ, o perspectivă asupra mecanismului de bază. Coagularea este un proces care implică o serie de factori și tipuri de celule diferiți, iar până acum relația dintre și interacțiunea dintre LNP-uri și trombocite nu a fost înțeleasă în acest sens. Această dezvoltare furnizează dovezi ale unei astfel de interacțiuni și, de asemenea, furnizează compuși și compoziții care sunt modificate pentru a avea efect trombotic redus, incluzând asocierea trombotică redusă, agregarea trombotică redusă și/sau agregarea trombotică redusă. Capacitatea de a modula, incluzând, de preferință, de a modula în jos, astfel de efecte trombotice poate reduce incidența și/sau severitatea coagulopatiei post-administrare de LNP. Acest lucru, la rândul său, va reduce toxicitatea legată de un astfel de LNP, permițând astfel administrarea unor doze mai mari de LNP și, mai ales, a încărcăturii acestora la pacienții care au nevoie de acestea.

CARPA este o clasă de toxicitate imună acută manifestată în reacții de hipersensibilitate (HSR-uri), care pot fi declanșate de nanomedicamente și substanțe biologice. Spre deosebire de reacțiile alergice, CARPA tipic, nu implică IgE, ci apare ca o consecință a activării sistemului complementului, care face parte din sistemul imunitar înăscut care îmbunătățește abilitățile organismului de a elimina agenții patogeni. Una sau mai multe dintre următoarele căi, calea clasică a complementului (CP), calea alternativă (AP) și calea lectinei (LP), pot fi implicate în CARPA. Szebeni, *Molecular Immunology*, 61:163-173 (2014).

Calea clasică este declanșată de activarea complexului C 1, care conține Clq,Clr,Cis, sau Clqr2s2. Activarea complexului C1 are loc atunci când Clq se leagă de IgM sau IgG complexată cu antigeni, sau când Clq se leagă direct de suprafața agentului patogen. O astfel de legare conduce la modificări conformaționale ale moleculei Clq, ceea ce conduce la activareaClr, care, la rândul său, scindează C1-urile. ComponentaClr2s2 împarte acum C4 și apoi C2, producând C4a, C4b, C2a și C2b. C4b și C2b se leagă pentru a forma calea clasică C3-convertază (complexul C4b2b), care promovează scindarea C3 în C3a și C3b. C3b leagă apoi convertaza C3 la convertaza C5 (complexul C4b2b3b). Calea alternativă este activată continuu ca rezultat al hidrolizei spontane a C3. Factorul P (properdina) este un agent de reglare pozitiv al căii alternative. Oligomerizarea properdinei stabilizează convertaza C3, care poate apoi scinda mult mai mult C3. Moleculele C3 se pot lega de suprafețe și pot recruta mai multă activitate B, D și P, ceea ce conduce la amplificarea activării complementului.

Răspunsul în fază acută (APR) este un răspuns imun înăscut sistemic complex pentru prevenirea infecției și curățarea de potențialii agenți patogeni. Numeroase proteine sunt implicate în APR, iar proteina C reactivă este una bine caracterizată.

S-a descoperit, în conformitate cu invenția, că anumite LNP-uri sunt capabile să se asocieze fizic cu trombocite aproape imediat după administrarea in vivo, în timp ce alte LNP-uri nu se asociază deloc cu trombocitele sau doar la niveluri de fundal. Semnificativ, acele LNP-uri care se asociază cu trombocite stabilizează, de asemenea, agregatele trombocitelor care se formează ulterior. Contactul fizic al trombocitelor cu anumite LNP-uri se corelează cu, capacitatea acestor trombocite de a rămâne agregate sau de a forma agregate continuu pentru o perioadă lungă de timp după administrare. Astfel de agregate cuprind trombocite activate și, de asemenea, celule imune înăscute, cum ar fi macrofagele și celulele B.

Agregarea trombotică este observată la scurt timp după administrarea de LNP și pare să aibă loc în același timp sau potențial înainte de activarea trombocitelor, așa cum este evidențiat prin exprimarea crescută a markerilor de activare a trombocitelor, cum ar fi CD31 și CD62P. LNP-urile care nu se asociază cu un număr semnificativ de trombocite, dar care sunt capabile să activeze trombocitele într-un grad mai mic decât LNP-urile mai robuste (discutate mai sus) provoacă, de asemenea, agregarea trombocitelor foarte devreme după administrare și, probabil, înainte de activarea trombocitelor. Astfel, asocierea in vivo, a LNP cu trombocitele pare să aibă loc aproximativ în același timp cu agregarea trombocitelor și, probabil, înainte de vârful activării trombocitelor.

De asemenea, este semnificativă observația suplimentară că un subset de LNP-uri sunt capabili să activeze trombocitele, chiar și fără o asociere fizică apreciabilă cu trombocitele. Acest subset este, de asemenea, capabil să formeze agregate trombocitare cuprinzând celule R și macrofage

S-a demonstrat, de asemenea, că anumite LNP-uri stimulează interacțiunea timpurie între trombocite (fie că sunt sau nu activate) și macrofage și celulele B, activând astfel și aceste din urmă celule. Efectul LNP-urilor asupra celulelor B și a macrofagelor este, prin urmare, atât direct, cât și indirect, dar în cele din urmă poate conduce la activarea crescută a acestor celule.

Activarea trombocitelor ar putea media activarea complementului. Prin urmare, se consideră că anumite LNP-uri pot induce toxicitate limitatoare de doză, cum ar fi CARPA și APR prin intermediul activării trombocitelor și ulterior a sistemului complementului. Anumite componente lipidice ale LNP-urilor, cum ar fi fosfatidilcolina, se pot lega și activa CD36 pe trombocite, ceea ce ar declanșa semnalizarea TLR2/4/6, conducând la agregarea și activarea trombocitelor. Trombocitele activate exprimă CD62P (selectina P), care este o proteină care leagă C3b și poate declanșa cascada complementului. Trombocitele activate recrutează, de asemenea, celule imune, cum ar fi macrofagele și neutrofilele, care conduc la răspunsuri imune suplimentare, inclusiv secreția de citokine (de exemplu, IL-6). În plus, s-a descoperit că properdina se leagă direct de trombocitele activate, de exemplu, prin CD62P și recrutează C3b sau C3(H<sub>2</sub>O), declanșând astfel calea alternativă. Saggi și colab, J. Immunol. 190:6457-6467 (2013).

În consecință, utilizări ale LNP-urilor care nu induc activarea și/sau agregarea trombocitelor, și/sau nu promovează activarea sistemului complementului (de exemplu, calea clasică și/sau calea alternativă) ar putea reduce riscul de toxicitate legată de LNP. Astfel de LNP-uri pot să nu inducă deloc activarea trombocitelor și/sau a sistemului complementului. Alternativ, astfel de LNP-uri pot induce un nivel substanțial scăzut de activare a trombocitelor și/sau activare a sistemului complementului, care nu este suficient pentru a conduce la o toxicitate substanțială limitatoare de doză.

Alternativ sau în plus, agenții secundari care blochează activarea/agregarea trombocitară inițială, activarea inițială a sistemului complementului și/sau cascada complementului din aval, fie pe calea clasică, fie pe calea alternativă, ar putea fi utilizați pentru a preveni sau reduce toxicitate legată de LNP. În unele cazuri, un astfel de agent secundar poate inhiba activarea trombocitelor, de exemplu, poate inhiba activarea CD36 declanșată de LNP-uri. În alte cazuri, agentul secundar poate inhiba CARPA sau ARP, de exemplu, poate inhiba calea clasică și/sau calea alternativă. Un astfel de agent secundar poate ținti cel puțin o componentă din sistemul complementului sau proteinele implicate în ARP, blocând astfel cascada de reacție. De exemplu, agentul secundar poate fi un antagonist al unui receptor de TLR (TLR2, TLR4, sau TLR6), CD62P, CD31, properdina, o componentă a sistemului complementului (de exemplu, Clq, C3a, C3b, C5a, și C5b). Încă în alte cazuri, agentul secundar poate fi un agent care poate atenua cel puțin un simptom al toxicității legate de LNP. Astfel de agenți includ, dar nu se limitează la, un medicament antiinflamator nesteroidian (NSAID) sau un agent antihistaminic, care poate fi un blocant al receptorului histaminic, cum ar fi un antagonist de H1 sau un agonist invers de H1.

În unele realizări, toxicitatea limitatoare de doză și/sau ABC-ul pot fi reduse la un subiect care este tratat cu un regim terapeutic care implică administrarea de medicamente mediate de LNP prin utilizarea LNP-urilor care nu activează un receptor de trombospondină (de exemplu, CD36), care poate fi exprimat pe suprafața celulelor imune (de exemplu, celule B1a sau B1b); sau alți receptori de suprafață implicați în declanșarea răspunsurilor imune care conduc la o toxicitate limitatoare de doză și/sau ABC. Astfel de LNP-uri pot să nu activeze deloc receptorul de trombospondină sau ar putea induce doar un nivel substanțial scăzut al activității sale, astfel încât să fie insuficient pentru a induce toxicitate limitatoare de doză semnificativă clinic și/sau ABC. Alternativ sau în plus, toxicitatea limitatoare de doză și/sau ABC-ul pot fi reduse la un subiect care este tratat cu un regim terapeutic care implică administrarea de medicamente mediată de LNP prin utilizarea unuia sau mai multor agenți secundari care inhibă activitatea unui receptor de trombospondină (de exemplu, CD36) exprimat pe suprafața celulelor imune și a trombocitelor. Trombospondinele (TSP) sunt o familie de proteine multifuncționale care sunt exprimate pe suprafața sau secrete de celule precum trombocitele din sânge. Familia este formată din trombospondinele 1-5. TSP-1 este un ligand inhibitor al CD36.

Pe baza acestor constatări, această dezvăluire are în vedere și furnizează LNP-uri precum și agenți activi formulați cu LNP care au asociere redusă a trombocitelor și/sau activare redusă a trombocitelor și/sau activitate redusă de agregare a trombocitelor. Utilizarea unor astfel de LNP-uri, de

exemplu ca vehicul de livrare pentru un agent activ, reduce riscul de a dezvolta coagulopatie, cum ar fi coagularea intravasculară diseminată (DIC, denumită și coagulopatie consumativă), fie că este acută fie cronică și/sau tromboză vasculară, precum și orice toxicitate legată de aceasta. Dacă o astfel de toxicitate este limitatoare de doză, atunci utilizarea acestor LNP-uri va permite administrarea unor doze mai mari de LNP și, mai important, va permite livrarea unor doze mai mari de încărcătură de agent activ transportată de astfel de LNP-uri.

Diminuarea răspunsului trombocitar după administrarea de LNP are efecte suplimentare de dorit, dintre care unele pot fi sinergetice. S-a raportat că LNP-urile activează complementul la scurt timp după administrare. Această activare poate fi directă sau indirectă. De exemplu, s-a raportat că trombocitele activate sunt capabile să activeze complementul. Astfel, LNP-urile care reduc sau previn activarea trombocitelor vor reduce sau preveni indirect activarea complementului. Activarea complementului poate contribui, de asemenea, la coagulare, de exemplu prin generarea de trombină mediată de complement. Trombina transformă fibrinogenul disponibil în fibrină, care la rândul său formează cheaguri împreună cu trombocitele. Trombocitele activate au receptori de trombină pe suprafața lor și, prin urmare, sunt capabile să recruteze și/sau să crească concentrația locală de trombine, sporind astfel producția de fibrină și, în final, formarea cheagurilor. Prin urmare, dezvoltarea sa în considerare și furnizează LNP-uri suplimentare care nu activează complementul sau nu activează complementul în același grad ca și LNP-urile existente. Totuși, LNP-urile suplimentare furnizate aici sunt cele care nu activează trombocitele și nu activează complementul.

Similar, această dezvoltare are în vedere LNP-urile care interferează cu legarea properdinei la trombocite. Properdina este un agent de reglare pozitiv al căii alternative a sistemului complementului. S-a arătat că se leagă de trombocitele activate, activând astfel calea alternativă ca răspuns la și în vecinătatea trombocitelor activate. Astfel, în plus, este luată în considerare utilizarea unui inhibitor de properdină în combinație cu LNP-urile furnizate aici, indiferent dacă astfel de LNP-uri activează sau nu activează trombocitele, așa cum este definit mai jos. Inhibitorii de properdină includ ADN și glucoconjugăți sulfatați, dintre care ambii sunt legați de properdină și pot interfera cu legarea properdinei la trombocitele activate.

Prin urmare, această dezvoltare ia în considerare și furnizează, în unele aspecte, LNP-uri și formulări de LNP care au efecte trombocitare reduse incluzând asociere redusă a trombocitelor și/sau activare redusă a trombocitelor și/sau o activitate redusă de agregare a trombocitelor. Anumite LNP-uri pot afecta una, două sau toate aceste trei activități trombocitare. De exemplu, unele LNP-uri pot avea o activitate redusă de asociere a trombocitelor sau o activitate redusă de agregare a trombocitelor sau o activitate redusă de activare a trombocitelor. Unele LNP-uri pot avea o activitate redusă de asociere a trombocitelor și/sau activitate redusă de activare a trombocitelor sau o activitate redusă de asociere a trombocitelor și o activitate redusă de activare a trombocitelor sau o activitate redusă de agregare a trombocitelor și o activitate redusă de activare a trombocitelor. Unele LNP pot avea o activitate redusă de asociere a trombocitelor, o activitate redusă de agregare a trombocitelor și o activitate redusă de activare a trombocitelor.

Dezvoltarea sa în considerare faptul că unele LNP-uri pot fi LNP-uri universale, intenționând ca acestea să moduleze în jos (sau să nu stimuleze în primă instanță) una sau mai multe dintre activitățile trombocitare menționate mai sus la administrarea la majoritatea pacienților sau la toți pacienții.

În plus, dezvoltarea sa în considerare faptul că unele LNP-uri pot fi, în unele cazuri, definite și astfel identificate ca fiind specifice pacientului. Adică, unele LNP-uri pot fi eficiente la reglarea în jos a unui răspuns trombocitar, așa cum este descris aici, la unii, dar nu la toți pacienții. Astfel, în unele cazuri, unele LNP-uri și formulări de LNP pot fi identificate pentru anumiți pacienți și pot fi apoi utilizate numai pentru acei pacienți particularizați.

În unele cazuri, descoperirile furnizate aici pot fi aplicate direct la agenți biologic activi. De exemplu, agentul activ biologic care este o lipidă sau este conjugat la o lipidă sau care este conjugat direct sau indirect la un fragment de PEG, poate fi modificat așa cum este descris aici pentru a face ca agentul să fie incapabil să stimuleze un răspuns sau o cascadă trombocitară.

#### **Teste de activitate a trombocitelor**

Aceste diverse activități pot fi măsurate așa cum este descris aici și/sau așa cum este realizat în domeniu. De exemplu, activarea trombocitelor poate fi evaluată prin exprimarea crescută a markerilor de activare cum ar fi CD31 și CD62P. Agregarea trombocitelor poate fi evaluată prin citometrie în flux. Similar, citometria în flux poate fi utilizată pentru a detecta tipuri non-trombocitare, cum ar fi celulele B

și macrofagele din astfel de agregate. Trebuie înțeles că efectele trombocitare ale LNP pot fi evaluate *in vivo*, de exemplu într-un model animal, precum și *in vitro* utilizând, de exemplu, sânge uman. Aceste teste pot fi utilizate pentru a verifica și/sau identifica LNP care are una sau mai multe dintre activitățile menționate mai sus.

5

#### **Compuși și compoziții, care includ LNP**

Dezvăluirea furnizează compoziții care cuprind lipide care sunt mai puțin susceptibile la clearance și, prin urmare, au un timp de înjumătățire mai lung *in vivo*. Acest lucru este deosebit de important atunci când, compozițiile sunt destinate administrării repetate, inclusiv cronice, și chiar mai particular atunci când o astfel de administrare repetată are loc în decurs de zile sau săptămâni.

10

Semnificativ, aceste compoziții sunt mai puțin susceptibile sau ocolesc cu totul fenomenul observat de clearance accelerat al sângelui (ABC). ABC-ul este un fenomen în care agenții administrați exogen care conțin lipide sunt îndepărtați rapid din sânge la a doua administrare și la administrări ulterioare. Acest fenomen a fost observat pentru o varietate de compoziții care conțin lipide, incluzând, dar fără a se limita la, lipozomi, nanoparticule de lipide și agenți încapsulați în lipide. Până acum, baza ABC-ului a fost slab înțeleasă și, în consecință, strategiile de evitare au rămas evazive.

15

Compozițiile care conțin lipide din această dezvăluire, surprinzător, nu prezintă sau sunt afectate minim de ABC la a doua administrare și la o administrare ulterioară *in vivo*. Această rezistență la ABC face ca aceste compoziții să fie deosebit de adecvate pentru utilizarea repetată *in vivo*, inclusiv pentru utilizare repetată în perioade scurte de timp, inclusiv zile sau 1-2 săptămâni.

20

Această rezistență la ABC se datorează în parte incapacității acestor compoziții de a activa celulele B1a. Prin urmare, astfel de compoziții sunt denumite aici compoziții inerte B1a sau compoziții care nu activează substanțial B1a, intenționând ca aceste compoziții, atunci când sunt combinate cu celule B1a, să nu activeze celulele B1a. Activarea celulelor B1a poate fi determinată într-un număr de moduri incluzând, dar fără a se limita la, exprimarea crescută a markerilor de activare, cum ar fi CD86, și exprimarea și/sau secreția de citokine. Aceste compoziții se pot lega sau nu de celulele B1a și se pot lega sau nu de IgM circulant. Astfel, aceste compoziții pot evita detectarea de către IgM circulant și/sau de către celulele B1a.

25

30

Celulele B1a sunt un subset de celule B implicate în imunitatea înăscută. Aceste celule sunt sursa de IgM circulant, denumit anticorp natural sau anticorp seric natural. Acești anticorpi IgM sunt caracterizați ca având afinitate slabă pentru un număr de antigeni și, prin urmare, sunt denumiți "poli-specifici" sau "poli-reactivi", descriind capacitatea lor de a se lega la mai mult de un antigen. Deși sunt capabile să producă astfel de IgM, celulele B1a nu sunt capabile să producă IgG. În plus, ele nu se dezvoltă în celule de memorie și, prin urmare, nu contribuie la un răspuns imun adaptativ. Cu toate acestea, ele sunt capabile să secrete IgM la activare. IgM-ul secretat este de obicei eliminat în aproximativ 12 zile (timpul de înjumătățire al IgM-ului în ser este de aproximativ 5-8 zile Nature Review Drug Discovery 2, 52-62. January 2003), moment în care sistemul imunitar devine relativ naiv față de antigenul administrat anterior. Dacă același antigen este prezentat după această perioadă de timp (*de exemplu*, la aproximativ 2 săptămâni după expunerea inițială), antigenul nu este curățat rapid. Cu toate acestea, semnificativ, dacă antigenul este prezentat în acea perioadă de timp (*de exemplu*, în decurs de 2 săptămâni, inclusiv în decurs de 1 săptămână sau în decurs de câteva zile), apoi antigenul este eliminat rapid. Această întârziere între doze consecutive a făcut ca anumite compoziții terapeutice sau de diagnostic care conțin lipide să fie inadecvate pentru o utilizare repetată.

35

40

45

Compușii, particulele și compozițiile descrise aici depășesc aceste limitări, transformând astfel o varietate de compoziții care conțin lipide în agenți terapeutici și de diagnostic eficienți. Compozițiile lipidice de B1a furnizate aici nu suferă o eliminare accelerată din sânge la administrarea repetată și astfel pot fi administrate repetat unui subiect, inclusiv la perioade scurte de timp, fără pierderea activității.

50

Rezistența la ABC se poate datora, de asemenea, în parte incapacității acestor compoziții de a activa celulele B1b, pDC și/sau trombocitele. Prin urmare, astfel de compoziții sunt denumite aici compoziții inerte de B1b pDC și/sau de trombocite sau compoziții care nu activează substanțial B1b pDC și/sau trombocitele, intenționând ca aceste compoziții, atunci când sunt combinate cu celulele B1b pDC și/sau trombocitele, să nu activeze celulele B1b pDC și/sau respectiv trombocitele. Activarea celulelor B1b, pDC și/sau a trombocitelor poate fi determinată într-un număr de moduri incluzând, dar fără a se limita la, exprimarea crescută a markerilor de activare cum ar fi CD11b (pentru celulele B1b) și exprimarea și/sau secreția de citokine și capacitatea de a activa celulele B (pDC). Aceste compoziții se pot lega sau nu la celulele B1b, pDC și/sau trombocite și se pot lega sau nu la IgM sau IgG circulant.

55

60

Astfel, aceste compoziții pot evita detectarea de către IgM, IgG circulante și/sau de către celulele B1a pDC și/sau trombocite.

5 Particulele, cum ar fi LNP-urile, cuprind de obicei una sau mai multe dintre următoarele componente: lipide (care pot include lipide cationice, lipide helper care pot fi lipide neutre, lipide zwitterionice, lipide anionice și altele asemenea), lipide structurale cum ar fi colesterolul sau analogi de colesterol, acizi grași, polimeri, stabilizatori, săruri, soluții tampon, solvent și altele asemenea.

10 Anumite dintre LNP-urile furnizate aici cuprind o lipidă cationică, o lipidă helper, o lipidă structurală și un stabilizator care poate fi furnizat sau nu conjugat cu o altă lipidă.

Lipida cationică poate fi, dar nu se limitează la DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA și DODMA. Lipida cationică poate fi o lipidă ionizabilă.

15 Lipida structurală poate fi, dar nu este limitată la, un sterol, cum ar fi, de exemplu, colesterolul.

Lipida helper este o lipidă necationică. Lipida helper poate cuprinde cel puțin un lanț de acid gras de cel puțin 8C și cel puțin un fragment polar de grupare de cap.

20 Unele dintre LNP-uri nu au niciuna dintre lipidele de fosfatidil colină (PC) (adică sunt lipsite de fosfatidil colină (PC)). Unele dintre LNP-urile furnizate aici sunt lipsite de lipidele de fosfatidil colină specifice, cum ar fi, dar fără a se limita la DSPC. Anumite dintre LNP-uri cuprind un analog de fosfatidil colină, astfel de analogi cuprinzând grupări de cap modificate (de exemplu, o grupare de cap de amină cuaternară modificată), o grupare de miez modificată și/sau o grupare de coadă lipidică modificată. Astfel  
25 de analogi pot cuprinde o grupare zwitterionică care este o grupare zwitterionă non-PC. Lipida helper poate fi o lipidă a oricărei combinații de formule I, I-a, I-b, I-b-1, I-b-2, I-b-3, I-b-4, I-c, I-c-1, I-c-2, I-c-3, sau II așa cum este redat aici.

30 Anumite LNP-uri pot include o 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (DSPC) substituită sau pot include o cantitate minimă de DSPC. În anumite variante de realizare, DSPC substituită este o lipidă care nu este o fosfolipidă.

35 Anumite LNP-uri cuprind alte lipide necationice helper incluzând, de exemplu, acid oleic sau analogi ai acidului oleic. Lipida helper poate fi o lipidă cu Formula IV, așa cum este furnizată aici. Acidul oleic poate fi un substitut sau poate fi în plus față de o altă lipidă din LNP. După cum ar putea fi apreciat de către un specialist în domeniu, pot fi utilizate, de asemenea, versiuni modificate de acid oleic sau acizi grași înrudiți.

40 În unele cazuri, LNP-ul cuprinde lipide PEGilate sau lipide conjugate cu alte fragmente stabilizatoare (sau stabilizatori) cum ar fi, dar fără a se limita la polipeptide XTEN și PAS. Astfel, dezvăluirea are în vedere și furnizează de LNP-uri sau formulări ale acestora care nu includ PEG. În anumite variante de realizare, LNP-urile includ HO-PEG. În alte variante de realizare, LNP-urile includ un substitut de PEG, cum ar fi un polimer diferit.

45 Când PEG este utilizat ca stabilizator, acesta poate fi conjugat la o lipidă și astfel poate fi furnizat ca PEG-c-DOMG sau PEG-DMG, de exemplu. Stabilizatorul, indiferent dacă este furnizat într-o formă conjugată sau neconjugată, poate cuprinde 1,5 % mol de LNP sau poate cuprinde mai puțin de 0,5 % mol de LNP. De exemplu, poate cuprinde mai puțin de 0,4 % mol, mai puțin de 0,3 % mol, mai puțin de 0,2 % mol sau mai puțin de 0,1 % mol

50 Încă în alte variante de realizare, LNP-urile pot conține mai puțin de 0,5% raport molar de lipidă PEG față de alte componente. Astfel, un LNP poate cuprinde cel puțin 0,0001%, cel puțin 0,0005%, cel puțin 0,001%, cel puțin 0,005%, cel puțin 0,01%, cel puțin 0,05%, cel puțin 0,1%, cel puțin 0,15%, cel puțin 0,2%, cel puțin 0,25%, cel puțin 0,3%, cel puțin 0,35%, cel puțin 0,4%, cel puțin 0,45%, și mai puțin de 0,5% (exprimat ca procent molar) de lipide PEGilate.

55 LNP-ul poate cuprinde o lipidă PEGilată cu Formula III, incluzând Formulele III-OH, III-a-1, III-a-2, III-b-1, III-b-2, III-b-1-OH, III-b-2-OH, V, V-OH.

60 Anumite LNP-uri furnizate aici cuprind niveluri scăzute sau sunt lipsite de lipide PEGilate, incluzând niveluri scăzute sau sunt lipsite de lipide alchil-PEGilate, și pot fi denumite aici ca fiind lipide lipsite de PEG sau PEGilate. Astfel, unele LNP-uri cuprind mai puțin de 0,5 mol% lipide PEGilate. În

unele cazuri, PEG poate fi un alchil-PEG cum ar fi metoxi-PEG. Încă alte LNP-uri cuprind non-alchil-PEG cum ar fi hidroxi-PEG, și/sau lipide non-alchil-PEGilate cum ar fi lipidele hidroxi-PEGilate.

Lipida PEGilată poate fi un Cmpd420, un Cmpd396, un Cmpd394, Cmpd397, Cmpd395,  
5 Cmpd417, Cmpd418, sau Cmpd419.

În unele cazuri, LNP-ul poate cuprinde aproximativ 50 % mol, 10 % mol lipidă helper, 1,5 % mol lipidă PEGilată și 38,5 % mol lipidă structurală.

În unele cazuri, LNP-ul poate cuprinde aproximativ 50 % mol, 10 % mol lipidă helper, mai puțin  
10 de 0,5 % mol lipidă PEGilată, și 39,5 % mol lipidă structurală.

În unele variante de realizare, stabilizatorul este un fragment non-PEG, cum ar fi o peptidă  
15 XTEN care poate fi sau nu conjugată la o lipidă. Peptida XTEN este capabilă să formeze un înveliș  
hidratat în jurul LNP-ului datorită naturii sale hidrofile. Mai mult, servește la creșterea timpului de  
înjumătățire al LNP-ului, în comparație cu un LNP lipsit (sau liber de) orice stabilizator. Spre deosebire  
de PEG, totuși, este biodegradabil și s-a raportat că nu este imunogen. Peptida XTEN poate avea o  
secvență de aminoacizi MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS  
(SECV ID NR:1) sau MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGS (SECV  
20 ID NR:2). Alte secvențe de aminoacizi XTEN sunt cunoscute în domeniu, incluzând, de exemplu, cele  
raportate în Brevetul U.S. nr. 9.062.299. Exemple de lipide conjugate XTEN includ, dar nu sunt limitate  
la Cmpd431, și Cmpd432 și Cmpd433. Chimia click poate fi utilizată pentru a conjuga peptida XTEN la  
lipidă.

În unele variante de realizare, stabilizatorul este un fragment non-PEG, cum ar fi o peptidă PAS.  
25 O peptidă PAS este o peptidă care cuprinde în primul rând, dacă nu exclusiv, prolină, alanină și serină. Ca  
și peptidele PEG și XTEN, peptida PAS este capabilă să formeze un înveliș hidratat în jurul LNP-ului. De  
asemenea, servește la creșterea timpului de înjumătățire al unui LNP, în comparație cu un LNP lipsit (sau  
30 liber) de stabilizator. Spre deosebire de peptidele XTEN, totuși, peptidele PAS tind să fie neutre ca  
sarcină și, astfel, cel puțin în acest sens, mai asemănătoare cu PEG. Peptida PAS poate avea o secvență de  
aminoacizi de SAPSSPSAPSSSPASPSSAPSSPSAPSSSPASPSSAPSSAPSSPSAPSSSPASPSS  
(SECV ID NR:3 sau AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPAAASPAAPSAPP  
ID NR:4). Alte secvențe de aminoacizi PAS sunt cunoscute în domeniu, incluzând, de exemplu, cele  
35 raportate în WO 2008155134.

Agenții care inhibă răspunsurile imune induse de LNP pot fi, de asemenea, utilizați în metodele  
dezwăluite, împreună cu un LNP standard care induce ABC sau cu un LNP modificat conform invenției.  
Agenții care inhibă răspunsurile imune induse de LNP sunt compuși care inhibă activarea unui senzor,  
40 inhibă interacțiunea dintre un LNP și un senzor sau dintre senzori (de exemplu, blochează interacțiunea  
dintre pDC și celulele B) și/sau inhibă producerea sau activitatea unui efector. În unele cazuri, agentul va  
fi specific pentru un anumit senzor sau efector. În alte variante de realizare, agentul care inhibă  
răspunsurile imune induse de LNP-uri funcționează pentru a preveni activarea senzorilor multipli printr-  
un mecanism mai general, acționând tipic indirect asupra altor componente celulare care pot afecta  
45 senzorii. Un exemplu de agent care funcționează indirect pe mai mulți senzori este un situs de legare a  
miR.

S-a descoperit conform invenției că eliberarea unui situs de legare a miR va inhiba un răspuns  
imun asociat cu ABC și poate fi utilizat pentru a asigura dozarea repetată a unui subiect cu un LNP în  
50 timpul ferestrei de susceptibilitate la ABC. Situsul de legare a miR poate fi încorporat într-un acid nucleic  
terapeutic care este eliberat în LNP. Alternativ, situsul de legare a miR poate fi încorporat separat în  
același LNP care încorporează acidul nucleic terapeutic sau într-un LNP diferit. Situsul de legare a miR  
poate fi administrat subiectului într-un vehicul separat în același timp sau unul diferit cu LNP-ul și poate  
fi sau nu încorporat într-un LNP. În unele variante de realizare, situsul de legare a miR poate fi un burete  
55 miR.

Deși solicitantul nu este legat de mecanism, se crede că situsul de legare a miR acționează pentru  
a absorbi miARN-ul endogen, țintit de interes, împiedicând acel miARN să funcționeze în celulă. Este  
posibil să fie țintit miARN-ul care joacă un rol pozitiv în reglarea funcției celulelor imune. Prin inhibarea  
60 funcției miARN-ului endogen, locul de legare a miR acționează ca un inhibitor pentru a bloca funcția  
miARN și alte efecte în aval care rezultă din această inhibare a țintirii. Agentul de legare a miARN poate  
funcționa, de asemenea, sau alternativ, prin prevenirea translației proteinelor în țesuturi sau celule

specifice, cum ar fi splina sau celulele imune. Prin prevenirea translației, de exemplu, a unui ARNm terapeutic încapsulat în LNP, în țesuturi specifice care sunt bogate în celule imune, răspunsul imun în acele țesuturi va fi scăzut, fără a avea un impact asupra exprimării ARNm-ului în alte țesuturi.

5 S-a demonstrat că introducerea unor situsuri de legare a miR, cum ar fi miR 126 (deosebit de abundent în pDC) are ca rezultat o reducere a activării celulelor B, o reducere a activării pDC, o reducere a exprimării citokinelor, cum ar fi IL6 și IFN-gamma și o reducere a IgM în raport cu răspunsul livrat de un LNP corespunzător fără situsul de legare a miR.

10 În unele variante de realizare situsul de legare a miR este un situs de legare a miR 126, miR 155, și/sau miR 142,3p. În unele variante de realizare, ARNm-ul poate cuprinde cel puțin un situs de legare a miR pentru a reduce sau inhiba astfel ABC-ul. Situsul de legare a miR poate fi găsit, de exemplu, în 3' UTR al ARNm. De exemplu, într-o variantă de realizare, ARNm-ul cuprinde un situs de legare a miR-122, pentru a permite astfel exprimarea crescută a unei polipeptide codificate de ARNm într-o celulă de cancer hepatic (de exemplu, o celulă de carcinom hepatocelular) în comparație cu o celulă hepatică normală și cuprinde, de asemenea, unul sau mai multe situsuri de legare a miR, de exemplu, selectate din grupul constând din miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miK-21, miR-223, miR-24, miR-27.

20 Un compus care inhibă interacțiunea dintre un LNP și un senzor așa cum este utilizat aici va perturba interacțiunea dintre LNP și celula B1, trombocite sau pDC. De exemplu, unele interacțiuni dintre LNP și celulele B1 sunt mediate prin receptorul CD36 de pe celula B1 și PC pe LNP. Compusul poate bloca și neutraliza PC sau CD36. În unele variante de realizare compusul este un anticorp care recunoaște și leagă CD36, sau un fragment de legare la antigen sau un derivat al acestuia sau un antagonist de CD36. Un antagonist CD36 poate fi selectat din grupul constând din anticorpi sau aptameri care se leagă la CD36 sau fragmente ale acestora; liganzi solubili care se leagă la CD36 sau fragmente ale acestora; CD36 solubil care se leagă de liganzii săi; polipeptide de fuziune, peptide, molecule mici, peptidomimetice care inhibă activitatea CD36; și molecule de acid nucleic care interferează specific cu exprimarea CD36. Un astfel de antagonist de CD36 este de preferință un antagonist care, de preferință, recunoaște și se leagă specific la o moleculă CD36 sau un fragment al acesteia și este de preferință selectat din grupul constând dintr-un anticorp sau un aptamer care recunoaște și se leagă specific la CD36 sau un fragment al acestora, o moleculă de acid nucleic interferând specific cu exprimarea CD36 și o moleculă mică care inhibă activitatea CD36. Mai preferabil, respectivul antagonist CD36 este un anticorp monoclonal care blochează funcția împotriva CD36. În alte variante de realizare, respectivul antagonist de CD36 este o moleculă mică selectată din grupul constând din acid salvianolic B, acid rosmarinic, danshensu de sodiu, 3-cinamoil indol, 13 pentil berberină, hexarelină, nanoblocante, statine sau antioxidanți cum ar fi alfa-tocopherol și peptide SS, sulfo-N-succinimidil oleat și acid ursolic și orice combinație a acestora. Alternativ, antagonistul de CD36 poate cuprinde un anticorp care recunoaște și leagă CD36, sau un fragment de legare la antigen sau un derivat al acestuia. De preferință, respectivul anticorp sau fragmentul de legare la antigen sau derivatul acestuia este îndreptat împotriva domeniului extracelular al CD36. Anticorpul menționat poate fi un anticorp de lungime completă. De preferință, respectivul anticorp este un anticorp monoclonal. Anticorpul poate fi de tip IgG, IgE sau IgD, preferabil de tip IgG. Anticorpul poate fi un anticorp umanizat, himeric sau uman. Anticorpul poate fi, de asemenea, anticorp cu lanț greu de camelidă, și în special un anticorp umanizat cu lanț greu de camelidă. De preferință, respectivul anticorp, sau fragmentul de legare la antigen sau derivatul acestuia, este bivalent. În special, fragmentul de legare la antigen este selectat din grupul constând din F(ab')<sub>2</sub> di-scFvs, fragment de sc(Fv)<sub>2</sub>, fragment de (VHH)<sub>2</sub> și diacorp.

50 Un compus care inhibă activitatea unui efector este un compus care împiedică producerea sau funcționarea unui efector de către un senzor. De exemplu, agentul poate inhiba producerea de IgM naturală care leagă LNP-urile prin interferarea cu calea de sinteză într-o celulă B1. Alternativ, agentul poate neutraliza astfel de IgM sau IgG naturale. Agentul poate fi un anticorp sau o porțiune a acestuia care leagă antigenul, care se leagă la IgM sau IgG naturale și le neutralizează. Alternativ, agentul poate interfera cu legarea IgM sau IgG la ținta sa. În alte variante de realizare, agentul care inhibă răspunsurile imune induse de LNP-uri este un agent care inhibă activitatea IL6. Agenții care inhibă activitatea IL6 includ, de exemplu, anticorpi, fragmente ale acestora, anticorpi umanizați specifici și fragmente și variante ale acestora capabile să se lege la IL-6 și/sau la complexul IL-6/IL-6R. Acești anticorpi pot lega IL-6 solubilă sau IL-6 exprimată la suprafața celulei.

#### ***Nanoparticule lipidice, în general***

60 În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică cuprinde o lipidă cationică, o lipidă modificată cu PEG, un sterol și o lipidă necationică. În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică



5 purtătoare cuprinde un raport molar de aproximativ 20-60% lipidă cationică: 5-25% lipidă necationică: 25-55% sterol; și 0,5-15% lipidă modificată cu PEG. În unele variante de realizare, lipida cationică este o lipidă cationică ionizabilă. În unele variante de realizare, lipida necationică este o lipidă neutră. În unele variante de realizare, sterolul este un colesterol. În unele variante de realizare, lipida cationică este selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxotan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il)9-((4-(dimetilamino)butanil)oxi)heptadecandioat (L319). În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică are o valoare a polidiversității mai mică de 0,4. În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică are o sarcină neutră netă la un pH neutru. În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică are un diametru mediu de 50-200nm.

15 Nanoparticulele lipidice pot cuprinde una sau mai multe specii de lipide, incluzând, dar fără a se limita la, lipide cationice/ionizabile, lipide necationice, lipide structurale, fosfolipide și lipide helper. Oricare dintre aceste lipide poate fi conjugată cu polietilen glicol (PEG) și astfel pot fi denumite lipide PEGilate sau lipide modificate cu PEG.

Formarea nanoparticulei lipidice (LNP) poate fi realizată prin metode cunoscute în domeniu și/sau așa cum este descris în Pub. U.S. Nr. 2012/0178702, de aici

20 O formulare de nanoparticule lipidice poate fi influențată, dar fără a se limita la, selecția componentei lipidice cationice, gradul de saturație a lipidei cationice, selecția componentei lipidice necationice, gradul de saturație a lipidei necationice, selecția componentei lipidice structurale, natura PEGilării, raportul dintre toate componentele și parametrii biofizici cum ar fi dimensiunea. În anumite exemple nelimitative, un LNP cuprinde componente de bază ale turului: (1) o lipidă cationică; (2) o lipidă necationică (de exemplu, o fosfolipidă cum ar fi DSPC); (3) o lipidă structurală (de exemplu, un sterol cum ar fi colesterolul); și (4) PEG sau o lipidă modificată cu PEG. Într-un exemplu din Semple et al. (Nature Biotech. 2010 28:172-176), formularea de nanoparticule lipidice este compusă din rapoarte molare după cum urmează: 57,1 % lipidă cationică, 7,1 % dipalmitoilfosfatidilcolină, 34,3 % colesterol și 1,4 % PEG-c-DMA. Ca un alt exemplu, modificarea compoziției lipidei cationice poate furniza mai eficient ARNs la diferite celule prezentatoare de antigen (Basha și colab, Mol Ther. 2011 19:2186-2200).

35 Nanoparticulele lipidice descrise aici cuprind una sau mai multe lipide. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică și o lipidă necationică. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică și un substitut de DSPC. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică și un acid gras. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică și acid oleic. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică și un analog de acid oleic.

40 Lipidele cationice sunt lipide încărcate pozitiv care se pot asocia cu acizii nucleici în sistemele de livrare bazate pe lipide/LNP. O sarcină pozitivă pe LNP promovează asocierea cu membrana celulară încărcată negativ pentru a îmbunătăți absorbția celulară. Lipidele cationice se pot combina, de asemenea, cu lipide încărcate negativ pentru a induce structuri non-bistraturi care facilitează livrarea intracelulară. Lipidele cationice adecvate pentru utilizarea la producerea LNP-urilor dezvăluite aici pot fi lipide cationice ionizabile, de exemplu, lipide amino, și cele descrise aici.

45 În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică, și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, un acid gras, și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, acid oleic, și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, un analog de acid oleic, și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, un acid gras, și un sterol. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, acid oleic, și un sterol. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, acid oleic, și colesterol.

55 În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică, și PEG sau o lipidă PEG. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică, și o lipidă PEG. În anumite variante de realizare, formularea de LNP cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică, și o lipidă PEG-OH. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică, și o lipidă PEG-OH. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, un acid gras, și o lipidă PEG-OH. În anumite variante de realizare, formularea

de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, acid oleic, și o lipidă PEG-OH. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, un analog de acid oleic, și o lipidă PEG-OH.

5 În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică (*de exemplu*, o fosfolipidă sau acid gras), o lipidă structurală, și o lipidă PEG. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras), o lipidă structurală, și o lipidă PEG-OH. În anumite  
10 variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras), și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, un acid gras (*de exemplu*, acid oleic sau un analog al acestuia), o lipidă structurală, și o lipidă PEG. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, un acid gras (*de exemplu*, acid oleic sau un analog al acestuia), o lipidă structurală, și o lipidă PEG-OH. În anumite variante de realizare, formularea de  
15 nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, acid oleic, o lipidă structurală (*de exemplu*, un sterol), și o lipidă PEG-OH. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde o lipidă cationică, acid oleic, și o lipidă structurală (*de exemplu*, colesterol). În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde una sau mai multe lipide cationice sau necationice, un acid gras (*de exemplu*, acid oleic), și o lipidă PEG. În anumite variante de realizare, formularea de  
20 nanoparticule lipidice cuprinde una sau mai multe lipide cationice sau necationice, un acid gras (*de exemplu*, acid oleic), și o lipidă PEG-OH.

În unele variante de realizare, LNP-ul cuprinde un acid gras. În anumite variante de realizare, acidul gras este un acid gras mononesaturat. În anumite variante de realizare, acidul gras este un acid gras  
25 polinesaturat. În unele variante de realizare, LNP-ul cuprinde acid oleic. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde una sau mai multe lipide cationice sau necationice, și un acid gras (*de exemplu*, acid oleic). În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde una sau mai multe lipide cationice sau necationice, și acid oleic. În anumite variante de realizare, când LNP-ul include acid oleic, LNP-ul nu include o fosfolipidă. În anumite variante de realizare, când  
30 LNP-ul include acid oleic, LNP-ul nu include DSPC. În anumite variante de realizare, când LNP-ul include un acid gras, LNP-ul nu include o fosfolipidă. În anumite variante de realizare, când LNP-ul include un acid gras, TNP-ul nu include DSPC.

În unele variante de realizare, LNP-ul cuprinde lipide PEG-OH. În anumite variante de realizare, formularea de nanoparticule lipidice cuprinde una sau mai multe lipide cationice sau necationice și o  
35 lipidă PEG-OH.

În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice pot cuprinde, în procente molare, 35 la 45% lipidă cationică, 40% la 50% lipidă cationică, 50% la 60% lipidă cationică și/sau 55%  
40 la 65% lipidă cationică. În unele variante de realizare, raportul dintre lipidă și acid nucleic (de exemplu, ARNm) în nanoparticulele lipidice poate fi 5:1 la 20:1, 10:1 la 25:1, 15:1 la 30:1 și/sau cel puțin 30:1.

În unele variante de realizare, raportul de PEG în formulările de nanoparticule lipidice poate fi crescut sau scăzut și/sau lungimea lanțului de carbon a lipidei PEG poate fi modificată de la C14 la C18  
45 pentru a modifica farmacocinetica și/sau biodistribuția formulărilor de nanoparticule lipidice. În anumite variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice pot conține 0,5% la 3,0%, 1,0% la 3,5%, 1,5% la 4,0%, 2,0% la 4,5%, 2,5% la 5,0%, și/sau 3,0% la 6,0% din raportul molar al lipidei de lipidă PEG față de alte componente. Ca un exemplu nelimitativ, formulările de nanoparticule lipidice pot conține 0,5% la 3,0%, 1,0% la 3,5%, 1,5% la 4,0%, 2,0% la 4,5%, 2,5% la 5,0%, și/sau 3,0% la 6,0% din raportul molar  
50 al lipidei de PEG-c-DOMG (R-3-[( $\omega$ -metoxi-poli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-dimiristiloxipropil-3-amină) (la care se face referire și ca PEG-DOMG) în comparație cu lipida cationică, DSPC, și colesterol. În unele variante de realizare, PEG-c-DOMG poate fi înlocuită cu o lipidă PEG cum ar fi, dar fără a se limita la, PEG- DSG (1,2-distearoil-sn-glicerol, metoxipolietilen glicol), DMG-PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicerol) și/sau PEG-DPG (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol, metoxipolietilen glicol). Lipida cationică poate fi  
55 selectată dintre orice lipidă cunoscută în domeniu cum ar fi, dar fără a se limita la, DLin-MC3-DMA, DLin-DMA, C12-200, și DLin-KC2-DMA. În anumite variante de realizare, nanoparticula lipidică nu conține o lipidă PEG. În anumite variante de realizare, nanoparticula lipidică conține o lipidă PEG substituită cum ar fi o lipidă PEG-OH. Incorporarea lipidelor PEG-OH în formularea de nanoparticule poate îmbunătăți farmacocinetica și/sau biodistribuția formulărilor de nanoparticule lipidice. De exemplu,  
60 incorporarea lipidelor PEG-OH în formularea de nanoparticule poate reduce efectul ABC. În anumite variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice pot conține 0,5% la 3,0%, 1,0% la 3,5%, 1,5%

la 4,0%, 2,0% la 4,5%, 2,5% la 5,0%, și/sau 3,0% la 6,0% din raportul molar al lipidei de lipidă PEG-OH față de alte componente (de exemplu, lipidele cationice, neutre și structurale).

În unele variante de realizare, o formulare de LNP este nanoparticulă care cuprinde cel puțin o lipidă. În anumite variante de realizare, lipidele sunt selectate dintre lipide cationice/ionizabile, lipide necationice (de exemplu, acizi grași și fosfolipide), lipide PEG, lipide structurale (de exemplu, steroli) și lipide PEG-OH. Lipida poate fi selectată dintre, dar nu se limitează la, DLin-DMA, DLin-K-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, PLGA, PEG, PEG-DMG, lipide PEGilate, și lipide de amino alcool. În unele variante de realizare, lipida poate fi o lipidă cationică, cum ar fi, dar fără a se limita la, DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, și lipide de amino alcool. Lipidele aminoalcoolice cationice pot fi lipidele descrise în și/sau produse prin metodele descrise în publicația de brevet US nr. US2013/0150625. Ca un exemplu nelimitativ, lipida cationică poate fi 2-amino-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-2-[(9Z,27)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]metilpropan-1-ol (Compusul 1 în US2013/0150625); 2-amino-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-2-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]metilpropan-1-ol (Compusul 2 în US2013/0150625); 2-amino-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-2-[(octitoxi)metil]propan-1-ol (Compusul 3 în US2013/0150625); și 2-(dimetilamino)-3-[(9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]metilpropan-1-ol (Compusul 4 în US2013/0150625); sau orice sare acceptabilă farmaceutic sau stereoisomer al acestora.

Formulările de nanoparticule lipidice pot cuprinde o lipidă, în special, o lipidă cationică ionizabilă, de exemplu, 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolane (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), sau di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanil)oxi)heptadecandioat (L319), și cuprind în plus o lipidă necationică (de exemplu, fosfolipidă sau acid gras), o lipidă structurală (de exemplu, un sterol cum ar fi colesterol), și o moleculă capabilă să reducă agregarea particulelor, de exemplu, o lipidă PEG sau modificată cu PEG (de exemplu, lipidă PEG-OH). În anumite variante de realizare, formularea nu conține lipida PEG.

În unele variante de realizare, formularea de LNP constă în esență dintr-un raport molar de 20-60% lipidă cationică; 5-25% lipidă necationică; 25-55% sterol; 0,5-15% lipidă PEG. În unele variante de realizare, formularea de LNP constă în esență dintr-un raport molar de 20-60% lipidă cationică; 5-25% lipidă necationică; 25-55% sterol; 0,5-15% lipidă PEG-OH. În unele variante de realizare, formularea de LNP constă în esență dintr-un raport molar de 20-60% lipidă cationică; 5-25% lipidă necationică; și 25-55% sterol. În anumite variante de realizare, lipida necationică este un acid gras. În anumite variante de realizare, lipida necationică este acidul oleic sau un analog al acestuia. În anumite variante de realizare, lipida PEG este o lipidă PEG-OH.

În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică constă în esență din (i) cel puțin o lipidă selectată din grupul care constă din 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolane (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanil)oxi)heptadecandioat (L319); (ii) o lipidă necationică selectată dintre DSPC, DPPC, POPC, DOPE, și SM; și (iii) un sterol, de exemplu, colesterol; și (iv) o lipidă PEG, de exemplu, PEG-DMG sau PEG-cDMA, într-un raport molar de 20-60% lipidă cationică; 5-25% lipidă necationică; 25-55% sterol; 0,5-15% lipidă PEG.

În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică constă în esență din (i) cel puțin o lipidă selectată din grupul care constă din 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanil)oxi)heptadecandioat (L319); (ii) o lipidă necationică cum ar fi DSPC substituită (de exemplu, o fosfolipidă diferită, sau un acid gras); (iii) o lipidă structurală (de exemplu, un sterol cum ar fi colesterol); și (iv) o lipidă PEG sau o lipidă PEG-OH (de exemplu, PEG-DMG sau PEG-cDMA), într-un raport molar de 20-60% lipidă cationică; 5-25% substituit de DSPC; 25-55% lipidă structurală; 0,5-15% lipidă PEG.

În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică include 25% la 75% pe o bază molară dintr-o lipidă cationică. Lipida cationică poate fi selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanil)oxi)heptadecandioat (L319), de exemplu, 35 la 65%, 45 la 65%, 60%, 57,5%, 50% sau 40% pe o bază molară.

În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică include 0,5% la 15% pe o

bază molară de lipida necationică, *de exemplu*, 3 la 12%, 5 la 10% sau 15%, 10%, sau 7,5% pe o bază molară. În anumite variante de realizare, lipida necationică este o fosfolipidă. În anumite variante de realizare, lipida necationică este un substitut de DSPC (*de exemplu*., o fosfolipidă alta decât DSPC, sau un acid gras). În anumite variante de realizare, lipida necationică este un acid gras (*de exemplu*, acid oleic sau un analog al acestuia). Alte exemple de lipide necationice include, fără limitare, POPC, DPPC, DOPE și SM. În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică include 0,5% la 15% pe o bază molară dintr-un acid gras, *de exemplu*, 3 la 12%, 5 la 10% sau 15%, 1 0%, sau 7,5% pe o bază molară. În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică include 0,5% la 15% pe o bază molară de oleic acid, *de exemplu*, 3 la 12%, 5 la 10% sau 15%, 10% sau 7,5% pe o bază molară. În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică include 0,5% la 15% pe o bază molară dintr-un analog de acid oleic, *de exemplu*, 3 la 12%, 5 la 10% sau 15%, 10%, sau 7,5% pe o bază molară.

În unele variante de realizare, formularea include 5% la 50% pe o bază molară dintr-o lipida structurală, *de exemplu*, 15 la 45%, 20 la 40%, 40%, 38,5%, 35%, sau 31% pe o bază molară. În unele variante de realizare, formularea include 5% la 50% pe o bază molară dintr-un sterol, *de exemplu*, 15 la 45%, 20 la 40%, 40%, 38,5%, 35%, sau 31% pe o bază molară. Un exemplu nelimitativ de sterol este colesterolul.

În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică include 0,5% la 20% pe o bază molară din lipida PEG sau modificată cu PEG, *de exemplu*, 0,5 la 10%, 0,5 la 5%, 1,5%, 0,5%, 1,5%, 3,5%, sau 5% pe o bază molară. În unele variante de realizare, PEG sau o lipidă modificată cu PEG cuprinde o moleculă PEG cu o masă moleculară medie în greutate de 2.000 Da. În unele variante de realizare, PEG sau o lipidă modificată cu PEG cuprinde o moleculă PEG cu o masă moleculară medie în greutate de mai puțin de 2.000, de exemplu, aproximativ 1.500 Da, aproximativ 1.000 Da, sau aproximativ 500 Da. Exemple nelimitative de lipide modificate cu PEG include PEG-distearoil glicerol (PEG-DMG) (la care se face referire și ca Cmpd422), PEG-cDMA (discutat în plus în Reyes și colab. J. Controlled Release, 107, 276-287 (2005)). Așa cum este descris aici, orice lipide PEG sau lipide modificate cu PEG pot fi lipide PEG-OH. În unele variante de realizare, o formulare de nanoparticulă lipidică include 0,5% la 20% pe o bază molară dintr-o lipidă PEG-OH, *de exemplu*, 0,5 la 10%, 0,5 la 5%, 1,5%, 0,5%, 1,5%, 3,5%, sau 5% pe o bază molară.

În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 25-75% dintr-o lipidă cationică, 0,5-1 5% dintr-o lipidă necationică; 5-50% dintr-o lipidă structurală, și 0,5-20% de PEG sau lipidă modificată cu PEG pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 25-75% dintr-o lipidă cationică, 0,5-15% dintr-o lipidă necationică; 5-50% dintr-o lipidă structurală, și 0,5-20% dintr-o lipidă PEG-OH pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 25-75% dintr-o lipidă cationică, 0,5-15% dintr-o lipidă necationică, și 5-50% dintr-o lipidă structurală pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 25-75% dintr-o lipidă cationică selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecandioat (L319).

În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 35-65% dintr-o lipidă cationică, 3-12% dintr-o lipidă necationică, 15-45% dintr-o lipidă structurală, și 0,5-10% de PEG sau lipidă modificată cu PEG pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 35-65% dintr-o lipidă cationică, 3-12% dintr-o lipidă necationică, 15-45% dintr-o lipidă structurală, și 0,5-10% dintr-o lipidă PEG-OH, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 35-65% dintr-o lipidă cationică, 3-12% dintr-o lipidă necationică, și 15-45% dintr-o lipidă structurală pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 35-65% dintr-o lipidă cationică selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecandioat (L319).

În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 45-65% dintr-o lipidă cationică, 5-10% dintr-o lipidă necationică, 25-40% dintr-o lipidă structurală, și 0,5-10% de PEG sau lipidă modificată cu PEG, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 45-65% dintr-o lipidă cationică, 5-10% dintr-o lipidă necationică, 25-40% dintr-o lipidă structurală, și 0,5-10% dintr-o lipidă PEG-OH pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 45-65% dintr-o lipidă cationică, 5-10% dintr-o lipidă necationică, și 25-40% dintr-o lipidă structurală, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 45-65% dintr-o lipidă cationică selectată dintre 2,2-dilinoleil-

4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecandioat (L319).

5 În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 60% dintr-o lipidă cationică, 7,5% dintr-o lipidă necationică, 31 % dintr-o lipidă structurală, și 1,5% de PEG sau lipidă modificată cu PEG, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 60% dintr-o lipidă cationică, 7,5% dintr-o lipidă necationică, 31% dintr-o lipidă structurală, și 1,5% dintr-o lipidă PEG-OH, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 60% dintr-o lipidă cationică, 9% dintr-o lipidă necationică, și 31% dintr-o lipidă structurală pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 60% dintr-o lipidă cationică selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și d1((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecandioat (L319).

15 În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 50% dintr-o lipidă cationică, 10% dintr-o lipidă necationică, 38,5 % dintr-o lipidă structurală, și 1,5% de PEG sau lipidă modificată cu PEG, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 50% dintr-o lipidă cationică, 10% dintr-o lipidă necationică, 38,5 % dintr-o lipidă structurală și 1,5% dintr-o lipidă PEG-OH, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 50% dintr-o lipidă cationică, 10% dintr-o lipidă necationică, și 40% dintr-o lipidă structurală, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 50% dintr-o lipidă cationică selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecandioat (L319).

25 În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 40% dintr-o lipidă cationică, 15% dintr-o lipidă necationică, 40% dintr-o lipidă structurală, și 5% de PEG sau lipidă modificată cu PEG, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 40% dintr-o lipidă cationică, 15% dintr-o lipidă necationică, 40% dintr-o lipidă structurală, și 5% dintr-o lipidă PEG-OH, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 40% dintr-o lipidă cationică, 20% dintr-o lipidă necationică, 40% dintr-o lipidă structurală pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 40% dintr-o lipidă cationică selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecandioat (L319).

40 În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 57,2% dintr-o lipidă cationică, 7,1% dintr-o lipidă necationică 34,3% de sterol, și 1,4% de PEG sau lipidă modificată cu PEG, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 57,2% dintr-o lipidă cationică, 7,1% dintr-o lipidă necationică, 34,3% dintr-o lipidă structurală, și 1,4% dintr-o lipidă PEG-OH, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 57,2% dintr-o lipidă cationică, 8,5% dintr-o lipidă necationică, și 34,3% dintr-o lipidă structurală, pe o bază molară. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice includ 57,2% dintr-o lipidă cationică selectată dintre 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), dilinoleil-metil-4-dimetilaminobutirat (DLin-MC3-DMA), și di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecandioale (L319).

50 În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% lipidă necationică; 20-55% lipidă structurală; 0,5-15% lipidă modificată cu PEG. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras); 20-55% lipidă structurală; și 0,5-15% lipidă PEG-OH. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras); 20-55% lipidă structurală (*de exemplu*, steroli); și 0,5-15% lipidă PEG-OH. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras); și 20-55% lipidă structurală (*de exemplu*, steroli). În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% acid gras (*de exemplu*, acid oleic sau analog al acestuia); 20-55% lipidă structurală (*de exemplu*, steroli); și 0,5-15% lipidă PEG-OH. În unele variante de realizare, formulările de

nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% acid gras (*de exemplu*, acid oleic sau analog al acestuia); și 20-55% lipidă structurală (*de exemplu*, steroli). În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% acid oleic; 20-55% lipidă structurală (*de exemplu*, steroli); și 0,5-15% lipidă PEG-OH. În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice constau în esență dintr-un amestec de lipide în rapoarte molare de 20-70% lipidă cationică; 5-45% acid oleic; și 20-55% lipidă structurală (*de exemplu*, steroli).

În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 50/10/38,5/1,5 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 57,2/7,1134,3/1,4 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 40/15/40/5 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 50/10/35/4,5/0,5 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 50/10/35/5 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 40/10/40/10 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 35/15/40/10 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). În unele variante de realizare, raportul molar al lipidelor este 52/13/30/5 (mol% lipidă cationică/lipidă necationică/lipidă structurală/lipidă PEG). Așa cum este descris aici, orice lipidă necationică poate fi un substitut de DSPC cum ar fi o fosfolipidă non-DSPC sau un acid gras (*de exemplu*, acid oleic). Așa cum este descris aici, orice lipidă PEG poate fi o lipidă PEG-OH.

Exemple nelimitative de nanoparticule lipidice și metode de obținere a acestora sunt descrise, de exemplu, în Semple și colab. (2010) Nat. Biotechnol. 28:172-176; Jayarama și colab. (2012), Angew. Chem. Int. Ed, 51: 8529-8533; și Maier et al. (2013) Molecular Therapy 21, 1570-1578

În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice pot cuprinde o lipidă cationică, o lipidă PEG (*de exemplu*, o lipidă PEG-OH ) și opțional cuprind o lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras). În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice pot cuprinde o lipidă cationică, o lipidă PEG (*de exemplu*, lipidă PEG-OH ) și o lipidă structurală (*de exemplu*, un sterol) și opțional cuprind o lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras).

Nanoparticulele lipidice descrise aici pot cuprinde 2 sau mai multe componente (*de exemplu*, lipide), fără a include sarcina utilă. În anumite variante de realizare, LNP-ul cuprinde două componente (*de exemplu*, lipide), fără a include sarcina utilă. În anumite variante de realizare, nanoparticula lipidică cuprinde 5 componente (*de exemplu*, lipide), fără a include sarcina utilă. În anumite variante de realizare, LNP-ul cuprinde 6 componente (*de exemplu*, lipide), fără a include sarcina utilă.

În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice descrise aici pot fi nanoparticule lipidice cu patru componente. Un LNP cu 4 componente poate cuprinde patru lipide diferite selectate dintre oricare dintre cele descrise aici. Cele patru componente nu includ sarcina utilă. Nanoparticula lipidică poate cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică, o lipidă PEG, și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, nanoparticula lipidică cuprinde o lipidă cationică, un acid gras, o lipidă PEG, și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, nanoparticula lipidică cuprinde o lipidă cationică, un acid gras, o lipidă PEG-OH, și o lipidă structurală.

În unele variante de realizare, formulările de nanoparticule lipidice descrise aici pot fi nanoparticule lipidice cu trei componente. Un LNP cu trei componente poate cuprinde trei lipide diferite descrise aici. Nanoparticula lipidică poate cuprinde o lipidă cationică, o lipidă necationică (*de exemplu*, fosfolipidă sau acid gras), și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, nanoparticula lipidică cuprinde o lipidă cationică, un acid gras, și o lipidă structurală. În anumite variante de realizare, nanoparticula lipidică cuprinde o lipidă cationică, a fosfolipidă, și o lipidă structurală.

În unele variante de realizare, o nanoparticulă (*de exemplu*, o nanoparticulă lipidică) are un diametru mediu de 10-500 nm, 20-400 nm, 30-300 nm, sau 40-200 nm. În unele variante de realizare, o nanoparticulă (*de exemplu*, o nanoparticulă lipidică) are un diametru mediu de 50-150 nm, 50-200 nm, 80-100 nm sau 80-200 nm.

Într-o variantă de realizare, formularea de LNP poate fi formulată prin metodele descrise

publicațiile internaționale nr. WO2011127255 sau WO2008103276. Ca un exemplu nelimitativ, formulări de LNP așa cum sunt descrise în WO2011127255 și/sau WO2008103276.

5 Într-o variantă de realizare, nanoparticula lipidică poate fi formulată prin metodele descrise în Publicația de brevet US nr US2013/0156845 sau Publicația internațională nr WO2013/093648 sau WO2012024526.

10 Nanoparticulele lipidice descrise aici pot fi produse într-un mediu steril prin sistemul și/sau metodele descrise în publicația de brevet US US20130164400.

Într-o variantă de realizare, formularea de LNP poate fi formulată în o nanoparticulă cum ar fi o particulă de acid nucleic-lipidă descrisă în Brevetul US nr. 8.492.359.

15 Ca un exemplu nelimitativ, particula lipidică poate cuprinde unul sau mai mulți agenți activi sau agenți terapeutici (*de exemplu*, ARN); una sau mai multe lipide cationice cuprinzând de la aproximativ 50 mol% la aproximativ 85 mol% din totalul de lipidă prezentă în particulă; una sau mai multe lipide necationice cuprinzând de la aproximativ 13 mol% la aproximativ 49,5 mol% din totalul de lipidă prezentă în particulă; și una sau mai multe lipide structurale care inhibă agregarea particulelor cuprinzând de la aproximativ 0,5 mol% la aproximativ 2 mol% din totalul de lipidă prezentă în particulă.

20 Într-o variantă de realizare, formularea de LNP poate fi formulată prin metodele descrise în publicațiile internaționale nr. WO2011127255 sau WO2008103276. Ca un exemplu nelimitativ, formulări de LNP sunt așa cum sunt descrise în WO2011127255 și/sau WO2008103276; conținutul fiecăruia dintre acestea este încorporat aici prin referință în întregime. Într-o variantă de realizare, formulările de LNP  
25 descrise aici pot cuprinde o compoziție policationică. Ca exemplu nelimitativ, compoziția policationică poate fi selectată din formula 1-60 din publicația de brevet US nr. US20050222064.

30 În unele variante de realizare, LNP-urile cuprind lipida KL52 (o amino-lipidă dezvoltată în Publicația cererii U.S. nr. 2012/0295832). Activitatea și/sau siguranța (măsurată prin examinarea unuia sau mai multor dintre ALT/AST, numărul de globule albe și inducerea citokinelor) ale administrării LNP-ului pot fi îmbunătățite prin încorporarea unor astfel de lipide. LNP-urile care cuprind KL52 pot fi administrate intravenos și/sau în una sau mai multe doze. În unele variante de realizare, administrarea de LNP-uri care cuprind KL52 are ca rezultat o exprimare egală sau îmbunătățită de ARNm și/sau a  
35 proteinei în comparație cu LNP-uri care cuprind MC3.

40 Ca un exemplu nelimitativ, LNP-ul poate include o peptidă sau o polipeptidă cationică cum ar fi, dar fără a se limita la, polilizină, poliornitină și/sau poliarginină și peptidele cationice descrise în Pub. internațională Nr. WO2012013326 sau Pub. de brevet US Nr. US20130142818. În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică include o lipidă necationică cum ar fi, dar fără a se limita la, colesterol sau dioleoil fosfatidiletanolamină (DOPE).

45 În unele variante de realizare, nanoparticulele lipidice descrise aici pot avea un diametru de la sub 0,1 um până la 100 nm cum ar fi, dar fără a se limita la, mai puțin de 0,1 um, mai puțin de 1,0 um, mai puțin de 5 um, mai puțin de 10 um, mai puțin de 15 um, mai puțin de 20 um, mai puțin de 25 um, mai puțin de 30 um, mai puțin de 35 um, mai puțin de 40 um, mai puțin de 50 um, mai puțin de 55 um, mai puțin de 60 um, mai puțin de 65 um, mai puțin de 70 um, mai puțin de 75 um, mai puțin de 80 um, mai puțin de 85 um, mai puțin de 90 um, mai puțin de 95 um, mai puțin de 100 um, mai puțin de 125 um, mai puțin de 150 um, mai puțin de 175 um, mai puțin de 200 um, mai puțin de 225 um, mai puțin de 250 um, mai puțin de 275 um, mai puțin de 300 um, mai puțin de 325 um, mai puțin de 350 um, mai puțin de 375 um, mai puțin de 400 um, mai puțin de 425 um, mai puțin de 450 um, mai puțin de 475 um, mai puțin de 500 um, mai puțin de 525 um, mai puțin de 550 um, mai puțin de 575 um, mai puțin de 600 um, mai puțin de 625 um, mai puțin de 650 um, mai puțin de 675 um, mai puțin de 700 um, mai puțin de 725 um, mai puțin de 750 um, mai puțin de 775 um, mai puțin de 800 um, mai puțin de 825 um, mai puțin de 850 um, mai puțin de 875 um, mai puțin de 900 um, mai puțin de 925 um, mai puțin de 950 um, mai puțin de 975 um.  
55 um.

60 Într-o altă variantă de realizare, LNP-urile pot avea un diametru de la aproximativ 1 nm la aproximativ 100 nm, de la aproximativ 1 nm la aproximativ 10 nm, aproximativ 1 nm la aproximativ 20 nm de la aproximativ 1 nm la aproximativ 30 nm de la aproximativ 1 nm la aproximativ 40 nm, de la aproximativ 1 nm la aproximativ 50 nm, de la aproximativ 1 nm la aproximativ 60 nm, de la aproximativ 1 nm la aproximativ 70 nm, de la aproximativ 1 nm la aproximativ 80 nm, de la aproximativ 1 nm la

aproximativ 90 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 100 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 10 nm, aproximativ 5 nm la aproximativ 20 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 30 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 40 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 50 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 60 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 70 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 80 nm, de la aproximativ 5 nm la aproximativ 90 nm, aproximativ 10 la aproximativ 50 nM, de la aproximativ 20 la aproximativ 50 nm, de la aproximativ 30 la aproximativ 50 nm, de la aproximativ 40 la aproximativ 50 nm, de la aproximativ 20 la aproximativ 60 nm, de la aproximativ 30 la aproximativ 60 nm, de la aproximativ 40 la aproximativ 60 nm, de la aproximativ 20 la aproximativ 70 nm, de la aproximativ 30 la aproximativ 70 nm, de la aproximativ 40 la aproximativ 70 nm, de la aproximativ 20 la aproximativ 80 nm, de la aproximativ 30 la aproximativ 80 nm, de la aproximativ 40 la aproximativ 80 nm, de la aproximativ 50 la aproximativ 80 nm. de la aproximativ 60 la aproximativ 80 nm, de la aproximativ 20 la aproximativ 90 nm, de la aproximativ 30 la aproximativ 90 nm, de la aproximativ 40 la aproximativ 90 nm, de la aproximativ 50 la aproximativ 90 nm, de la aproximativ 60 la aproximativ 90 nm și/sau de la aproximativ 70 la aproximativ 90 nm. Fiecare posibilitate reprezintă un exemplu de realizare separat al prezentei invenții.

O compoziție de nanoparticule poate fi relativ omogenă. Un indice de polidispersie poate fi utilizat pentru a indica omogenitatea unei compoziții de nanoparticule, *de exemplu*, distribuția mărimii particulelor a compozițiilor de nanoparticule. Un indice de polidispersie mic (*de exemplu*, mai puțin de 0,3) indică în general o distribuție îngustă a dimensiunii particulelor. O compoziție de nanoparticule poate avea un indice de polidispersie de la aproximativ 0 la aproximativ 0,25, cum ar fi 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, sau 0,25. În unele variante de realizare, indicele de polidispersitate al unei compoziții de nanoparticule poate fi de la aproximativ 0,10 până la aproximativ 0,20. Fiecare posibilitate reprezintă un exemplu de realizare separat al prezentei invenții.

Potențialul zeta al unei compoziții de nanoparticule poate fi utilizat pentru a indica potențialul electrocinetic al compoziției. De exemplu, potențialul zeta poate descrie sarcina de suprafață a unei compoziții de nanoparticule. Compozițiile de nanoparticule cu sarcini relativ scăzute, pozitive sau negative, sunt în general de dorit, deoarece speciile cu încărcare mai mare pot interacționa în mod nedorit cu celulele, țesuturile și alte elemente din organism. În unele variante de realizare, potențialul zeta al unei compoziții de nanoparticule poate fi de la aproximativ -10 mV la aproximativ +20 mV, de la aproximativ -10 mV la aproximativ +15 mV, de la aproximativ -10 mV la aproximativ +10 mV, de la aproximativ -10 mV la aproximativ +5 mV, de la aproximativ -10 mV la aproximativ 0 mV, de la aproximativ -10 mV la aproximativ -5 mV, de la aproximativ -5 mV la aproximativ +20 mV, de la aproximativ -5 mV la aproximativ +15 mV, de la aproximativ -5 mV la aproximativ +10 mV, de la aproximativ -5 mV la aproximativ +5 mV, de la aproximativ -5 mV la aproximativ 0 mV, de la aproximativ 0 mV la aproximativ +20 mV, de la aproximativ 0 mV la aproximativ +15 mV, de la aproximativ 0 mV la aproximativ +10 mV, de la aproximativ 0 mV la aproximativ +5 mV, de la aproximativ +5 mV la aproximativ +20 mV, de la aproximativ +5 mV la aproximativ +15 mV, sau de la aproximativ +5 mV la aproximativ +10 mV. Fiecare posibilitate reprezintă un exemplu de realizare separat al prezentei invenții.

Eficiența încapsulării unui agent terapeutic descrie cantitatea de agent terapeutic care este încapsulată sau asociată în alt mod cu o compoziție de nanoparticule după preparare, în raport cu cantitatea inițială furnizată. Eficiența de încapsulare este de dorit să fie ridicată (*de exemplu*, aproape de 100%). Eficiența de încapsulare poate fi măsurată, de exemplu, prin compararea cantității de agent terapeutic dintr-o soluție care conține compoziția de nanoparticule înainte și după ruperea compoziției de nanoparticule cu unul sau mai mulți solvenți organici sau detergenți. Fluorescența poate fi utilizată pentru a măsura cantitatea de agent terapeutic liber (*de exemplu*, acizi nucleici) într-o soluție. Pentru compozițiile de nanoparticule descrise aici, eficiența de încapsulare a unui agent terapeutic poate fi de cel puțin 50%, de exemplu 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, sau 100%. În unele variante de realizare, eficiența de încapsulare poate fi cel puțin 80%. În anumite variante de realizare, eficiența de încapsulare poate fi cel puțin 90%. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

O compoziție de nanoparticule poate cuprinde opțional una sau mai multe acoperiri. De exemplu, o compoziție de nanoparticule poate fi formulată într-o capsulă, film sau tabletă având o acoperire. O capsulă, film sau tabletă care include o compoziție descrisă aici poate avea orice dimensiune, rezistență la tracțiune, duritate sau densitate utilă.



În unele variante de realizare, astfel de LNP-uri sunt sintetizate folosind metode care cuprind amestecătoare microfluidice. Exemple de amestecătoare microfluidice pot include, dar nu sunt limitate la, un microamestecător interdigital cu fantă, incluzând, dar fără a se limita la, cele fabricate de Microinnova (Allerheiligen bei Wildon, Austria) și/sau un microamestecător în schemă eșalonată (SHM) (Zhigaltsev, I.V. și colab., A fost publicată proiectarea și sinteza de jos în sus a sistemelor de nanoparticule lipidice de dimensiune limită cu miezuri apoase și trigliceride utilizând amestecarea microfluidice în milisecunde ă (Langmuir. 2012. 28:3633-40; Belliveau, N.M. și colab., Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2012. 1:e37; Chen, D. și colab., Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation. J Am Chem Soc. 2012. 134(16):6948-51 ).

În unele variante de realizare, metodele de generare a LNP-urilor cuprinzând SHM, cuprind în plus amestecarea a cel puțin două fluxuri de intrare în care amestecarea are loc prin advecție haotică indusă de microstructură (MICA). Conform acestei metode, fluxurile de fluid curg prin canalele prezente într-un model în formă de os de pește, provocând fluxul rotațional și rotind fluidele unul în jurul celuilalt. Această metodă poate cuprinde, de asemenea, o suprafață pentru amestecarea fluidelor în care suprafața își schimbă orientările în timpul ciclării fluidului. Metodele de generare a LNP-urilor folosind SHM le includ pe cele dezvoltate în Publicațiile cererilor U.S. Nr. 2004/0262223 și 2012/0276209.

Într-o variantă de realizare, nanoparticulele lipidice pot fi formulate utilizând un microamestecător, cum ar fi, dar fără a se limita la, un amestecător microstructurat interdigital cu fantă (SIMM-V2) sau un micro amestecător interdigital cu fantă standard (SSIMM) sau Caterpillar (CPMM) sau cu jet de impact. (IJMM) de la Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Mainz Germany).

Într-o variantă de realizare, nanoparticulele lipidice sunt create folosind tehnologia microfluidică (vezi Whitesides, George M. The Origins and the Future of Microfluidics. Nature, 2006 442: 368-373; și Abraham și colab. Chaotic Mixer for Microchannels. Science, 2002 295: 647-651). Ca un exemplu nelimitativ, formularea microfluidică controlată include o metodă pasivă de amestecare a fluxurilor curenților constanți conduși de presiune în microcanale la un număr Reynolds scăzut (vezi de exemplu, Abraham și colab. Chaotic Mixer for Microchannels. Science, 2002 295: 647651).

Într-o variantă de realizare, ARNm-ul conform prezentei invenții poate fi formulat în nanoparticule lipidice create utilizând un cip microamestecător cum ar fi, dar fără a se limita la, cele de la Harvard Apparatus (Holliston, MA) sau Dolomite Microfluidics (Royston, UK). Un cip microamestecător poate fi utilizat pentru amestecarea rapidă a două sau mai multe fluxuri de fluide cu un mecanism de divizare și recombinare.

Într-o variantă de realizare, nanoparticulele lipidice pot avea un diametru de la aproximativ 10 la aproximativ 100 nm cum ar fi, dar fără a se limita la, aproximativ 10 la aproximativ 20 nm, aproximativ 10 la aproximativ 30 nm, aproximativ 10 la aproximativ 40 nm, aproximativ 10 la aproximativ 50 nm, aproximativ 10 la aproximativ 60 nm, aproximativ 10 la aproximativ 70 nm, aproximativ 10 la aproximativ 80 nm, aproximativ 10 la aproximativ 90 nm, aproximativ 20 la aproximativ 30 nm, aproximativ 20 la aproximativ 40 nm, aproximativ 20 la aproximativ 50 nm, aproximativ 20 la aproximativ 60 nm, aproximativ 20 la aproximativ 70 nm, aproximativ 20 la aproximativ 80 nm, aproximativ 20 la aproximativ 90 nm, aproximativ 20 la aproximativ 100 nm, aproximativ 30 la aproximativ 40 nm, aproximativ 30 la aproximativ 50 nm, aproximativ 30 la aproximativ 60 nm, aproximativ 30 la aproximativ 70 nm, aproximativ 30 la aproximativ 80 nm, aproximativ 30 la aproximativ 90 nm, aproximativ 30 la aproximativ 100 nm, aproximativ 40 la aproximativ 50 nm, aproximativ 40 la aproximativ 60 nm, aproximativ 40 la aproximativ 70 nm, aproximativ 40 la aproximativ 80 nm, aproximativ 40 la aproximativ 90 nm, aproximativ 40 la aproximativ 100 nm, aproximativ 50 la aproximativ 60 nm, aproximativ 50 la aproximativ 70 nm, aproximativ 50 la aproximativ 80 nm, aproximativ 50 la aproximativ 90 nm, aproximativ 50 la aproximativ 100 nm, aproximativ 60 la aproximativ 70 nm, aproximativ 60 la aproximativ 80 nm, aproximativ 60 la aproximativ 90 nm, aproximativ 60 la aproximativ 100 nm, aproximativ 70 la aproximativ 80 nm, aproximativ 70 la aproximativ 90 nm, aproximativ 70 la aproximativ 100 nm, aproximativ 80 la aproximativ 90 nm, aproximativ 80 la aproximativ 100 nm și/sau aproximativ 90 la aproximativ 100 nm. Într-o variantă de realizare, nanoparticulele lipidice pot avea un diametru de la aproximativ 10 la 500 nm. Într-o variantă de realizare, nanoparticula lipidică poate avea un diametru mai mare de 100 nm, mai mare de 150 nm, mai mare de 200 nm, mai mare de 250 nm, mai mare de 300 nm, mai mare de 350 nm, mai mare de 400 nm, mai mare de 450 nm, mai mare de 500 nm, mai mare de 550 nm, mai mare de 600 nm,

mai mare de 650 nm, mai mare de 700 nm, mai mare de 750 nm, mai mare de 800 nm, mai mare de 850 nm, mai mare de 900 nm, mai mare de 950 nm sau mai mare de 1000 nm. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

5 În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică are o valoare de polidiversitate mai mică de 0,4. În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică are o sarcină neutră netă la un pH neutru. În unele variante de realizare, nanoparticula lipidică are un diametru mediu de 50-200 nm.

#### *Lipide*

10 Așa cum este definit în general aici, termenul "lipidă" se referă la o moleculă mică care are proprietăți hidrofobe sau amfifile. Lipidele pot fi naturale sau sintetice. Exemple de clase de lipide includ, dar nu se limitează la, grăsimi, ceruri, metaboliți care conțin sterol, vitamină, acizi grași, glicerolipide, glicerofosfolipide, sfingolipide, zaharolipide și policetide și lipide prenolice. În unele cazuri, proprietățile amfifile ale unor lipide le determină să formeze lipozomi, vezicule sau membrane în medii apoase.

#### 15 *Lipide cationice/ionizabile*

O compoziție de nanoparticule poate include una sau mai multe lipide cationice și/sau ionizabile (de exemplu, lipide care pot avea o sarcină pozitivă sau parțială pozitivă la pH fiziologic). Lipidele cationice și/sau ionizabile pot fi selectate din grupul nelimitativ constând din 3-(didodecilamino)-N1,N1,4-tridodecil-1-piperazineetanamină (KL10), N1-[2-(didodecilamino)etil] N1,N4,N4-tridodecil-1,4-piperazinedietanamină (KL22), 14,25-diidecil-15,18,21,24-tetraaza-octatriacontane (KL25), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropane (DLin-DMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolan (DLin-K-DMA), butanoat de heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamino) (DLin-MC3-DMA), 2,2-dilinoleil-4-(2 dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolan (DLin-KC2-DMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropan (DODMA), 2-({8 [(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi) N,N dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amină (Octil-CLinDMA). (2R)-2-((B-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amină (Octil-CLinDMA (2R)), și (2S) 2-({8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amină (Octil-CLinDMA (2S)). În plus față de acestea, o lipidă cationică poate fi, de asemenea, o lipidă care include o grupare de amină ciclică. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

35 Într-o variantă de realizare, lipida cationică poate fi selectată dintre, dar nu se limitează la, o lipidă cationică descrisă în publicațiile internaționale nr. WO2012040184, WO2011153120, WO2011149733, WO2011090965, WO2011043913, WO2011022460, WO2012061259, WO2012054365, WO2012044638, WO2010080724, WO201021865, WO2008103276 WO2013086373 și WO2013086354, Brevetele US nr. 7.893.302, 7.404.969, 8.283.333, și 8.466.122 și Publicația de brevet US nr. US20100036115, US20120202871, US20130064894, US20130129785, US20130150625, US20130178541 și S20130225836.

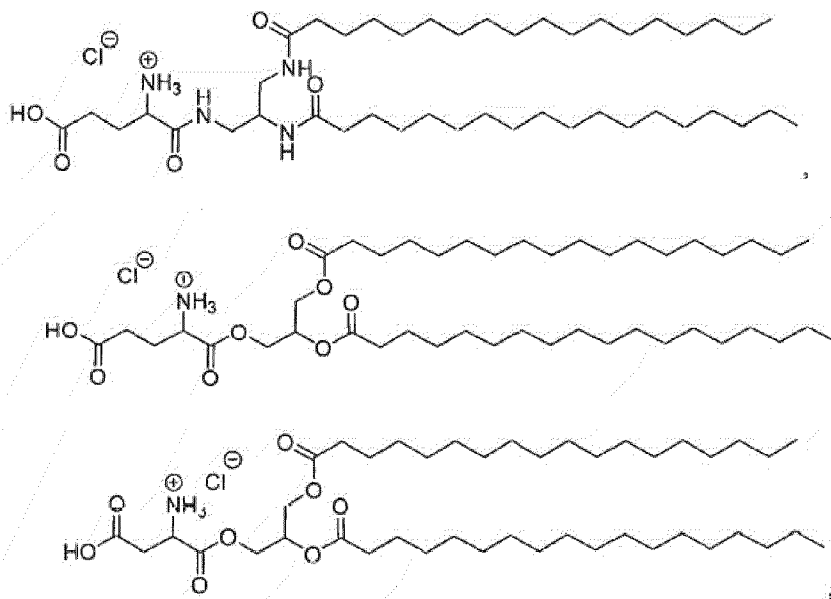
45 Într-o altă variantă de realizare, lipida cationică poate fi selectată dintre, dar fără a se limita la publicațiile internaționale nr. WO2012040184, WO2011153120, WO2011149733, WO2011090965, WO2011043913, WO2011022460, WO2012061259, WO2012054365, WO2012044638 și WO2013116126 publicația de brevet US nr. US20130178541 și US20130225836. Încă într-o altă variantă de realizare, lipida cationică poate fi selectată dintre, dar fără a se limita la, formula CLI-CLXXIX din Publicația internațională nr. WO2008103276, formula CLI-CLXXXII din Brevetul US nr. 7.893.302, formula CLI-CLXXXII din Brevetul US nr. 7.404.969 și formula I-VI din Publicația de brevet US Nr. US20100036115, formula I din Publicația de brevet US nr US20130123338.

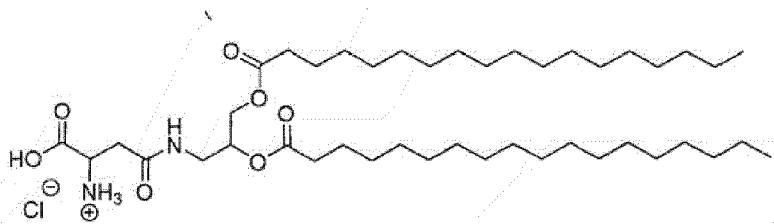
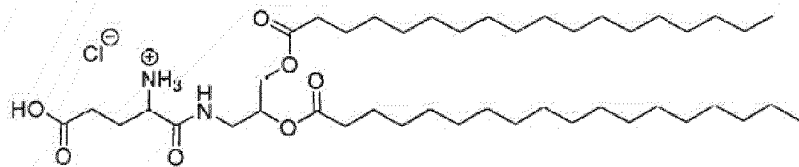
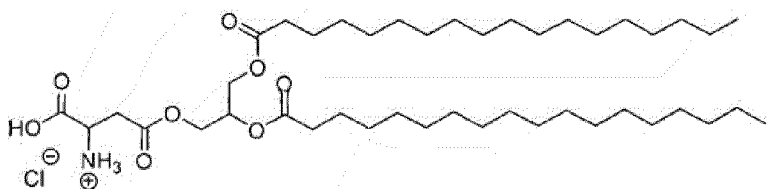
50 Ca un exemplu nelimitativ, lipida cationică poate fi selectată dintre (20Z,23Z)-N,N-dimetytnonacosa-20,23-dien-10-amină, (17Z,20Z)-N,N-dimemilhexacosa-17,20-dien-9-amină, (1Z,19Z)-N5N-dimetilpentacosa-16, 19-dien-8-amină, (13Z,16Z)-N,N-dimetildocosa-13, 16-dien-5-amină, (12Z,15Z)-N,N-dimetilhenicosa-12,15- dien-4-amină, (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricosa-14,17-dien-6-amină, (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracosa-15,18-dien-7-amină, (18Z,21Z)-N,N-dimetilheptacosa-18,21-dien-10-amină, (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracosa-15,18-dien-5-amină, (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricosa-14, 17-dien-4-amină, (19Z,22Z)-N,N-dimeihiloctacosa-19,22-dien-9-amină, (18Z,21 Z)-N,N-dimetilheptacosa- 18,21-dien-8 -amină, (17Z,20Z)-N,N-dimetilhexacosa- 17,20-dien-7-amină, (16Z,19Z)-N,N-dimetilpentacosa-16,19-dien-6-amină, (22Z,25Z)-N,N-dimetilhentriaconta-22,25-dien-10-amină, (21 Z,24Z)-N,N-dimetiltriaconta-21,24-dien-9-amină, (18Z)-N,N-dimetilheptacos-18-en-10-amină, (17Z)-N,N-dimetilhexacos-17-en-9-amină, (19Z,22Z)-N,N-dimetiloctacosa-19,22-dien-7-amină, N,N-

dimetilheptacosan-10-amină, (20Z,23Z)-N-etil-N-metilnonacosan-20,23-dien-10-amină, 1-[(11Z,14Z)-1-nonilicosa-11,14-dien-1-il] pirolidină, (20Z)-N,N-dimetilheptacos-20-en-10-amină, (15Z)-N,N-dimetil eptacos-15-en-10-amină, (14Z)-N,N-dimetilnonacos-14-en-10-amină, (17Z)-N,N-dimetilnonacos-17-en-10-amină, (24Z)-N,N-dimetiltritriacont-24-en-10-amină, (20Z)-N,N-dimetilnonacos-20-en-10-amină, (22Z)-N,N-dimetilhentriacont-22-en-10-amină, (16Z)-N,N-dimetilpentacos-16-en-8-amină, (12Z,15Z)-N,N-dimetil-2-nonilhenicosa-12,15-dien-1-amină, (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amină, N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil] eptadecan-8-amină, 1-[(1S,2R)-2-hexilciclopropil]-N,N-dimetilnonadecan-10-amină, N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]nonadecan-10-amină, N,N-dimetil-2-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]henicosan-10-amină, N,N-dimety]-1-[(1S,2S)-2-{{(1R,2R)-2-pentilciclopropil}metil}ciclopropil]nonadecan-10-amină, N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]hexadecan-8-amină, N,N-dimetil-[(1R,2S)-2 undecilciclopropil]tetradecan-5-amină, N,N-dimetil-3-{{7-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]heptil} dodecan-1-amină, 1-[(1R,2S)-2-heptylciclopropil]-N,N-dimetiloctadecan-9-amină, 1-[(1S,2R)-2-decilciclopropil]-N,N-dimetilpentadecan-6-amină, N,N-dimety]-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]pentadecan-8-amină, R-N,N-dimcthy(-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-3-(octiloxi)propan-2-amine, S-N,N-dimetil-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-3-(octiloxi)propan-2-amină, 1-{{2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-1-[(octiloxi)metil]etil}pirolidină, (2S)-N,N-dimetil-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-3-[(5Z)-oct-5-en-1-iloxi]propan-2-amină, 1-{{2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-1-[(octiloxi)metil]etil}azetidine, (2S)-1-(hexiloxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amină, (2S)-1-(heptiloxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amină, N,N-dimetil-1-(noniloxi)-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amină, N,N-dimetil-1-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-3-(octitoxi)propan-2-amină; (2S)-N,N-dimetil-1-[(6Z,9Z,12Z)-octadeca-6,9,12-trien-1-iloxi]-3-(octiloxi)propan-2-amină, (2S)-1-[(11Z,14Z)-icosa-11,14-dien-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amină, (2S)-1-(hexiloxi)-3-[(11Z,14Z)-icosa-11,14-dien-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amină, 1-[(11Z,14Z)-icosa-11,14-dien-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(octiloxi)propan-2-amină, 1-[(13Z,16Z)-docosa-13,16-dien-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(octiloxi)propan-2-amină, (2S)-1-[(13Z,16Z)-docosa-13,16-dien-1-iloxi]-3-(hexiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amină, (2S)-1-[(13Z)-docos-13-en-1-iloxi]-3-(hexiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amină, 1-[(13Z)-docos-13-en-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(octiloxi)propan-2-amină, 1-[(9Z)-hexadec-9-en-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(octiloxi)propan-2-amină, (2R)-N,N-dimetil-H(1-metioctil)oxi]-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amină, (2R)-1-[(3,7-dimetiloctil)oxi]-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amină, N,N-dimetil-1-(octiloxi)-3-{{8-[(1S,2S)-2-{{(1R,2R)-2-pentilciclopropil}metil}ciclopropil]octil}oxi)propan-2-amină, N,N-dimetil-1-{{8-(2-octilciclopropil)octil}oxi]-3-(octitoxi)propan-2-amină și (11E,20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacosan-11,20,2-trien-10-amină sau o sare acceptabilă farmaceutic sau stereozomer al acestora. Fiecare posibilitate reprezintă un exemplu de realizare separat al prezentei invenții.

Exemple suplimentare de lipide cationice includ următoarele:

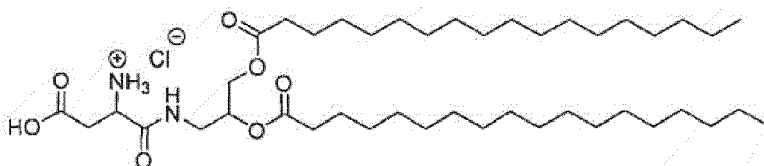
40





5

și

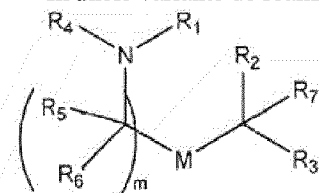


10

Într-o variantă de realizare, lipida poate fi o lipidă scindabilă, cum ar fi cele descrise în Publicația internațională nr. WO2012170889. Într-o altă variantă de realizare, lipida poate fi o lipidă cationică cum ar fi, dar fără a se limita la, Formula (1) din cererea de brevet U.S. Nr. US20130064894. Într-o variantă de realizare, lipida cationică poate fi sintetizată prin metode cunoscute în domeniu și/sau așa cum sunt descrise publicațiile internaționale nr. WO2013086354. Într-o altă variantă de realizare, lipida cationică poate fi o lipidă cationică trialchilică. Exemple nelimitative de lipide cationice trialchilice și metode de obținere și utilizare a lipidelor cationice trialchilice sunt descrise în publicația internațională de brevet nr. WO2013126803.

15

În unele variante de realizare, lipide suplimentare pot cuprinde un compus cu Formula (X):



(X),

20

sau o sare sau izomer al acestora, în care:

R<sub>1</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>5-30</sub>, alchenil C<sub>5-20</sub>, -R\*YR", -YR", și -R"M'R';

R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub> sunt selectate independent din grupul care constă din H, alchil C<sub>1-14</sub>, alchenil C<sub>2-14</sub>, -R\*YR", -YR", și -R\*OR", sau R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub>, împreună cu atomul la care sunt atașați, formează un heterociclu sau carbociclu;

25

R<sub>4</sub> este selectat din grupul care constă din un carbociclu C<sub>3-6</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, -CQ(R)<sub>2</sub>, și alchil C<sub>1-6</sub> nesubstituit, în care Q este selectat dintre un carbociclu, heterociclu, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -N(R)<sub>2</sub>, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)R<sub>8</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR, -N(R)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)<sub>2</sub>R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)R, -C(O)N(R)OR, și -C(R)N(R)<sub>2</sub>C(O)OR, și fiecare n este selectat independent dintre 1, 2, 3, 4, și 5;

30

fiecare R<sub>5</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

- 5 fiecare  $R_6$  este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-3}$ , alchenil  $C_{2-3}$ , și H;  
 M și M' sunt selectate independent dintre  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R)-$ ,  $-N(R)C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  
 $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR)O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S-S-$ , o grupare aril, și o grupare heteroaril;  
 $R_7$  este selectată din grupul care constă din alchil  $C_{1-3}$ , alchenil  $C_{2-3}$ , și H;  
 10  $R_8$  este selectată din grupul care constă din carbociclu și heterociclu  $C_{3-6}$ ;  
 $R_9$  este selectată din grupul care constă din H, CN,  $NO_2$ , alchil  $C_{1-6}$ ,  $-OR$ ,  $-S(O)_2R$ ,  $-S(O)_2N(R)_2$ , alchenil  
 $C_{2-6}$ , carbociclu și heterociclu  $C_{3-6}$ ;  
 fiecare R este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-3}$ , alchenil  $C_{2-3}$ , și H;  
 fiecare R' este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-18}$ , alchenil  $C_{2-18}$ ,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$ , și  
 10 H;  
 fiecare R'' este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{3-14}$  și alchenil  $C_{3-14}$ ;  
 fiecare R\* este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-12}$  și alchenil  $C_{2-12}$ ;  
 fiecare Y este independent un carbociclu  $C_{3-6}$ ;  
 fiecare X este selectat independent din grupul care constă din F, Cl, Br, și I; și  
 15 m este selectat dintre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, și 13.

În unele variante de realizare, un subset de compuși cu Formula (X) îi includ pe cei în care  
 atunci când  $R_4$  este  $-(CH_2)_nQ$ ,  $-(CH_2)_nCHQR$ ,  $-CHQR$ , sau  $-CQ(R)_2$ , atunci (i) Q nu este  $-N(R)_2$  când n  
 este 1, 2, 3, 4 sau 5, sau (ii) Q nu este heterocicloalchil cu 5, 6, sau 7- membri când n este 1 sau 2.

- 20 În unele variante de realizare, un alt subset de compuși cu Formula (X) îi includ pe cei în care  
 $R_1$  este selectat din grupul care constă din alchil  $C_{5-30}$ , alchenil  $C_{5-20}$ ,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$ , și  $-R''M'R'$ ;  
 $R_2$  și  $R_3$  sunt selectate independent din grupul care constă din H, alchil  $C_{1-14}$ , alchenil  $C_{2-14}$ ,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$ ,  
 și  $-R''OR''$ , sau  $R_2$  și  $R_3$ , împreună cu atomul la care sunt atașați, formează un heterociclu sau carbociclu;  
 25  $R_4$  este selectată din grupul care constă dintr-un carbociclu  $C_{3-6}$ ,  $-(CH_2)_nQ$ ,  
 $-(CH_2)_nCHQR$ ,  
 $-CHQR$ ,  $-CQ(R)_2$ , și alchil  $C_{1-6}$  nesubstituit, în care Q este selectat dintre un carbociclu  $C_{3-6}$ , un heteroaril  
 cu 5- la 14- membri având unul sau mai mulți heteroatomi selectați dintre N, O, și S, -OR,  
 30  $-O(CH_2)_nN(R)_2$ ,  $-C(O)OR$ ,  $-OC(O)R$ ,  $-CX_3$ ,  $-CX_2H$ ,  $-CXH_2$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  
 $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(S)N(R)_2$ ,  $-CRN(R)_2C(O)OR$ ,  $-N(R)R_8$ ,  $-O(CH_2)_nOR$ ,  $-N(R)C$   
 $(-NR_9)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-OC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)R$ ,  $-N(OR)S(O)_2R$ ,  
 $-N(OR)C(O)OR$ ,  $-N(OR)C(O)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(S)N(R)_2$ ,  $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ ,  
 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-C(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-C(=NR_9)R$ ,  
 35  $-C(O)N(R)OR$ , și un heterocicloalchil cu 5- la 14- membri având unul sau mai mulți heteroatomi selectați  
 dintre N, O, și S care este substituit cu unul sau mai mulți substituenți selectați dintre oxo (=O), OH,  
 amino, mono- sau di-alchilamino, și alchil  $C_{1-3}$ , și fiecare n este selectat independent dintre 1, 2, 3, 4, și 5;  
 fiecare  $R_5$  este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-3}$ , alchenil  $C_{2-3}$ , și H;  
 fiecare  $R_6$  este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-3}$ , alchenil  $C_{2-3}$ , și H;  
 M și M' sunt selectați independent dintre  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R)-$ ,  $-N(R)C(O)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(S)-$ ,  
 40  $-C(S)S-$ ,  $-SC(S)-$ ,  $-CH(OH)-$ ,  $-P(O)(OR)O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-S-S-$ , o grupare aril, și o grupare heteroaril;  
 $R_7$  este selectată din grupul care constă din alchil  $C_{1-3}$ , alchenil  $C_{2-3}$ , și H;  
 $R_8$  este selectat din grupul care constă din carbociclu și heterociclu;  
 $R_9$  este selectată din grupul care constă din H, CN,  $NO_2$ , alchil  $C_{1-6}$ ,  $-OR$ ,  $-S(O)_2R$ ,  $-S(O)_2N(R)_2$ , alchenil  
 $C_{2-6}$ , carbociclu  $C_{3-6}$  și heterociclu;  
 45 fiecare R este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-3}$ , alchenil  $C_{2-3}$ , și H;  
 fiecare R' este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-18}$ , alchenil  $C_{2-18}$ ,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$ , și  
 H;  
 fiecare R'' este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{3-14}$  și alchenil  $C_{3-14}$ ;  
 fiecare R\* este selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{1-12}$  și alchenil  $C_{2-12}$ ;  
 50 fiecare Y este independent un carbociclu  $C_{3-6}$ ;  
 fiecare X este selectat independent din grupul care constă din F, Cl, Br, și I; și  
 m este selectat dintre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, și 13,  
 sau săruri sau izomeri ai acestora.

- 55 În unele variante de realizare, un alt subset de compuși cu Formula (X) îi includ pe cei în care  
 $R_1$  este selectat din grupul care constă din alchil  $C_{5-30}$ , alchenil  $C_{5-20}$ ,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$ , și  $-R''M'R'$ ;  
 $R_2$  și  $R_3$  sunt selectați independent din grupul care constă din H, alchil  $C_{1-14}$ , alchenil  $C_{2-14}$ ,  $-R^*YR''$ ,  $-YR''$ ,  
 și  $-R''OR''$ , sau  $R_2$  și  $R_3$ , împreună cu atomul la care sunt atașați, formează un heterociclu sau carbociclu;  
 $R_4$  este selectat din grupul care constă dintr-un carbociclu  $C_{3-6}$ ,  $-(CH_2)_nQ$ ,  $-(CH_2)_nCHQR$ ,

- CHQR, -CQ(R)<sub>2</sub>, și alchil C<sub>1-6</sub> nesubstituit, în care Q este selectat dintre un carbociclu C<sub>3-6</sub>, un heterociclu cu 5- la 14-membri având unul sau mai mulți heteroatomi selectați dintre N, O, și S, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -CRN(R)<sub>2</sub>C(O)OR, -N(R)R<sub>8</sub>,
- 5 -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR, -N(R)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)<sub>2</sub>R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)R, -C(O)N(R)OR, și -C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, și fiecare n este selectat independent dintre 1, 2, 3, 4, și 5; și atunci când Q este un heterociclu cu 5- la 14-membri și (i) R<sub>4</sub> este -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q în care n este 1 sau 2, sau (ii) R<sub>4</sub> este -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR în care n este 1, sau (iii) R<sub>4</sub> este -CHQR, și -CQ(R)<sub>2</sub>, atunci Q este fie un heteroaril cu 5 la 14 membri fie un heterocicloalchil cu 8 la 14 membri;
- 10 fiecare R<sub>5</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H; fiecare R<sub>6</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H; M și M' sunt selectați independent dintre -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R)-, -N(R)C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, o grupare aril, și o grupare heteroaril;
- 15 R<sub>7</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H; R<sub>8</sub> este selectat din grupul care constă din carbociclu C<sub>3-6</sub> și heterociclu; R<sub>9</sub> este selectat din grupul care constă din H, CN, NO<sub>2</sub>, alchil C<sub>1-6</sub>, -OR, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>2</sub>N(R)<sub>2</sub>, alchenil C<sub>2-6</sub>, carbociclu C<sub>3-6</sub> și heterociclu;
- 20 fiecare R este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H; fiecare R' este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-18</sub>, alchenil C<sub>2-18</sub>, -R\*YR", -YR", și H; fiecare R" este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>3-14</sub> și alchenil C<sub>3-14</sub>;
- 25 fiecare R\* este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-12</sub> și alchenil C<sub>2-12</sub>; fiecare Y este independent un carbociclu C<sub>3-6</sub>;
- fiecare X este selectat independent din grupul care constă din F, Cl, Br, și I; și m este selectat dintre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, și 13, sau săruri sau izomeri ai acestora.
- 30 În unele variante de realizare, un alt subset de compuși cu Formula (X) îi includ pe cei în care R<sub>1</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>5-30</sub>, alchenil C<sub>5-20</sub>, -R\*YR", -YR", și -R"MR'; R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub> sunt selectați independent din grupul care constă din H, alchil C<sub>1-14</sub>, alchenil C<sub>2-14</sub>, -R\*YR", -YR", și -R\*OR", sau R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub>, împreună cu atomul la care sunt atașați, formează un heterociclu sau carbociclu;
- 35 R<sub>4</sub> este selectat din grupul care constă dintr-un carbociclu C<sub>3-6</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, -CQ(R)<sub>2</sub>, și alchil C<sub>1-6</sub> nesubstituit, în care Q este selectat dintre un carbociclu C<sub>3-6</sub>, un heteroaril cu 5 la 14 membri având unul sau mai mulți heteroatomi selectați dintre N, O, și S, -OR, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)<sub>2</sub>, -C(O)OR, -OC(O)R, -CX<sub>3</sub>, -CX<sub>2</sub>H, -CXH<sub>2</sub>, -CN, -C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -CRN(R)<sub>2</sub>C(O)OR, -N(R)R<sub>8</sub>,
- 40 -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OR, -N(R)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, -N(OR)C(O)R, -N(OR)S(O)<sub>2</sub>R, -N(OR)C(O)OR, -N(OR)C(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(S)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -N(OR)C(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -C(=NR<sub>9</sub>)R, -C(O)N(R)OR, și -C(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, și fiecare n este selectat independent dintre 1, 2, 3, 4, și 5;
- fiecare R<sub>5</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H; fiecare R<sub>6</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;
- 45 M și M' sunt selectate independent dintre -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R)-, -N(R)C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, o grupare aril, și o grupare heteroaril;
- R<sub>7</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;
- 50 R<sub>8</sub> este selectat din grupul care constă din carbociclu C<sub>3-6</sub> și heterociclu; R<sub>9</sub> este selectat din grupul care constă din H, CN, NO<sub>2</sub>, alchil C<sub>1-6</sub>, -OR, -S(O)<sub>2</sub>R, -S(O)<sub>3</sub>N(R)<sub>2</sub>, alchenil C<sub>2-6</sub>, carbociclu C<sub>3-6</sub> și heterociclu;
- fiecare R este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;
- fiecare R' este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-18</sub>, alchenil C<sub>2-18</sub>, -R\*YR", -YR", și H;
- 55 fiecare R" este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>3-14</sub> și alchenil C<sub>3-14</sub>;
- fiecare R\* este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-12</sub> și alchenil C<sub>2-12</sub>;
- fiecare Y este independent un carbociclu C<sub>3-6</sub>;
- fiecare X este selectat independent din grupul care constă din F, Cl, Br, și I; și
- 60 m este selectat dintre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, și 13, sau săruri sau izomeri ai acestora.

În unele variante de realizare, un alt subset de compuși cu Formula (X) îi includ pe cei în care

R<sub>1</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>5-30</sub>, alchenil C<sub>5-20</sub>, -R\*YR", -YR", și -R"M'R';

R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub> sunt selectați independent din grupul care constă din H, alchil C<sub>2-14</sub>, alchenil C<sub>2-14</sub>, -R\*YR", -YR", și -R\*OR", sau R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub>, împreună cu atomul la care sunt atașați, formează un heterociclu sau carbociclu;

R<sub>4</sub> este -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q sau -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, în care Q este -N(R)<sub>2</sub>, și n este selectat dintre 3, 4, și 5;

fiecare R<sub>5</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

fiecare R<sub>6</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

M și M' sunt selectați independent dintre -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R)-, -N(R)C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, o grupare aril, și o grupare heteroaril;

R<sub>7</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

fiecare R este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

fiecare R' este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-18</sub>, alchenil C<sub>2-18</sub>, -R\*YR", -YR", și H;

fiecare R" este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>3-14</sub> și alchenil C<sub>3-14</sub>;

fiecare R\* este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-12</sub> și alchenil C<sub>1-12</sub>;

fiecare Y este independent un carbociclu C<sub>3-6</sub>;

fiecare X este selectat independent din grupul care constă din F, Cl, Br, și I; și

m este selectat dintre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, și 13,

sau săruri sau izomeri ai acestora.

În unele variante de realizare, un alt subset de compuși cu Formula (X) îi includ pe cei în care

R<sub>1</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>5-30</sub>, alchenil C<sub>5-20</sub>, -R\*YR", -YR", și -R"M'R';

R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub> sunt selectați independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-14</sub>, alchenil C<sub>2-14</sub>, -R\*YR", -YR", și -R\*OR", sau R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub>, împreună cu atomul la care sunt atașați, formează un heterociclu sau carbociclu;

R<sub>4</sub> este selectat din grupul care constă din -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CHQR, -CHQR, și -CQ(R)<sub>2</sub>, în care Q este -N(R)<sub>2</sub>, și n este selectată dintre 1, 2, 3, 4, și 5;

fiecare R<sub>5</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

fiecare R<sub>6</sub> este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

M și M' sunt selectați independent dintre -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R)-, -N(R)C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S-S-, o grupare aril, și o grupare heteroaril;

R<sub>7</sub> este selectat din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

fiecare R este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-3</sub>, alchenil C<sub>2-3</sub>, și H;

fiecare R' este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-18</sub>, alchenil C<sub>2-18</sub>, -R\*YR", -YR", și H;

fiecare R" este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>3-14</sub> și alchenil C<sub>3-14</sub>;

fiecare R\* este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-12</sub> și alchenil C<sub>1-12</sub>;

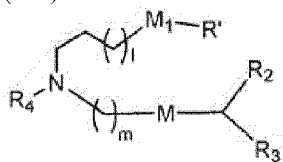
fiecare Y este independent un carbociclu C<sub>3-6</sub>;

fiecare X este selectat independent din grupul care constă din F, Cl, Br, și I; și

m este selectat dintre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, și 13,

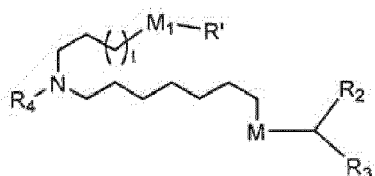
sau săruri sau izomeri ai acestora.

În unele variante de realizare, un subset de compuși cu Formula (X) include cei cu Formula (XA):



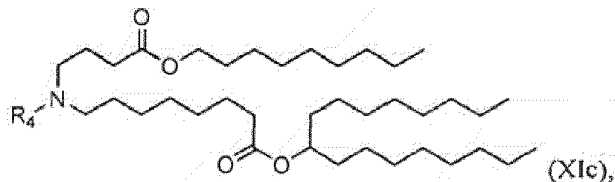
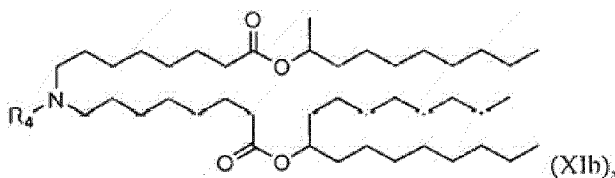
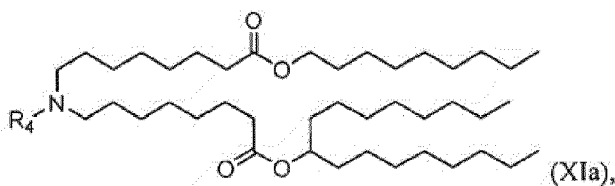
sau o sare sau izomer al acestora, în care | este selectat dintre 1, 2, 3, 4, și 5; m este selectat dintre 5, 6, 7, 8, și 9; M<sub>1</sub> este o legătură sau M'; R<sub>4</sub> este alchil C<sub>1-3</sub> nesubstituit, sau -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, în care Q este OH, -NHC(S)N(R)<sub>2</sub>, -NHC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)R<sub>8</sub>, -NHC(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -NHC(=CHR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, heteroaril sau heterocicloalchil; M și M' sunt selectați independent dintre -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R)-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, o grupare aril, și o grupare heteroaril; și R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub> sunt selectați independent din grupul care constă din H alchil, C<sub>1-14</sub>, și alchenil C<sub>2-14</sub>.

În unele variante de realizare, un subset de compuși cu Formula (X) include cei cu Formula (XI):

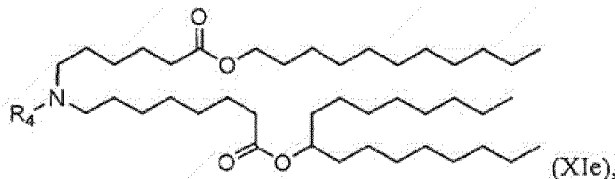


(II) sau o sare sau izomer al acestora, în care  $l$  este selectat dintre 1, 2, 3, 4, și 5;  $M_1$  este o legătură sau  $M'$ ;  $R_4$  este alchil  $C_{1-3}$  nesubstituit, sau  $-(CH_2)_nQ$ , în care  $n$  este 2, 3, sau 4, și  $Q$  este OH,  $-NHC(S)N(R)_2$ ,  $-NHC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)R$ ,  $-N(R)S(O)_2R$ ,  $-N(R)R_8$ ,  $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ ,  $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ ,  $-OC(O)N(R)_2$ ,  $-N(R)C(O)OR$ , heteroaril sau heterocicloalchil;  $M$  și  $M'$  sunt selectați independent dintre  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-C(O)N(R)-$ ,  $-P(O)(OR')O-$ ,  $-S-S-$ , o grupare aril, și o grupare heteroaril; și  $R_2$  și  $R_3$  sunt selectați independent din grupul care constă din H, alchil  $C_{1-14}$ , și alchenil  $C_{2-14}$ .

În unele variante de realizare, un subset de compuși cu Formula (X) include cei cu Formula (XIa), (XIb), (XIc), sau (XIe):

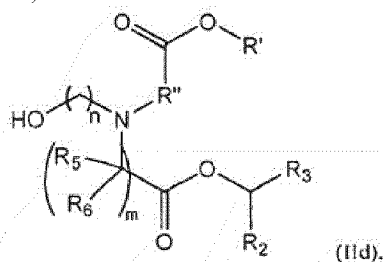


sau



20 sau o sare sau izomer al acestora, în care  $R_4$  este așa cum este descris aici.

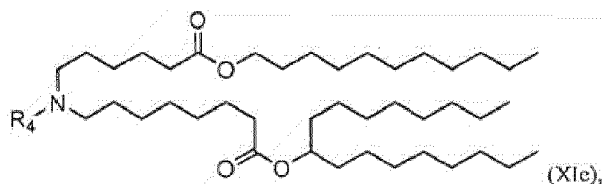
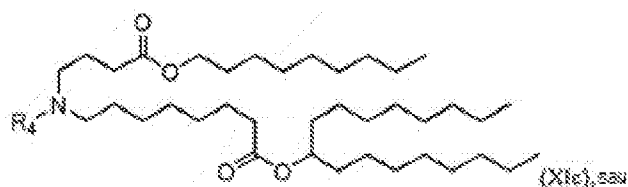
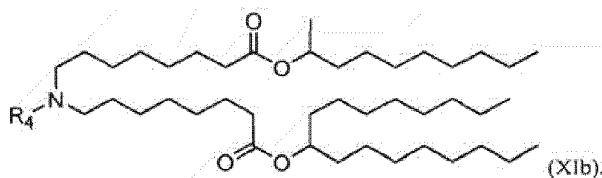
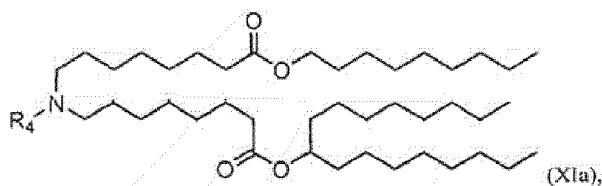
În unele variante de realizare, un subset de compuși cu Formula (X) include cei cu Formula (XIId):



25 sau o sare sau izomer al acestora, în care  $n$  este 2, 3, sau 4; și  $m$ ,  $R'$ ,  $R''$ , și  $R_2$  până la  $R_6$  sunt așa cum este descris aici. De exemplu, fiecare dintre  $R_2$  și  $R_3$  poate fi selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{5-14}$  și alchenil  $C_{5-14}$ .

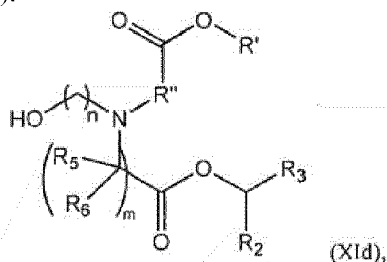


În unele variante de realizare, un subset de compuși cu Formula (X) include cei cu Formula (XIa), (XIb), (XIc), sau (XIe):



sau o sare sau izomer al acestora, în care  $R_4$  este așa cum este descris aici.

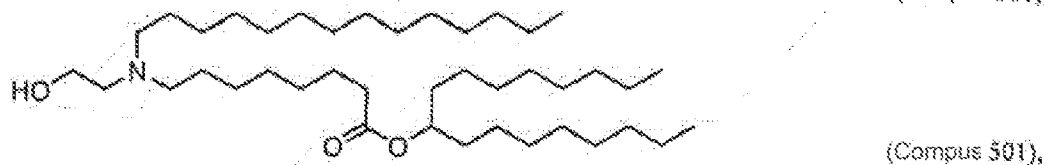
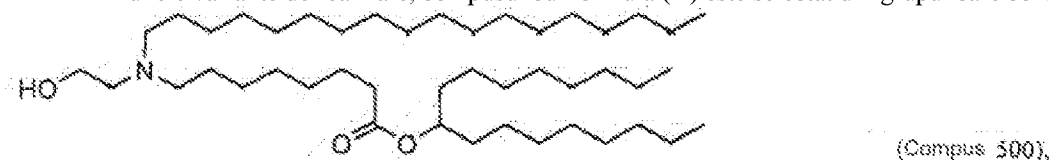
15 În unele variante de realizare, un subset de compuși cu Formula (X) include cei cu Formula (XIId):

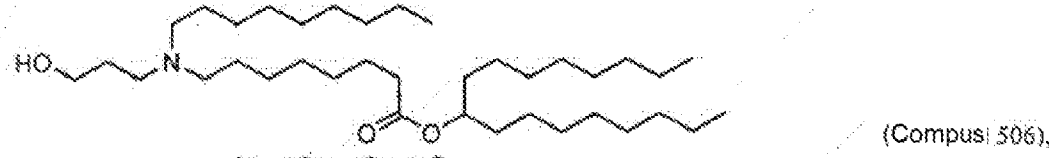
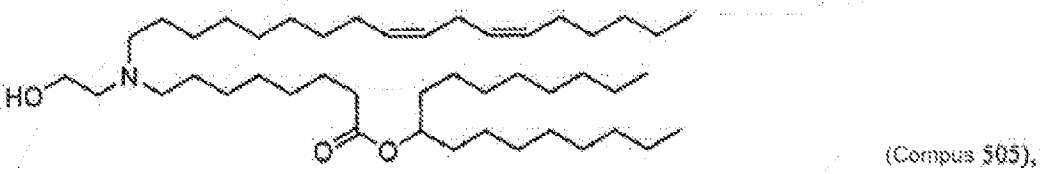
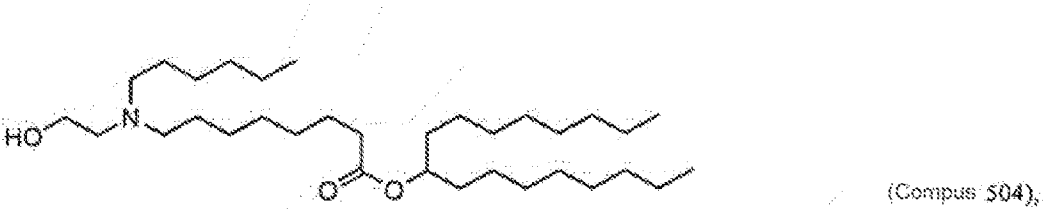
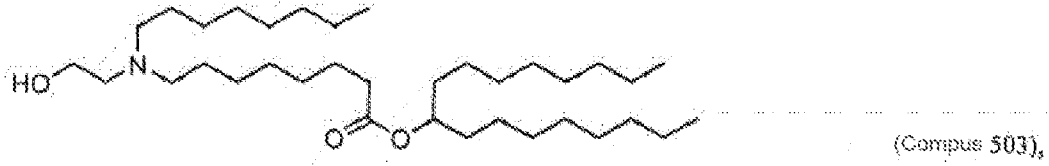
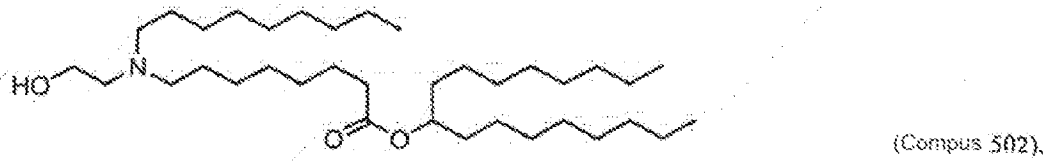


sau o sare sau izomer al acestora, în care  $n$  este 2, 3, sau 4; și  $m$ ,  $R'$ ,  $R''$ , și  $R_2$  până la  $R_6$  sunt așa cum este descris aici. De exemplu, fiecare dintre  $R_2$  și  $R_3$  poate fi selectat independent din grupul care constă din alchil  $C_{5-14}$  și alchenil  $C_{5-14}$ .

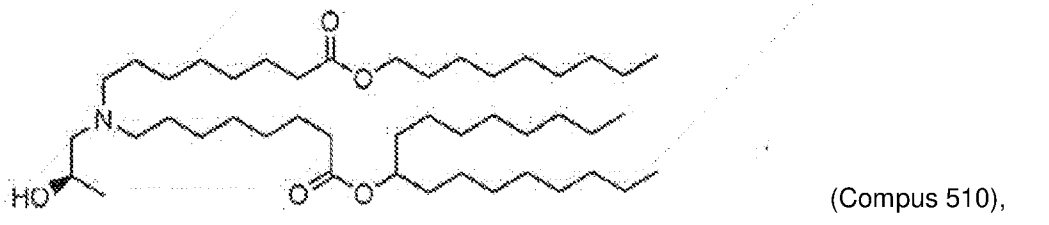
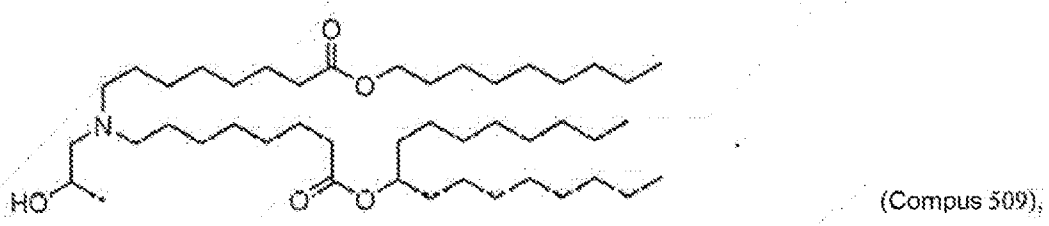
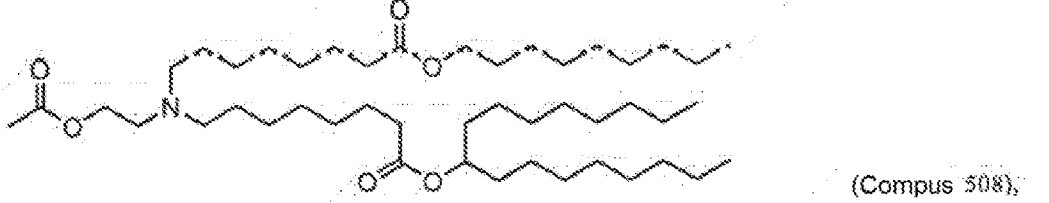
20

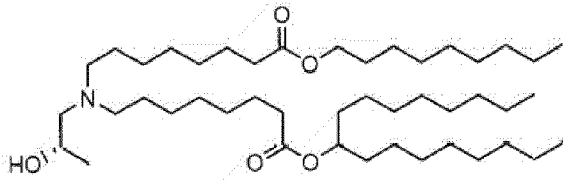
În unele variante de realizare, compusul cu Formula (X) este selectat din grupul care constă din:



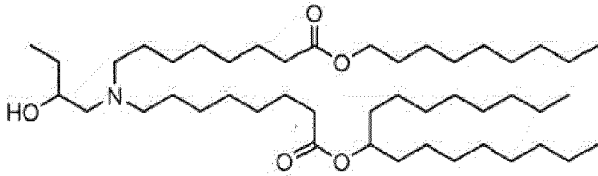


5

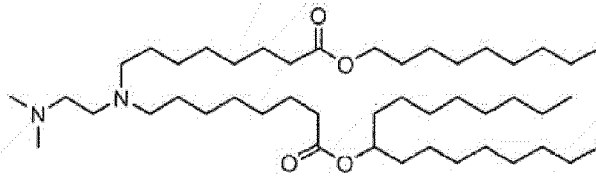




(Compus 511),

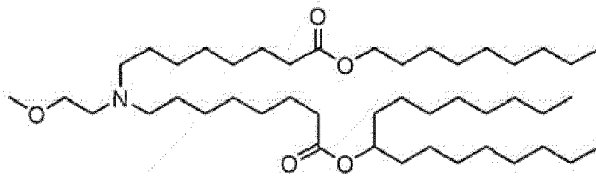


(Compus 512),

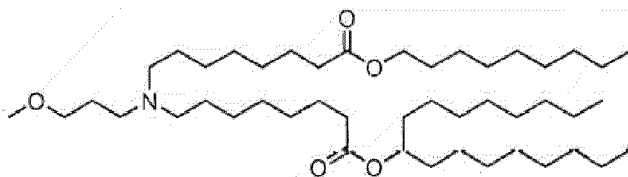


5

(Compus 513),

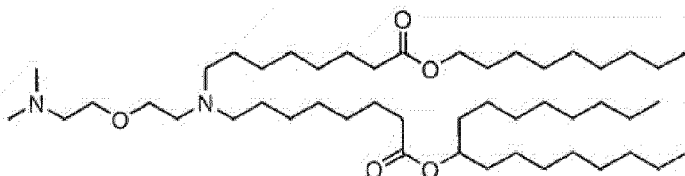


(Compus 514),

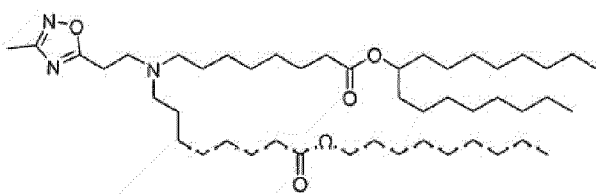


10

(Compus 515),

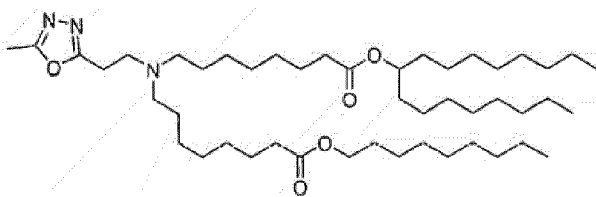


(Compus 516),

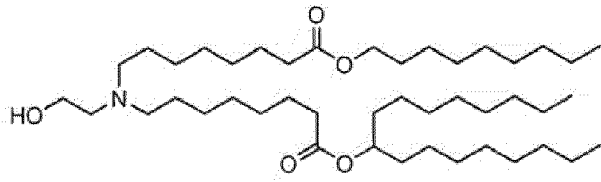


15

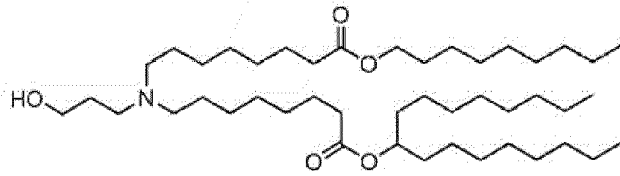
(Compus 517),



(Compus 518),

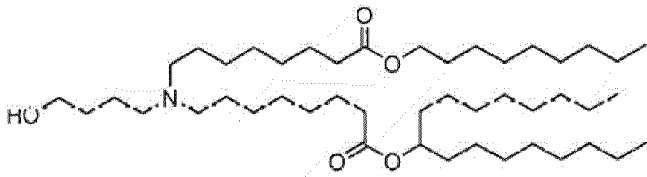


(Compus 18),

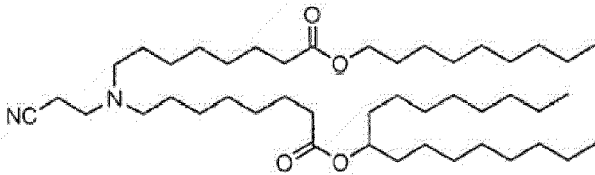


(Compus 519),

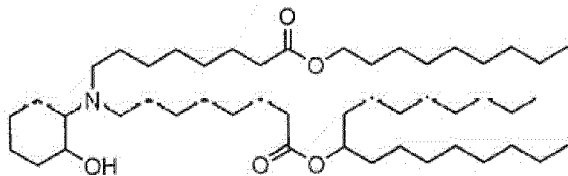
5



(Compus 520),

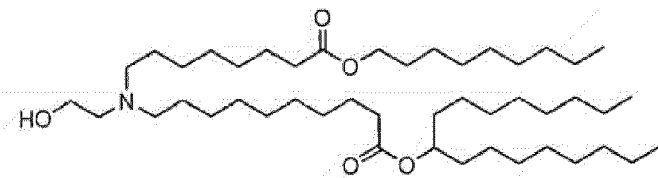


(Compus 521),

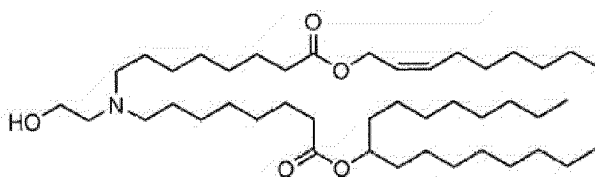


10

(Compus 522),

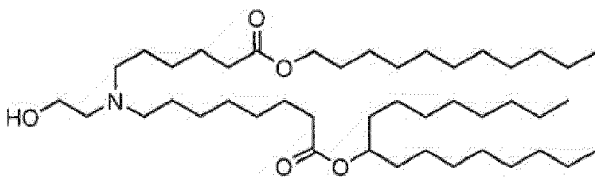


(Compus 523),

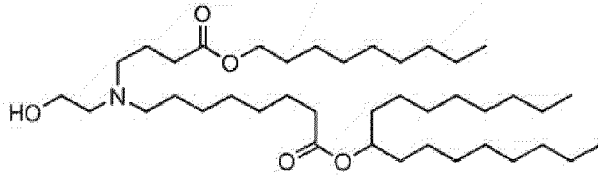


(Compus 524),

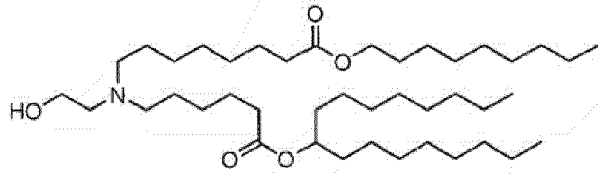
15



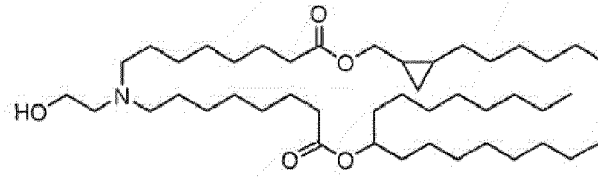
(Compus 525),



(Compus 526),

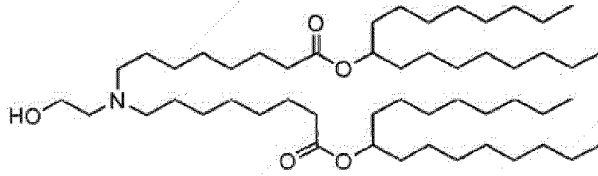


(Compus 527),

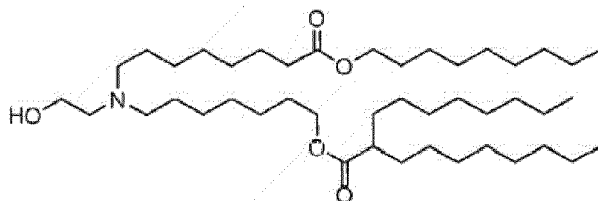


5

(Compus 528),

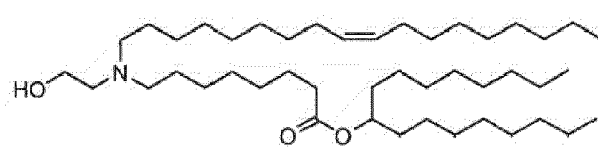


(Compus 529),

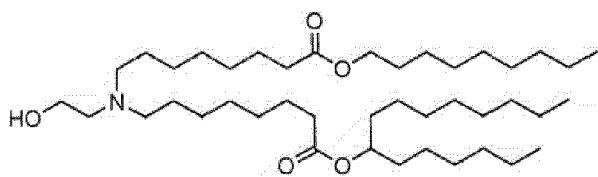


10

(Compus 530),

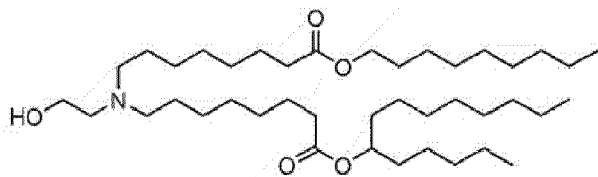


(Compus 531),

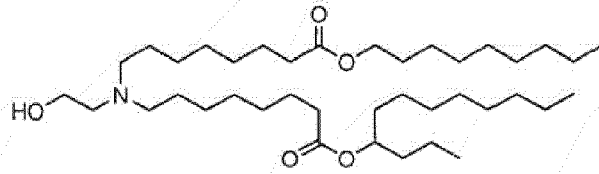


15

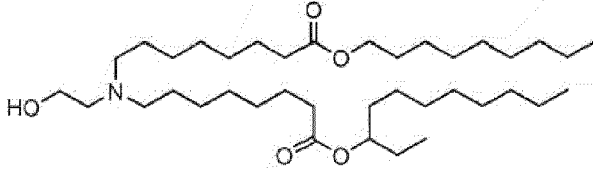
(Compus 532),



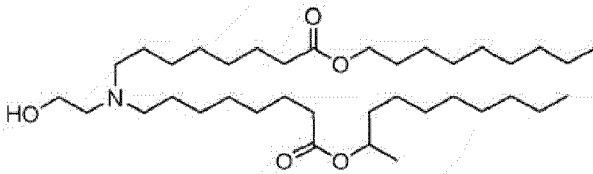
(Compus 533),



(Compus 534),

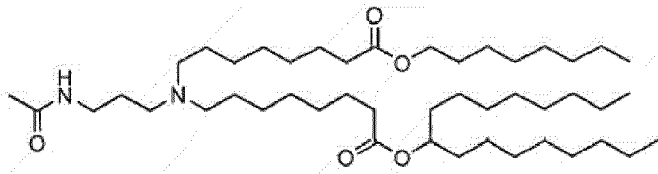


(Compus 535),

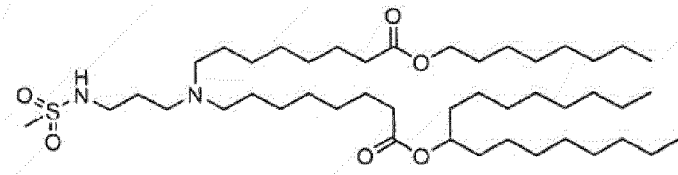


5

(Compus 536),

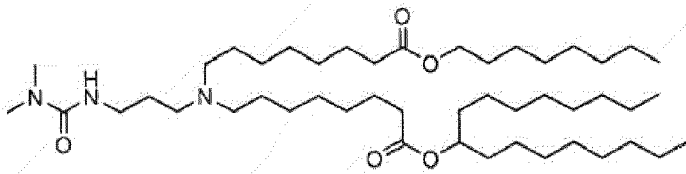


(Compus 537),

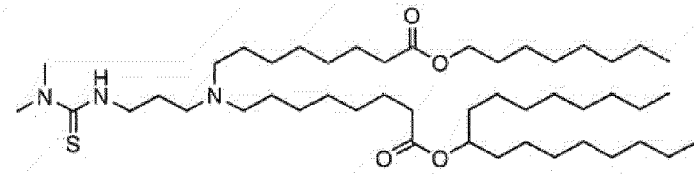


10

(Compus 538),

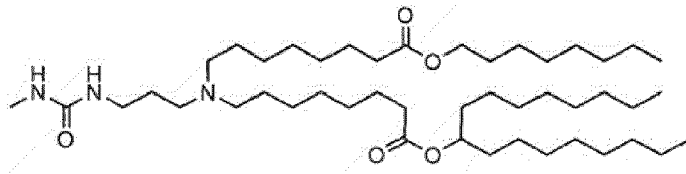


(Compus 539),

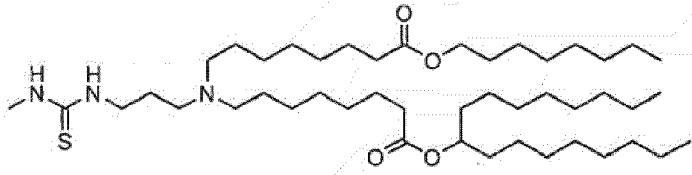


(Compus 540),

15

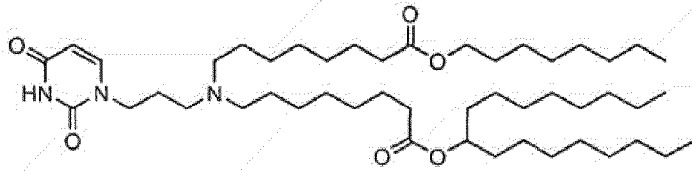


(Compus 541),

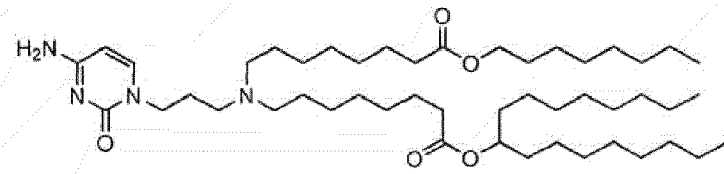


(Compus 542),

5

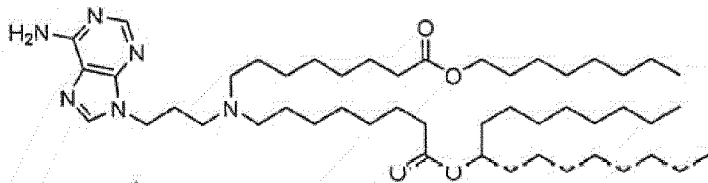


(Compus 543),

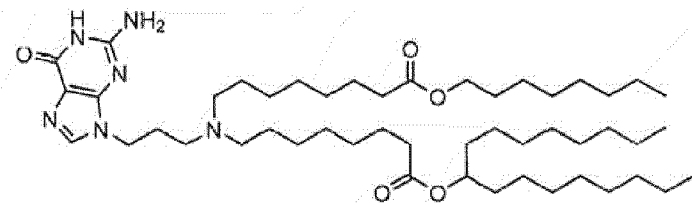


(Compus 544),

10

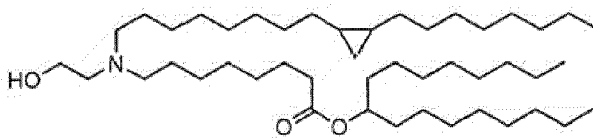


(Compus 545),

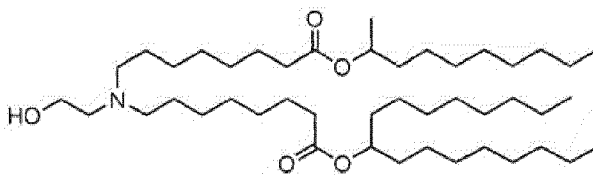


(Compus 546),

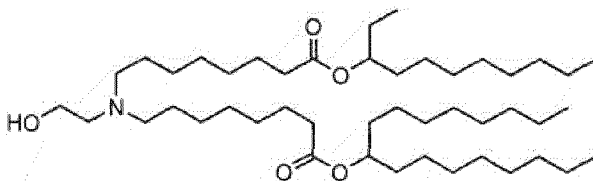
15



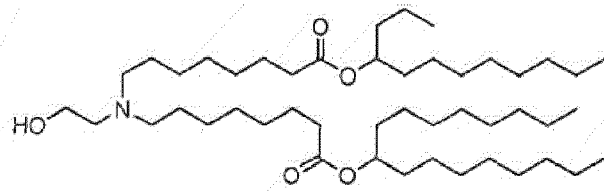
(Compus 547),



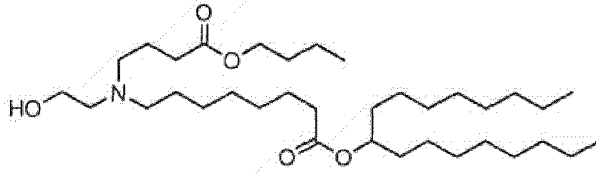
(Compus 548),



(Compus 549),

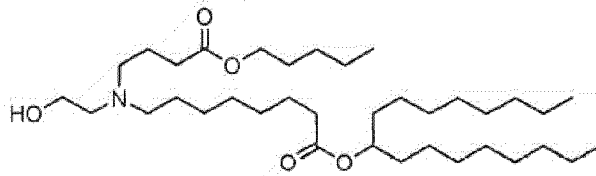


(Compus 550),

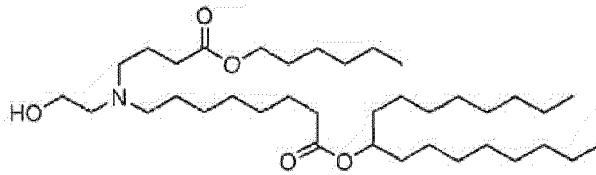


5

(Compus 551),

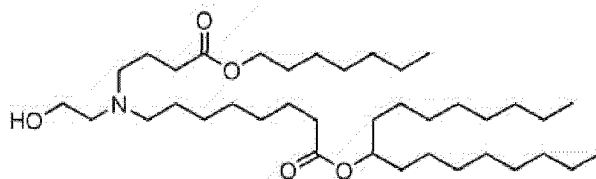


(Compus 552),

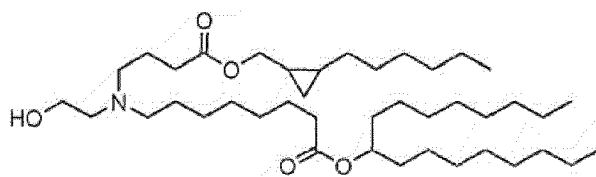


10

(Compus 553),

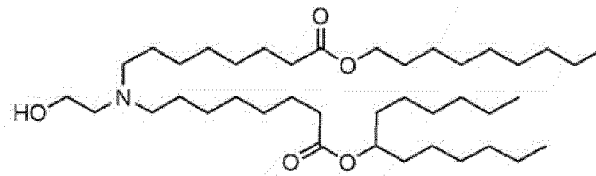


(Compus 554),

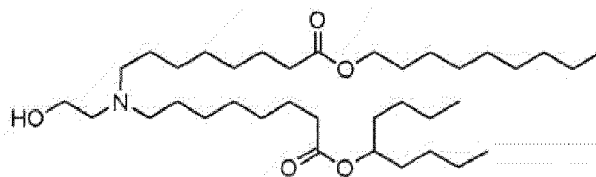


15

(Compus 555),

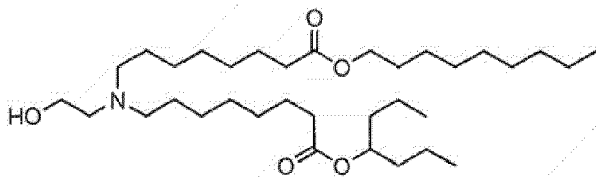


(Compus 556),

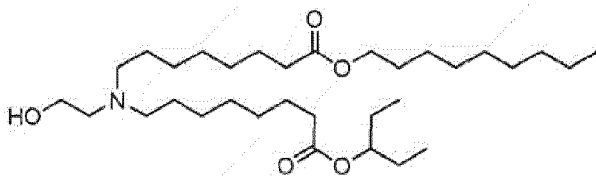


(Compus 557),



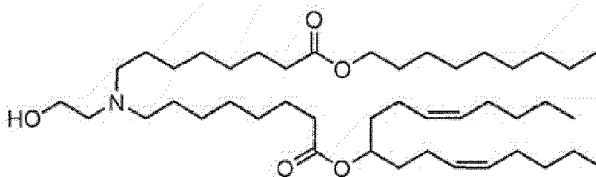


(Compus 558),

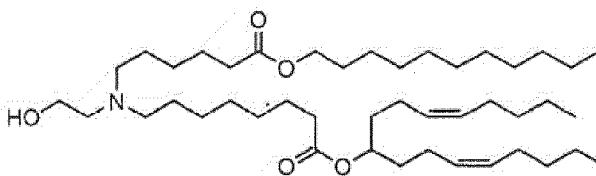


(Compus 559),

5



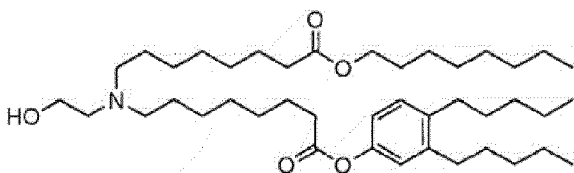
(Compus 560), și



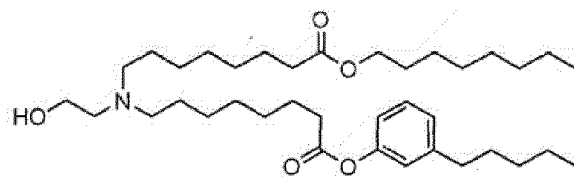
(Compus 561).

10

În variante de realizare suplimentare, compusul cu Formula (X) este selectat din grupul care constă din:

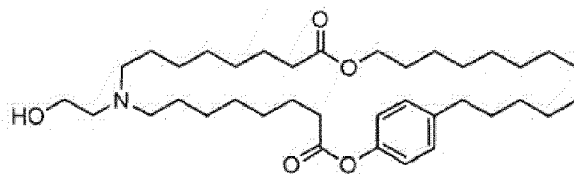


(Compus 562),



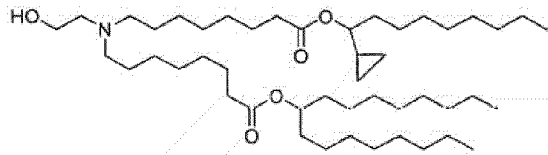
15

(Compus 563), și

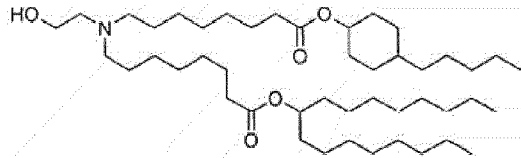


(Compus 564).

În unele variante de realizare, compusul cu Formula (X) este selectat din grupul care constă din:

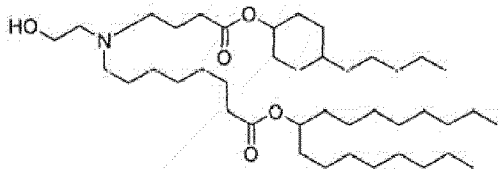


(Compus 565),

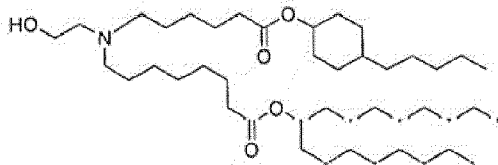


(Compus 566),

5

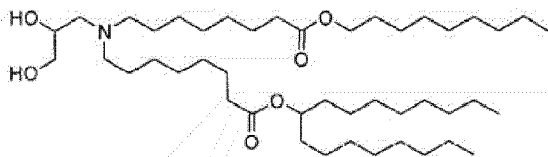


(Compus 567),

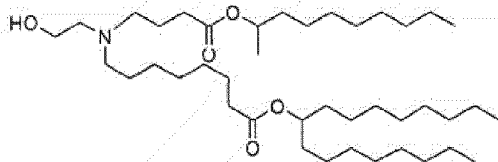


(Compus 568),

10

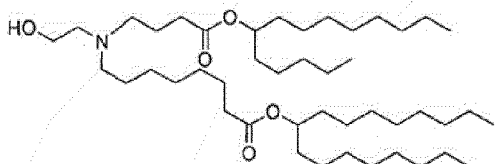


(Compus 569),

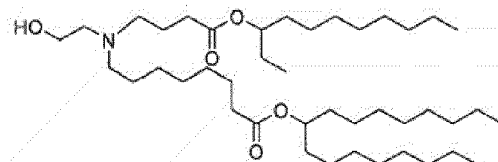


(Compus 570),

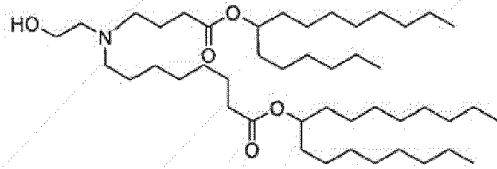
15



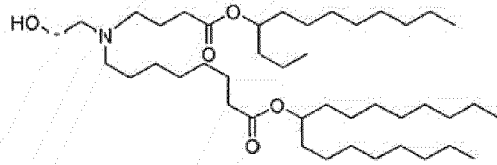
(Compus 571),



(Compus 572),

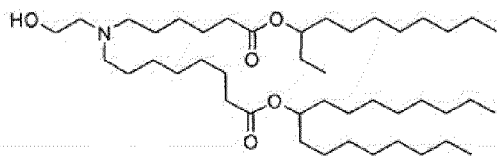


(Compus 573),

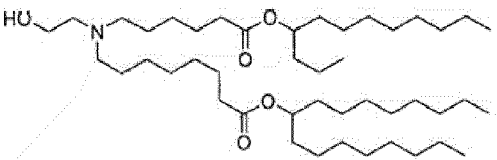


(Compus 574),

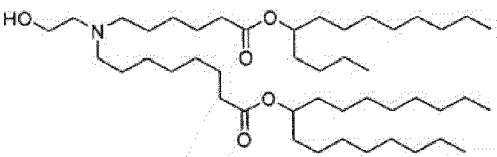
5



(Compus 755),

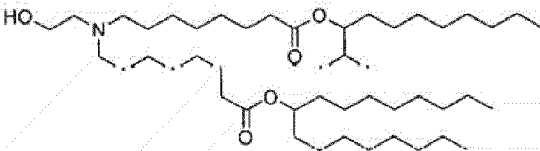


(Compus 576),

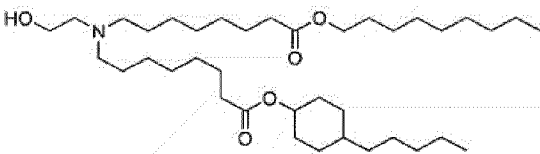


10

(Compus 577),

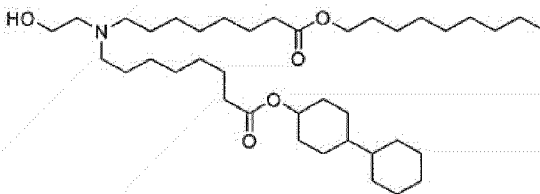


(Compus 578),

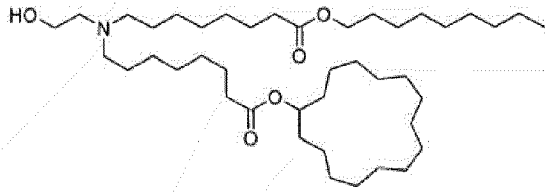


15

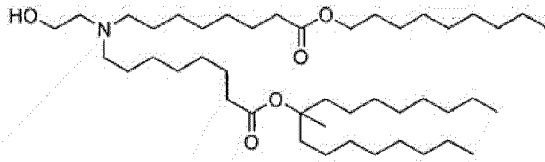
(Compus 579),



(Compus 580),

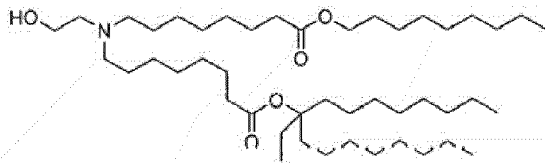


(Compus 581),

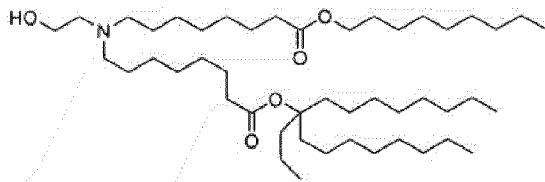


(Compus 582),

5

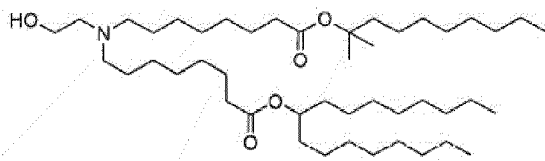


(Compus 583),

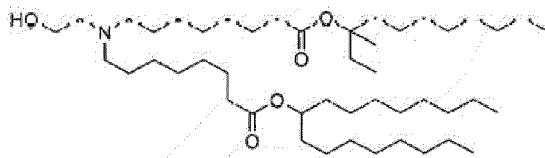


(Compus 584),

10

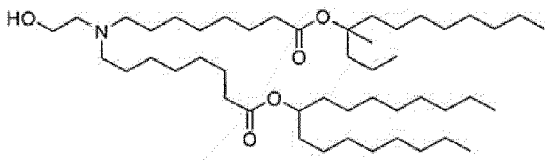


(Compus 585),

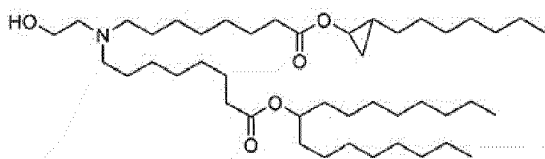


(Compus 586),

15

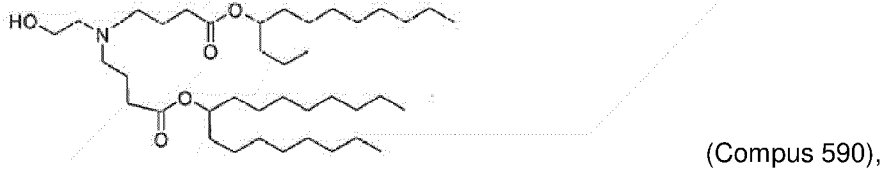
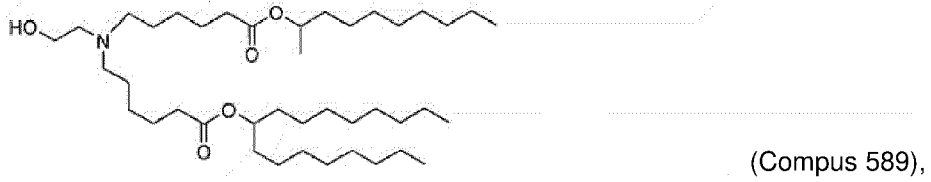


(Compus 587),

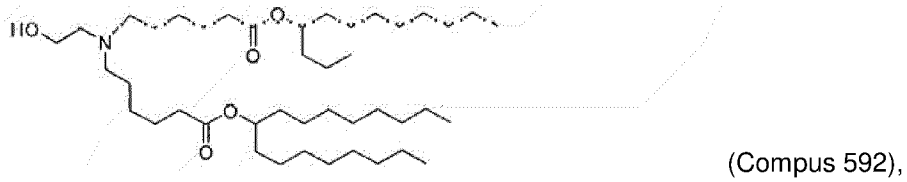
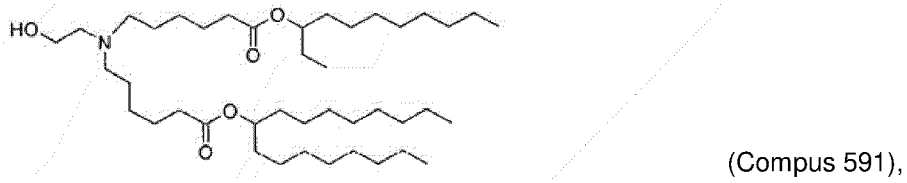


(Compus 588),

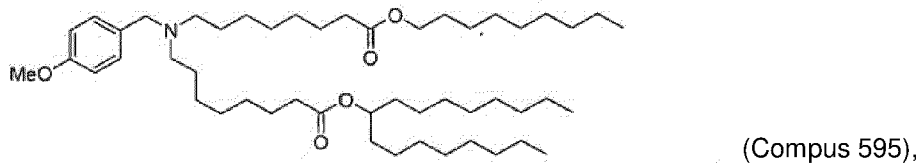
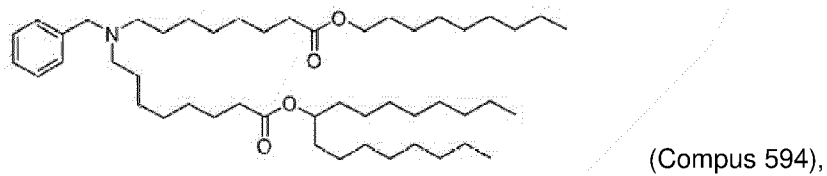
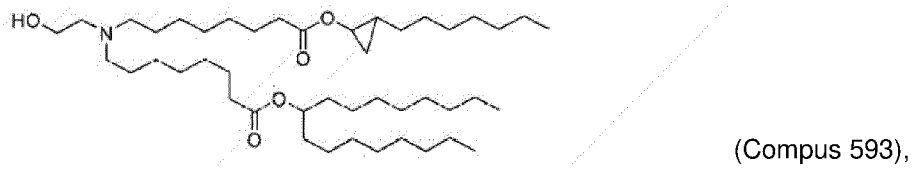
20



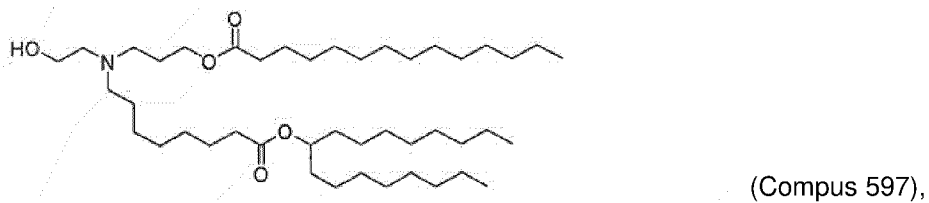
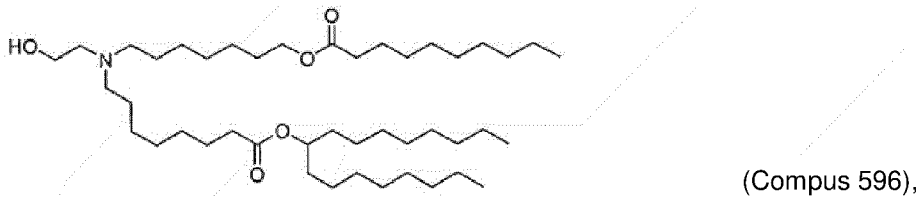
5

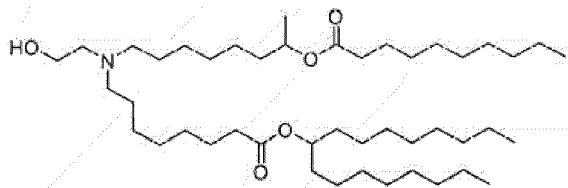


10

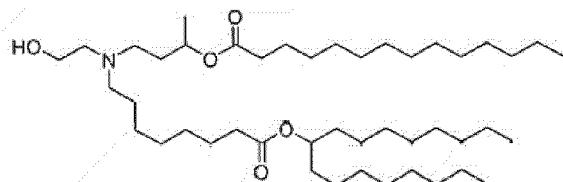


15



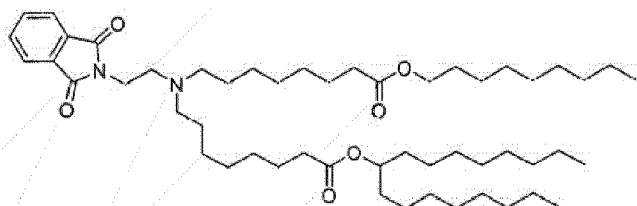


(Compus 598),

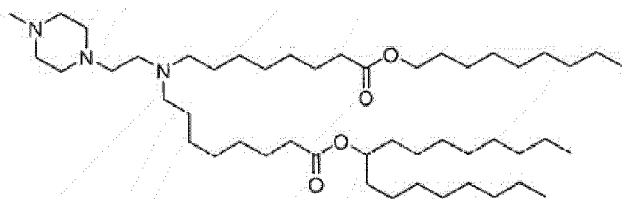


5

(Compus 599),

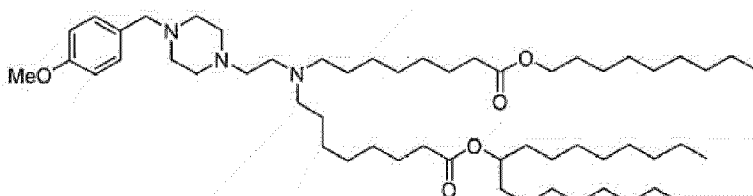


(Compus 600),

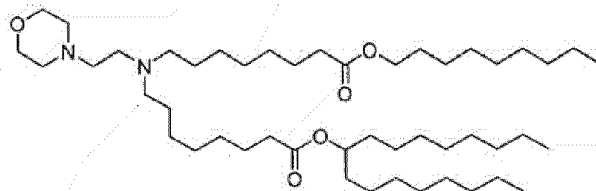


(Compus 601),

10

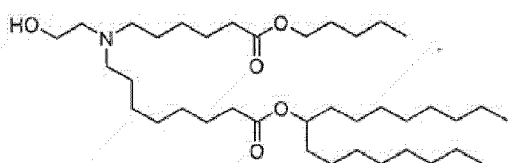


(Compus 602),

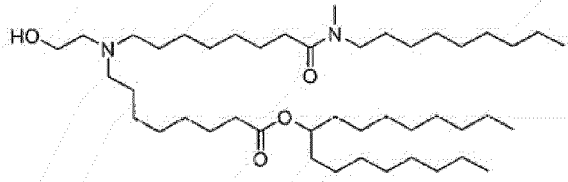


(Compus 603),

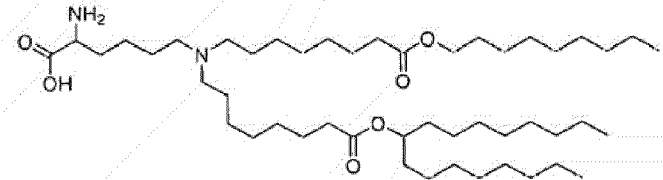
15



(Compus 604),

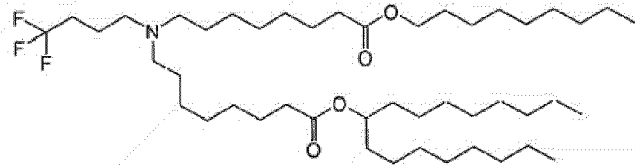


(Compus 605),

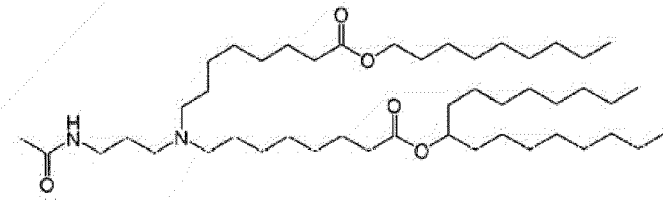


5

(Compus 606),

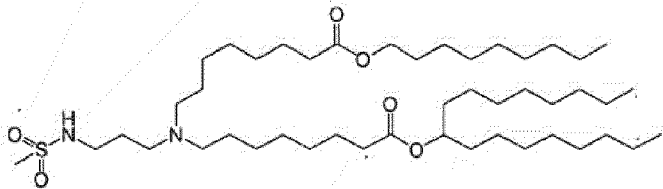


(Compus 607),

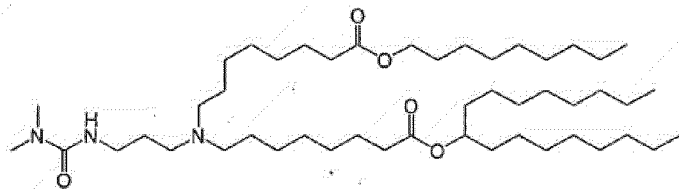


10

(Compus 608),

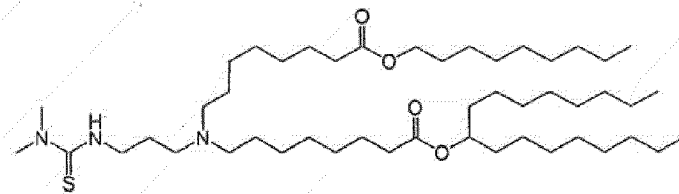


(Compus 609),

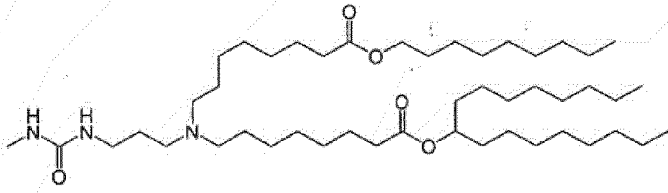


15

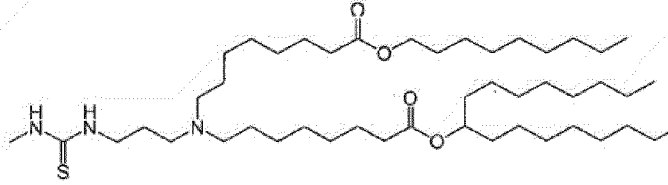
(Compus 610),



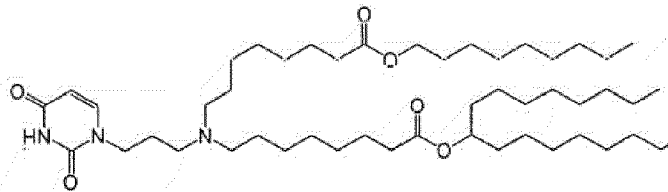
(Compus 611),



(Compus 612),

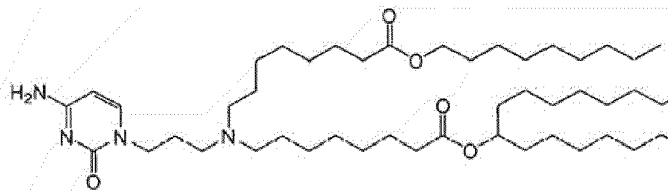


(Compus 613),

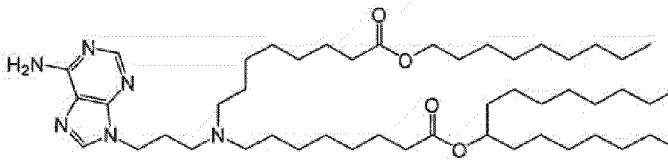


5

(Compus 614),

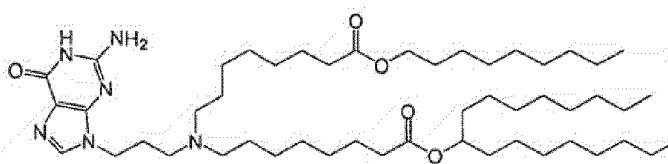


(Compus 615),

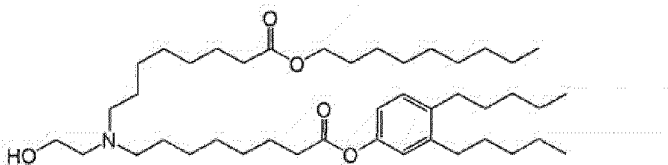


10

(Compus 616),

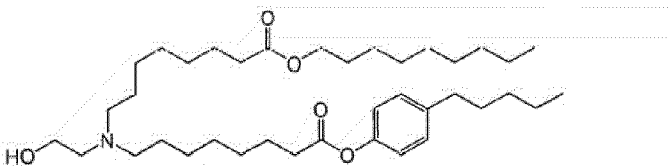


(Compus 617),



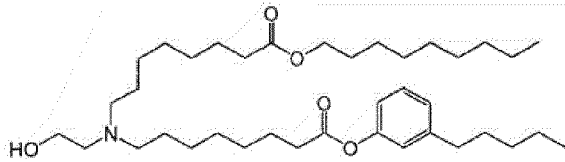
15

(Compus 618),

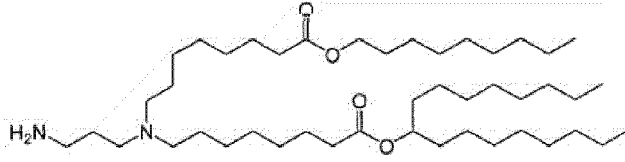


(Compus 619),



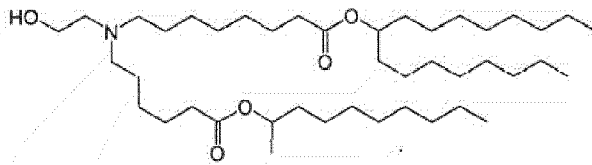


(Compus 620),

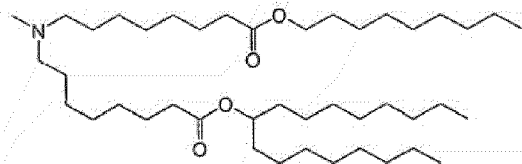


(Compus 621),

5

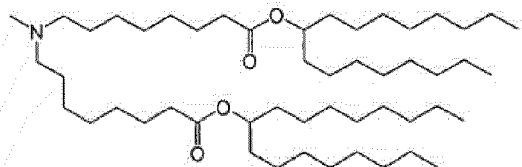


(Compus 622),

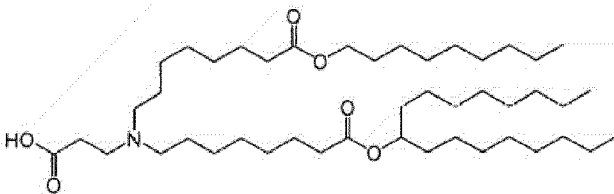


(Compus 623),

10

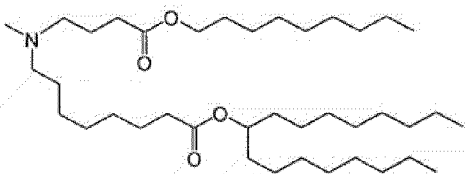


(Compus 624),

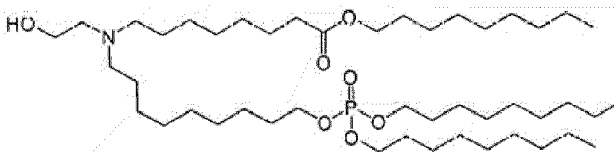


(Compus 625),

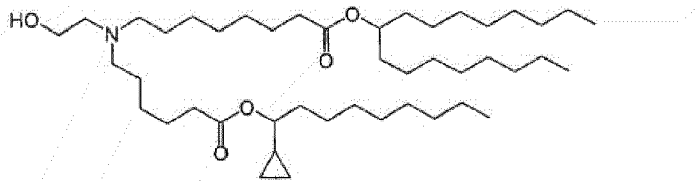
15



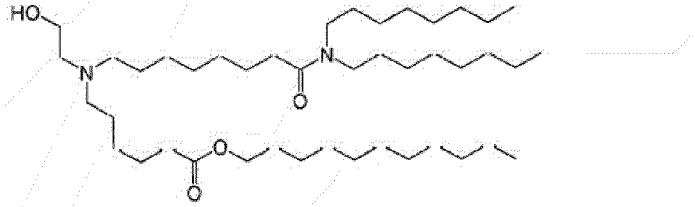
(Compus 626),



(Compus 627),

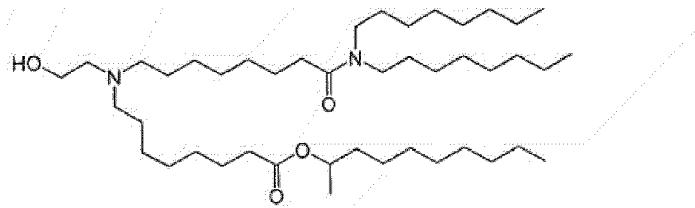


(Compus 628),

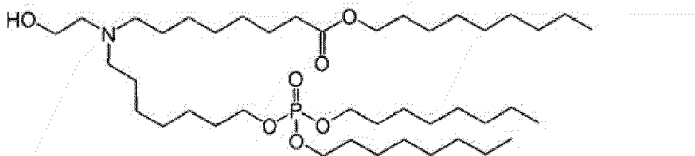


(Compus 629),

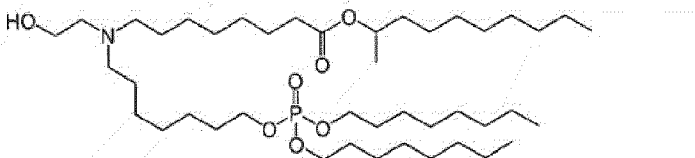
5



(Compus 630),

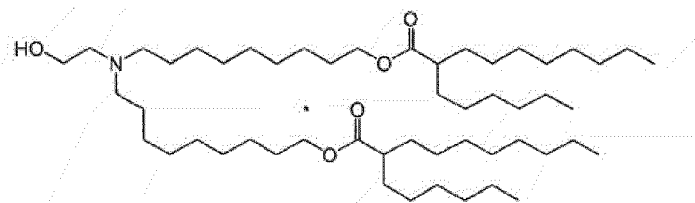


(Compus 631),

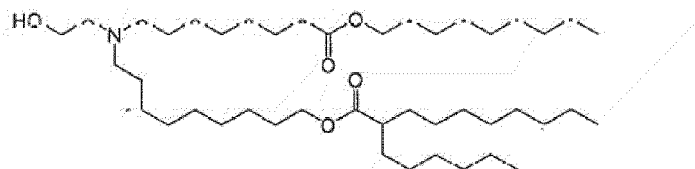


10

(Compus 632),

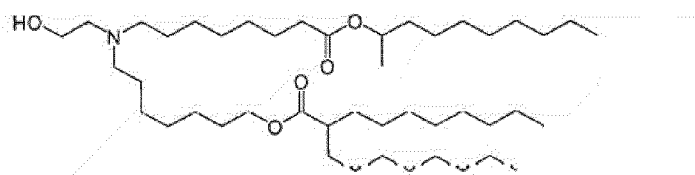


(Compus 633),

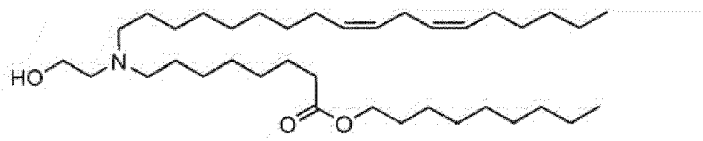


15

(Compus 634),

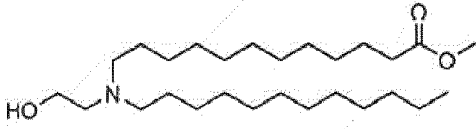


(Compus 635),

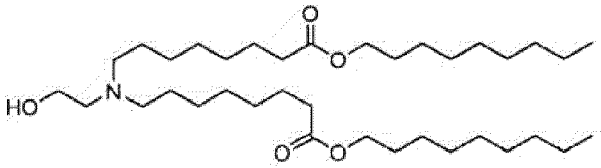


(Compus 636),

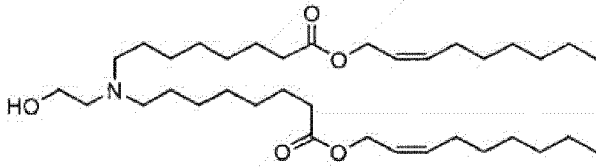
5



(Compus 637),

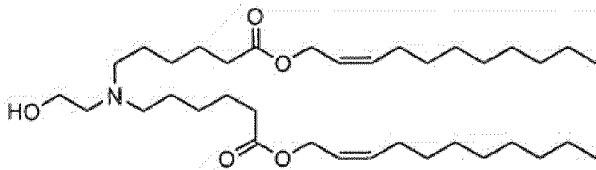


(Compus 638),

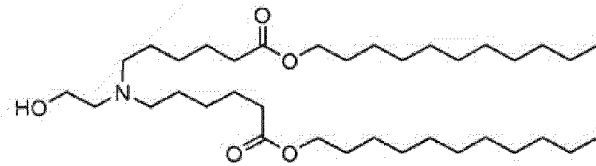


10

(Compus 639),

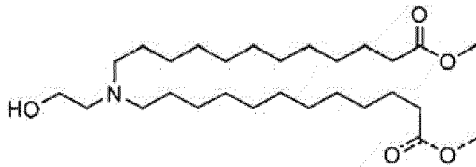


(Compus 640),

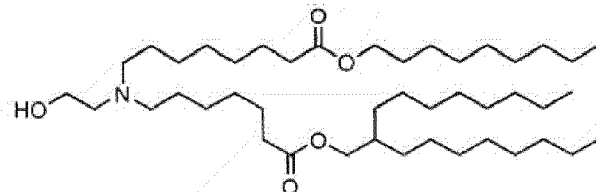


15

(Compus 641),

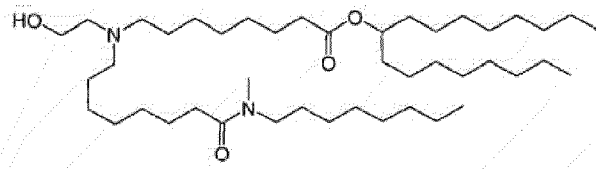
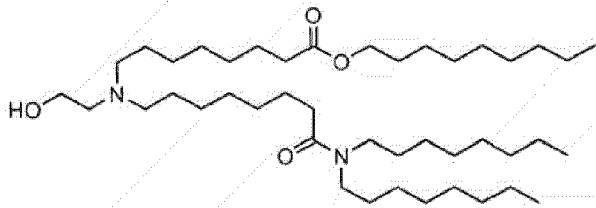


(Compus 642),

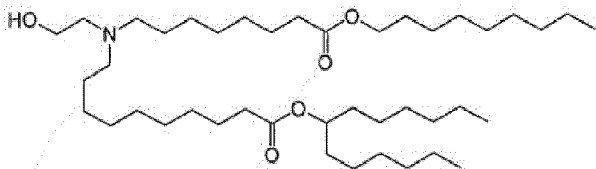
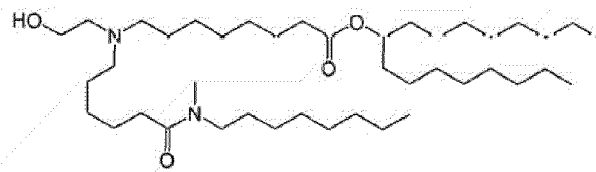


20

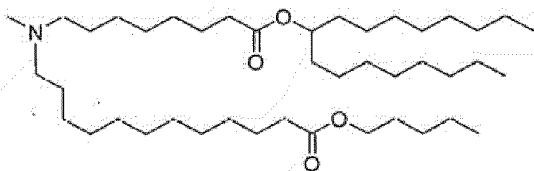
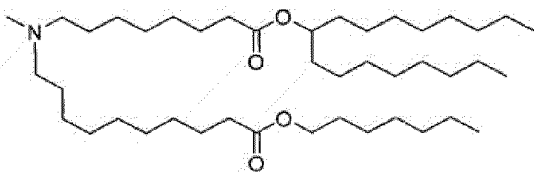
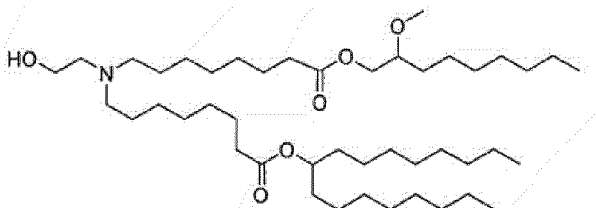
(Compus 643),



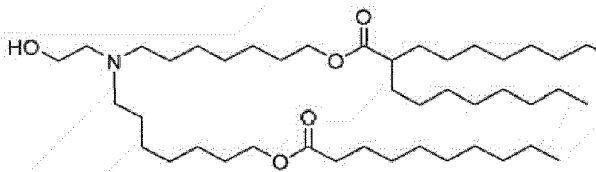
5

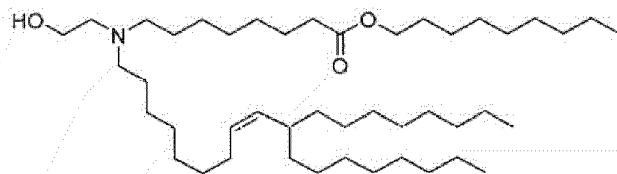


10

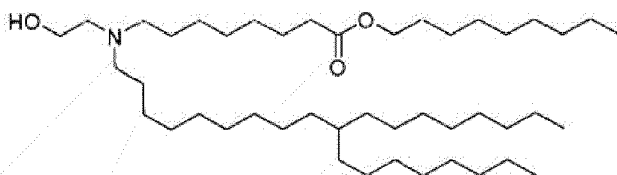


15



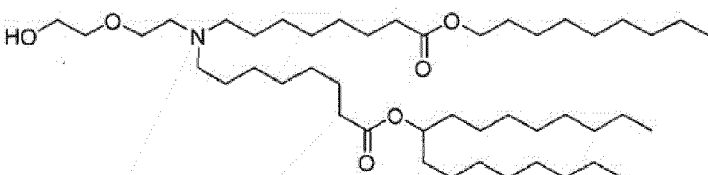


(Compus 652),

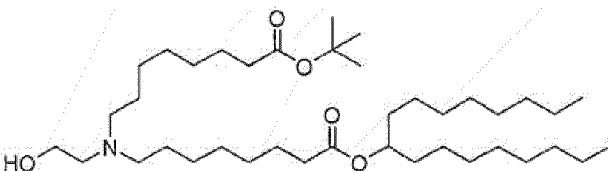


(Compus 653),

5

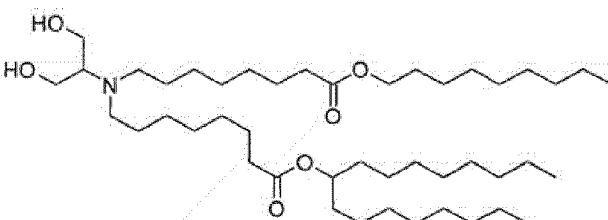


(Compus 654),

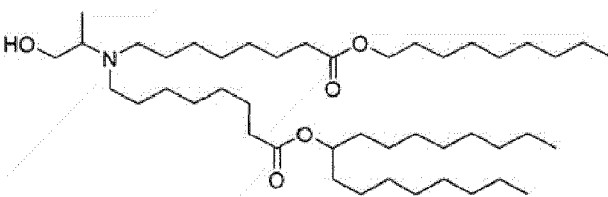


10

(Compus 655),

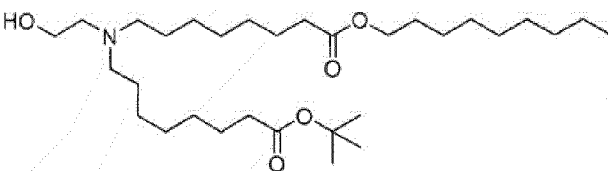


(Compus 656),

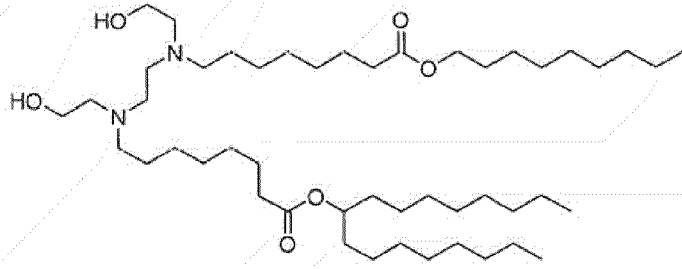


(Compus 657),

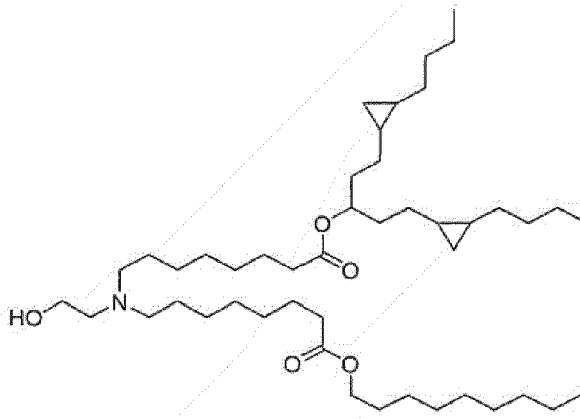
15



(Compus 658),

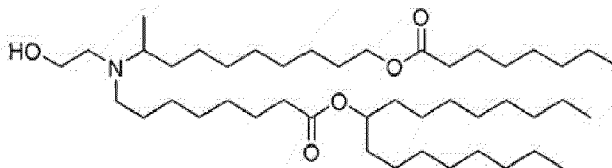


(Compus 659),

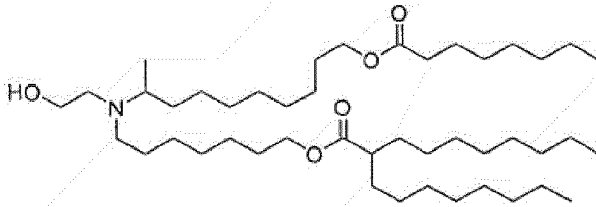


(Compus 660),

5

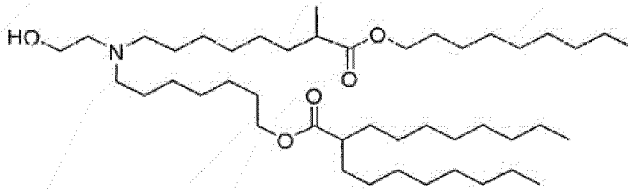


(Compus 661),

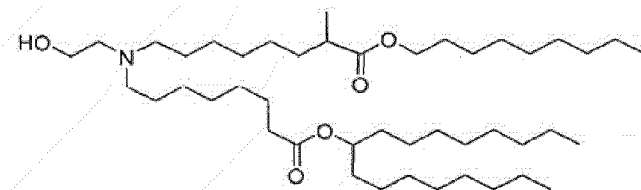


(Compus 662),

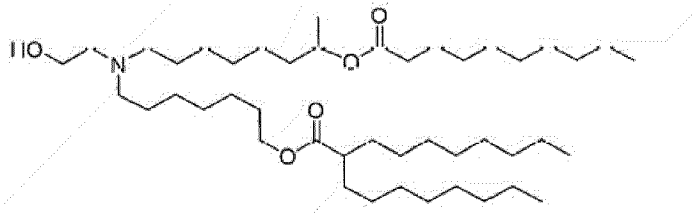
10



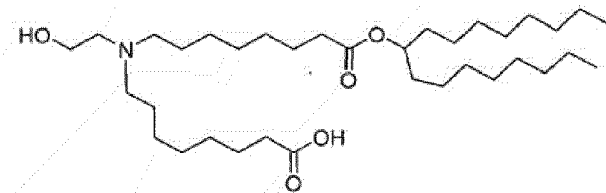
(Compus 663),



(Compus 664),

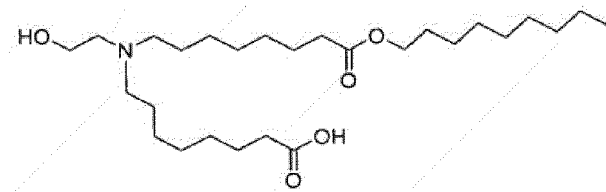


(Compus 665),

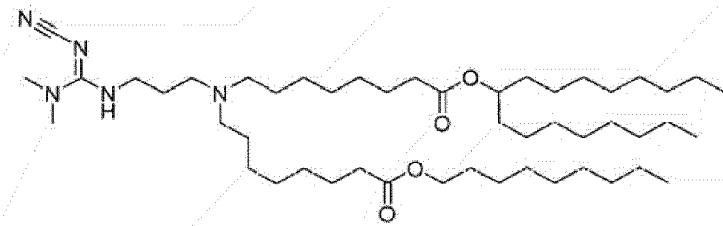


5

(Compus 666),

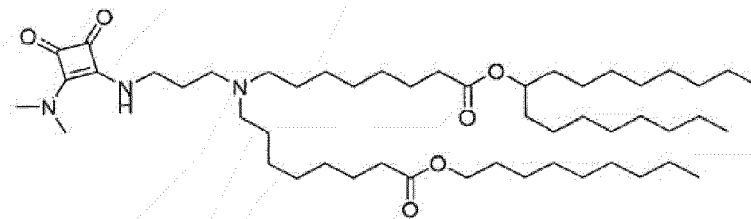


(Compus 667),

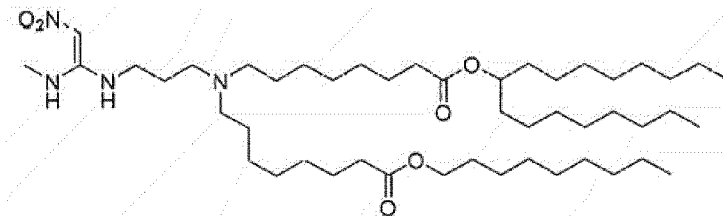


10

(Compus 668),

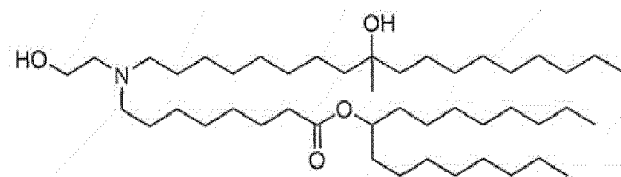


(Compus 669),

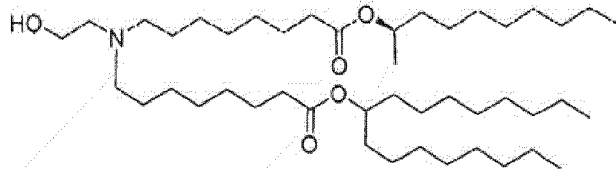


15

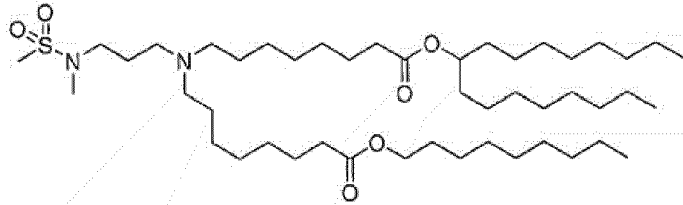
(Compus 670),



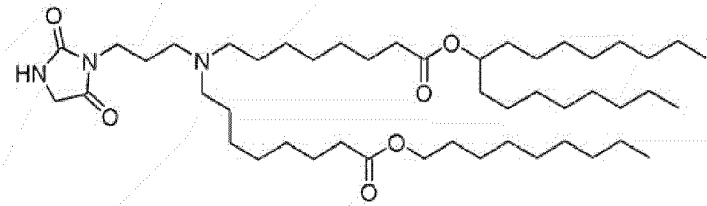
(Compus 671),



(Compus 672),

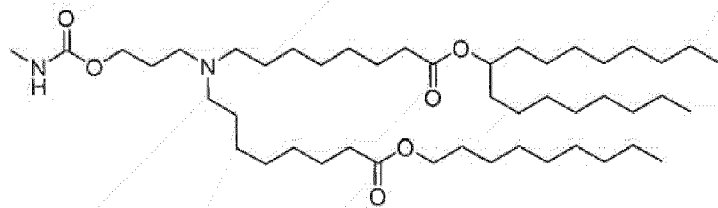


(Compus 673),

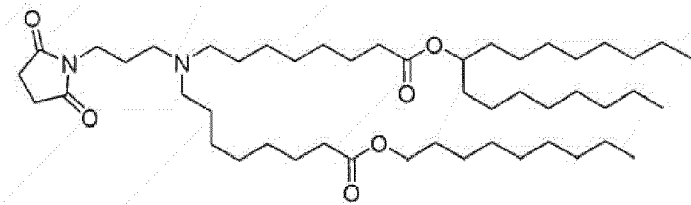


5

(Compus 674),

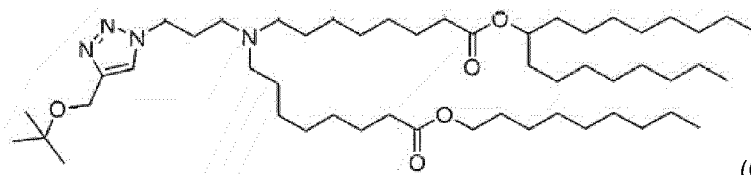


(Compus 675),

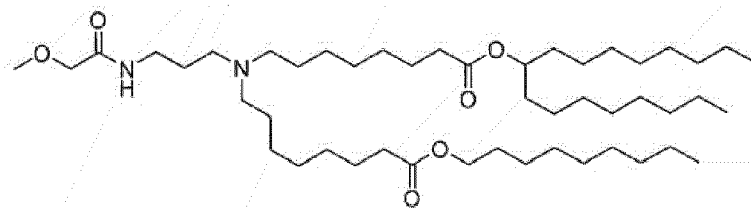


10

(Compus 676),



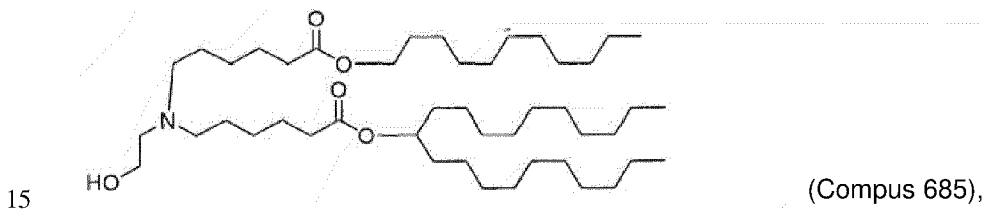
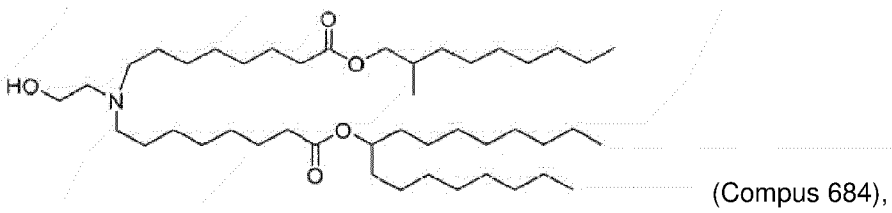
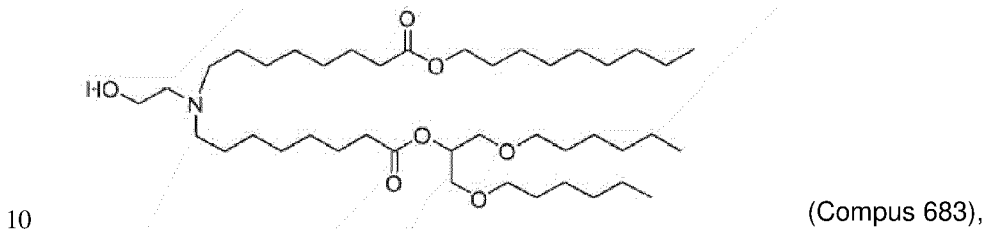
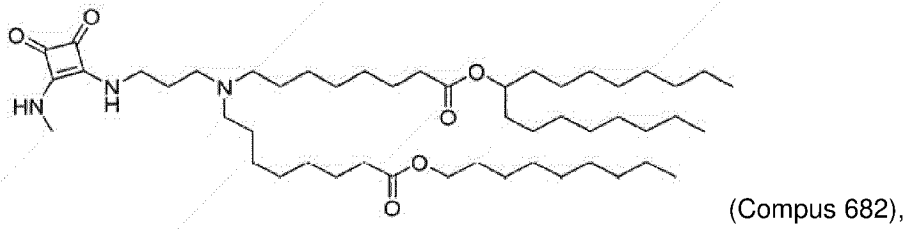
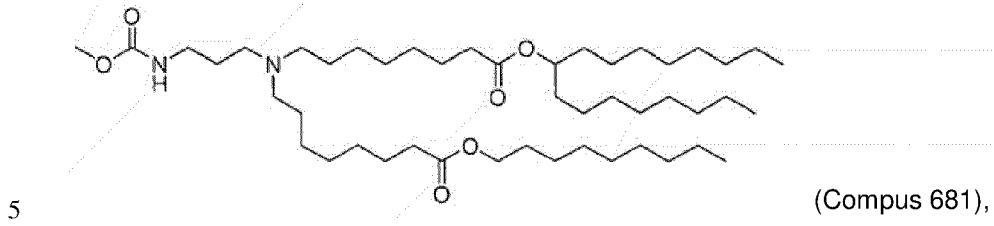
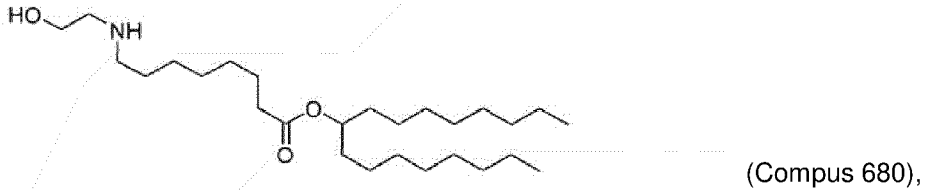
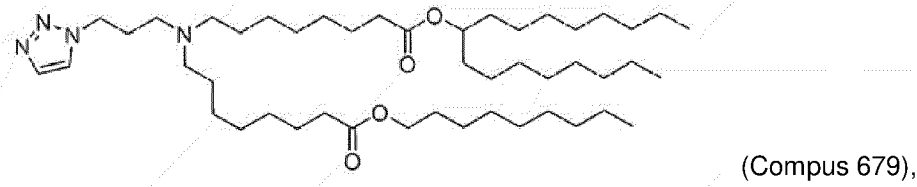
(Compus 677),

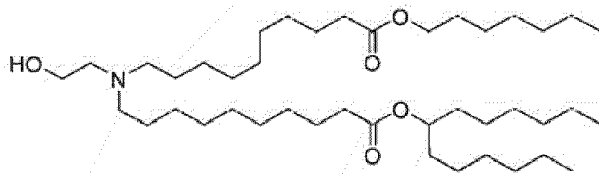


15

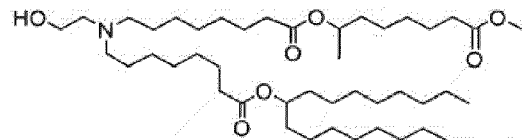
(Compus 678),





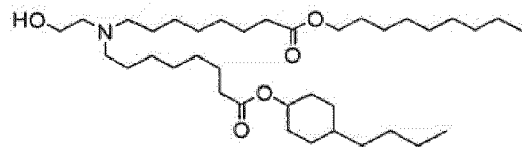


(Compus 686),

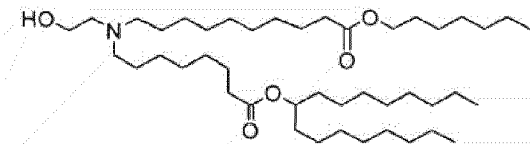


5

(Compus 687),

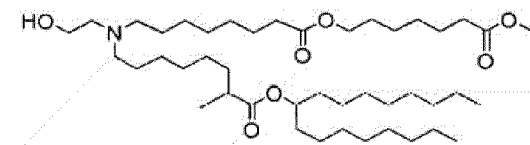


(Compus 688),

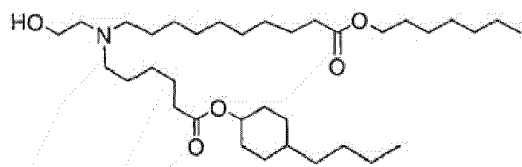


10

(Compus 689),

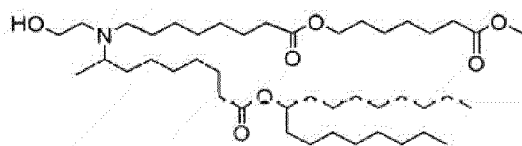


(Compus 690),

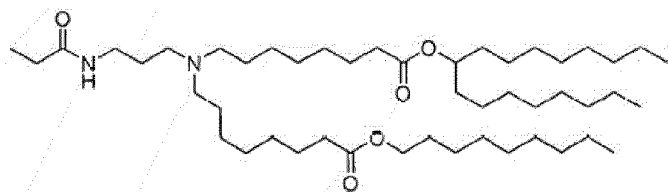


15

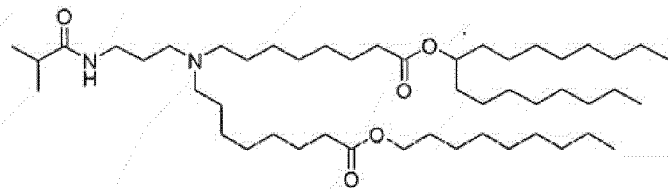
(Compus 691),



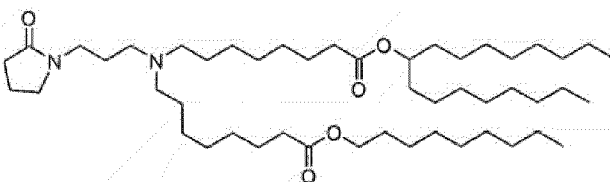
(Compus 692),



(Compus 693),

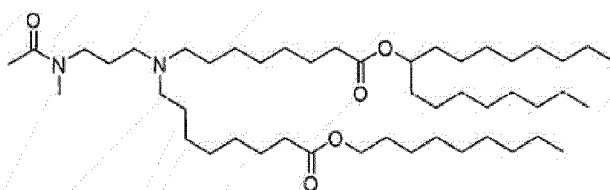


(Compus 694),

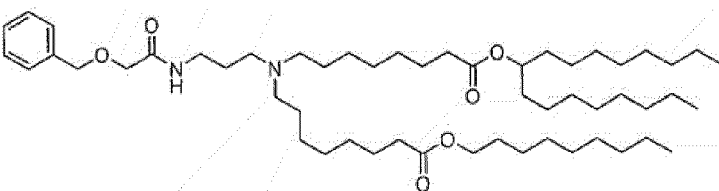


5

(Compus 695),

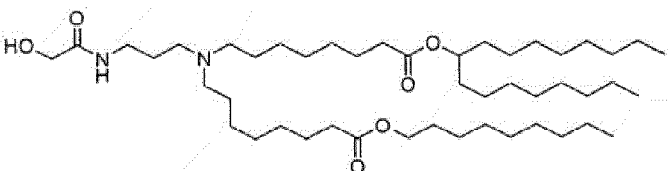


(Compus 696),

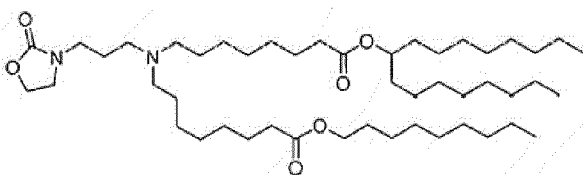


10

(Compus 697),

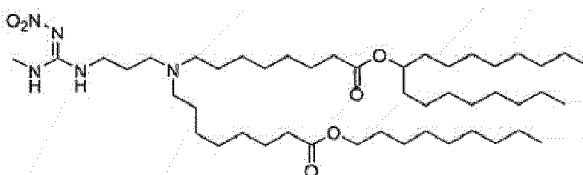


(Compus 698),

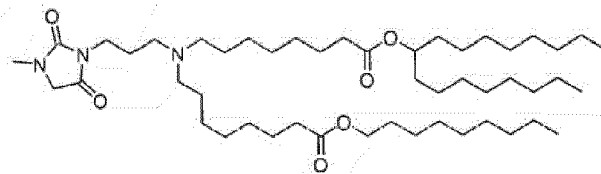


15

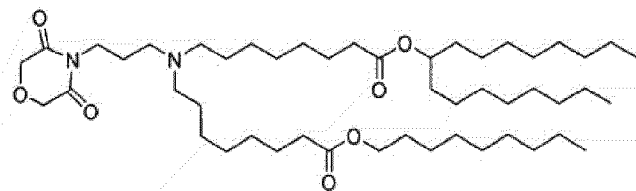
(Compus 699),



(Compus 700),

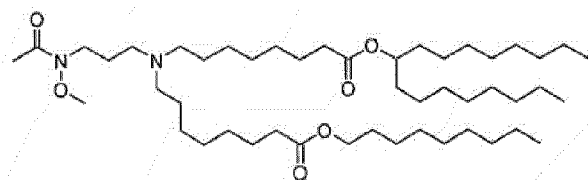


(Compus 701),

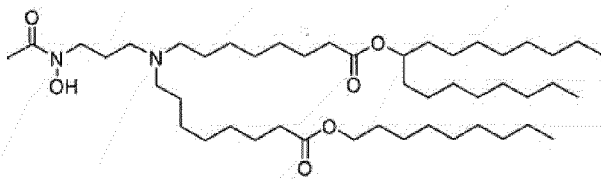


5

(Compus 702),

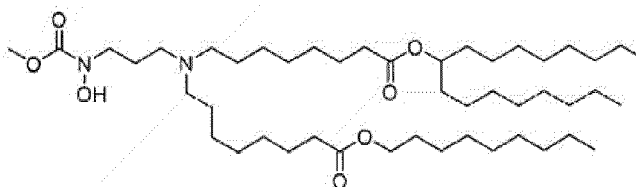


(Compus 703),

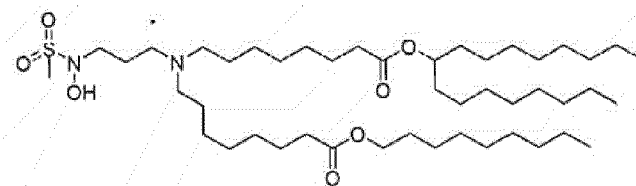


10

(Compus 704),

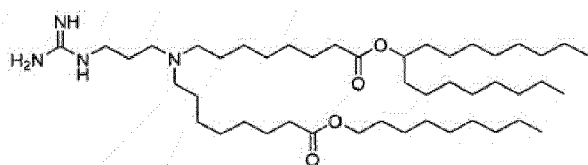


(Compus 705),

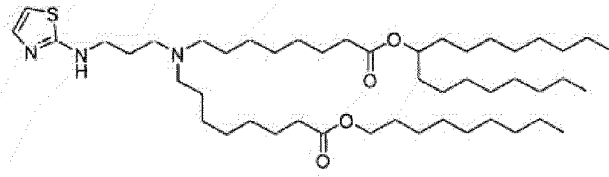


15

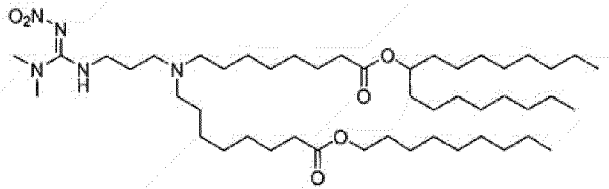
(Compus 706),



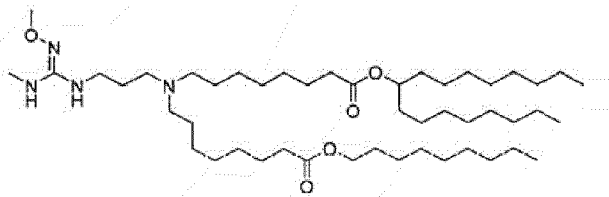
(Compus 707),



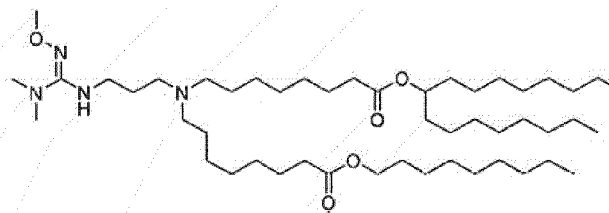
(Compus 708),



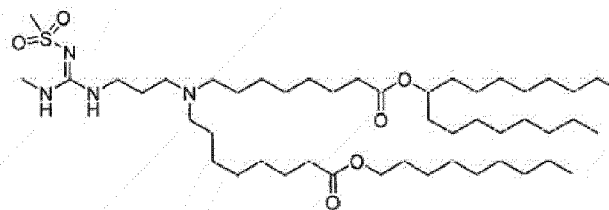
(Compus 709),



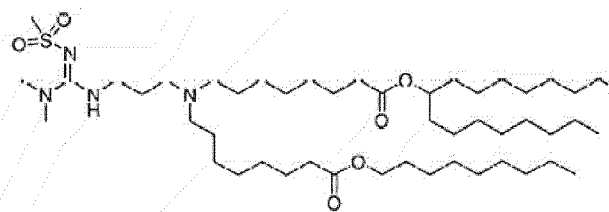
(Compus 710),



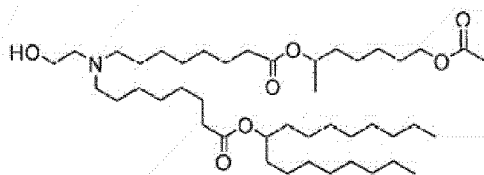
(Compus 711),



(Compus 712),



(Compus 713),

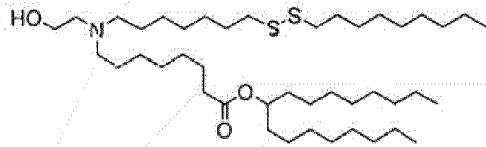


(Compus 714),

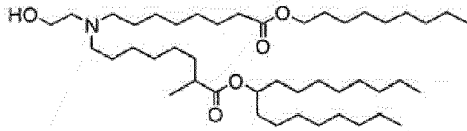
5

10

15

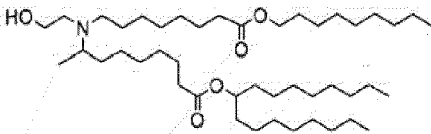


(Compus 715),

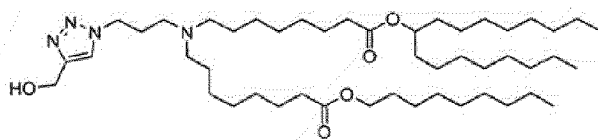


(Compus 716),

5

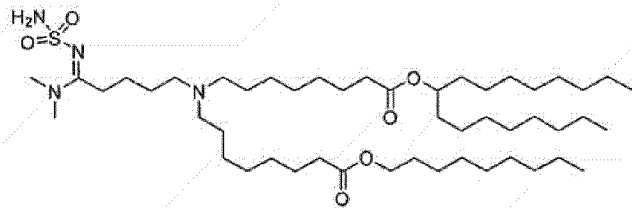


(Compus 717),

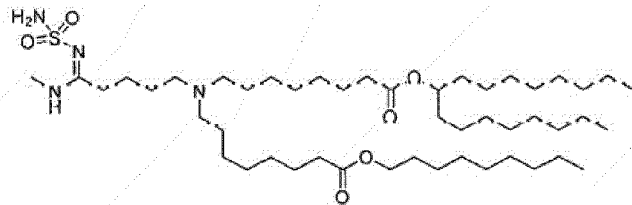


(Compus 718),

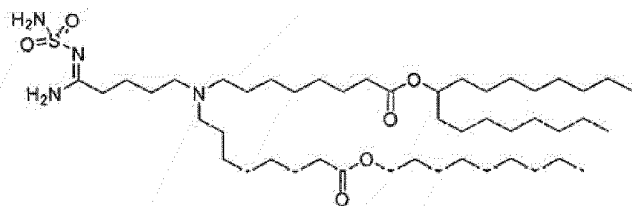
10



(Compus 719),

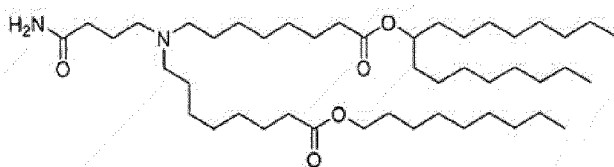


(Compus 720),

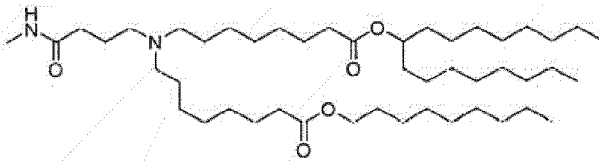


15

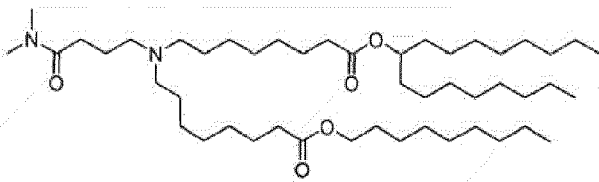
(Compus 721),



(Compus 722),

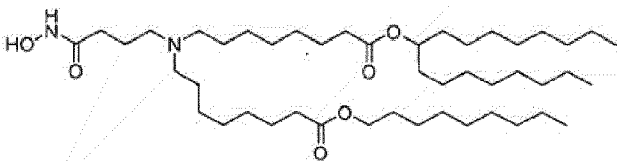


(Compus 723),

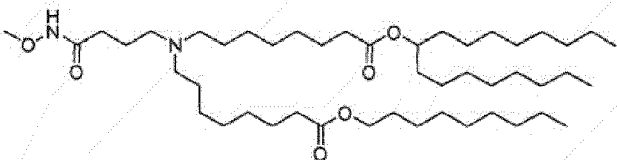


(Compus 724),

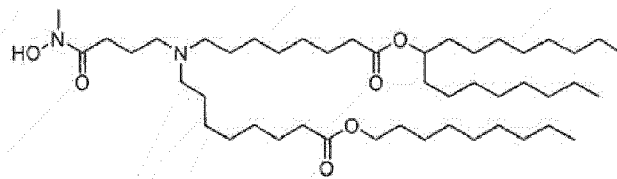
5



(Compus 725),

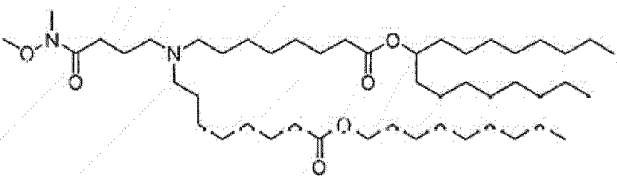


(Compus 726),

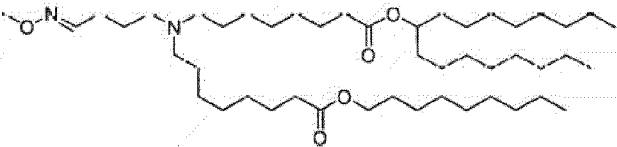


10

(Compus 727),

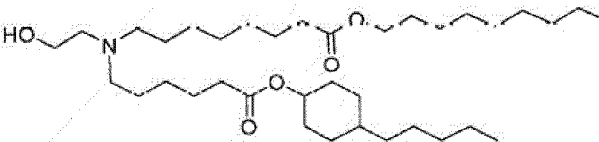


(Compus 728),



15

(Compus 729),

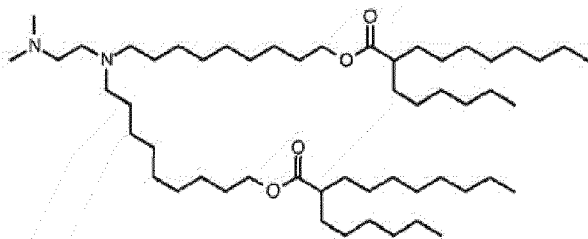


(Compus 730), și săruri și

izomeri ai acestora,

20

În unele variante de realizare, o nanoparticulă cuprinde următorul compus:



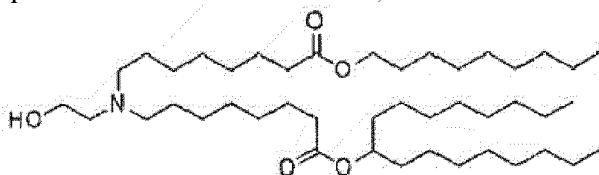
(Compus 731) sau săruri

și izomeri ai acestuia.

- 5 În unele variante de realizare, dezvăluirea prezintă o compoziție de nanoparticulă care include o componentă lipidică care cuprinde un compus așa cum este descris aici (*de exemplu*, un compus conform cu Formula (X), (XA), (XI), (XIa), (XIb), (XIc), (XIId) sau (XIe)).

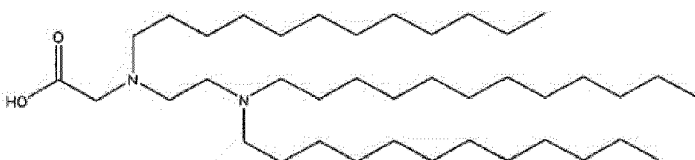
**Lipide necationice, incluzând lipide necationice helper**

- 10 Componenta lipidică a nanoparticulei poate include orice lipidă neutră și/sau necationică (*de exemplu*, lipide care sunt lipide neutre sau necationice la pH fiziologic). Lipidele necationice pot include, dar nu se limitează la, acizi grași, glicerolipide și lipide prenil. În anumite variante de realizare, lipida necationică este un acid gras. acidul gras poate fi saturat sau nesaturat. Exemple de acizi grași nesaturați
- 15 includ, dar nu se limitează la, acid miristoleic, acid palmitoleic acid sapienic, acid oleic, acid elaidic, acid vaccenic, acid linoleic, acid linoelaidic, acid alfa-linoelaidic acid arachidonic, acid eicosapentaenoic, acid erucic, acid docosahexanoic, sau oricare izomeri cis/trans de legătură dublă ai acestora. În anumite variante de realizare, lipida este acidul oleic. În anumite variante de realizare, lipida este un izomer de acid oleic (*de exemplu*, legătura dublă este într-o locație diferită de-a lungul lanțului alifatic față de acidul oleic). În anumite variante de realizare, lipida este un analog de acid oleic (*de exemplu*, lanțul alifatic este
- 20 cu 1-10 atomi de carbon mai lung sau cu 1-10 atomi de carbon mai scurt decât lanțul alifatic al acidului oleic). Exemplele de acizi grași saturați includ, dar nu sunt limitate la, acid caprilic, acid capric, acid lauric, acid miristic, acid palmitic, acid stearic, acid arachidic, acid behenic, acid lignoceric, și acid cerotic. În anumite variante de realizare, lipida necationică este un derivat de glicină al unui acid gras (*de exemplu*, *N*-palitoilglicină sau *N*-oleoglicină) În anumite variante de realizare, lipida necationică este o glicerolipidă (*de exemplu*, monogliceridă, digliceridă, trigliceridă). În anumite variante de realizare, lipida necationică este o monogliceridă. În anumite variante de realizare, lipida necationică este o digliceridă. În anumite variante de realizare, lipida necationică este o trigliceridă. În anumite variante de realizare, lipida necationică cuprinde un fragment de zahăr (*de exemplu*, zaharidă, dizaharidă, polizaharidă). Exemple de
- 25 lipide necationice includ, dar nu sunt limitate la, următoarele:



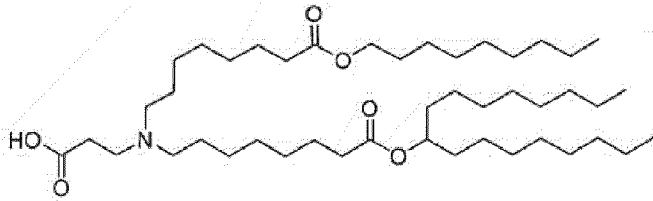
(Compus 18),

30

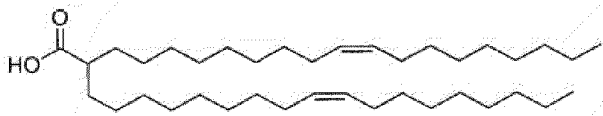
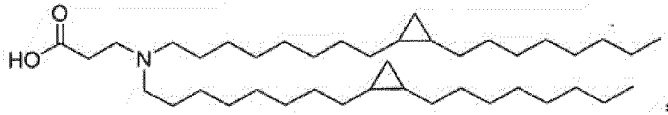


(Compus 393),

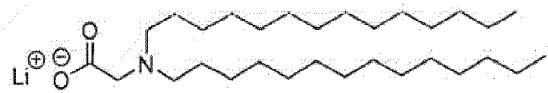
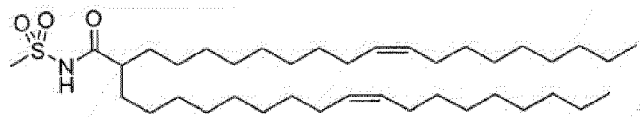




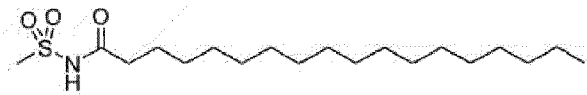
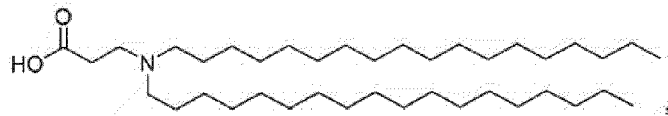
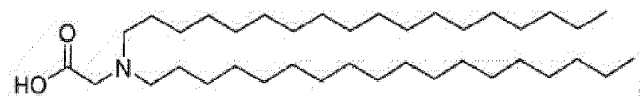
(Compus 125),



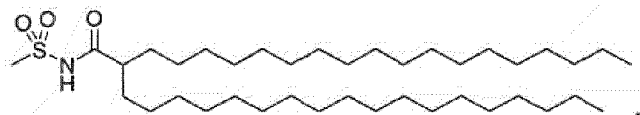
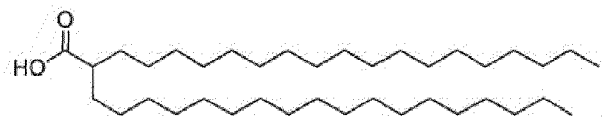
5



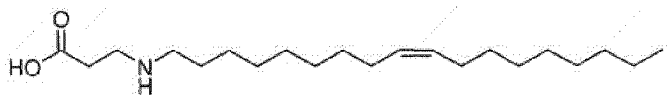
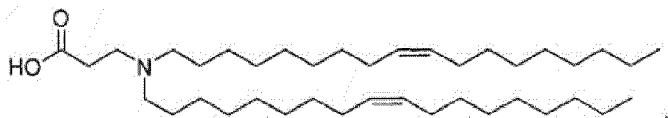
10

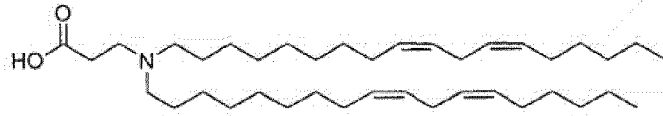


15

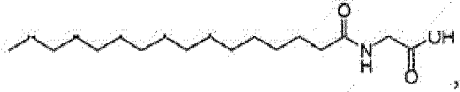
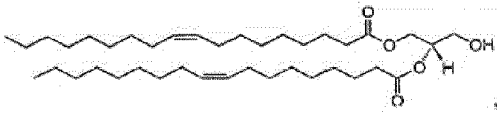


20

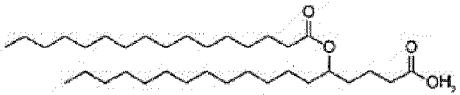




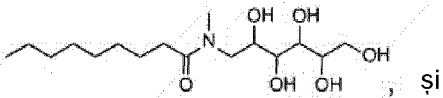
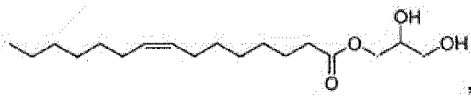
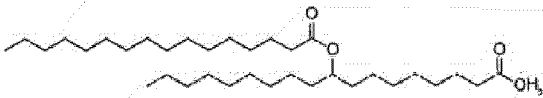
5



10



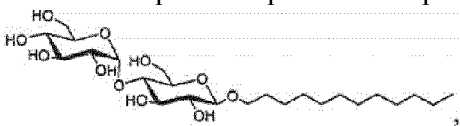
15



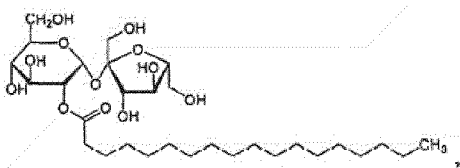
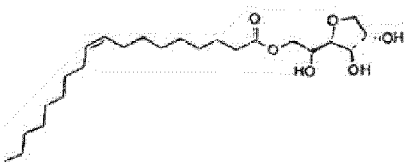
20

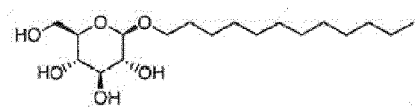


Exemple de lipide care cuprind zaharuri includ, dar nu se limitează la următoarele:

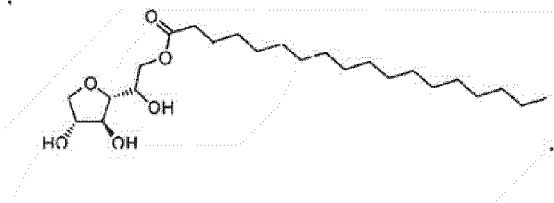


25





și

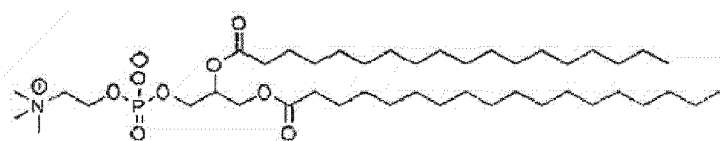
**Lipide necationice zwitterionice**

5

În anumite variante de realizare, lipidele necationice utile în prezenta invenție sunt analogi DSPC în care fragmentul de fosfocolină este înlocuit cu o grupare zwitterionică diferită.

DSPC are următoarea structură:

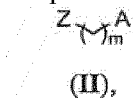
10



Înlocuirea cu o grupare zwitterionică diferită este reprezentată în FIG. 73.

15

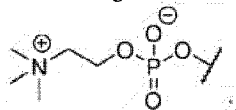
În anumite variante de realizare, gruparea zwitterionică diferită nu este o grupare de fosfocolină. În anumite variante de realizare, o lipidă necationică utilă în prezenta invenție este un compus cu Formula (II). Sunt redați aici compuși cu Formula (II):



sau săruri ale acestora, în care:

20

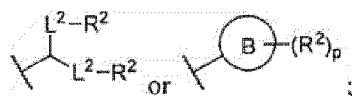
Z este un fragment zwitterionic, în care fragmentul zwitterionic nu are formula:



m este 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10;

25

A are formula :



sau

30

fiecare caz de  $L^2$  este independent o legătură sau alchilen  $C_{1-6}$  opțional substituit, în care o unitate de metilen a alchilenului  $C_{1-6}$  opțional substituit este opțional înlocuită cu  $-O-$ ,  $-N(R^N)-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ , sau  $-NR^N C(O)N(R^N)-$ ;

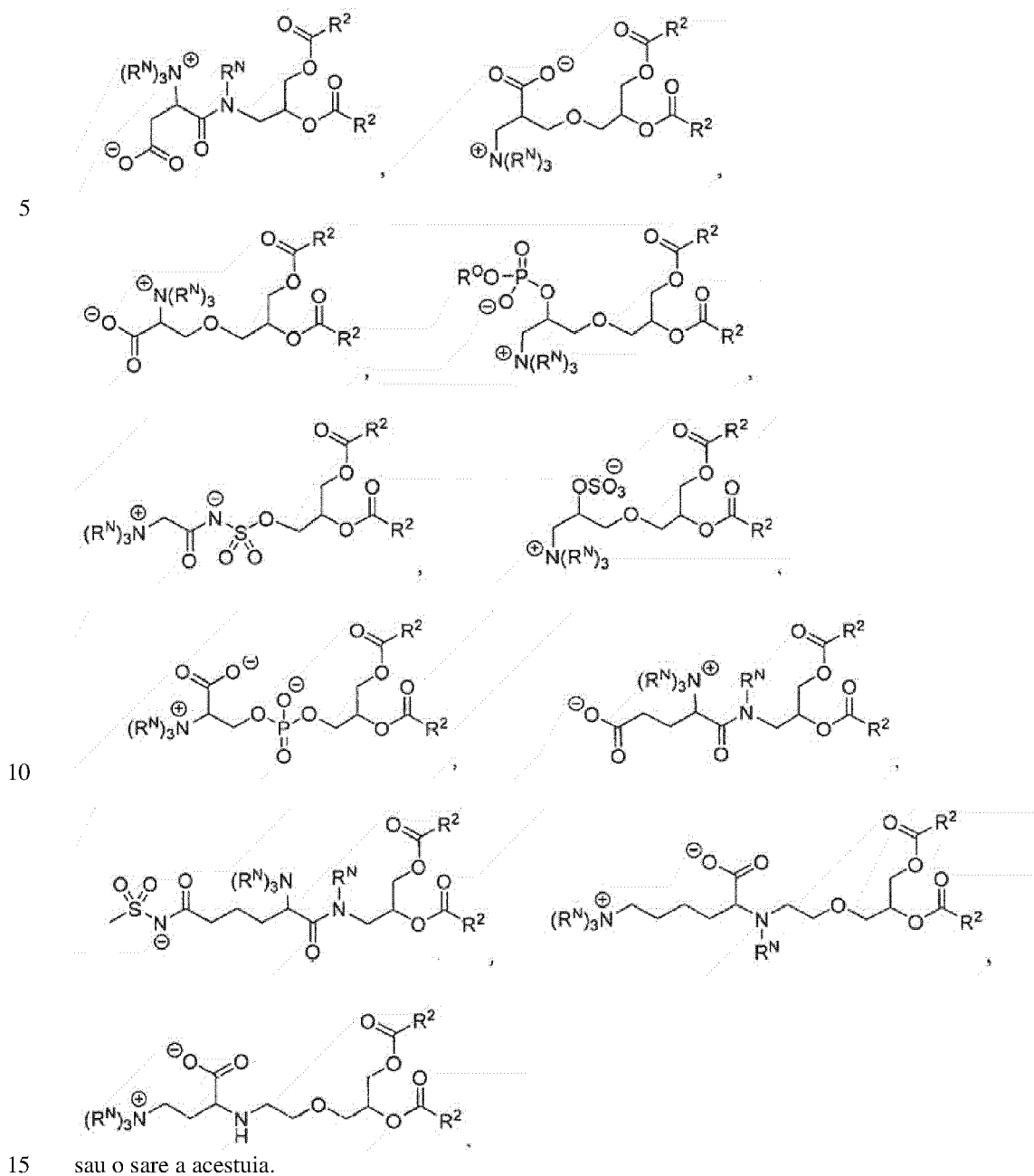
35

fiecare caz de  $R_2$  este independent alchil  $C_{1-30}$  opțional substituit, alchenil  $C_{1-30}$  opțional substituit, sau alchil  $C_{1-30}$  opțional substituit; în care opțional una sau mai multe unități de metilen ale lui  $R_2$  sunt înlocuite independent cu carbociclicilen opțional substituit, heterociclicilen opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  $-N(R^N)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(=NR^N)-$ ,  $-C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(S)-$ ,  $-NR^N C(S)N(R^N)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-OS(O)-$ ,  $-S(O)O-$ ,  $-OS(O)O-$ ,  $-OS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2O-$ ,  $-OS(O)_2O-$ ,  $-N(R^N)S(O)-$ ,

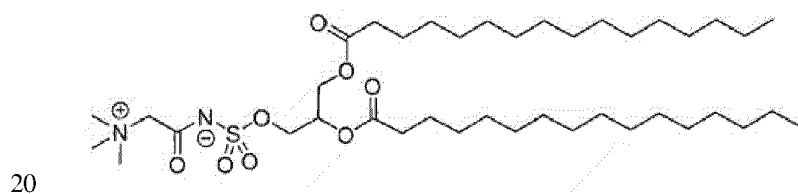
40

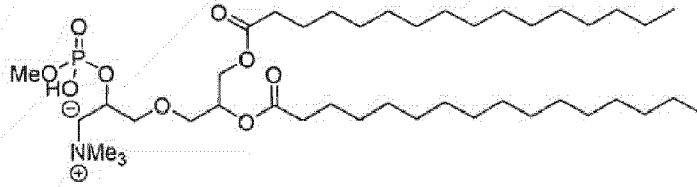
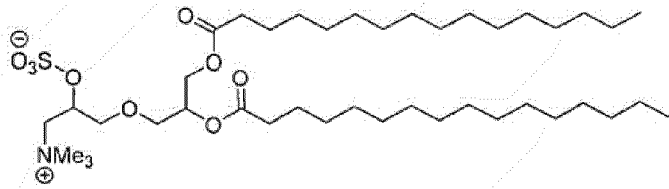


În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (II) are una dintre următoarele formule:

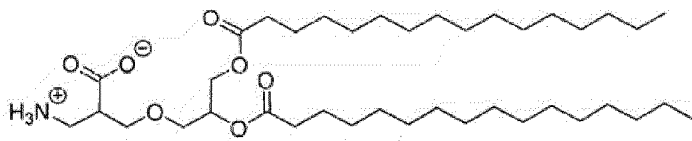
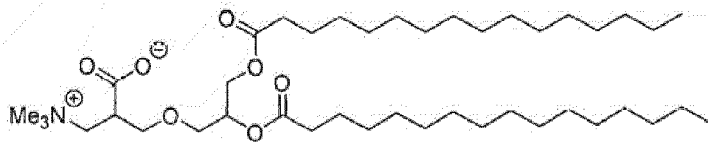
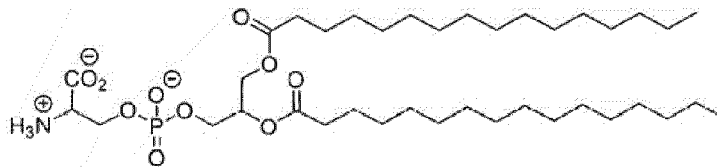


De exemplu, în anumite variante de realizare, un compus cu Formula (II) este unul dintre următorii:

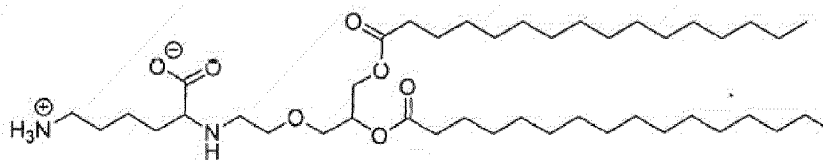
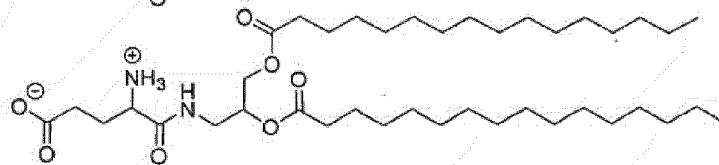
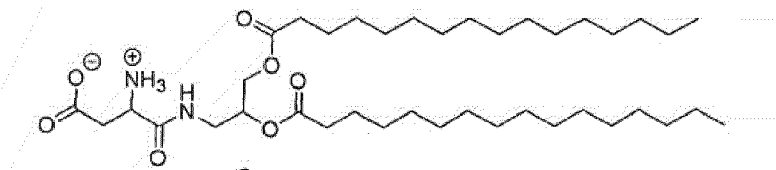
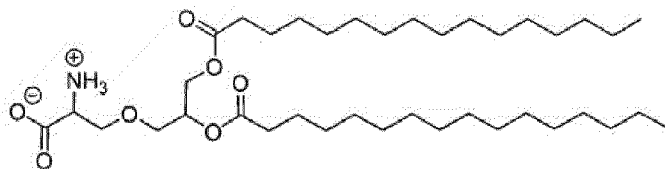




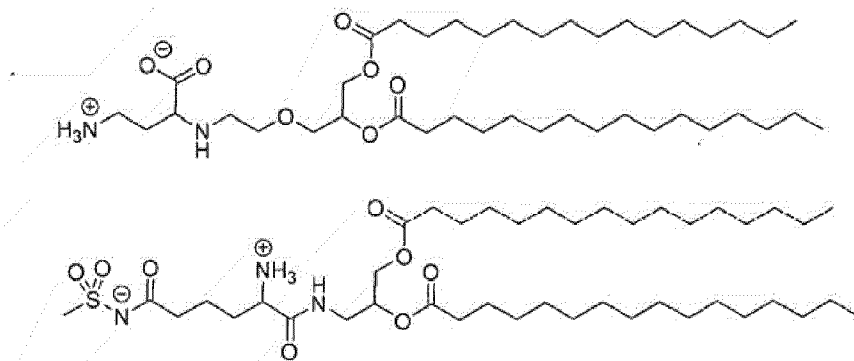
5



10



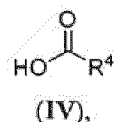
15



sau săruri ale acestora.

### 5 **Analogi de acid oleic**

Așa cum este descris aici, lipide necationice utile în prezenta invenție includ analogi de acid oleic. Așa cum este descris aici, un analog de acid oleic poate cuprinde o coadă de acid oleic modificat, un fragment de acid carboxilic modificat, sau ambele. În anumite variante de realizare, un analog de acid oleic este un compus cu Formula (IV). Sunt redați aici compuși cu Formula (IV):



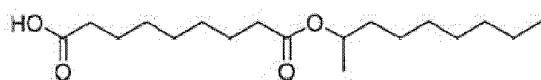
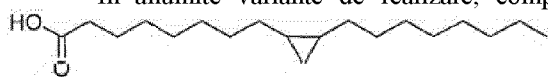
sau o sare a acestora, în care:

15  $R^4$  este, alchil  $C_{10-40}$  opțional substituit; alchenil  $C_{10-40}$  opțional substituit; alchinil  $C_{10-40}$  opțional substituit; în care cel puțin o grupare metilen a  $R^4$  este înlocuit independent cu carbociclicilen opțional substituit, heterociclicilen opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  $-N(R^N)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(O)-$ ,  $-NR^NC(O)N(R^N)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(=NR^N)-$ ,  $-C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(=NR^N)-$ ,  $-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)N(R^N)-$ ,  $-NR^NC(S)-$ ,  $-NR^NC(S)N(R^N)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-OS(O)-$ ,  $-S(O)O-$ ,  $-OS(O)O-$ ,  $-OS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2O-$ ,  $-OS(O)_2O-$ ,  $-N(R^N)S(O)-$ ,  $-S(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ ,  $-OS(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-OS(O)_2N(R^N)-$ , sau  $-N(R^N)S(O)_2O-$ ; și

20 fiecare caz de  $R^N$  este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului.

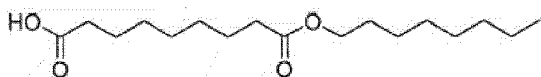
25

În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (IV) este unul dintre următorii:

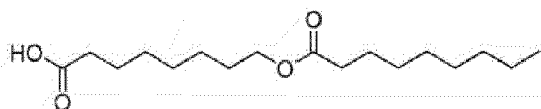


(Compus 148),

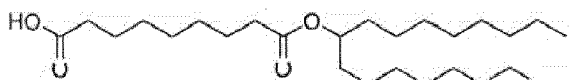
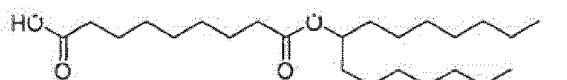
30



(Compus 149),



35

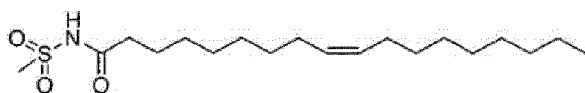


(Compus 159),

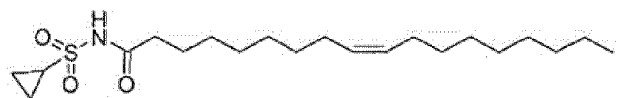
5 sau săruri ale acestora.

În anumite variante de realizare, un analog de acid oleic este un compus în care fragmentul de acid carboxilic al acidului oleic este înlocuit cu o grupare diferită. În anumite variante de realizare, un analog de acid oleic util în prezenta invenție este unul dintre următorii:

10

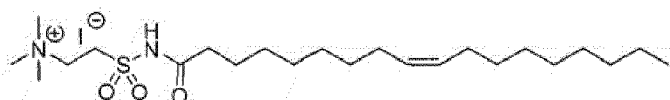


(Compus 157),

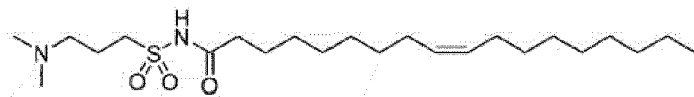
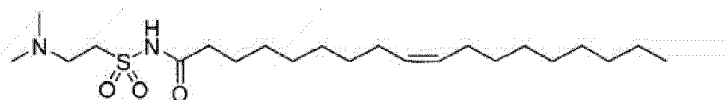
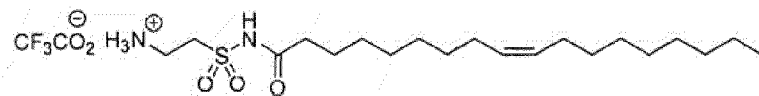


(Compus 158),

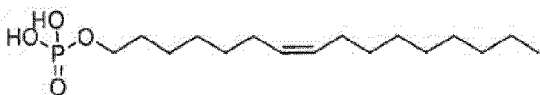
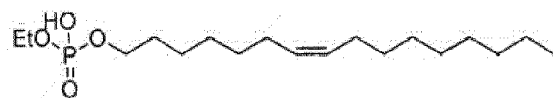
15



20



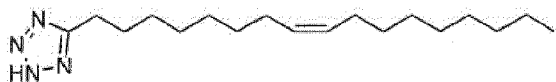
25



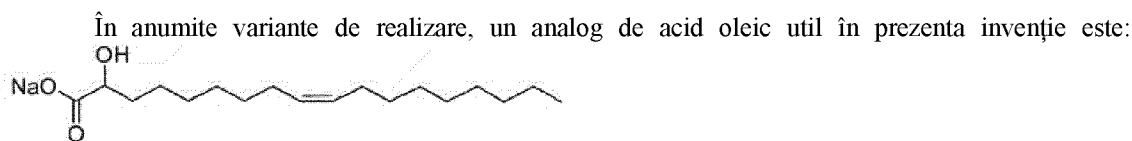
30







sau săruri ale acestora.



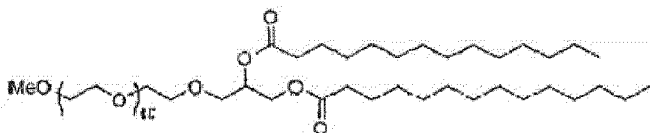
5

### Lipide PEGilate

Componenta lipidică a unei compoziții de nanoparticulă poate include una sau mai multe lipide PEG sau modificate cu PEG. Astfel de specii pot fi denumite alternativ ca lipide PEGilate. O lipidă PEG este o lipidă modificată cu polietilen glicol. O lipidă PEG poate fi selectată din grupul nelimitativ constând din fosfatidiletanolamine modificate cu PEG, acizi fosfatidici modificați cu PEG, ceramide modificate cu PEG, dialchilamine modificate cu PEG, diacilgliceroli modificați cu PEG, dialchilgliceroli modificați cu PEG și amestecuri ale acestora. De exemplu, o lipidă PEG poate fi PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC, sau o lipidă PEG-DSPE.

15

În unele variante de realizare lipidele modificate cu PEG sunt o formă modificată de PEG DMG. PEG-DMG are următoarea structură:



20

Într-o variantă de realizare, lipidele PEG utile în prezenta dezvăluire pot fi lipide PEGilate dezvăluite în Publicația internațională nr. WO2012099755. Oricare dintre aceste lipide PEG exemplificative descrise aici poate fi modificată pentru a cuprinde o grupare hidroxil pe lanțul PEG. În anumite variante de realizare, lipida PEG este o lipidă PEG-OH. Așa cum este definită în general aici, o "lipidă PEG-OH" (denumită aici și "lipidă hidroxi-PEGilată") este o lipidă PEGilată având una sau mai multe grupări hidroxil (-OH) pe lipidă. În anumite variante de realizare, lipida PEG-OH include una sau mai multe grupări hidroxil pe lanțul PEG. În anumite variante de realizare, o lipidă PEG-OH sau hidroxi-PEGilată cuprinde o grupare -OH la capătul lanțului PEG.

25

### Lipide PEG și PEG-OH

În anumite variante de realizare, o lipidă PEG utilă în prezenta dezvăluire este un compus cu Formula (III). Sunt redați aici compuși cu Formula (III):



(III),

35

sau săruri ale acestora, în care:

$R_3$  este  $-OR^0$ ;

$R^0$  este hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a oxigenului;

$r$  este un întreg cuprins între 1 și 100, inclusiv;

40

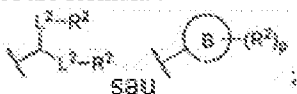
$L^1$  este alchilen  $C_{1-10}$  opțional substituit, în care cel puțin un metilen din alchilenul  $C_{1-10}$  opțional substituit este înlocuit independent cu un carbociclilen opțional substituit, heterociclilen opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  $-O-$ ,  $-N(R^N)-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ , sau  $-NR^N C(O)N(R^N)-$ ;

$D$  este un fragment obținut prin chimie click sau un fragment scindabil în condiții fiziologice;

$m$  este 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10;

45

$A$  are formula:



fiecare caz de  $L^2$  este independent o legătură sau alchilen  $C_{1-6}$  opțional substituit, în care o unitate de metilen a alchilenului  $C_{1-6}$  opțional substituit este opțional înlocuită cu  $O$ ,  $N(R^N)-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,

-C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, sau -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-;

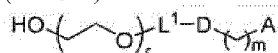
5 fiecare caz de R<sub>2</sub> este independent alchil C<sub>1-30</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>1-30</sub> opțional substituit, sau alchilul C<sub>1-30</sub> opțional substituit; în care opțional una sau mai multe unități de metilen ale lui R<sup>2</sup> sunt înlocuite independent cu carbociclicul opțional substituit, heterociclicul opțional substituit, arilul opțional substituit, heteroarilul opțional substituit, -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-, -OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, sau -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-;

10 fiecare caz de R<sup>N</sup> este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului;

15 Inelul B este carbociclicul opțional substituit, heterociclicul opțional substituit, arilul opțional substituit, sau heteroarilul opțional substituit; și

p este 1 sau 2.

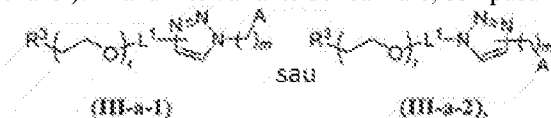
20 În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) este o lipidă PEG-OH (și anume, R<sup>3</sup> este -OR<sup>O</sup>, și R<sup>O</sup> este hidrogen). În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are Formula (III-OH):



(III-OH),

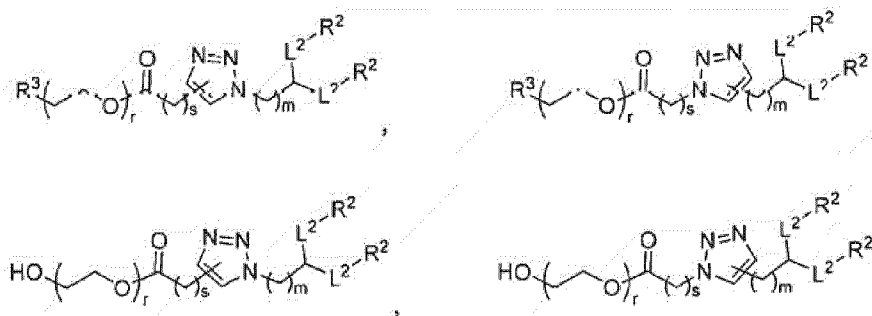
sau o sare a acestuia.

25 În anumite variante de realizare, D este un fragment obținut prin chimie click (de exemplu, triazol). În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are Formula (III-a-1) sau (III-a-2):



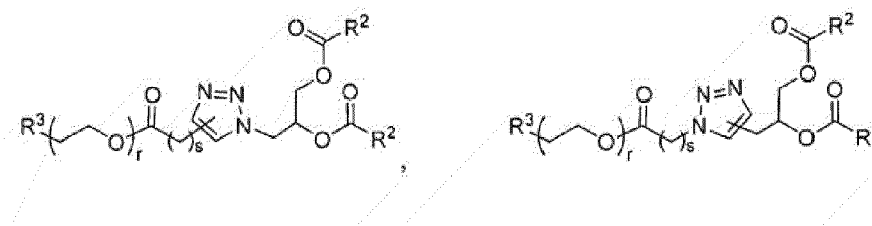
sau o sare a acestuia.

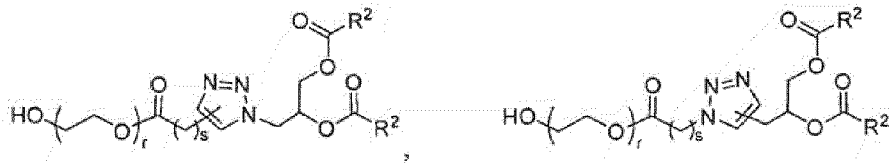
30 În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



35 sau o sare a acestuia, în care s este 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10.

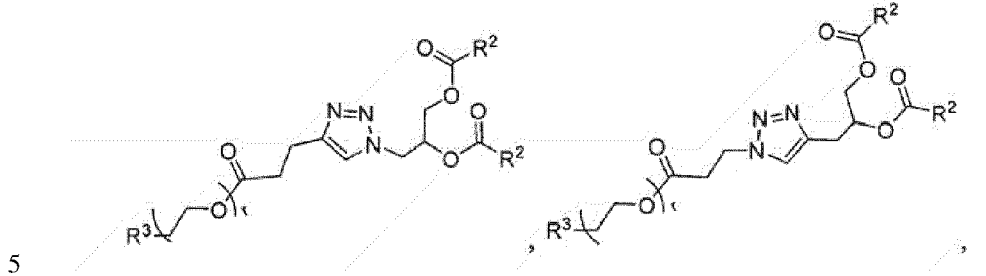
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:





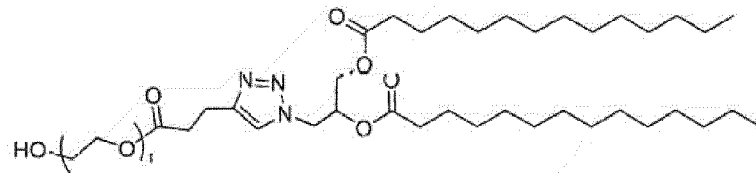
sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:

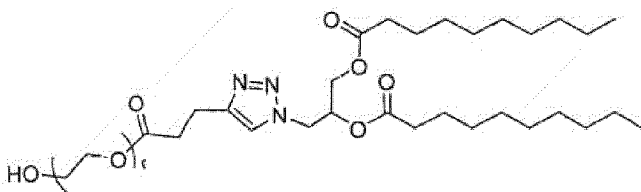


sau o sare a acestuia

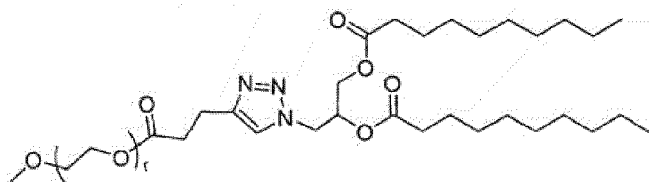
10 În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



(Compus 394),

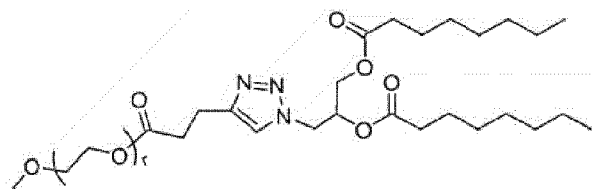


(Compus 396),



(Compus 395),

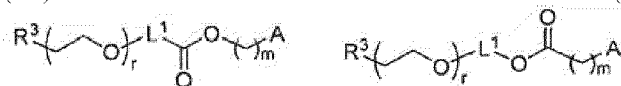
15



(Compus 397),

sau o sare a acestuia.

- 5 În anumite variante de realizare, D este un fragment scindabil în condiții fiziologice (de exemplu, ester, amidă, carbonat, carbamat, uree). În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are Formula (III-b-1) sau (III-b-2):

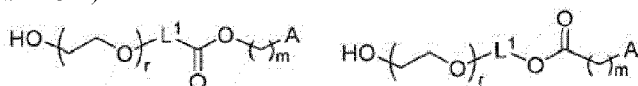


(III-b-1)

(III-b-2),

sau o sare a acestuia.

- 10 În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are Formula (III-b-1-OH) sau (III-b-2-OH):

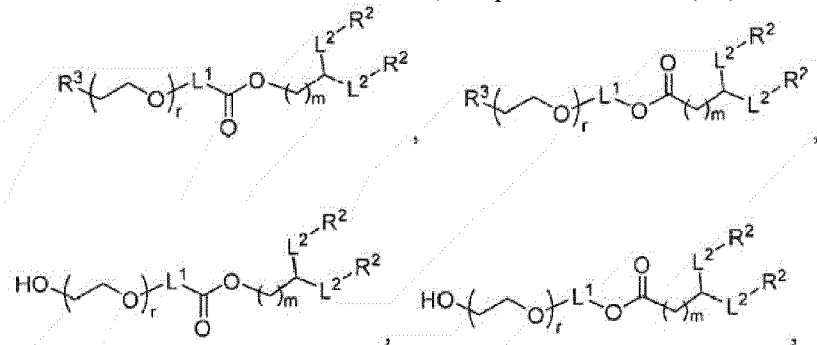


(III-b-1-OH)

(III-b-2-OH),

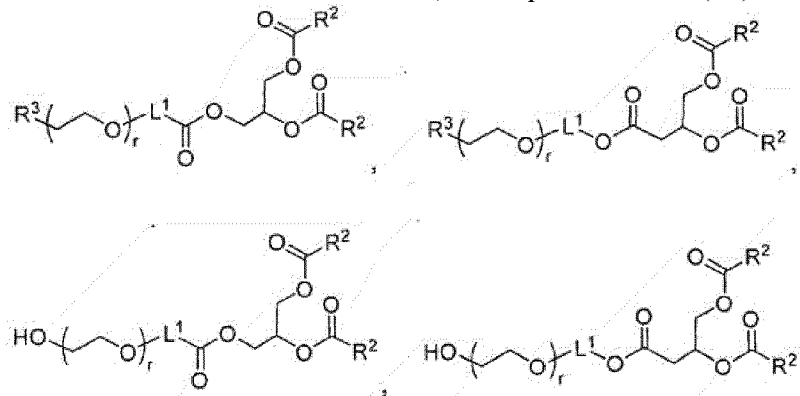
sau o sare a acestuia.

- 15 În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



sau o sare a acestuia.

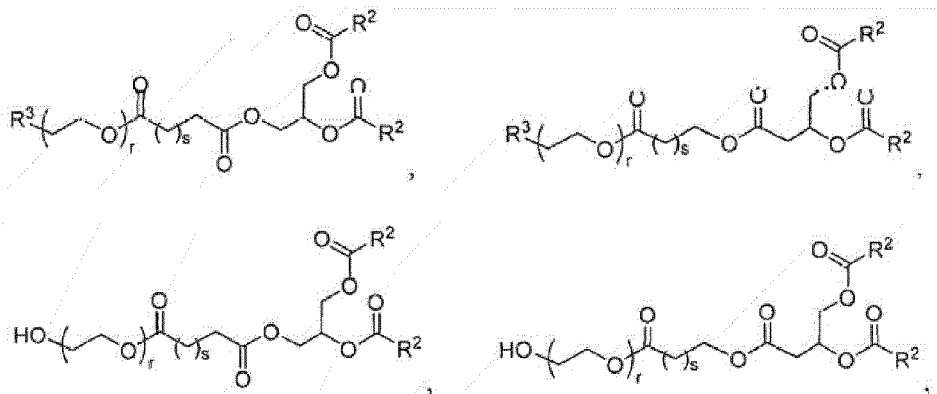
- 20 În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



sau o sare a acestuia.

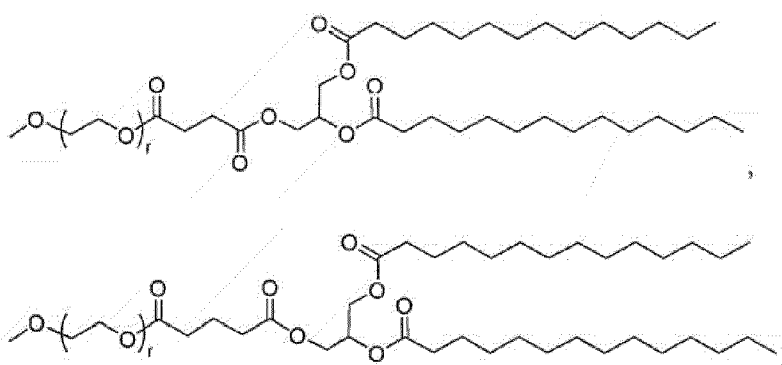
25

- În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



5 sau o sare a acestuia.

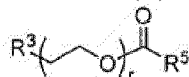
În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (III) are una dintre următoarele formule:



10

sau săruri ale acestora.

15 În anumite variante de realizare, o lipidă PEG utilă în prezenta dezvoltare este un acid gras PEGilat. În anumite variante de realizare, o lipidă PEG utilă în prezenta dezvoltare este un compus cu Formula (V). Sunt redați aici compuși cu Formula (V):



(V),

sau săruri ale acestora, în care:

R<sup>3</sup> este -OR<sup>0</sup>;

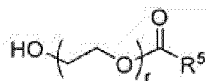
20 R<sup>0</sup> este hidrogen, alchil opțional substituit sau o grupare protectoare a oxigenului;  
r este un întreg cuprins între 1 și 100, inclusiv;

R<sup>5</sup> este alchil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, sau alchinil C<sub>10-40</sub> opțional substituit; și opțional una sau mai multe grupări metilen ale lui R<sup>5</sup> sunt înlocuite cu carbociclieni opțional substituit, heterociclieni opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,

25 -N(R<sup>N</sup>)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)-, -NR<sup>N</sup>C(O)N(R<sup>N</sup>)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-,  
-OC(O)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR<sup>N</sup>)-, -C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)-,  
-NR<sup>N</sup>C(=NR<sup>N</sup>)N(R<sup>N</sup>)-, -C(S)-, -C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -NR<sup>N</sup>C(S)-, -NR<sup>N</sup>C(S)N(R<sup>N</sup>)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-,  
-OS(O)O-, -OS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>O-, -OS(O)<sub>2</sub>O-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)-, -S(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)N(R<sup>N</sup>)-,  
-OS(O)N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-, -OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>N</sup>)-,  
30 sau -N(R<sup>N</sup>)S(O)<sub>2</sub>O-; și

fiecare caz de R<sup>N</sup> este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului.

În variante de realizare ale invenției, compusul cu Formula (V) are Formula (V-OII):



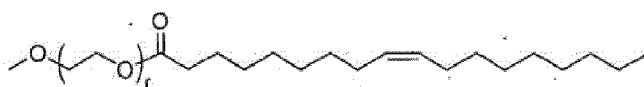
(V-OH),

sau o sare a acestuia.

5 În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (V) are una dintre următoarele formule:



(Compus 400),



(Compus 401),

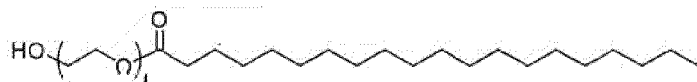
10



(Compus 402),



15



20



sau o sare a acestuia.

Numeroase formulări de LNP având diferite lipide PEG au fost preparate și testate în ceea ce privește activitatea, așa cum s-a demonstrat în Exemplele incluse mai jos.

25 **Fosfolipide, inclusiv fosfolipidele helper**

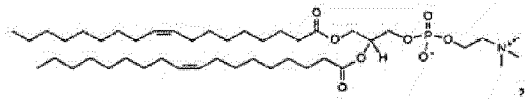
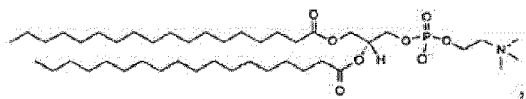
Fosfolipidele, așa cum sunt definite aici, sunt orice lipide care cuprind o grupare de fosfat. Fosfolipidele sunt un subset de lipide necationice. Componenta lipidică a unei compoziții de nanoparticule poate include una sau mai multe fosfolipide, cum ar fi una sau mai multe lipide (poli)nesaturate. Fosfolipidele se pot asambla în unul sau mai multe bistraturi lipidice. În general, fosfolipidele pot include un fragment fosfolipidic și unul sau mai multe fragmente de acizi grași. Un fragment de fosfolipidă poate fi selectat din grupul nelimitativ constând din fosfatidil colină, fosfatidil etanolamină, fosfatidil glicerol, fosfatidil serină, acid fosfatidic, 2-lizofosfatidil colină, și o sfingomielină. Un fragment de acid gras poate fi selectată din grupul nelimitativ constând din acid lauric, acid miristic,

30

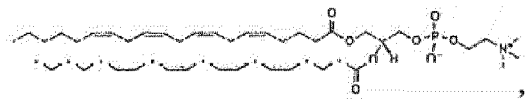
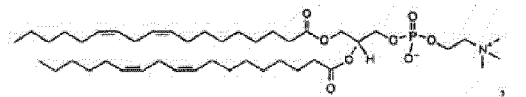
acid miristoleic, acid palmitic, acid palmitoleic, acid stearic, acid oleic, acid linoleic, acid alfa-linolenic, acid erucic, acid fitanoic, acid arahidic, acid arahidonic, acid eicosapentaenoic, acid behenic, acid docosapentaenoic, și acid docosahexaenoic. Sunt de asemenea avute în vedere specii nenaturale, incluzând specii naturale cu modificări și substituții, inclusiv ramificare, oxidare, ciclizare și alchine. De exemplu, o fosfolipidă poate fi funcționalizată cu sau reticulată la una sau mai multe alchine (de exemplu, o grupare alchenil în care una sau mai multe legături duble sunt înlocuite cu o legătură triplă). În condiții de reacție adecvate, o grupare alchincă poate suferi o cicloadiție catalizată de cupru la expunerea la o azidă. Astfel de reacții pot fi utile în funcționalizarea unui bistrat lipidic al unei compoziții de nanoparticulă pentru a facilita penetrarea membranei sau recunoașterea celulară sau în conjugarea unei compoziții de nanoparticulă la o componentă utilă, cum ar fi un fragment de țintire sau imagistic (de exemplu, un colorant). Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

Fosfolipidele utile în compoziții și metode pot fi selectate din grupul nelimitativ constând din 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (DSPC), 1,2-diolcoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină (DOPE), 1,2-dilinoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (DLPC), 1,2-dimirisloil-*sn*-glicero-fosfocolină (DMPC), 1,2 dioleoil *sn* glicero 3 fosfocolină (DOPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (DPPC), 1,2-diundecanoil-*sn*-glicero-fosfocolină (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (18:0 Dieter PC), 1-oleoil-2-colesterilhemisuccinoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (OChemPC), 1-hexadecil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (C16 Lyso PC), 1,2-dilinoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină, 1,2-diarachidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină, 1,2-didocosahexaenoil-*sn*-glyccro-3-fosfocolină, 1,2-diphytanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină (ME 16,0 PE), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină, 1,2-dilinoleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină, 1,2-dilinoleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină, 1,2-diarachidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină, 1,2-didocosahexaenoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină, 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sodium salt (DOPG), și sfingomielină. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

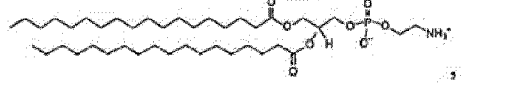
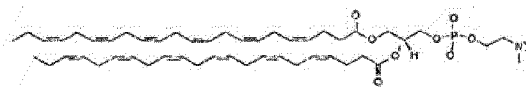
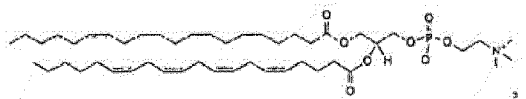
În unele variante de realizare, o compoziție de nanoparticulă include DSPC. În anumite variante de realizare, o compoziție de nanoparticulă include DOPE. În unele variante de realizare, o compoziție de nanoparticulă include atât DSPC, cât și DOPE. Exemple de fosfolipide includ, dar nu sunt limitate la, următoarele:



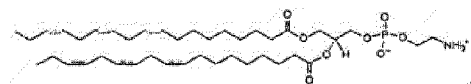
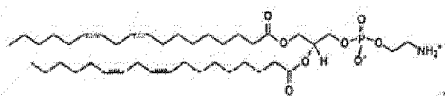
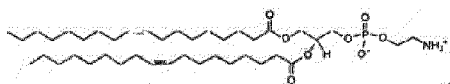
35



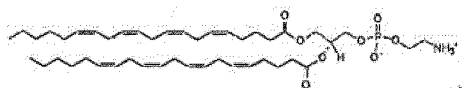
40



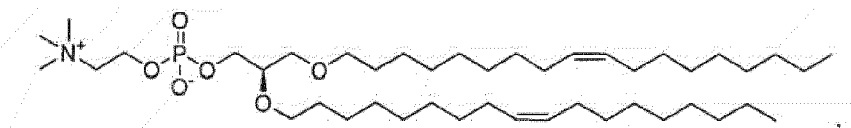
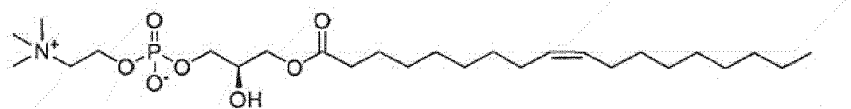
45



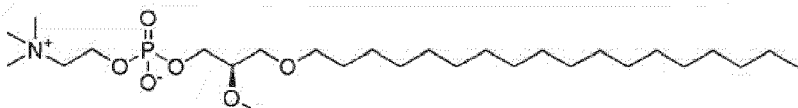
5



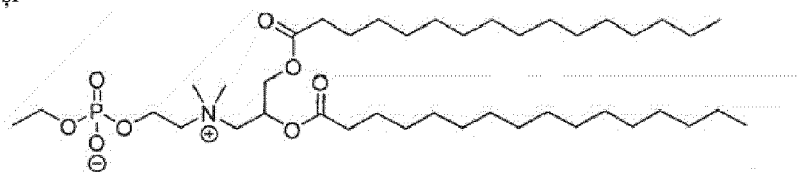
10



15

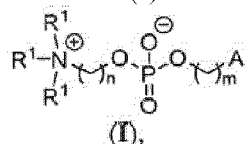


și



20

În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție este un analog sau variantă de DSPC. În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție este un compus cu Formula (I):



sau o sare a acestuia, în care:

25

fiecare  $\text{R}^1$  este independent alchil opțional substituit; sau opțional doi  $\text{R}^1$  sunt uniți împreună cu atomii intermediari pentru a forma carbocicilul monociclic opțional substituit sau heterocicilul monociclic opțional substituit; sau opțional trei  $\text{R}^1$  sunt uniți împreună cu atomii intermediari pentru a forma carbocicilul biciclic opțional substituit sau heterocicilul biciclic opțional substituit;

30

$n$  este 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10;

$m$  este 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10;



A are formula :



fiecare caz de  $L^2$  este independent o legătură sau alchilen  $C_{1-6}$  opțional substituit, în care o unitate de metilen din alchilenul  $C_{1-6}$  opțional substituit este opțional înlocuită cu  $-O-$ ,  $-N(R^N)-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ , sau  $-NR^N C(O)N(R^N)-$ ;

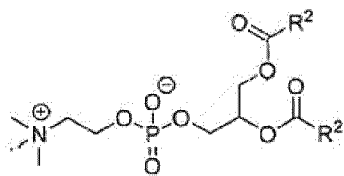
fiecare caz de  $R^2$  este independent alchil  $C_{1-30}$  opțional substituit, alchenil  $C_{1-30}$  opțional substituit, sau alchilul  $C_{1-30}$  opțional substituit; în care opțional una sau mai multe unități de metilen ale lui  $R^2$  sunt înlocuite independent cu carbociclii opțional substituit, heterociclii opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  $-N(R^N)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-NR^N C(O)N(R^N)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(=NR^N)-$ ,  $-C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(S)-$ ,  $-NR^N C(S)N(R^N)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-OS(O)-$ ,  $-S(O)O-$ ,  $-OS(O)O-$ ,  $-OS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2O-$ ,  $-OS(O)_2O-$ ,  $-N(R^N)S(O)-$ ,  $-S(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ ,  $-OS(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-OS(O)_2N(R^N)-$ , sau  $-N(R^N)S(O)_2O-$ ;

fiecare caz de  $R^N$  este independent hidrogen, alchil opțional substituit, sau o grupare protectoare a azotului;

Inelul B este carbocicilul opțional substituit, heterocicilul opțional substituit, aril opțional substituit, sau heteroaril opțional substituit; și

p este 1 sau 2;

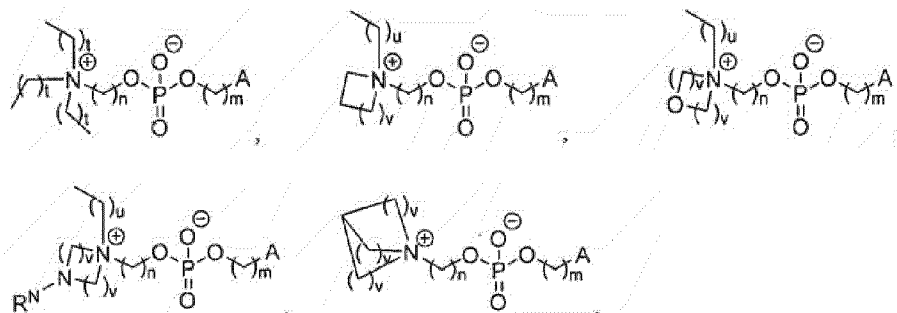
cu condiția ca, compusul să nu aibă formula:



în care în fiecare caz  $R^2$  este independent alchil nesubstituit, alchenil nesubstituit, sau alchilul nesubstituit.

### Modificări ale fosfolipidelor de cap

În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție cuprinde o fosfolipidă de cap modificată (de exemplu, o grupare de colină modificată). În anumite variante de realizare, o fosfolipidă cu un cap modificat este DSPC, sau analogul acestuia, cu o amină cuaternară modificată. De exemplu, în variante de realizare cu Formula (I), cel puțin unul dintre  $R^1$  nu este metil. În anumite variante de realizare, cel puțin unul dintre  $R^1$  nu este hidrogen sau metil. În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I) are una dintre următoarele formule:



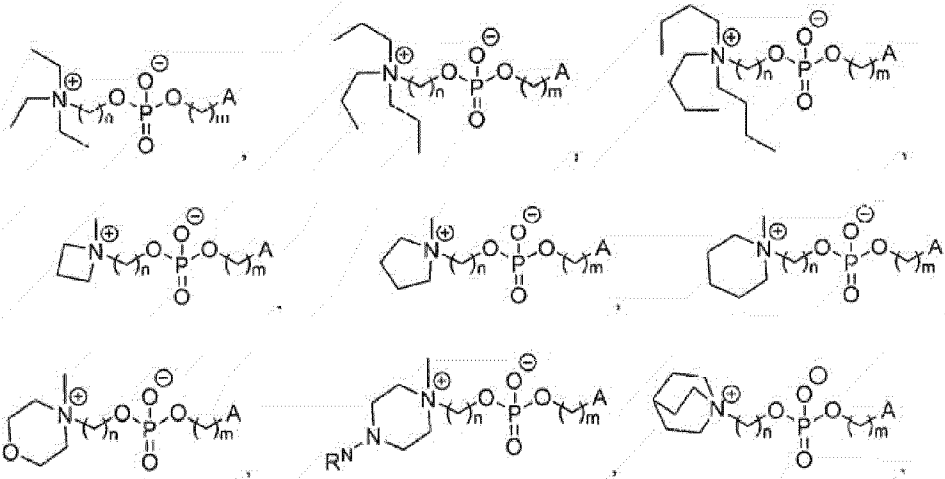
sau o sare a acestuia, în care:

fiecare t este independent 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10;

fiecare u este independent 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10; și

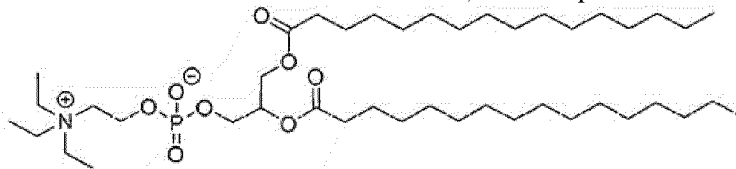
fiecare v este independent 1, 2, sau 3.

În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I) are una dintre următoarele formule:

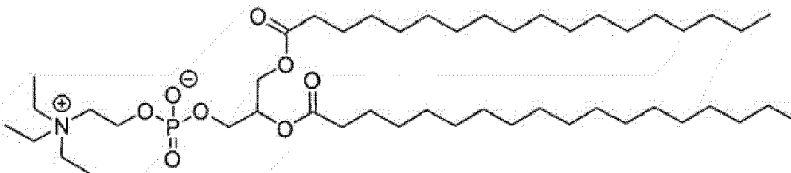


sau o sare a acestuia.

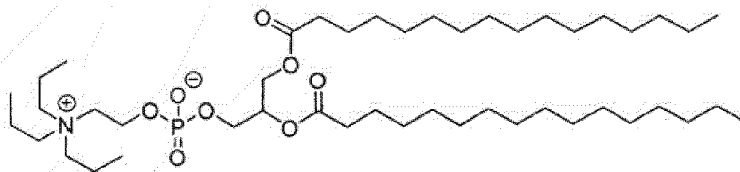
În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (I) este unul dintre următorii:



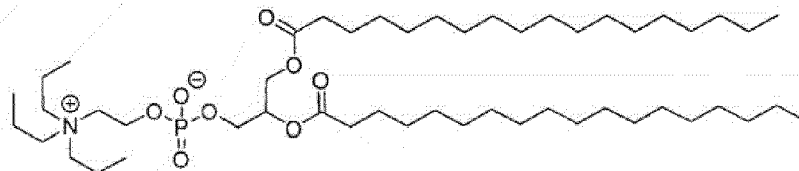
(Compus 150),



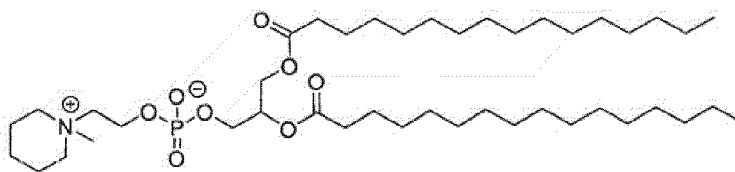
(Compus 160),



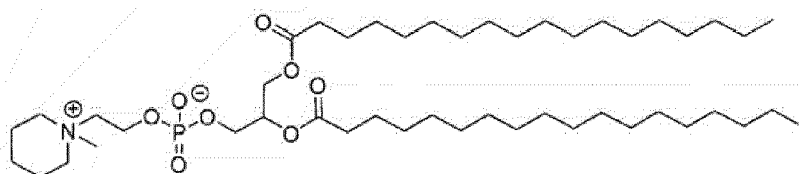
(Compus 151),



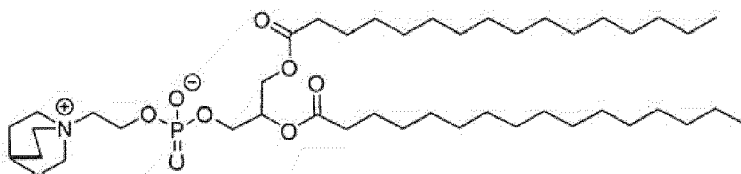
(Compus 165),



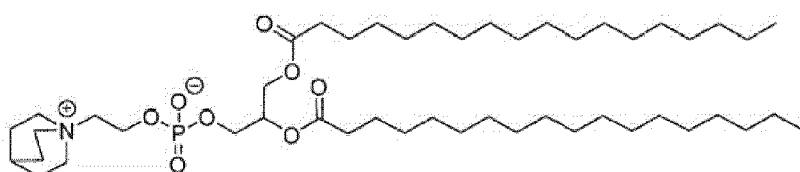
(Compus 152),



(Compus 161),

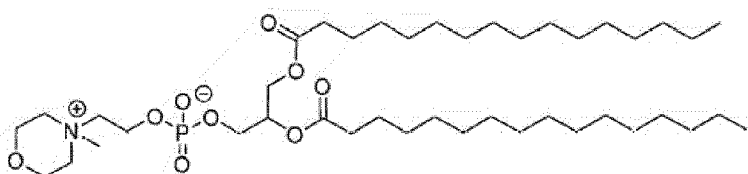


(Compus 153),

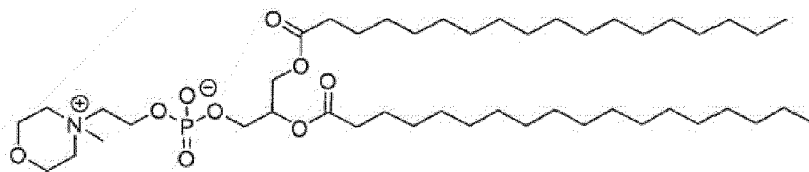


(Compus 164),

5



(Compus 155),

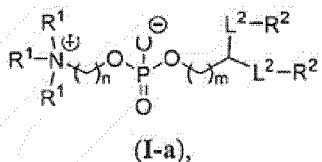


(Compus 166)

10 sau o sare a acestuia.

**Modificări ale miezului fosfolipidic**

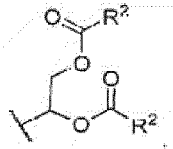
În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (I) are Formula (I-a):



15 sau o sare a acestuia.

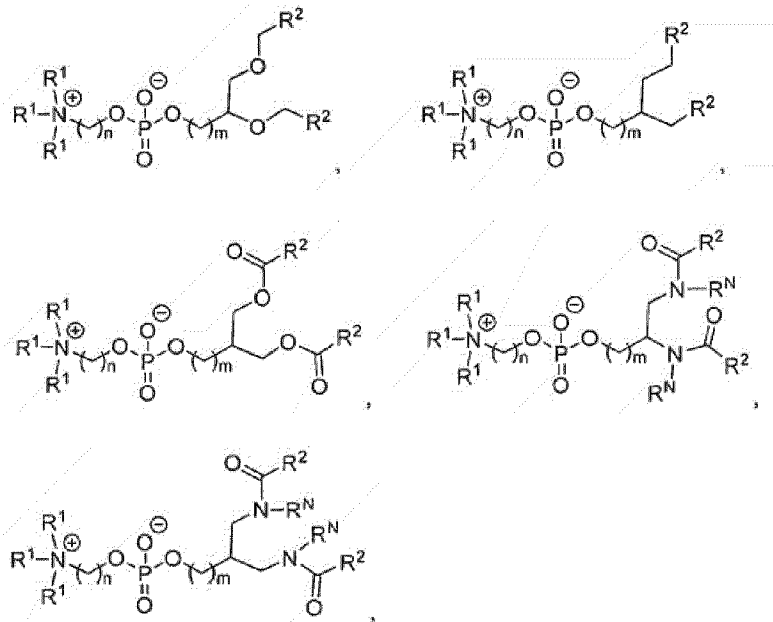
În anumite variante de realizare, fosfolipidele utile în prezenta invenției cuprind un miez modificat (vezi, *deexemplu*, FIG 47B). În anumite variante de realizare, o fosfolipidă cu un miez modificat descrisă aici este DSPC, sau un analog al acesteia, cu o structură de miez modificată. De exemplu, în anumite variante de realizare cu Formula (I-a), gruparea A nu are următoarea formulă:

20



În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-a) are una dintre următoarele formule:

5

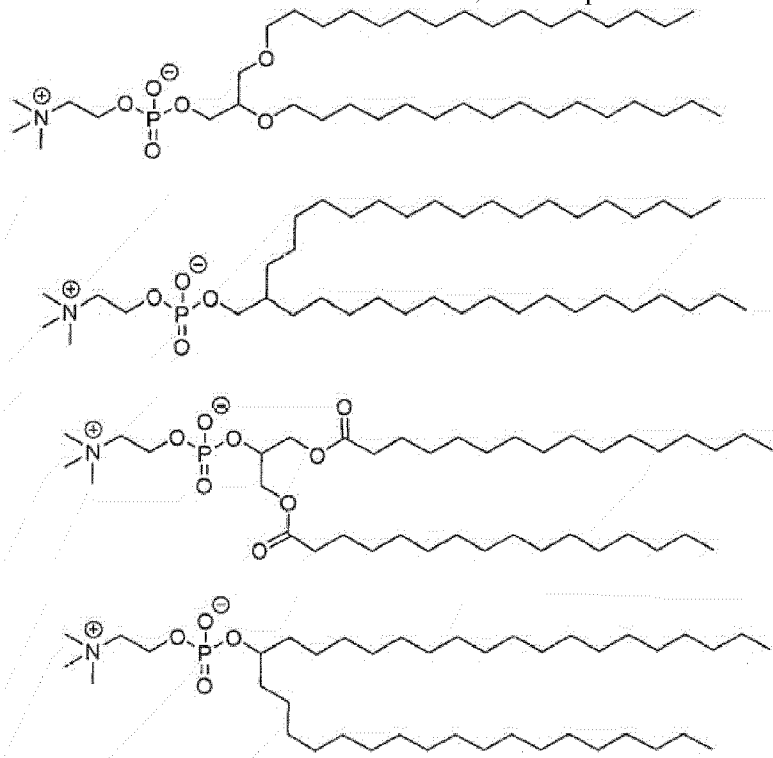


10

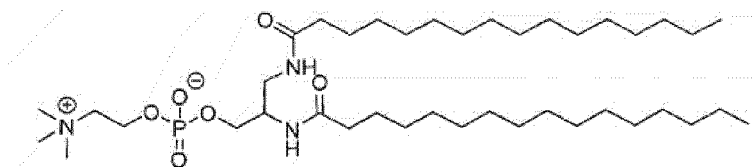
sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (I) este unul dintre următorii:

15

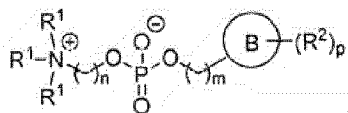


20



sau săruri ale acestora.

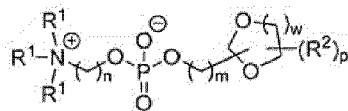
- 5 În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție cuprinde un fragment ciclic în locul fragmentului de gliceridă. În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție este DSPC, sau analog al acesteia, cu un fragment ciclic în locul fragmentului de gliceridă. În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I) are Formula (I-b):



(I-b),

- 10 sau o sare a acestuia.

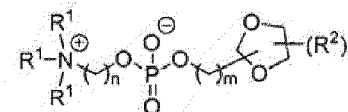
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-b) are Formula (I-b-1):



(I-b-1),

- 15 sau o sare a acestuia, în care:  
w este 0, 1, 2, sau 3.

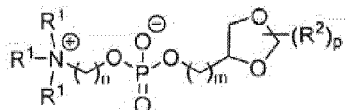
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-b) are Formula (I-b-2):



(I-b-2),

- 20 sau o sare a acestuia.

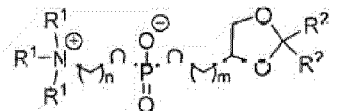
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-b) are Formula (I-b-3):



(I-b-3),

- sau o sare a acestuia.

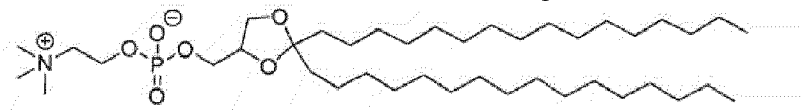
- 25 În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-b) are Formula (I-b-4):



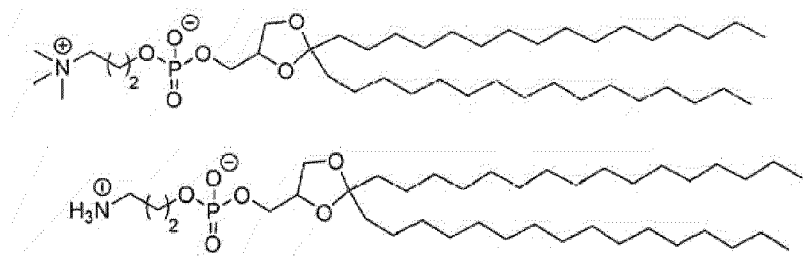
(I-b-4),

sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-b) este unul dintre următorii:



- 30

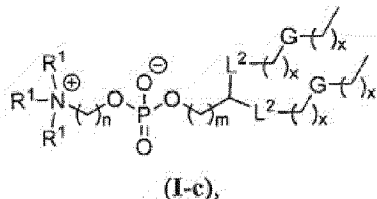


sau săruri ale acestora.

### 5 **Modificări ale cozii fosfolipidei**

În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție cuprinde o coadă modificată. În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție este DSPC, sau analog al acesteia, cu o coadă modificată. Așa cum este descris aici, o "coadă modificată" poate fi o coadă cu lanțuri alifatiche mai scurte sau mai lungi, lanțuri alifatiche cu ramificare introdusă, lanțuri alifatiche cu substituenți introduși, lanțuri alifatiche în care unul sau mai mulți metileni sunt înlocuiți cu grupări ciclice sau heteroatomi sau orice combinație a acestora. De exemplu, în anumite variante de realizare, compusul (I) are Formula (I-a), sau o sare a acestuia, în care cel puțin un caz de  $R^2$  este fiecare caz de  $R^2$  este alchil  $C_{1-30}$  opțional substituit, în care una sau mai multe unități de metilen ale lui  $R^2$  sunt înlocuite independent cu carbociclii opțional substituit, heterociclii opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  $-N(R^N)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-NR^N C(O)N(R^N)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(C)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(=NR^N)-$ ,  $-C(NR^N)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(S)-$ ,  $-NR^N C(S)N(R^N)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-OS(O)-$ ,  $-S(O)O-$ ,  $-OS(O)O-$ ,  $-OS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2O-$ ,  $-OS(O)_2O-$ ,  $-N(R^N)S(O)-$ ,  $-S(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ ,  $-OS(O)N(R^N)-$ ,  $N(R^N)S(O)O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-OS(O)_2N(R^N)-$ , sau  $-N(R^N)S(O)_2O-$ .

În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-a) are Formula (I-c):

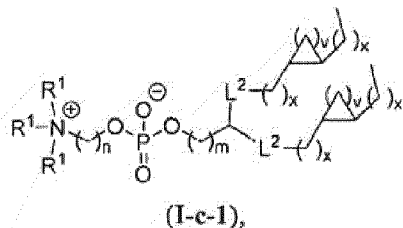


25 sau o sare a acestuia, în care:

fiecare  $x$  este independent un întreg cuprins între 0-30, inclusiv; și

fiecare caz de  $G$  este selectat independent din grupul care constă din carbociclii opțional substituit, heterociclii opțional substituit, arilen opțional substituit, heteroarilen opțional substituit,  $-N(R^N)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)-$ ,  $-NR^N C(O)N(R^N)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-OC(O)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(O)O-$ ,  $-C(O)S-$ ,  $-SC(O)-$ ,  $-C(=NR^N)-$ ,  $-C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)-$ ,  $-NR^N C(=NR^N)N(R^N)-$ ,  $-C(S)-$ ,  $-C(S)N(R^N)-$ ,  $-NR^N C(S)-$ ,  $-NR^N C(S)N(R^N)-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-OS(O)-$ ,  $-S(O)O-$ ,  $-OS(O)O-$ ,  $-OS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2O-$ ,  $-OS(O)_2O-$ ,  $-N(R^N)S(O)-$ ,  $-S(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)N(R^N)-$ ,  $-OS(O)N(R^N)-$ ,  $-N(R^N)S(O)O-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-N(R^N)S(O)_2-$ ,  $-S(O)_2N(R^N)-$ ,  $N(R^N)S(O)_2N(R^N)-$ ,  $-OS(O)_2N(R^N)-$ , sau  $-N(R^N)S(O)_2O-$ . Fiecare posibilitate reprezintă un exemplu de realizare separat al prezentei invenții.

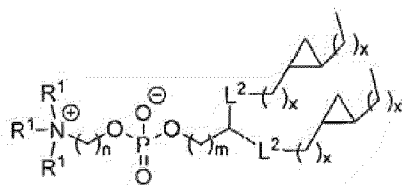
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-c) are Formula (I-c-1):



sau o sare a acestuia, în care:

40 fiecare caz de  $v$  este independent 1, 2, sau 3.

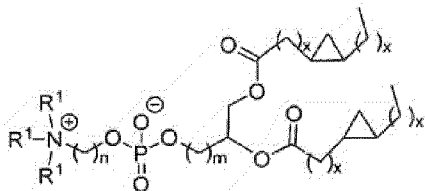
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-c) are Formula (I-c-2):



(I-c-2),

sau o sare a acestuia.

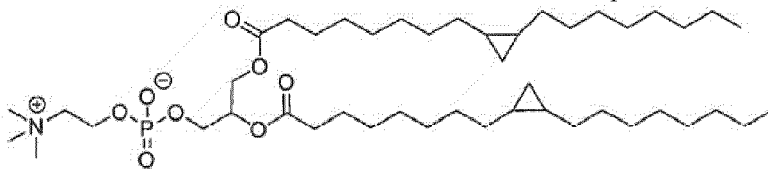
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-c) are formula care urmează:



5

sau o sare a acestuia.

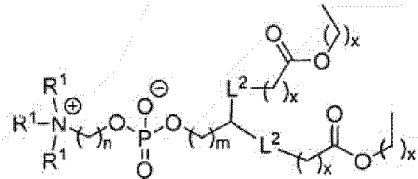
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-c) este următorul:



10

sau o sare a acestuia.

În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-c) are Formula (I-c-3):

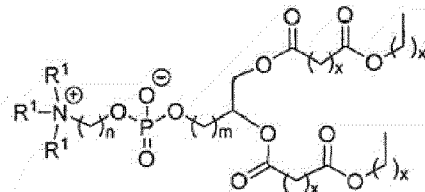


(I-c-3),

sau o sare a acestuia.

15

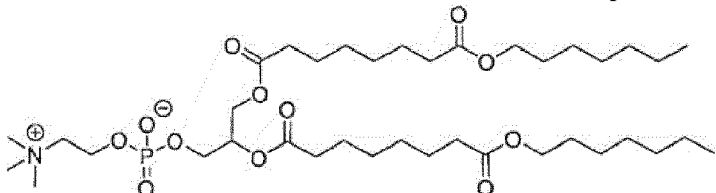
În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-c) este cu următoarele formule:



sau o sare a acestuia.

20

În anumite variante de realizare, compusul cu Formula (I-c) este următorul:



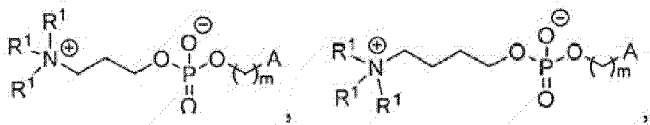
sau o sare a acestuia.

#### Modificări ale linkerului de fosfocolină

25

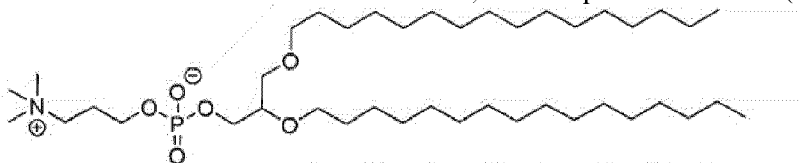
În anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție cuprinde un fragment de fosfocolină modificată, în care lanțul alchil care leagă amina cuaternară de gruparea fosforil nu este etilen

(de exemplu, n nu este 2). Prin urmare, în anumite variante de realizare, o fosfolipidă utilă în prezenta invenție este un compus cu Formula (I), în care n este 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10. De exemplu, în anumite variante de realizare, un compus cu Formula (I) are una dintre următoarele formule:

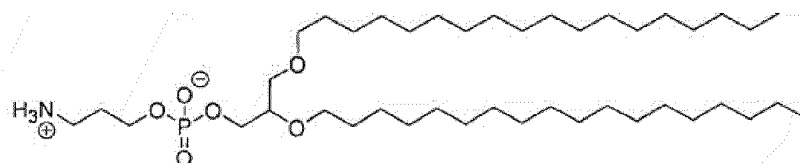
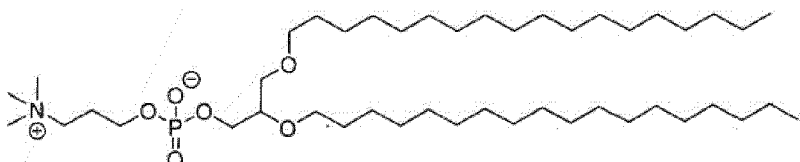
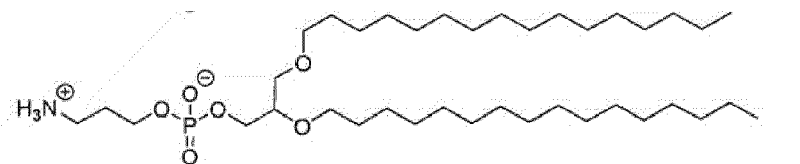


5 sau o sare a acestuia.

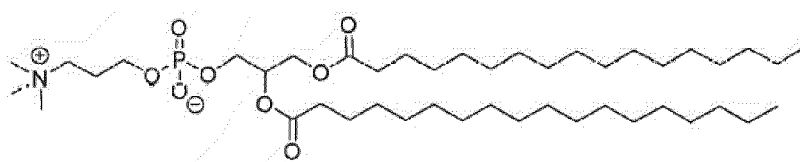
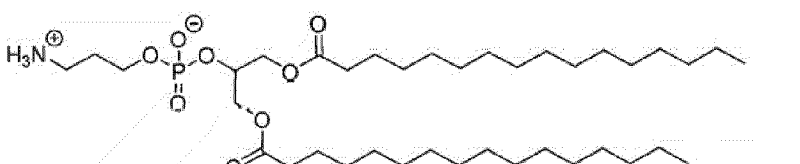
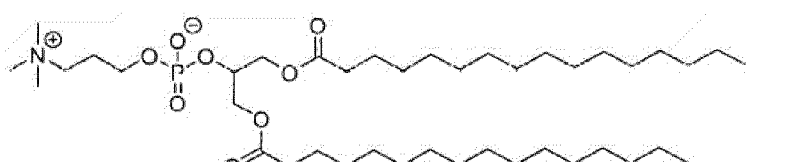
În anumite variante de realizare, un compus cu Formula (I) este unul dintre următorii:



10



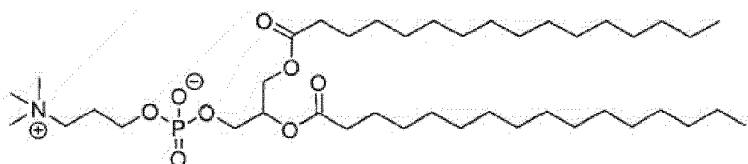
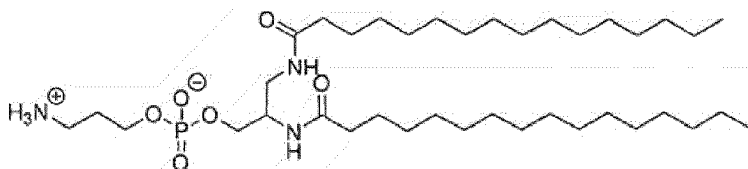
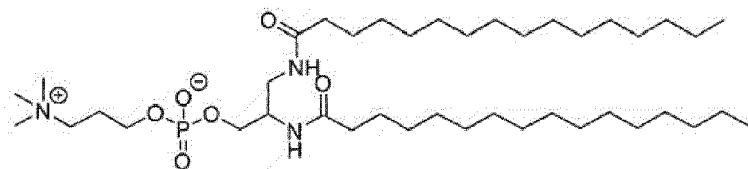
15



(Compus 162)

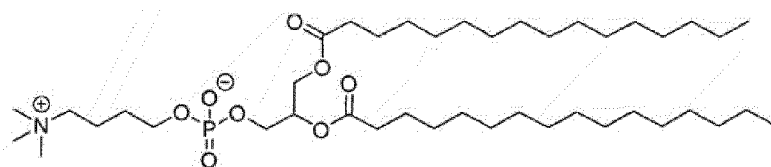
20



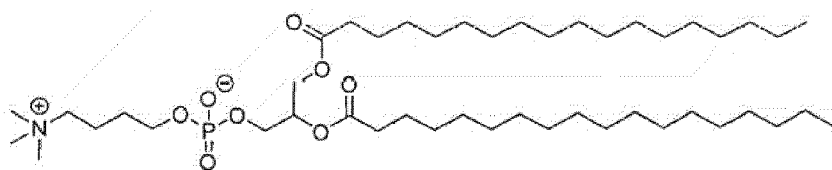


(Compus 154)

5



(Compus 156)



(Compus 163),

10 sau săruri ale acestora.

Numeroase formulări de LNP având fosfolipide altele decât DSPC au fost preparate și testate în ceea ce privește activitatea, așa cum a fost demonstrat în exemplele de mai jos. Exemple de fosfolipide sunt prezentate în figuri, inclusiv fig. 75A, 75D și 75E lipsă.

15

Următorul Tabel oferă un rezumat al fosfolipidelor și indică exemplele care includ date despre fosfolipide.

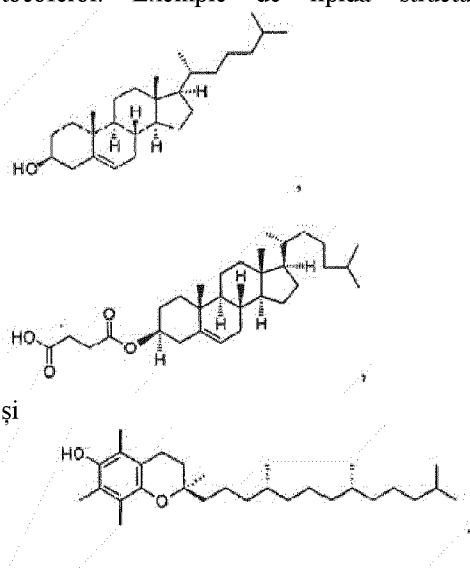
Nume compus	Denumirea comună	Exemplu de testare a lipidelor	Formulare
Acid oleic	OL	23	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
Comp393	Trialchil	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp 125	Dialchil	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -148	OL	25	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
Comp - 149	OL	23	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
Comp -150	PC	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -151	PC	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -152	PC	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -153	PC	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG

Nume compus	Denumirea comună	Exemplu de testare a lipidelor	Formulare
DOPC	PC	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Acid oleic	FA	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
DOCP	PC	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
DOCPe	PC	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
DOPE	PE	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
DOPG	PG	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
DOPA	PA	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
DOPS 0,1%	PS	22	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
DOPS 1%	PS	22	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
DOPS 1%	PS	22	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -279	PC	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -280	PC	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -281	PC	23	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -160	PC	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -161	PC	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -162	PC	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -163	PC	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -157	OL	25	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
Comp -158	OL	25	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
Comp -159	OL	25	MC3:OL:Chol:PEG-DMG
Comp -164	PC	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -165	PC	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
Comp -166	PC	25	MC3:PC:Chol:PEG-DMG
DSPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
DPPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
DMPC	PC	24	Cmpd18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
SMPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
OMPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
SPPC		24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
OPPC		24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:30,5:1,5)
PSPC		24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
POPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)
PLPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1-:38,5:1,5)

Nume compus	Denumirea comună	Exemplu de testare a lipidelor	Formulare
PMPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1:38,5:1,5)
MSPC	PC	24	Comp18:PC:Chol:PEG-DMG (50:1:38,5:1,5)
Acid steric	OL	24	
Acid oleic	OL	24	
Acid linoleic	OL	24	

### Lipide structurale

Componenta lipidică a unei compoziții de nanoparticulă poate include una sau mai multe lipide structurale. Incorporarea lipidelor structurale în nanoparticulele lipidice poate ajuta la atenuarea agregării altor lipide în particule. Lipidele structurale pot fi selectate din grupul constând din, dar nu se limitează la, colesterol, fecosterol, sitosterol, ergosterol, campesterol, stigmasterol, brassicasterol, tomatidină, tomatină, acid ursolic, alfa-tocoferol, hopanoide, fitosteroli, steroide, și amestecuri ale acestora. În unele variante de realizare, lipida structurală este un sterol. Așa cum este definit aici, "sterolii" sunt un subgrup de steroizi constând din alcoolii steroizi. În anumite variante de realizare, lipida structurală este un steroid. În anumite variante de realizare, lipida structurală este colesterol. În anumite variante de realizare, lipida structurală este un analog de colesterol. În anumite variante de realizare, lipida structurală este alfa-tocoferol. Exemple de lipida structurală includ, dar nu sunt limitate la, următoarele:



### Definiții chimice

Definițiile grupărilor funcționale specifice și ale termenilor chimici sunt descrise mai detaliat mai jos. Elementele chimice sunt identificate în conformitate cu Tabelul periodic al elementelor, versiunea CAS, *Handbook of Chemistry and Physics*, a-75<sup>a</sup> Ediție, coperta interioară, și grupările funcționale specifice sunt în general definite așa cum este descris aici. În plus, principiile generale ale chimiei organice, precum și fragmentele funcționale specifice și reactivitatea, sunt descrise în *Organic Chemistry*. Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith și March, *March's Advanced Organic Chemistry*, Ediția a 5-a, John Wiley & Sons, Inc, New York, 2001; Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, Inc, New York, 1989; și Carruthers, *Some Modern Methods of Organic Synthesis*, Ediția a 3-a, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Compușii descriși aici pot cuprinde unul sau mai mulți centri de asimetrie și astfel pot exista în diferite forme stereoizomerice, *de exemplu*, enantiomeri și/sau diastereomeri. De exemplu, compușii descriși aici pot fi sub forma unui enantiomer individual, diastereomer sau izomer geometric sau pot fi sub forma unui amestec de stereoizomeri, incluzând amestecuri racemice și amestecuri îmbogățite în unul sau mai mulți stereoizomeri. Izomerii pot fi izolați din amestecuri prin metode cunoscute specialiștilor în domeniu, inclusiv cromatografia lichidă chirală de înaltă presiune (HPLC) și formarea și cristalizarea unor săruri chirale; sau izomerii preferați pot fi preparați prin sinteze asimetrice. Vezi, de exemplu,

Jacques și colab, *Enantiomers, Racemates și Resolutions* (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen și colab, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E.L. *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); și Wilen, S.H, *Tables of Resolving Agents și Optical Resolutions* pag. 268 (E.L. Eliel, Ed, Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, în 1972). Invenția cuprinde în plus compuși ca izomeri individuali substanțial lipsiți de alți izomeri și, alternativ, ca amestecuri de diverși izomeri.

Într-o formulă,

~~---~~

este o legătură simplă în care stereochemia fragmentelor atașate imediat la aceasta nu este specificată,

--- este absent sau o legătură simplă, și

~~===~~ sau ===

este o legătură simplă sau dublă.

Dacă nu este specificat altfel, structurile descrise aici sunt, de asemenea, menite să includă compuși care diferă numai prin prezența unuia sau mai multor atomi îmbogățiți izotopic. De exemplu, compușii având structurile prezente, cu excepția înlocuirii hidrogenului cu deuteriu sau tritiu, înlocuirea  $^{19}\text{F}$  cu  $^{18}\text{F}$ , sau înlocuirea  $^{12}\text{C}$  cu  $^{13}\text{C}$  sau  $^{14}\text{C}$  fac parte din scopul dezvoltării. Astfel de compuși sunt utili, de exemplu, ca instrumente analitice sau sonde în testele biologice.

Când este listat un interval de valori, se intenționează ca acesta să cuprindă fiecare valoare și sub-interval din interval. De exemplu "alchil  $\text{C}_{1-6}$ " este destinat să cuprindă alchil  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_{1-6}$ ,  $\text{C}_{1-5}$ ,  $\text{C}_{1-4}$ ,  $\text{C}_{1-3}$ ,  $\text{C}_{1-2}$ ,  $\text{C}_{2-6}$ ,  $\text{C}_{2-5}$ ,  $\text{C}_{2-4}$ ,  $\text{C}_{2-3}$ ,  $\text{C}_{3-6}$ ,  $\text{C}_{3-5}$ ,  $\text{C}_{3-4}$ ,  $\text{C}_{4-6}$ ,  $\text{C}_{4-3}$ , și  $\text{C}_{5-6}$ .

Termenul "alifatic" se referă la grupări alchil, alchenil, alchinil, și carbociclice. Asemănător, termenul "heteroalifatic" se referă la grupări heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchinil, și heterociclice.

Termenul "alchil" se referă la un radical al unei grupări de hidrocarbură saturată cu catenă liniară sau ramificată având de la 1 până la 10 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-10}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 9 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-9}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 8 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-8}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 7 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-7}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 6 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-6}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 5 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-5}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 4 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-4}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 3 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-3}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 la 2 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{1-2}$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 1 atom de carbon ("alchil  $\text{C}_1$ "). În unele variante de realizare, o grupare alchil are 2 la 6 atomi de carbon ("alchil  $\text{C}_{2-6}$ "). Exemple de grupări alchil  $\text{C}_{1-6}$  includ metil ( $\text{C}_1$ ), etil ( $\text{C}_2$ ), propil ( $\text{C}_3$ ) (*de exemplu*, n-propil, izopropil), butil ( $\text{C}_4$ ) (*de exemplu*, n-butyl, terț-butyl, sec-butyl, izo-butyl), pentil ( $\text{C}_5$ ) (*de exemplu*, n-pentil, 3-pentanil, amil, neopentil, 3-metil-2-butanil, amil terțiar), și hexil ( $\text{C}_6$ ) (*de exemplu*, n-hexil). Exemple suplimentare de grupări alchil includ n-heptil ( $\text{C}_7$ ), n-octil ( $\text{C}_8$ ), și altele asemenea. Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare alchil este independent nesubstituită (un "alchil nesubstituit") sau substituită (un "alchil substituit") cu unul sau mai mulți substituenți (*de exemplu*, halogen, cum ar fi F). În anumite variante de realizare, gruparea alchil este un alchil  $\text{C}_{1-10}$  nesubstituit (cum ar fi alchil  $\text{C}_{1-6}$  nesubstituit, *de exemplu*,  $-\text{CH}_3$  (Me), etil nesubstituit (Et), propil nesubstituit (Pr, *de exemplu*, n-propil nesubstituit (n-Pr), izopropil nesubstituit (i-Pr)), butil nesubstituit (Bu, *de exemplu*, n-butyl nesubstituit (n-Bu), terț-butyl nesubstituit (terț-Bu sau t-Bu), sec-butyl nesubstituit (sec-Bu), izobutil nesubstituit (i-Bu)). În anumite variante de realizare, gruparea alchil este un alchil  $\text{C}_{1-10}$  substituit (cum ar fi alchil  $\text{C}_{1-6}$  substituit, *de exemplu*,  $-\text{CF}_3$ , Bn).

Termenul "haloalchil" este o grupare alchil substituită, în care unul sau mai mulți atomi de hidrogen sunt înlocuiți independent cu un halogen, *de exemplu*, fluor, brom, clor sau iod. În unele variante de realizare, fragmentul de haloalchil are 1 la 8 atomi de carbon ("haloalchil  $\text{C}_{1-8}$  "). În unele variante de realizare, fragmentul de haloalchil are 1 la 6 atomi de carbon ("haloalchil  $\text{C}_{1-6}$  "). În unele variante de realizare, fragmentul de haloalchil are 1 la 4 atomi de carbon ("haloalchil  $\text{C}_{1-4}$  "). În unele variante de realizare, fragmentul de haloalchil are 1 la 3 atomi de carbon ("haloalchil  $\text{C}_{1-3}$  "). În unele variante de realizare, fragmentul de haloalchil are 1 la 2 atomi de carbon ("haloalchil  $\text{C}_{1-2}$  "). Exemple de grupări haloalchil includ  $-\text{CHF}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{F}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CCl}_3$ ,  $-\text{CFCl}_2$ ,  $-\text{CF}_2\text{Cl}$ , și altele asemenea.

Termenul "heteroalchil" se referă la o grupare alchil, care include în plus cel puțin un heteroatom (*de exemplu*, 1, 2, 3, sau 4 heteroatomi) selectați dintre oxigen, azot sau sulf în (adică, inserați între atomi de carbon adiacenți ai) și/sau plasați la una sau mai multe poziții terminale ale lanțului părinte. În anumite

exemple de realizare, o grupare heteroalchil se referă la o grupare saturată având de la 1 la 10 atomi de carbon și 1 sau mai mulți heteroatomi în cadrul lanțului părinte ("heteroalchil C<sub>1-10</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 9 atomi de carbon și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-9</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 8 atomi de carbon și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-8</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 7 atomi de carbon și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-7</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 6 atomi de carbon și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 5 atomi de carbon și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-5</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 4 atomi de carbon și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-4</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 3 atomi de carbon și 1 heteroatom în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-3</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 la 2 atomi de carbon și 1 heteroatom în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>1-2</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 1 atom de carbon și 1 heteroatom ("heteroalchil C<sub>1</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchil este o grupare saturată având 2 la 6 atomi de carbon și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchil C<sub>2-6</sub>"). Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare heteroalchil este independent nesubstituit (un "heteroalchil nesubstituit") sau substituit (un "heteroalchil substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea heteroalchil este un heteroalchil C<sub>1-10</sub> nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea heteroalchil este un heteroalchil C<sub>1-10</sub> substituit.

Termenul "alchenil" se referă la un radical al unei grupări hidrocarburi cu catenă liniară sau ramificată având de la 2 la 10 atomi de carbon și una sau mai multe legături duble carbon-carbon (de exemplu, 1, 2, 3 sau 4 legături duble). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 la 9 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2-9</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 la 8 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2-8</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 la 7 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2-7</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 la 6 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 la 5 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2-5</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 la 4 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2-4</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 la 3 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2-3</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchenil are 2 atomi de carbon ("alchenil C<sub>2</sub>"). Respectiva una sau mai multe duble legături carbon-carbon pot fi interne (cum ar fi în 2-butenil) sau terminale (cum ar fi în 1-butenil). Exemple de grupări alchenil C<sub>2-4</sub> includ etenil (C<sub>2</sub>), 1-propenil (C<sub>3</sub>), 2-propenil (C<sub>3</sub>), 1-butenil (C<sub>4</sub>), 2-butenil (C<sub>4</sub>), butadienil (C<sub>4</sub>), și altele asemenea. Exemple de grupări alchenil C<sub>2-6</sub> includ grupările alchenil C<sub>2-4</sub> menționate anterior precum și pentenil (C<sub>5</sub>), pentadienil (C<sub>5</sub>), hexenil (C<sub>6</sub>), și altele asemenea. Exemple suplimentare de alchenil includ heptenil (C<sub>7</sub>), octenil (C<sub>8</sub>), octatrienil (C<sub>8</sub>), și altele asemenea. Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare alchenil este independent nesubstituit (un "alchenil nesubstituit") sau substituit (un "alchenil substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea alchenil este un alchenil C<sub>2-10</sub> nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea alchenil este un alchenil C<sub>2-10</sub> substituit. Într-o grupare alchenil, o legătură dublă C=C pentru care stereochemia nu este



specificată (de exemplu, -CH=CHCH<sub>3</sub> sau

poate fi o legătură dublă (E)- sau (Z).

Termenul "heteroalchenil" se referă la o grupare alchenil, care include în plus cel puțin un heteroatom (*de exemplu*, 1, 2, 3, sau 4 heteroatomi) selectați dintre oxigen, azot, sau sulf în cadrul (adică, inserați între atomi de carbon adiacenți ai) și/sau plasați la una sau mai multe poziții terminale ale lanțului părinte. În anumite variante de realizare, o grupare heteroalchenil se referă la o grupare având de la 2 la 10 atomi de carbon, cel puțin o legătură dublă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchenil C<sub>2-10</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 9 atomi de carbon cel puțin o legătură dublă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchenil C<sub>2-9</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 8 atomi de carbon, cel puțin o legătură dublă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchenil C<sub>2-8</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 7 atomi de carbon, cel puțin o legătură dublă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchenil C<sub>2-7</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 6 atomi de carbon, cel puțin o legătură dublă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchenil C<sub>2-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 5 atomi de carbon, cel puțin o legătură dublă, și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("heteroalchenil C<sub>2-5</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 4 atomi de carbon, cel puțin o

legătură dublă, și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchenil C<sub>2-4</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 3 atomi de carbon, cel puțin o legătură dublă, și 1 heteroatom în lanțul părinte ("hetero alchenil C<sub>2-3</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchenil are 2 la 6 atomi de carbon, cel puțin o legătură dublă, și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchenil C<sub>2-6</sub>"). Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare heteroalchenil este independent nesubstituită (un "heteroalchenil nesubstituit") sau substituită (un "heteroalchenil substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea heteroalchenil este un hetero alchenil C<sub>2-10</sub> nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea heteroalchenil este un hetero alchenil C<sub>2-10</sub> substituit.

Termenul "alchinil" se referă la un radical al unei grupări de hidrocarbură cu catenă liniară sau ramificată având de la 2 la 10 atomi de carbon și una sau mai multe legături triple carbon-carbon (*de exemplu*, 1, 2, 3, sau 4 legături triple) ("alchinil C<sub>2-10</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 la 9 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2-9</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 la 8 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2-8</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 la 7 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2-7</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 la 6 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 la 5 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2-5</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 la 4 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2-4</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 la 3 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2-3</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare alchinil are 2 atomi de carbon ("alchinil C<sub>2</sub>"). Respectiva una sau mai multe legături triple carbon-carbon pot fi interne (cum ar fi în 2-butilinil) sau terminale (cum ar fi în 1-butilinil). Exemple de grupări alchinil C<sub>2-4</sub> includ, fără limitare, etinil (C<sub>2</sub>), 1-propinil (C<sub>3</sub>), 2-propynil (C<sub>3</sub>), 1-butilinil (C<sub>4</sub>), 2-butilinil (C<sub>4</sub>), și altele asemenea. Exemple de grupări alchenil C<sub>2-6</sub> includ grupările alchinil C<sub>2-4</sub> menționate anterior precum și pentinil (C<sub>5</sub>), hexinil (C<sub>6</sub>), și altele asemenea. Exemple suplimentare de alchinil include heptinil (C<sub>7</sub>), octinil (C<sub>8</sub>), și altele asemenea. Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare alchinil este independent nesubstituită (un "alchinil nesubstituit") sau substituită (un "alchinil substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea alchinil este un alchinil C<sub>2-10</sub> nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea alchinil este un alchinil C<sub>2-10</sub> substituit.

Termenul "heteroalchinil" se referă la o grupare alchinil, care include în plus cel puțin un heteroatom (*de exemplu*, 1, 2, 3, sau 4 heteroatomi) selectați dintre oxigen, azot, sau sulf din (adică, inserați între atomi de carbon adiacenți ai) și/sau plasați la una sau mai multe poziții terminale ale lanțului părinte. În anumite variante de realizare, o grupare heteroalchinil se referă la o grupare având de la 2 la 10 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-10</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 9 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-9</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 8 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-8</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 7 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-7</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 6 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau mai mulți heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 5 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-5</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 4 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-4</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 3 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 heteroatom în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-3</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare heteroalchinil are 2 la 6 atomi de carbon, cel puțin o legătură triplă, și 1 sau 2 heteroatomi în lanțul părinte ("hetero alchinil C<sub>2-6</sub>"). Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare heteroalchinil este independent nesubstituită (un "heteroalchinil nesubstituit") sau substituită (un "heteroalchinil substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea heteroalchinil este un hetero alchinil C<sub>2-10</sub> nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea heteroalchinil este un hetero alchinil C<sub>2-10</sub> substituit.

Termenul "carbociclic" sau "carbociclic" se referă la un radical dintr-o grupare de hidrocarbură ciclică nearomatică având de la 3 până la 14 atomi de carbon în ("carbociclic C<sub>3-14</sub>") și zero heteroatomi în sistemul de inel nearomatic. În unele variante de realizare, o grupare carbociclic are 3 la 10 atomi de carbon în inel ("carbociclic C<sub>3-10</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare carbociclic are 3 la 8 atomi de carbon în inel ("carbociclic C<sub>3-8</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare carbociclic are 3 la 7 atomi de carbon în inel ("carbociclic C<sub>3-7</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare carbociclic are 3 la 6 atomi de

carbon în inel ("carbociclii C<sub>3-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare carbociclii are 4 la 6 atomi de carbon în inel ("carbociclii C<sub>4-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare carbociclii are 5 la 6 atomi de carbon în inel ("carbociclii C<sub>5-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare carbociclii are 5 la 10 atomi de carbon în inel ("carbociclii C<sub>5-10</sub>"). Grupări carbociclii C<sub>3-6</sub> exemplificative includ, fără limitare, ciclopropil (C<sub>3</sub>), ciclopropenil (C<sub>3</sub>), ciclobutil (C<sub>4</sub>), ciclobutenil (C<sub>4</sub>), ciclopentil (C<sub>5</sub>), ciclopentenil (C<sub>5</sub>), ciclohexil (C<sub>6</sub>), ciclohexenil (C<sub>6</sub>), ciclohexadienil (C<sub>6</sub>), și altele asemenea. Grupări carbociclii C<sub>3-8</sub> exemplificative includ, fără limitare, grupările carbociclii C<sub>3-6</sub> menționate anterior precum și cicloheptil (C<sub>7</sub>), cicloheptenil (C<sub>7</sub>), cicloheptadienil (C<sub>7</sub>), cicloheptatrienil (C<sub>7</sub>), ciclooctil (C<sub>8</sub>), ciclooctenil (C<sub>8</sub>), biciclo[2,2,1]heptanil (C<sub>7</sub>), biciclo[2,2,2]octanil (C<sub>8</sub>), și altele asemenea. Grupări carbociclii C<sub>3-10</sub> exemplificative include, fără limitare, grupările carbociclii C<sub>3-8</sub> menționate anterior precum și ciclononil (C<sub>9</sub>), ciclononenil (C<sub>9</sub>), ciclodecil (C<sub>10</sub>), ciclodecenil (C<sub>10</sub>), octahidro-1H-indenil (C<sub>9</sub>), decahidronaftalenil (C<sub>10</sub>), spiro[4,5]decanil (C<sub>10</sub>), și altele asemenea. Așa cum ilustrează exemplele anterioare, în anumite variante de realizare, gruparea carbociclii este fie monociclică ("carbociclii monociclic") fie policiclică (*de exemplu*, care conțin un sistem de inel condensat, cu punte sau spiro cum ar fi un sistem biciclic ("carbociclii biciclic") sau un sistem triciclic ("carbociclii triciclic")) și poate fi saturat sau poate conține una sau mai multe legături carbon-carbon duble sau triple "Carbociclii" include, de asemenea, sisteme de inele în care inelul carbociclii, așa cum este definit mai sus, este condensat cu una sau mai multe grupări aril sau heteroaril în care punctul de atașare este pe inelul carbociclii și, în astfel de cazuri, numărul de atomi de carbon continuă să desemneze numărul de atomi de carbon din sistemul de inel carbociclic. Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare carbociclii este independent nesubstituită (un "carbociclii nesubstituit") sau substituită (un "carbociclii substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea carbociclii este un carbociclii C<sub>3-14</sub> nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea carbociclii este un carbociclii C<sub>3-14</sub> substituit.

În unele variante de realizare, "carbociclii" este o grupare carbociclii monociclică saturată, având de la 3 la 14 atomi de carbon în inel (cicloalchil C<sub>3-14</sub>). În unele variante de realizare, o grupare cicloalchil are 3 la 10 atomi de carbon în inel ("cicloalchil C<sub>3-10</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare cicloalchil are 3 la 8 atomi de carbon în inel ("cicloalchil C<sub>3-8</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare cicloalchil are 3 la 6 atomi de carbon în inel ("cicloalchil C<sub>3-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare cicloalchil are 4 la 6 atomi de carbon în inel ("cicloalchil C<sub>4-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare cicloalchil are 5 la 6 atomi de carbon în inel ("cicloalchil C<sub>5-6</sub>"). În unele variante de realizare, o grupare cicloalchil are 5 la 10 atomi de carbon în inel ("cicloalchil C<sub>5-10</sub>"). Exemple de grupări cicloalchil C<sub>3-6</sub> includ ciclopropil (C<sub>3</sub>) și ciclohexil (C<sub>6</sub>), Exemple de grupări cicloalchil C<sub>3-6</sub> include grupările cicloalchil C<sub>3-6</sub> menționate anterior precum și ciclopropil (C<sub>3</sub>) și ciclobutil (C<sub>4</sub>). Exemple de grupări cicloalchil C<sub>3-8</sub> includ grupările cicloalchil C<sub>3-6</sub> menționate anterior precum și cicloheptil (C<sub>7</sub>) și ciclooctil (C<sub>8</sub>). Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare cicloalchil este independent nesubstituită (un "cicloalchil nesubstituit") sau substituită (un "cicloalchil substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea cicloalchil este un cicloalchil C<sub>3-14</sub> nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea cicloalchil este un cicloalchil C<sub>3-14</sub> substituit.

Termenul "heterociclii" sau "heterociclic" se referă la un radical dintr-un sistem de inel nearomatic cu 3 până la 14 atomi având atomi de carbon în inel și 1 până la 4 heteroatomi în inel, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heterociclii cu 3-14 membri"). În grupările heterociclii care conțin unul sau mai mulți atomi de azot, punctul de atașare poate fi un atom de carbon sau de azot, după cum permite valența. O grupare heterociclii poate fi fie monociclică ("heterociclii monociclic"), fie policiclică (*de exemplu*, un sistem inel condensat, cu punte sau spiro cum ar fi un sistem biciclic ("heterociclii biciclic") sau un sistem triciclic ("heterociclii triciclic")) și poate fi saturat sau poate conține una sau mai multe legături duble sau triple carbon-carbon. Sistemele de inele heterociclice pot include unul sau mai mulți heteroatomi în unul sau ambele inele. "Heterociclii" include, de asemenea, sisteme de inele în care inelul heterociclii, așa cum a fost definit mai sus, este condensat cu una sau mai multe grupări carbociclii în care punctul de atașare este fie pe inelul carbociclii, fie pe inelul heterociclii, sau sisteme inelare în care inelul heterociclii, așa cum este definit mai sus, este condensat cu una sau mai multe grupări aril sau heteroaril, în care punctul de atașare este pe inelul heterociclii, și în astfel de cazuri, numărul de membri ai inelului continuă să desemneze numărul de membri ai inelului din sistemul inelului heterociclii. Dacă nu este specificat altfel, fiecare exemplu de heterociclii este independent nesubstituit (un "heterociclii nesubstituit") sau substituit (un "heterociclii substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea heterociclii este un heterociclii nesubstituit cu 3-14 membri. În anumite variante de realizare, gruparea heterociclii este un heterociclii substituit cu 3-14 membri.

În unele variante de realizare, o grupare heterociclii este un sistem inelar nearomatic cu 5-10

membri având atomi de carbon în inel și 1-4 heteroatomi în inel, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heterocicilul cu 5-10 membri"). În unele variante de realizare, o grupare heterocicilul este un sistem inelar nearomatic cu 5-8 membri având atomi de carbon în inel și 1-4 heteroatomi în inel, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heterocicilul cu 5-8 membri"). În unele variante de realizare, o grupare heterocicilul este un sistem inelar nearomatic cu 5-6 membri având atomi de carbon în inel și 1-4 heteroatomi în inel, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heterocicilul cu 5-6 membri"). În unele variante de realizare, heterocicilul cu 5-6 membri are 1-3 heteroatomi în inel selectați dintre azot, oxigen, și sulf. În unele variante de realizare, heterocicilul cu 5-6 membri are 1-2 heteroatomi în inel selectați dintre azot, oxigen, și sulf. În unele variante de realizare, heterocicilul cu 5-6 membri are 1 heteroatom în inel selectat dintre azot, oxigen, și sulf. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

Grupări heterocicilul cu 3 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom includ, fără limitare, azirdinil, oxiranil, și tiiranil. Grupări heterocicilul cu 4 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom includ, fără limitare, azetidil, oxetanil, și tietanil. Grupări heterocicilul cu 5 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom includ, fără limitare, tetrahidrofuranyl, dihidrofuranyl, tetrahidrotiofenil, dihidrotiofenil, pirolidinil, dihidropirolil, și pirolil-2,5-dionă. Grupări heterocicilul cu 5 membri exemplificative care conțin 2 heteroatomi include, fără limitare, dioxolanil, oxatiolanil și ditiolanil. Grupări heterocicilul cu 5 membri exemplificative care conțin 3 heteroatomi include, fără limitare, triazolinil, oxadiazolinil, și tiadiazolinil. Grupări heterocicilul cu 6 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom include, fără limitare, piperidinil, tetrahidropiranil, dihidropiridinil, și tianil. Grupări heterocicilul cu 6 membri exemplificative care conțin 2 heteroatomi include, fără limitare, piperazinil, morfolinil, ditianil, și dioxanil. Grupări heterocicilul exemplificative cu 6 membri care conțin 2 heteroatomi includ, fără limitare, triazinanil. Grupări heterocicilul cu 7 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom include, fără limitare, azepanil, oxepanil și tiepanil. Grupări heterocicilul exemplificative cu 8 membri care conțin 1 heteroatom include, fără limitare, azocanil, oxecanil și tiocanil. Grupări heterocicilul biciclice exemplificative include, fără limitare, indolinil, izoindolinil, dihidrobenzofuranil, dihidrobenzotienil, tetrahidrobenzotienil, tetrahidrobenzofuranil, tetrahidroindolil, tetrahidrochinolinil, tetrahidroizochinolinil, decahidrochinolinil, decahidroizochinolinil, octahidrocromenil, octahidroizocromenil, decahidronaftiridinil, decahidro-1,8-naftiridinil, octahidropirolol[3,2-b]pirol, indolinil, ftalimidil, naftalimidil, cromanil, cromenil, 1H-benzo[e][1,4]diazepinil, 1,4,5,7-tetrahidropirano[3,4-b]pirolil, 5,6-dihidro-4H-furo[3,2-b]pirolil, 6,7-dihidro-5H-furo[3,2-b]piranil, 5,7-dihidro-4H-tieno[2,3-c]piranil, 2,3-dihidro-1H-pirolol[2,3-b]piridinil, 2,3-dihidrofuro[2,3-b]piridinil, 4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirolol[2,3-b]piridinil, 4,5,6,7-tetrahidrofuro[3,2-c]piridinil, 4,5,6,7-tetrahidrotieno[3,2-b]piridinil, 1,2,3,4-tetrahidro-1,6-naftiridinil, și altele asemenea.

Termenul "aril" se referă la un radical al unui sistem inelar aromatic  $4n+2$  monociclic sau policiclic (de exemplu, biciclic sau triciclic) (de exemplu, având 6, 10 sau 14 electroni  $\pi$  puși în comun într-o matrice ciclică) având 6-14 inele atomi de carbon și zero heteroatomi furnizați în sistemul inelar aromatic ("aril  $C_{6-14}$ "). În unele variante de realizare, o grupare aril are 6 atomi de carbon în inel ("aril  $C_6$ "; de exemplu, fenil). În unele variante de realizare, o grupare aril are 10 atomi de carbon în inel ("aril  $C_{10}$  de exemplu, naftil cum ar fi 1-naftil și 2-naftil). În unele variante de realizare, o grupare aril are 14 atomi de carbon în inel ("aril  $C_{14}$  "; de exemplu, antracil). "Aril" include, de asemenea, sisteme inelare în care inelul aril, așa cum este definit mai sus, este condensat cu una sau mai multe grupări carbocicilul sau heterocicilul în care radicalul sau punctul de atașare este pe inelul aril și, în astfel de cazuri, numărul de atomi de carbon continuă să indice numărul de atomi de carbon din sistemul de inel aril. Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare aril este independent nesubstituită (un "aril nesubstituit") sau substituită (un "aril substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea aril este un aril  $C_{6-14}$  nesubstituit. În anumite variante de realizare, gruparea aril este un aril  $C_{6-14}$  substituit.

Termenul "heteroaril" se referă la un radical monociclic sau policiclic cu 5-14 membri (de exemplu, sistem inelar aromatic  $4n+2$  biciclic, triciclic) (de exemplu, având 6, 10, sau 14  $\pi$  electroni puși în comun într-o matrice ciclică) având atomi de carbon în ciclu și 1-4 heteroatomi în inel furnizați în sistemul inelar aromatic, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heteroarilul cu 5-14 membri"). În grupările heteroaril care conțin unul sau mai mulți atomi de azot, punctul de atașare poate fi un atom de carbon sau de azot, după cum permite valența. Sistemele inelare heteroaril policiclice pot include unul sau mai mulți heteroatomi în unul sau ambele inele. "Heteroaril" include sisteme inelare în care inelul heteroaril, așa cum este definit mai sus, este condensat cu una sau mai multe grupări carbocicilul sau heterocicilul în care punctul de atașare este pe inelul heteroaril și, în astfel de cazuri, numărul de membri ai inelului continuă să indice numărul de membri ai inelului din



sistemul inelar heteroaril. "Heteroaril" include, de asemenea, sisteme inelare în care inelul heteroaril, așa cum este definit mai sus, este condensat cu una sau mai multe grupări aril în care punctul de atașare este fie pe inelul aril, fie pe inelul heteroaril și, în astfel de cazuri, numărul de membri ai inelului indică numărul de membri ai inelului din sistemul inelar condensat (aril/heteroaril). Grupări heteroaril policiclice în care un inel nu conține niciun heteroatom (*de exemplu*, indolil, chinolinil, carbazolil, și altele asemenea) punctul de atașare poate fi pe oricare inel, adică fie pe inelul care poartă un heteroatom (*de exemplu*, 2-indolil) sau pe inelul care nu conține un heteroatom (*de exemplu*, 5-indolil).

În unele variante de realizare, o grupare heteroaril este un sistem inelar aromatic cu 5-10 membri având atomi de carbon în inel și 1-4 heteroatomi în inel furnizați în sistemul inelar aromatic, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heteroaril cu 5-0 membri"). În unele variante de realizare, o grupare heteroaril este un sistem inelar aromatic cu 5-8 membri având atomi de carbon în inel și 1-4 heteroatomi în inel furnizați în sistemul inelar aromatic, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heteroaril cu 5-8 membri"). În unele variante de realizare, o grupare heteroaril este un sistem inelar aromatic cu 5-6 membri având atomi de carbon în inel și 1-4 heteroatomi în inel furnizați în sistemul inelar aromatic, în care fiecare heteroatom este selectat independent dintre azot, oxigen și sulf ("heteroaril cu 5-6 membri"). În unele variante de realizare, heteroarilul cu 5-6 membri are 1-3 heteroatomi în ciclul selectați dintre azot, oxigen și sulf. În unele variante de realizare, heteroarilul cu 5-6 membri are 1-2 heteroatomi în inel selectați dintre azot, oxigen și sulf. În unele variante de realizare, heteroarilul cu 5-6 membri are 1 heteroatom în inel selectat dintre azot, oxigen și sulf. Dacă nu este specificat altfel, fiecare caz de grupare heteroaril este independent nesubstituită (un "heteroaril nesubstituit") sau substituită (un "heteroaril substituit") cu unul sau mai mulți substituenți. În anumite variante de realizare, gruparea heteroaril este un heteroaril nesubstituit cu 5-14 membri. În anumite variante de realizare, gruparea heteroaril este un heteroaril substituit cu 5-14 membri.

Grupări heteroaril cu 5 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom includ, fără limitare, pirolil, furanil, și tiofenil. Grupări heteroaril cu 5 membri exemplificative care conțin 2 heteroatomi includ, fără limitare, imidazolil, pirazolil, oxazolil, izoxazolil, tiazolil, și izotiazolil. Grupări heteroaril cu 5 membri exemplificative care conțin 3 heteroatomi includ, fără limitare, triazolil, oxadiazolil, și tiadiazolil. Grupări heteroaril cu 5 membri exemplificative care conțin 4 heteroatomi includ, fără limitare, tetrazolil. Grupări heteroaril cu 6 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom includ, fără limitare, piridinil. Grupări heteroaril cu 6 membri exemplificative care conțin 2 heteroatomi includ, fără limitare, piridazinil, pirimidinil, și pirazinil. Grupări heteroaril cu 6 membri exemplificative care conțin 3 sau 4 heteroatomi includ, fără limitare, triazinil și respectiv tetrazinil. Grupări heteroaril cu 7 membri exemplificative care conțin 1 heteroatom includ, fără limitare, azepinil, oxepinil, și tiepinil. Grupări heteroaril 5,6-biciclic exemplificative includ, fără limitare, indolil, izoindolil, indazolil, benzotriazolil, benzotiofenil, izobenzotiofenil, benzofuranil, benzoizofuranil, benzimidazolil, benzoxazolil, benzioxazolil, benzoxadiazolil, benzotiazolil, benzotiazolil, benzotiadiazolil, indolizinil, și purinil. Grupări heteroaril 6,6-biciclice exemplificative includ, fără limitare, naftiridinil, pteridinil, chinolinil, izochinolinil, cinnolinil, chinoxalinil, ftalazinil, și chinazolinil. Grupări heteroaril triciclice exemplificative includ, fără limitare, fenantridinil, dibenzofuranil, carbazolil, acridinil, fenotiazinil, fenoxazinil și fenazinil.

Termenul "legătură nesaturată" se referă la o legătură dublă sau triplă. Termenul "nesaturat" sau "parțial nesaturat" se referă la un fragment care include cel puțin o legătură dublă sau triplă. Termenul "saturat" se referă la un fragment care nu conține o legătură dublă sau triplă, *adică*, fragmentul conține doar legături simple.

Atașarea sufixului "-en" la o grupare indică faptul că gruparea este un fragment divalent, *de exemplu*, alchilen este fragmentul divalent de alchil, alchenilen este fragmentul divalent de alchenil, alchinilen este fragmentul divalent de alchinil, heteroalchilen este fragmentul divalent de heteroalchil, heteroalchenilen este fragmentul divalent de heteroalchenil, heteroalchinilen este fragmentul divalent de heteroalchinil, carbociclilen este fragmentul divalent de carbocicilil, heterociclilen este fragmentul divalent de heterocicilil, arilen este fragmentul divalent de aril, și heteroarilen este fragmentul divalent de heteroaril.

O grupare este opțional substituită, dacă nu este specificat altfel. Termenul "opțional substituit" se referă la a fi substituit sau nesubstituit. În anumite variante de realizare, grupările alchil, alchenil, alchinil, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchinil, carbocicilil, heterocicilil, aril, și heteroaril sunt opțional substituite. "Opțional substituit" se referă la o grupare care poate fi substituită sau nesubstituită (*de exemplu*, grupare alchil "substituită" sau "nesubstituită", alchenil "substituită" sau "nesubstituită",

alchilul "substituită" sau "nesubstituită", heteroalchil "substituită" sau "nesubstituită", heteroalchenil "substituită" sau "nesubstituită", heteroalchilul "substituită" sau "nesubstituită", carbocicilul "substituită" sau "nesubstituită", heterocicilul "substituită" sau "nesubstituită", aril "substituită" sau "nesubstituită" sau heteroarilul "substituită" sau "nesubstituită"). În general, termenul "substituit" înseamnă că, cel puțin un hidrogen prezent pe o grupare este înlocuit cu un substituent permisibil, *de exemplu*, un substituent a cărui substituție are ca rezultat un compus stabil, *de exemplu*, un compus care nu suferă în mod spontan transformare, cum ar fi prin rearanjare, ciclizare, eliminare sau altă reacție. Dacă nu se indică altfel, o grupare "substituită" are un substituent la una sau mai multe poziții substituibile ale grupării, iar când este substituită mai mult de o poziție în orice structură dată, substituentul este fie același, fie diferit la fiecare poziție. Termenul "substituit" este considerat a include substituția cu toți substituenții permisibili ai compușilor organici și include oricare dintre substituenții descriși aici care are ca rezultat formarea unui compus stabil. Prezenta invenție are în vedere oricare și toate astfel de combinații pentru a ajunge la un compus stabil. Pentru scopurile acestei invenții, heteroatomi cum ar fi azotul pot avea substituenți hidrogen și/sau orice substituent adecvat așa cum este descris aici, care satisface valențele heteroatomilor și are ca rezultat formarea unui fragment stabil. Invenția nu se intenționează a fi limitată în nici un fel de substituenții exemplificativi descriși aici.

Exemple de substituenți de atomi de carbon includ, dar nu sunt limitați la, -CN, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -OH, -OR<sup>aa</sup>, -ON(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>bb</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -N(OR<sup>cc</sup>)R<sup>bb</sup>, -SH, -SR<sup>aa</sup>, -SSR<sup>cc</sup>, -C(=O)R<sup>aa</sup>, -CO<sub>2</sub>H, -CHO, -C(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -OC(=O)R<sup>aa</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -C(=O)N(R<sup>b</sup>)<sub>2</sub>, -OC(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>C(=O)R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>C(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>bb</sup>)R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)OR<sup>aa</sup>, -OC(=NR<sup>bb</sup>)R<sup>aa</sup>, -OC(=NR<sup>bb</sup>)OR<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -OC(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)NR<sup>bb</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>aa</sup>, -OSO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -S(=O)R<sup>aa</sup>, -OS(=O)R<sup>aa</sup>, -Si(R<sup>aa</sup>)<sub>3</sub>, -OSi(R<sup>aa</sup>)<sub>3</sub>, -C(=S)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)SR<sup>aa</sup>, -C(=S)SR<sup>aa</sup>, -SC(=S)SR<sup>aa</sup>, -SC(=O)SR<sup>aa</sup>, -OC(=O)SR<sup>aa</sup>, -SC(=O)OR<sup>aa</sup>, -SC(=O)R<sup>aa</sup>, -P(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)(N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>P(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>P(=O)(N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -P(OR<sup>cc</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>4</sub>, -P(OR<sup>cc</sup>)<sub>4</sub>, -OP(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -OP(V)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -OP(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -OP(OR<sup>cc</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -OP(R<sup>cc</sup>)<sub>4</sub>, -OP(OR<sup>cc</sup>)<sub>4</sub>, -B(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -B(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -BR<sup>aa</sup>(OR<sup>cc</sup>), alchil C<sub>1-10</sub>, perhaloalchil C<sub>1-10</sub>, alchenil C<sub>2-10</sub>, alchilul C<sub>2-10</sub>, hetero alchil C<sub>1-10</sub>, hetero alchenil C<sub>2-10</sub>, hetero alchilul C<sub>2-10</sub>, carbocicilul C<sub>3-10</sub>, heterocicilul cu 3-14 membri, aril C<sub>6-14</sub>, și heteroarilul cu 5-14 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchilul, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchilul, carbocicilul, heterocicilul, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, sau 5 grupări R<sup>dd</sup>; în care X este un contraion; sau doi hidrogeni geminali de pe un atom de carbon sunt înlocuiți cu gruparea =O, =S, =NN(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, =NNR<sup>bb</sup>C(=O)R<sup>aa</sup>, =NNR<sup>bb</sup>C(=O)OR<sup>aa</sup>, =NNR<sup>bb</sup>S(=O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, =NR<sup>bb</sup>, sau =NOR<sup>cc</sup>; fiecare caz de R<sup>aa</sup> este, independent, selectat dintre alchil C<sub>1-10</sub>, perhaloalchil C<sub>1-10</sub>, alchenil C<sub>2-10</sub>, alchilul C<sub>2-10</sub>, hetero alchil C<sub>1-10</sub>, hetero alchenil C<sub>2-10</sub>, hetero alchilul C<sub>2-10</sub>, carbocicilul C<sub>3-10</sub>, heterocicilul cu 3-14 membri aril, C<sub>6-14</sub>, și heteroarilul cu 5-14 membri, sau două grupări R<sup>aa</sup> sunt unite pentru a forma un inel heterocicilul cu 3-14 membri sau heteroarilul cu 5-14 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchilul, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchilul, carbocicilul, heterocicilul, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5 grupări R<sup>dd</sup>; fiecare caz de R<sup>bb</sup> este, independent, selectat dintre hidrogen, -OH, -OR<sup>aa</sup>, -N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -CN, -C(=O)R<sup>aa</sup>, -C(=O)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)OR<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>cc</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>cc</sup>, -SOR<sup>aa</sup>, -C(=S)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)SR<sup>cc</sup>, -C(=S)SR<sup>cc</sup>, -P(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)(N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, alchil C<sub>1-10</sub>, perhaloalchil C<sub>1-10</sub>, alchenil C<sub>2-10</sub>, alchilul C<sub>2-10</sub>, hetero alchil C<sub>1-10</sub>, hetero alchenil C<sub>2-10</sub>, hetero alchilul C<sub>2-10</sub>, carbocicilul C<sub>3-10</sub>, heterocicilul cu 3-14 membri, aril C<sub>6-14</sub>, și heteroarilul cu 5-14 membri, sau două grupări R<sup>bb</sup> sunt unite pentru a forma un heterocicilul cu 3-14 membri sau inel heteroarilul cu 5-14 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchilul, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchilul, carbocicilul, heterocicilul, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5 grupări R<sup>dd</sup>; în care X<sup>-</sup> este un contraion; fiecare caz de R<sup>cc</sup> este, independent, selectat dintre hidrogen, alchil C<sub>1-10</sub>, perhaloalchil C<sub>1-10</sub>, alchenil C<sub>2-10</sub>, alchilul C<sub>2-10</sub>, hetero alchil C<sub>1-10</sub>, hetero alchenil C<sub>2-10</sub>, hetero alchilul C<sub>2-10</sub>, carbocicilul C<sub>3-10</sub>, heterocicilul cu 3-14 membri, aril C<sub>6-14</sub>, și heteroarilul cu 5-14 membri, sau două R<sup>cc</sup> grupări sunt unite pentru a forma un heterocicilul cu 3-14 membri sau un inel heteroarilul cu 5-14 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchilul, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchilul, carbocicilul, heterocicilul, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5 grupări R<sup>dd</sup>; fiecare caz de R<sup>dd</sup> este, independent, selectat dintre halogen, -CN, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -OH, -OR<sup>ee</sup>, -ON(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>ff</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -N(OR<sup>ee</sup>)R<sup>ff</sup>, -SH, -SR<sup>ee</sup>, -SSR<sup>ee</sup>, -C(=O)R<sup>ee</sup>, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>R<sup>ee</sup>, -OC(=O)R<sup>ee</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>ee</sup>, -C(=O)N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -OC(=O)N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>ff</sup>C(=O)R<sup>ee</sup>, -NR<sup>ff</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>ee</sup>, -NR<sup>ff</sup>C(=O)N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>ff</sup>)OR<sup>cc</sup>, -OC(=NR<sup>ff</sup>)R<sup>ee</sup>, -OC(=NR<sup>ff</sup>)OR<sup>ee</sup>, -C(=NR<sup>ff</sup>)N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -OC(=NR<sup>ff</sup>)N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>ff</sup>C(-NR<sup>ff</sup>)N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>ff</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>ee</sup>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>ee</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>22</sup>, -OSO<sub>2</sub>R<sup>ee</sup>, -S(=O)R<sup>ee</sup>, -Si(R<sup>ee</sup>)<sub>3</sub>, -OSi(R<sup>ee</sup>)<sub>3</sub>, -C(=S)N(R<sup>ff</sup>)<sub>2</sub>, -C(-O)SR<sup>ee</sup>, -C(=S)SR<sup>ee</sup>, -SC(=S)SR<sup>ee</sup>, -P(=O)(OR<sup>ee</sup>)<sub>2</sub>,

-P(=O)(R<sup>ee</sup>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(R<sup>ee</sup>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OR<sup>ee</sup>)<sub>2</sub>, alchil C<sub>1-6</sub>, perhaloalchil C<sub>1-6</sub>, alchenil C<sub>2-6</sub>, alchinil C<sub>2-6</sub>, hetero alchil C<sub>1-6</sub>, hetero alchenil C<sub>2-6</sub>, hetero alchinil C<sub>2-6</sub>, carbocicilil C<sub>3-10</sub>, heterocicilil cu 3-10 membri, aril C<sub>6-10</sub>, heteroaril cu 5-10 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchinil, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchinil, carbocicilil, heterocicilil, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5 grupări R<sup>eg</sup>, sau doi substituenți R<sup>dd</sup> geminali pot fi uniți pentru a forma =O sau =S; în care X<sup>-</sup> este un contraion;

fiecare caz de R<sup>ee</sup> este, independent, selectată dintre C<sub>1-6</sub> alchil, C<sub>1-6</sub> perhaloalchil, C<sub>2-6</sub> alchenil, C<sub>2-6</sub> alchinil, hetero alchil C<sub>1-6</sub>, hetero alchenil C<sub>2-6</sub>, hetero alchinil C<sub>2-6</sub>, C<sub>3-10</sub> carbocicilil, C<sub>6-10</sub> aril, heterocicilil cu 3-10 membri, și heteroaril cu 3-10 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchinil, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchinil, carbocicilil, heterocicilil, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5 grupări R<sup>eg</sup>;

fiecare caz de R<sup>ff</sup> este, independent, selectat dintre hidrogen, C<sub>1-6</sub> alchil, C<sub>1-6</sub> perhaloalchil, C<sub>2-6</sub> alchenil, alchinil C<sub>2-6</sub>, hetero alchil C<sub>1-6</sub>, hetero alchenil C<sub>2-6</sub>, hetero alchinil C<sub>2-6</sub>, carbocicilil C<sub>3-10</sub>, heterocicilil cu 3-10 membri, aril C<sub>6-10</sub> și heteroaril cu 5-10 membri, sau două grupări R<sup>ff</sup> sunt unite pentru a forma un inel heterocicilil cu 3-10 membri sau heteroaril cu 5-10 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchinil, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchinil, carbocicilil, heterocicilil, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5 grupări R<sup>eg</sup>; și

fiecare caz de R<sup>gg</sup> este, independent, halogen, -CN, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -OH, -O alchil C<sub>1-6</sub>, -ON(alchil C<sub>1-6</sub>), -N(alchil C<sub>1-6</sub>), -N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -NH(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -NH<sub>2</sub>( alchil C<sub>1-6</sub>)<sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -N(O alchil C<sub>1-6</sub>)( alchil C<sub>1-6</sub>), -N(OH)( alchil C<sub>1-6</sub>), -NH(OH), -SH, -S alchil C<sub>1-6</sub>, -SS(alchil C<sub>1-6</sub>), -C(=O)( alchil C<sub>1-6</sub>), -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>( alchil C<sub>1-6</sub>), -OC(=O)( alchil C<sub>1-6</sub>), -OCO<sub>2</sub>(alchil C<sub>1-6</sub>), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alchil C<sub>1-6</sub>), -NHC(=O)(alchil C<sub>1-6</sub>), -N(alchil C<sub>1-6</sub>)C(=O)(alchil C<sub>1-6</sub>), -NHCO<sub>2</sub>( alchil C<sub>1-6</sub>), -NHC(=O)N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alchil C<sub>1-6</sub>), -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=NH)O(alchil C<sub>1-6</sub>), -OC(=NH)( alchil C<sub>1-6</sub>), -OC(-NH)O alchil C<sub>1-6</sub>, -C(=NH)N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -C(=NH)NH(alchil C<sub>1-6</sub>), -C(=NH)NH<sub>2</sub>, -OC(=NH)N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -OC(NH)NH(alchil C<sub>1-6</sub>), -OC(NH)NH<sub>2</sub>, -NHC(NH)N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>( alchil C<sub>1-6</sub>), -SO<sub>2</sub>N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alchil C<sub>1-6</sub>), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub> alchil C<sub>1-6</sub>, -SO<sub>2</sub>O alchil C<sub>1-6</sub>, -OSO<sub>2</sub> alchil C<sub>1-6</sub>, -SO alchil C<sub>1-6</sub>, -Si(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>3</sub>, -OSi(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>3</sub> -C(=S)N(alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, C(=S)NH(alchil C<sub>1-6</sub>), C(=S)NH<sub>2</sub>, -C(=O)S(alchil C<sub>1-6</sub>), -C(=S)S alchil C<sub>1-6</sub>, -SC(=S)S alchil C<sub>1-6</sub>, -P(=O)(O alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -P(=O)( alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -OP(=O)( alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(O alchil C<sub>1-6</sub>)<sub>2</sub>, alchil C<sub>1-6</sub>, perhaloalchil C<sub>1-6</sub>, alchenil C<sub>2-6</sub>, alchinil C<sub>2-6</sub>, hetero alchil C<sub>1-6</sub>, hetero alchenil C<sub>2-6</sub>, hetero alchinil C<sub>2-6</sub>, carbocicilil C<sub>3-10</sub>, aril C<sub>6-10</sub>, heterocicilil cu 3-10 membri, heteroaril cu 5-10 membri; sau doi substituenți R<sup>gg</sup> geminal pot fi uniți pentru a forma =O sau =S; în care X<sup>-</sup> este un contraion.

Termenul "halo" sau "halogen" se referă la fluor (fluoro, -F), clor (cloro, -Cl), brom (bromo, -Br), sau iod (iodo, -I).

Termenul "hidroxil" sau "hidroxi" se referă la gruparea -OH. Termenul "hidroxi substituit" sau "hidroxil substituit," prin extensie, se referă la o grupare hidroxil în care atomul de oxigen atașat direct la molecula părinte este substituit cu o altă grupare decât hidrogen și include grupări selectate dintre -OR<sup>aa</sup>, -ON(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -OC(=O)SR<sup>aa</sup>, -OC(=O)R<sup>aa</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -OC(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -OC(=NR<sup>bb</sup>)R<sup>aa</sup>, -OC(=NR<sup>bb</sup>)OR<sup>aa</sup>, -OC(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -OS(=O)R<sup>aa</sup>, -OSO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -OSi(R<sup>aa</sup>)<sub>3</sub>, -OP(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -OP(R<sup>aa</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -OP(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -OP(OR<sup>cc</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, -OP(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, și -OP(=O)(N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>), în care X<sup>-</sup>, R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup>, și R<sup>cc</sup> sunt așa cum sunt definite aici.

Termenul "amino" se referă la gruparea -NH<sub>2</sub>. Termenul " amino substituit," prin extensie, se referă la un amino monosubstituit, un amino disubstituit sau un amino trisubstituit. În anumite variante de realizare, "amino substituit" este o grupare amino monosubstituită sau amino disubstituită.

Termenul "amino monosubstituit" se referă la o grupare amino în care atomul de azot atașat direct la molecula părinte este substituit cu un hidrogen și o grupare, alta decât hidrogen, și include grupări selectate dintre -NH(R<sup>bb</sup>), -NHC(=O)R<sup>aa</sup>, -NHCO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NHC(O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NHC(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NHP(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, și -NHP(=O)(N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, în care R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> și R<sup>cc</sup> sunt așa cum au fost definiți aici, și în care R<sup>bb</sup> din gruparea -NH(R<sup>bb</sup>) nu este hidrogen.

Termenul "amino disubstituit" se referă la o grupare amino în care atomul de azot atașat direct la molecula părinte este substituit cu două grupări, altele decât hidrogen, și include grupări selectate dintre -N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup> C(=O)R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>C(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, și -NR<sup>bb</sup>P(=O)(N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, în care R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup>, și R<sup>cc</sup> sunt așa cum sunt definite aici, cu condiția ca atomul de azot atașat direct la molecula părinte să nu fie substituit cu hidrogen.

Termenul "amino trisubstituit" se referă la o grupare amino în care atomul de azot atașat direct la molecula părinte este substituit cu trei grupări și include grupări selectate dintre  $-N(R^{bb})_3$  și  $-N(R^{bb})_3^+X^-$ , în care  $R^{bb}$  și  $X^-$  sunt așa cum sunt definite aici.

5

Termenul "sulfonil" se referă la o grupare selectată dintre  $-SO_2N(R^{bb})_2$ ,  $-SO_2R^{aa}$ , și  $-SO_2OR^{aa}$ , în care  $R^{aa}$  și  $R^{bb}$  sunt așa cum sunt definite aici.

Termenul "sulfinil" se referă la gruparea  $-S(=O)R^{aa}$ , în care  $R^{aa}$  este așa cum a fost definit aici.

10

Termenul "acil" se referă la o grupare având formula generală  $-C(=O)R^{XI}$ ,  $-C(=O)OR^{XI}$ ,  $-C(=O)-O-C(=O)R^{XI}$ ,  $-C(=O)SR^{XI}$ ,  $-C(=O)N(R^{XI})_2$ ,  $-C(=S)R^{XI}$ ,  $-C(=S)N(R^{XI})_2$ , și  $-C(=S)S(R^{XI})$ ,  $-C(=NR^{XI})R^{XI}$ ,  $-C(=NR^{XI})OR^{XI}$ ,  $-C(=NR^{XI})SR^{XI}$ , și  $-C(=NR^{XI})N(R^{XI})_2$ , în care  $R^{XI}$  este hidrogen; halogen; hidroxil substituit sau nesubstituit; tiol substituit sau nesubstituit; amino substituit sau nesubstituit; acil substituit sau nesubstituit, alifatic ciclic sau aciclic, substituit sau nesubstituit, ramificat sau neramificat; heteroalifatic ciclic sau aciclic, substituit sau nesubstituit, ramificat sau neramificat; alchil ciclic sau aciclic, substituit sau nesubstituit, ramificat sau neramificat; alchenil ciclic sau aciclic, substituit sau nesubstituit, ramificat sau neramificat; alchinil substituit sau nesubstituit; aril substituit sau nesubstituit, heteroaril, alifaticoxi, heteroalifaticoxi, alchiloxi, heteroalchiloxi, ariloxi, heteroariloxi, alifatictioxi, heteroalifatictioxi, alchiltioxi, heteroalchiltioxi, ariltioxi, heteroariltioxi, mono- sau di- alifaticamino, mono- sau di- heteroalifaticamino, mono- sau di- alchilamino, mono- sau di- heteroalchilamino, mono- sau di-arilamino, sau mono- sau di-heteroarilamino substituit sau nesubstituit; sau două grupări  $R^{XI}$  luate împreună formează un inel heterociclic cu 5- la 6-membri. Grupări acil exemplificative includ aldehide ( $-CHO$ ), acizi carboxilici ( $-CO_2H$ ), cetone, halogenuri de acil, esteri, amidă, imine, carbonați, carbamați, și uree. Substituenții acil includ, dar nu se limitează la, oricare dintre substituenții descriși aici, care au ca rezultat formarea unui fragment stabil (*de exemplu*, alifatic, alchil, alchenil, alchinil, heteroalifatic, heterociclic, aril, heteroaril, acil, oxo, imino, tiooxo, ciano, izociano, amino, azido, nitro, hidroxil, tiol, halo, alifaticamino, heteroalifaticamino, alchilamino, heteroalchilamino, arilamino, heteroarilamino, alchilaril, arilalchil, alifaticoxi, heteroalifaticoxi, alchiloxi, heteroalchiloxi, ariloxi, heteroariloxi, alifatictioxi, heteroalifatictioxi, alchiltioxi, heteroalchiltioxi, ariltioxi, heteroariltioxi, aciloxi, și altele asemenea, fiecare dintre acestea putând fi sau nu substituit suplimentar).

15

20

25

30

Termenul "carbonil" se referă la o grupare în care carbonul atașat direct la molecula părinte este hibridizat  $sp^2$ , și este substituit cu un atom de oxigen, azot sau sulf, *de exemplu*, o grupare selectată dintre cetone ( $-C(=O)R^{aa}$ ), acizi carboxilici ( $-CO_2H$ ), aldehide ( $-CHO$ ), esteri ( $-CO_2R^{aa}$ ,  $-C(=O)SR^{aa}$ ,  $-C(=S)SR^{aa}$ ), amide ( $-C(=O)N(R^{bb})_2$ ,  $-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$ ,  $-C(=S)N(R^{bb})_2$ ), și imine ( $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ ), în care  $R^{aa}$  și  $R^{bb}$  sunt așa cum sunt definite aici.

35

Atomii de azot pot fi substituiți sau nesubstituiți după cum permite valența și includ atomi de azot primari, secundari, terțiari și cuaternari. Substituenții exemplificativi ai atomilor de azot includ, dar nu se limitează la, hidrogen,  $-OH$ ,  $-OR^{aa}$ ,  $-N(R^{cc})_2$ ,  $-CN$ ,  $-C(=O)R^{aa}$ ,  $-C(=O)N(R^{cc})_2$ ,  $-CO_2R^{aa}$ ,  $-SO_2R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$ ,  $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$ ,  $-SO_2N(R^{cc})_2$ ,  $-SO_3R^{cc}$ ,  $-SO_2OR^{cc}$ ,  $-SOR^{aa}$ ,  $-C(=S)N(R^{cc})_2$ ,  $-C(=O)SR^{cc}$ ,  $-C(=S)SR^{cc}$ ,  $-P(=O)(OR^{cc})_2$ ,  $-P(=O)(R^{aa})_2$ ,  $-P(=O)N(R^{cc})_2$ , alchil  $C_{1-10}$ , perhaloalchil  $C_{1-10}$ , alchenil  $C_{2-10}$ , alchinil  $C_{2-10}$ , hetero alchil  $C_{1-10}$ , hetero alchenil  $C_{2-10}$ , hetero alchinil  $C_{2-10}$ , carbocicilil  $C_{3-10}$ , heterocicilil cu 3-14 membri,  $C_{6-14}$  aril, și heteroaril cu 5-14 membri, sau două grupări  $R^{cc}$  atașate la un atom de N sunt unite pentru a forma un inel heterocicilil cu 3-14 membri sau heteroaril cu 5-14 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchinil, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchinil, carbocicilil, heterocicilil, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5  $R^{dd}$  grupări, și în care  $R^{aa}$ ,  $R^{bb}$ ,  $R^{cc}$  și  $R^{dd}$  sunt așa cum au fost definiți mai sus.

40

45

50

În anumite variante de realizare, substituentul prezent pe atomul de azot este o grupare protectoare a azotului (denumită aici de asemenea "grupare protectoare pentru amino"). Grupările protectoare pentru azot includ, dar nu se limitează la, grupări  $-OH$ ,  $-OR^{aa}$ ,  $-N(R^{cc})_2$ ,  $-C(=O)R^{aa}$ ,  $-C(=O)N(R^{cc})_2$ ,  $-CO_2R^{aa}$ ,  $-SO_2R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{cc})R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$ ,  $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$ ,  $-SO_2N(R^{cc})_2$ ,  $-SO_2R^{cc}$ ,  $-SO_2OR^{cc}$ ,  $-SOR^{aa}$ ,  $-C(=S)N(R^{cc})_2$ ,  $-C(=O)SR^{cc}$ ,  $-C(=S)SR^{cc}$ , alchil  $C_{1-10}$  (*de exemplu*, aralchil, heteroaralchil), alchenil  $C_{2-10}$ , alchinil  $C_{2-10}$ , hetero alchil  $C_{1-10}$ , hetero alchenil  $C_{2-10}$ , hetero alchinil  $C_{2-10}$ , carbocicilil  $C_{3-10}$ , heterocicilil cu 3-14 membri, aril  $C_{6-14}$ , și heteroaril cu 5-14 membri, în care fiecare alchil, alchenil, alchinil, heteroalchil, heteroalchenil, heteroalchinil, carbocicilil, heterocicilil, aralchil, aril, și heteroaril este independent substituit cu 0, 1, 2, 3, 4, sau 5 grupări  $R^{dd}$ , și în care  $R^{aa}$ ,  $R^{bb}$ ,  $R^{cc}$  și  $R^{dd}$  sunt așa cum au fost definiți aici. Grupările protectoare ale azotului sunt bine cunoscute în domeniu și le

55

60

inclus pe cele descrise în detaliu în Protecting Grupări în Organic Synthesis, T. W. Greene și P. G. M. Wuts, ediția a 3-a, John Wiley & Sons, 1999.

De exemplu, grupările protectoare de azot, cum ar fi grupările amidice (*de exemplu*,  $-C(=O)R^{aa}$ ) includ, dar nu sunt limitate la, formamidă, acetamidă, cloroacetamidă, tricloroacetamidă, trifluoroacetamidă, fenilacetamidă, 3-fenilpropanamidă, picolinamidă, 3-piridilcarboxamidă, derivat de N-benzoilfenilalanil, benzamidă, p-fenilbenzamidă, o-nitrofenilacetamidă, o-nitrofenoxiacetamidă, acetoacetamidă, (N'-ditiobenziloxiacilamino)acetamidă, 3-(p-hidroxifenil)propanamidă, 3-(o-nitrofenil)propanamidă, 2-metil-2-(o-nitrofenoxi)propanamidă, 2-metil-2-(o-fenilazofenoxi)propanamidă, 4-clorobutanamidă, 3-metil-3-nitrobutanamidă, o-nitrocinamidă, derivat de N-acetilmetionină, o-nitrobenzamidă și o-(benzoiloximetil)benzamidă.

Grupări protectoare ale azotului cum ar fi grupări carbamat (*de exemplu*,  $-C(=O)OR^{aa}$ ) include, dar nu sunt limitate la, carbamat de metil, carbamat de etil, carbamat de 9-fluorenilmetil (Fmoc), carbamat de 9-(2-sulfo)fluorenilmetil, carbamat de 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetil, carbamat de 2,7-di-t-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metil (DBD-Tmoc), carbamat de 4-metoxifenacil (Fenoc), carbamat de 2,2,2-tricloroetil (Troc), carbamat de 2-trimetilsililetil (Teoc), carbamat de 2-feniletil (hZ), carbamat de 1-(1-adamantil)-1-metiletil (Adpoc), carbamat de 1,1-dimetil-2-haloetil, carbamat de 1,1-dimetil-2,2-dibromoetil (DB-t-BOC), carbamat de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetil (TCBOC), carbamat de 1-metil-t-(4-bifenil)etil (Bpoc), carbamat de 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletil (t-Bumeoc), carbamat de 2-(2'- și 4'-piridil)etil (Pyoc), carbamat de 2-(N,N-diciclohexilcarboxamido)etil, carbamat de t-butil (BOC sau Boc), carbamat de 1-adamantil (Adoc), carbamat de vinil (Voc), carbamat de alil (Alloc), carbamat de 1-izopropilalil (Ipaoc), carbamat de cinamil (Coc), carbamat de 4-nitrocinamil (Noc), carbamat de 8-chinolil, carbamat de N-hidroxipiperidinil, alchiditio carbamat, carbamat de benzil (Cbz), carbamat de p-metoxibenzil (Moz), carbamat de p-nitobenzil, carbamat de p-bromobenzil, p-clorobenzil carbamat, 2,4-diclorobenzil carbamat, carbamat de 4-metilsulfonilbenzil (Msz), carbamat de 9-antrilmetil, carbamat de difenilmetil, carbamat de 2-metiltioetil, 2- carbamat de metilsulfoniletil, carbamat de 2-(p-toluenesulfonil)etil, \ carbamat de [2-(1,3-ditanil)]metil (Dmoc), carbamat de 4-metiltiofenil (Mtpc), carbamat de 2,4-dimetiltiofenil (Bmpc), carbamat de 2-fosfonioetil (Peoc), carbamat de 2-trifenilfosfonioizopropil (Ppoc), carbamat de 1,1-dimetil-2-cianoetil, carbamat de m-cloro-p-aciloxibenzil, carbamat de p-(dihidroxiboril)benzil, carbamat de 5-benzizoxazolilmetil, carbamat de 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetil (Troc), carbamat de m-nitrofenil, carbamat de 3,5-dimetoxibenzil, carbamat de o-nitrobenzil, carbamat de 3,4-dimetoxi-6-nitrobenzil, carbamat de fenil(o-nitrofenil)metil, carbamat de t-amil, tiocarbamat de S-benzil, carbamat de p-cianobenzil, carbamat de ciclobutil, carbamat de ciclohexil, carbamat de ciclopentil, carbamat de ciclopropilmetil, carbamat de p-deciloxibenzil, carbamat de 2,2-dimetoxiacilvinil, carbamat de o-(N,N-dimetilcarboxamido)benzil, carbamat de 1,1-dimetil-3-(N,N-dimetilcarboxamido)propil, carbamat de 1,1-dimetilpropinil, carbamat de di(2-piridil)metil, carbamat de 2-furanilmetil, carbamat de 2-iodoetil, carbamat de izoborinil, carbamat de izobutil, carbamat de izonicotinil, carbamat de p-(p'-metoxifenilazo)benzil, carbamat de 1-metilciclobutil, carbamat de 1-metilciclohexil, carbamat de 1-metil-1-ciclopropilmetil, carbamat de 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etil, carbamat de 1-metil-1-(p-fenilazofenil)etil, carbamat de 1-metil-1-feniletil, carbamat de 1-metil-1-(4-piridil)etil, carbamat de fenil, carbamat de p-(fenilazo)benzil, carbamat de 2,4,6-tri-t-butilfenil, carbamat de 4-(trimetilamoniu)benzil, și carbamat de 2,4,6-trimetilbenzil.

Grupări protectoare ale azotului, cum ar fi grupări de sulfonamidă (*de exemplu*,  $-S(=O)_2R^{aa}$ ) include, dar nu sunt limitate la, p-toluenesulfonamidă (Ts), benzensulfonamidă, 2,3,6-trimetil-4-metoxibenzensulfonamidă (Mtr), 2,4,6-trimetoxibenzensulfonamidă (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibenzensulfonamidă (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibenzensulfonamidă (Mte), 4-metoxibenzensulfonamidă (Mbs), 2,4,6-trimetilbenzensulfonamidă (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbenzensulfonamidă (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonamidă (Pmc), metansulfonamidă (Ms),  $\beta$ -trimetilsililetansulfonamidă (SES), 9-antracenesulfonamidă, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)benzensulfonamidă (DNMBS), benzilsulfonamidă, trifluorometilsulfonamidă, și fenacilsulfonamidă.

Alte grupări protectoare ale azotului include, dar nu sunt limitate la, derivat de fenotiazinil-(10)-acil, derivat de N'-p-toluenesulfonilaminoacil, derivat de N'-fenilaminotioacil, derivat de N-benzoilfenilalanil, derivat de N-acetilmetionină, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-onă, N-ftalimidă, N-ditiasuccinimidă (Dts), N-2,3-difenilmaleimidă, N-2,5-dimetilpirol, aduct de N-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentan (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-onă 5-substituită, 1,3-dibenzil-1,3,5-triazaciclohexan-2-onă 5-substituită, 3,5-dinitro-4-piridonă 1-substituită, N-metilamină, N-alilamină, N-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamină (SEM), N-3-acetoxipropilamină, N-(1-izopropil-4-nitro-2-

oxo-3-pirolin-3-il)amină, săruri cuaternare de amoniu, N-benzilamină, N-di(4-metoxifenil)metilamină, N-5-dibenzosuberilamină, N-trifenilmetilamină (Tr), N-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amină (MMTr), N-9-fenilfluorenilamină (FF), N-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilenamină, N-ferocenilmetilamino (Fcm), N-2-picolilamino N'-oxid, N-1,1-dimetiltiometilenamină, N-benzilidenamină, N-p-metoxibenzilidenamină, N-difenilmetilenamină, N-[(2-piridil)mesitil]metilenamină, N-(N',N'-dimetilaminometilen)amină, N,N'-izopropilidendiamină, N-p-nitrobenzilidenamină, N-salicilidenamină, N-5-clorosalicilidenamină, N-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilenamină, N-ciclohexilidenamină, N-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amină, derivat de N-borane, derivat de acid N-difenilborinic, N-[fenil(pentaacilcromiu - sau tungsten)acil]amină, chelat N-cupru, chelat N-zinc, N-nitroamină, N-nitrozoamină, N-oxid de amină, difenilfosfinamidă (Dpp), dimetiltiofosfinamidă (Mpt), difeniltiofosfinamidă (Ppt), dialchil fosforamides, dibenzil fosforamidat, difenil fosforamidat, benzensulfenamidă, o-nitrobenzensulfenamidă (Nps), 2,4-dinitrobenzensulfenamidă, pentaclorobenzensulfenamidă, 2-nitro-4-metoxibenzensulfenamidă, trifenilmetilsulfenamidă, și 3-nitropiridinsulfenamidă (Npys).

În anumite variante de realizare, substituentul prezent pe un atom de oxigen este o grupare protectoare a oxigenului (denumită aici și "grupare protectoare pentru hidroxil"). Grupările protectoare ale oxigenului includ, dar nu sunt limitate la,  $-R^{aa}$ ,  $-N(R^{bb})_2$ ,  $-C(=O)SR^{aa}$ ,  $-C(=O)R^{aa}$ ,  $-CO_2R^{aa}$ ,  $-C(=O)N(R^{bb})_2$ ,  $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ ,  $-S(=O)R^{ee}$ ,  $-SO_2R^{aa}$ ,  $-Si(R^{aa})_3$ ,  $-P(R^{cc})_2$ ,  $-P(R^{cc})_3^+X^-$ ,  $-P(OR^{cc})_2$ ,  $-P(OR^{cc})_3^+X^-$ ,  $-P(=O)(R^{aa})_2$ ,  $-P(=O)(OR^{cc})_2$ , și  $-P(=O)(N(R^{bb})_2)_2$ , în care  $X^-$ ,  $R^{aa}$ ,  $R^{bb}$ , și  $R^{cc}$  sunt așa cum au fost definiți aici. Grupările protectoare ale oxigenului sunt bine cunoscute în domeniu și le includ pe cele descrise în detaliu în Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene și P. G. M. Wuts, ediția a-3-a, John Wiley & Sons, 1999.

Grupări de protecție a oxigenului exemplare le includ, dar nu se limitează la, metil, metoxilmetil (MOM), metiltiometil (MTM), t-butiltiometil, (fenildimetilsilil)metoximetal (SMOM), benziloximetal (BOM), p-metoxibenziloximetal (PMBM), (4-metoxifenoxi)metil (p-AOM), guaiacolmetil (GUM), t-butoximetal, 4-penteniloximetal (POM), siloximetal, 2-metoxietoximetal (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetal, bis(2-cloroetoxi)metil, 2-(trimetilsilil)etoximetal (SEMOR), tetrahidropirani (THP), 3-bromotetrahidropirani, tetrahidrotiopirani, 1-metoxiciclohexil, 4-metoxitetrahidropirani (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopirani, 4-metoxitetrahidrotiopirani S,S-dioxide, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxitiperidin-4-il (CTMP), 1,4-dioxan-2-il, tetrahidrofuranil, tetrahidrotiofuranil, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-il, 1-etoxietil, 1-(2-cloroetoxi)etil, 1-metil-1-metoxietil, 1-metil-1-benziloxietil, 1-metil-1-benziloxi-2-fluoroetil, 2,2,2-tricloroetil, 2-trimetilsililetil, 2-(fenilselenil)etil, t-butil, alil, p-clorofenil, p-metoxifenil, 2,4-dinitrofenil, benzil (Bn), p-metoxibenzil, 3,4-dimetoxibenzil, o-nitrobenzil, p-nitrobenzil, p-halobenxil, 2,6-diclorobenxil, p-cianobenxil, p-fenilbenzil, 2-picolil, 4-picolil, 3-metil-2-picolil N-oxido, difenilmetil, p,p'-dinitrobenzidril, 5-dibenzosuberil, trifenilmetil,  $\alpha$ -naftildifenilmetil, p-metoxifenildifenilmetil, di(p-metoxifenil)fenilmetil, tri(p-metoxifenil)metil, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetil, 4,4',4''-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metil, 4,4',4''-tris(levulinoiloxifenil)metil, 4,4',4''-tris(benzoiloxifenil)metil, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4''-dimetoxifenil)metil, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetil, 9-antril, 9-(9-fenil)xanthenil, 9-(9-fenil-10-oxo)antril, 1,3-benzoditiolan-2-il, benzotiazolil S,S-dioxido, trimetilsilil (TMS), trietilsilil (TES), triizopropilsilil (TIPS), dimetilizopropilsilil (IPDMS), dietilizopropilsilil (DEIPS), dimetilhexilsilil, t-butildimetilsilil (TBDMS), t-butildifenilsilil (TBDPS), tribenzilsilil, tri-p-xililsilil, trifenilsilil, difenilmetilsilil (DPMS), t-butilmetoxifenilsilil (TBMPS), formate, benzoilformate, acetat, cloroacetat, dicloroacetat, tricloroacetat, trifluoroacetat, metoxiacetat, trifenilmetoxiacetat, fenoxiacetat, p-clorofenoxiacetat, 3-fenilpropionat, 4-oxopentanoat (levulinat), 4,4-(etilenditio)pentanoat (levulinoilditioacetal), pivaloat, adamantoat, crotonat, 4-metoxicrotonat, benzoat, p-fenilbenzoat, 2,4,6-trimetilbenzoat (mezitoat), carbonat de metil, carbonat de 9-fluorenilmetil (Fmoc), carbonat de etil, carbonat de 2,2,2-tricloroetil (Troc), carbonat de 2-(trimetilsilil)etil (TMSEC), 2-(fenilsulfonil) carbonat de etil (Psec), 2-(trifenilfosfonio) carbonat de etil (Peoc), carbonat de izobutil, carbonat de vinil, carbonat de alil, carbonat de t-butil (BOC sau Boc), carbonat de p-nitrofenil, carbonat de benzil, carbonat de p-metoxibenzil, carbonat de 3,4-dimetoxibenzil, carbonat de o-nitrobenzil, carbonat de p-nitrobenzil, tiocarbonat de S-benzil, carbonat de 4-etoxi-1-naftil, ditiocarbonat de metil, 2-iodobenzoat, 4-azidobutirat, 4-nitro-4-metilpentanoat, o-(dibromometil)benzoat, 2-formilbenzensulfonat, 2-(metiltiometoxi)etil, butirat de 4-(metiltiometoxi), benzoat de 2-(metiltiometoximetal), 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetat, fenoxiacetat de 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil), fenoxiacetat de 2,4-bis(1,1-dimetilpropil), clorodifenilacetat, izobutirat, monosuccinoat, (E)-2-metil-2-butenolat, o-(metoxiacil)benzoat, a-naftoat, nitrat, N,N,N',N'-tetrametilfosforodiamidat de alchil, N-fenilcarbammat de alchil, borat, dimetilfosfinotioil, 2,4-dinitrofenilsulfenat de alchil, sulfat, metansulfonat (mesilat), benzilsulfonat, și tosilat (Ts).

În anumite variante de realizare, substituentul prezent pe un atom de sulf este o grupare protectoare a sulfului (denumită "grupare protectoare a tiolului"). Grupările protectoare ale sulfului includ, dar nu sunt limitate la,  $-R^{aa}$ ,  $-N(R^{bb})_2$ ,  $-C(=O)SR^{aa}$ ,  $-C(=O)R^{aa}$ ,  $-CO_2R^{aa}$ ,  $-C(=O)N(R^{bb})_2$ ,  $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ ,  $-S(=O)R^{ee}$ ,  $-SO_2R^{aa}$ ,  $-Si(R^{aa})_3$ ,  $-P(R^{cc})_2$ ,  $-P(R^{cc})_3^+X^-$ ,  $-P(OR^{cc})_2$ ,  $-P(OR^{cc})_3^+X^-$ ,  $-P(=O)(R^{aa})_2$ ,  $-P(=O)(OR^{cc})_2$ , și  $-P(=O)(N(R^{bb})_2)_2$ , în care  $R^{aa}$ ,  $R^{bb}$ , și  $R^{cc}$  sunt așa cum au fost definiți aici. Grupările protectoare ale sulfului sunt bine cunoscute în domeniu și le includ pe cele descrise în detaliu în *Protecting groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene și P. G. M. Wuts, a-3-a ediție, John Wiley & Sons, 1999.

Un "contraion" sau "contraion anionic" este o gruparea încărcat negativ asociat cu un grup încărcat pozitiv pentru a menține neutralitatea electronică. Un contraion anionic poate fi monovalent (adică, incluzând o sarcină negativă formală). Un contraion anionic poate fi, de asemenea, multivalent (adică, incluzând mai mult de o sarcină negativă formală), cum ar fi bivalent sau trivalent. Contraioni exemplificativi includ ioni de halogenură (*de exemplu*,  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ),  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HSO_4^-$ , ioni sulfonat (*de exemplu*, metansulfonat, trifluorometansulfonat, *p*-toluensulfonat, benzensulfonat, 10-camfor sulfonat, naftalen-2-sulfonat, acid naftalen-1-sulfonic -5-sulfonat, etan-1-sulfonic acid-2-sulfonat, și altele asemenea), ioni de carboxilat (*de exemplu*, acetat, propanoat, benzoat, glicerat, lactat, tartrat, glicolat, gluconat, și altele asemenea),  $BF_4^-$ ,  $PPh_4^-$ ,  $PPh_6^-$ ,  $AsF_6^-$ ,  $SbF_6^-$ ,  $B[3,5-(CF_3)_2C_6H_3]_4^-$ ,  $B(C_6F_5)_4^-$ ,  $BF_4^-$ ,  $Al(OC(CF_3)_3)_4^-$ , și anioni carboran (*de exemplu*,  $CB_{11}H_{12}^-$  sau  $(HCB_{11}Me_5Br_6)^-$ ). Contraioni exemplificativi care pot fi multivalenți includ  $CO_3^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $B_4O_7^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ , anioni carboxilat (*de exemplu*, tartrat, citrat, fumarat, maleat, malat, malonat, gluconat, succinat, glutarat, adipat, pimelat, suberat, azelat, sebacat, salicilat, ftalați, aspartat, glutamat, și altele asemenea), și carborani.

Așa cum este utilizată aici, utilizarea sintagmei "cel puțin un caz" se referă la 1, 2, 3, 4, sau mai multe cazuri, dar include, de asemenea, un interval, de exemplu, de la 1 la 4, de la 1 la 3, de la 1 la 2, de la 2 la 4, de la 2 la 3, sau de la 3 la 4 cazuri, inclusiv.

Aceștia și alți substituenți exemplificativi sunt descriși mai detaliat pe tot cuprinsul. Invenția nu este intenționată a fi limitată în niciun fel de lista exemplificativă de mai sus a substituenților.

Așa cum este utilizat aici, termenul "sare" se referă la oricare și la toate sărurile și cuprinde sărurile acceptabile farmaceutic.

Termenul "sare acceptabilă farmaceutic" se referă la acele săruri care, în limitele raționamentului medical sănătos, sunt adecvate pentru utilizare în contact cu țesuturile oamenilor și animalelor inferioare, fără toxicitate nejustificată, iritație, răspuns alergic și altele asemenea, și altele asemenea și sunt proporționale cu un raport rezonabil beneficiu/risc. Sărurile acceptabile farmaceutic sunt bine cunoscute în domeniu. De exemplu, Berge și colab. descriu săruri acceptabile farmaceutic în detaliu în *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19. Sărurile acceptabile farmaceutic ale compușilor conform acestei invenții le includ pe cele derivate din acizi și baze anorganice și organice adecvate. Exemple de săruri de adiție acidă netoxice acceptabile farmaceutic sunt sărurile unei grupări amino formate cu acizi anorganici, cum ar fi acidul clorhidric, acidul bromhidric, acidul fosforic, acidul sulfuric și acidul percloric sau cu acizi organici, cum ar fi acidul acetic, acidul oxalic, acidul maleic, acidul tartric, acidul citric, acidul succinic sau acidul malonic sau prin utilizarea altor metode cunoscute în domeniu, cum ar fi schimbul de ioni. Alte săruri acceptabile farmaceutic includ săruri adipat, alginat, ascorbat, aspartat, benzensulfonat, benzoat, bisulfat, borat, butirat, camforat, camforsulfonat, citrat, ciclopentanpropionat, digluconat, dodecilsulfat, etansulfonat, formiat, fumarat, glucoheptonat, glicerofosfat, gluconat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, iodhidrat, 2-hidroxi-etansulfonat, lactobionat, lactat, laurat, lauril sulfat, malat, maleat, malonat, metansulfonat, 2-naftalensulfonat, nicotinat, nitrat, oleat, oxalat, palmitat, pamoat, pectinat, persulfat, 3-fenilpropionat, fosfat, picrat, pivalat, propionat, stearat, succinat, sulfat, tartrat, tiocianat, *p*-toluensulfonat, undecanoat, valerat, și altele asemenea. Sărurile derivate din baze adecvate includ săruri de metale alcaline, metale alcalino-pământoase, amoniu și, și  $N^+(\text{alchil } C_{1-4})_4^-$ . Săruri reprezentative ale metalelor alcaline sau alcalino-pământoase includ sodiu, litiu, potasiu, calciu, magneziu și altele asemenea. Alte săruri acceptabile farmaceutic includ, atunci când este cazul, cationi netoxici de amoniu, amoniu cuaternar și amină formați folosind contraioni cum ar fi halogenură, hidroxid, carboxilat, sulfat, fosfat, azotat, sulfonat de alchil inferior și sulfonat de aril.

#### **Agenți activi biologic**

Această dezvăluire are în vedere faptul că LNP-urile furnizate aici și/sau diferitele terapii combinate furnizate aici pot fi utilizate pentru a administra o varietate de agenți unui subiect. Astfel de

agenți vor fi, tipic, agenți activi biologic Agenții activi biologic sunt agenți care au un efect in vivo și, de preferință, un efect benefic, cum ar fi modularea imună dorită, stimularea imună, inhibarea imună,uciderea celulelor, conservarea celulelor, exprimarea genei modificate, înlocuirea proteinelor și altele asemenea. Agenții activi biologic includ, dar nu se limitează la, agenți profilactici, agenți terapeutici și  
 5 agenți de diagnostic. Agenții activi biologic includ agenți imunomodulatori, cum ar fi agenți imunostimulatori sau imunoinhibitori, antigeni, anticorpi și fragmente de anticorpi, cum ar fi fragmente de anticorpi care leagă antigenul, adjuvanți, citokine cum ar fi interleukine, agenți antibacterieni, agenți antivirali, agenți antifungici, agenți antiparaziți, agenți anti-cancerigeni, agenți antiinflamatori și alții asemenea.

Astfel de agenți pot fi, fără limitare, acizi nucleici, proteine sau peptide, compuși organici mici, carbohidrați și/sau polizaharide și altele asemenea. Aceștia pot fi utilizați pentru a exprima acizi nucleici și/sau proteine în celule, în special în celulele care sunt deficitare în astfel de acizi nucleici sau proteine sau au versiuni mutante ale acestor acizi nucleici sau proteine. Aceștia pot fi utilizați pentru a introduce și  
 15 exprima acizi nucleici sau proteine care nu sunt native pentru celulă sau organism, așa cum se poate face, de exemplu, în contextul unui protocol de imunizare sau vaccinare. În acest sens, acidul nucleic sau proteina poate fi străină de subiectul cărui i se administrează (de exemplu, nu apare în mod natural la un astfel de subiect sau nu apare deloc în mod natural), și este administrată subiectului pentru a induce și/sau stimula un răspuns imunitar la astfel de acid nucleic sau proteină. Acizii nucleici furnizați aici pot fi  
 20 utilizați în acest scop.

Alți agenți biologic activi pot fi utilizați singuri sau împreună cu astfel de acizi nucleici sau proteine, inclusiv formulați împreună cu astfel de acizi nucleici sau proteine, inclusiv formulați în LNP-urile din această dezvăluire.

#### 25 **Acizi nucleici**

Așa cum se utilizează aici, termenul "acid nucleic" se referă la un compus care cuprinde o nucleobază și un fragment acid, de exemplu, o nucleozidă, o nucleotidă sau un polimer de nucleotide. Tipic, acizii nucleici polimerici, *de exemplu* moleculele de acid nucleic cuprinzând trei sau mai multe nucleotide sunt molecule liniare, în care nucleotidele adiacente sunt legate între ele printr-o legătură fosfodiester. În unele variante de realizare, "acid nucleic" se referă la resturi individuale de acid nucleic (de exemplu, nucleotide și/sau nucleozide). În unele variante de realizare, "acid nucleic" se referă la un lanț de oligonucleotide care cuprinde trei sau mai multe reziduuri de nucleotide individuale. Așa cum sunt  
 30 utilizați aici, termenii "oligonucleotidă" și "polinucleotidă" pot fi utilizați interschimbabil pentru a se referi la un polimer din nucleotide (de exemplu, un șir de cel puțin trei nucleotide). În unele variante de realizare, "acid nucleic" cuprinde ARN, precum și ADN simplu și/sau dublu catenar. O secvență de acid nucleic este prezentată pe direcția 5' la 3' dacă nu se indică altfel.

Acizii nucleici includ orice compus și/sau substanță care cuprinde un polimer de nucleotide. Acești polimeri sunt denumiți polinucleotide. Acizii nucleici pot fi sau pot include, de exemplu, acizi ribonucleici (ARN-uri), acizi dezoxiribonucleici (ADN-uri), acizi nucleici treozici (TNA-uri), acizi nucleici glicolici (GNA-uri), acizi nucleici peptidici (PNA-uri), acizi nucleici blocați (LNA-uri), incluzând LNA având o configurație  $\beta$ -D-ribo,  $\alpha$ -LNA având o configurație  $\alpha$ -L-ribo (un diastereomer al LNA), 2'-amino-LNA având o funcționalizare 2'-amino și 2'-amino- $\alpha$ -LNA având o funcționalizare 2'-amino), acizi nucleici etilenici (ENA), acizi nucleici ciclohexenilici (CeNA) sau himere sau combinații  
 45 ale acestora.

Acizii nucleici pot fi prezenți natural, de exemplu, în contextul unui genom, al unui transcript, al unui ARNm, ARNt, ARNr, ARNsi, ARNsn, plasmidă, cosmidă, cromozom, cromatidă sau altă moleculă naturală de acid nucleic. Pe de altă parte, o moleculă de acid nucleic poate fi o moleculă nenaturală, de  
 50 exemplu, un ADN sau ARN recombinant, un cromozom artificial, un genom proiectat sau fragment al acestuia, sau un ADN, ARN sintetic, hibrid de ADN/ARN, sau incluzând nucleotide sau nucleozide care nu apar natural. Acizii nucleici pot fi purificați din surse naturale, produși folosind sisteme de exprimare recombinante și, opțional, purificați, sintetizați chimic, *etc.*

Mai mult, termenii "acid nucleic", "ADN", "ARN" și/sau termeni similari includ analogi de acid nucleic, adică analogi având altul decât o coloană vertebrală de fosfodiester.

Acolo unde este cazul, de exemplu, în cazul moleculelor sintetizate chimic, acizii nucleici pot cuprinde analogi nucleozidici, cum ar fi analogi având baze sau zaharuri modificate chimic, și modificări  
 60 ale coloanei vertebrale. În unele variante de realizare, un acid nucleic este sau cuprinde nucleozide naturale (de exemplu, adenzină, timidină, guanozină, citidină, uridină, deoxiadenozină, deoxitimidină,



deoxiguanozină, și deoxicitidină); analogi de nucleozide (de exemplu, 2-aminoadenozină, 2-tiotimidină, inozină, pirolo-pirimidină, 3-metil adenzină, 5-metilcitidină, 2-aminoadenozină, CS-bromouridină, C5-fluorouridină, C5-iodouridină, C5-propinil-uridină, C5-propinil-citidină, C5-metilcitidină, 2-aminoadenozină, 7-deazaadenozină, 7-deazaguanozină, 8-oxoadenzină, 8-oxoguanozină, O(6)-metilguanină, și 2-tiocitidină); baze modificate chimic; baze modificate biologic (de exemplu, baze metilate); baze intercalate; zaharuri modificate (de exemplu, 2'-fluororiboză, riboză, 2'-deoxiriboză, arabinoză, și hexoză); și/sau grupări de fosfat modificate (de exemplu, legături de fosforotioați și 5'-N-fosforamidite).

O "nucleozidă" se referă la un compus care conține o moleculă de zahăr (de exemplu, o pentoză sau riboză) sau un derivat al acesteia în combinație cu o bază organică (de exemplu, o purină sau pirimidină) sau un derivat al acesteia (denumit aici și "nucleobază"). O "nucleotidă" se referă la o nucleozidă, incluzând o grupare fosfat. Nucleotidele modificate pot fi sintetizate prin orice metodă utilă, cum ar fi, de exemplu, chimic, enzimatic sau recombinant, pentru a include una sau mai multe nucleozide modificate sau nenaturale. Polinucleotidele pot cuprinde o regiune sau regiuni de nucleozide legate. Astfel de regiuni pot avea legături variabile de coloană vertebrală. Legăturile pot fi legături standard fosfodioester, caz în care polinucleotidele ar cuprinde regiuni de nucleotide.

Perechea de baze de nucleotide modificată cuprinde nu numai perechile standard de baze adenzină-timină, adenzină-uracil sau guanozină-citozină, ci și perechile de baze formate între nucleotide și/sau nucleotide modificate cuprinzând baze nestandard sau modificate, în care aranjarea donatorilor de legături de hidrogen și a acceptorilor de legături de hidrogen permit formarea legăturii de hidrogen între o bază nestandard și o bază standard sau între două structuri de bază nestandard complementare. Un exemplu de astfel de formare a unei perechi de baze nestandard este formarea unei perechi de baze între nucleotida modificată inozina și adenina, citozina sau uracilul. Orice combinație de bază/zahăr sau linker poate fi încorporată în polinucleotidele din prezenta dezvoltare.

Un specialist în domeniu va aprecia că, cu excepția cazului în care se menționează altfel, secvențele de polinucleotide prezentate în prezenta cerere vor menționa "T"-uri într-o secvență reprezentativă de ADN, dar în cazul în care secvența reprezintă ARN, "T"-urile vor fi înlocuite cu "U"-uri.

Modificările polinucleotidelor (de exemplu, polinucleotidele ARN, cum ar fi polinucleotidele ARNm) care sunt utile în agenții terapeutici descriși aici includ, dar nu se limitează la următoarele: 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiizopentenil)adenozină; 2-metiltio-N6-metiladenozină; 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenozină; N6-glycinilcarbamoiladenozină; N6-izopenteniladenozină; N6-metiladenozină; N6-treonilcarbamoiladenozină; 1,2'-O-dimetiladenozină; 1-metiladenozină; 2'-O-metiladenozină; 2'-O-ribosiladenozină (fosfat); 2-metiladenozină; 2-metiltio-N6 izopenteniladenozină; 2-metiltio-N6-hidroxinorvalil carbamoiladenozină; 2'-O-metiladenozină; 2'-O-ribosiladenozină (fosfat); Izopenteniladenozină; N6-(cis-hidroxiizopentenil)adenozină; N6,2'-O-dimetiladenozină; N6,2'-O-dimetiladenozină; N6,N6,2-O-trimetiladenozină; N6,N6-dimetiladenozină; N6-acetiladenozină; N6-hidroxinorvalilcarbamoiladenozină; N6-metil-N6-treonilcarbamoiladenozină; 2-metiladenozină; 2-metiltio-N6-izopenteniladenozină; 7-deaza-adenozină; N1-metiladenozină; N6, N6 (dimetil)adenină; N6-cis-hidroxi-izopentenil-adenozină;  $\alpha$ -tio-adenozină; 2 (amino)adenină; 2 (aminopropil)adenină; 2 (metiltio) N6 (izopentenil)adenină; 2-(alchil)adenină; 2-(aminoalchil)adenină; 2-(aminopropil)adenină; 2-(halo)adenină; 2-(halo)adenină; 2-(propil)adenină; 2'-Amino-2'-deoxi-ATP; 2'-Azido-2'-deoxi-ATP; 2'-Deoxi-2'-a-aminoadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-a-azidoadenozină TP; 6 (alchil)adenină; 6 (metil)adenină; 6-(alchil)adenină; 6-(metil)adenină; 7 (deaza)adenină; 8 (alchenil)adenină; 8 (alchinil)adenină; 8 (amino)adenină; 8 (tioalchil)adenină; 8-(alchenil)adenină; 8-(alchil)adenină; 8-(alchinil)adenină; 8-(amino)adenină; 8-(halo)adenină; 8-(hidroxil)adenină; 8-(tioalchil)adenină; 8-(tiol)adenină; 8-azido-adenozină; aza adenină; deaza adenină; N6 (metil)adenină; N6-(izopentil)adenină; 7-deaza-8-aza-adenozină; 7-metiladenină; I-Deazaadenozină TP; 2'Fluoro-N6-Bz-deoxiadenozină TP; 2'-OMe-2-Amino-ATP; 2'-O-metil-N6-Bz-deoxiadenozină TP; 2'-a-Etiniladenozină TP; 2-aminoadenină; 2-Aminoadenozină TP; 2-Amino-ATP; 2'-a-Trifluorometiladenozină TP; 2-Azidoadenozină TP; 2'-b-Etiniladenozină TP; 2-Bromoadenozină TP; 2'-b-Trifluorometiladenozină TP; 2-Cloroadenozină TP; 2'-Deoxi-2',2'-difluoroadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-a-mercaptoadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-a-tiometoxiadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-aminoadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-azidoadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-b.bromoadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-cloroadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-fluoroadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-iodoadenosinc TP; 2'-Deoxi-2'-b-mercaptoadenozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-tiometoxiadenozină TP; 2-Fluoroadenozină TP; 2-Iodoadenozină TP; 2-Mercaptoadenozină TP; 2-metoxi-adenină; 2-metiltio-adenină; 2-Trifluorometiladenozină TP; 3-Deaza-3-bromoadenozină TP; 3-Deaza-3-cloroadenozină TP; 3-Deaza-3-tluoroadenozină TP; 3-Deaza-3-iodoadenzină TP; 3-Deazaadenozină TP; 4'-Azidoadenozină TP; 4'-

Carbociclic adenzină TP; 4'-Etiladenozină TP; 5'-Homo-adenozină TP; 8-Aza-ATP; 8-bromo-adenozină TP; 8-Trifluorometiladenozină TP; 9-Deazaadenozină TP; 2-aminopurină; 7-deaza-2,6-diaminopurină; 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurină; 7-deaza-8-aza-2-aminopurină; 2,6-diaminopurină; 7-deaza-8-aza-adenină, 7-deaza-2-aminopurină; 2-tiocitidină; 3-metilcitidină; 5-formilcitidină; 5-hidroxi-metilcitidină; 5-metilcitidină; N4-acetilcitidină; 2'-O-metilcitidină; 2'-O-metilcitidină; 5,2'-O-dimetilcitidină; 5-formil-2'-O-metilcitidină; Lizidină; N4,2'-O-dimetilcitidină; N4-acetil-2'-O-metilcitidină; N4-metilcitidină; N4,N4-Dimetil-2'-OMe-Citidină TP; 4-metilcitidină; 5-aza-citidină; Pseudo-izo-citidină; pirolo-citidină;  $\alpha$ -tio-citidină; 2-(tio)citozină; 2'-Amino-2'-deoxi-CTP; 2'-Azido-2'-deoxi-CTP; 2'-Deoxi-2'-a-aminocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-a-azidocitidină TP; 3 (deaza) 5 (aza)citozină; 3 (metil)citozină; 3-(alchil)citozină; 3-(deaza) 5 (aza)citozină; 3-(metil)citidină; 4,2'-O-dimetilcitidină; 5 (halo)citozină; 5 (metil)citozină; 5 (propinil)citozină; 5 (trifluorometil)citozină; 5-(alchil)citozină; 5-(alchil)citozină; 5-(halo)citozină; 5-(propinil)citozină; 5-(trifluorometil)citozină; 5-bromo-citidină; 5-iodo-citidină; 5-propinil citozină; 6-(azo)citozină; 6-aza-citidină; aza citozină; deaza citozină; N4 (acetil)citozină; 1-metil-1-deaza-pseudoizocitidină; 1-metil-pseudoizocitidină; 2-metoxi-5-metil-citidină; 2-metoxi-citidină; 2-tio-5-metil-citidină; 4-metoxi-1-metil-pseudoizocitidină; 4-metoxi-pseudoizocitidină; 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoizocitidină; 4-tio-1-metil-pseudoizocitidină; 4-tio-pseudoizocitidină; 5-aza-zebularină; 5-metil-zebularină; pirolo-pseudoizocitidină; Zebularină; (E)-5-(2-Bromo-vinil)citidină TP; 2,2'-anhidro-citidină TP clorhidrat; 2'Fluor-N4-Bz-citidină TP; 2'Fluoro-N4-Acetil-citidină TP; 2'-O-Metil-N4-Acetil-citidină TP; 2'O-metil-N4-Bz-citidină TP; 2'-a-Etilcitidină TP; 2'-a-Trifluorometilcitidină TP; 2'-b-Etilcitidină TP; 2'-b-Trifluorometilcitidină TP; 2'-Deoxi-2',2'-difluorocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-a-mercaptocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-a-tiometoxicitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-aminocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-azidocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-bromocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-clorocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-fluorocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-iodocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-mercaptocitidină TP; 2'-Deoxi-2'-b-tiometoxicitidină TP; 2'-O-Metil-5-(1-propinil)citidină TP; 3'-Etilcitidină TP; 4'-Azidocitidină TP; 4'-Carbociclic citidină TP; 4'-Etilcitidină TP; 5-(1-Propinil)aracitidină TP; 5-(2-Cloro-fenil)-2-tiocitidină TP; 5-(4-Amino-fenil)-2-tiocitidină TP; 5-Aminoalil-CTP; 5-Cianocitidină TP; 5-Etililara-citidină TP; 5-Etilcitidină TP; 5'-Homo-citidină TP; 5-Metoxicitidină TP; 5-Tritfluorometil-Citidină TP; N4-Amino-citidină TP; N4-Benzoil-citidină TP; Pseudoizocitidină; 7-metilguanozină; N2,2'-O-dimetilguanozină; N2-metilguanozină; Wiozină; 1,2-O-dimetyguanozină; 1-metilguanozină; 2'-O-metilguanozină; 2'-O-ribosilguanozină (fosfat); 2'-O-metilguanozină; 2'-Oribosilguanozină (fosfat); 7-aminometil-7-dezaguanozină; 7-ciano-7-dezaguanozină; Archaeozină; Metilwiozină; N2,7-dimetilguanozină; N2,N2,2'-O-trimetilguanozină; N2,N2,7-trimetilguanozină; N2,N2-dimetilguanozină; N2,7,2'-O-trimetilguanozină; 6-tio-guanozină; 7-deaza-guanozină; 8-oxo-guanozină; N1-metil-guanozină;  $\alpha$ -tio-guanozină; 2 (propil)guanină; 2-(alchil)guanină; 2'-Amino-2'-deoxi-GTP; 2'-Azido-2'-deoxi-GTP; 2'-Deoxi-2'-a-aminoguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-a-azidoguanozină TP; 6 (metil)guanină; 6-(alchil)guanină; 6-(metil)guanină; 6-metil-guanozină; 7 (alchil)guanină; 7 (deaza)guanină; 7 (metil)guanină; 7-(alchil)guanină; 7-(deaza)guanină; 7-(metil)guanină; 8 (alchil)guanină; 8 (alchil)guanină; 8 (halo)guanină; 8 (tioalchil)guanină; 8-(alchenil)guanină; 8-(alchil)guanină; 8-(alchil)guanină; 8-(amino)guanină; 8-(halo)guanină; 8-(hidroxil)guanină; 8-(tioalchil)guanină; 8-(tiol)guanină; aza guanină; deaza guanină; N (metil)guanină; N-(metil)guanină; 1-metil-6-tio-guanozină; 6-metoxi-guanozină; 6-tio-7-deaza-8-aza-guanozină; 6-tio-7-deaza-guanozină; 6-tio-7-metil-guanozină; 7-deaza-8-aza-guanozină; 7-metil-8-oxo-guanozină; N2,N2-dimetil-6-tio-guanozină; N2-metil-6-tio-guanozină; 1-Me-GTP; 2'Fluoro-N2-izobutil-guanozină TP; 2'O-metil-N2-izobutil-guanozină TP; 2-a-Etilguanozină TP; 2'-a-Trifluorometilguanozină TP; 2'-b-Etilguanozină TP; 2'-b-Trifluorometilguanozină TP; 2'-Deoxi-2',2'-difluoroguanosinc TP; 2'-Deoxi-2'-a-mercaptoguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-a-tiometoxiguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-aminoguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-azidoguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-bromoguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-cloroguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-fluoroguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-iodoguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-mercaptoguanozină TP; 2'-Deoxi-2'-b-tiometoxiguanozină TP; 4'-Azidoguanozină TP; 4'-Carbociclic guanozină TP; 4'-Etilguanozină TP; 5'-Homo-guanozină TP; 8-bromo-guanozină TP; 9-Dezaguanozină TP; N2-izobutil-guanozină TP; 1-metilinozină; Inozină; 1,2'-O-dimetilinozină; 2'-O-metilinozină; 7-metilinozină; 2'-O-metilinozină; Epoxiquosinc; galactozil-queuozină; Mannosilqueuozină; Queuozină; aliamino-timidină; aza timidină; deaza timidină; deoxi-timidină; 2'-O-metiluridină; 2-tiouridină; 3-metiluridină; 5-carboximetiluridină; 5-hidroxiuridină; 5-metiluridină; S-taurinometil-2-tiouridină; 5-taurinometiluridină; Dihidrouridină; Pseudouridină; (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridină; 1-metil-3-(3-amino-5-carboxipropil)pseudouridină; 1-metilpseudouridină; 1-metil-pseudouridină; 2'-O-metiluridină; 2-O-metilpseudouridină; 2'-O-metiluridină; 2-tio-2'-O-metiluridină; 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridină; 3,2'-O-dimetiluridină; 3-Metil-pseudo-Uridină TP; 4-tiouridină; 5-(carboxihidroxi-metil)uridină; 5-(carboxihidroxi-metil)uridină metil ester; 5,2'-O-dimetiluridină; 5,6-dihidro-uridină; 5-aminomelhil-2-tiouridină; 5-carbamoilmetil-2-O-metiluridină; 5-carbamoilmetiluridină; 5-carboxihidroxi-metiluridină; 5-carboxihidroxi-metiluridină metil ester; 5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridină; 5-

carboximetilaminometil-2-tiouridină; 5-carboximetilaminometil-2-tiouridină; 5-carboximetilaminometiluridină; 5-carboximetilaminometiluridină; 5-Carbamoilmetiluridină TP; 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridină; 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridină; 5-metoxycarbonilmctiluridină; 5-metiluridină), 5-metoxiuridină; 5-metil-2-tiouridină; 5-metilaminometil-2-selenouridină; 5-metilaminometil-2-tiouridină; 5-metilaminometiluridină; 5-Metildihidrouridină; 5-Oxiacetic acid- Uridină TP; 5-Oxiacetic acid-metil ester-Uridină TP; N1 -metil-pseudouridină; uridină 5-oxiacetic acid; uridină 5-oxiacetic acid metil ester; 3-(3-Amino-3-carboxipropil)-Uridină TP; 5-(izo-Pentenilaminometil)-2-tiouridină TP; 5-(izo-Pentenilaminometil)-2'-O-metiluridină TP; 5-(izo-Pentenilaminometil)uridină TP; 5-propinil uracil;  $\alpha$ -tio-uridină; 1 (aminoalchilamino-carboniletilenil)-2(tio)-pseudouracil; 1 (aminoalchilaminocarboniletilenil)-2,4-(ditio)pseudouracil; 1 (aminoalchilaminocarboniletilenil)-4(tio)pseudouracil; 1 (aminoalchilaminocarboniletilenil)-pseudouracil; 1 (aminocarboniletilenil)-2(tio)-pseudouracil; 1 (aminocarboniletilenil)-2,4-(ditio)pseudouracil; 1 (aminocarboniletilenil)-4(tio)pseudouracil; 1 (aminocarboniletilenil)-pseudouracil; 2(tio)-pseudouracil1 substituit; 1 substituit 2,4-(ditio)pseudouracil; 4 (tio)pseudouracil 1 substituit; pseudouracil 1 substituit; 1-(aminoalchilamino-carboniletilenil)-2-(tio)-pseudouracil; 1-Metil-3-(3-amino-3-carboxipropil) pseudouridină TP; 1-Metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudo-UTP; 1-Metil-pseudo-UTP; 2 (tio)pseudouracil; 2' deoxi uridină; 2' fluorouridină; 2-(tio)uracil; 2,4-(ditio)pseudouracil; 2' metil, 2'amino, 2'azido, 2'fluro-guanozină; 2'-Amino-2'-deoxi-UTP; 2'-Azido-2'-deoxi-UTP; 2'-Azido-deoxiuridină TP; 2'-O-metilpseudouridină; 2' deoxi uridină; 2' fluorouridină; 2'-Deoxi-2'-a-aminouridină TP; 2'-Deoxi-2'-a-azidouridină TP; 2-metilpseudouridină; 3 (3 amino-3 carboxipropil)uracil; 4 (tio)pseudouracil; 4-(tio) pseudouracil; 4-(tio)uracil; 4-tiouracil; 5 (1,3-diazol-1-alchil)uracil; 5 (2-aminopropil)uracil; 5 (aminoalchil)uracil; 5 (dimetilaminoalchil)uracil; 5 (guanidiniumalchil)uracil; 5 (metoxycarbonilmetil)-2-(tio)uracil; 5 (metoxycarbonil-metil)uracil; 5 (metil) 2 (tio)uracil; 5 (metil) 2,4 (ditio)uracil; 5 (metil) 4 (tio)uracil; 5 (metilaminometil)-2 (tio)uracil; 5 (metilaminometil)-2,4 (ditio)uracil; 5 (metilaminometil)-4 (tio)uracil; 5 (propinil)uracil; 5 (trifluorometil)uracil; 5-(2-aminopropil)uracil; 5-(alchil)-2-(tio)pseudouracil; 5-(alchil)-2,4 (ditio)pseudouracil; 5-(alchil)-4 (tio)pseudouracil; 5-(alchil)pseudouracil; 5-(alchil)uracil; 5-(alchil)uracil; 5-(alilamino)uracil; 5-(cianoalchil)uracil; 5-(dialchilaminoalchil)uracil; 5-(dimetilaminoalchil)uracil; 5-(guanidiniumalchil)uracil; 5-(halo)uracil; 5-(1,3-diazol-1-alchil)uracil; 5-(metoxi)uracil; 5-(metoxycarbonilmetil)-2-(tio)uracil; 5-(metoxycarbonil-metil)uracil; 5-(metil) 2(tio)uracil; 5-(metil) 2,4 (ditio) uracil; 5-(metil) 4 (tio)uracil; 5-(metil)-2-(tio)pseudouracil; 5-(metil)-2,4 (ditio)pseudouracil; 5-(metil)-4 (tio)pseudouracil; 5-(metil)pseudouracil; 5-(metilaminometil)-2,4(ditio)uracil; 5-(metilaminometil)-4(tio)uracil; 5-(propinil)uracil; 5-(trifluorometil)uracil; 5-aminoalil-uridină; 5-bromo-uridină; 5-iodo-uridină; 5-uracil; 6 (azo)uracil; 6-(azo)uracil; 6-aza-uridină; aliamino-uracil; aza uracil; deaza uracil; N3 (metil)uracil; P pseudo-UTP-1-2-etanoic acid; Pseudouracil; 4-Tio-pseudo-UTP; 1-carboximetil-pseudouridină; 1-metil-1-deaza-pseudouridină; 1-propinil-uridină; 1-taurinometil-1-metil-uridină; 1-taurinometil-4-tio-uridină; 1-taurinometil-pseudouridină; 2-metoxi-4-tio-pseudouridină; 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridină; 2-tio-1-metil-pseudouridină; 2-tio-5-aza-uridină; 2-tio-dihidropseudouridină; 2-tio-dihidrouridină; 2-tio-pseudouridină; 4-metoxi-2-tio-pseudouridină; 4-metoxi-pseudouridină; 4-tio-1-metil-pseudouridină; 4-tio-pseudouridină; 5-aza-uridină; Dihidropseudouridină; ( $\pm$ )1-(2-Hidroxiopropil)pseudouridină TP; (2R)-1-(2-Hidroxiopropil)pseudouridină TP; (2S)-1-(2-Hidroxiopropil)pseudouridină TP; (E)-5-(2-Bromo-vinil)ara-uridină TP; (E)-5-(2-Bromo-vinil)uridină TP; (Z)-5-(2-Bromo-vinil)ara-uridină TP; (Z)-5-(2-Bromo-vinil)uridină TP; t-(2,2,2-Trifluoroety))pseudo-UTP; 1-(2,2,3,3,3-Pentafluoropropil)pseudouridină TP; 1-(2,2-Dietoxietil)pseudouridină TP; 1-(2,4,6-Trimetilbenzil)pseudouridină TP; 1-(2,4,6-Trimetil-benzil)pseudo-UTP; 1-(2,4,6-Trimetil-fenil)pseudo-UTP; 1-(2-Amino-2-carboxietil)pseudo-UTP; 1-(2-Aminoetil)pseudo-UTP; 1-(2-Hidroxietyl)pseudouridină TP; 1-(2-Metoxietil)pseudouridină TP; 1-(3,4-Bis-trifluorometoxibenzil)pseudouridină TP; 1-(3,4-Dimetoxibenzil)pseudouridină TP; 1-(3-Amino-3-carboxipropil)pseudo-UTP; 1-(3-Amino-propil)pseudo-UTP; 1-(3-Ciclopropil-prop-2-ynil)pseudouridină TP; 1-(4-Amino-4-carboxibutil)pseudo-UTP; 1-(4-Amino-benzil)pseudo-UTP; 1-(4-Amino-butil)pseudo-UTP; 1-(4-Amino-fenil)pseudo-UTP; 1-(4-Azidobenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Bromobenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Clorobenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Fluorobenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Iodobenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Metansulfonilbenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Metoxibenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Metoxi-benzil)pseudo-UTP; 1-(4-Metoxi-fenil)pseudo-UTP; 1-(4-Metilbenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Metil-benzil)pseudo-UTP; 1-(4-Nitrobenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Nitro-benzil)pseudo-UTP; 1(4-Nitro-fenil)pseudo-UTP; 1-(4-Tiometoxibenzil)pseudouridinăTP; 1-(4-Trifluorometoxibenzil)pseudouridină TP; 1-(4-Trifluorometilbenzil)pseudouridină TP; 1-(5-Aminopentil)pseudo-UTP; 1-(6-Amino-hexil)pseudo-UTP; 1,6-Dimetil-pseudo-UTP; 1-[3-(2-[2-(2-Aminoetoxi)-etoxi]-etoxi)-propionil]pseudouridină TP; 1-{3-[2-(2-Aminoetoxi)-etoxi]-propionil} pseudouridină TP; I-Acetilpseudouridinc TP; 1-Alchil-6-(1-propinil)-pseudo-UTP; 1 -Alchil-6-(2-propinil)-pseudo-UTP; 1-Alchil-6-alil-pseudo-UTP; 1-Alchil-6-etinil-pseudo-UTP; 1-Alchil-6-homoalil-

pseudo-UTP; 1-Alchil-6-vinil-pseudo-UTP; 1-Alilpseudouridină TP; 1-Aminometil-pseudo-UTP; 1-Benzoilpseudouridină TP; 1-Benziloximetilpseudouridină TP; 1-Benzil-pseudo-UTP; 1-Biotinil-PEG2-pseudouridină TP; 1-Biotinilpseudouridină TP; 1-Butil-pseudo-UTP; 1-Cianometilpseudouridină TP; 1-Ciclobutilmetil-pseudo-UTP; 1-Ciclobutil-pseudo-UTP; 1-Cicloheptilmetil-pseudo-UTP; 1-Cicloheptil-pseudo-UTP; 1-Ciclohexilmetil-pseudo-UTP; 1-Ciclohexil-pseudo-UTP; 1-Ciclooctilmetil-pseudo-UTP; 1-Ciclooctil-pseudo-UTP; 1-Ciclopentilmetil-pseudo-UTP; 1-Ciclopentil-pseudo-UTP; 1-Ciclopropilmetil-pseudo-UTP; 1-Ciclopropil-pseudo-UTP; 1-Etil-pseudo-UTP; 1-Hexil-pseudo-UTP; 1-Homoalilpseudouridină TP; 1-Hidroxiometilpseudouridină TP; 1-izo-propil-pseudo-UTP; 1-Me-2-tio-pseudo-UTP; 1-Me-4-tio-pseudo-UTP; 1-Me-alfa-tio-pseudo-UTP; 1-Metansulfonilmetilpseudouridină TP; 1-Metoximetilpseudouridină TP; 1-Metil-6-(2,2,2-Trifluoroetil)pseudo-UTP; 1-Metil-6-(4-morfolino)-pseudo-UTP; 1-Metil-6-(4-tiomorfolino)-pseudo-UTP; 1-Metil-6-(substituit fenil)pseudo-UTP; 1-Metil-6-amino-pseudo-UTP; 1-Metil-6-azido-pseudo-UTP; 1-Metil-6-bromo-pseudo-UTP; 1-Metil-6-butil-pseudo-UTP; 1-Metil-6-cloro-pseudo-UTP; 1-Metil-6-ciano-pseudo-UTP; 1-Metil-6-dimetilamino-pseudo-UTP; 1-Metil-6-etoxi-pseudo-UTP; 1-Metil-6-etilcarboxilate-pseudo-UTP; 1-Metil-6-etil-pseudo-UTP; 1-Metil-6-fluoro-pseudo-UTP; 1-Metil-6-formil-pseudo-UTP; 1-Metil-6-hidroxi-amino-pseudo-UTP; 1-Metil-6-hidroxi-pseudo-UTP; 1-Metil-6-iodo-pseudo-UTP; 1-Metil-6-izo-propil-pseudo-UTP; 1-Metil-6-metoxi-pseudo-UTP; 1-Metil-6-metilamino-pseudo-UTP; 1-Metil-6-fenil-pseudo-UTP; 1-Metil-6-propil-pseudo-UTP; 1-Metil-6-terț-butil-pseudo-UTP; 1-Metil-6-trifluorometoxi-pseudo-UTP; 1-Metil-6-trifluorometil-pseudo-UTP; 1-Morfolinometilpseudouridină TP; 1-Pentil-pseudo-UTP; 1-Fenil-pseudo-UTP; 1-Pivaloilpseudouridină TP; 1-Propargilpseudouridină TP; 1-Propil-pseudo-UTP; 1-propinil-pseudouridină; 1-p-tolil-pseudo-UTP; 1-terț-Butil-pseudo-UTP; 1-Tiometoximetilpseudouridină TP; 1-Tiomorfolinometilpseudouridină TP; 1-Trifluoroacetilpseudouridină TP; 1-Trifluorometil-pseudo-UTP; 1-Vinilpseudouridină TP; 2,2'-anhidro-uridină TP; 2'-bromodeoxiuridină TP; 2'-F-S-Metil-2'-deoxi-UTP; 2'-OMe-5-Me-UTP; 2'-OMe-pseudo-UTP; 2'-a-Etiniluridină TP; 2'-a-Trifluoromelhiluridină TP; 2'-b-Etiniluridină TP; 2'-b-Trifluorometiluridină TP; 2'-Deoxi-2',2'-difluorouridină TP; 2'-Deoxi-2'-a-mercaptopuridină TP; 2'-Deoxi-2'-a-tiometoxiuridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-aminouridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-azidouridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-bromouridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-clorouridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-fluorouridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-iodouridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-mercaptopuridină TP; 2'-Deoxi-2'-b-tiometoxiuridină TP; 2-metoxi-4-tio-uridină; 2-metoxiuridină; 2'-O-Metil-S-(1-propinil)uridină TP; 3-Alchil-pseudo-UTP; 4'-Azidouridină TP; 4'-Carbociclic uridină TP; 4'-Etiniluridină TP; 5-(1-Propinil)ara-uridină TP; 5-(2-Furanil)uridină TP; 5-Cianouridină TP; 5-Dimetilaminouridină TP; 5'-Homo-uridină TP; 5-iodo-2'-fluoro-deoxiuridină TP; 5-Feniletiniluridină TP; 5-Trideuterometil-6-deuterouridină TP; 5-Trifluorometil-Uridină TP; 5-Vinilaruridină TP; 6-(2,2,2-Trifluoroetil)-pseudo-UTP; 6-(4-Morfolino)-pseudo-UTP; 6-(4-Tiomorfolino)-pseudo-UTP; 6-(Fenil Substituit)-pseudo-UTP; 6-Amino-pseudo-UTP; 6-Azido-pseudo-UTP; 6-Bromo-pseudo-UTP; 6-Butil-pseudo-UTP; 6-Cloro-pseudo-UTP; 6-Ciano-pseudo-UTP; 6-Dimetilamino-pseudo-UTP; 6-Etoxi-pseudo-UTP; 6-Etilcarboxilate-pseudo-UTP; 6-Etil-pseudo-UTP; 6-Fluoro-pseudo-UTP; 6-Formil-pseudo-UTP; 6-Hidroxi-amino-pseudo-UTP; 6-Hidroxi-pseudo-UTP; 6-Iodo-pseudo-UTP; 6-izo-Propil-pseudo-UTP; 6-Metoxi-pseudo-UTP; 6-Metilamino-pseudo-UTP; 6-Metil-pseudo-UTP; 6-Fenil-pseudo-UTP; 6-Fenil-pseudo-UTP; 6-Propil-pseudo-UTP; 6-terț-Butil-pseudo-UTP; 6-Trifluorometoxi-pseudo-UTP; 6-Trifluorometil-pseudo-UTP; Alfa-tio-pseudo-UTP; Pseudouridină 1-( acid 4-metilbensulfonic) TP; Pseudouridină 1-( acid 4-metilbenzoic) TP; Pseudouridină TP 1-\ acid [3-(2-etoxi)] propionic; Pseudouridină TP 1-[3-{2-(2-\ acid [2-(2-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi}]propionic; Pseudouridină TP 1-[3-{2-(2-[2-\ acid {2(2-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi}-etoxi}]propionic; Pseudouridină TP 1-[3-(2-(2-\ acid [2-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi}]propionic; Pseudouridină TP 1-[3-\ acid {2-(2-etoxi)-etoxi}]propionic; Pseudouridină TP acid 1-metilfosfonic; Pseudouridină TP ester dietilic al acidului 1-metilfosfonic; acid pseudo-UTP-N1-3-propionic; acid pseudo-UTP-NI-4-butanoic; acid Pseudo-UTP-N1-5-pentanoic; acid Pseudo-UTP-N1-6-hexanoic; acid Pseudo-UTP-N 1-7-heptanoic; acid Pseudo-UTP-N 1-metil-p-benzoic; acid Pseudo-UTP-N 1-p-benzoic; Wibutozină; Hidroxiwibutozină; Izowiozină; Peroxiwibutozină; hidroxiwibutozină sub modificare; 4-demetilwiozină; 2,6-(diamino)purină; 1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-il; 1,3-( diaza)-2-( oxo )-fentiazin-1-il; 1,3-(diaz)-2-(oxo)-fenoxazin-1-il; 1,3,5-(triaz)-2,6-(diox)-naftalene; 2 (amino)purine; 2,4,5-(trimetil)fenil; 2' metil, 2'amino, 2'azido, 2'fluorocitidină; 2' metil, 2'amino, 2'azido, 2'fluoro-adenină; 2'metil, 2'amino, 2'azido, 2'fluoro-uridină; 2'-amino-2'-deoxiriboză; 2-amino-6-Cloro-purină; 2-aza-inozinil; 2'-azido-2'-deoxiriboză; 2'fluoro-2'-deoxiriboză; 2'fluoro-modified baze; 2'-O=metil-riboză; 2-oxo-7-aminopiridopirimidin-3-il; 2-oxo-piridopirimidină-3-il; 2-piridinone; 3 nitropirol; 3-(metil)-7-(propinil)izocarbostirilil; 3-(metil)izocarbostirilil; 4-(fluoro)-6-(metil)benzimidazol; 4-(metil)benzimidazol; 4-(metil)indolil; 4,6-(dimetil)indolil; 5 nitroindol; pirimidine5 substituit; 5-(metil)izocarbostirilil; 5-nitroindol; 6-(aza)pirimidină; 6-(azo)timină; 6-(metil)-7-(aza)indolil; 6-cloro-purină; 6-fenil-pirol-pirimidin-2-on-3-il; 7-(aminoalchilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fentiazin-1-il; 7-(aminoalchilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-il; 7-(aminoalchilhidroxi)-1,3-(diaz)-2-(oxo)-fenoxazin-1-il, 7-(aminoalchilhidroxi)-1,3-(diaz)-2-(oxo)-

fentiazin-1-il; 7-(aminoalchilhidroxi)-1,3-( diaza)-2-(oxo)-fenoxazin-1-il; 7-(aza)indolil; 7-(guanidiniumalchilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio )-3-(aza)-fenoxazin-1-il; 7-(guanidiniumatalkilhidroxi)-1-(axa)-2-(tio )-3-(aza)-fentiazin-1-il; 7-(guanidiniumalchilhidroxi)-1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-il; 7-(guanidiniumalchilhidroxi)-1,3-(diază)-2-(oxo)-fenoxazin-1-il; 7-(guanidiniumalchilhidroxi)-1,3-(diază)-2-(oxo)-fentiazin-1-il; 7-(guanidiniumalchilhidroxi)-1,3-(diază)-2-(oxo)-fenoxazin-1-il; 7-(propinil)izocarbostirilil; 7-(propinil)izocarbostirilil, propinil-7-(aza)indolil; 7-deaza-inozinil; 7-substituit 1-(aza)-2-(tio)-3-(aza)-fenoxazin-1-il; 7-substituit 1,3-(diază)-2-(oxo)-fenoxazin-1-il; 9-(metil)-imidizopiridinil; Aminoindolil; Antracenil; bis-orto-(aminoalchilhidroxi)-6-fenil-pirol-pirimidin-2-on-3-il; bis-orto-substituit-6-fenil-pirol-pirimidin-2-on-3-il; Difluorotolil; Hypoxantine; Imidizopiridinil; Inozinil; Izocarbostirilil; Izoguanizină; N2-substituit purine; N6-metil-2-amino-purină; N6-substituit purine; N-derivat de alchilat; Naftalenil; Nitrobenzimidazolil; Nitroimidazolil; Nitroindazolil; Nitropirazolil; Nubularine; O6-substituit purine; O- derivat de alchilat; orto-(aminoalchilhidroxi)-6-fenil-pirol-pirimidin-2-on-3-il; orto-substituit-6-fenil-pirol-pirimidin-2-on-3-il; Oxoformicin TP; para-(aminoalchilhidroxi)-6-fenil-pirol-pirimidin-2-on-3-il; para-substituit-6-fenil-pirol-pirimidin-2-on-3-il; Pentaceniil; Fenantraceniil; Fenil; propinil-7-(aza)indolil; Pirenil; piridopirimidin-3-il; piridopirimidin-3-il, 2-oxo-7-amino-piridopirimidin-3-il; pirol-pirimidin-2-on-3-il; Pirolopirimidinil; Pirolopirizinil; Stilbenzil; substituit 1,2,4-triazols; Tetraceniil; Tubercidină; Xantină; Xantozină-5'-TP; 2-tio-zebularină; 5-aza-2-tio-zebularină; 7-deaza-2-amino-purină; piridin-4-one ribonucleozide; 2-Amino-ribozidă-TP; Formicină A TP; Formicină B TP; Pirolozină TP; 2'-OH-ara-adenozină TP; 2'-OH-ara-citidină TP; 2'-OH-ara-uridină TP; 2'-OH-ara-guanozină TP; 5-(2-carbometoxivinil)uridină TP; și N6-(19-Amino-pentaanonadecil)adenozinăTP.

În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) include o combinație de cel puțin două (de exemplu, 2, 3, 4 sau mai multe) dintre nucleobazele modificate menționate mai sus.

În unele variante de realizare, nucleobazele modificate din polinucleotidă (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) sunt selectate din grupul care constă din pseudouridină ( $\psi$ ), N1-metilpseudouridină (m1 $\psi$ ), N1-etilpseudouridină, 2-tiouridină, 4'-tiouridină, 5-metilcitozină, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridină, 2-tio-1-metil-pseudouridină, 2-tio-5-aza-uridină, 2-tio-dihidropseudouridină, 2-tio-dihidrouridină, 2-tio-pseudouridină, 4-metoxi-2-tio-pseudouridină, 4-metoxi-pseudouridină, 4-tio-1-metil-pseudouridină, 4-tio-pseudouridină, 5-aza-uridină, dihidropseudouridină, 5-metiluridină, 5-metoxiuridină și 2'-O-metil uridină. În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) include o combinație de cel puțin două (de exemplu, 2, 3, 4 sau mai multe) dintre nucleobazele modificate menționate mai sus. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

În unele variante de realizare, nucleobazele modificate din polinucleotide (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) sunt selectate din grupul care constă din 1-metil-pseudouridină (m1 $\psi$ ), 5-metoxi-uridină (mo5U), 5-metil-citidină (m5C), pseudouridină ( $\psi$ ),  $\alpha$ -tio-guanozină și  $\alpha$ -tio-adenozină. În unele variante de realizare, polinucleotida include o combinație din cel puțin două (de exemplu, 2, 3, 4 sau mai multe) dintre nucleobazele modificate menționate anterior. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde pseudouridină ( $\psi$ ) și 5-metil-citidină (m5C). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde 1-metil-pseudouridină (m1 $\psi$ ). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde 1-metil-pseudouridină (m1 $\psi$ ) și 5-metil-citidină (m5C). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde 2-tiouridină (s2U). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde 2-tiouridină și 5-metil-citidină (m5C). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde metoxi-uridină (mo5U). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde 5-metoxi-uridină (mo5U) și 5-metil-citidină (m5C). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde 2'-O-metil uridină. În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde 2'-O-metil uridină și 5-metil-citidină (m5C). În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde N6-metil-adenozină (m6A). În unele variante de realizare, polinucleotida

(de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) cuprinde N6-metil-adenozină (m6A) și 5-metil-citidină (m5C). Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

5 În unele variante de realizare, polinucleotida (de exemplu, polinucleotida ARN, cum ar fi polinucleotida ARNm) este modificată uniform (*de exemplu*, complet modificată, modificată pe parcursul întregii secvențe) pentru o anumită modificare. De exemplu, o polinucleotidă poate fi modificată uniform cu 5-metil-citidină (m5C), ceea ce înseamnă că toate reziduurile de citozină din secvența de ARNm sunt înlocuite cu 5-metil-citidină (m5C). Similar, o polinucleotidă poate fi modificată uniform pentru orice tip  
10 de reziduu nucleozidic prezent în secvență prin înlocuire cu un reziduu modificat, cum ar fi oricare dintre cele specificate mai sus. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

15 În unele variante de realizare nucleobaza modificată este o citozină modificată. Exemple de nucleobaze și nucleozide o citozină modificată includ N4-acetil-citidină (ac4C), 5-metil-citidină (m5C), 5-halo-citidină (de exemplu, 5-iodo-citidină), 5-hidroximetil-citidină (hm5C), 1-metil-pseudoizocitidină, 2-tio-citidină (s2C), 2-tio-5-metil-citidină.

20 În unele variante de realizare, o nucleobază modificată este o uridină modificată. Exemple nucleobaze și nucleozide care au o uridină modificată includ 5-ciano uridină sau 4'-tio uridină. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

25 În unele variante de realizare, o nucleobază modificată este o adenină modificată. Exemple nucleobaze și nucleozide având o adenină modificată include 7-deaza-adenină, 1-metiladenozină (m1A), 2-metil-adenină (m2A), N6-metil-adenozină (m6A), și 2,6-Diaminopurină. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

30 În unele variante de realizare, o nucleobază modificată este o guanină modificată. Exemple nucleobaze și nucleozide având o guanină modificată include inozină (I), 1-metil-inozină (m1I), wiozină (imG), metilwiozină (mimG), 7-deaza-guanozină, 7-ciano-7-deaza-guanozină (preQ0), 7-aminometil-7-deaza-guanozină (preQ1), 7-metil-guanozină (m7G), 1-metil-guanozină (m1G), 8-oxo-guanozină, 7-metil-8-oxo-guanozină. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

35 În unele variante de realizare, polinucleotidele funcționează ca ARN mesager (ARNm). "ARN mesager" (ARNm) se referă la orice polinucleotidă care codifică o (cel puțin o) polipeptidă (un polimer de aminoacizi natural, nenatural sau modificat) și care poate fi translatată pentru a produce polipeptida codificată *in vitro*, *in vivo*, *in situ* sau *ex vivo*. Componentele de bază ale unei molecule de ARNm includ tipic cel puțin o regiune de codificare, o regiune 5' netranslatată (UTR), un 3' UTR, un cap 5' și o coadă poli-A. Polinucleotidele pot funcționa ca ARNm, dar pot fi diferențiate de ARNm de tip sălbatic prin  
40 caracteristicile lor funcționale și/sau structurale de proiectare care servesc la depășirea problemelor existente de exprimare eficientă a polipeptidei folosind terapii bazate pe acid nucleic.

ARNm-ul, așa cum este furnizat aici, cuprinde cel puțin o (una sau mai multe) polinucleotide de acid ribonucleic (ARN) având un cadru de citire deschis care codifică cel puțin o polipeptidă de interes.  
45 În unele variante de realizare, o polinucleotidă de ARN dintr-un ARNm codifică 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-10, 7-9, 7-8, 8-10, 8-9 sau 9-10 polipeptide. În unele variante de realizare, o polinucleotidă de ARN dintr-un ARNm codifică cel puțin 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 sau 100 polipeptide. În unele variante de realizare, o polinucleotidă de ARN dintr-un ARNm codifică cel puțin  
50 100 sau cel puțin 200 polipeptide.

55 În unele variante de realizare, acizii nucleici sunt ARNm-uri terapeutice. Așa cum se utilizează aici, termenul "ARNm terapeutic" se referă la un ARNm care codifică o proteină terapeutică. Proteinele terapeutice mediază o varietate de efecte într-o celulă gazdă sau un subiect pentru a trata o boală sau a ameliora semnele și simptomele unei boli. De exemplu, o proteină terapeutică poate înlocui o proteină care este deficitară sau anormală, poate crește funcția unei proteine endogene, poate oferi o nouă funcție unei celule (de exemplu, inhiba sau activa o activitate celulară endogenă sau poate acționa ca agent de  
60 livrare pentru un alt compus (de exemplu, un conjugat anticorp-medicament). ARNm terapeutic poate fi util pentru tratamentul următoarelor boli și afecțiuni: infecții bacteriene, infecții virale, infecții parazitare, tulburări de proliferare celulară, tulburări genetice și tulburări autoimune.

Astfel, structurile conform invenției pot fi utilizate ca agenți terapeutici sau profilactici. Sunt furnizate pentru utilizarea în medicină. De exemplu, ARNm-ul structurilor descrise aici poate fi administrat unui subiect, în care polinucleotidele sunt translatate in vivo pentru a produce o peptidă terapeutică. Sunt furnizate compoziții, metode, kituri și reactivi pentru diagnosticarea, tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni la oameni și alte mamifere. Agenții activi terapeutic conform invenției includ structurile, celulele care conțin structuri sau polipeptidele translatate din polinucleotidele conținute în structuri.

Structurile pot fi induse pentru translație într-o celulă, țesut sau organism. O astfel de transducție poate fi in vivo, ex vivo, în cultură sau in vitro. Celula, țesutul sau organismul este pus în contact cu o cantitate eficientă dintr-o compoziție care conține o structură care conține polinucleotidele de ARNm, fiecare dintre acestea având cel puțin o regiune translatabilă care codifică o peptidă.

O "cantitate eficientă" de structuri este furnizată pe baza, cel puțin parțial, pe țesutul țintă, tipul celulei țintă, mijloacele de administrare, caracteristicile fizice ale polinucleotidei (de exemplu, dimensiunea și extinderea nucleozidelor modificate) și alte componente ale acizii nucleici și alți determinanți. În general, o cantitate eficientă de acizi nucleici asigură o producție de peptide indusă sau stimulată în celulă.

ARNm-ul din prezenta invenție poate fi proiectat pentru a codifica polipeptide de interes selectate din oricare dintre mai multe categorii țintă incluzând, dar fără a se limita la, substanțe biologice, anticorpi, vaccinuri, proteine sau peptide terapeutice, peptide care penetrează celulele, proteine secretate, proteine ale membranei plasmatică, proteine citoplasmice sau citoscheletice, proteine legate de membrana intracelulară, proteine nucleare, proteine asociate bolilor umane, fragmente țintite sau acele proteine codificate de genomul uman pentru care nu a fost identificată nicio indicație terapeutică, dar care au totuși utilitate în domenii de cercetare și descoperire. "Proteină terapeutică" se referă la o proteină care, atunci când este administrată unei celule, are un efect terapeutic, de diagnostic și/sau profilactic și/sau determină un efect biologic și/sau farmacologic dorit.

ARNm-ul dezvăluit aici poate codifica una sau mai multe substanțe biologice. Așa cum se utilizează aici, un produs "biologic" este o moleculă pe bază de polipeptide produse prin metodele furnizate aici și care poate fi utilizată pentru a trata, vindeca, atenua, preveni sau diagnostica o boală sau o afecțiune gravă sau care pune viața în pericol. Produsele biologice, conform prezentei invenții includ, dar nu se limitează la, extracte alergene (de exemplu, pentru injecții și teste alergice), componente sanguine, produse de terapie genică, țesut uman sau produse celulare utilizate în transplant, vaccinuri, anticorpi monoclonali, citokine, factori de creștere, enzime, trombolitice și imunomodulatoare, printre altele.

Conform prezentei invenții, una sau mai multe substanțe biologice comercializate sau în dezvoltare în prezent pot fi codificate de ARNm-ul din prezenta invenție. Deși nu se dorește să fie legat de teorie, se crede că încorporarea polinucleotidelor de codificare ale unei substanțe biologice cunoscute în ARNm-ul conform invenției va avea ca rezultat o eficacitate terapeutică îmbunătățită datorită, cel puțin în parte, specificității, purității și/sau selectivității construcțiilor proiectate.

ARNm-ul dezvăluit aici poate codifica unul sau mai mulți anticorpi sau fragmente ale acestora. Termenul "anticorp" include anticorpi monoclonali (inclusiv anticorpi de lungime completă care au o regiune Fc de imunoglobulină), compoziții de anticorpi cu specificitate poliepitopică, anticorpi multispecifici (de exemplu, anticorpi bispecifici, diacorpi și molecule cu un singur lanț), precum și fragmente de anticorpi. Termenul "imunoglobulină" (Ig) se utilizează aici, interschimbabil cu "anticorp". Așa cum se utilizează aici, termenul "anticorp monoclonal" se referă la un anticorp obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi, adică anticorpii individuali care cuprind populația sunt identici, cu excepția posibilelor mutații care apar natural și/sau modificări post-translație (de exemplu, izomerizări, amidări) care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpii monoclonali sunt avea o specificitate ridicată, fiind îndreptați împotriva unui singur situs antigenic.

Anticorpii monoclonali de aici includ specific anticorpi "himerici" (imunoglobuline) în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este identică sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare din anticorpii derivați de la o anumită specie sau aparținând unei anumite clase sau subclase de anticorpi, în timp ce restul lanțului(lor) este (sunt) identic(e) sau omolog(e) cu secvențele corespunzătoare din anticorpii derivați de la o altă specie sau aparținând unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmente ale unor astfel de anticorpi, atâta timp cât prezintă activitatea biologică dorită. Anticorpii

himerici de interes de aici includ, dar nu se limitează la, anticorpi "primatizași" care cuprind secvențe de legare a antigenului de domeniu variabil derivate de la o primată non-umană (de exemplu, maimuță din lumea veche, maimuță etc.) și secvențe de regiune constantă umană.

5 Un "fragment de anticorp" cuprinde o porțiune a unui anticorp intact, de preferință de legare a antigenului și/sau regiunea variabilă a anticorpului intact. Exemple de fragmente de anticorpi includ Fab, Fab'. Fragmente F(ab')<sub>2</sub> și Fv; diacorpi; anticorpi liniari; nanocorpi; molecule de anticorpi cu o singură catenă și anticorpi multispecifici formați din fragmente de anticorpi.

10 Oricare dintre cele cinci clase de imunoglobuline, IgA, IgD, IgE, IgG și IgM, poate fi codificată de ARNm-ul invenției, incluzând lanțurile grele denumite alfa, delta, epsilon, gamma și respectiv mu. Sunt incluse, de asemenea, secvențe de polinucleotide care codifică subclasele, gamma și mu. Prin urmare, oricare dintre subclasele de anticorpi poate fi codificată parțial sau în întregime și include următoarele subclase: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 și IgA2. Conform prezentei invenții, unul sau mai  
15 mulți anticorpi sau fragmente comercializate în prezent sau în dezvoltare pot fi codificate de ARNm-ul din prezenta invenție.

20 Anticorpii codificați în ARNm-ul invenției pot fi utilizați pentru a trata afecțiuni sau boli în multe domenii terapeutice, cum ar fi, dar fără a se limita la, sânge, cardiovasculare, CNS, otrăviri (inclusiv antiveninuri), dermatologice, endocrinologice, gastrointestinale, imagistică medicală, musculo-scheletice, oncologie, imunologie, respiratorii, senzoriale și antiinfecțioase.

25 Într-o variantă de realizare, ARNm-ul dezvoltat aici poate codifica anticorpi monoclonali și/sau variante ale acestora. Variantele de anticorpi pot include, de asemenea, dar nu se limitează la, variante de substituție, substituție conservative de aminoacizi, variante de inserție, variante de deleție și/sau derivați covalenți. Într-o variantă de realizare, ARNm-ul dezvoltat aici poate codifica o regiune Fc de imunoglobulină. Într-o altă variantă de realizare, ARNm-ul poate codifica o regiune Fc a unei variante a imunoglobulinei.

30 ARNm-ul dezvoltat aici poate codifica unul sau mai mulți antigeni de vaccin. Așa cum se utilizează aici, un "antigen de vaccin" este un preparat biologic care îmbunătățește imunitatea la o anumită boală sau agent infecțios. Conform prezentei invenții, unul sau mai mulți antigeni de vaccin comercializați în prezent sau în dezvoltare pot fi codificați de ARNm-ul din prezenta invenție. Antigenii de vaccin codificați în ARNm-ul conform invenției pot fi utilizați pentru a trata afecțiuni sau boli în multe  
35 domenii terapeutice cum ar fi, dar fără a se limita la, cancer, alergii și boli infecțioase.

40 ARNm-ul din prezenta invenție poate fi proiectat pentru a codifica pe sau mai multe peptide antimicrobiene (AMP) sau peptide antivirale (AVP). AMP-uri și AVP-uri au fost izolate și descrise dintr-o gamă largă de animale, cum ar fi, dar fără a se limita la, microorganisme, nevertebrate, plante, amfibieni, păsări, pești și mamifere. Polipeptidele anti-microbiene descrise aici pot bloca fuziunea celulară și/sau intrarea virală a unuia sau mai multor virusi anvelopați (de exemplu, HIV, HCV). De exemplu, polipeptida anti-microbiană poate cuprinde sau consta dintr-o peptidă sintetică corespunzătoare unei regiuni, de exemplu, o secvență consecutivă de cel puțin aproximativ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40,  
45 45, 50, 55 sau 60 de aminoacizi ai subunității transmembranare a unei proteine de anvelopă virală, de exemplu, HIV-1 gp120 sau gp41. Secvențele de aminoacizi și nucleotide ale HIV-1 gp120 sau gp41 sunt descrise în, de exemplu, Kuiken și colab, (2008). "HIV Sequence Compendium," Los Alamos National Laboratory.

50 În unele variante de realizare, polipeptida anti-microbiană poate avea cel puțin aproximativ 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% omologie de secvență cu secvența de proteină virală corespunzătoare. În unele variante de realizare, polipeptida anti-microbiană poate avea cel puțin aproximativ 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 100% omologie de secvență cu secvența de proteină virală corespunzătoare.

55 În alte variante de realizare, polipeptida antimicrobiană poate cuprinde sau consta dintr-o peptidă sintetică corespunzătoare unei regiuni, de exemplu, o secvență consecutivă de cel puțin aproximativ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 sau 60 de aminoacizi ai domeniului de legare al unei proteine de legare a capsidului. În unele variante de realizare, polipeptida antimicrobiană poate avea cel puțin aproximativ 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 100% omologie de secvență cu secvența corespunzătoare a proteinei de legare a capsidului.  
60

Polipeptidele anti-microbiene descrise aici pot bloca dimerizarea proteazei și pot inhiba



scindarea proproteinelor virale (de exemplu, procesarea HIV Gag-pol) în proteine funcționale, prevenind astfel eliberarea unuia sau mai multor virusuri anvelopate (de exemplu, HIV, HCV). În unele variante de realizare, polipeptida anti-microbiană poate avea cel puțin aproximativ 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% omologie de secvență cu secvența de proteină virală corespunzătoare.

5

În alte variante de realizare, polipeptida antimicrobiană poate cuprinde sau poate consta dintr-o peptidă sintetică corespunzătoare unei regiuni, de exemplu, o secvență consecutivă de cel puțin aproximativ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 sau 60 de aminoacizi ai domeniului de legare al unei proteine de legare la protează. În unele variante de realizare, polipeptida anti-microbiană poate avea cel puțin aproximativ 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% omologie de secvență cu secvența corespunzătoare a proteinei de legare la protează.

10

O listă nelimitativă a bolilor infecțioase pe care antigenii vaccinului ARNm sau peptidele antimicrobiene le pot trata este prezentată mai jos: virusul imunodeficienței umane (HIV), HIV care are ca rezultat infecție micobacteriană, Cacheixa legată de SIDA, infecția cu citomegalovirus asociată cu SIDA, nefropatia asociată cu HIV, Lipodistrofia, meningita criptococică legată de SIDA, neutropenia legată de SIDA, infecții cu Pneumocystis jiroveci (Pneumocystis carinii), toxoplasmoza asociată cu SIDA, hepatita A, B, C, D sau E, herpesul, herpesul zoster (varicela), rujeola germană (virusul rubeolic), febra galbenă, febra dengue etc. (virusuri flavi), gripă (virusuri gripale), boli infecțioase hemoragice (virusuri Marburg sau Ebola), boli infecțioase bacteriene precum boala legionarului (Legionella), ulcerul gastric (Helicobacter), holera (Vibrio), infecții cu E. coli, infecții cu stafilococ, infecții cu salmonella sau infecții streptococice, tetanos (Clostridium tetani), boli infecțioase cu protozoare (malaria, boala somnului, leishmanioză, toxoplasmoza, adică infecții cauzate de plasmodium, tripanosomcs, leishmanie și toxoplasmă), difteria, lepra, rujeola, pertussis, rabia, tetanosul, tuberculoza, tifoida, varicela, infecții diareice asociate cu Amoebiasis, diareea asociată cu Clostridium difficile (CDAD), criptosporidioza, giardioza, ciclosporiatoza și gastroenterita rotavirală, encefalita cum ar fi encefalita japoneza, encefalita ecvină occidentală și encefalita transmisă de căpușe (TBE), bolile fungice ale pielii, cum ar fi candidoza, onicomicoza, Tinea capitis/scal vierme inelar, Tinea corporis/ corp vierme inelar, Tinea cruris/mâncărime, sportricoză și Tinea pedis/picior de atlet, meningită precum Haemophilus influenza tip b (Hib), meningită, virală, infecții, meningococice și infecții pneumococice, boli tropicale neglijate, cum ar fi febra hemoragică argentiniană, Leishmanioza, infecții cu nematode/viermi inelari, infecția cu virusul Ross river și boala cu virusul West Nile (WNV), bolile STD-uri non-HIV, cum ar fi trichomonioza, infecții cu papilomavirus uman (HPV), boli cu chlamydia cu transmitere sexuală, chancroid și sifilis, infecții bacteriene non-septice, cum ar fi celulita, boala Lyme, infecția cu MRSA, pseudomonas, infecții stafilococice, febră Boutonneuse, leptospiroză, febră reumatică. Botulism, boala rickettsială și mastoidita, infecții parazitare cum ar fi cisticercioza, echinococoza, infecțiile cu trematode/Fluke, trichineloză, babezioza, hipodermiata, difilobotriata și tripanosomiata, infecțiile respiratorii cum ar fi infecția cu adenovirus, infecția aspergiloza, gripa aviara (H5N1) gripa, infecții RSV, sindrom respirator acut sever (SARS), sinuzită, legioneloză, coccidioidomicoză și gripă porcină (H1N1), sepsis cum ar fi bacteriemia, sepsis/șoc septic, sepsis la copii prematuri, infecții ale tractului urinar, cum ar fi infecții vaginale (bacteriene), infecții vaginale (fungice) și gonococice, boli virale ale pielii, cum ar fi infecții cu parvovirus B19, veruci, herpes genital, herpes orofacial, zona zoster, infecții ale urechii interne, sindromul citomegalovirus fetal, boli alimentare cum ar fi bruceloza (specia Brucella), Clostridium perfringens (toxina Epsilon) E. Coli 0157:H7 (Escherichia coli), Salmoneloză (specia Salmonella), Shingelloză (Shingella), vibrioză și listerioză, bioterorism și potențiale boli epidemice, cum ar fi febra hemoragică Ebola, febra Lassa, febra hemoragică Marburg, ciurma, boala cu virusul Antrax Nipah, virusul Hanta, variola, Glanders (Burkholderia mallei), Melioidosis (Burkholderia pseudomallei), Psittacoza (Chlamydia psittaci), febra Q (Coxiella burnetii), Tularemia (Francisella tularensis), rubeola, oreionul și poliomielite.

50

ARNm-ul dezvăluit aici poate codifica una sau mai multe proteine sau peptide terapeutice validate sau "în testare". Conform prezentei invenții, una sau mai multe proteine sau peptide terapeutice aflate în prezent pe piață sau în dezvoltare pot fi codificate de ARNm-ul din prezenta invenție. Proteinele și peptidele terapeutice codificate în ARNm-ul conform invenției pot fi utilizate pentru a trata afecțiuni sau boli în multe domenii terapeutice, cum ar fi, dar fără a se limita la, sânge, cardiovascular, CNS, otrăvire (inclusiv antiveninuri), dermatologie, endocrinologie, genetică, genito-urinar, gastrointestinale, musculo-scheletice, oncologice și imunologice, respiratorii, senzoriale și antiinfecțioase.

55

ARNm-ul dezvăluit aici poate codifica una sau mai multe polipeptide care pătrund în celule. Așa cum se utilizează aici, "polipeptidă care pătrunde în celule" sau CPP se referă la o polipeptidă care poate facilita absorbția celulară a moleculelor. O polipeptidă care pătrunde în celule din prezenta invenție poate

60

conține una sau mai multe etichete detectabile. Polipeptidele pot fi etichetate parțial sau etichetate complet pe tot parcursul. ARNm-ul poate codifica eticheta detectabilă complet, parțial sau deloc. Peptida care pătrunde în celule poate include, de asemenea, o secvență semnal. Așa cum este utilizată aici, o "secvență semnal" se referă la o secvență de resturi de aminoacizi legate la capătul amino-terminal al unei proteine născând în timpul translației proteinei. Secvența semnal poate fi utilizată pentru a semnaliza secreția polipeptidică care pătrunde în celule.

Într-o variantă de realizare, ARNm-ul poate codifica, de asemenea, o proteină de fuziune. Proteina de fuziune poate fi creată prin legarea operațională a unei proteine încărcate la o proteină terapeutică. Așa cum se utilizează aici, "legat operabil" se referă la proteina terapeutică și proteina încărcată care sunt conectate într-un asemenea mod pentru a permite exprimarea complexului atunci când este introdus în celulă. Așa cum se utilizează aici, "proteină încărcată" se referă la o proteină care poartă o sarcină electrică pozitivă, negativă sau total neutră. De preferință, proteina terapeutică poate fi legată covalent de proteina încărcată în formarea proteinei de fuziune. Raportul dintre sarcina de suprafață și aminoacizii totali sau de suprafață poate fi de aproximativ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 sau 0,9.

Polipeptida care pătrunde în celule codificată de ARNm poate forma un complex după ce a fost translatată. Complexul poate cuprinde o proteină încărcată legată, de exemplu legată covalent, la polipeptida care pătrunde în celule.

Într-o variantă de realizare, polipeptida care pătrunde în celule poate cuprinde un prim domeniu și un al doilea domeniu. Primul domeniu poate cuprinde o polipeptidă supraîncărcată. Al doilea domeniu poate cuprinde un partener de legare la proteine. Așa cum se utilizează aici, "partenerul de legare la proteină" include, dar nu este limitat la, anticorpi și fragmente funcționale ale acestora, proteine de tip schelă sau peptide. Polipeptida care pătrunde în celulă poate cuprinde în plus un partener de legare intracelulară pentru partenerul de legare la proteină. Polipeptida care pătrunde în celulă poate fi capabilă să fie secretată dintr-o celulă în care poate fi introdus ARNm-ul. Polipeptida care pătrunde în celulă poate fi, de asemenea, capabilă să pătrundă în prima celulă.

Într-o variantă de realizare, ARNm-ul poate codifica o polipeptidă care pătrunde în celulă care poate cuprinde un partener de legare la proteină. Partenerul de legare la proteină poate include, dar nu este limitat la, un anticorp, un anticorp supraîncărcat sau un fragment funcțional. ARNm-ul poate fi introdus în celula în care este introdusă o polipeptidă care pătrunde în celulă cuprinzând partenerul de legare a proteinei.

Unele variante de realizare ale prezentei dezvoltării furnizează un ARNm terapeutic care include cel puțin o polinucleotidă de acid ribonucleic (ARN) având un cadru de citire deschis care codifică cel puțin o polipeptidă antigenică, în care polinucleotida ARN a ARN-ului include cel puțin o modificare chimică. În unele variante de realizare, modificarea chimică este selectată dintre pseudouridină, N1-metilpseudouridină, N1-etilpseudouridină, 2-tiouridină, 4'-tiouridină, 5-metiletozină, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridină, 2-tio-1-metil-pseudouridină, 2-tio-5-aza-uridină, 2-tio-dihidropseudouridină, 2-tio-dihidrouridină, 2-tio-pseudouridină, 4-metoxi-2-tio-pseudouridină, 4-metoxi-pseudouridină, 4-tio-1-metil-pseudouridină, 4-tio-pseudouridină, 5-aza-uridină, dihidropseudouridină, 5-metiluridină, 5-metoxiuridină, și 2'-O-metil uridină. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenției.

Oricare dintre polinucleotidele de mai sus din prezenta dezvoltare, în unele exemple de realizare, sunt optimizate prin codon. Metodele de optimizare prin codoni sunt cunoscute în domeniu și pot fi utilizate așa cum este redat aici. Optimizarea prin codoni, în unele variante de realizare, poate fi utilizată pentru a potrivi frecvențele codonilor în organismele țintă și gazdă pentru a asigura plierea corespunzătoare; înclinarea conținutului de GC pentru a crește stabilitatea ARNm-ului sau a reduce structurile secundare; minimizarea repetițiilor în tandem ale codonilor sau cursele de bază care pot afecta construcția sau exprimarea genei; personalizarea regiunilor de control transcripțional și translațional; inserarea sau eliminarea secvențelor de trafic de proteine; eliminarea/adăugarea site-urilor de modificare post-translație în proteina codificată (de exemplu, situsurile de glicozilare); adăugarea, îndepărtarea sau amestecarea domeniilor de proteine; inserarea sau deletarea situsurilor cu restricții; modificarea situsurilor de legare a ribozomilor și a situsurile de degradare a ARNm; ajustarea ratelor de translație pentru a permite diferitelor domenii ale proteinei să se plieze corespunzător; sau pentru a reduce sau elimina structurile secundare problematice din polinucleotidă. Instrumentele, algoritmii și serviciile de optimizare a codonilor sunt cunoscute în domeniu - exemplele nelimitative includ servicii de la GeneArt (Life

Technologies), DNA2.0 (Menlo Park CA) și/sau metode brevetate. În unele variante de realizare, secvența de cadru deschis de citire (ORF) este optimizată utilizând algoritmi de optimizare.

5 În unele variante de realizare o secvență optimizată prin codon are mai puțin de 95% identitate de secvență cu o secvență naturală sau de tip sălbatic (de exemplu, o secvență de ARNm naturală sau de tip sălbatic care codifică o polipeptidă sau o proteină de interes (de exemplu, o proteină sau polipeptidă antigenică). În unele exemple de realizare, o secvență optimizată prin codon împărtășește mai puțin de 90% identitate de secvență cu o secvență naturală sau de tip sălbatic (*de exemplu*, o secvență de ARNm naturală sau de tip sălbatic care codifică o polipeptidă sau o proteină de interes (de exemplu, o proteină sau polipeptidă antigenică). În unele variante de realizare, o secvență optimizată de codon are mai puțin de 85% identitate de secvență cu o secvență naturală sau de tip sălbatic (de exemplu, o secvență de ARNm naturală sau de tip sălbatic care codifică o polipeptidă sau o proteină de interes) În unele variante de realizare, o secvență optimizată de codon împărtășește mai puțin de 80% identitate a secvenței cu o secvență naturală sau de tip sălbatic (de exemplu, cu o secvență de ARNm naturală sau de tip sălbatic care codifică o polipeptidă sau proteină de interes (de exemplu, o proteină sau polipeptidă antigenică. În unele variante de realizare, o secvență optimizată de codon împărtășește mai puțin de 75% identitate a secvenței cu o secvență naturală sau de tip sălbatic (*de exemplu*, cu o secvență de ARNm naturală sau de tip sălbatic care codifică o polipeptidă sau proteină de interes (de exemplu, o proteină sau polipeptidă antigenică.

20 În unele variante de realizare, o secvență optimizată de codon împărtășește între 65% și 85% (de exemplu, între aproximativ 67% și aproximativ 85% sau între aproximativ 67% și aproximativ 80%) identitate a secvenței cu o secvență naturală sau de tip sălbatic (*de exemplu*, cu o secvență de ARNm naturală sau de tip sălbatic care codifică o polipeptidă sau proteină de interes (de exemplu, o proteină sau polipeptidă antigenică. În unele variante de realizare, o secvență optimizată de codon împărtășește între 65% și 75 sau aproximativ 80% identitate a secvenței cu o secvență naturală sau de tip sălbatic (de exemplu, cu o secvență de ARNm naturală sau de tip sălbatic care codifică o polipeptidă sau proteină de interes (*de exemplu*, o proteină sau polipeptidă antigenică.

30 În unele variante de realizare un ARN optimizat de codon poate fi, de exemplu, unul în care nivelurile de G/C sunt sporite. Conținutul G/C al moleculelor de acid nucleic poate influența stabilitatea ARN-ului. ARN-ul având o cantitate crescută de reziduuri de guanină (G) și/sau citozină (C) poate fi mai stabil din punct de vedere funcțional decât acizii nucleici care conțin o cantitate mare de nucleotide de adenină (A) și timidină (T) sau uracil (U). WO02/098443 dezvăluie o compoziție farmaceutică care conține un ARNm stabilizat prin modificări de secvență în regiunea translatată. Datorită degenerării codului genetic, modificările funcționează prin înlocuirea codonilor existenți cu cei care promovează o mai mare stabilitate a ARN-ului fără a modifica aminoacidul rezultat. Abordarea este limitată la regiunile de codificare ale ARN-ului.

40 Așa cum se utilizează aici, atunci când se face referire la polipeptide, termenii "situs" în ceea ce privește formele de realizare pe bază de aminoacizi sunt utilizați sinonim cu "reziduu de aminoacid" și "lanț lateral de aminoacid". Așa cum se utilizează aici când se face referire la polinucleotide, termenii "situs" în ceea ce privește formele de realizare pe bază de nucleotide sunt utilizați sinonim cu "nucleotide". Un situs reprezintă o poziție în cadrul unei peptide sau polipeptide sau polinucleotide care poate fi modificată, manipulată, alterată, derivatizată sau variată în cadrul moleculelor pe bază de polipeptidă sau polinucleotidă.

50 Așa cum se utilizează aici, termenii "terminal" sau "terminali" atunci când se referă la polipeptide sau polinucleotide se referă la o extremitate a unei polipeptide sau, respectiv, polinucleotide. O astfel de extremitate nu este limitată doar la primul situs sau cel final al polipeptidei sau polinucleotidei, ci poate include aminoacizi sau nucleotide suplimentare în regiunile terminale. Moleculele pe bază de polipeptide pot fi caracterizate ca având atât un capăt N-terminal (terminat de un aminoacid cu o grupare amino liberă (NH<sub>2</sub>)) cât și un capăt C-terminal (terminat de un aminoacid cu o grupare carboxil liberă (COOH)). Proteinele sunt în unele cazuri alcătuite din mai multe lanțuri polipeptidice reunite prin legături disulfurice sau prin forțe necovalente (multimeri, oligomeri). Aceste proteine au multipli N- și C-terminali. Alternativ, capetele terminale ale polipeptidelor pot fi modificate astfel încât să înceapă sau să se termine, după caz, cu un fragment non-polipeptidic, cum ar fi un conjugat organic.

60 Așa cum este recunoscut de către specialiștii în domeniu, fragmentele de proteine, domeniile proteice funcționale și proteinele omoloage sunt, de asemenea, considerate a fi în sfera polipeptidelor de interes. De exemplu, aici este furnizat orice fragment de proteină (adică o secvență de polipeptidă cel

puțin cu un reziduu de aminoacid mai scurtă decât o secvență de polipeptidă de referință, dar altfel identică) al unei proteine de referință cu 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 sau mai mult de 100 de aminoacizi în lungime. Într-un alt exemplu, orice proteină care include o întindere de 20, 30, 40, 50 sau 100 de aminoacizi care sunt 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% sau 100% identice cu oricare dintre secvențele descrise aici pot fi utilizate în conformitate cu dezvoltarea. În unele variante de realizare, o polipeptidă include 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau mai multe mutații așa cum sunt prezentate în oricare dintre secvențele furnizate sau la care se face referire aici. Într-un alt exemplu, orice proteină care include o întindere de 20, 30, 40, 50 sau 100 de aminoacizi care sunt mai mult de 80%, 90%, 95% sau 100% identici cu oricare dintre secvențele descrise aici, în care proteina are o întindere de 5, 10, 15, 20, 25 sau 30 aminoacizii care sunt mai puțin de 80%, 75%, 70%, 65% sau 60% identici cu oricare dintre secvențele descrise aici pot fi utilizați în conformitate cu dezvoltarea.

Moleculele de polipeptide sau polinucleotide din prezenta dezvoltare pot împărtăși un anumit grad de asemănare sau identitate a secvenței cu moleculele de referință (de exemplu, polipeptide de referință sau polinucleotide de referință), de exemplu, cu molecule descrise în domeniu (*de exemplu*, molecule concepute sau proiectate sau molecule de tip sălbatic). Termenul "identitate", așa cum este cunoscut în domeniu, se referă la o relație între secvențele a două sau mai multe polipeptide sau polinucleotide, așa cum este determinată prin compararea secvențelor. În domeniu, identitatea înseamnă, de asemenea, gradul de înrudire a secvențelor dintre ele, așa cum este determinat de numărul de potriviri între șiruri pentru două sau mai multe reziduuri de aminoacizi sau reziduuri de acid nucleic. Identitatea măsoară procentul de potriviri identice dintre cele mai mici dintre două sau mai multe secvențe cu aliniamente ale golurilor (dacă există) abordate de un model matematic sau program de calculator particularizat (*de exemplu*, "algoritmi"). Identitatea peptidelor înrudite poate fi calculată cu ușurință prin metode cunoscute. „% identitate”, așa cum se aplică secvențelor de polipeptide sau polinucleotide, este definită ca fiind procentul de reziduuri (reziduuri de aminoacizi sau reziduuri de acizi nucleici) din secvența candidată de aminoacizi sau de acizi nucleici care sunt identice cu reziduurile din secvența de aminoacizi sau secvența de acizi nucleici a unei a doua secvențe, după alinierea secvențelor și introducerea golurilor, dacă este necesar, pentru a se realiza procentul maxim de identitate. Metodele și programele de calculator pentru aliniere sunt bine cunoscute în domeniu. Se înțelege că identitatea depinde de un calcul al procentului de identitate, dar poate diferi ca valoare din cauza golurilor și penalităților introduse în calcul. În general, variantele unei anumite polinucleotide sau polipeptide au cel puțin 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, dar mai puțin de 100% identitate de secvență cu acea polinucleotidă sau polipeptidă de referință particulară, așa cum este determinată de programele de aliniere de secvențe și parametri descriși aici și cunoscuți de specialiștii în domeniu. Astfel de instrumente de aliniere le includ pe cele ale suitei BLAST (Stefen F. Altschul, și colab (1997), "Gapped BLAST și PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402). O altă tehnică populară de aliniere locală se bazează pe algoritmul Smith-Waterman (Smith, T.F. & Waterman, M.S. (1981) "Identification of common molecular subsequences." *J. Mol. Biol.* 147:195-197). O tehnică generală de aliniere globală bazată pe programare dinamică este algoritmul Needleman-Wunsch (Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) "A general method applicable la the search for similarities în the amino acid sequences of two proteins." *J. Mol. Biol.* 48:443-453.). Mai recent, a fost dezvoltat un algoritm rapid de aliniere a secvenței globale optime (FOGSAA) care se presupune că produce alinierea globală a secvențelor de nucleotide și proteine mai rapid decât alte metode de aliniere globală optimă, inclusiv algoritmul Needleman-Wunsch. Alte instrumente sunt descrise aici, specific în definiția "identității" de mai jos.

Așa cum se utilizează aici, termenul "omologie" se referă la înrudirea globală dintre moleculele polimerice, de exemplu între molecule de acid nucleic (de exemplu, molecule de ADN și/sau molecule de ARN) și/sau între molecule de polipeptide. Moleculele polimerice (de exemplu, molecule de acid nucleic (de exemplu, molecule de ADN și/sau molecule de ARN) și/sau molecule de polipeptide) care au o similitudine sau identitate determinate prin alinierea reziduurilor care se potrivesc, de un nivel de prag, sunt denumite omoloage. Omologia este un termen calitativ care descrie o relație între molecule și se poate baza pe similitudinea sau identitatea cantitativă. Similitudinea sau identitatea reprezintă un termen cantitativ care definește gradul de potrivire a secvenței dintre două secvențe comparate. În unele variante de realizare, moleculele polimerice sunt considerate a fi "omoloage" una cu cealaltă dacă secvențele lor sunt de cel puțin 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70. %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 99% identice sau similare. Termenul "omolog" se referă în mod necesar la o comparație între cel puțin două secvențe (secvențe de polinucleotide sau polipeptide). Două secvențe de polinucleotide sunt considerate omoloage dacă polipeptidele pe care le codifică sunt de cel puțin 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% sau chiar 99% pentru cel puțin o întindere de cel puțin 20 de aminoacizi. În unele variante de realizare, secvențele de polinucleotide omoloage sunt caracterizate prin capacitatea de a codifica o

întindere de cel puțin 4-5 aminoacizi unic specificați. Pentru secvențele de polinucleotide cu lungime mai mică de 60 de nucleotide, omologia este determinată de capacitatea de a codifica o întindere de cel puțin 4-5 aminoacizi unic specificați. Două secvențe de proteine sunt considerate omoloage dacă proteinele sunt cel puțin 50%, 60%, 70%, 80% sau 90% identice pentru cel puțin o întindere de cel puțin 20 de aminoacizi.

Omologia implică faptul că secvențele comparate au variat în evoluție de la o origine comună. Termenul "omologul" se referă la o primă secvență de aminoacizi sau secvență de acid nucleic (de exemplu, genă (ADN sau ARN) sau secvență de proteină) care este legată de o a doua secvență de aminoacizi sau secvență de acid nucleic prin descendența dintr-o secvență ancestrală comună. Termenul "omolog" se poate aplica relației dintre gene și/sau proteine separate prin evenimentul de speciație sau relației dintre gene și/sau proteine separate prin evenimentul de duplicare genetică. "Ortologii" sunt gene (sau proteine) din diferite specii care au evoluat dintr-o genă (sau proteină) ancestrală comună prin speciație. Tipic, ortologii păstrează aceeași funcție în cursul evoluției. "Paralogii" sunt gene (sau proteine) înrudite prin duplicarea într-un genom. Ortologii păstrează aceeași funcție în cursul evoluției, în timp ce paralogii dezvoltă noi funcții, chiar dacă acestea sunt legate de cea de origine.

Termenul "identitate" se referă la înrudirea globală dintre moleculele polimerice, de exemplu, între moleculele de polinucleotide (de exemplu, moleculele de ADN și/sau moleculele de ARN) și/sau între moleculele de polipeptide. Calculul procentului de identitate a două secvențe de acid polinucleic, de exemplu, poate fi efectuat prin alinierea celor două secvențe în scopuri de comparare optimă (de exemplu, pot fi introduse goluri într-una sau ambele dintre secvențele de acid nucleic a unei prime și a doua dintre secvențe pentru o aliniere optimă și secvențele neidentice pot fi ignorate în scopuri de comparație). În anumite exemple de realizare, lungimea unei secvențe aliniate în scopuri de comparație este de cel puțin 30%, cel puțin 40%, cel puțin 50%, cel puțin 60%, cel puțin 70%, cel puțin 80%, cel puțin 90%, cel puțin 95% sau 100% din lungimea secvenței de referință. Nucleotidele din pozițiile nucleotidelor corespunzătoare sunt apoi comparate. Când o poziție din prima secvență este ocupată de aceeași nucleotidă ca și poziția corespunzătoare din a doua secvență, atunci moleculele sunt identice în acea poziție. Procentul de identitate dintre cele două secvențe este o funcție a numărului de poziții identice pe care le împărtășesc secvențele, luând în considerare numărul de goluri și lungimea fiecărui gol, care trebuie introdus pentru alinierea optimă a celor două secvențe. Compararea secvențelor și determinarea procentului de identitate între două secvențe pot fi realizate folosind un algoritm matematic. De exemplu, procentul de identitate dintre două secvențe de acid nucleic poate fi determinat folosind metode precum cele descrise în Computational Molecular Biology, Lesk, A. M, ed, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics și Genome Projects, Smith, D. W, ed, Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis în Molecular Biology, von Heinje, G, Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M, și Griffin, H. G, eds, Humana Press, New Jersey, 1994; și Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. și Devereux, J, eds, M Stockton Press, New York, 1991. De exemplu, procentul de identitate dintre două secvențe de acid nucleic poate fi determinat folosind algoritmul lui Meyers și Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), care a fost încorporat în programul ALIGN (versiunea 2.0) folosind un tabel de greutate de reziduuri PAM120, o penalizare pentru lungimea golului de 12 și o penalizare a golului de 4. Procentul de identitate dintre două secvențe de acid nucleic poate fi determinat, alternativ, folosind Programul GAP din pachetul software GCG folosind o matrice NWSgapdna.CMP. Metodele utilizate de regulă pentru a determina procentul de identitate între secvențe includ, dar nu se limitează la cele de mai sus în Carillo, H, și Lipman, D, SIAM J Applied Math, 48:1073 (1988). Tehnicile de determinare a identității sunt codificate în programe de calculator disponibile publicului. Un exemplu de program de calculator pentru determinarea omologiei între două secvențe include, dar nu se limitează la, pachetul de programe GCG, Devereux, J, și colab, Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984), BLASTP, BLASTN, și FASTA Altschul, S. F. și colab, J. Molec. Biol, 215, 403 (1990).

Agentul imunomodulator poate fi un agent imunostimulator sau un agent imunoinhibitor.

Un agent imunostimulator este un agent care stimulează un răspuns imun (inclusiv intensificarea unui răspuns imun preexistent) la un subiect cărui i se administrează, fie singur fie în combinație cu un alt agent. Exemplele includ antigeni, adjuvanți (de exemplu, liganzi de TLR cum ar fi imiquimod, imidazochinolină, acizi nucleici care cuprind o dinucleotidă CpG nemetilată, monofosforil lipidă A sau alți derivați de lipopolizaharide, ARN monocatenar sau dublu catenar, flagelină, dipeptidă muramil), citokine incluzând interleukine (de exemplu, IL-2, IL-7, IL-15 (sau forme de superagonist/mutant ale acestor citokine), IL-12, IFN-gamma, IFN-alfa, GM-CSF, FLT3-ligand, etc.), anticorpi imunostimulatori

(de exemplu, anti-CTLA-4, anti-CD28, anti-CD3, sau fragmente monocatenare/anticorp ale acestor molecule) și altele asemenea.

Un agent imunoinhibitor este un agent care inhibă un răspuns imun la un subiect cărui i se administrează, fie singur fie în combinație cu un alt agent. Exemplele includ steroizi, acid retinoic, dexametazonă, ciclofosfamidă, anticorp anti-CD3 sau fragment de anticorp și alte imunopresoare.

Adjuvanții sunt agenți care îmbunătățesc un răspuns imun. Adjuvantul poate fi, fără limitare, alaun (de exemplu, hidroxid de aluminiu, fosfat de aluminiu); saponine purificate din coaja arborelui Q. saponaria cum ar fi QS21 (o glicolipidă care eluează în al 21-lea pic de fracționare prin HPLC; Antigenics, Inc., Worcester, Mass.); poli[di(carboxilatofenoxi) fosfazenă (polimer PCPP; Virus Research Institute, USA), ligand Flt3, factor de alungire Leishmania (o proteină purificată Leishmania; Corixa Corporation, Seattle, Wash.), ISCOMS (complecși imunostimulatori care conțin amestecuri de saponine, lipide și formează particule de dimensiunea unui virus cu pori care pot deține un antigen; CSL, Melbourne, Australia), Pam3Cys, SB-AS4 (sistem de adjuvant #4 SmithKline Beecham care conține alaun și MPL; SBB, Belgia), copolimeri bloc neionici care formează micle cum ar fi CRL 1005 (acestea conțin un lanț liniar de polioxipropilenă hidrofobă flancat de lanțuri de polioxietilenă, Vaxcel, Inc, Norcross, Ga.), și Montanide IMS (de exemplu, IMS 1312, nanoparticule pe bază de apă combinate cu un imunostimulant solubil, Seppic.)

Adjuvanții pot fi liganzi TLR. Adjuvanții care acționează prin TLR3 includ, fără limitare, ARN dublu catenar Adjuvanții care acționează prin TLR4 includ fără limitare, derivați ai lipopolizaharidelor, cum ar fi monofosforil lipidă A (MPLA; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.) și muramil dipeptidă (MDP; Ribi) și treonil-muramil dipeptidă (t-MDP; Ribi); OM-174 (o dizaharidă de glucozamină înrudită cu lipida A; OM Pharma SA, Meyrin, Elveția). Adjuvanții care acționează prin TLR5 includ, fără limitare, flagelina. Adjuvanții care acționează prin TLR7 și/sau TLR8 includ ARN monocatenar, oligoribonucleotide (ORN), compuși sintetici cu greutate moleculară mică, cum ar fi imidazochinolinaminele (de exemplu, imiquimod, resiquimod). Adjuvanții care acționează prin TLR9 includ ADN de origine virală sau bacteriană sau oligodeoxinucleotide sintetice (ODN), cum ar fi CpG ODN. O altă clasă de adjuvanți este formată moleculele care conțin fosforotioat, cum ar fi analogii nucleotidelor de fosforotioat și acizii nucleici care conțin legături de coloană vertebrală fosforotioat.

Antigenul poate fi, fără limitare, un antigen de cancer, un auto-antigen, un antigen microbial, un alergen sau un antigen de mediu. Antigenul poate fi de natură peptidică, lipidică sau carbohidrat, dar nu este atât de limitat.

Un antigen de cancer este un antigen care este exprimat preferențial de către celulele canceroase (adică este exprimat la niveluri mai mari în celulele canceroase decât în celulele necanceroase) și în unele cazuri este exprimat numai de celulele canceroase. Antigenul canceros poate fi exprimat în interiorul unei celule canceroase sau pe suprafața celulei canceroase. Antigenul de cancer poate fi MART-1/Melan-A, gp100, proteina de legare a adenozin deaminazei (ADAbp), FAP, ciclofilină b, antigenul asociat colorectal (CRC)--C017-1A/GA733, antigen carcinoembrionic (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AMLI, antigen specific prostatei (PSA), PSA-1, PSA-2, PSA-3, antigen de membrană specific prostatei (PSMA), receptor al celulei T /lanț CD3-zeta, și CD20. Antigenul de cancer poate fi selectat din grupul care constă din MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5). Antigenul de cancer poate fi selectat din grupul care constă din GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9. Antigenul de cancer poate fi selectat din grupul care constă din BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirozinază, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1,  $\alpha$ -fetoproteină, E-cadherină,  $\alpha$ -catenină,  $\beta$ -catenină,  $\gamma$ -catenină, p120ctn, gp100Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteina coli de polipoză adenomatoasă (APC), fodrină, Connexină 37, Ig-idiotip, p15, gp75, GM2 gangliozidă, GD2 gangliozidă, proteine de virus papilloma uman, familia de antigeni tumorali Smad, Imp-1, P1A, antigen nuclear codificat de EBV (EBNA)-1, glicogen fosforilază cerebrală, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 și CT-7, CD20, și c-erbB-2. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

Antigenii microbieni sunt antigeni derivați din specii microbiene, cum ar fi, fără limitare, speciile bacteriene, virale, fungice, parazitare și micobacteriene. Ca atare, antigenii microbieni includ antigeni bacterieni, antigeni virali, antigeni fungici, antigeni parazitari și antigeni micobacterieni. Sunt

furnizate aici exemple de specii bacteriene, virale, fungice, parazitare și micobacteriene. Antigenul microbial poate face parte dintr-o specie microbială sau poate fi întregul microb.

Un agent anticancerigen este un agent care inhibă cel puțin parțial dezvoltarea sau progresarea unui cancer, inclusiv inhibarea totală sau parțială a simptomelor asociate cu cancerul, chiar dacă numai pe termen scurt. Mai mulți agenți anticancerigeni pot fi clasificați ca agenți de deteriorare a ADN-ului și aceștia includ inhibitori de topoizomerază (de exemplu, etopozidă, ramptotecină, topotecan, tenipozidă, mitoxantronă), agenți alchilanți de ADN (de exemplu, cisplatină, mecloretamină, ciclofosfamidă, ifosfamidă, melfalan, corambucil, busulfan, tiotepa, carmustină, lomustină, carboplatină, dacarbazină, procarbazină), agenți care induc ruperea catenei de ADN (de exemplu, bleomicină, doxorubicină, daunorubicină, idarubicină, mitomicină C), agenți anti-microtubule (de exemplu, vincristină, vinblastină), agenți anti-metabolici (de exemplu, citarabină, metotrexat, hidroxiuree, 5-fluorouracil, floxuridină, 6-tioguanină, 6-mercaptopurină, fludarabină, pentostatină, clorodeoxiadenozină), antracicline, alcaloizi vinca sau epipodofilotoxine.

Exemple de agenți anti-cancerigeni includ fără limitare Acivicină; Aclarubicină; Clorhidrat de Acodazol; Acronină; Adozelezină; Aldesleukin; Altretamină; Ambomicin; Acetat de Ametantronă; Aminoglutetimidă; Amsacrină; Anastrozol; Antramicină; Asparaginază; Asperlină; Azacitidină; Azetepa; Azotomicină; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamidă; Clorhidrat de Bisantren; Dimesilat de Bisnafidă; Bizelezină; Sulfat de Bleomicină; Bortezomib (VELCADE); Brechinar Sodiu; Bropirimină; Busulfan; Cactinomicină; Calusteronă; Caracemidă; Carbetimer; Carboplatină (un regim care conține platină); Carmustină; Clorhidrat de Carubicină; Carzelezină; Cedefingol; Clorambucil; Cirolemicină; Cisplatină (un regim care conține platină); Cladribină; Mesilat de Crisnatol; Ciclofosfamidă; Citarabină; Dacarbazină; Dactinomicină; Daunorubicină; Decitabină; Dexormaplatină; Dezaguanină; Diaziquonă; Docetaxel (TAXOTERE); Doxorubicină; Droloxifen; Dromostanolonă; Duazomicină; Edatrexat; Eflornitină; Elsamitruicină; Enloplatin; Enpromat; Epiropidină; Epirubicin; Erbulozol; Erlotinib (TARCEVA); Erorubicin; Estramustină; Etanidazol; Etopozidă; Etoprină; Fadrozol; Fazarabină; Fenretinidă; Floxuridină; Fludarabină; 5-Fluorouracil; Flurocitabină; Fosquidonă; Fostriccină; Gefitinib (IRESSA); Gemcitabină; Hidroxiuree; Idarubicină; Ifosfamidă; Ilmofozină; mesilat de Imatinib (GLEEVAC); Interferon alfa-2a; Interferon alfa-2b; Interferon alfa-n1; Interferon alfa-n3; Interferon beta-I a; Interferon gamma-I b; Iproplatină; Irinotecan; Lanreotidă; Lenalidomidă (REVLIMID, REVIMID); Letrozol; Leuprolidă; Liarozol; Lometrexol; Lomustină; Losoxantronă; Masoprocol; Maytansină; Mecloretamină; Megestrol; Melengestrol; Melfalan; Menogaril; Mercaptopurină; Metotrexate; Metoprină; Meturedopa; Mitindomidă; Mitocarcină; Mitocromină; Mitogillină; Mitomalcină; Mitomicină; Mitosper; Mitotan; Mitoxantronă; Acid Micofenolic; Nocodazol; Nogalamycină; Ormaplatină; Oxisuran; Paclitaxel; Pemetrexed (ALIMTA); Pegaspargază; Peliomicină; Pentamustină; Pentomonă; Peplomicină; Perfosfamidă; Pipobroman; Puposulfan; Izetionat de Piritrexim; Piroxantronă; Plicamicină; Plomestan; Porfimer; Porfiromicină; Prednimustină; Procarbazină; Puromicină; Pirazofurin; Riboprină; Rogletimidă; Safingol; Semustină; Simtrazen; Sitogluzidă; Sparfosat; Sparsomicină; Spirogermaniu; Spiromustină; Spiroplatină; Streptonigrină; Streptozocină; Sulofenur; Talizomicină; Tamsulozină; Taxol; Taxoter; Tecogalan; Tegafur; Teloxantronă; Temoporfin; Temozolomid (TEMODAR); Tenipozidă; Teroxironă; Testolactonă; Talidomidă (THALOMID) și derivați ai acestora; Tiamiprină; Tioguanină; Tiotepa; Tiazofurină; Tirapazamină; Topotecan; Toremifen; Trestolonă; Triciribină; Trimetrexat; Triptorelin; Tubulozol; Muștar de Uracil; Uredopa; Vapreotidă; Verteporfin; Vinblastină; Vincristină; Vindesină; Vinepidină; Vinglicinate; Vinleurozină; Vinorelbină; Vinrosidină; Vinzolidină; Vorozol; Zeniplatin; Zinostatin; Zorubicin.

Agentul anti-cancer poate fi un inhibitor enzimatic incluzând, fără limitare, un inhibitor al tirozin kinazei, un inhibitor CDK, un inhibitor al MAP kinazei sau un inhibitor EGFR. Inhibitorul de tirozin kinază poate fi fără limitare Genisteină (4',5,7-trihidroxiizoflavonă), Tirfostin 25 (3,4,5-trihidroxifenil), metilen]-propandinitril, Herbimicină A, Daidzeină (4',7-dihidroxiizoflavonă), AG-126, trans-1-(3'-carboxi-4'-hidroxifenil)-2-(2",5"-dihidroxi-fenil)etan, sau HDBA acid (2-Hidroxi5-(2,5-Dihidroxibenzilamino)-2-hidroxibenzoic. Inhibitorul CDK poate fi fără limitare p21, p27, p57, p15, p16, p18, sau p19. Inhibitorul de MAP kinază poate fi fără limitare KY12420 (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>), CNI-1493, PD98059, sau 4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfonil fenil)-5-(4-piridil) 1H-imidazol. Inhibitorul de EGFR poate fi, fără limitare erlotinib (TARCEVA), gefitinib (IRESSA), WHI-P97 (derivat de chinazolină), LFM-A12 (analog de metabolit de leflunomidă), ABX-EGF, lapatinib, canertinib, ZD-6474 (ZACTIMA), AEE788, și AG1458.

Agentul anticancerigen poate fi un inhibitor VEGF, incluzând, fără limitare, bevacizumab

(AVASTIN), ranibizumab (LUCENTIS), pegaptanib (MACUGEN), sorafenib, sunitinib (SUTENT), vatalanib, ZD-6474 (ZACTIMA), anecortavă (RETAANE), lactat de scualamină, și semaforin.

5 Agentul anti-cancerigen poate fi un anticorp sau un fragment de anticorp incluzând, fără limitare, un anticorp sau un fragment de anticorp incluzând, dar fără a se limita la, bevacizumab (AVASTIN), trastuzumab (HERCEPTIN), alemtuzumab (CAMPATH, indicat pentru leucemia limfocitară cronică cu celule B) gemtuzumab (MILOTARG, hP67,6, anti-CD33, indicat pentru leucemie cum ar fi leucemie mieloidă acută), rituximab (RITUXAN), tositumomab (BEXXAR, anti-CD20, indicat pentru malignitate cu celule B), MDX-210 (anticorp bispecific care se leagă simultan de produsul proteic oncogen HER-2/neu și receptorii Fc tip 1 pentru imunoglobulina G (IgG) (Fc gama RI)), oregovomab (OVAREX, 10 indicat pentru cancer ovarian), edrecolomab (PANOREX), daclizumab (ZENAPAX), palivizumab (SYNAGIS, indicat pentru afecțiuni respiratorii cum ar fi infecția RSV), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN, indicat pentru limfom Non-Hodgkin), cetuximab (ERBITUX), MDX-447, MDX-22, MDX-220 (anti-TAG-72), IOR-C5, IOR-T6 (anti-CD1), IOR EGF/R3, celogovab (ONCOSCINT OV103), 15 epratuzumab (LYMFOCIDE), pentumomab (THERAGYN), și Gliomab-H (indicat pentru cancer cerebral, melanom).

Un agent de diagnostic, care poate fi denumit aici agent de imagistică, este un agent care emite direct sau indirect un semnal, permițând astfel detectarea sa *in vivo*. Agenți de diagnostic, cum ar fi agenți 20 de contrast și agenți radioactivi, care pot fi detectați folosind tehnici de imagistică medicală, cum ar fi scanările de medicină nucleară și imagistica prin rezonanță magnetică (MRI). Agenții de imagistică pentru imagistica prin rezonanță magnetică (MRI) includ Gd(DOTA), nanoparticule de oxid de fier sau de aur; agenți de imagistică pentru medicina nucleară includ <sup>201</sup>Tl, radionuclid emițător de gamma 99 mTc; 25 agenții de imagistică pentru tomografia cu emisie de pozitroni (PET) includ izotopi care emit pozitroni, (18)F-fluorodeoxiglucoză ((18)FDG), (18)F-fluorură, cupru-64, gadoamidă și radioizotopi de Pb(II) precum ca 203 Pb și 111In; agenți de imagistică pentru imagistica fluorescență *in vivo*, cum ar fi coloranți fluorescenți sau nanoparticule conjugate cu colorant. În alte variante de realizare, agentul care urmează să fie eliberat este conjugat, sau fuzionat cu, sau amestecat sau combinat cu un agent de diagnostic.

30 Compușii și compozițiile pot fi administrate practic oricărui tip de subiect care este probabil să beneficieze de eliberarea agenților așa cum se prevede aici. Subiecții umani sunt subiecții preferați în unele variante de realizare ale invenției. Subiecții includ de asemenea și animale, cum ar fi animalele de companie (*de exemplu*, câini, pisici, iepuri, dihorni etc.), șeptel sau animale de fermă (de exemplu, vaci, porci, oi, găini și alte păsări), cai, cum ar fi cai pursânge, animale de laborator (de exemplu, șoareci, șobolani, iepuri, etc.), și altele asemenea. Subiecții includ, de asemenea, pești și alte specii acvatice. 35

Subiecții cărora li se livrează agenții pot fi subiecți normali. Alternativ, aceștia pot avea sau pot fi expuși riscului de a dezvolta o afecțiune care poate fi diagnosticată sau care poate beneficia de administrarea localizată a unuia sau mai multor agenți speciali. Astfel de afecțiuni includ cancer (de 40 exemplu, cancere cu tumori solide), infecții (în special infecții localizate în anumite regiuni sau țesuturi din organism), tulburări autoimune, alergii sau stări alergice, astm, respingere a transplantului și altele asemenea. În unele variante de realizare, subiecții au fost diagnosticați cu un defect genetic și li se administrează un medicament pe bază de acid nucleic.

45 Agenții pot fi administrați sistemic sau local. Agenții pot fi administrați în cantități eficiente. O cantitate eficientă este o doză de agent suficientă pentru a oferi un rezultat dezirabil din punct de vedere medical. Cantitatea eficientă va varia în funcție de afecțiunea particulară care este tratată, de vârsta și de starea fizică a subiectului tratat, de severitatea afecțiunii, de durata tratamentului, de natura terapiei concomitente sau combinate (dacă este cazul), de calea specifică de administrare și factori similari în 50 cadrul cunoștințelor și expertizei practicianului din domeniul sănătății. Se preferă, în general, să fie utilizată o doză maximă, adică cea mai mare doză sigură, conform raționamentului medical sănătos.

Invenția furnizează compoziții farmaceutice. Compozițiile farmaceutice sunt compoziții sterile care cuprind agenți și pot cuprinde vehicule de livrare, nanoparticule și altele asemenea, de preferință într-un purtător acceptabil farmaceutic. Termenul "purtător acceptabil farmaceutic" înseamnă unul sau mai multe materiale de umplutură solide sau lichide compatibile, diluanți sau substanțe de încapsulare care sunt adecvate pentru administrarea la un om sau alt subiect avut în vedere în invenție. Termenul "purtător" desemnează un ingredient organic sau anorganic, natural sau sintetic, cu care celulele, nanoparticulele și agentul(ii) sunt combinate pentru a facilita administrarea. Componentele compozițiilor farmaceutice sunt amestecate într-un mod care exclude interacțiunea care ar afecta substanțial eficiența farmaceutică dorită. 60



Compușii și compozițiile, atunci când este de dorit să fie livrate sistemic, pot fi formulate pentru administrarea parenterală prin injecție, de exemplu, prin injecție în bolus sau perfuzie continuă. Formulările pentru injecție pot fi prezentate sub formă de dozare unitară, *de exemplu*, în fiole sau în recipiente cu doze multiple. Formulările parenterale farmaceutice includ soluții apoase ale ingredientelor. Suspensiile apoase pentru injecție pot conține substanțe care cresc vâscozitatea suspensiei, cum ar fi carboximetil celuloza de sodiu, sorbitol sau dextranul. Alternativ, suspensiile de ingrediente pot fi preparate ca suspensii pe bază de ulei, cum sunt cunoscute în domeniu sau care vor fi ușor evidente pentru cei cu o calificare obișnuită în domeniu pe baza acestei dezvoltări.

Această dezvoltare ia în plus în considerare utilizarea LNP-urilor împreună cu unul sau mai mulți agenți secundari, inclusiv agenți care ar fi în mod normal indicați pentru subiect.

În unele cazuri, LNP-urile pot fi administrate substanțial simultan cu agenții secundari. Prin substanțial simultan, se înțelege că un LNP este administrat unui subiect apropiat în timp cu administrarea agentului secundar, incluzând, de exemplu, cu 1 oră, în 30 minute, în 10 minute sau în 5 minute.

În unele cazuri, agentul(ii) secundar(i) poate(pot) fi administrat(i) înainte de LNP. De exemplu, agentul(ii) secundar(i) poate(pot) fi administrat(i) înainte și în decurs de 24 de ore, sau în decurs de 18 ore, sau în decurs de 12 ore, sau în decurs de 6 ore, sau în decurs de 3 ore, sau în decurs de 2 ore de la administrarea LNP-ului. Agentul(ii) secundar(i) poate(pot) fi administrat(i) cu 18-24 de ore înainte de administrarea LNP-ului, sau 12-18 ore înainte de administrarea LNP-ului, sau 6-12 ore înainte de administrarea LNP-ului, sau 2-6 ore înainte de administrarea LNP-ului.

Subiecții cărora li s-au administrat unul sau mai mulți agenți secundari cu 2 sau mai multe ore înainte de administrarea LNP-ului pot fi denumiți ca fiind premedicați cu astfel de agent(i). Subiecții cărora li s-au administrat unul sau mai mulți agenți secundari cu o oră înainte de administrarea LNP-ului pot fi denumiți ca fiind mediați împreună cu un astfel de agent(i).

În unele cazuri, agentul(ii) secundar(i) poate(pot) fi administrat(i) subiectului continuu, după cum este necesar sau cu un program regulat (de exemplu, în fiecare zi, la fiecare două zile etc.).

În alte cazuri, agentul secundar poate fi administrat înainte sau după administrarea LNP-ului.

S Astfel de agenți secundari pot include, dar nu sunt limitați la, antihistaminice, agenți anti-trombocitari și medicamente antiinflamatoare nesteroidiene. În anumite variante de realizare, LNP-urile nu sunt formulate cu, și subiecții nu sunt pre- sau co-medicați cu un corticosteroid, cum ar fi, dar fără a se limita la, dexametazona.

În anumite variante de realizare, sunt utilizați agenți secundari individuali având efecte antiinflamatorii și antitrombocitare. Un exemplu de astfel de agent este aspirina.

În anumite variante de realizare, se utilizează o combinație de aspirină, clopidogrel (Plavix®), și un anti-histaminic cum ar fi dar fără a se limita la difenhidramină (Benadril), fexofenadină (Allegra), loratadină (Claritin), sau cetirizină. Unul sau mai mulți agenți secundari pot fi administrați o dată pe administrare de LNP, în timp ce alții pot fi administrați mai frecvent. De exemplu, clopidogrel (Plavix®) poate fi administrat o dată la fiecare administrare de LNP, în timp ce aspirina și/sau antihistaminicul pot fi administrate zilnic.

Antihistaminicele includ antagoniști ai receptorilor H1 și agoniștii inverși ai receptorilor H1.

Exemple de antagoniști ai receptorilor H1 includ, dar nu se limitează la acrivastină, alimemazină, tartrat de alimemazină, antazolină, astemizol, azatadină, maleat de azatadină, azelastină, bamipină, benzchinamidă, bepotastină, besilat de bepotastină, bilastin bromazină, bromofeniramină, buclizină, carbinoxamină, clorfenoxamină, clorciclizină, cinopentazon, histapirodină, clorodifenhidramină, cloropiramină, clorofenamină, clorpromazină, cinarizină, clemastină, clemizol, clocinizină, ciclizină, ciproheptadină, desloratadină, dectropină, dexclorfeniramină, dexbromfeniramină, dimenhidrinat, dimetindenă, dimetotiazină, difenhidramină (Benadril), pifenilpiralină, doxepină, doxilamină, ebastină, eflerizină, embramină, emedastină, epinastină, fexofenadină (Allegra), flunarizină, homoclorciclizină, hidroxizină, izotipendil, ketotifen, levocabastină (a-2-a generație), loratadină (Claritin), mebhidrolină, meclozină, mepiramină, mequitazină, metdilazină, mirtazapină, mizolastină,

niaprazină, olopatadină, orfenadrină, oxatomidă, oxomemazină, pemirolast, fenindamină, feniramină, feniltoloxamină, pimetixen, piprinhidrinat, prometazină, propiomazină, pirobutamină, quetiapină, quifenadină, rupatadină, setastină, terfenadină, tenildiaminc, tietilperazină, tonzilamină, tolpropamină, trimetobenzamină, tripeleennamină, triprolidină și tritoqualină.

5

Exemple de agoniști inverși ai receptorului H1 includ, dar nu se limitează la, pirilamină, cetirizină, levocetirizină și desloratadină.

10

Agenții anti-trombocitari includ, dar nu se limitează la, inhibitori de activare, inhibitori de agregare, antagoniști de aderență, medicamente anticoagulante (care nu vizează direct trombocitele) și agenți care reduc cuantumul sau numărul de trombocite.

15

20

25

30

Exemple de inhibitori de activare includ, dar nu se limitează la, (1) inhibitori ai receptorului de trombină PAR-1, cum ar fi SCH 530348 (vorapaxar), E-5555 (atopaxar), SCH79797, FR 171113, RWJ 56110, BMS-200661, RWJ-58259, SCH205831, Pipal-7 pepducin, P1pal-12 pepducin; (2) inhibitori ai receptorului de trombină PAR-4 cum ar fi ML 354, tY-NH2, P4pal-10 pepducin, P4pal-11 pepducin; (3) FSLLRY-NH2 (antagonist de peptidă PAR-2); (4) antagoniști ai receptorului TxA2 cum ar fi AH 23,848, SQ 29,548, sau R 68,070, S-1452, iozartan, seratrodist; (5) antagoniști ai receptorului de tromboxan cum ar fi terutroban; (6) inhibitori ai receptorului de ADP P2Y12 cum ar fi ticlopidină, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, cangrelor, elinogrel, AZD6140, AR-C69931, CoA; (7) inhibitori ai receptorului de ADP P2Y1 cum ar fi A2P5P, A3P5P, MRS2179, MRS2279, MRS2500, palmitoil-CoA (acționează de asemenea și asupra P2Y12), și alți compuși din studiul SAR al lui Thalji și colab. 2010; (8) antagoniști de 5-HT2A cum ar fi R-1012444, naftidrofuril, sarpogrelat, AT-1015; (9) inhibitori de tromboxan sintază cum ar fi dazoxiben, CS-518 (inhibitor de TXA2 sintază), SB 203580, U63557A, acid imidazo (1,5-2) piridin-5-hexanoic; (10) inhibitori de COX-1 cum ar fi aspirina, NCX-4016, ridogrel, S18886, picotamida, ramatroban (de asemenea și antagonist al receptorului de TXA2), SC-560, FR122047, mofezolac, P6, TFAP, ibuprofen și naproxen (de asemenea și inhibitori de Cox-2); (11) inhibitori de COX-2 cum ar fi triflusal (de asemenea și inhibitor de COX-1 și PDE), Etoricoxib, rofecoxib, celecoxib, mcloxicam; și (12) inhibitori de PI3K cum ar fi AZD6482.

35

Exemple de inhibitori de agregare includ, dar nu sunt limitate la (1) Inhibitori de GPIIa/IIIa cum ar fi EMS16; (2) inhibitori de GPVI cum ar fi anticorpi monoclonali și fragmente Fab de mAb 12A5; (3) inhibitori de GPIIb/IIIa cum ar fi abciximab, eptifibatidă, tirofiban; (4) inhibitori de PDE cum ar fi dipiridamol (de asemenea și inhibitor de reabsorbție a adenozei), cilostazol (inhibitor de PDE3 care are ca rezultat creșterea AMPc și PKA activată), și (5) antagoniști ai receptorului de ADP. Alți inhibitori ai agregării trombocitare includ aspirină, clopidogrel (Plavix®), aspirină/pravastatin, cilostazol, prasugrel, aspirină/dipiridamol, ticagrelor, cangrelor, elinogrel, dipiridamol, și ticlopidină.

40

Exemple de antagoniști de adeziune (la fibrinogen) includ, dar nu sunt limitate la proteina-1 legată de ClqTNF, DZ-697b, RG 12986.

45

Exemplele de agenți anticoagulanți netrombocitari includ, dar nu se limitează la warfarină; inhibitori de Xa cum ar fi rivaroxaban, apixaban, edoxaban, betrixaban, darexaban, otamixaban; inhibitori de trombină cum ar fi bivalirudin, hirudin, dabigatran, lepirudin, desirudin, argatroban, melagatran, dabigatran, CDSO3, FDSO3, SDSO3, și inhibitori alosterici de benzofurani sulfatați suplimentari raportați de Sidhu și colab. lucrare pe hârtie.

50

55

60

Exemple de agenți care reduc cuantumul sau numărul de trombocite includ, dar nu se limitează (1) inhibitori de fosfodiesterază cAMP (de exemplu, anagrelidă), 6,7-dicloro-1,5-dihidroimidazo-[2,1-b]chinazolin-2(3H)-onă sau 6,7-dicloro-1,2,3,5-tetrahidroimidazo[2,1-b]chinazolin-2-onă (Brevete U.S. 3.932.407; 4.146.718; RE31,617, Haematologica 1992 77:40-3), (2) anticorpi ai receptorilor de suprafață celulară exprimați specific de trombocite sau megacariocite, cum ar fi anticorpii receptorilor de glicoproteină IIb/IIIa, (3) majoritatea medicamentelor chimioterapeutice anticancerigene, cum ar fi busulfanul (Br. J. Haematol. 1986 62:229-37), hidroxiuree (N Engl J Med 1995 332:1132-6), hepsulfan, fosfor-32 (Br J Radiol 1997 70:1169-73), pipobroman (Scand J. Haematol 1986 37:306-9), ciclofosamidă (J Cell Physiol 1982 112:222-8), anumiți agenți de alchilare și anumiți antimetaboliți, (4) citokine, factori de creștere și interleukine cum ar fi alfa-interferon (Cancer Immunol Tmmunother 1987 25:266-73), gamma-interferon, factor de creștere transformator-beta, peptidă activatoare de neutrofile-2 și analogii săi (Brevet U.S. 5.472.944), proteina inflamatorie a macrofagelor și analogii săi ( Brevet U.S. 5.306.709), (5) compuși secretați fie de trombocite, fie de megacariocite, cum ar fi factorul trombocitar 4 (Brevet U.S. 5.185.323), factor de creștere transformator-beta, glicoproteina de 12-17 kD produsă de

megacariocite, trombină și trombospondină și fragmentul său terminal amino (aminoacid I-174) (J Lab Clin Med 1997 129:231-8), și (6) alți agenți, inclusiv agenți anticheloizi, cum ar fi (Rizaben) (J Dermatol 1998 25:706-9); forskolina și factorul anti-maturare a splinei (Brevet U.S. 4.088.753).

5 Agenții anti-trombocitari pot fi, de asemenea, caracterizați ca agenți anti-trombotici, agenți fibrinolitici, inhibitori direcți ai trombinei, inhibitori ai receptorilor glicoproteinei IIb/IIIa, agenți care se leagă la moleculele de adeziune celulară și inhibă capacitatea globulelor albe de a se atașa la astfel de molecule, blocante ale canalelor de calciu, blocante ale receptorilor beta-adrenergici, inhibitori ai ciclooxygenazei-2 și inhibitori ai sistemului de angiotensină.

10

Agenții anti-trombotici sunt definiți ca agenți care previn formarea unui tromb sanguin printr-un număr de potențiale mecanisme și includ agenți fibrinolitici, agenți anticoagulanți și inhibitori ai funcției trombocitelor.

15

Agenții fibrinolitici sunt definiți ca agenți care lizează un tromb (de exemplu, un cheag de sânge), tipic prin dizolvarea fibrinei prin acțiune enzimatică. Exemple de agenți trombolitici includ, dar nu se limitează la, ancrod, anistreplază, lactat de bizobrin, brinolază, fragmente de factor Hageman (adică factor XII), molsidomină, activatori de plasminogen cum ar fi streptokinază, activatori de plasminogen tisular (TPA) și urokinază, și plasmină și plasminogen. Agenții anticoagulanți includ, de asemenea, inhibitori ai factorului Xa, factorului TFPI, factorului VIIa, factorului IXc, factorului Va, factorului VIIIa precum și inhibitori ai altor factori de coagulare.

20

Agenții anticoagulanți sunt agenți care inhibă calea de coagulare prin impact negativ asupra producerii, depunerii, scindării și/sau activării factorilor esențiali în formarea unui cheag de sânge. Agenții anticoagulanți includ, dar nu se limitează la, antagoniști ai vitaminei K, cum ar fi cumarină și derivați de cumarină (de exemplu, warfarină de sodiu); glicozoaminoglicani cum ar fi heparinele atât în formă nefracționată, cât și în formă cu greutate moleculară mică; ardeparină de sodiu, bivalirudină, bromindionă, cumarină dalteparină de sodiu, desirudină, dicumarol, liapolat de sodiu, mesilat de nafamostat, fenprocumon, sulfatidă și tinzaparină de sodiu.

30

Alți agenți "anti-coagulanți" și/sau "fibrinolitici" includ Plasminogen; Streptokinază; Urokinază; Complex Activator de Plasminogen-Streptokinază Anizoilat; Pro-Urokinază; (Pro-UK); rTPA (alteplază sau activază; r indică recombinant); rPro-UK; Abbokinază; Eminază; Streptază; Clorhidrat de Anagrelidă; Bivalirudin; Dalteparin de Sodiu; Danaparoid de Sodiu; Clorhidrat de Dazoxiben; Sulfat de Efegatran; Enoxaparină de Sodiu; Ifetroban; Ifetroban de Sodiu; Tinzaparină de Sodiu; retaplază; Trifenagrel; Warfarin; Dextransi.

35

Încă alți agenți anticoagulanți includ, dar nu se limitează la, Ancrod; Soluție Anticoagulantă de Citrat Dextroză; Soluție Anticoagulantă de Citrat Fosfat Dextroză Adenină; Soluție Anticoagulantă de Citrat Fosfat Dextroză; Soluție Anticoagulantă de Heparină; Soluție Anticoagulantă de Citrat de Sodiu; Ardeparin de Sodiu; Bromindionă; Desirudin; Dicumarol; Heparină de Calciu; Heparin de Sodiu; Liapolat de Sodiu; Nafamostat Mesilat; Fenprocumon.

40

Agenții de lizare a cheagurilor includ, dar nu sunt limitați la, activator de plasminogen tisular, streptokinaza și nimodipină.

45

Inhibitorii funcției trombocitelor sunt agenți care afectează capacitatea trombocitelor mature de a-și îndeplini rolurile fiziologice normale (adică funcția lor normală). Trombocitele sunt în mod normal implicate într-un număr de procese fiziologice, cum ar fi adeziunea, de exemplu, la entitățile celulare și non-celulare, agregarea, de exemplu, în scopul formării unui cheag de sânge și eliberarea de factori cum ar fi factorii de creștere (de exemplu, factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF)) și componentele granulare trombocitare. O subcategorie de inhibitori ai funcției trombocitare este aceea a inhibitorilor agregării trombocitare care sunt compuși care reduc sau opresc capacitatea trombocitelor de a se asocia fizic cu ele însele sau cu alte componente celulare și non-celulare, excluzând astfel capacitatea trombocitelor de a forma un tromb.

50

55

Exemple de inhibitori utili ai funcției trombocitelor includ, dar nu se limitează la acadezină, anagrelidă, anipamil, argatroban, aspirină, clopidogrel, inhibitori de ciclooxygenază cum ar fi medicamentele antiinflamatoare nesteroidiene și compusul sintetic FR-122047, danaparoid de sodiu, clorhidrat de dazoxiben, analogi de diadenozină 5',5'''-P<sub>1</sub>,P<sub>4</sub>-tetrafosfat (Ap<sub>4</sub>A), difibrotidă, diclorhidrat de dilazep, 1,2- și 1,3- dinitrat de gliceril, dipiridamol, dopamină și 3-metoxitiramină, sulfat de efegatran,

60

enoxaparină de sodiu, glucagon, antagoniști de glicoproteină IIb/IIIa cum ar fi Ro-43-8857 și L-700,462, ifetroban, ifetroban de sodiu, iloprost, ester metilic de izocarbacin, izosorbid-5-mononitrat, itazigrel, ketanserin și BM-13,177, lamifiban, lifarizină, molsidomină, nifedipină, oxagrelat, antagoniști ai factorului de activare a trombocitelor PGE cum ar fi lexipafant, prostacilin (PGI<sub>2</sub>), pirazine, carbat de piridinol, ReoPro (adică, abciximab), sulfpirazonă, compuși sintetici BN-50727, BN-52021, CV-4151, E-5510, FK-409, GU-7, KB-2796, KBT-3022, KC-404, KF-4939, OP-41483, TRK-100, TA-3090, TFC-612 și ZK-36374, 2,4,5,7-tetratioctan, 2,2-dioxid de 2,4,5,7-tetratioctan, 2,4,5-tritiahexan, theofillin pentoxifillină, inhibitori de tromboxan și tromboxan sintetază cum ar fi picotamidă și sulotroban, ticlopidină, tirofiban, trapidil și ticlopidină, trifenagrel, trilinein, 5,6-bis(4-metoxifenil)-1,2,4-triazine 3-substituite, și anticorpi la glicoproteina IIb/IIIa precum și cei dezvăluiți în Brevetul U.S. 5.440.020, și medicamente anti-serotonin, Clopidogrel; Sulfpirazonă; Aspirină; Dipiridamol; Clofibrat; Carbat de Piridinol; PGE; Glucagon; medicamente Antiserotonice; Cafeină; Teofilină Pentoxifillină; Ticlopidină.

"Inhibitorii direcți ai trombinei" includ hirudin, hirugen, hirulog, agatroban, PPACK, aptameri de trombină.

"Inhibitorii receptorului glicoproteinei IIb/IIIa" sunt atât anticorpi, cât și non-anticorpi și includ, dar nu se limitează la ReoPro (abciximab), lamifiban, tirofiban.

"Blocantele canalelor de calciu" sunt o clasă diversă din punct de vedere chimic de compuși cu valoare terapeutică importantă în controlul unei varietăți de boli (Fleckenstein, Cir. Res. v. 52, (suppl. 1), pag.13-16 (1983); Fleckenstein, Experimental Facts și Therapeutic Prospects, John Wiley, New York (1983); McCall, D, Curr Pract Cardiol, v. 10, p. 1-11 (1985)). Blocantele canalelor de calciu sunt un grup eterogen de medicamente care împiedică sau încetinesc intrarea calciului în celule prin reglarea canalelor celulare de calciu. (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, Eaton, PA, pag. 963 (1995)). Majoritatea blocantelor canalelor de calciu disponibile în prezent și utile conform prezentei invenții aparțin uneia dintre cele trei grupe chimice majore de medicamente, dihidropiridinele, cum ar fi nifedipina, fenil alchil aminele, cum ar fi verapamilul și benzotiazepinele, cum ar fi diltiazem. Alte blocante ale canalelor de calciu utile conform invenției includ, dar nu se limitează la, amrinonă, amlodipină, benciclană, felodipină, fendilină, flunarizină, isradipină, nicardipină, nimodipină, perhexilenă, galopamil, tiapamil și analogi de tiapamil (cum ar fi 1993RO-11-2933), fenitoină, barbiturice, și peptidele de dinorfin, omega-conotoxina, și omega-agatoxina, și altele asemenea și/sau sări acceptabile farmaceutic ale acestora.

"Agenții de blocare a receptorilor beta-adrenergici" sunt o clasă de medicamente care antagonizează efectele cardiovasculare ale catecolaminelor în angina pectorală, hipertensiunea arterială și aritmiile cardiace. Blocanții receptorilor beta-adrenergici includ, dar nu se limitează la, atenolol, acebutolol, alprenolol, befunolol, betaxolol, bunitrolol, carteolol, celiprolol, hedroxalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metindol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimepranol, 2-(3-(1,1-dimetilet)-amino-2-hidroxi-propoxi)-3-piridencarbonitrilHCl, 1-butilamino-3-(2,5-diclorofenoxi)-2-propanol, 1-izopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-izopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propiltio)-4-(5-carbamoi-2-tienil)tiazol,7-(2-hidroxi-3-t-butilaminpropoxi)ftalidă. Compușii identificați mai sus pot fi utilizați ca amestecuri izomerice sau în forma lor levorotativă sau dextrorotativă.

Ciclooxigenaza-2 (COX-2) este o formă recent identificată de ciclooxigenază. "Ciclooxigenaza" este un complex enzimatic prezent în majoritatea țesuturilor care produce diverse prostaglandine și tromboxani din acidul arahidonic. Medicamentele nesteroidiene, antiinflamatoare își exercită cea mai mare parte a activității lor antiinflamatorii, analgezice și antipiretice și inhibă contracțiile uterine induse de hormoni și anumite tipuri de creștere a cancerului prin inhibarea ciclooxigenazei (cunoscută și sub numele de prostaglandin G/H sintază și/sau prostaglandin-endoperoxid sintază). Inițial, era cunoscută o singură formă de ciclooxigenază, "enzima constitutivă" sau ciclooxigenaza-1 (COX-1). Acesta și a fost identificat inițial în veziculele seminale bovine.

Ciclooxigenaza-2 (COX-2) a fost clonată, secvențializată și caracterizată inițial din surse de găină, murină și umană (vezi, de exemplu, Brevet U.S. 5.543.297, eliberat în 6 August, 1996 lui Cromlish, și colab., și cesionat lui Merck Frosst Canada, Inc, Kirkland, CA, intitulat: "Human ciclooxigenase-2 cDNA and assays for evaluating ciclooxigenase-2 activity").

Un număr de "inhibitori de COX-2" selectivi sunt cunoscuți în domeniu. Aceștia includ, dar nu

se limitează la, inhibitorii de COX-2 descriși în Brevetul U.S. 5.474.995 "Phenyl heterocycles as cox-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.521.213 "Diaryl bicyclic heterocycles as inhibitors of cyclooxygenase-2"; Brevetul U.S. 5.536.752 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.550.142 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.552.422 "Aryl substituted 5,5 fused aromatic nitrogen compounds as anti-inflammatory agents"; Brevetul U.S. 5.604.253 "N-benzylindol-3-yl propanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; Brevetul U.S. 5.604.260 "5-methanesulfonamido-1-indanones as an inhibitor of cyclooxygenase-2"; Brevetul U.S. 5.639.780 N-benzyl indol-3-yl butanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; Brevetul U.S. 5.677.318 Diphenyl-1,2-3-thiadiazoles as anti-inflammatory agents"; Brevetul U.S. 5.691.374 "Diaryl-5-oxygenated-2-(5H) -furanones as COX-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.698.584 "3,4-diaryl-2-hydroxy-2,5-dihydrofurans as prodrugs to COX-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.710.140 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.733.909 "Diphenyl stilbenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.789.413 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.817.700 "Bisaryl cyclobutenes derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; Brevetul U.S. 5.849.943 "Stilbene derivatives useful as cyclooxygenase-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.861.419 "Substituted pyridines as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.922.742 "Pyridinyl-2-cyclopenten-1-ones as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; Brevetul U.S. 5.925.631 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; toate fiind atribuite de regulă lui Merck Frosst Canada, Inc. (Kirkland, CA). Inhibitori de COX-2 suplimentari sunt de asemenea descriși în Brevetul U.S. 5.643.933, atribuit lui G. D. Searle & Co. (Skokie, IL), cu titlul: "Substituted sulfonylphenylheterocycles as cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors." Aspirina este un exemplu pentru un inhibitor de COX-2.

Un număr dintre inhibitorii de COX-2 identificați mai sus sunt promedicamente ale inhibitorilor selectivi de COX-2 și își exercită acțiunea prin conversia in vivo la inhibitorii de COX-2 activi și selectivi. Inhibitorii COX-2 activi și selectivi formați din promedicamentele inhibitoare de COX-2 identificate mai sus sunt descriși în detaliu în WO 95/00501, publicată în 5 ianuarie, 1995, WO 95/18799, publicată în 13 iulie, 1995 și Brevet U.S. 5.474.995, eliberat în 12 decembrie, 1995. Având în vedere învățăturile din Brevetul U.S. 5.543.297, cu titlul: "Human cyclooxygenase-2 cDNA and assays for evaluating cyclooxygenase-2 activity," o persoană cu calificare obișnuită în domeniu ar putea fi capabilă să determine dacă un agent este un inhibitor selectiv de COX-2 sau un precursor al unui inhibitor de COX-2 și, prin urmare, parte a prezentei invenții.

Medicamentele antiinflamatoare nesteroidiene includ, dar nu se limitează la naproxen de sodiu, diclofenac, sulindac, oxaprozin, diflunisal, aspirină, piroxicam, indometocin, etodolac, ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen, acid mefenamic, nabumetonă, tolmetin de sodiu, și ketorolac trometamină.

În unele variante de realizare, agentul secundar poate fi un agent care inhibă producerea de IgM, IgG naturale și/sau activarea celulelor B1a și/sau B1b de către LNP-uri. Astfel de agenți pot fi antagoniști ai unui receptor de suprafață ai celulelor B1a (de exemplu, CD36 și C5a) sau ai celulelor B1b, de exemplu, anticorpi sau inhibitorii cu molecule mici care leagă receptorul de suprafață și interferează cu legarea acestuia la liganzii săi înrudiți (de exemplu, componenta lipidică) cum ar fi fosfatidilcolina în anumite LNP-uri).

În alte variante de realizare, agentul secundar poate fi un agent care inhibă activarea trombocitelor și/sau a sistemului complementului (cale clasică sau cale alternativă) de către LNP-uri. Astfel de agenți pot fi antagoniști de CD36, antagoniști de TLR sau antagoniști ai oricărei componente din cascada complementului. Astfel de antagoniști pot fi anticorpi antagoniști specifici uneia dintre ținte. În unele exemple, antagoniștii pot fi un inhibitor de protează care vizează una sau mai multe dintre componentele de serin protează din sistemul complementului. Alți antagoniști de CD36 includ, dar nu sunt limitați la, acid salvianolic sau metabolii ai acestuia (de exemplu, RA și DSS), 3-cinamoil indol, 13-pentil berberină, hexarelină sau anumiți acizi grași cum ar fi DHA.

Trebuie înțeles că dezvăluirea are în vedere utilizarea unuia sau mai multor agenți secundari anteriori cu oricare dintre LNP-urile furnizate aici, incluzând, de exemplu, cele care cuprind o lipidă cationică cum ar fi MC3, o lipidă helper cum ar fi DSPC sau DOPE, o lipidă structurală cum ar fi colesterol, și o lipidă metoxi-PEGilată cum ar fi DMG-PEG, incluzând atunci când este utilizată o astfel de lipidă metoxi-PEGilată la un procent molar mai mare de 0,5% inclusiv 1,5%. Astfel, dezvăluirea ia în considerare faptul că LNP-urile care altfel ar declanșa un răspuns trombocitar pot fi utilizate împreună cu agenți secundari care includ unul sau mai mulți agenți secundari anti-trombocitari. Astfel de combinații sunt destinate să reducă frecvența și/sau severitatea ABC-ului și toxicitatea legată de utilizarea LNP-ului in vivo.

De asemenea, sunt furnizate aici metode pentru reducerea răspunsurilor la medicamente, inclusiv ABC-ul și a toxicității limitatoare de doză, asociate cu LNP-uri care încapsulează ARNm-uri.

5 ABC este un fenomen de prag, ceea ce înseamnă că doza dintr-un agent cum ar fi LNP-urile trebuie să atingă un prag pentru a induce un ABC semnificativ clinic (substanțial). În consecință, se are în vedere că utilizarea unei doze mai mici decât pragul ar putea reduce ABC-ul sau preveni apariția acestuia. Alternativ, LNP-urile descrise aici pot scădea activitatea de stimulare a B1a și/sau B1b și/sau IgM naturală și astfel pot crește pragul de dozare.

10 În unele variante de realizare, o metodă pentru reducerea ABC a LNP-urilor lipidice care încapsulează un ARNm poate fi realizată prin cel puțin (i) administrarea la un subiect care are nevoie de aceasta a unei prime doze de LNP-uri și (ii) administrarea la subiect a unei a doua doze de LNP-uri; în care prima doză, a doua doză sau ambele sunt egale cu sau mai mici de aproximativ 0,3 mg/kg. De  
15 exemplu, prima doză, a doua doză sau ambele pot fi egale cu sau mai puțin de 0,2 mg/kg sau 0,1 mg/kg. În unele exemple, prima doză, a doua doză sau ambele pot varia de la aproximativ 0,1-0,3 mg/kg. Intervalul dintre prima doză și a doua doză poate fi mai mic de 2 săptămâni, de exemplu, mai mic de 10 zile, mai mic de 1 săptămână, mai mic de 4 zile sau mai mic de 2 zile. Când sunt necesare doze ulterioare, pot fi utilizate aceleași doze mici descrise aici. Intervalul dintre două doze consecutive poate fi mai mic  
20 de 2 săptămâni, de exemplu, mai mic de 10 zile, mai mic de 1 săptămână, mai mic de 4 zile sau mai mic de 2 zile.

Toxicitatea limitatoare de doză, cum ar fi CARPA, se referă la efectele secundare ale unui  
25 medicament sau altui tratament care sunt suficient de grave pentru a preveni creșterea dozei sau a nivelului de tratament. Este avut în vedere că, utilizarea unor scheme de tratament care ar putea menține nivelul seric al LNP-urilor sub pragul de declanșare a toxicității de limitare a dozei semnificative din punct de vedere clinic ar reduce o astfel de toxicitate sau ar preveni apariția acesteia.

În consecință, este furnizată aici o metodă pentru livrare de nanoparticule lipidice (LNP-uri) care  
30 încapsulează un ARNm la un subiect fără a promova toxicitatea legată de LNP. O astfel de metodă cuprinde administrarea unei cantități de LNP-uri la un subiect în timpul unei perioade, în care nivelul seric al LNP-urilor la subiect în timpul perioadei de administrare nu este suficient pentru a induce toxicitatea legată de LNP. Toxicitatea legată de LNP poate fi coagulopatie, coagulare intravasculară diseminată (DIC), tromboză vasculară, pseudo alergie legată de activare (CARPA), răspuns în fază acută  
35 (APR) sau o combinație a acestora.

Face parte din cunoștințele celor de specialitate în domeniu selectarea unor doze adecvate de  
LNP-uri care încapsulează ARNm-ul și durata administrării (de exemplu, perfuzie), astfel încât să se  
40 mențină nivelul seric al LNP-urilor sub prag. De exemplu, atunci când este necesară o doză mare pentru a atinge efectele terapeutice dorite, poate fi utilizată o perioadă mai lungă de administrare. Apariția oricărei toxicități care limitează doza poate fi monitorizată prin abordări convenționale în practica medicală. Doza și perioada de administrare pot fi ajustate la apariția oricărui simptom asociat cu toxicitatea. În unele  
45 exemple, doza de LNP-uri poate fi mai mică de 1 mg/kg, de exemplu, 0,5 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,2 mg/kg, sau 0,1 mg/kg. În alte exemple, doza de LNP poate varia de la 0,5 la 1 mg/kg (de exemplu, 0,3 la 0,5 mg/kg). Perioada de administrare poate varia de la 30 de minute la 3 ore, de exemplu 1-2 ore. În unele cazuri, perioada de administrare nu este de mai puțin de 1 oră, de exemplu, nu mai puțin de 1,5 ore, nu  
mai puțin de 2 ore, nu mai puțin de 2,5 ore, sau nu mai puțin de 3 ore.

În oricare dintre metodele descrise aici, ARNm-ul încapsulat în LNP-uri poate fi un ARNm  
50 terapeutic, care poate codifica o proteină terapeutică. ARNm-ul încapsulat în LNP-uri poate fi, de asemenea, un ARNm care codifică un antigen de vaccin. În unele cazuri, ARNm-ul încapsulat în LNP-uri poate codifica mai multe proteine. În unele variante de realizare, LNP-urile utilizate în această metodă pot fi oricare dintre LNP-urile descrise aici.

## 55 EXAMPLE

### *Exemple de metode de testare:*

#### **1. Teste pe bile prin citometrie în flux:**

Bile de latex de streptavidină CML (Polysciences Inc) au fost cuplate cu DSPC biotinitat (bile de  
6 mm) sau PEG biotinitat (bile de 10 mm) urmând recomandările producătorului. Bilele cuplate (cuplate  
60 cu DSPC și cuplate cu PEG) au fost incubate cu ser diluat de la șoareci injectați cu diferite LNP-uri timp de 30 de minute la temperatura camerei. După spălare, bilele au fost apoi incubate cu IgM IgG de șobolan

anti-șoarece (BD biosciences) timp de 15 minute la temperatura camerei. După spălare, celulele au fost resuspendate în PBS + 2% BSA și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Titrurile de IgM anti-LNP au fost calculate pe baza curbei standard obținute cu un anticorp monoclonal IgM anti-PEG. Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 5 **2. Test de activare a trombocitelor in vitro cu LNP-uri sau componente de LNP-uri**

Probe de sânge au fost colectate în BD Vacutainer de 6 ml care conține 1 mL anticoagulant de citrat dextroză (BD biosciences) și centrifugate fără accelerare și fără frână la  $200 \times g$ ,  $22^{\circ}C$ , timp de 20 de minute. Stratul superior, transparent, de plasmă bogată în trombocite (PRP) a fost transferat într-un tub conic de 15 mL și spălat în PBS + 2% ser fetal de vițel. După numărare,  $10^5$  celule au fost incubate la temperatura camerei la diferite momente de timp cu diferite LNP-uri sau LPS sau diferite componente de LNP-uri și colorate cu anti-CD41, CD31 și CD62P etichetate fluorescent timp de 20 de minute pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 15 **3. Agregarea trombocitară in vitro cu macrofage, celule B**

Probe de sânge au fost colectate în BD Vacutainer de 6 mL care conține 1 mL anticoagulant citrat de dextroză (BD biosciences). 10-25 mL de sânge au fost incubate la temperatura camerei la diferite momente de timp la temperatura camerei cu diferite LNP-uri sau LPS și colorate cu anti-CD41, CD11b, CD19 și F4/80 etichetate fluorescent timp de 20 min pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 20 **4. Test de activare a trombocitelor in vivo**

Șoareci au fost injectați intravenos cu diferite LNP-uri. După diferite momente de timp, probă de sânge a fost colectată în BD Vacutainer de 6 mL care conține 1 mL anticoagulant citrat de dextroză (BD biosciences) și centrifugată fără accelerare și fără frână la  $200 \times g$ ,  $22^{\circ}C$ , timp de 20 de minute. Stratul superior, transparent, de plasmă bogată în trombocite (PRP) a fost transferat într-un tub conic de 15 mL și spălat în PBS+2% ser fetal de vițel. După numărare,  $10^5$  celulele au fost colorate cu anti-CD41, CD31 și CD62P etichetate fluorescent timp de 20 min pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 30 **5. Agregarea trombocitelor in vivo cu macrofage, celule B**

Șoarecii au fost injectați intravenos cu diferite LNP-uri. După diferite momente de timp, au fost colectate probe de sânge în Vacutainer BD de 6 mL conținând 1 mL anticoagulant de citrat dextroză (BD biosciences). 10-25 ml de sânge au fost colorați cu anti-CD41, CD11b, CD19 și F4/80 etichetat fluorescent timp de 20 min pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 35 **6. Test de activare a celulelor B splenice in vivo:**

Splinele animalelor injectate cu LNP-uri fluorescente au fost colectate în tampon salin. Suspensia celulară de splenocite a fost preparată prin presarea ușoară a splinei printr-o sită celulară cu plasă de  $70\text{-}\mu\text{M}$  (Fisher Scientific). După spălare, celulele roșii din sânge au fost lizate și celulele au fost resuspendate în PBS+2% ser fetal de vițel. După spălare și numărare,  $10^5$  celule au fost colorate cu anti-CD19, CD86 și etichetate fluorescent CD69 timp de 20 min pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 45 **7. Interacțiunea LNP in vivo cu celulele B:**

Splinele animalelor injectate cu LNP-uri fluorescente au fost colectate în tampon salin. Suspensia celulară de splenocite a fost preparată prin presarea ușoară a splinei printr-o sită celulară cu plasă de  $70\text{-}\mu\text{M}$  (Fisher Scientific). După spălare, celulele roșii din sânge au fost lizate și celulele au fost resuspendate în PBS+2% ser fetal de vițel. După spălare și numărare,  $10^5$  celule au fost colorate cu anti-CD19 și etichetate fluorescent cu CD5 timp de 20 min pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 50 **8. Test de activare a celulelor B splenice in vitro:**

Splinele animalelor injectate cu LNP-uri fluorescente au fost colectate în tampon salin. Suspensia celulară de splenocite a fost preparată prin presarea ușoară a splinei printr-o sită celulară cu plasă de  $70\text{-}\mu\text{M}$  (Fisher Scientific). După spălare, celulele roșii din sânge au fost lizate și celulele au fost resuspendate în PBS+2% ser fetal de vițel. După numărare,  $10^5$  celule au fost incubate la  $37^{\circ}C$  pentru momentele de timp indicate cu diferite LNP-uri sau mediu. După incubare, celulele au fost colorate cu anti-CD19, CD86 și etichetate fluorescent cu CD69 timp de 20 de minute pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

## 60 **9. Interacțiunea LNP in vitro cu celulele B:**

Splinele animalelor injectate cu LNP-uri fluorescente au fost colectate în tampon salin. Suspensia celulară de splenocite a fost preparată prin presarea ușoară a splinei printr-o sită celulară cu plasă de 70- $\mu$ m (Fisher Scientific). După spălare, celulele roșii din sânge au fost lizate și celulele au fost resuspendate în PBS+2% ser fetal de vițel. După numărare,  $10^5$  celule au fost incubate la 37C la

5 momentele de timp indicate cu diferite LNP-ului sau mediu. După incubare, celulele au fost colorate cu anti-CD19 și etichetate fluorescent cu CD5 timp de 20 de minute pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

**10. Test de activare a celulelor B umane:**

10 PBMC umane au fost izolate după separarea gradientului Ficoll. După numărare,  $10^5$  celule au fost incubate la 37C la momentele de timp indicate cu diferite LNP-uri sau mediu. După incubare, celulele au fost spălate și colorate cu anti-CD19, CD86 și marcate fluorescent cu CD69 timp de 20 min pe gheață. După spălare, celulele au fost fixate și analizate prin citometrie în flux cu un BD Fortessa (BD Biosciences). Analiza a fost efectuată cu FlowJo și Prism Software.

15 **IgM Anti-PEG:** În câteva dintre figuri, terminologia IgM anti-PEG este utilizată în general pentru a se referi la IgM. Dacă IgM este detectată la un moment dat mai devreme de 96 de ore după livrarea LNP-ului, IgM este IgM naturală. Dacă IgM este măsurată după 96 de ore, IgM poate fi IgM anti-PEG și/sau IgM naturală. IgM naturală se leagă la motivul de fosfocolină mai degrabă decât la PEG.

20 **Exemplul 1.**

25  $2 \times 10^5$  splenocite sterile nefracționate au fost incubate cu 200 ng de ARNm EGFP formulată cu PE+ sau PE- LNP PE-Rodamină. LNP a cuprins MC3, DMG-PEG (1,5%), DSPC și colesterol, ARNm exprimând EGFP, și PE pentru vizualizarea prezenței LNP. După 2, 4, 6, 24, 48 sau 120 de ore, celulele au fost colorate pentru CD3 și CD19 și analizate prin citometrie în flux în ceea ce privește absorbția PE și exprimarea EGFP. În paralel,  $10^5$  celule HeLa au fost incubate cu 100 ng de ARNm EGFP formulat cu LNP PE-Rodamină și exprimarea EGFP a fost urmărită prin microscopie cu tehnologia IncuCyte PE = ficoeritrina, fluorescența la 562 nm. Fluorescența PE demonstrează prezența LNP-ului. Proteina cu fluorescență verde îmbunătățită (EGFP) odată translatată are o lungime de undă de emisie maximă de 509 nm. Fluorescența EGFP demonstrează că încărcătura LNP a fost translatată.

30 LNP-urile se asociază sau sunt preluate în principal de celulele B (celule CD19+) și nu de celulele T (celule CD3+) în condiții de cultură ex vivo, așa cum se arată în FIG. 1. Splenocitele incubate cu LNP-uri fără PE sau cu mediu singur nu prezintă fluorescență PE-Rodamină, așa cum era de așteptat.

35 Evoluțiile în cursul timpului referitoare la asocierea sau absorbția de LNP de către celulele T CD3+ sau celulele B CD19+ sunt furnizate în FIG. 2A și, respectiv, 2B. Celulele B CD19+ asociază și/sau absorb LNP-ul rapid *ex vivo* la incubarea culturii și într-o măsură mult mai mare decât celulele T CD3+. Aproximativ 20% din celulele B CD19+ sunt pozitive la PE până la aproximativ 48 de ore de incubație. Doar aproximativ 5% din celulele T CD3+ se colorează cu PE și numai după 48 de ore de incubație. Astfel, se pare că celulele B asociază și/sau preiau LNP-urile într-o măsură mult mai mare și mai rapid decât celulele T.

40 Cu toate acestea, celulele B CD19+ nu exprimă totuși încărcătura de ARNm a LNP, așa cum este demonstrat în FIG. 3. Nu se observă fluorescență EGFP de la celulele B CD19+. Timpii testați corespund perioadei de timp în care a fost observată asocierea și/sau absorbția maximă a LNP de către CD19+ (adică până la 48 de ore inclusiv). Astfel, celulele B par să asocieze și/sau să preia LNP-ul, dar nu exprimă încărcătura de ARNm a LNP-ului.

45 Pentru a evalua integritatea încărcăturii de ARNm EGFP în aceste experimente, a fost efectuat un experiment martor în care celulele HeLa au fost incubate cu PE+ și PE-LNP, ambele cuprinzând ARNm EGFP și a fost testată fluorescența PE și EGFP. Imaginile au fost obținute folosind IncuCyte. După cum era de așteptat, celulele incubate cu PE+ LNP au prezentat fluorescență roșie, în timp ce celulele incubate cu PE-LNP nu. Ambele populații de celule; totuși, verde fluorescent, indicând faptul că încărcătura de ARNm a LNP a fost exprimată în ambele populații.

50 **Exemplul 2.**

55 Într-un alt experiment, a fost analizat efectul splinei și populațiilor de splenocite asupra actualizării LNP și a exprimării încărcăturii de ARNm. Șoareci CD-1 au fost splenectomizați și apoi LNP-urile au fost injectate intravenos (i.v.). LNP-ul a transportat o încărcătură ARNm hEPO și a cuprins MC3, DMG-PEG (1,5%), DSPC și colesterol. Concentrația proteinei hEPO în sânge a fost măsurată după o primă, a doua și a treia doză de LNP, așa este prezentat în FIG. 4A. Nivelul de hEPO a scăzut la



administrări succesive, atât la șoarecii nesplenectomizați, cât și la șoarecii splenectomizați. Datele sunt reminiscente de la un fenomen accelerat de clearance a sângelui.

Nivelul anticorpului IgM anti-PEG a fost de asemenea măsurat la acești șoareci după prima și a doua doză de LNP, așa este prezentat în FIG. 4B. Nivelul de IgM anti-PEG a scăzut între prima și a doua doză, dar numai la șoarecii nesplenectomizați. Șoarecii splenectomizați, pe de altă parte, au avut niveluri mai scăzute de IgM anti-EPG în ambele momente și nu au prezentat o astfel de scădere a nivelului de IgM după a doua doză.

**Exemplul 3.**

$2 \times 10^5$  Celulele mononucleare din sângele periferic purificat Ficoll (PBMC-uri) au fost incubate cu 200 ng de ARNm EGFP formulat cu LNP PE-Rodamină. După 2, 4, 6, 24 de ore, celulele au fost colorate pentru CD3 și CD19 și analizate prin citometrie în flux pentru absorbția PE și exprimarea EGFP. LNP-ul a cuprins MC3, DMG-PEG (1,5%), DSPC și colesterol.

Au fost observate nivelurilor crescătoare de absorbție a LNP PE+ de către celulele B CD19+ circulante după 2 până la 24 de ore de incubare, așa este prezentat în FIG. 5. După cum era de așteptat, nu a fost observată fluorescență PE în celulele incubate cu PE-LNP sau cu mediu singur. Evoluția în timp este ilustrată în FIG. 6A care arată că asocierea și/sau absorbția de LNP au crescut constant de la 2 ore la 24 de ore. Absorbția de LNP de către celulele B circulante este similară cu cea observată în celulele B splenice. FIG. 6B arată că nu are loc exprimarea EGFP în celulele B CD191 circulante, similar cu celulele B splenice.

**Exemplul 4.**

$2 \times 10^5$  splenocitele sau PBMC-uri au fost incubate cu 200 ng de ARNm EGFP formulat cu LNP cuprinzând PE-Rodamină sau LNP fără PE-Rodamină ("non-PE-Rodamină"). După 24 de ore, celulele au fost colorate pentru CD3, CD19 și CD86 și analizate prin citometrie în flux în ceea ce privește absorbția PE și reglarea ascendentă a CD86. Exprimarea CD86 a fost comparată între celulele B incubate cu PE+ LNP-uri și PE-LNP-uri și între celulele B care au preluat PE+ LNP-uri și celulele B care nu au preluat PE+ LNP-uri. Secreția de IL-6 și TNF-alfa în supernatantul culturii celulare a fost măsurată prin ELISA după 24 de ore de cultură.

Celulele B splenice și circulante care preiau LNP-urile sunt activate așa cum se măsoară prin reglarea ascendentă a CD86. FIG. 7 arată că, celulele B splenice și circulante sunt activate după incubarea fie cu PE+, fie cu PE-LNP. Similar, FIG. 8 arată că exprimarea crescută a CD86 se corelează cu asocierea sau absorbția LNP de către celulele B splenice și circulante. FIG. 9 arată că, celulele B splenice care preiau LNP-urile sunt activate într-o manieră dependentă de doză de LNP. Activarea este un fenomen tranzitoriu și începe să scadă după 24 de ore. Celulele B incubate cu PE+ sau PE-LNP timp de 24 de ore secretă niveluri crescute ale citokinelor inflamatorii IL-6 și TNF-alfa (FIG. 10).

**Exemplul 5.**

$2 \times 10^5$  splenocite au fost incubate cu PE+ LNP. După 4 și 24 de ore, celulele au fost colorate pentru CD3, CD19 și CD86 și analizate prin citometrie în flux în ceea ce privește absorbția PE și reglarea ascendentă a CD86. Secreția de IL-6 și TNF-alfa în supernatantul culturii celulare a fost măsurată prin ELISA după 24 de ore de cultură.

Celulele B splenice sunt absorbite de PE+ LNP gol la 4 ore (FIG. 11B) și 24 de ore (FIG. 11A și 11B). Absorbția LNP PE+ gol de către celulele B splenice este similară cu cea observată cu LNP-urile PE+ care transportă încărcătură de ARNm EGFP. LNP-ul PE+ gol a fost capabil să activeze celulele B, așa cum este demonstrat de creșterea exprimării CD86. Celulele B splenice sunt activate de LNP-uri PE+ goale într-o manieră dependentă de doză, așa este prezentat în FIG. 12A. Similar, PE+ LNP gol au fost capabili să inducă secreția de IL-6 și TNF-alfa din celulele B splenice, așa este prezentat în FIG. 12B.

**Exemplul 6.**

$2 \times 10^5$  splenocite de la șoareci de tip sălbatic (WT) și knockout ApoE<sup>-/-</sup> sau LDL-R<sup>-/-</sup> au fost incubate cu 200 ng de ARNm EGFP formulat cu LNP PE+ sau PE-. După 24 de ore, celulele au fost colorate pentru CD3, CD19 și analizate prin citometrie în flux în ceea ce privește absorbția de PE. Secreția de IL-1alfa, KC-GRO și TNF-alfa în supernatantul culturii celulare a fost măsurată prin ELISA.

După este prezentat în FIG. 13A-13C, absorbția de LNP la 24 de ore este parțial eliminată în absența ApoE sau în absența receptorului de LDL. FIG. 13D ilustrează faptul că, celulele B de tip sălbatic și cele cu deficit de Apo secretă niveluri similare de TNF-alfa și KC/GRO care sunt mai mari decât nivelurile secretate de celulele B cu deficit de LDLR după incubarea cu LNP. Celulele B de tip sălbatic secretă totuși niveluri mai mari de IL-1beta atât față de celulele B deficiente de Apo cât și de cele deficiente de receptori LDL, după incubarea cu LNP.

**Exemplul 7.**

2 × 10<sup>5</sup> splenocite au fost pre-incubate timp de 2 ore cu PEG liber sau cu IgG anti-PEG și apoi incubate cu 200 ng de ARNm EGFP formulat cu PE+ sau PE-LNP. După 24 de ore de incubare LNP, celulele au fost colorate pentru CD3, CD19 și analizate prin citometrie în flux în ceea ce privește absorbția de PE.

Absorbția de LNP a avut loc chiar și după pre-incubarea celulelor B cu PEG liber sau cu anticorp IgG anti-PEG, așa cum este prezentat în FIG. 14. Ca atare, o astfel de pre-incubare nu pare să concureze cu LNP-ul care cuprinde PEG pentru legarea la celulele B. De asemenea, pre-incubarea cu anticorpi anti-PEG nu pare să interfereze cu capacitatea LNP de a se lega de celulele B.

**Exemplul 8.**

Splenocite au fost incubate cu 200 ng de ARNm EGFP formulat cu PE+ LNP cuprinzând fie PEG, PE-OH sau fără PEG (fără PEG). După 24 de ore, celulele au fost colorate pentru CD3, CD19 și analizate prin citometrie în flux în ceea ce privește absorbția de PE.

Absorbția de LNP lipsit de PEG (LNP "fără PEG") sau LNP cuprinzând hidroxi-PEG (PEG-OH) a fost parțial eliminată în comparație cu LNP care cuprinde metoxi-PEG, așa este prezentat în FIG. 15 și 16. LNP fără PEG și LNP PEG-OH activează totuși o mică fracțiune de celule B, așa cum este evident din FIG. 17. Activarea celulelor B mediată de non-PEG este evidentă. Activarea bazată pe exprimarea CD86 pare să fie, de asemenea, dependentă de doză, deoarece celulele B care preiau cantități mai mari de LNP prezintă niveluri mai ridicate de exprimare a CD86.

**Exemplul 9.**

Splenocite au fost incubate cu 200 ng de ARNm EGFP formulat cu diferite LNP PE+ sau PE-. Aceste LNP-uri nu au avut fosfolipide ("fără fosfolipide") sau au cuprins DSPC, acid oleic, DOPC sau DOPE ca lipidă helper. În alte experimente, LNP-urile au cuprins fie PEG, PE-OH, DOPE PEG sau fără PEG (lipsite de PEG). După 24 de ore, celulele au fost colorate pentru CD3, CD19 și CD5 și analizate prin citometrie în flux în ceea ce privește absorbția de LNP.

FIG. 18 prezintă absorbția de LNP pentru LNP-uri care cuprind DSPC, acid oleic, DOPC și DOPE ca lipidă helper sau lipsite de o lipidă helper. Absorbția de către celulele B a fost cea mai mare pentru LNP-urile care cuprind DOPE, urmate de LNP-urile care cuprind DOPC și LNP-urile care cuprind DSPC. Cea mai scăzută absorbție de către celulele B a fost observată pentru LNP-urile care cuprind acid oleic sau care nu au o lipidă helper. Aceste date indică faptul că absorbția celulelor B de către LNP-uri este parțial dependentă de conținutul de fosfolipidă a LNP-ului.

FIG. 19 indică faptul că absorbția de LNP fără PEG sau PEG-OH se datorează în principal prezenței celulelor B splenice CD19+ CD5+. Această populație de celule B CD5+ reprezintă celulele B1a. Aceste celule sunt responsabile de producerea de IgM naturală. Absorbția rămasă observată cu LNP-uri fără PEG și PEG-OH se datorează în principal celulelor B convenționale CD19+ CD5-. Aceste date sugerează că utilizarea combinată a hidroxi-PEG sau absența PEG cu acid oleic ca lipidă helper ar putea conduce la absența sau absorbția scăzută a LNP de către celulele B.

FIG. 20 indică faptul că celulele B CD5+ sunt responsabile de absorbția majorității LNP-ului cuprinzând PEG-OH, DSPE și PEG, sau fiind lipsite de PEG. Celulele CD5- au fost responsabile de absorbția majorității LNP-ului care cuprinde DMG-PEG. Absorbția LNP-urilor fără PEG sau PEG-OH se datorează în principal prezenței celulelor B murine splenice CD19+CD5+.

**Exemplul 10.**

Un studiu *in vivo* a diferitelor LNP-uri a fost întreprins pentru a se evalua efectul diferitelor combinații de fosfolipide și PEG asupra absorbției LNP de către celulele B splenice. Grupurile martor și de testare sunt rezumate în Tabelul 2 de mai jos. Diferitele LNP-uri au cuprins DMG-PEG și DSPC, PEG-OH și DSPC sau DSPC fără PEG (lipsite de PEG). Toate LNP-urile au mai cuprins lipide cationice MC3 și au purtat, de asemenea, ARNm EGFP. S-a administrat o singură doză de 0,1 mL doză de 0,1 mg/kg (concentrație 0,02 mg/mL) Tabel 2. Rezumatul grupurilor experimentale

Grup	Material de Testare/Martor	Veicul	Formulare	Rută	# de Doze	# de femele
1	PRS	N/A			1	4
2	ARNm EGFP ψ	MC3	DMG-PEG (DSPC)	TV	1	6
3	ARNm EGFP ψ	MC3	PEG-OH (DSPC)	IV	1	6
4	ARNm EGFP ψ	MC3	Fără PEG (DSPC)	IV	1	6

FIG. 21 arată că exprimarea EGFP a fost observată în celulele T neconvenționale T (CD3<sup>+</sup>) și B (CD19<sup>+</sup>) în splină încă de la 1 oră după administrarea de DMG-PEG, PEG-OH și LNP-uri fără PEG. La 4 ore după administrare, nivelurile de exprimare ale EGFP au crescut în raport cu nivelul de la 1 oră în toate grupurile de testare. Cu toate acestea, exprimarea a fost cea mai scăzută în grupul fără PEG.

FIG. 22A și 22B arată că absorbția celulelor B *in vivo* este similară cu absorbția observată *ex vivo* și este parțial dependentă de DMG-PEG. Absorbția celulelor B a fost măsurată la 1 oră după injecție (FIG. 22A) și la 4 ore după injecție (FIG. 22B) cu PBS sau LNP cuprinzând DMG-PEG sau PEG OH, sau LNP fără PEG (LNP-uri fără PEG).

Fig. 23A-23C arată că absorbția de către celulele B a LNP cuprinzând DMG-PEG (FIG. 23A) sau Cmpd418 (FIG. 23B) sau LNP fără PEG (FIG. 23C) are ca rezultat activarea celulelor B, așa cum este indicat de exprimarea CD86, într-un LNP, într-o manieră dependentă de doză. Absorbția de LNP a fost măsurată la o oră după injecție (FIG. 23D) și la 4 ore după injecție (FIG. 23E) de PBS sau LNP cuprinzând DMG-PEG sau PEG OH sau LNP-uri fără PEG. Absorbția celulelor B este, de asemenea, analizată prin citometrie în flux (fig. 23A-23C). Nivelurile de activare sunt similare la 1 oră după injectare între diferitele LNP-uri. La 4 ore după injectare, LNP-urile cuprinzând PEG OH sau lipsite de PEG au fost mai puțin stimulative decât au fost LNP-urile care cuprind DMG-PEG.

Celulele B CD19<sup>+</sup> au fost colorate și analizate individual. Au fost examinate colorația LNP (PE, roșu) și suprapunerea dintre colorarea LNP și CD19 (verde). LNP-urile sunt localizate în principal în membrana celulelor B. Au fost observate mai puține LNP-uri fără PEG și LNP-uri care cuprind Cmpd418 în membrană, comparativ cu LNP-uri care cuprind DMG-PEG.

În continuare, a fost analizată absorbția LNP-urilor de către celulele B CD5<sup>+</sup>. Rezultatele sunt prezentate în FIG. 24A-24B. Absorbția de LNP prin absorbția de celule B CD5<sup>+</sup> *in vivo* este ușor scăzută când LNP-ul cuprinde PEG-OH sau când LNP-ul nu are PEG. Absorbția de LNP este măsurată la 1 oră după injectare (FIG. 24A) și la 4 ore după injectarea (FIG. 24B) de PBS, sau LNP cuprinzând DMG-PEG sau PEG OH sau LNP-uri fără PEG.

Celulele B CD5<sup>+</sup> au fost colorate și analizate individual. Au fost examinate colorarea LNP (PE, roșu) și suprapunerea dintre colorarea LNP și CD19 (verde). LNP-urile sunt localizate în principal în membrana celulelor B. Au fost observate mai puține LNP-uri fără PEG și LNP-uri care cuprind PEG-OH la membrană, comparativ cu LNP-uri care cuprind DMG-PEG.

#### Exemplul 11.

Tabelul 3 prezintă un studiu conceput pentru a analiza efectele LNP-urilor care cuprind diferite cantități de DMG-PEG. Toate LNP-urile de testare au cuprins lipide cationice MC3, lipide helper DSPC, colesterol structural lipidic și au transportat o încărcătură de ARNm hEPO. LNP-urile diferă prin conținutul lor de DMG-PEG cu un conținut de DMG-PEG variind de la 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25% și 1,5%. Procentele reflectă un % mol teoretic. A treia coloană a tabelului redă compoziția lipidică a LNP exprimată ca % mol teoretic.

Tabelul 3. Proiectul studiului

	Compoziție	mol%teoretic	ARNm	Diametru (nm)	Indice Pd	%EE	ug/ml [final]	Pentru200 ng
0% PEG-DMG	MC3:DSPC:Col	50:11,5:38,5	hEPO	39,5	0,15	98	47	4,26
0,25% PEG-DMG	MC3:DSPC:Col:P EG-DMG	50,11,25:38,5, 0,25	hEPO	56,2	0,12	98	52	3,84
0,5% PEG-DMG	MC3:DSPC:Col:P EG-DMG	50:11:38,5:0	hEPO	63	0,16	98	44	4,55
0,75% PEG-DMG	MC3 DSPC:Col:P EG-DMG	50:10,75:38,5: 0,75	hEPO	61,8	0,13	98	50	4,00

1% PEG DMG	MC3:DSPC Col:P EG-DMG	50:10,5:38,5:1	hEPO	57,6	0,14	98	53	3,77
1,25% PEG- DMG	MC3:DSPC:Col:P EG-DMG	50:10,25:38,5: 1,25	hEPO	53,7	0,076	98	53	3,77
1,5% PEG- DMG acetat	MC3:DSPC:Col:P EG-DMG	50:10:38,5:1,5	hEPO	51,5	0,043	98	54	3,70

Următoarele experimente au fost efectuate pentru a se determina efectul de creștere a conținutului de DMG-PEG al LNP asupra activării splenocitelor murine și a celulelor B murine și a absorbției LNP de către celulele B murine. S-a observat colorarea PE+ (și astfel asocierea și/sau absorbția) celulelor B. Absorbția de LNP este redusă semnificativ atunci când procentul de DMG-PEG este mai mic de 0,25%. Există o creștere a celulelor PE înalte (absorbție crescută de LNP) atunci când procentul de DMG-PEG este mai mare de 0,5%. Setul complet de date este furnizat în FIG. 25, care arată că absorbția de LNP este redusă semnificativ atunci când procentul de DMG-PEG este mai mic de 0,5%. Procentul total de celule PE+ B este relativ constant pentru LNP-urile care conțin DMG-PEG egal sau mai mare de 0,5%.

Apoi, a fost analizată activarea celulelor B, măsurată prin exprimarea CD86, după absorbția LNP-urilor care au cantități diferite de DMG-PEG. Aceste date sunt prezentate în FIG. 26. Exprimarea CD86 a crescut pe suprafața celulelor B pe măsură ce procentul molar de DMG-PEG a crescut. Activarea celulelor B este în concordanță cu absorbția celulelor B. În plus, celulele cele mai activate sunt cele care s-au asociat cu sau au preluat cel mai mult LNP (indicat ca LNP PE ridicat).

#### Exemplul 12.

Tabelul 4 prezintă un studiu conceput pentru a analiza efectele LNP-urilor care cuprind diferite cantități de DMG-PEG. Unele dintre LNP-urile testate au cuprins lipidele cationice MC3, lipidele auxiliare DSPC, colesterolul lipidic structural și încărcătura ARNm hEPO. Unele dintre LNP-urile testate au cuprins lipidele cationice MC3, lipidele auxiliare DOPE conjugate la rodamină, colesterolul lipidic structural și transportă încărcătură ARNm hEPO. Pentru fiecare subset de LNP, cantitatea de DMG-PEG a variat de la 0%, 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2% și 0,25%. Procentele reflectă un % mol teoretic A treia coloană a tabelului oferă compoziția lipidică a LNP exprimată ca % mol teoretic.

Tabelul 4 Proiectul studiului

	Compoziție	mol %	ARNm	Diametru (nm)	Indice Pd	%EE	ug/mL [ARNm]
0% PEG DMG hEPO	MC3:DSPC:Col	50:11,5:38,5	hEPO	99,4	0,15	97	51
0,05% PEG DMG hEPO	MC3:DSPC:Col:PEG -DMG	50:11,45:38,5: 0,05	hEPO	89,8	0,12	97	53
0,1% PEG DMG hEPO	MC3:DSPC:Col:PEG -DMG	50:11,4:38,5: 0,1	hEPO	85,8	0,11	97	63
0,15% PFG DMG hEPO	MC3:DSPC:Col:PEG -DMG	50:11,35:38,5: 0,15	hEPO	136,6	0,12	97	59
0,2% PEG DMG hEPO	MC3:DSPC:Col:PEG -DMG	50:11,3:38,5: 0,2	hEPO	88,5	0,12	98	61
0,25% PEG	MC3:DSPC:Col:PEG -DMG	50:11,25:38,5: 0,25	hEPO	122,9	0,15	97	56

DMG hEPO							
Fluor 0% PEG DMG hEPO	MC3:DSPC:Rodamină-DOPE:Col	50:11,4:0,1:38,5	hEPO	151,8	0,15	95	46
Fluor 0,05% PEG DMG hEPO	MC3:DSPC:Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG	50:11,35:0,1:38,5:0,05	hEPO	120,8	0,16	96	50
Fluor 0,1% PEG DMG hEPO	MC3:DSPC:Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG	50:11,3:0,1:38,5:0,1	hEPO	129,2	0,17	94	36
Fluor 0,15% PEG DMG hEPO	<b>MC3:DSPC:Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG</b>	50:11,25:0,1:38,5:0,15	hEPO	96	0,13	97	54
Fluor 0,2% PEG DMGF hEPO	MC3:DSPC:Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG	50:11,2:0,1:38,5:0,2	hEPO	93,5	0,14	97	47
Fluor 0,25% PEG DMG hEPO	MC3: DSPC:Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG	50:11,15:38,5:0,25	HEPO	88,6	0,12	97	54

Următoarele experimente au fost efectuate pentru a se determina efectul de scădere a conținutului de DMG-PEG al LNP asupra absorbției LNP de către celulele B și activării celulelor B. A fost examinată colorarea PE+ (și, prin urmare, asocierea și/sau absorbția) celulelor B. Absorbția LNP este redusă semnificativ la toate concentrațiile de DMG-PEG testate (adică toate sub 0,5%). Setul complet de date este furnizat în FIG. 27, care arată că absorbția LNP este redusă semnificativ la toate DMG-PEG % mol testate (adică, 0-0,25 % mol). Există o absență sau o reducere semnificativă a captării LNP de către celulele B la aceste % mol de DMG-PEG mai mici. Există o reducere semnificativă a activării celulelor B, măsurată prin exprimarea CD86, pentru toate LNP-urile testate în comparație cu LNP-urile care au 1,5 % mol DMG-PEG. Exprimarea CD86 în populațiile de celule B nu a arătat o absorbție scăzută, intermediară și ridicată a LNP cuprinzând 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 și 0,25 % mol DMG-PEG (datele nu sunt prezentate).

### Exemplul 13.

Tabelul 5 prezintă un studiu conceput pentru a analiza efectul LNP-urilor care cuprind diferite lipide helper și diferite chimii de conjugare PEG asupra absorbției unui astfel de LNP de către celulele B. Toate LNP-urile testate au cuprins lipide cationice MC3 și colesterol lipidic structural. LNP-urile diferă în ceea ce privește lipidele lor auxiliare cu unele LNP-uri cuprinzând acid oleic, DSPC, DOPE (conjugat cu Rodamină), acid oleic și DOPE sau DSPC și DOPE. LNP-urile diferă, de asemenea, în componenta lipidă PEGilată, unele LNP cuprinzând DMG-PEG și altele cuprinzând varianta Cmpd395. A doua coloană oferă detalii cu privire la compoziția lipidelor LNP. A treia coloană oferă detalii cu privire la % mol din fiecare componentă LNP. Structura variantei Cmpd395 este prezentată în FIG. 31A.

Tabelul 5 Proiectul studiului

	Compoziție	mol%	ARNm	Diametru (nm)	Indice Pd	%EE	[ARNm] ug/mL
Oleic	MC3:Acid oleic:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	hEPO	101,6	0,11	97	65
Click C10	MC3:DSPC: Col: PEG Click C10	50:10:38,5:1,5	hEPO	67,4	0,19	97	58

Oleic Click C10	MC3: Acid Oleic: Col:PEG Click C10	50:10:38,5:1,5	hEPO	99,4	0,2	89	35
Fluor Oleic	MC3: Acid Oleic: Rodamină-DOPE:Col:PEG- DMG	50:9,9:0,1:38,5:1,5	hEPO	87,7	0,077	95	56
Fluor Click C10	MC3:DSPC:Rodamină-DOPE:Col:PEG Click C10	50:9,9:0,1:38,5:1,5	hEPO	74,6	0,19	97	57
Fluor oleic click C10	MC3: Acid oleic :Rodamină-DOPE:Col:PEG Click C10	50:9,9:0,1:38,5:1,5	hEPO	84,2	0,19	91	38

Colorarea PE+ (și astfel asocierea și/sau absorbția) celulelor B CD19+ pentru LNP-uri care cuprind acid oleic, Cmpd395 și Cmpd404. Compozițiile LNP sunt identificate în FIG. 40. Setul complet de date este furnizat în FIG. 28. LNP care cuprinde varianta Cmpd395 pare să aibă o absorbție mai mare de către celulele B. Exprimarea CD86 în populațiile de celule B nu a arătat o absorbție scăzută, intermediară și ridicată a LNP care cuprinde Cmpd395, Cmpd404 și, respectiv, acid oleic. Nu a existat nicio activare în prezența acidului oleic.

**Exemplul 14.**

Acest experiment a evaluat procentul unei populații de celule B activate definite ca (CD19+CD86+CD69+) în funcție de conținutul de DMG-PEG din LNP, în prezența și absența Imiquimod. % mol de DMG-PEG au fost 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25 și 1,5 % mol. Datele sunt prezentate în FIG. 29A (fără Imiquimod) și 29B (cu Imiquimod). Activarea celulelor B este crescută atunci când procentul de DMG-PEG este crescut. 0,5% din DMG-PEG pare să constituie un prag, sub care celulele B nu sunt activate sau sunt activate minim. Eliberarea de citokine proinflamatorii indusă de aceleași LNP-uri într-o cultură *ex vivo* este prezentată în FIG. 30A (IFN-gamma) și FIG. 30B (TNF-alfa). Datele referitoare la secreția de citokine sunt în concordanță cu datele de activare a celulelor B. Creșterea secreției de citokine a fost observată atunci când DMG-PEG % mol a fost crescut, cu 0,5% apărând la un prag sub care nu s-au observat sau niveluri scăzute de secreție de citokine.

**Exemplul 15.**

În FIG. 31A-31D sunt furnizate variații de proiectare a fosfolipidelor și substituții pentru PC, inclusiv lipide DSPC. Modificările pot funcționa pentru a reduce asocierea LNP cu celulele B, recunoașterea LNP de către receptori și, în final, absorbția de către celulele B. Variațiile avute în vedere includ, dar nu se limitează la modificarea grupării PC de cap (FIG. 31A), miezul PC (FIG. 31B) sau prin reducerea planarității lipidei (FIG. 31C). Alte variante sau substituții includ acid oleic modificat, așa cum este prezentat în FIG. 31D.

Sunt de asemenea avute în vedere variații ale DMG-PEG și acestea includ, de exemplu, variante care au cozi lipidice mai scurte, un linker cu clic și/sau o grupare hidroxi terminală pe fragmentul PEG (PEG-OH sau hidroxi-PEG). FIG. 32A prezintă structurile pentru variantele Cmpd394, Cmpd395, Cmpd396 și Cmpd397. FIG. 32B prezintă exemplare Cmpd 398 și Cmpd 399.

Un tabel de parametri pentru un studiu cu doze repetate FFLuc cu diferite lipide PEG și/sau alternative la PEG la șoarece este prezentat în Tabelul 6. Acest studiu a fost conceput pentru a testa efectul diferitelor componente LNP de stabilizare a suprafeței asupra producției de IgG. Toate LNP-urile testate au cuprins lipidele cationice MC3, lipidele helper DSPC și colesterolul lipidic structural în aceleași proporții. Toate au conținut, de asemenea, o încărcătură de ARNm Luc. LNP-ul diferă în lipidele PEGilate. Răspunsul IgM anti-PEG sau anti-DSPC măsurat prin citometrie în flux (bile) la 96 de ore după administrarea celei de-a doua doze este prezentat în FIG. 33. LNP-urile PEG DMG, PEG DSPE sau PEG DSG au indus răspunsuri anti-LNP. Datele prezentate în FIG. 34 prezintă IgM anti-PEG măsurate prin ELISA și IgM anti-PEG sau anti-DSPC măsurată prin citometrie în flux (bile) la 96 de ore după administrarea celei de-a doua doze. IgM anti-PEG măsurate prin ELISA și perle sunt similare și nu au fost detectate diferențe semnificative.

Tabelul 6. Model de studiu

Material de test/martor	Vehicul	Formulare	Cale	Regim de dozare	cant. de doze	cant. de form.	Nivel dozare (mg/kg)	Vol. doză (ml)	Conc. doză (mg/ml)	Vol. total (ml)	Masă totală (mg)
Test_G5_C1	MC3	asociere MC3-DSPC-Chol-PEG-DMG 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-Chol (C12) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-DIPE (C12) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-DMPG (C14) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-EGEA DMG (C14) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-DMG (C14) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-DIPE (C18) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-DIPE (C18) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Test_G5_C1	MC3	MC3-DSPC-Chol-PEG-DIPE (C18) 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0,5	0,1	0,1	2,8	0,28
Emery	PBS	MC3-DSPC-Chol-PEG-DMG 50:10:38:5:1:5	IV	1săp.,2săp.	2	8	0	0	0	2,8	0
	PBS	888	IV	1săp.,2săp.	2	8	0	0	0	2,8	0

**Exemplul 16**

- 5 Au fost efectuate analize suplimentare folosind modelul de studiu prezentat în Tabelul 7 pentru a evalua legarea diferitelor LNP la trombocite *in vivo*. LNP-urile testate sunt denumite DMG-PEG LNP (cuprinzând DMG-PEG, lipidă helper DSPC, lipidă cationică MC3, și lipidă structurală colesterol), PEG-OH LNP (cuprinzând PEG-OH, lipidă helper DSPC, lipidă cationică MC3, și lipidă structurală colesterol), și LNP fără PEG (cuprinzând lipidă helper DSPC, lipidă cationică MC3, și lipidă structurală colesterol, dar fără PEG).

Tabelul 7

Grup	Material Testare/Martor	Vehicul	Formulare	Cale	Regim dozare	#din doză	# din masculi	# din femele	Nivel doză (mg/kg)	Vol. doză (mL)	Conc. doză (mg/mL)	Vol total nec.	Masă totală
1	PBS	N/A				1		6					
1	ARNm EGFP G5	MC3	DMG-PEG (DSPC)	IV		1		6	0,1	0,1	0,02	0,84	0,0168
3	ARNm EGFP G5	MC3	PEG-OH (DSPC)	IV		1		6	0,1	0,1	0,02	0,84	0,0168
4	ARNm EGFP G5	MC3	Fără PEG (DSPC)	IV		1		6	0,1	0,1	0,02	0,84	0,0168

- 15 Asocierea LNP cu trombocite este prezentată în FIG. 35. Procentul de LNP asociat cu trombocite (așa cum este indicat de fluorescența ficoeritrinei (PE)) este afișat la trei momente (15, 60 și 240 de minute) după administrarea de PBS, DMG-PEG care conține LNP, LNP care conține PEG-OH și LNP fără PEG (de la stânga la dreapta pentru fiecare punct de timp). Aceste experimente au fost efectuate pe trombocite purificate recoltate de la un subiect la diferite momente de timp. După injectarea intravenoasă, LNP-urile care conțin DMG-PEG sunt asociate cu trombocite. Această asociere a fost rapidă, dar tranzitorie; după 60 de minute nu va mai fi vizibilă. DMG-PEG, și mai specific fragmentul metoxi-PEG, a fost probabil responsabil pentru asocierea observată a LNP, deoarece asocierea nu a avut loc atunci când a fost utilizat hidroxi-PEG (PEG-OH) în loc de DMG-PEG și nici nu a avut loc în absența oricărui PEG (denumit fără PEG).

- 25 Activarea trombocitelor după administrarea LNP este prezentată în FIG. 36. Activarea trombocitelor (așa cum este indicată de exprimarea markerului de activare a trombocitelor CD62P (MFI)) a fost măsurată la trei momente (15, 60 și 240 de minute) după administrarea de PBS, DMG-PEG LNP, PEG-OH LNP și LNP fără PEG (de la stânga la dreapta). LNP-urile sunt așa cum sunt descrise în Tabelul 7. Administrarea LNP-urilor a condus la creșterea exprimării CD62P. Activarea este cea mai ridicată în grupul DMG-PEG, dar este măsurabilă și în grupurile PEG-OH și fără PEG. Activarea este detectabilă la 30 15 minute după injectare și este maximă la 60 de minute după injectare. Ca și în cazul asocierii LNP cu trombocite, activarea este tranzitorie și scade cu timpul.

- 35 Astfel, trombocitele par să se asocieze mai întâi cu LNP-ul injectat, după care astfel de trombocite sunt activate. LNP-urile care cuprind DMG-PEG sunt capabile să se asocieze cu trombocitele în decurs de 15 minute de la administrare și apoi să activeze trombocitele în 60 și 240 de minute de la administrare. LNP-urile care cuprind PEG-OH și LNP fără PEG, pe de altă parte, nu demonstrează o asociere semnificativă cu trombocitele și totuși sunt încă capabile să activeze trombocitele la momentele de timp de 60 și 240 de minute. Nivelul de activare a trombocitelor observat cu PEG-OH și LNP fără

PEG este ușor mai mic decât cel observat cu DMG-PEG LNP. Astfel, este posibil ca trombocitele să fie activate chiar și fără o asociere apreciabilă cu LNP-ul administrat. Este posibil ca asocierea DMG-PEG LNP cu trombocite să fie mai stabilă decât este asocierea celorlalte tipuri de LNP-uri cu trombocitele și că, în timp ce este asociată *in vivo*, o astfel de asociere se destramă în timpul testului.

5

De asemenea, a fost evaluată prezența altor celule în agregatele trombocitare. FIG. 37A și 37B arată procentul de celule B B220+ și macrofage F4/80+ prezente în agregatele trombocitare după injectarea intravenoasă de DMG-PEG LNP, PEG-OH LNP și LNP fără PEG. Sunt prezentate procentul de celule B (așa cum este indicat prin colorarea B220+, FIG. 37A) și procentul de macrofage (așa cum este indicat prin colorarea F4/80+, FIG. 37B) la trei momente de timp (15, 60 și 240 de minute) după administrarea de PBS, DMG-PEG LNP, PEG-OH LNP și LNP fără PEG (de la stânga la dreapta). Celulele B și macrofagele au fost asociate cu agregatele trombocitare. Macrofagele și celulele B s-au asociat cu agregate trombocitare după administrarea tuturor celor trei tipuri de LNP (DMG-PEG LNP, PEG-OH LNP și LNP fără PEG). Asocierea celulelor B a fost similară între cele trei tipuri de LNP, sugerând că PEG a jucat un rol minim sau deloc în acest fenomen. Asocierea macrofagelor a variat ușor între cele trei tipuri de LNP, cea mai mare asociere a macrofagelor fiind observată cu LNP-urile cuprinzând DMG-PEG. Diferențe mai semnificative au fost observate la momentul de 240 de minute pentru ambele tipuri de celule. Indiferent de compoziția LNP-ului și conținutul de PEG, asocierea a fost tranzitorie și a scăzut în timp. Interesant, chiar și în absența unei "asocieri a LNP" observabile cu trombocitele în prezența PEG-OH LNP și LNP fără PEG (vezi FIG. 35), există o prezență detectabilă a celulelor B și a macrofagelor în agregatele trombocitare.

10

15

20

Au fost efectuate experimente suplimentare *in vitro* pentru a investiga aceste interacțiuni trombocitare. Trombocitele au fost incubate *in vitro* cu mediu, LPS sau LNP-uri cuprinzând lipidă helper DSPC (cuprinzând în plus lipidă cationică MC3, DMG-PEG și colesterol ca lipidă structurală). Activarea trombocitelor a fost evaluată prin exprimarea CD31 și CD62P în populația de trombocite CD41+. Trombocitele au fost activate rapid și puternic, așa cum este indicat de reglarea ascendentă a markerilor de activare CD31 și CD62P, după contactul cu LNP-uri. Vârful de activare a trombocitelor a fost observat la 15 minute, comparativ cu 60 de minute, atunci când au fost administrate LNP-uri *in vivo*. DSPC LNP a stimulat trombocitele într-un grad mai mare decât LPS și mediu la fiecare moment de timp testat. Datele sunt prezentate în FIG. 38 și 39A-39D.

25

30

Apoi a fost determinată capacitatea LNP de a induce agregarea trombocitelor într-un test de sânge integral. Datele sunt furnizate în FIG. 40A-40B. Celulele agregate au fost colectate și încadrate pe baza exprimării CD41 (prima coloană), împrăstierii ridicate înainte și împrăstierii laterale (a doua coloană) și exprimării F4/80 (axa y) și CD11b (axa x) (a treia coloană) după contactul cu mediu (primul rând), LPS (al doilea rând) și DSPC LNP (al treilea rând). Agregatele trombocitare au fost izolate pe baza exprimării CD41+ și FCS ridicat și SSC ridicat, așa este prezentat în a doua coloană pentru FIG. 40A. Este prezentat procentul de celule agregate care sunt CD11b+ F4/80+ dublu pozitiv (macrofage) după administrarea de mediu, LPS și DSPC LNP (de la stânga la dreapta) (FIG. 40B). LNP-urile DSPC au avut ca rezultat un procent mai mare de macrofage în agregatele trombocitare.

35

40

FIG. 41A-41B arată gradul de celule B CD19+, macrofage CD11b+ și macrofage F4/80+ legate la trombocite după incubarea sângelui integral cu mediu, LPS și DSPC LNP timp de 30 de minute (FIG. 41A) și 120 de minute (FIG. 41B). Datele sunt de asemenea prezentate în fig. 42A și 42B (macrofage) și FIG. 42C (celule B).

45

Un alt experiment a fost efectuat pentru a se evalua activarea trombocitelor, așa cum este indicat de exprimarea CD31 și CD62P măsurată prin citometrie în flux, în funcție de conținutul de lipidă LNP. FIG. 43A-43B arată activarea pe baza exprimării CD31 (FIG. 43A) și CD62P (FIG. 43B) după incubarea trombocitelor LNP timp de 0, 10, 30 și 60 de minute (de la stânga la dreapta) cu mediu (martor), DSPC LNP, DOPC LNP, DOPG LNP, DMG-PEG LNP, și LPS (de la stânga la dreapta). Prezența DSPC și DOPC activează puternic trombocitele *in vitro*. DMG-PEG activează trombocitele, dar activarea este mai mică decât activarea cu DSPC sau DOPC. Absența activării cu DOPG, în special în comparație cu activarea observată cu DOPC, sugerează cu tărie că motivul PC este responsabil de activarea de către DOPC și DSPC. Datele sunt prezentate de asemenea și în FIG. 44A-44B.

50

55

#### **Exemplul 17.**

S-au efectuat analize suplimentare utilizând proiectul studiului prezentat în Tabelul 8 pentru a se evalua parametrii farmacocinetici și farmacodinamici ai primatelor non-umane splenectomizate (NHP-uri).

60



Tabelul 8 Proiect de studiu

Nr. Grup	Material Testare	Nivel doză (mg/kg/săpt.)	Volum doză (mL/kg) <sup>a</sup>	Concentrație Doză (mg/mL)	Nr. de animale	
					Splenectomizate	Intacte
1	rhEPO					3
2	ARNm-LNP	0,20	5	0,04	3	

\*Dozele se vor administra cu o infuzie 60 minute la o rată a infuziei de 5 mL/kg/oră.

5 În general, splina este singura locație în care trombocitele intră în contact cu limfocitele. La contactul cu nanoparticulele lipidice (LNP-uri), trombocitele sunt activate rapid și puternic, așa cum este demonstrat printr-o reglare ascendentă atât a CD31 cât și a CD62, doi markeri de activare a trombocitelor (FIG. 38, 39A-39D). O analiză de sânge integral a ilustrat faptul că trombocitele se agregă cu macrofagele în prezența LNP-urilor (figurile 40A-40B, 42A-42B). În splină, s-a demonstrat că absorbția LNP de către celulele B are loc rapid într-o manieră genetică în condițiile de cultură *ex vivo*, deși nu s-a observat o absorbție specifică a LNP-urilor de către celulele T (FIG. 2A-2B). Mai mult, celulele B, în special subsetul B1, s-au dovedit a fi activate dependent de doză de LNP-uri goale (FIG. 12A-12B). S-a demonstrat că, atât celulele B1a, cât și B2b necesită splina, deoarece celulele B1a sunt libere și celulele B1b își pierd capacitatea de a secreta anticorpi după splenectomie (FIG. 46A-46B).

15 Au fost efectuate experimente pentru a se compara nivelul de tratament cu ARNm modificat a primatelor non-umane și producția de eritropoietină în prezența splinelor intacte, funcționale (grupul martor) și celor splenectomizate (NHP-uri) (Tabelul 8). Animalele (n=3 per grup) au suferit perfuzii de 60 de minute de rhEPO ARNm-LNP la o rată de 5 mL/kg/h (o concentrație de doză de 0,04 mg/mL), totalizând de 0,20 mg/kg/săptămână. Au fost recoltate probe de sânge înainte și după terminarea perfuziei (până la 48 de ore) timp de 29 de zile. Nivelurile de ARNm PKPD și producția de hEPO au fost măsurate folosind ADNb și un ELISA pentru proteine.

25 În primul rând, a fost explorat efectul splenectomiilor asupra numărului de reticulocite. Reticulocitele, globulele roșii imature, sunt supuse eritropoiezei pentru a se dezvolta în globule roșii mature, un proces controlat de hormonul de eritropoietină (EPO). Splina filtrează sângele, eliminând infecțiile și globulele roșii din circulație, dar nu este vitală; Subiecții splenectomizați prezintă o adaptare a organelor, rezultând o capacitate crescută de a lupta împotriva infecțiilor și de a elimina globulele roșii vechi din circulație. După tratamentul cu LNP-ARNmod-hEPO așa cum este descris mai sus (zilele 1, 8, 30 15 și 29), nivelul reticulocitelor a crescut cu perfuzia de ARNm, în timp ce nivelul a scăzut la grupul NHP intact (martor) după ziua 15. În grupul cu splenectomie, nivelul a scăzut treptat după 15 zile (FIG. 47). S-a constatat că hematocritul este menținut în grupul splenectomizat, precum și în aceleași condiții de tratament (FIG. 48).

35 Valorile ariei de sub curbă (AUC) și ale  $C_{max}$  au fost determinate pe parcursul a 29 de zile și 5 doze de ARNm-hEPO-LNP. AUC, o măsură a biodisponibilității substanței măsurate în timp, a demonstrat că a existat o expunere sistemică la substanță (FIG. 49A-49B).  $C_{max}$  reprezintă concentrația de pic a substanței sau a produsului substanței după administrare (FIG. 49C-49D). În NHP-urile splenectomizate, nivelurile de ARNm și hEPO sunt menținute sistemic prin dozare repetată (perfuzie IV) pe parcursul studiului. Spre deosebire de grupul de NHP intact (martor), ARNm și hEPO scad semnificativ începând cu ziua 15 (Fig. 49A-49D).

45 Activarea complementului a fost, de asemenea, măsurată și comparată între cele două grupuri. S-a descoperit că NHP-urile splenectomizate au prezentat o activare suprimată a complementului în comparație cu NHP-urile intacte (martor), așa cum au fost măsurate prin indicatorii de activare a complementului, C3a (FIG. 50A) și C5b9 (FIG. 50B). Mai mult, s-a constatat că exprimarea citokinelor este aproape absentă la NHP-urile splenectomizate (IL-6, FIG. 51A și IL-10, FIG. 51B). IgM anti-PEG (FIG. 52A) și IgG anti-PEG (FIG. 52B) s-au dovedit, de asemenea, mult reduse în absența splinei.

50 În rezumat, LNP-urile au interacțiuni celulare multiple *in vivo* care determină efectul de ABC, care include probabil un eveniment de detecție a cvorumului care include trombocite, monocite, grulocite

și celule B. Un nod cheie pare a fi splina, ceea ce susține în mare măsură ipoteza că ABC este condus de funcția celulei B1. Celulele B1 sunt responsabile pentru IgM-urile naturale și pot recunoaște PEG, fosfolipide și, eventual, cristale de colesterol, printre altele. Celulele B1b pot produce, de asemenea, IgG atunci când sunt stimulate. După cum a fost demonstrat mai sus, îndepărtarea splinei previne activarea celulelor B (inclusiv a celulelor B1) care probabil contribuie în mare măsură la ABC. Animalele splenectomizate au prezentat IgM/IgG scăzute până la deloc la PEG, nici un clearance al ARN-ului sau proteinei și o activare scăzută până la deloc a citokinelor/complementului, arătând că, celulele B1 conduc la un clearance accelerat a sângelui.

#### 10 **Exemplul 18**

Exemplul 18 prezintă formulări de LNP concepute pentru a reduce legarea CD36 și producerea de IgM anti-PEG. Numeroase noi formulări LNP încărcate cu hEPO au fost preparate și testate pentru a se determina efectul modificărilor lipidelor asupra nivelurilor de exprimare, de activare a celulelor B (de exemplu prin CD36) și de producere de IgM anti-PEG. Fosfolipidele naturale disponibile comercial și acizii grași au fost încorporați în LNP-uri și supuși unui screening în paralel cu proiectarea și sinteza analogilor de DSPC nenaturali. Fig. 54 este o schemă care ilustrează înlocuirea unei fosfolipide cu o grupare zwitterionică diferită.

20 Șoarecii CD-1 au fost dozați săptămânal cu LNP-uri cu Cmpd405, Cmpd396, Cmpd406, Cmpd394, Cmpd407, Cmpd403, Cmpd434, Cmpd406, Cmpd405 și Cmpd407. O doză repetată a fost administrată la 3 săptămâni.

În studiu, exprimarea hEPO a fost măsurată la 6 ore (pg/ml) și IgM anti-PEG a fost măsurată în săptămâna a-2-a. Datele sunt prezentate în fig. 53A-53B. Figurile. 53A-53B sunt un set de grafice care ilustrează producția de IgM anti-PEG după administrarea formulărilor de LNP. PEG-lipida afectează cantitatea de IgM Anti-PEG generată *in vivo* la doza repetată. Patru lipide PEG au demonstrat niveluri scăzute de IgM anti-PEG cu niveluri moderate de exprimare a hEPO. Cmpd396, Cmpd416, Cmpd403, și Cmpd405. Cmpd413 a produs IgM PEG relativ ridicat. În general, lipidele PEG terminate cu hidroxil și cu difuzie mai rapidă oferă niveluri reduse de IgM anti-PEG.

Mai multe formulări de LNP au fost concepute pentru a se determina ce tip de modificări DSPC ar reduce recunoașterea LNP-ului de către CD36 pe celulele imune. Se crede, conform aspectelor invenției, că activarea sistemului imunitar de către DSPC este cauzată de interacțiunea cu CD36 pe trombocite și celule B și/sau miez de glicerol. Gruparea de cap și planaritatea cozii lipidelor pe DSPC pot juca un rol asupra capacității moleculei de a interacționa cu liganzii CD36. În consecință, au fost generate mai multe DSPC-uri modificate, încorporate în lipide și testate în ceea ce privește efectele asupra celulelor B și trombocitelor.

A fost testat efectul analogilor naturali de PC asupra activării și nivelurilor de exprimare a celulelor. FIG. 55A-55B prezintă exprimarea ARNm Luc (FIG. 55A) și activarea celulelor B (FIG. 55B) după administrarea formulărilor de LNP la șoarecii CD-1. Analogii de PC naturali au ca rezultat activarea celulelor B și unii par să interfereze cu exprimarea (DOPG și DOPA) în testul efectuat. Cu toate acestea, acidul oleic demonstrează o reducere semnificativă a activării celulelor B, menținând în același timp niveluri suficiente de exprimare a Luc.

Mai mulți derivați de acid oleic au fost sintetizați și testați în ceea ce privește efectele asupra nivelurilor de exprimare, activării celulelor B și agregării trombocitelor. Datele sunt prezentate în FIG. 56A-56E și 57A-57C. Structurile sunt prezentate în FIG. 56A. FIG. 56B este un grafic care ilustrează exprimarea CD86 (activarea celulelor B) și FIG. 56C este un grafic care ilustrează nivelurile de exprimare ale Luc, măsurate prin fluxul total. FIG. 57A este un grafic care ilustrează frecvențele celulelor B activate la 24 de ore după doză FIG. 57B este un grafic care ilustrează agregarea trombocitelor la 15 minute după doză. FIG. 57C este un grafic care ilustrează recrutarea celulelor în agregatul trombocitar. Derivații de acid oleic prezintă o exprimare bună și o activare mai scăzută *in vitro* a celulelor B în raport cu DSPC, așa este prezentat în FIG. 56B (grafic care ilustrează exprimarea CD86) și FIG. 56C (grafic care ilustrează fluxul total).

Au fost examinate profilurile de activare imună a LNP-urilor de Cmpd 18 care conțin derivați de acid oleic. Derivații de acid oleic au demonstrat profiluri de activare imună îmbunătățite. Datele sunt prezentate în FIG. 58A-58B, 59 și 60A-60C. Efectele pozitive ale acidului oleic s-au menținut pentru Cmpd18. FIG. 58A ilustrează nivelurile de exprimare a luciferazei măsurate prin fluxul total la 6 ore după livrarea la șoarecii CD-1. FIG. 58B ilustrează activarea *in vivo* a celulelor B în splenocite de șoarece la 24 de ore după administrare. FIG. 59 este un grafic care ilustrează concentrația în timp a hEPO. O marjă de

exprimare îmbunătățită cu o particulă conform invenției, spre deosebire de MC3, a fost demonstrată cu ARNm modificat chimic. FIG. 60A-60C sunt un set de grafice care ilustrează un profil de activare imun îmbunătățit cu ARNm modificat chimic în formulările de LNP conform invenției. FIG. 60A este un grafic care ilustrează activarea *in vivo* a celulelor B la 24 de ore după administrarea particulelor încărcate cu hEPO sau PBS. FIG. 60B este un grafic care ilustrează concentrația IL-6 la 6 ore după administrarea particulelor încărcate cu hEPO sau PBS. FIG. 60C este un grafic care ilustrează concentrația de IP-10 la 6 ore după administrarea particulelor încărcate cu hEPO sau PBS.

10 Datele demonstrează că, mai multe alternative de DSPC, inclusiv acidul oleic și analogii de acid oleic, pot fi formulate în LNP-uri și au ca rezultat o reducere a activării celulelor *Bin vivo*. În plus, au fost identificate alternative de PEG-lipidă (PEG-DMG) care au proprietăți de inducere reduse a IgM anti-PEG prin difuzie mai rapidă și hidrofobie de suprafață redusă.

#### Exemplul 19

15 Asocierea și activarea celulelor B utilizând noi formulări LNP care cuprind acid oleic și derivați de PC sunt prezentate în Exemplul 19. Un studiu pentru determinarea efectului încorporării în LNP a acidului oleic și a derivaților de PC asupra celulelor B, a fost configurat folosind materialele prezentate în Tabelul 9. Caracteristicile particulelor rezultate sunt, de asemenea, prezentate în Tabelul 9.

	Compoziție	mol%	ARNm	Diametru (nm)	PDI	%EE	ARNm [ug/mL]
DSPC	MC3:DSPC : Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	80,8	0,1	99	63
Comp160	MC3:Comp 160:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	76	0,1	98	65
Comp161	<b>MC3:Comp</b> 161:Col: PEG-DMG	50:10:38,5; <b>1,5</b>	Luc	74	0,098	99	66
Comp162	<b>MC3:Comp</b> 162:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	76,3	0,085	99	65
Comp163	<b>MC3:Comp</b> 163:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	77,5	0,11	99	66
Comp164	<b>MC3: Comp</b> 164:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	70,1	0,069	98	59
Comp165	<b>MC3: Comp</b> 165:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	74,3	0,12	96	60
Comp166	<b>MC3:Comp</b> 166:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	70,3	0,073	99	66
Acid oleic	MC3: <b>Acid</b> oleic:Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	80,6	0,093	97	67
Comp148	<b>MC3: Comp</b> 148: Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	79,7	0,092	95	66
Comp157	<b>MC3: Comp</b> 157: Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	75,8	0,094	97	63
Comp158	<b>MC3: Comp</b> 158: Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	76,4	0,13	97	65
Comp159	<b>MC3: Comp</b> 159: Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	97,5	0,11	97	69
Comp393	<b>MC3: Comp</b> 393: Col:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	Luc	134	0,12	80	60
Fluor DSPC	MC3:DSPC: Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38,5 : <b>1,5</b>	Luc	78,1	0,075	99	68
Fluor Comp160	MC3:DSPC: Comp160:Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38,5 : <b>1,5</b>	Luc	73,4	0,099	99	68
Fluor Comp161	MC3:DSPC: Comp161:Rodamină-DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38,5 : <b>1,5</b>	Luc	69,6	0,11	99	64
Fluor Comp162	MC3:DSPC: Comp162:Rodamină-	50:9,9:0,1:38,5 : <b>1,5</b>	Luc	72	0,1	99	64

	DOPE:Col:PEG-DMG						
Fluor Comp163	MC3:DSPC: Comp163:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	72,6	0,046	99	64
Fluor Comp164	MC3:DSPC: Comp164:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	67,3	0,11	99	63
Fluor Comp165	MC3:DSPC: Comp165:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	74,8	0,16	97	66
Fluor Comp166	MC3:DSPC: Comp166:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	69,5	0,083	99	68
Fluor Acid Oleic	MC3:DSPC: Acid:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	83,7	0,12	97	78
Fluor Comp148	MC3:DSPC: Comp148:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	81,2	0,11	97	73
Fluor Comp157	MC3:DSPC: Comp157:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	78,8	0,11	98	67
Fluor Comp158	MC3:DSPC: Comp158:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	83,8	0,078	98	60
Fluor Comp159	MC3:DSPC: Comp159:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	99	0,13	97	58

Fluor Comp393	MC3:DSPC:Comp393:Rodamină- DOPE:Col:PEG-DMG	50:9,9:0,1:38, 5 :1,5	Luc	122,4	0,09	83	67
---------------	--	--------------------------	-----	-------	------	----	----

Datele sunt prezentate în FIG. 61-62. FIG. 61 este un grafic care ilustrează absorbția de LNP de către celulele B măsurată prin procentul de celule B PE+ CD19+. FIG. 62 este un grafic care ilustrează activarea celulelor B de către LNP, măsurată prin exprimarea CD86 pe celulele B.

5

### Exemplul 20

Evaluarea *in vivo* a formulărilor LNP care conțin hEPO compuse din noi lipide PEG este prezentată în Exemplul 20. A fost efectuat un studiu *in vivo* pentru a examina efectele diferitelor lipide PEG asupra nivelurilor de exprimare și a producției de IgM anti-PEG. Studiul a implicat o comparație a diferitelor lungimi de coadă de lipide (difuzie) și grupuri terminale - de exemplu, -OH (față de oMe) cu linkeri click sau o grupare de amidă. Structurile testate și proiectul experimental sunt prezentate în Tabelul 10.

10

Tabelul 10

Grup	Material Testare/Martor	Vehicle	Comp #/lipidă	Cale	Regim Dozare	# de doze	# masculi	# femele	Nivel doză (mg/kg)	Vol Doz (mL)	Conc. Doz (mg/mL)	Vol Total necesar (ml)	Masă min totală nec (mg)
1	PBS	N/A	N/A	IV	o dată săptămânal	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
2	hEPO	MC3	Fără PEG	IV	o dată săptămânal	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
3	hEPO	MC3	408	IV	o dată săptămânal	4	S		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448

4	hEPO	MC3	405	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
5	hEPO	MC3	406	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
6	hEPO	MC3	396	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
7	hEPO	MC3	394	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
8	hEPO	MC3	409	tv	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
9	hEPO	MC3	410	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
10	hEPO	MC3	411	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
11	hEPO	MC3	412	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
12	hEPO	MC3	413	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
13	hEPO	MC3	414	IV	o dată spătamâna l	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448

5 Nivelurile de exprimare ale hEPO din ARNm-ul livrat în LNP au fost măsurate în săptămânile 1, 2, 3 și 4 după administrarea IV a LNP-ului. hEPO a fost exprimată prin fiecare dintre formulările de ARNm-LNP. Nivelurile de exprimare au fost diminuate în DSG PEG OMe LNP în raport cu celelalte formulări.

10 Nivelurile de IgM anti-PEG au fost de asemenea detectate la 96 de ore după a doua și a treia doză de LNP. FIG. 63A-63B sunt un set de grafice care ilustrează cantitatea de PEG IgM produsă la 96 de ore după o a doua doză de LNP (FIG. 63A) sau la 96 de ore după o a treia doză de LNP (FIG. 63B). Compușii testați corespund benzilor în următoarea ordine de la stânga la dreapta în ambele FIG. 63A și 63B: PBS, fără PEG, Cmpd408, Cmpd405, Cmpd406, Cmpd409, Cmpd410, Cmpd411, Cmpd412, Cmpd413, și Cmpd414. DSG și DMG servesc ca martori relativ cunoscuți. Controlul DMG este crescut de a treia a treia doză. Multe dintre formulările noi au produs mai puține IgM decât martorul DMG. Cmpd405, Cmpd396, Cmpd403 (coadă unică C18), Cmpd416 (coadă di-lipidică), toate au prezentat o 15 inducere scăzută a IgM anti-PEG Cmpd405 și Cmpd396 după ambele doze au prezentat doar IgM PEG minime. Cmpd396 a părut a fi cel mai bun candidat testat la producerea de PEG IgM minime.

20 În timp ce exprimarea hEPO s-a menținut în general pentru toate grupurile, PEG-urile terminate în OH au prezentat niveluri reduse de IgM anti-PEG. Lipidele C10 PEG au demonstrat, de asemenea, o producție redusă de IgM anti-PEG.

### Exemplul 21

25 Datele de titrare au fost generate pentru a determina efectul de titrare cu oleic și DSPC asupra componentelor imune ale ABC/toxicității. Nivelurile de oleic și DSPC în LNP-urile MC3 au fost reduse (de exemplu, oferind niveluri reduse de colină). LNP-urile au fost încărcate cu hEPO și formulate așa cum este prezentat în Tabelul 11. LNP-urile au fost administrate IV o dată pe săptămână timp de 4 săptămâni la șoareci.

Tabelul 11

Grup	Material testare/martor	Vehicul	Formulare	Cale	Regim dozare	# de doze	# masculi	# femelle	Nivel doză (mg/kg)	VOI doză (mL)	Conc doză (mg/mL)	Vol total nec. (mL)	Masă min totală nec. (mg)
1	PBS	N/A	N/A	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
2	hEPO	MC3	0%	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
3	hEPO	MC3	10% DSFC	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
4	hEPO	MC3	20% DSFC	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
5	hEPO	MC3	30% DSFC	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
6	hEPO	MC3	10% Acid oleic	(V	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
7	hEPO	MC3	20% Acid oleic	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
8	hEPO	MC3	30% Acid oleic	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
9	hEPO	MC3	30% Acid oleic & PEGOH	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
10	hEPO	MC3	30% DSFC & PEGOH	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448
11	hEPO	MC3	DSG PEGOMe	IV	o dată pe săptămână	4	8		0,05	0,1	0,01	4,48	0,0448

Datele sunt prezentate în FIG. 64-65. FIG. 64 este un grafic care ilustrează exprimarea hEPO la 6 ore după administrarea o dată pe săptămână prin IV a formulărilor de ARNm hEPO - LNP în săptămânile 1, 2, 3 și 4. Rezultatele indică un răspuns la doză mai degrabă decât o schimbare binară. Creșterea cantității de acid oleic poate oferi beneficii suplimentare în producerea de particule stabile, deoarece este doar aproximativ jumătate din dimensiunea DSFC. FIG. 65 este un grafic care ilustrează producția de IgM anti-PEG la 96 de ore după o a treia doză de formulări de hEPO ARNm-LNP.

#### Exemplul 22

LNP-urile care cuprind din fosfolipide având diferite grupări de cap au fost preparate și testate într-un studiu cu doză unică. Obiectivul studiului a fost de a evalua exprimarea pentru diferite grupe de cap de fosfolipide în raport cu formularea standard DSFC. O singură doză de LNP MC3 având diferite fosfolipide cu grupări de cap diferite a fost administrată IV la șoareci CD-1. La 3, 6 și 24 de ore după injectare au fost colectate 100  $\mu$ l de sânge timp de 15 minute.

Rezultatele sunt prezentate în FIG. 66. Fiecare fosfolipidă este măsurată la trei momente de timp (3, 6 și 24 de ore) după injectare. Structurile fosfolipidelor sunt prezentate în FIG. 69. Toate formulările au fost bine exprimate (DOPA și DOPG au avut cea mai scăzută exprimare).

Au fost sintetizate mai multe LNP-uri noi pentru a testa activarea celulelor B1a/B. Formulările sunt prezentate în Tabelul 12.

Tabelul 12

	Compoziție	% mol	ARNm	Diametru (nm)	Indice Pd	%E	[ARNm] $\mu$ g/mL
<b>DSFC</b>	MC3:DSFC:Chol:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	hEPO	69,7	0,12	98	57
<b>Acid oleic</b>	MC3:Acid oleic:Chol:PEG-DMG	50:10:38,5:1,5	hEPO	101,7	0,088	96	50
<b>0,1% PS</b>	MC3:DOPS:Acid	50:0,1:9,9:38,5:1,5	hEPO	81	0,079	97	53

	Compoziție	% mol	ARN m	Diametru (nm)	Indice Pd	%E E	[ARNm] ug/mL
<b>9,9% acid oleic</b>	oleic:Chol:PEG-DMG						
<b>1% PS 9% Acid Oleic</b>	MC3:DOPS:Acid oleic:Chol:PEG-DMG	50:1:9:38,5:1,5	hEPO	74,4	0,083	98	51
<b>DOPA</b>	MC3:DOPA:Chol:PEG- DMG	50:10:38,5:1,5	hEPO	103,9	0,15	98	43
<b>0,1% PS 9,9% DSPC</b>	MC3:DOPS:DSPC:Chol:PE G-DMG	50:0,1:9,9:38,5:1,5	hEPO	77,6	0,11	98	48
<b>1% PS 9% DSPC</b>	MC3:DOPS:DSPC:Chol:PE G-DMG	50:1:9:38,5:1,5	hEPO	73	0,12	99	46

Toate formulările au dus la o creștere a populației de celule B activate (CD19+CD86+CD69+) în comparație cu un martor negativ. Cu toate acestea, înlocuirea DSPC cu acid oleic a condus la scăderea nivelului de activare a celulelor B. Activarea celulelor B umane *ex vivo* a fost de asemenea evaluată prin măsurarea eliberării de citokine. FIG. 67A-67C sunt un set de grafice care ilustrează eliberarea de citokine ca măsură a activării celulelor B umane *ex vivo*. Au fost măsurate nivelurile de IFN-gamma (FIG. 67A), IL-6 (FIG. 67B) și TNF-alfa (FIG. 67C). În FIG. 67A, au fost observate diferențe semnificative în eliberarea IFN-g cu LNP-uri non-DSPC. Înlocuirea DSPC cu acid oleic conduce la o scădere semnificativă a eliberării de IFN-g. În Fig. 67B, au fost observate diferențe semnificative în IL-6 cu LNP-uri non-DSPC. Substituția DSPC cu acid oleic a condus la o scădere semnificativă a secreției de IL-6. Substituția DSPC cu acid oleic a condus, de asemenea, la o scădere semnificativă a secreției de TNF-a (FIG. 67C). Această scădere a fost mai semnificativă decât scăderile observate cu IFN-g și IL-6.

De asemenea, a fost evaluată activarea celulelor VB splenice. Rezultatele sunt prezentate în FIG. 68. FIG. 68 este un grafic care ilustrează quantumul de activare a celulelor B ca rezultat al diferitelor formulări de LNP. Formulările de LNP, inclusiv acidul oleic, au demonstrat o activare redusă a celulelor B splenice.

#### **Exemplul 23**

Au fost preparate și testate LNP-uri care cuprind noi derivați de PC și acid oleic în ceea ce privește impactul asupra exprimării Luc, agregării trombocitelor și activării celulelor B. LNP-urile au fost formulate așa cum este listat în Tabelul 13 și administrate IV ca o singură doză la șoareci CD-1. Lipidele au fost înlocuitori de DSPC având structuri așa este prezentat în FIG. 56A. Unele dintre lipide au o grupare de cap modificată similară PC. Altele au cozile modificate pentru a testa stabilizarea Cmpd 125 are au o grupare de cap Zwitterionică.

Tabelul 13

Grup	Material de incapsulare	Formulă	Formulare	Cale	Regim de dozare	Nr de doze	Vol. total (ml)	Nr de formulări	Alte componente	Alte doze (mg/kg)	Vol. total (ml)	Conc. doză (mg/ml)	Vol. total (ml)	Alte doze (mg)
1	LUC C1	DSPC	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
2	LUC C1	DSPC	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
3	LUC C1	Acid oleic	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
4	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
5	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
6	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
7	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
8	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
9	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
10	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
11	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
12	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007
13	LUC C1	Compleți	MC3-PC:Chol:PEG-DMSO; 50:10:30:5:1:5	IV	Orală în Zona 1	3		5		0.05	0.1	0.01	0.7	0.007

ARN-urile sunt modificate cu N1-metilpseudouridină. Structurile lipidice sunt prezentate în FIG. 56A.

- 5 Rezultatele sunt prezentate în FIG. 70. FIG. 70 este un grafic care ilustrează nivelurile de exprimare Luc după administrarea de ARNm LUC încapsulat în diferite formulări LNP compuse din PC noi și derivați de acid oleic la 3, 6 și 24 de ore după administrare. Nivelurile de exprimare au variat. Pe măsură ce moleculele au devenit mai împiedicate steric, exprimarea părea să scadă. Nivelurile de exprimare pentru acidul oleic și derivații săi au rămas ridicate.

10

*In vitro* au fost, de asemenea, evaluate interacțiunea și activarea Cmpd-LNP și celulele B. Datele sunt prezentate în FIG. 71A-71B și 72A-72B.

- 15 FIG. 71A-71B sunt un set de grafice care ilustrează interacțiunea/asocierea celulelor B cu diferite formulări de LNP, așa cum este evaluată printr-un procent de celule CD19+PE+. Mai multe formulări de LNP sunt descrise în FIG. 71A. Acidul oleic și Cmpd125 sunt reprezentați în FIG. 71B. FIG. 72A-72B sunt un set de grafice care ilustrează activarea celulelor B cu diferite formulări LNP, așa cum a fost evaluată prin intensitatea fluorescenței mediană a exprimării CD86. Mai multe formulări de LNP sunt descrise în FIG. 72A. Acidul oleic și Cmpd 125 sunt reprezentați în FIG. 72B.

20

#### **Exemplul 24**

LNP-urile care cuprind noi derivați de PC și acid oleic au fost preparate și testate în ceea ce privește exprimarea, activarea trombocitelor și activarea celulelor B într-un studiu cu doză unică în raport cu formularea de DSPC standard. LNP-urile au fost formulate așa cum este listat în Tabelul 14 și administrate IV ca o singură doză la șoareci CD-1.



Tabelul 14

Grup	Material de testare	Nivelul	Formulare	Căi	Regim de dozare	# de doze	Volum	# din	Nivel dozare (mg/kg)	Conc. doză (mg/ml)	Vol. total (ml)	Schimbare min. (mg)
1	MC3	0,06	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
2	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
3	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
4	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
5	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
6	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
7	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
8	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
9	MC3	Acid DMSO	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
10	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
11	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
12	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
13	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7
14	MC3	Complet	MC3-PC-Chol-PEG-DMSO; SS-10-30-S-1-S	IV	Oral în Zua 1	5	5	5	0,06	0,1	0,05	0,7

ARN-urile sunt modificate cu N1-metilpseudouridină. Structurile lipidelor testate sunt prezentate în FIG. 56D.

Datele sunt prezentate în FIG. 73A-73C. Exprimarea Luc cu diferite formulări de LNP a fost evaluată printr-o măsurare a fluxului total la 3 ore (FIG. 73A), 6 ore (FIG. 73B) și 24 de ore (FIG. 73C) după o doză.

#### Exemplul 25

Maimuțelor li s-a administrat hEPO ARNm (modificat chimic) în MC3-LNP 1X săptămânal timp de 4 săptămâni. Regimul de co-medicație cu dexametazonă orală în doză egală de mg/kg de om, inhibitor COX-2 (veterinar), ranitidină și cetirizină a fost administrat așa cum este descris în literatură. Metotrexatul a fost administrat săptămânal pentru a se evalua inhibarea țintită a celulelor B. Proiectul experimental este prezentat în Tabelul 15.

Tabelul 15

Grup Nr.	Material de testare	Nivelul dozei (mg/kg)	Co-medicație	Rata de dozare (mL/kg/h)	Concentrația dozei (mg/mL)	Număr de masculi
1	MC3 <sup>a</sup>	0	N/A	5	0	3
2	hEPO ARNm în MC3	0,3	N/A	5	0,06	3
3	hEPO ARNm în MC3	0,3	Metotrexat	5	0,06	3

<sup>a</sup> Concentrația de MC3 pentru grupul 1 este echivalentă cu concentrația de MC3 din grupurile 2 la 3. N/A = nu se aplică.

Datele sunt prezentate în FIG. 91A-91B. FIG. 91A este un grafic care ilustrează producția de citokine (IL-6) în NHP-uri în ziua 1 și ziua 22 a regimurilor de co-medicație. FIG. 91B este un grafic care ilustrează faptul că, co-medicația cu Gilenya reduce producția de IgM anti-Peg, în concordanță cu ABC redus. Rezultatele arată că animalele tratate anterior par să aibă un titru IgM sau IgG pozitiv la linia de

bază ridicat. Cu toate acestea, unele animale nu au prezentat o creștere a IgM și/sau IgG după administrarea de LNP. NHP-urile prezintă o frecvență ridicată de răspuns Anti-PEG, fie IgM, fie IgG (-50%). Mai multe regimuri de co-medicație par să amelioreze ABC la primate, inclusiv Gilenya și antitrombocitare/Syk/Dex/PI3Kdelta. Acest lucru are ca rezultat reducerea producției de IL-6 și a răspunsurilor Ig anti-PEG reduse, așa este prezentat în FIG. 91A-91B. Co-medicația pare să îmbunătățească exprimarea în ziua 1, indicând faptul că au loc răspunsuri ABC inițiale (FIG 91A). Rezultatele regimurilor de co-medicație sunt prezentate în Tabelul 16.

Tabelul 16

		MC3	hEPO în MC3	hEPO în MC3 cu metotrexat
Cmax (ng/mL)	Ziua 1	0.001	0.162	0.144
	Ziua 8	0.001	0.153	0.141
	Ziua 15	0.001	0.102	0.092
	Ziua 22	0.001	0.056	0.056
AUC (ng*hr/mL)	Ziua 1	0.150	8.998	6.725
	Ziua 8	0.150	7.620	5.694
	Ziua 15	0.150	3.811	3.211
	Ziua 22	0.150	2.196	4.252

### Exemplul 26

#### 1. Testul CFSE

Celulele au fost izolate din splină prin zdrobirea țesutului printr-un filtru de 70 nm în prezența PBS. După spălare, celulele roșii din sânge au fost lizate cu tampon ACK. După o spălare suplimentară cu PBS,  $2 \times 10^6$  celule per probă au fost colorate cu CFSE în PBS la temperatura camerei timp de 5 minute. Imediat după incubare, reacția de colorare a fost stinsă cu 15 mL de mediu la temperatura camerei. Celulele au fost apoi centrifugate și spălate de două ori cu mediu. Celulele au fost apoi incubate timp de 3 zile la 37°C în prezența unor diverși stimuli. Analiza a fost efectuată folosind software-ul ModFit 4.1. FIG. 92 arată că celulele B proliferază în prezența LNP-urilor DSPC.

#### 2. Fluxul de calciu

Celulele au fost izolate din splină prin zdrobirea țesutului printr-un filtru de 70 nm în prezența PBS. După spălare, celulele roșii din sânge au fost lizate cu tampon ACK. După o spălare suplimentară,  $2 \times 10^6$  celule per probă au fost colorate cu 5 uM de Calcium Sensor Dye eFluor<sup>®</sup> 514(#65-0959-39, ebioscience) timp de 30 de minute la 37°C. După o spălare suplimentară, celulele au fost colorate cu CD19 pe gheață timp de 20 de minute. Celulele au fost apoi analizate prin citometrie în flux. O linie de bază a fost obținută timp de 30 de secunde, apoi după adăugarea stimulului, semnalul a fost măsurat timp de 360 de secunde. După adăugarea unui stimul pozitiv (cocktail de stimulare a celulelor #00-4970-03 ebioscience), semnalul a fost înregistrat pentru încă 30 de secunde. Analiza a fost efectuată folosind software-ul FlowJo software. FIG. 93 arată că LNP-urile DSPC induc eliberarea de calciu în celulele B.

### Exemplul 27

Studiile anterioare au caracterizat, în detaliu, eficacitatea redusă a nanoparticulelor PEGilate la dozarea repetată, cunoscut sub numele de fenomenul ABC. IgM anti-PEG generate ca răspuns la administrarea de LNP, recunosc componenta lipidică PEG a LNP, se leagă de LNP și le îndepărtează din circulație. Componenta fosfolipidă a LNP, în special DSPC, activează atât trombocitele, cât și celulele B, provocând eliberarea de citokine și "IgM naturală" care potențează și mai mult răspunsul imun la LNP-urile administrate, contribuind la ABC. Acidul oleic a fost identificat ca o alternativă la DSPC. Înlocuirea DSPC cu acid oleic are ca rezultat o exprimare comparabilă a proteinei din ARNm încapsulat, dar asigură o activare redusă a celulelor B în comparație cu formularea LNP standard, de exemplu, formularea LNP pe bază de MC3. De asemenea, sunt identificate mai sus, noi lipide PEG care pot fi utilizate ca lipide PEG, de exemplu, alternative PEG DMG. Fără a fi legat în teorie, se crede că astfel de noi lipide PEG asigură reducerea generării de IgM anti-PEG prin difuzie mai rapidă (cozi mai scurte ale lipidelor) și hidrofobie de suprafață redusă (-OH față de -OMe).

Studii recente cu mai multe doze la șoareci cu hEPO au identificat lipide PEG care oferă niveluri bune de exprimare a proteinei și niveluri scăzute de IgM Anti-PEG. Acest studiu a fost proiectat pentru a testa astfel de lipide într-un studiu de administrare repetată la șoareci, opțional în combinație cu noi lipide amino cationice, în formulări de LNP pentru administrarea de ARNm. Parametri specifici, cum ar fi exprimarea proteinei, IgM anti-PEG, activarea celulelor B și exprimarea citokinelor *in vivo* au fost testate pentru a diferenția LNP-urile pe baza eficacității preferate.

Un studiu de trei săptămâni al noii combinații PEG/Cmpd18 și PEG/MC3 prin administrare intravenoasă (IV) cu hEPO a fost efectuat la șoareci. În special, noi LNP-uri PEG MC3 și noi LNP-urile

PEG Cmpd18 au fost preparate și testate cap la cap în ceea ce privește exprimarea, activarea IgM anti-PEG în celule B și exprimarea citokinelor *in vivo* într-un studiu cu doze multiple. Formulările de LNP au fost administrate IV în trei doze cu volum fix la șoareci CD-1. Mărimea în diametru (nm), indicele de polidispersie (PDI), eficiența încapsulării (EE), concentrația de ARNm (ug/mL) și concentrația de endotoxină (EU/mL) au fost măsurate pentru noile LNP-uri. Tabelul 1 prezintă măsurătorile anterioare ale LNP-urilor MC3 și Cmpd18 cu noi lipide PEG după administrarea primei doze. Așa cum arată datele din tabelul 17, LNP-urile au avut o dimensiune, PDI și EE suficiente pentru administrarea *in vivo*.

Tabelul 17. Săptămâna 1 Doza

Animal		Diametru		%EE	[final] ug/mL
		(nm)	Pd Index		
1	MC3: Comp422	63,8	0,089	98	93
2	MC3: Comp416	108	0,14	97	81
3	MC3: Comp405	76,7	0,14	97	71
4	MC3: Comp403	65,8	0,16	98	68
5	MC3: Comp396	77,2	0,18	97	67
6	MC3: Comp430	69,1	0,13	98	70
7	Comp18: Comp422	77,1	0,085	95	71
8	Comp18: Comp416	130,4	0,181	96	103
9	Comp18: Comp405	103,1	0,18	91	68
10	Comp18: Comp403	89,4	0,13	96	77
11	Comp18: Comp396	96	0,16	93	77
12	Comp18: Comp430	86,5	0,105	97	86
13	MC3				

Mărimea în diametru (nm), indicele de polidispersie (PDI), eficiența încapsulării, concentrația de ARNm (ug/mL) și concentrația de endotoxină a noului PEG LNP MC3 și a noului PEG LNPS SM86 au fost de asemenea măsurate la trei săptămâni după dozare. Aceste date sunt prezentate în Tabelul 18 de mai jos. Datele din tabelele 17 și 18 arată că, caracteristicile fizico-chimice atât pentru LNP-urile MC3, cât și pentru Cmpd18 au rămas constante pe tot parcursul studiului. În plus, EE și dimensiunea noului LNPS prezentate în Tabelele 17 și 18 sunt cuprinse în intervalele recunoscute în domeniu.

Tabelul 18 (Săptămâna 3)

Animal		Diametru (nm)	Indice Pd	%EE	[final] ug/mL
1	MC3: Comp422	63,8	0,089	98	93
2	MC3: Comp416	108	0,045	98	81
3	MC3: Comp405	76,7	0,16	97	71
4	MC3: Comp403	65,8	0,14	98	68
5	MC3: Comp396	77,2	0,16	97	67
6	MC3: Comp430	69,1	0,074	98	80
7	Comp18: Comp422	77,1	0,082	95	71
8	Comp18: Comp416	130,4	0,1	96	103
9	Comp18: Comp405	103,1	0,18	91	68
10	Comp18: Comp403	89,4	0,13	96	77
11	Comp18: Comp396	96	0,17	93	77
12	Comp18: Comp430	86,5	0,11	97	86

Date suplimentare sunt prezentate în FIG. 74A-74B. FIG. 74A-74B prezintă exprimarea hEPO la 6 ore după administrarea IV o dată pe săptămână a formulărilor de hEPO ARNm - LNP în săptămânile 1, 2 și 3. Datele arată o exprimare superioară pentru LNP-urile pe bază de Cmpd 18 și alte dovezi ale exprimării proteinelor apreciabile cu mai multe dintre noile lipide PEG testate.

Exprimarea citokinelor în LNP-urile MC3 și Cmpd 18 este prezentată în Tabelele 19-22. Proteina 10 inductibilă cu IFN- $\gamma$  (IP-10) este o chemokină implicată în inflamație, iar interleukina 6 (IL-6)



Tabelul 22. Săptămâna 2 IL-6 (pg/mL)

MC3: Cmpd 432	MC3: Cmpd 436	MC3: Cmpd 439	MC3: Cmpd 403	MC3: Cmpd 399	MC3: Cmpd 430	Cmpd 18: Cmpd 422	Cmpd 18: Cmpd 418	Cmpd 18: Cmpd 425	Cmpd 18: Cmpd 405	Cmpd 18: Cmpd 399	Cmpd 18: Cmpd 420	PBS	Water
97	613	39	87	39	509	24	325	0*	35	0*	28	49	
107	0*	45	13	0*	252	0*	147	0*	125	0*	159	33	
116	19	48	0*	27	0*	27	283	180*	18	451	39	3	
8	43	45	369	31	36	0*	431	6	38	0*	84	18	
36	9*	85	74	284	93	21	38	46	594	43	7	485	
34	28	74	0*	18	72	7	325	0*	75	0*	0*	588	
0*	85	127	140	63	10	383	45	67	265	153	97		
0*	61	39	509	0*	388	13	425	0*	58	500	0*		
0*	622	43	8	98	169	3	134		38	0*	26		
	29	9*	284	11	34	48				48	0*		

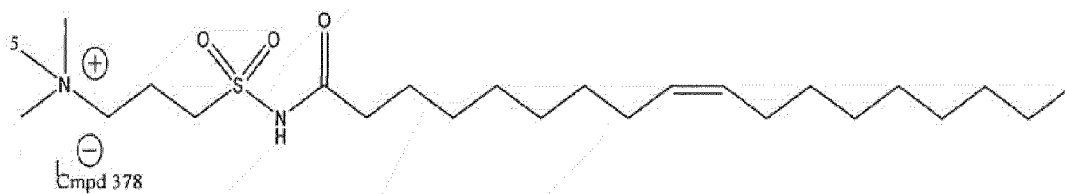
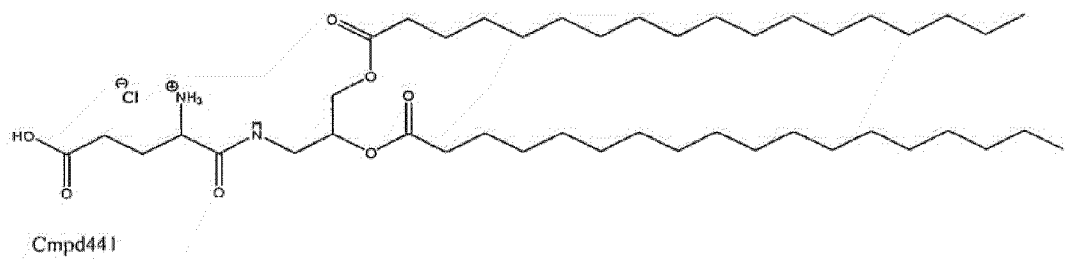
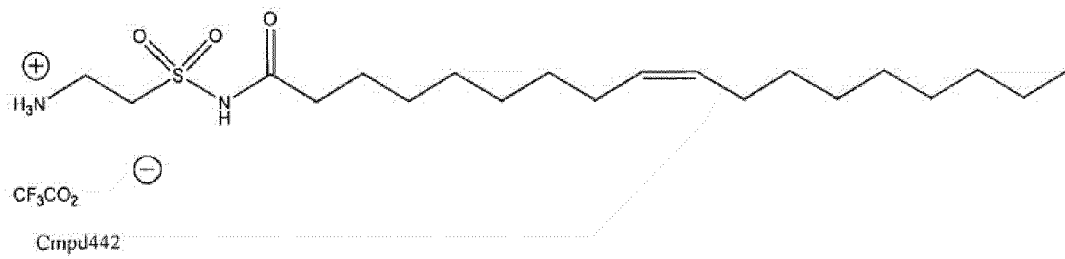
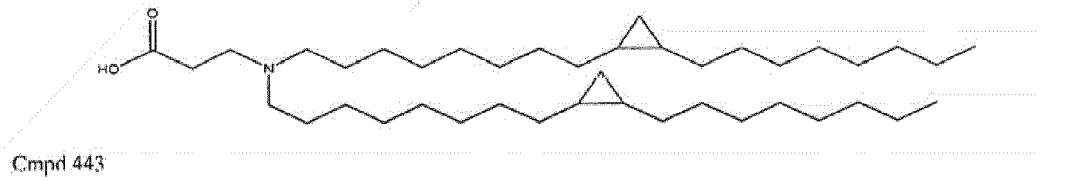
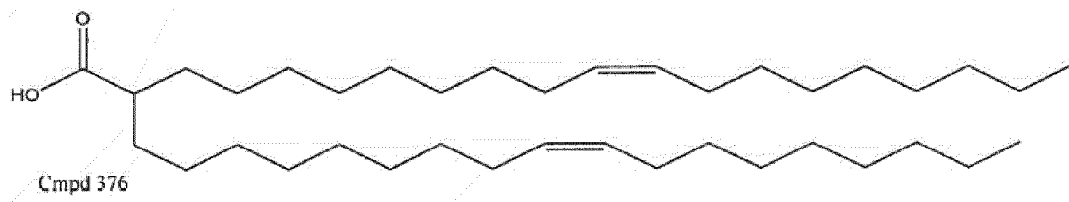
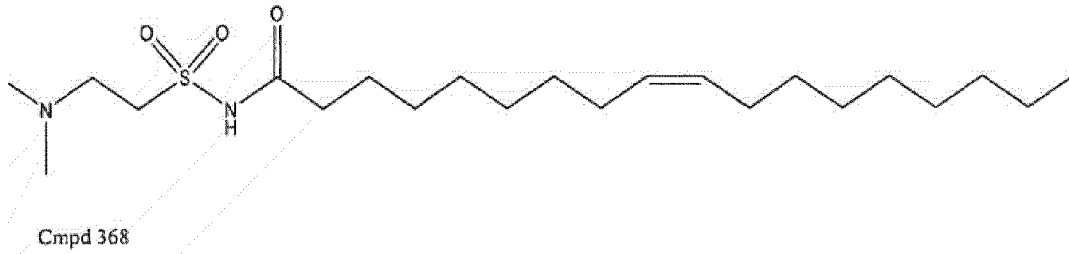
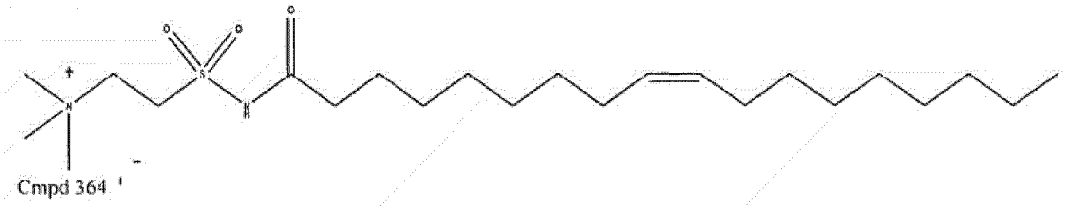
În FIG. 75, au fost măsurate nivelurile de IgM anti-PEG (ng/mL) la 96 de ore după a doua doză. Datele din acest grafic arată niveluri reduse de IgM anti-PEG generate pentru noile lipide PEG. Datele discutate mai sus arată că, clearance-ul sanguin accelerat nu a fost observat atunci când unele dintre noile lipide PEG au fost utilizate în formulările de LNP. Interesant, majoritatea grupurilor MC3 și-au menținut exprimarea, în timp ce majoritatea grupurilor Cmpd18 au crescut exprimarea pe parcursul studiului de 3 săptămâni. Dintre noile lipide PEG testate, Cmpd405, Cmpd396 și Cmpd403 au avut cele mai scăzute niveluri de IgM anti-PEG. În acest studiu, s-a observat, destul de surprinzător, la fel ca și în studiile descrise anterior, că Cmpd160, care diferă de DSPC doar printr-o grupare de metil din gruparea de cap, a fost, în esență, silențios imun atunci când a fost testat în LNP-uri administrate IV *in vivo*.

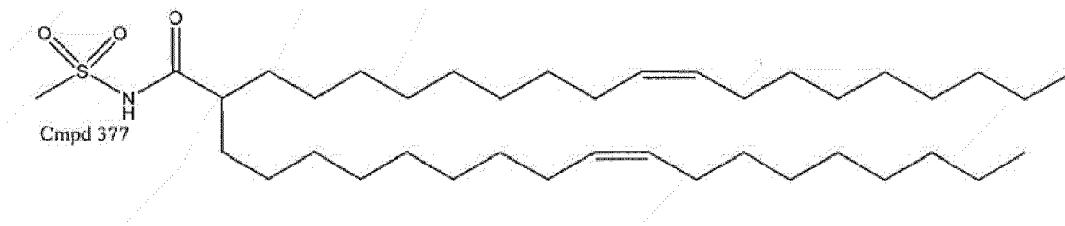
**Exemplul 28**

LNP-urile cuprinzând noi derivați de DSPC și/acid oleic au fost preparate și testate în ceea ce privește exprimarea luciferazei (luciferază codificată de ARNm modificat m1 ψ) și activarea celulelor B într-un studiu cu doză unică în raport cu formularea standard de DSPC. Analogii DSPC/oleici testați sunt prezentați în Tabelul 23 de mai jos.

Tabelul 23

Grup	Fosfolipidă (PL)	Formulare	Cale	Fregm de dozare	# de doze	# din femele	Nivel dozare (mg/kg)	Valori (ng)	Conc. sâc (mg/mL)	Vol. total (mL)	Masă totală (μg)
1	Cmpd442	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
2	Cmpd441	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
3	Cmpd443	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
4	Cmpd443	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
5	Cmpd444	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
6	Cmpd445	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
7	Cmpd446	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
8	Cmpd447	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
9	Cmpd448	MC3-PL:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
10	Oleic Acid	MC3-Oleic Acid:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
11	DSPC	MC3-DSPC:Chol:PEG-DMG; 50:10:38:3:1:5	V	Udată în Zua 1	5	5	0.5	0.1	0.1	0.7	0.07
12	PBS		V	Udată în Zua 1	5	5		0.1	0	0.42	0
13	Water				5	5					





Așa cum este prezentat în Tabelul 23, LNP-urile au fost administrate IV ca o singură doză la soareci. Datele sunt prezentate în FIG. 76 și 77. Expimarea Luc cu diferite formulări de LNP a fost evaluată printr-o măsurare a fluxului total (p/s) la 3, 6 și 9 ore după dozare, utilizând imagistica BLI a întregului corp (vezi FIG. 76). Procentul de celule B activate (CD86<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>) în celule splenice CD19<sup>+</sup> a fost de asemenea măsurat. Aceste frecvențe ale celulelor B activate sunt prezentate în FIG. 77.

În general, fluxul a crescut de la trei la șase ore, arătând o scădere a exprimării cu 24 de ore. Toate formulările testate au prezentat o exprimare apreciabilă a luciferazei *in vivo*, deși s-a observat o oarecare variabilitate în exprimare. % Celule B CD86<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> în celule CD19<sup>+</sup> splenice (limfocite B) din splină a fost de asemenea măsurată pentru formulările LNP ca indicator al activării celulelor B. Toate formulările testate au arătat activarea celulelor B la niveluri sub, și adesea semnificativ mai mici, decât formulările martor DSCP.

#### Exemplul 29

O doză repetată de ARNm de hEPO în LNP-uri care conțin Cmpd18 cu lipide PEG modificate a fost apoi efectuată la primate non-umane. Pe scurt, maimuțele cynomolgus au fost tratate cu ARNm încapsulat în LNP, administrat prin perfuzie intravenoasă (IV). LNP-urile care conțin acid oleic și Cmpd403 au fost analizate pentru a se determina efectul lor asupra clearance-ului accelerat al sângelui (ABC). În special, un obiectiv a fost acela de a se determina dacă înlocuirile DSPC și PEG-lipidice demonstrează o activare scăzută a celulelor B, IgM anti-PEG scăzut și menținerea exprimării proteinei la speciile superioare. Au fost comparate următoarele patru grupuri: MC3/DSPC/Chol/Cmpd422 (control), Cmpd18/DSPC/Chol/Cmpd422 (martor), Cmpd18/DSPC/Chol/Cmpd403 (grup testare), și Cmpd18/Acid oleic/Chol/Cmpd422 (grup testare). Maimuțelor li s-a administrat o doză săptămânală de ARNm de hEPO modificat cu pseudouridină (0,2 mg/kg) în LNP-urile de mai sus timp de 6 săptămâni.

Parametrii farmacocinetici incluzând AUC au fost determinați pentru combinațiile Cmpd 18: Cmpd 403. AUC constitutivă a fost monitorizată de-a lungul timpului de la niveluri la linia de bază ale complementului și citokinelor și s-au observat niveluri scăzute până la deloc de IgM.

Caracteristicile particulelor pentru fiecare dintre formulări sunt prezentate în Tabelul 24 de mai jos. ARNm-ul utilizat pentru acest studiu a fost ARNm modificat m 1 ψ care codifică EPO. Formulările includ componente la următorul % mol 50:10:38,5:1,5. Tabelul 24 prezintă dimensiunea, eficiența de încapsulare (EE) și indicele de polidispersie (PDI). Particulele au avut caracteristici în limite acceptabile pentru testarea *in vivo*.

Tabelul 24

Grup	Probă	Compoziție	Mt. Ig teoretic	mRNA	pH	Concentrație (mOsm/kg)
1	Std MC3	MC3: DSPC: Chol: Cmpd 427	50:10:38,5:1,5	hEPO modificat	7,30 2	307
2	Std Cmpd18	Cmpd18: DSPC: Chol: Cmpd427	50:10:38,5:1,5	hEPO modificat	7,45 3	307
3	Cmpd18: Oleic Acid	Cmpd18: Oleic Acid: Chol: Cmpd427	50:10:38,5:1,5	hEPO modificat	7,45 5	307
4	Cmpd18: Cmpd403	Cmpd18: DSPC: Chol: Cmpd403	50:10:38,5:1,5	hEPO modificat	7,44 6	306

Pe parcursul celor 6 săptămâni de experimentare, exprimarea proteinei hEPO, nivelurile de IgM și IgG anti-PEG, IgM, IgG și nivelurile de citokine și complement au fost măsurate pentru noile LNP-uri. FIG. 79 ilustrează exprimarea hEPO (ng/mL) la predoză, 2 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore și 72 de ore după administrarea IV o dată pe săptămână a formulărilor de ARNm hEPO - LNP în ziua 1, ziua 8, ziua 15, ziua 22, ziua 29, ziua 36 și ziua 43.

În FIG. 80, nivelurile de IgM anti-PEG (U/mL) au fost măsurate după administrarea IV o dată pe

săptămână a formulărilor hEPO ARNm - LNP în ziua 1, ziua 8, ziua 15, ziua 22, ziua 29, ziua 36 și ziua 43. FIG. 81 prezintă nivelurile de IgG anti-PEG (U/mL) măsurate după administrarea IV o dată pe săptămână a formulărilor hEPO ARNm - LNP în ziua 1, ziua 8, ziua 15, ziua 22, ziua 29, ziua 36 și ziua 43. Gruparea Cmpd403 a demonstrat menținerea exprimării proteinei pe parcursul celor 6 săptămâni, menținerea nivelurilor inițiale de IgM anti-PEG și IgG anti-PEG, fără activare a complementului și activare minimă a citokinelor. Nivelurile de IgM și IgG anti-PEG, complement și creșteri ale citokinelor par să se coreleze invers cu o pierdere a exprimării proteinei. Martorii MC3 și Cmpd18 și grupul cu acid oleic au prezentat toate o exprimare redusă a proteinei hEPO în săptămâna 6. Grupul cu acid oleic a demonstrat cele mai înalte niveluri dintre cele inițiale de producere de proteină. Martorii MC3 și Cmpd18 și grupurile Cmpd403 au prezentat niveluri similare de exprimare a hEPO. Cmpd18/DSPC la 0,2 mg/kg nu a prezentat o exprimare crescută a hEPO în comparație cu MC3/DSPC; cu toate acestea, Cmpd18/acid oleic a prezentat o exprimare crescută a proteinei (de 3 ori) în comparație cu MC3/DSPC și Cmpd18/DSPC. Tabelul 25 prezintă exprimarea hEPO măsurată prin AUC a celor patru grupuri de LNP. În special, AUC de hEPO (ng/mL\* h) a fost măsurată în fiecare săptămână a studiului de 6 săptămâni.

Tabelul 25

Zi	hEPO AUC (ng/mL* h)			
	MC3	Comp18	Comp403	Acid oleic
1	9134	4059	9861	31258
8	4754	6272	8554	31739
15	8031	4059	10922	17132
22	4951	6272	7562	44124
29	2607	9414	10822	21015
36	2824	17585	7870	6105
43	7491	14102	16622	689,3

Particulele formulate cu Cmpd18 ca amino lipidă cationică au depășit LNP-urile standard pe bază de MC3 în ceea ce privește exprimarea proteinei în timpul administrării repetate la primate. Acidul oleic ca înlocuitor al DSPC a condus la o exprimare inițială ridicată a proteinei, dar nu a ameliorat complet ABC-ul pe parcursul studiului. Compusul 403 ca înlocuitor de PEG-lipidă a condus la reducerea ABC-ului, așa cum este evidențiată prin menținerea AUC de hEPO pe parcursul studiului. Luată împreună, aceste date arată că ștergerea celulelor B conduce la absența ABC după 5 injecții. În special, o singură injecție cu anti CD20, cu 7 zile înainte de injectarea de LNP, a condus la (1) scăzute/fără IgM/IgG la PEG; (2) lipsa clearance-ului de ARN sau proteină; și (3) activarea scăzută/fără citokine/complement, făcând din aceasta un candidat atractiv pentru regimurile de co-administrare care includ ARNm-uri încapsulate în LNP.

FIG. 82 prezintă procentul de celule B activate (CD86<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) în CD 19<sup>+</sup> la pre-sângerare, ziua 1, ziua 22, ziua 43 și ziua 44 a studiului. Așa cum este prezentat în FIG. 82, toate grupurile cu LNP au demonstrat o activare scăzută a celulelor B. Aproape toți subiecții cărora li s-a administrat Cmpd 18/DSPC/Chol/Cmpd403 sau Cmpd18/Acid oleic/Chol/Cmpd422 au avut mai puțin de 5% activare a celulelor B în celule CD19<sup>+</sup> și au demonstrat un procent mediu de activare a celulelor B aproape de 2,5%, care s-a menținut pe parcursul studiului. Procentul de activare a monocitelor a fost de asemenea măsurat la pre-sângerare, ziua 1, ziua 22, ziua 43 și ziua 44 a studiului. Aceste rezultate sunt reflectate în FIG. 83. Toate grupurile cu LNP au demonstrat o activare scăzută a monocitelor și toți subiecții cărora li s-a administrat Cmpd18/DSPC/Chol/Cmpd403 sau Cmpd18/Acid oleic/Chol/Cmpd422 au păstrat o medie de mai puțin de 3% activare a monocitelor pe parcursul studiului.

#### Exemplul 30

Datele de mai sus arată că activarea celulelor B este un contribuitor cheie la fenomenul ABC în acizii nucleici încapsulați în LNP administrați la animale, de exemplu, ARNm-uri. Studiile din stadiul tehnicii au încercat să atenueze fenomenul ABC cu unii compuși precum dexametazonă și/sau corticosteroizi. Prezenții inventatori au oferit o înțelegere mecanică detaliată a fenomenului ABC, în special în ceea ce privește administrarea ARNm încapsulat în LNP. LNP-urile au interacționat cu celule multiple *in vivo* care s-a demonstrat că, produc efectul de ABC. Injectarea IV de LNP conduce la creșterea secreției de IgM anti PC (IgM naturală) și la dezvoltarea indusă a răspunsului IgM anti-PEG.



Mai mult, injectarea IV repetată de LNP conduce la creșterea nivelurilor de IgM naturală. Un nod cheie pare a fi splina și susține în mare măsură ipoteza că ABC este condusă de funcția celulei B1. Aceste celule sunt responsabile de secretarea "IgM-urilor naturale" (de exemplu, celulele B1a), dar celulele B1b pot produce și IgG atunci când sunt stimulate. Aceste imunoglobuline recunosc PEG, fosfolipide și, cel mai probabil, domenii de colesterol, prezente pe suprafața LNP-urilor. Se arată aici că IgM naturale recunosc probabil un motiv PC prezent pe suprafața LNP standard (de exemplu, LNP-uri care conțin DSFC).

Injectarea IV de LNP conduce la activarea rapidă a celulelor B1a, rezultând o secreție crescută de IgM anti-PC (IgM naturală) și injectia IV repetată de LNP conduce la creșterea nivelului de IgM natural. Îndepărtarea splinei previne activarea celulelor B (în special B1) care probabil contribuie în mare măsură la ABC. În particular, animalele splenectomizate prezintă (1) IgM/IgG scăzute/lipsă la PEG; (2) lipsa clearance-ului de ARN sau proteine; și (3) activare scăzută/lipsă a citokinelor/complementului. Pe baza mecanismelor și a tipurilor de celule implicate aici în efectul ABC, prezenții inventatori au emis ipoteza că anumite regimuri de co-administrare țintite pentru celulele B ar putea fi utile pentru tratamentul subiecților cu ARNm încapsulat în LNP, în special, acolo unde este necesară repetarea dozării cronice pentru indicele terapeutic dorit.

Un studiu cu doze repetate de ARNm de hEPO prin perfuzie IV cu administrare concomitentă a fost efectuat la maimuțe cynomolgus. Maimuțelor li s-a administrat ARNm hEPO în MC3-LNP-uri conform proiectului experimental prezentat în Tabelul 26 și li s-a co-administrat unul dintre rituximab, idealalisib, fostamatinib sau fingoimod conform regimului prezentat în Tabelul 27.

Tabelul 26

Grup No.	Material de test	Nivel doză (mg/kg)	Comedi.	Volum doză (ml/kg)	Curr. doză (mg/ml)	Nr. de masculi
1	hEPO mRNA în MC3	0.1	N/A	10	0.01	4
2	hEPO mRNA în MC3	0.1	rituximab	10	0.01	4
3	hEPO mRNA în MC3	0.1	idealalisib	10	0.01	4
4	hEPO mRNA în MC3	0.1	fostamatinib	10	0.01	4
5	hEPO mRNA în MC3	0.1	fingoimod	10	0.01	4

Tabelul 27

Comedi.	Cale	Nivel doză (mg/kg/week)	Vol. doză (ml/kg)	Conc. doză (mg/ml)	Num. doză (ml/kg)	Regim
rituximab	IV intravenos	10	2	10	3	0 doză pe Zi 1
idealalisib	PO în capsule	1	N/A	N/A	N/A	0 doză pe Zi 1 0.1 mg/kg/week (0.1 mg/kg/week) on Day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
fostamatinib	PO în capsule	1	N/A	N/A	N/A	0 doză pe Zi 1 0.1 mg/kg/week (0.1 mg/kg/week) on Day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
fingoimod	PO în capsule 100	0.5	N/A	N/A	N/A	0 doză pe Zi 1 0.5 mg/kg/week (0.5 mg/kg/week) on Day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29

01 = 0.1 mg/kg/week; 10 = 10 mg/kg/week; N/A = nu se aplică

Datele experimentale sunt prezentate în FIG. 84A-90. FIG. 84A și 84B prezintă exprimarea EPO după prima injecție și după a cincea injecție. În special, concentrația de EPO (ng/mL) a fost măsurată la 2 ore, 6 ore, 12 ore, 24 ore și 48 de ore după prima injecție și a cincea injecție. FIG. 85A-85E prezintă exprimarea EPO pentru fiecare dintre comedițiile în ziua 1 și ziua 29 a studiului. În particular, concentrația de EPO (ng/mL) a fost măsurată în ziua 1 și ziua 29 la 2 ore, 6 ore, 12 ore, 24 de ore și 48 de ore pentru fiecare grup de co-mediție. Au fost măsurate de asemenea și populațiile de celule imune. Specific, procentul de celule B (FIG. 86A), celule B1a (FIG. 86B) și monocite (FIG. 86C) în PBMC a fost măsurat pentru fiecare grup de co-mediție în ziua -7, la 24 de ore după prima injecție și 24 de ore după a cincea injecție. Activarea celulelor B este reflectată în FIG. 87. Procentul de celule B activate în celulele B circulante a fost măsurat pentru fiecare grup de co-mediție în ziua -7, la 24 de ore după prima injecție și la 24 de ore după a cincea injecție.

În grupul martor, procentul de celule B activate a crescut la 24 de ore după prima injecție și din nou la 24 de ore după a cincea injecție, arătând astfel că mai multă injecție de LNP duce la o activare mai

mare a celulelor B. Procentul de celule B activate a fost redus drastic în grupul cu rituximab la 24 de ore după prima injecție, datorită faptului că celulele B au fost șterse la subiecții acestui grup. Epuizarea celulelor B s-a corelat cu reducerea IgM și IgG anti-PEG, chiar și în ziua 34 (post a 5-a injecție). Epuizarea celulelor B s-a corelat, de asemenea, bine cu menținerea exprimării proteinei. În special, epuizarea celulelor B a dus la pierderea exprimării după 5 injecții, indicând că nu a existat ABC și epuizarea celulelor B a furnizat în continuare niciun răspuns anti PEG. Activarea celulelor B nu a fost observată în grupul idelalisib și frecvențele celulelor B au fost ușor reduse (vezi FIG. 86A). Grupurile fostamatinib și fingolimod au prezentat o activare normală a celulelor B similară cu cea a grupului martor. În ceea ce privește celulele B1a, frecvențele celulelor B1a au fost normale înainte de injecție în toate grupurile de co-medicație (vezi FIG. 86B). Cu excepția grupului de rituximab, în care frecvențele celulelor B1a au scăzut ușor, toate grupurile de co-medicație au afișat frecvențe crescute ale celulelor B1a după injecția LNP, ceea ce înseamnă că injecția LNP duce la activarea și proliferarea B1a.

Activarea monocitelor este reflectată în FIG. 88. Procentul de monocite/macrofage activate în PBMC circulante a fost măsurat pentru fiecare grup de co-medicație în ziua -7, la 24 de ore după prima injecție și la 24 de ore după a cincea injecție. După cum este prezentat în FIG. 86C, frecvențele monocitelor au fost normale în toate grupurile de co-medicație, cu excepția fingolimodului, unde a fost observată o scădere semnificativă. O creștere a procentului de monocite/macrofage activate după injecție a fost observată numai în grupul tratat cu fingolimod. Deoarece frecvența monocitelor din grupul fingolimod a scăzut semnificativ după injecție, datele sugerează activarea monocitelor înainte de apoptoză.

FIG. 89A și 89B arată răspunsul anti-PEG. Nivelurile de IgM anti-PEG (U/mL) (FIG. 89A) și nivelurile de IgG anti-PEG (U/mL) (FIG. 89B) au fost măsurate pentru fiecare grup de co-medicație la momentul inițial, ziua 9 după prima injecție și ziua 34 după a cincea injecție.

#### **Exemplul 31**

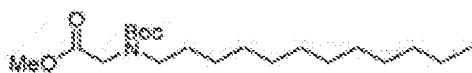
Pentru a studia în continuare rolul IgM în fenomenul ABC, ARNm încapsulat în LNP care codifică EPO a fost administrat la șoareci de control și la care lipsește IgM secretat (șoareci sIgM-/-). FIG. 78 arată impactul eliminării IgM circulante asupra exprimării EPO pe parcursul studiului de 6 săptămâni. În special, concentrația de EPO (ng/mL) a fost măsurată la pre-sângereare, 6 ore și 24 de ore, la fiecare dintre cele 6 săptămâni. În cele două grupuri de martor negativ, c57Bl6J/PBS și sIgM-/-PBS, nivelurile de EPO au rămas la valoarea la linia de bază pe tot parcursul studiului, în timp ce în grupurile de tratament cu ARNm, concentrațiile de EPO au atins vârful la 6 ore după doză și apoi au scăzut înapoi la valoarea de la linia de bază la două săptămâni după administrarea de ARNm. Este de reținut că, în săptămâna 1, concentrația de EPO a fost aproximativ aceeași la șoarecii c57Bl6J și la șoarecii sIgM-/- la momentul de timp de 6 ore (exprimare maximă după doză). Cu toate acestea, de-a lungul timpului experimentului, a fost observat fenomenul ABC, așa cum este evidențiat de scăderea AUC pentru exprimarea EPO la șoarecii c57Bl6J. Prin contrast, șoarecii sIgM-/- au produs constant niveluri ridicate de EPO după fiecare administrare repetată de ARNm încapsulat în LNP pe toată durata experimentului. Astfel, în absența IgM circulant, nu s-a observat nicio pierdere a exprimării chiar și după cinci injecții de ARNm care evidențiază o lipsă completă de ABC.

FIG. 90 demonstrează în plus importanța IgM anti-PEG în fenomenul ABC. FIG. 90A-90B sunt două grafice care arată nivelurile de IgM anti-PEG (U/mL) și nivelurile de EPO (ng/mL) în două dintre grupurile din FIG. 78: C57Bl6J (FIG. 90A) și șoareci sIgM-/- (FIG. 90B). Nivelurile de IgM anti-PEG sunt reprezentate grafic ca cercuri gri deschis în FIG. 90A și o creștere a IgM anti-PEG se corelează cu debutul ABC. La șoarecii sIgM-/- acest lucru este arătat de cercuri negre care rămân la linia de bază (FIG. 90B). Concentrațiile de EPO sunt indicate prin cercuri negre (FIG. 90A) și pătrate negre (FIG. 90B). Datele demonstrează clar corelația inversă dintre exprimarea proteinei și nivelurile de IgM anti-PEG. Când nivelurile de IgM sunt ridicate, exprimarea EPO este suprimată, ceea ce indică apariția ABC. Când nivelurile de IgM sunt suprimate, de exemplu la șoarecii knockout, exprimarea EPO este îmbunătățită semnificativ și ABC este redus. Astfel, în absența IgM circulant, nu s-a observat nicio pierdere de exprimare (fără ABC) corelând cu absența unui răspuns anti-PEG.

#### **Exemplul 32**

Urmează un exemplu de sinteză a compusului:

**Compusul 393: N-(2-(Didodecilamino)etil)-N-dodecilglicină  
N-(terț-butoxicarbonil)-N-dodecilglicinat de metil**



Formulă Chimică:  $C_{30}H_{59}NO_4$

Greutate Moleculară: 357,54

O soluție, la 0 °C, de ester metilic de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)glicină (7,7 g, 40,7 mmol) în DMF (100 mL) s-a tratat cu NaH (60%, 1,71 g, 42,7 mmol) și amestecul a fost lăsat să se agite timp de 30 minute. Soluția a fost lăsată să revină la temperatura camerei înainte de a se adăuga 1-bromododecan (15,2 g, 61,0 mmol) și reacția a fost lăsată să se agite peste noapte. Reacția s-a stins cu apă și s-a extras cu EtOAc. Organicele s-au spălat cu saramură, s-au uscat pe  $Na_2SO_4$  anhidru, s-au filtrat, și s-au concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-20% EtOAc/hexani) a furnizat *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-dodecylglicinat de metil (4,03 g, 28%).  
 $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 4,01-3,84 (br. m, 2H); 3,75 (s, 3H); 3,27 (br. m, 2H); 1,67-1,39 (br. m, 11H); 1,28 (br, 18H); 0,90 (t, 3H).

#### Dodecylglicinat de metil

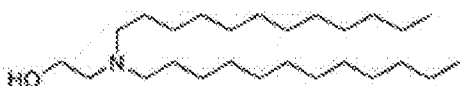


Formulă Chimică:  $C_{13}H_{27}NO_2$

Greutate Moleculară: 257,42

La o soluție, la 0 °C, de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*-dodecylglicinat de metil (4,03 g, 11,3 mmol) în DCM (17 mL) s-a adăugat, în picături, TFA (17 mL, 226 mmol). Reacția a fost lăsată să revină la temperatura camerei și s-a agitat timp de 6 ore. Amestecul de reacție s-a concentrat *in vid* și materialul brut s-a dizolvat în DCM. Soluția s-a spălat cu 10% NaOH, saramură, s-a uscat pe  $Na_2SO_4$  anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat *in vid* pentru a da dodecylglicinat de metil (2,84 g, 98%).  
 $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 3,75 (s, 3H); 3,44 (s, 2H); 2,62 (t, 2H); 1,70 (br, 1H); 1,51 (m, 2H); 1,29 (br, 18H); 0,90 (t, 3H).

#### 2-(Didodecylamino)etan-1-ol



Formulă Chimică:  $C_{26}H_{55}NO$

Greutate Moleculară: 397,73

La o soluție de 1-bromododecan (10 g, 40,1 mmol) în MeCN (84 mL) s-a adăugat etanolamină (1,10 mL, 18,2 mmol),  $K_2CO_3$  (11,1 g, 80,1 mmol), și KI (302 mg, 1,82 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la 82 °C timp de 48 ore. Amestecul de reacție s-a răcit la temperatura camerei, s-a filtrat, și solidele s-au spălat cu hexani. Filtratul s-a extras cu hexani, și extractele combinate s-au concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) a furnizat 2-(didodecylamino)etan-1-ol (3,87 g, 53%).

UPLC/ELSD: RT = 2,69 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 398,56 pentru  $C_{26}H_{55}NO$

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 3,57 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,49 (br. m, 4H); 1,48 (br. m, 4H); 1,29 (br, 36H); 0,91 (t, 6H).

#### *N*-(2-Cloroetil)-*N*-dodecylidodecan-1-amină



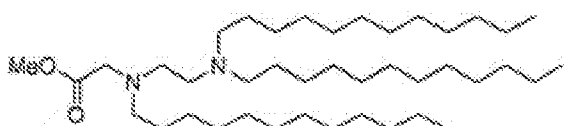
Formula Chimică:  $C_{26}H_{54}ClN$

Greutate Moleculară: 416,18

- 5 La o soluție, la 0 °C, de 2-(didodecilamino)etan-1-ol (3,87 g, 9,73 mmol) și trietilamină (1,76 mL, 12,6 mmol) în DCM (50 mL) s-a adăugat în picături o soluție de clorură de metansulfonil (0,941 mL, 12,2 mmol) în DCM (5 mL). Reacția a fost lăsată să revină la temperatura camerei și s-a agitat timp de 16 ore. Amestecul s-a stins prin adăugarea de apă și s-a extras cu DCM. Stratul organic s-a spălat cu NaHCO saturat 3, saramură, s-a uscat pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat *in vid*. Purificarea prin
- 10 cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-10% EtOAc/hexani) a furnizat *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-amină (1,92 g, 47%).  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,51 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,47 (br. m, 4H); 1,44 (br. m, 4H); 1,28 (br, 36H); 0,90 (t, 6H).

*N*-(2-(didodecilamino)etil)-*N*-dodecilglicinat de metil

15



Formula Chimică:  $C_{41}H_{84}N_2O_2$

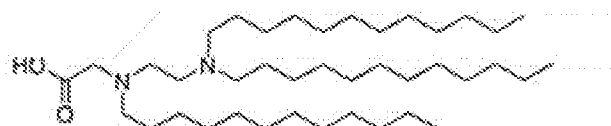
Greutate Moleculară: 637,14

- 20 La o soluție de dodecilglicinat de metil (425 mg, 1,65 mmol) în MeCN (10 mL) s-a adăugat *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-amină (825 mg, 1,98 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (457 mg, 3,30 mmol), și KI (27 mg, 0,165 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la 82 °C timp de 72 ore. Amestecul de reacție s-a filtrat și solidele s-au spălat cu hexani. Filtratul s-a concentrat *in vid* pentru a da produsul brut. Purificarea prin
- 25 cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) a furnizat *N*-(2-(didodecilamino)etil)-*N*-dodecilglicinat de metil (652 mg, 62%).  
 UPLC/ELSD: RT = 3,77 min. MS (ES): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 638,18 pentru C<sub>41</sub>H<sub>84</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,72 (s, 3H); 3,41 (s, 2H); 2,90-2,20 (br. m, 10H); 1,60-1,00 (br. m, 60H); 0,90 (t, 9H).

*N*-(2-(Didodecilamino)etil)-*N*-dodecilglicină

30

### Compusul 393



Formula Chimică:  $C_{40}H_{82}N_2O_2$

Greutate Moleculară: 623,11

35

- O soluție de *N*-(2-(didodecilamino)etil)-*N*-dodecilglicinat de metil (652 mg, 1,02 mmol) în THF (6 mL) și LiOH 1M (5 mL, 5 mmol) a fost lăsat să se agite la 65 °C timp de 16 ore. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și s-a acidulat cu HCl 10%. Amestecul s-a extras cu cloroform, și organicele s-au spălat cu saramură, s-au uscat pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidru, s-au filtrat, și s-au concentrat *in vid*. Purificarea prin
- 40 cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) a furnizat *N*-(2-(didodecilamino)etil)-*N*-dodecilglicină (153 mg, 24%).

UPLC/ELSD: RT = 3,60 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 624,07 pentru  $C_{40}H_{82}N_2O_2$

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 4,02-3,40 (br. m, 6H); 3,16 (br, 6H); 1,78 (br, 6H); 1,46-1,01 (br. m, 54H); 0,90 (t, 9H).

Compusul 125 Acid: 3-((8-(heptadecan-9-iloxi)-8-oxooctil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)propanoic

5

### Heptadecan-9-il 8-bromooctanoate



Formulă Chimică:  $C_{25}H_{48}BrO_2$

Greutate Moleculară: 461,57

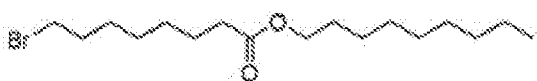
10

La o soluție de acid 8-bromooctanoic (1,04 g, 4,6 mmol) și heptadecan-9-ol (1,5 g, 5,8 mmol) în diclorometan (20 mL) s-a adăugat clorhidrat de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimidă (1,1 g, 5,8 mmol), *N,N*-diizopropiletilamină (3,3 mL, 18,7 mmol) și DMAP (114 mg, 0,9 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la rt timp de 18 h. Reacția s-a diluat cu diclorometan și s-a spălat cu bicarbonat de sodiu saturat. Stratul organic s-a separat și s-a spălat cu saramură, și s-a uscat pe  $MgSO_4$ . Stratul organic s-a filtrat și s-a evaporat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-10% acetat de etil în hexani) pentru a se obține heptadecan-9-il 8-bromooctanoate (875 mg, 1,9 mmol, 41%).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 4,89 (m, 1H); 3,42 (m, 2H); 2,31 (m, 2H); 1,89 (m, 2H); 1,73-1,18 (br. m, 36H); 0,88 (m, 6H).

15

20

### Nonil 8-bromooctanoate



Formulă Chimică:  $C_{17}H_{33}BrO_2$

Greutate Moleculară: 349,35

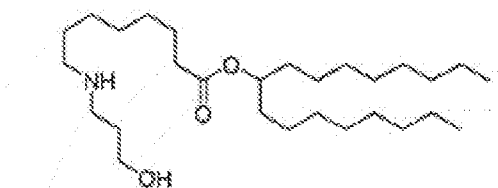
25

La o soluție de 8-bromooctanoic acid (5 g, 22 mmol) și nonan-1-ol (6,46 g, 45 mmol) în diclorometan (100 mL) s-au adăugat clorhidrat de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimidă (4,3 g, 22 mmol) și DMAP (547 mg, 4,5 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la rt for 18 h. Reacția s-a diluat cu diclorometan și s-a spălat cu bicarbonat de sodiu saturat. Stratul organic s-a separat și s-a spălat cu saramură, s-a uscat pe  $MgSO_4$ . Stratul organic s-a filtrat și s-a evaporat sub vid. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-10% acetat de etil în hexani) pentru a se obține 8-bromooctanoat de nonil (6,1 g, 17 mmol, 77%).  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 4,06 (t, 2H); 3,40 (t, 2H); 2,29 (t, 2H); 1,85 (m, 2H); 1,72-0,97 (m, 22H); 0,88 (m, 3H).

30

35

### 8-((3-Hidroxiopropil)amino)octanoat de heptadecan-9-il



Formulă Chimică:  $C_{28}H_{57}NO_3$

Greutate Moleculară: 455,77

40

O soluție de 8,87 g (19,2 mmol) 8-bromo-octanoat de heptadecan-9-il și 29 mL (384 mmol) 3-aminopropanol în 250 mL etanol s-a încălzit la 50 °C și s-a agitat timp de 20 ore, după care nu a mai rămas bromură inițială, prin LC/MS. Soluția a fost lăsată să se răcească la temp camerei, conc, și reziduu

5

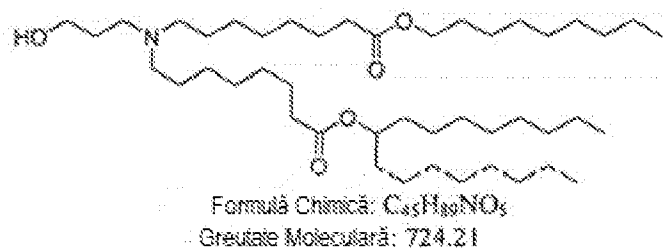
s-a dizolvat în DCM. Soluția s-a spălat de două ori cu o soluție apoasă 5% de bicarbonat de sodiu, s-au uscat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), s-au filtrat și filtratul s-a conc. la un ulei incolor. Acesta a fost cromatografiat pe silice cu 100% DCM mergând la 10% DCM/90% 80:20:1 DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH pentru a da 8-((3-hidroxi

10

propil)amino)octanoat de heptadecan-9-il (7,98 g, 17,5 mmol, 91%) ca un ulei incolor. UPLC/ELSD: RT= 2,52 min. MS (ES): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 456,8 pentru C<sub>28</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>3</sub>.  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 4,86 (chint, 1H, *J* = 6 Hz); 3,81 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 2,88 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 2,60 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 2,44 (br. s, 1H); 2,27 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 1,70 (m, 2H); 1,61 (m, 2H); 1,49 (m, 6H); 1,25 (br. m, 31H); 0,88 (t, 6H, *J* = 7,5 Hz).

#### 8-((3-Hidroxi)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoat de heptadecan-9-il

15



20

La un amestec de 7,98 g (17,5 mmol) 8-((3-hidroxi)propil)amino)octanoat de heptadecan-9-il și 6,12 g (17,5 mmol) 8-bromo-octanoat de nonil în 100 mL acetonitril anhidru sub azot uscat s-au adăugat 3,2 g (19,3 mmol) iodură de potasiu urmată de 9,7 g (70 mmol) carbonat de potasiu și amestecul s-a diluat cu 25 mL eter ciclopentil metilic anhidru. Amestecul alb rezultat s-a încălzit la 90 °C și s-a agitat timp de 28 ore, apoi a fost lăsat să se răcească la temp camerei, s-a filtrat, solidele filtrate s-au spălat cu DCM și filtratul s-a conc. Reziduu

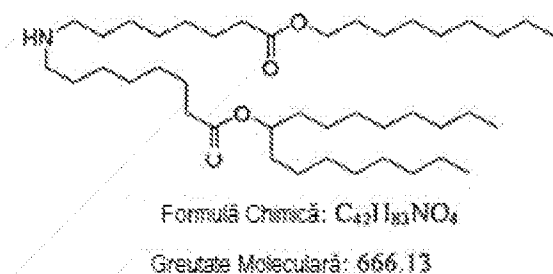
25

s-a partiționat între o soluție apoasă 5% de bicarbonat de sodiu și DCM, fazele s-au separat și faza apoasă s-a extras de două ori cu DCM. Organicele s-au combinat, s-au uscat (MgSO<sub>4</sub>), s-au filtrat și filtratul s-a conc. la un ulei galben. Acesta a fost cromatografiat pe silice cu 100% DCM mergând la 50% DCM/50% 80:20:1 DCM:MeOH:NH<sub>4</sub>OH pentru a da 8-((3-hidroxi)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoat de heptadecan-9-il (10,14 g, 14 mmol, 80%) ca un ulei galben pal. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 4,86 (p, 1H); 4,05 (t, 2H); 3,80 (m, 2H); 2,92-2,36 (br. m, 5H); 2,29 (m, 4H); 1,89-1,42 (br. m, 16H); 1,42-1,02 (br. m, 50H); 0,88 (m, 9H). UPLC/ELSD: RT = 4,51 min. MS (ES): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 725,19 pentru C<sub>45</sub>H<sub>89</sub>NO<sub>5</sub>.

30

#### 8-((8-(Noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoat de heptadecan-9-il

35



40

La -78 °C, La o soluție de clorură de oxalil (0,25 mL, 3,0 mmol) în 3 mL diclorometan s-a adăugat în picături o soluție de DMSO (0,43 mL, 6,0 mmol) în 2 mL diclorometan, și apoi o soluție de 8-((3-hidroxi)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoat de heptadecan-9-il (1,45 g, 2,0 mmol) în diclorometan (10 mL) s-a adăugat imediat. După aceasta s-a agitat timp de 30 min la această temperatură, s-a adăugat trietilamină (1,45 mL, 10,4 mmol) și amestecul de reacție s-a încălzit la temperatura camerei. TLC și MS au arătat că reacția s-a terminat (M+1: 722,7), și amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a

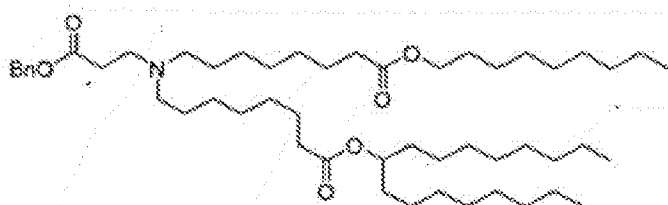
extras cu hexani (2X). Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură. După uscarea pe sulfat de sodiu, filtratul s-a concentrat și reziduul s-a purificat prin ISCO (SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani/0,5% Et<sub>3</sub>N 0 la 50%) pentru a se obține produsul ca un ulei maroniu (810 mg, 61%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 4,85 (p, 1H, J = 6,0 Hz); 4,05 (t, 2H, J = 6,9 Hz); 2,56 (t, 4H, J = 7,1 Hz); 2,31-2,24 (m, 4H); 1,67-1,19 (m, 63H); 0,87 (m, 9H).

MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 666,7.

#### 8-((3-(Benziloxi)-3-oxopropil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoat de heptadecan-9-il

10



Formula Chimică: C<sub>52</sub>H<sub>93</sub>NO<sub>5</sub>

Greutate Moleculară: 828,32

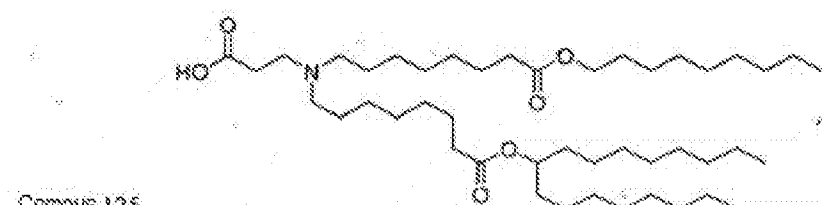
O soluție de 8-((8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoat de heptadecan-9-il (798 mg, 1,2 mmol) și acrilat de benzil (293 mg, 1,8 mmol) în diclorometan (20 mL) s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC și MS au arătat că nu a avut loc aproape nicio reacție, s-au adăugat 10 mL MeOH și amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. MS a arătat produsul cu o cantitate mică de ester metilic (M+1: 829,8, 752,7): Amestecul de reacție s-a concentrat la sec și s-a purificat prin ISCO (SiO<sub>2</sub>: EtOAc/hexani 0 la 35%) pentru a se obține produsul ca un ulei incolor (280 mg, 28%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,36-7,32 (m, 5H); 5,10 (s, 2H); 4,85 (p, 1H, J = 6,0 Hz); 4,04 (t, 2H, J = 6,9 Hz); 2,78 (t, 2H, J = 6,9 Hz); 2,46 (t, 2H, J = 7,0 Hz); 2,36 (t, 4H, J = 6,9 Hz); 2,30-2,24 (m, 4H); 1,67-1,19 (m, 62H); 0,87 (m, 9H).

MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 829,8.

#### Acid 3-((8-(heptadecan-9-iloxi)-8-oxooctil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)propanoic

25



Compus 125

Formula Chimică: C<sub>43</sub>H<sub>87</sub>NO<sub>5</sub>

Greutate Moleculară: 738,19

Un amestec de 8-((3-(benziloxi)-3-oxopropil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoat de heptadecan-9-il (280 mg, 0,34 mmol) și Pd/C (10%, 28 mg) în 20 mL EtOAc s-a agitat sub balon de hidrogen timp de 1 h. MS a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a filtrat și filtratul s-a concentrat. Reziduul s-a purificat prin ISCO (SiO<sub>2</sub>: MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0 la 10%) pentru a se obține produsul ca un ulei incolor (230 mg, 91%).

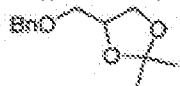
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 4,85 (p, 1H, J = 6,0 Hz); 4,04 (t, 2H, J = 6,6 Hz); 2,85 (t, 2H, J = 6,0 Hz); 2,65 (t, 4H, J = 7,7 Hz); 2,48 (t, 2H, J = 6,0 Hz); 2,32-2,24 (m, 4H); 1,67-1,17 (m, 63H); 0,87 (m, 9H). LC/UV (214 nm): RT = 12,38 min.

MS (APCI): *m/z* (MW<sup>+</sup>) 838,7.

#### Compusul 154 Dipalmitat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil

40

4-((Benziloxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan (Ref: EP1916255 A2, Pg 29)



Formulă Chimică:  $C_{13}H_{18}O_3$

Greutate Moleculară: 222,28

5

La 0 °C, la un amestec de NaH (60%, 4,4 g, 0,11 moli) în THF/DMF (25 mL/120 mL), s-a adăugat, în picături, o soluție de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanol (13,2 g, 0,1 moli) în THF/DMF (25 mL/25 mL). După adăugare, amestecul s-a agitat timp de 1 h, și apoi s-a adăugat clorură de benzil (12,6 mL, 0,11 moli). Amestecul s-a încălzit până la temperatura camerei și s-a agitat timp de 16 h. După

10

terminarea confirmată prin TLC, reacția s-a stins cu clorură de amoniu saturată (300 mL) și s-a extras cu eter (2X 300 mL). Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea în vid, s-a obținut 4-((benziloxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan ca un ulei

15

maroniu (23,3 g, cant.) care s-a utilizat pentru etapa următoare fără altă purificare.  
 $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,25-7,41 (m, 5H), 4,52-4,61 (m, 2H), 4,25-4,34 (m, 1H), 4,02-4,08 (m, 1H), 3,71-3,78 (m, 1H), 3,43-3,58 (m, 2H), 1,41 (s, 3H), 1,35 (s, 3H).

3-(Benziloxi)propan-1,2-diol (Ref: EP1916255 A2, Pg 30)



Formulă Chimică:  $C_{13}H_{16}O_3$

Greutate Moleculară: 182,22

20

La o soluție de 4-((benziloxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan (23,3 g, 0,1 moli) în 150 mL MeOH, s-a adăugat 1 N HCl (40 mL), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După terminarea confirmată prin TLC, amestecul de reacție s-a neutralizat cu bicarbonat de sodiu saturat la pH = 7, și s-a extras cu diclorometan (4 X 300 mL). Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat cu sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea în vid, produsul brut s-a purificat cu ISCO (330 g

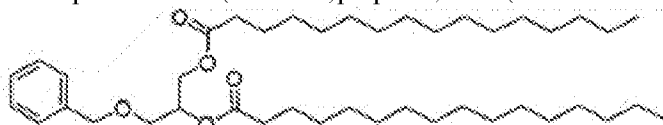
25

$\text{SiO}_2$ : EtOAc/Hexani 0 la 100%) pentru a se obține 3-(benziloxi)propan-1,2-diol ca un ulei galben deschis (13,39 g, 73%).

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,25-7,38 (m, 5H), 4,55 (s, 2H), 3,54-3,75 (m, 4H), 3,85-3,95 (m, 1H), 2,62 (t, 1H,  $J = 4,7$  Hz), 2,12 (m, 1H).

30

Dipalmitat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil (Ref: EP1916255 A2, Pg 30)



Formulă Chimică:  $C_{42}H_{76}O_8$

Greutate Moleculară: 659,05

35

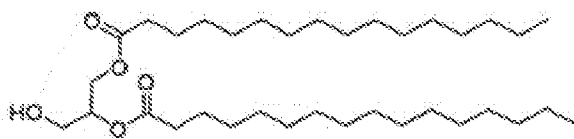
Un amestec de 3-(benziloxi)propan-1,2-diol (7,57 g, 41,5 mmol), acid palmitic (21,3 g, 83 mmol), EDCI (17,5 g, 91,4 mmol) și DMAP (1,02 g, 8,3 mmol) în 150 mL diclorometan s-a agitat la temperatura camerei timp de 48 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă, s-a extras cu diclorometan (2 X 500 mL), și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, produsul brut s-a purificat prin dizolvarea în hexani și filtrarea printr-un dop de silicagel, și apoi s-a eluat cu EtOAc/Hexani 0 la 20% pentru a da dipalmitat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil ca un ulei incolor (21,0 g, 76%).

40

$^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,27-7,33 (m, 5H), 5,31-5,36 (m, 1H), 5,29 (s, 2H), 5,21-5,26 (m, 1H), 4,53 (dd, 2H,  $J = 12,3$  Hz, 15,8 Hz), 4,33 (dd, 1H,  $J = 11,8$  Hz, 3,8 Hz), 4,18 (dt, 1H,  $J = 12,0$  Hz, 6,4 Hz), 3,58 (d, 2H,  $J = 5,2$  Hz), 2,24-2,33 (m, 4H), 1,95-2,02 (m, 2H), 1,55-1,63 (w, 3H), 1,24 (bs, 44H), 0,87 (t, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

**Dipalmitat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil**





Formulă Chimică:  $C_{35}H_{68}O_5$

Greutate Moleculară: 668,97

5

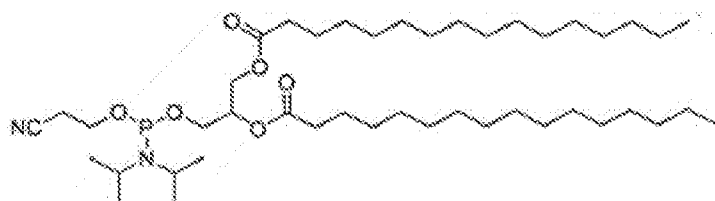
Un amestec de dipalmitat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil (5,14 g, 7,8 mmol) și Pd/C (5%, Degaussa E10002U/W, Aldrich 330124, 514 mg) în 100 mL EtOAc s-a purjat cu azot și hidrogen 3 ori, respectiv, și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei cu balon timp de 16 h. Suspensia s-a filtrat prin Celită, s-a spălat cu diclorometan (300 mL). După concentrarea sub vid, reziduu s-a purificat cu ISCO (80 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani 0 la 40% pentru a da dipalmitat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil ca un solid alb (3,17 g, 71%).

10

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,07 (*pent*, 1H, *J* = 5,2 Hz), 4,27 (*ddd*, 2H, *J* = 4,4 Hz, 11,9 Hz, 24,9 Hz), 3,72 (*t*, 2H, *J* = 4,9 Hz), 2,33 (*q*, 4H, *J* = 7,1 Hz), 1,99 (*t*, 1H, *J* = 6,6 Hz), 1,56-1,66 (*m*, 4H), 1,24 (*bs*, 48H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,8 Hz).

15

**Pasul 5: Dipalmitat de 3-((2-Cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil**



Formulă Chimică:  $C_{64}H_{112}N_2O_{10}P$

Greutate Moleculară: 769,15

20

La o soluție de dipalmitat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (2,70 g, 4,75 mmol) și tetrazol (0,45 M în MeCN, 21 mL, 9,490 mmol) în 80 mL diclorometan, s-a adăugat în picături o soluție de 3-((cloro)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propanenitril (3,0 mL, 9,49 mmol) în 20 mL diclorometan și amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 1h. Amestecul s-a concentrat și s-a purificat prin ISCO (80 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani (1% Et<sub>3</sub>N) 0 la 10%) pentru a da dipalmitat de 3-((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil ca un solid alb (3,22 g, 88%). Randamentul poate fi îmbunătățit prin pre-eluarea coloanei cu exces de hexani/1% Et<sub>3</sub>N.

25

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,14-5,21 (*m*, 1H), 4,33 (*dt*, 1H, *J* = 11,2 Hz, 3,8 Hz), 4,11-4,20 (*m*, 1H), 3,56-3,87 (*m*, 5H), 2,62 (*t*, 2H, *J* = 6,6 Hz), 2,29 (*t*, 4H, *J* = 7,9 Hz), 1,55-1,64 (*m*, 3H), 1,24 (*bs*, 50H), 1,17 (*d*, 6H, *J* = 6,8 Hz), 1,16 (*d*, 6H, *J* = 6,8 Hz), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,3 Hz).

30

Tosilat de 3-hidroxi-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminium (Ref: Eur. J. Med. Chem. 2013, 66. 46)



Formulă Chimică:  $C_{13}H_{23}NO_4S$

Greutate Moleculară: 289,39

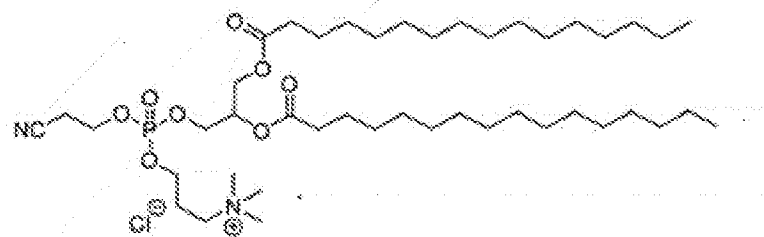
35

O soluție de 3-(dimetilamino)propan-1-ol (2,27 g, 22 mmol) și tosilat de metil (3,0 mL, 20 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la reflux timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a precipitat în acetonă pentru a da tosilat de 3-hidroxi-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminium ca un solid alb (5,50 g, 86%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,47 (*d*, 2H, *J* = 7,9 Hz), 7,11 (*d*, 2H, *J* = 7,9 Hz), 4,80 (*t*, 1H, *J* = 4,9 Hz), 3,47 (*q*, 2H, *J* = 5,8 Hz), 3,34 (*m*, 2H), 3,04 (*s*, 9H), 2,28 (*s*, 3H), 1,79-1,85 (*m*, 2H).

**Clorură de 3-(((2,3-Bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminiiu**

5

Formulă Chimică:  $C_{44}H_{88}ClN_2O_8P$ 

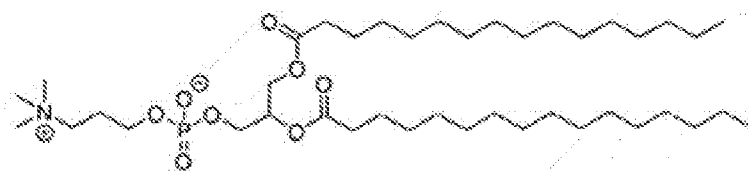
Greutate Moleculară: 837.60

La o soluție de dipalmitat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil (769 mg, 1,0 mmol) și tosilat de 3-hidroxi-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminiiu (289 mg, 1,0 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 2,2 mL, 1,0 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a dipalmitatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat <sup>t</sup>BuOOH (0,80 mL, 4,0 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu 10% bisulfat de sodiu și saremură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduu sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 3-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminiiu ca un solid alb (407 mg, 48%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,20-5,28 (m, 1H), 4,15-4,35 (m, 4H), 3,71-3,82 (m, 2H), 3,31 (s, 9H), 2,83 (m, 2H), 2,20-2,36 (m, 7H), 1,98 (s, 3H), 1,53-1,65 (m, 4H), 1,24 (bs, 48H), 0,87 (t, 6H, J = 6,6 Hz).

**Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (3-(trimetilammonio)propil) Compusul 154**

20

Formulă Chimică:  $C_{44}H_{88}NO_8P$ 

Greutate Moleculară: 748.08

25

O soluție de clorură de 3-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminiiu (407 mg, 0,48 mmol) și diizopropiletilamină (0,62 mL, 3,5 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60°C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>:MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a da produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (3-(trimetilammonio)propil) ca un solid alb (280 mg, 78%).

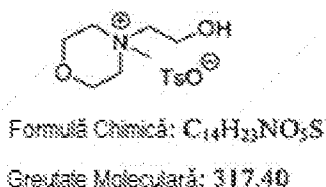
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,20 (m, 1H), 4,40 (dd, 1H, J = 12,2 Hz, 2,7 Hz), 4,13 (dd, 1H, J = 11,7 Hz, 7,1 Hz), 3,93-4,03 (m, 4H), 3,82-3,88 (m, 2H), 3,28 (s, 9H), 2,23-2,30 (m, 4H), 2,13 (m, 2H), 1,56 (m, 4H), 1,24 (bs, 48H), 0,87 (t, 6H, J = 6,6 Hz).

35

**Compusul 155: Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil)**

4-Metilbenzensulfonat de S4-(2-Hidroxi)etil-4-metilmorfolin-4-ium (Ref: Eur. J. Med. Chem. 2009, 44, 4970)

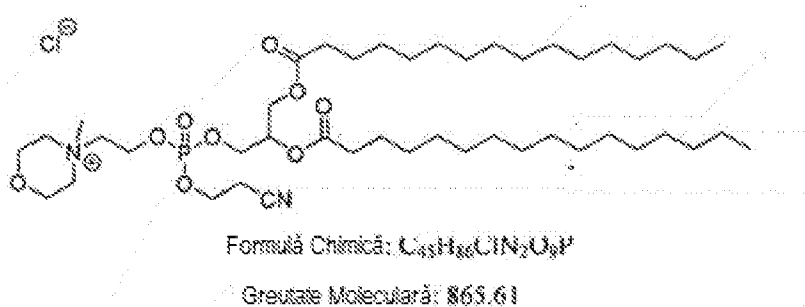
40



soluție de 2-morfolinoetan-1-ol (2,7 mL, 22 mmol) și tosilat de metil (3,0 mL, 20 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la reflux timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a precipitat în acetonă pentru a da 4-metilbenzensulfonat de 3-hidroxi-4-metilmorfolin-4-ium ca un solid maroniu (5,57 g, 87%).

$^1H$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,47 (*d*, 2H,  $J = 8,0$  Hz), 7,11 (*d*, 2H,  $J = 8,0$  Hz), 5,32 (*t*, 1H,  $J = 4,8$  Hz), 3,86-3,96 (*m*, 6H), 3,38-3,58 (*m*, 6H), 3,19 (*s*, 3H), 2,28 (*s*, 3H).

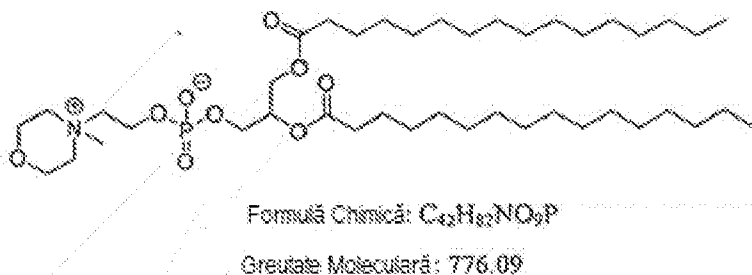
**Clorură de 4-(2-(((2,3-Bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-4-metilmorfolin-4-ium**



La o soluție de dipalmitat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil (769 mg, 1,0 mmol) 4-metilbenzensulfonat de 3-hidroxi-4-metilmorfolin-4-ium (317 mg, 1,0 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 2,2 mL, 1,0 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 48 h. După dispariția confirmată a dipalmitatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat BuOOH (0,80 mL, 4,0 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrarea și concentrarea sub vid, rezidul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 4-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-4-metilmorfolin-4-ium ca un solid alb (713 mg, 86%).

$^1H$  RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5,24 (*m*, 1H), 4,73 (*m*, 2H), 4,11-4,38 (*m*, 7H), 4,02 (*m*, 3H), 3,67 (*m*, 3H), 3,48 (*m*, 2H), 2,58-2,83 (*m*, 5H), 2,27-2,34 (*m*, 5H), 1,58 (*m*, 4H), 1,19-1,34 (*bs*, 48H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,6$  Hz).

**Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil) Compusul 155**



O soluție de clorură de 4-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-4-metilmorfolin-4-ium (713 mg, 0,86 mmol) și diizopropiletilamină (1,05 mL, 6,0 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60°C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a da produsul dorit, fosfat de 2,3-

bis(palmitoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil) ca un solid alb (446 mg, 67%).  
 $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,20 (m, 1H), 4,36-4,42 (m, 3H), 4,10 (dd, 1H,  $J = 12,1$  Hz, 7,4 Hz), 3,90-4,02 (m, 6H), 3,69 (m, 4H), 3,50 (m, 1H), 2,28 (q, 8H,  $J = 6,8$  Hz), 1,52-1,61 (m, 4H), 1,24 (bs, 48H), 0,87 (t, 6H,  $J = 7,1$  Hz).

5 **Compusul 156: Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (4-(trimetilammonio)butil)**

4-Metilbenzensulfonat de 4-Hidroxi-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminu (Ref: Eur. J. Med. Chem. 2013, 66, 46)



Formulă Chimică:  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{S}$

10

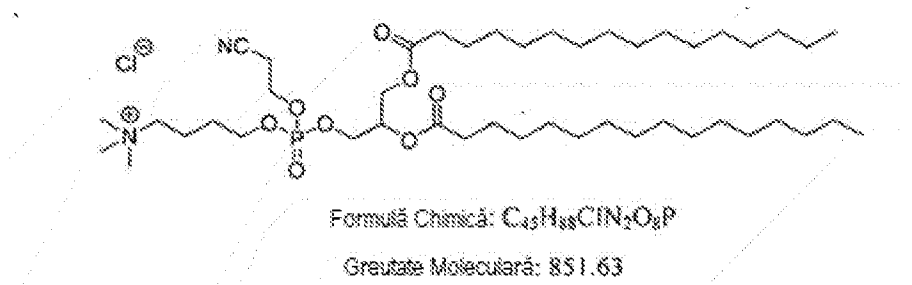
Greutate Moleculară: 303.42

15 O soluție de 4-(dimetilamino)butan-1-ol (2,58 g, 22 mmol) și tosilat de metil (3,0 mL, 20 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la reflux timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a precipitat în acetonă pentru a da 4-metilbenzensulfonat de 4-hidroxi-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminu ca un solid alb (5,13 g, 84%).  
 $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7,46 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz), 7,11 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz), 4,58 (t, 1H,  $J = 4,9$  Hz), 3,43 (q, 2H,  $J = 5,2$  Hz), 3,24-3,30 (m, 2H), 3,02 (s, 9H), 2,28 (s, 3H), 1,64-1,73 (m, 2H), 1,36-1,45 (m, 2H).

20

**Clorură de 4-(((2,3-Bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforiloxi)-*N,N,N*- trimetilbutan-1-aminu**

25



Formulă Chimică:  $\text{C}_{43}\text{H}_{88}\text{ClN}_4\text{O}_7\text{P}$

Greutate Moleculară: 851.63

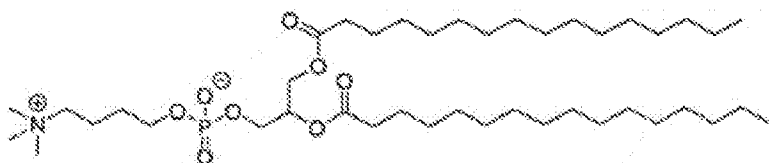
30 La o soluție de dipalmitat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil (769 mg, 1,0 mmol) 4-metilbenzensulfonat de 3,4-hidroxi-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminu (303 mg, 1,0 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 2,2 mL, 1,0 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a dipalmitatului de a 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat  $\text{tBuOOH}$  (0,80 mL, 4,0 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, rezidul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g  $\text{SiO}_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 4-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforiloxi)-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminu ca un solid alb (531 mg, 65%).

35

40

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,22-5,26 (m, 1H), 4,11-4,35 (m, 8H), 3,62-3,68 (m, 2H), 3,31 (s, 9H), 2,78-2,84 (m, 2H), 2,32 (q, 4H,  $J = 7,6$  Hz), 1,52-2,01 (m, 8H), 1,15-1,32 (m, 48H), 0,87 (t, 6H,  $J = 7,1$  Hz).

**Fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (4-(trimetilammonio)butil) Compusul 156**

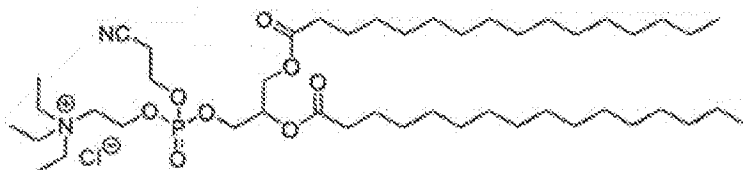


Formulă Chimică:  $C_{43}H_{84}NO_6P$

Greutate Moleculară: 762.11

- 5 soluție de clorură de 4-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminu (531 mg, 0,65 mmol) și diizopropiletilamină (0,79 mL, 4,56 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60°C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a da produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (4-(trimetilammonio)butil) ca un solid alb (383 mg, 77%).
- 10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,20 (*m*, 1H), 4,40 (*dd*, 1H, *J* = 11,9 Hz, 2,7 Hz), 4,15 (*dd*, 1H, *J* = 11,9 Hz, 6,8 Hz), 3,89-3,98 (*m*, 4H), 3,65-3,72 (*m*, 2H), 3,29 (*s*, 9H), 2,22-2,34 (*m*, 6H), 1,94-2,02 (*m*, 2H), 1,69-1,73 (*m*, 2H), 1,15-1,61 (*m*, 2H), 1,24 (*bs*, 48H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,1 Hz).
- Compusul 150: : Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (2-(trietilammonio)etil)**

- 15 **Clorură de 2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)-*N,N,N*- trietiletan-1-aminu**



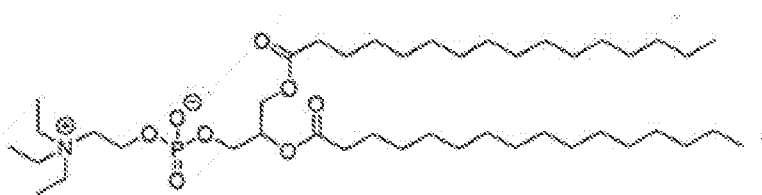
Formulă Chimică:  $C_{48}H_{90}ClN_2O_6P$

Greutate Moleculară: 865.66

- 20 La o soluție de dipalmitat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil (769 mg, 1,0 mmol) și iodură de *N,N,N*-trietil-2-hidroxi-tetanaminu (126 mg, 0,46 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,03 mL, 0,46 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a dipalmitatului de 3-
- 25 (((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat <sup>t</sup>BuOOH (0,37 mL, 1,84 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduu sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (12 g SiO<sub>2</sub>:MeOH/diclorometan 0 la 50%) pentru a da clorură de 2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)-*N,N,N*-
- 30 trietiletan-1-aminu ca o spumă galbenă (180 mg, 45%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,26 (*m*, 1H), 4,70 (*m*, 2H), 4,05-4,45 (*m*, 6H), 3,56 (*q*, 6H, *J* = 7,1 Hz), 2,87 (*m*, 2H), 2,28-2,36 (*m*, 4H), 1,70 (*m*, 2H), 1,58 (*m*, 4H), 1,41 (*t*, 9H, *J* = 7,1 Hz), 1,24 (*bs*, 48H), 0,87 (*t*, 6H, 7,1 Hz).

**Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (2-(trietilammonio)etil) Compusul 150**

35



Formulă Chimică:  $C_{43}H_{89}NO_8P$

Greutate Moleculară: 776.13

- 5 O soluție de clorură de 2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)-*N,N,N*-triiletan-1-aminu (180 mg, 0,21 mmol) și diizopropiletilamină (0,27 mL, 1,53 mmol) în 5 mL MeCN s-a încălzit la 60°C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 12 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a se obține produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(triethylammonio)etil) ca un solid alb (114 mg, 70%).
- 10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,21 (*m*, 1H), 4,41 (*dd*, 1H, *J* = 11,9 Hz, 2,7 Hz), 4,31 (*m*, 2H), 4,15 (*dd*, 1H, *J* = 11,9 Hz, 6,8 Hz), 4,01 (*t*, 2H, *J* = 6,6 Hz), 3,51 (*q*, 8H, *J* = 7,4 Hz), 2,28 (*q*, 4H, *J* = 6,3 Hz), 1,71 (*m*, 4H), 1,37 (*t*, 9H, *J* = 7,4 Hz), 1,24 (*bs*, 48H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,1 Hz).

**Compusul 151: Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (2-(tripropilammonio)etil)**

- 15 Bromură de *N*-(2-Hidroxietil)-*N,N*-dipropilpropan-1-aminu (Ref: Dalton Trans. 2015, 44, 16680)

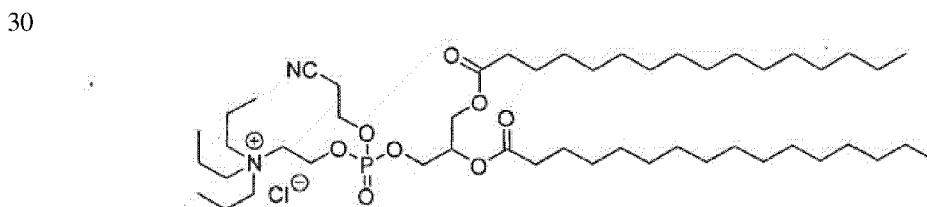


Formulă Chimică:  $C_{11}H_{25}BrNO$

Greutate Moleculară: 268.24

- 20 O soluție de tripropilamină (3,8 mL, 20 mmol) și 2-bromoetanol (1,42 mL, 20 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la reflux timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat și reziduuul s-a precipitat în amestec de hexani/EtOAc pentru a se obține bromură de *N*-(2-hidroxietyl)-*N,N*-dipropilpropan-1-aminu ca un solid alb (3,81 g, 71%).
- 25 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5,25 (*t*, 1H, *J* = 5,2 Hz), 3,77 (*m*, 2H), 3,33 (*t*, 2H, *J* = 7,1 Hz), 3,17-3,23 (*m*, 6H), 1,56-1,68 (*m*, 6H), 0,88 (*t*, 9H, *J* = 7,1 Hz).

**Clorură de *N*-(2-(((2,3-Bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)-*N,N*-dipropilpropan-1-aminu**



Formulă Chimică:  $C_{49}H_{99}ClN_2O_8P$

Greutate Moleculară: 907.74

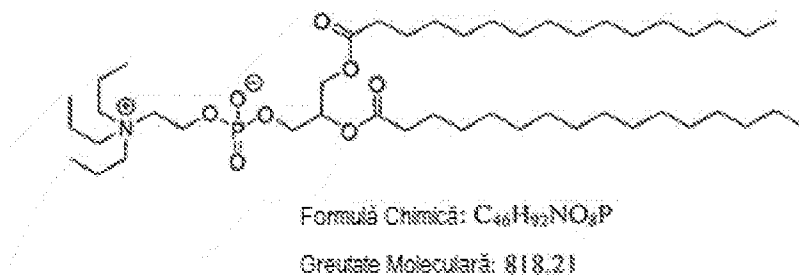
- 35 La o soluție de dipalmitat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil (769 mg, 1,0 mmol) și bromură de *N*-(2-hidroxietyl)-*N,N*-dipropilpropan-1-aminu (268 mg, 1,0 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 2,2 mL, 1,0 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a dipalmitatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfino)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat tBuOOH (0,80 mL, 4,0 mmol)

și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu 10% bisulfat de sodiu și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduu sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>1</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 50%) pentru a da clorură de N-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)-N,N-

dipropilpropan-1-aminii de ca o spumă albă (520 mg, 60%).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,26 (m, 1H), 4,64 (m, 2H), 4,10-4,42 (m, 6H), 3,97 (m, 2H), 3,31 (m, 6H), 2,87 (m, 2H), 2,32 (g, 4H, J = 7,7 Hz), 1,54-2,00 (m, 10H), 1,24 (m, 48H), 1,03 (t, 9H, J = 7,1 Hz), 0,87 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

**Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (2-(tripropilammonio)etil)**

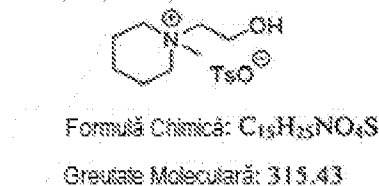
**Compusul 151**



O soluție de clorură de N-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)-N,N-dipropilpropan-1-aminii (520 mg, 0,60 mmol) și diizopropiletilamină (0,75 mL, 4,29 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a se obține produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(tripropilammonio)etil) ca un solid alb (360 mg, 73%).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,20 (m, 1H), 4,41 (dd, 1H, J = 11,9 Hz, 2,7 Hz), 4,28 (m, 2H), 4,13 (dd, 1H, J = 11,9 Hz, 6,8 Hz), 4,00 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 3,62 (m, 2H), 3,31-3,38 (m, 6H), 2,27 (dd, 4H, J = 7,0 Hz), 1,66-1,80 (m, 6H), 1,52-1,61 (m, 4H), 1,24 (bs, 48H), 1,04 (t, 9H, J = 7,4 Hz), 0,87 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

**Compusul 152: Fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(1-metilpiperidin-1-ium-1-il)etil)**

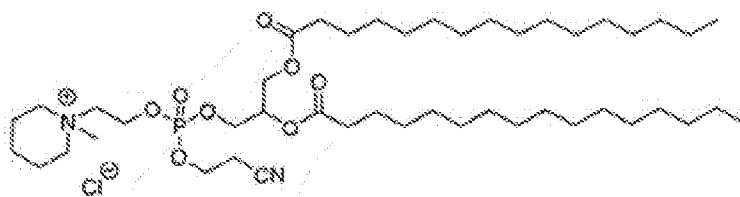
4-Metilbenzensulfonat de 4-(2-Hidroxi)etil)-4-metilmorfolin-4-ium (Ref: Eur. J. Med Chem. 2009, 44, 4970)



O soluție de 2-morfolinoetan-1-ol (2,7 mL, 22 mmol) și tosilat de metil (3,0 mL, 20 mmol) în 20 mL acetonitril s-a încălzit la reflux timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a precipitat în acetonă pentru a da 4-metilbenzensulfonat de 3-hidroxi-4-metilmorfolin-4-ium ca un solid maroniu (5,57 g, 87%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,47 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,11 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 5,27 (t, 1H, J = 4,8 Hz), 3,79-3,86 (m, 2H), 3,36-3,46 (m, 6H), 3,06 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 1,72-1,83 (m, 4H), 1,46-1,55 (m, 2H).

**Clorură de 1-(2-(((2,3-Bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)-1-metilpiperidin-1-ium**



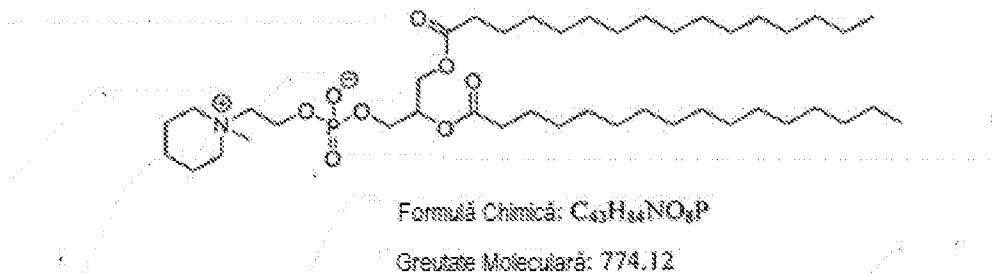
Formulă Chimică:  $C_{46}H_{88}ClN_2O_8P$

Greutate Moleculară: 863.64

- 5 La o soluție de dipalmitat de 3-((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (769 mg, 1,0 mmol) și 4-metilbensulfonat de 1-(2-hidroxi)etil-1-metilpiperidin-1-ium (315 mg, 1,0 mmol) în 10 mL diclorometan s-a adăugat lent, o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 2,2 mL, 1,0 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a dipalmitatului de 3-((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat  $t\text{-BuOOH}$  (0,80 mL, 4,0 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și sare, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, rezidul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g  $\text{SiO}_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 50%) pentru a da clorură de 1-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)-1-metilpiperidin-1-ium ca o spumă albă (690 mg, 84%).
- 10
- 15  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,25 (m, 1H), 4,66 (m, 2H), 4,05-4,32 (m, 7H), 3,48 (s, 2H), 3,52-3,70 (m, 3H), 3,32 (s, 3H), 2,84 (m, 2H), 2,32 (q, 4H,  $J = 8,0$  Hz), 1,92 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 1,59 (m, 4H), 1,19-1,34 (bs, 48H), 0,87 (t, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

**Fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(1-metilpiperidin-1-ium-1-il)etil)**

## 20 Compusul 152



Formulă Chimică:  $C_{43}H_{84}NO_8P$

Greutate Moleculară: 774.12

- 25 O soluție de clorură de 1-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)-1-metilpiperidin-1-ium (690 mg, 0,83 mmol) și diizopropilamină (1,02 mL, 5,83 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g  $\text{SiO}_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a se obține produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(1-metilpiperidin-1-ium-1-il)etil) ca un solid alb (495 mg, 77%).
- 30  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,18-5,20 (m, 1H), 4,30-4,42 (m, 3H), 4,12 (dd, 1H,  $J = 11,9$  Hz, 7,1 Hz), 3,98 (t, 2H,  $J = 5,7$  Hz), 3,82 (m, 2H), 3,60-3,71 (m, 2H), 3,46-3,55 (m, 2H), 3,33 (s, 3H), 2,27 (q, 4H,  $J = 7,4$  Hz), 2,10 (m, 2H), 1,84-1,96 (m, 4H), 1,66-1,76 (m, 2H), 1,50-1,63 (m, 2H), 1,24 (bs, 48H), 0,87 (t, 6H,  $J = 6,6$  Hz).

## 35 Compusul 153: Fosfat de 2,3-Bis(palmitoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil)



Bromură de 1-(2-hidroxi)etil)chinuclidin-1-ium (Ref: Org. Bioorg. Chem. 2010,425)-

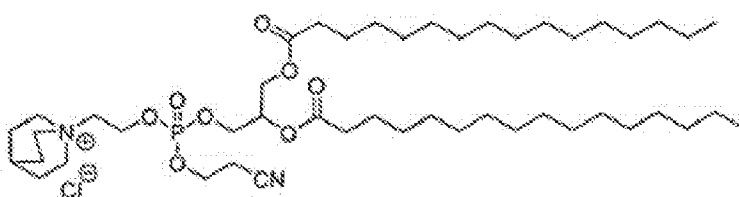


Formulă Chimică:  $C_9H_{14}BrNO$

Greutate Moleculară: 236.15

- 5 O soluție de chinuclidină (2,22 g, 20 mmol) și 2-bromoetanol (1,42 mL, 20 mmol) în 20 mL THF s-a încălzit la 50 °C timp de 5 h. După răcirea la temperatura camerei, solidul s-a filtrat și s-a spălat cu eter pentru a da bromură de 1-(2-hidroxi)etil)chinuclidin-1-ium ca un solid alb (4,61 g, 97%).  
 $^1H$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  5,24 (t, 1H,  $J = 4,6$  Hz), 3,76-3,83 (m, 2H), 3,46 (t, 6H,  $J = 7,6$  Hz), 3,21 (t, 2H,  $J = 5,5$  Hz), 2,01-2,08 (m, 1H), 1,81-1,88 (m, 6H).

10 **Clorură de 1-(2-(((2,3-Bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)chinuclidin-1-ium**



Formulă Chimică:  $C_{47}H_{88}ClN_7O_8P$

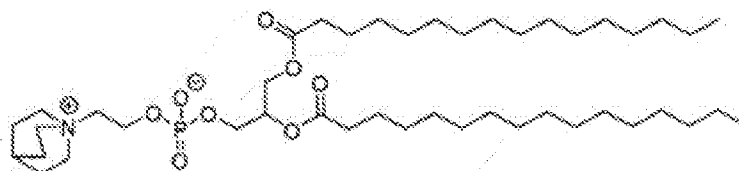
Greutate Moleculară: 875.65

- 15 La o soluție de dipalmitat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (769 mg, 1,0 mmol) și bromură de 1-(2-hidroxi)etil)chinuclidin-1-ium (236 mg, 1,0 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 2,2 mL, 1,0 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a dipalmitatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat  $tBuOOH$  (0,80 mL, 4,0 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g  $SiO_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da
- 20 clorură de 1-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)chinuclidin-1-ium ca un solid alb (646 mg, 76%).  
 $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5,25 (m, 1H), 4,63 (m, 2H), 4,13-4,44 (m, 6H), 3,85 (m, 2H), 3,65 (m, 6H), 3,27 (m, 4H), 2,87 (m, 2H), 2,32 (q, 4H,  $J = 7,6$  Hz), 2,19 (m, 1H), 2,04 (m, 4H), 1,59 (m, 2H), 1,18-1,42 (m, 48H), 0,87 (t, 6H,  $J = 7,0$  Hz).

25 **Fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil)**

30

**Compusul 153**



Formulă Chimică:  $C_{44}H_{88}NO_8P$

Greutate Moleculară: 786.13

35

O soluție de clorură de 1-(2-(((2,3-bis(palmitoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosfanil)oxi)etil)chinuclidin-1-ium (646 mg, 0,76 mmol) și diizopropiletilamină (0,94 mL,

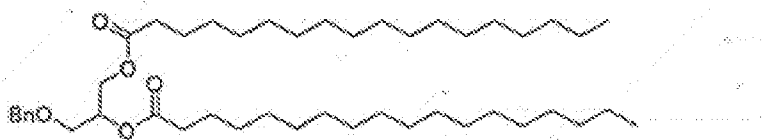
5,38 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>; MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a se obține produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(palmitoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil) ca un solid alb (444 mg, 74%).

- 5 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,22 (*m*, 1H), 4,40 (*dd*, 1H, *J* = 11,6 Hz, 2,8 Hz), 4,30 (*m*, 2H), 4,12 (*dd*, 1H, *J* = 11,8 Hz, 7,0 Hz), 3,98 (*m*, 2H), 3,63-3,73 (*m*, 8H), 2,15-2,34 (*m*, 8H), 2,00 (*m*, 5H), 1,50-1,62 (*m*, 2H), 1,18-1,42 (*m*, 48H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,0 Hz).

**Compusul 160: Fosfat de 2,3-Bis(stearoiloxi)propil (2-(trietilammonio)etil)**

10

Distearat de 3-(Benziloxi)propan-1,2-diil (Ref: EP 1916255 A2, Pg 30)



Formula Chimică: C<sub>46</sub>H<sub>92</sub>O<sub>8</sub>

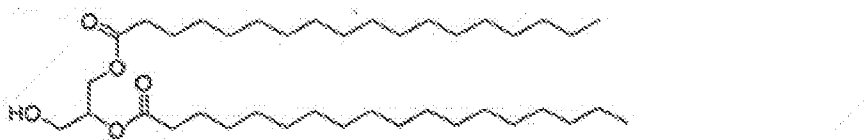
Greutate Moleculară: 715,16

Un amestec de 3-(benziloxi)propan-1,2-diol (13,39 g, 73,5 mmol), acid stearic (41,8 g, 0,147 moli), EDCI (31,0 g, 0,161 moli) și DMAP (1,80 g, 14,7 mmol) în 300 mL diclorometan s-a agitat la temperatura camerei timp de 40 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă, s-a extras cu diclorometan (2 X 500 mL), și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, produsul brut s-a purificat prin dizolvarea în hexani și filtrarea printr-un dop de silicagel, și apoi s-a eluat cu EtOAc/Hexani 0 la 30% pentru a da distearat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil ca un solid alb (48,2 g, 91%).

- 15 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,27-7,34 (*m*, 5H), 5,21-5,25 (*m*, 1H), 4,53 (*m*, 2H), 4,34 (*dd*, 1H, *J* = 3,8 Hz, 11,8 Hz), 4,18 (*dd*, 1H, *J* = 6,6 Hz, 11,8 Hz), 3,58 (*d*, 2H, *J* = 6,0 Hz), 2,24-2,34 (*m*, 4H), 1,54-1,63 (*m*, 4H), 1,24 (*s*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,3 Hz).

**Distearat de 3-Hidroxiopropan-1,2-diil**

25



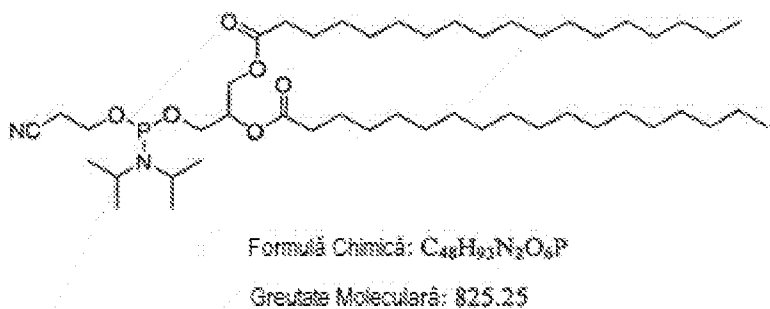
Formula Chimică: C<sub>38</sub>H<sub>76</sub>O<sub>6</sub>

Greutate Moleculară: 625,03

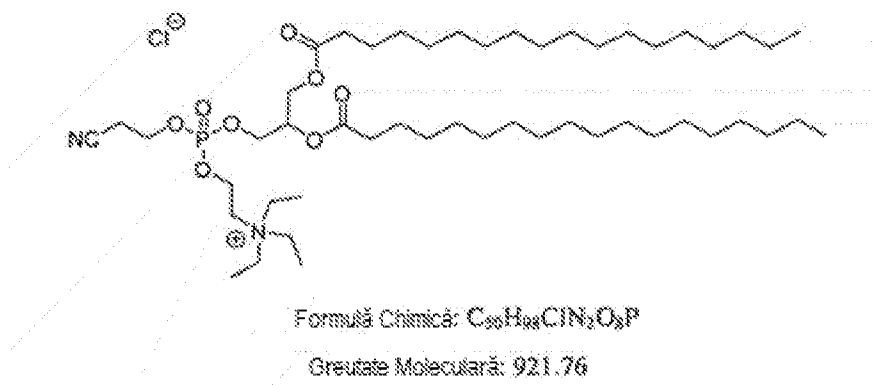
Un amestec de distearat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil (48,2 g, 67,4 mmol) și Pd/C (5%, Degaussa E10002U/W, Aldrich 330124, 4,8 g) în 1 L EtOAc s-a purtat cu azot și hidrogen de 3 ori, respectiv, și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei cu balon timp de 16 h. Suspensia s-a filtrat prin Celită, s-a spălat cu diclorometan (3 L). După concentrarea sub vid, solidul s-a precipitat în diclorometan pentru a da distearat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil ca un solid alb (40,67 g, 96%).

- 30 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,05-5,11 (*m*, 1H), 4,31 (*dd*, 1H, *J* = 4,6 Hz, 11,9 Hz), 4,23 (*dd*, 1H, *J* = 5,7 Hz, 11,9 Hz), 3,70-3,74 (*m*, 2H), 2,33 (*q*, 4H, *J* = 7,1 Hz), 2,00 (*t*, 1H, *J* = 6,3 Hz), 1,57-1,62 (*m*, 4H), 1,24 (*s*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,1 Hz).

**Distearat de 3-(((2-Cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil**

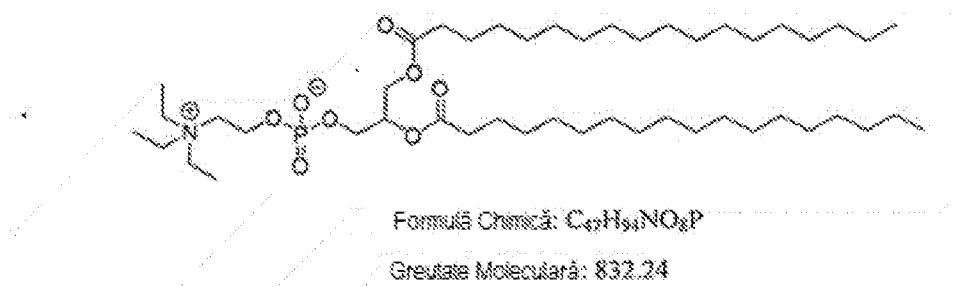


- 5 La o soluție de 3-hidroxiopropan-1,2-diil distearate (5,00 g, 8,0 mmol) și tetrazol (0,45 M în MeCN, 35,6 mL, 16,0 mmol) în 150 mL diclorometan, o soluție de 3-((cloro(diizopropilamino)fosfino)oxi)propanenitrile (5,1 mL, 16,0 mmol) în 100 mL diclorometan s-a adăugat în picături și amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 4 h. Amestecul s-a concentrat și s-a purificat prin ISCO (120 g  $SiO_2$ :EtOAc/Hexani (1%  $Et_3N$ ) 0 la 10%) pentru a da
- 10 distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil ca un solid alb (3,73 g, 56%). Randamentul poate fi crescut prin preluarea coloanei cu exces de hexani/1%  $Et_3N$ .  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5,16-5,20 (m, 1H), 4,28-4,37 (m, 1H), 4,11-4,17 (m, 1H), 2,62 (t, 2H,  $J=6,3$  Hz), 2,26-2,32 (m, 8H), 1,57-1,64 (m, 6H), 1,24 (s, 56H), 1,14-1,19 (m, 12H), 0,87 (t, 6H,  $J=6,3$  Hz).
- 15 **Clorură de 2-(((2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-N,N,N-trietiletanaminii**



- 20 La o soluție de distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (700 mg, 0,848 mmol) și iodură de N,N,N-trietil-2-hidroxietaanaminii (232 mg, 0,848 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,9 mL, 0,848 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a distearatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat t-BuOOH (0,68 mL, 3,39 mmol) și
- 25 amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu 10% bisulfat de sodiu și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, rezidul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g  $SiO_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-N,N,N-trietiletanaminii ca o spumă gălbuie (332 mg, 43%).
- 30  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5,29 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,14-4,44 (m, 7H), 3,98 (m, 1H), 3,51 (q, 6H,  $J=7,2$  Hz), 2,87 (m, 2H), 2,28-2,37 (m, 4H), 1,60 (m, 5H), 1,41 (t, 9H,  $J=7,1$  Hz), 1,24 (s, 56H), 0,87 (t, 6H,  $J=7,2$  Hz).

**Fosfat de 2,3-Bis(stearoiloxi)propil (2-(trietilamonio)etil) Compusul 160**

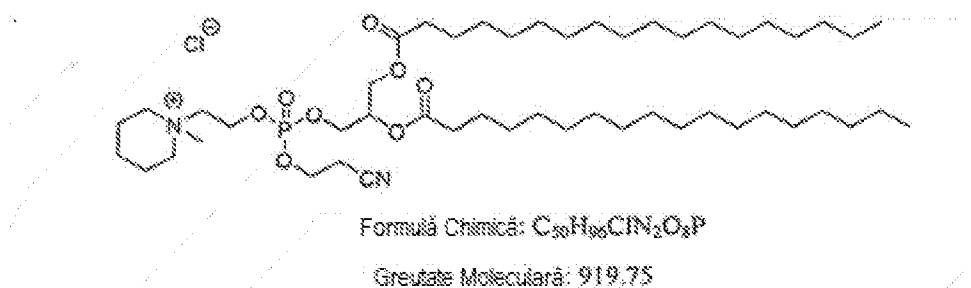


5 O soluție de clorură de 2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-trietiletanaminiiu (332 mg, 0,374 mmol) și diizopropiletilamină (0,46 mL, 2,62 mmol) în 10 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a da produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (2-(trietilamonio)etil) ca un solid alb (200 mg, 64%).

10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,18-5,25 (*m*, 1H), 4,41 (*dd*, 1H, *J* = 2,7 Hz, 11,8 Hz), 4,29 (*m*, 2H), 4,13 (*dd*, 1H, *J* = 7,0 Hz, 11,8 Hz), 4,00 (*t*, 2H, *J* = 6,6 Hz), 3,57-3,62 (*m*, 2H), 3,52 (*q*, 6H, *J* = 7,4 Hz), 2,27 (*q*, 4H, *J* = 6,6 Hz), 1,52-1,62 (*m*, 4H), 1,37 (*t*, 9H, *J* = 7,1 Hz), 1,24 (*s*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,1 Hz).

**Compusul 161: Fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (2-(1-metilpiperidin-1-ium-1-il)etil)**

15 **Clorură de 1-(2-(((2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-1-metilpiperidin-1-ium**

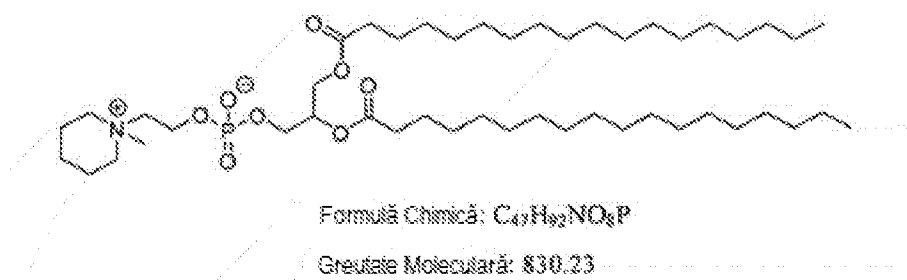


20 La o soluție de distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (700 mg, 0,848 mmol) și 4-metilbenzensulfonat de 1-(2-hidroxi)etil)-1-metilpiperidin-1-ium (267 mg, 0,848 mmol) în 10 mL diclorometan s-a adăugat lent, o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,9 mL, 0,848 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a distearatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat 'BuOOH (0,68 mL, 3,39 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduu sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 1-(2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-1-metilpiperidin-1-ium ca un solid alb (470 mg, 62%).

30 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,25 (*m*, 1H), 4,67 (*m*, 2H), 4,12-4,42 (*m*, 7H), 3,48 (*s*, 2H), 3,55-3,70 (*m*, 3H), 3,32 (*s*, 3H), 2,77-2,85 (*m*, 2H), 2,32 (*q*, 4H, *J* = 8,0 Hz), 1,93 (*m*, 4H), 1,70-1,78 (*m*, 2H), 1,59 (*m*, 4H), 1,19-1,34 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,8 Hz).

**Fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (2-(1-metilpiperidin-1-ium-1-il)etil) Compusul 161**

35

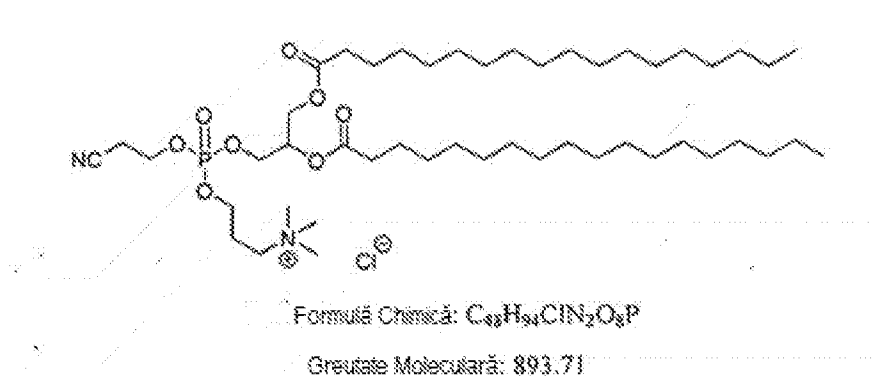


5 O soluție de clorură de 1-(2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-1-metilpiperidin-1-ium (470 mg, 0,53 mmol) și diizopropiletilamină (0,65 mL, 3,72 mmol) în 15 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a se obține produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (2-(1-metilpiperidin-1-ium-1-il)etil) ca un solid alb (269 mg, 61%).

10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,18-5,24 (m, 1H), 4,40 (dd, 1H, *J* = 12,1 Hz, 3,0 Hz), 4,34 (m, 2H), 4,12 (dd, 1H, *J* = 11,9 Hz, 7,1 Hz), 3,99 (t, 2H, *J* = 5,7 Hz), 3,82 (m, 2H), 3,62-3,71 (m, 2H), 3,46-3,55 (m, 2H), 3,34 (s, 3H), 2,27 (q, 4H, *J* = 7,4 Hz), 1,84-1,96 (m, 4H), 1,68-1,76 (m, 2H), 1,52-1,63 (m, 4H), 1,24 (bs, 56H), 0,87 (t, 6H, *J* = 6,6 Hz).

15 **Compusul 162: Fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (3-(trimetilamonio)propil)**

15 **Clorură de 3-(((2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminii**

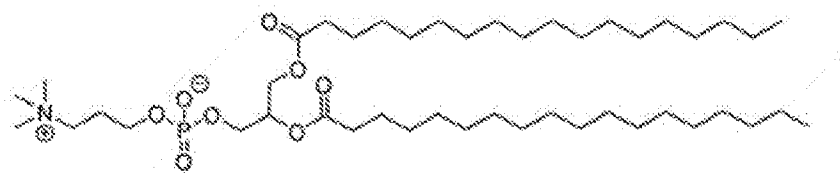


20 La o soluție de distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (700 mg, 0,848 mmol) și tosilat de 3-hidroxi-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminii (245 mg, 0,848 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,9 mL, 0,848 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a distearatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat *t*BuOOH (0,68 mL, 3,39 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduu

25 sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 3-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminii ca o spumă albă (502 mg, 68%).

30 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,25 (m, 1H), 4,15-4,35 (m, 7H), 3,78 (m, 2H), 3,31 (s, 9H), 2,83 (m, 2H), 2,27-2,35 (m, 10H), 1,98 (m, 3H), 1,59 (m, 4H), 1,24 (s, 50H), 0,87 (t, 6H, *J* = 6,0 Hz).

35 **Fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (3-(trimetilamonio)propil) Compusul 162**



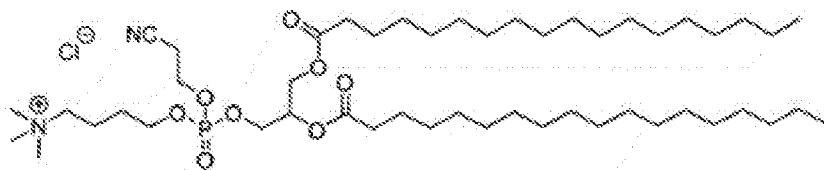
Formula Chimică:  $C_{45}H_{90}NO_8P$

Greutate Moleculară: 804,19

- 5 O soluție de clorură de 3-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-aminii (502 mg, 0,58 mmol) și diizopropiletilamină (0,71 mL, 4,1 mmol) în 15 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOR/diclorometan 0 la 60%) pentru a se obține produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (3-(trimetilamonio)propil) ca un solid alb (385 mg, 82%).
- 10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,02 (*m*, 1H), 4,40 (*dd*, 1H, *J* = 3,0 Hz, 11,8 Hz), 4,13 (*dd*, 1H, *J* = 7,2 Hz, 11,8 Hz), 3,91-4,00 (*m*, 4H), 3,77-3,83 (*m*, 2H), 3,28 (*s*, 9H), 2,07-2,32 (*m*, 10H), 1,24 (*s*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,0 Hz).

**Compusul 163: Fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (3-(trimetilamonio)butil)**

- 15 **Clorură de 4-(((2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminii**



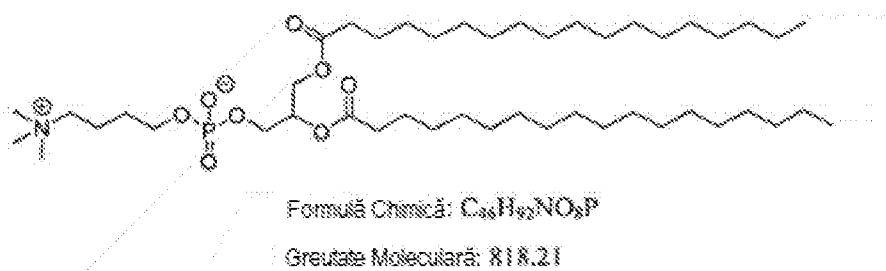
Formula Chimică:  $C_{46}H_{92}ClN_2O_8P$

Greutate Moleculară: 907,74

- 20 La o soluție de distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (700 mg, 0,848 mmol) și 4-metilbensulfonat de 3-hidroxi-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminii (257 mg, 0,848 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent, o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,9 mL, 0,848 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a distearatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat <sup>t</sup>BuOOH (0,68 mL, 3,39 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduu sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 3-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminii ca un solid alb (648 mg, 87%).
- 25 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,19-5,27 (*m*, 1H), 4,1 1-4,34 (*m*, 8H), 3,60-3,68 (*m*, 2H), 3,32 (*s*, 9H), 2,77-2,85 (*m*, 2H), 2,31 (*q*, 4H, *J* = 6,8 Hz), 1,90-2,00 (*m*, 2H), 1,78-1,86 (*m*, 2H), 1,54-1,64 (*m*, 4H), 1,19-1,35 (*m*, 56H), 0,86 (*t*, 6H, *J* = 6,8 Hz).

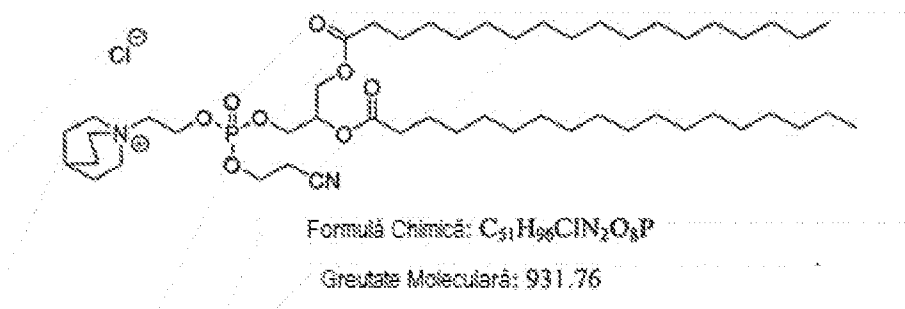
**Fosfat 2,3-Bis(stearoiloxi)propil (3-(trimetilamonio)butil) Compusul 163**

35



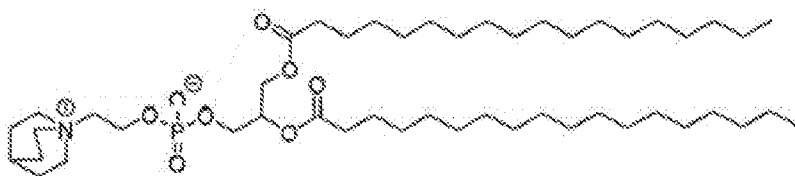
- 5 O soluție de clorură de 3-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-trimetilbutan-1-aminu (648 mg, 0,74 mmol) și diizopropiletilamină (0,91 mL, 5,2 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a se obține produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (3-(trimetilamonio)butil) ca un solid alb (330 mg, 54%).
- 10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,18-5,24 (*m*, 1H), 4,40 (*dd*, 1H, *J*= 12,0 Hz, 3,0 Hz), 4,15 (*dd*, 1H, *J*= 11,9 Hz, 6,8 Hz), 3,90-3,98 (*m*, 4H), 3,94-3,98 (*m*, 2H), 3,28 (*s*, 9H), 1,94-2,32 (*m*, 6H), 1,68-1,73 (*m*, 2H), 1,52-1,62 (*m*, 4H), 1,24 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J*= 6,6 Hz).
- Compusul 164: Fosfat 2,3-Bis(stearoiloxi)propil (2-(chinuclidin-1-ium-1-il)etil)**

- 15 **Clorură de 1-(2-(((2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)chinuclidin-1-ium**



- 20 La o soluție de distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (700 mg, 0,848 mmol) și bromură de 1-(2-hidroxi)etil)chinuclidin-1-ium (200 mg, 0,848 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,9 mL, 0,848 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a distearatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat t-BuOOH (0,68 mL, 3,39 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, reziduul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a
- 25 da clorură de 1-(2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)chinuclidin-1-ium ca un solid alb (572 mg, 75%).
- 30 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,26 (*m*, 1H), 4,62 (*m*, 2H), 4,16-4,42 (*m*, 6H), 3,85 (*m*, 2H), 3,63-3,73 (*m*, 6H), 2,84-2,92 (*m*, 2H), 2,32 (*q*, 4H, *J*= 8,0 Hz), 2,20 (*m*, 1H), 2,04 (*m*, 6H), 1,52-1,84 (*m*, 10H), 1,18-1,33 (*m*, 50H), 0,87 (*t*, 6H, *J*= 6,8 Hz).

- 35 **Fosfat de 2,3-Bis(stearoiloxi)propil (2-(chinuclidin-1-ium-1-il)etil) Compusul 164**



Formula Chimică:  $C_{49}H_{97}NO_5P$

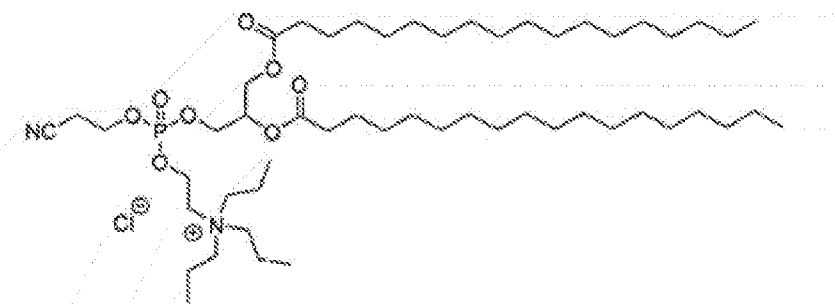
Greutate Moleculară: 842.24

5 soluție de clorură de 1-(2-(((2,3-bis(stearoiloxy)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)chinuclidin-1-ium (572 mg, 0,64 mmol) și diizopropiletilamină (0,78 mL, 4,47 mmol) în 15 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a da produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(stearoiloxy)propil (2-(chinuclidin-1-ium-1-il)etil) ca un solid alb (387 mg, 72%).  
10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,17-5,23 (m, 1H), 4,40 (dd, 1H, J = 11,9 Hz, 2,6 Hz), 4,32 (m, 2H), 4,12 (dd, 1H, J = 11,9 Hz, 7,1 Hz), 3,99 (t, 2H, J = 6,4 Hz), 3,64-3,73 (m, 9H), 2,52 (m, 4H), 2,28 (q, 4H, J = 7,7 Hz), 2,14-2,21 (m, 1H), 2,01 (m, 3H), 1,52-1,60 (m, 4H), 1,36-1,46 (m, 4H), 1,19-1,32 (bs, 50H), 0,87 (t, 6H, J = 6,6 Hz).

15 **Compusul 165: Fosfat de 2,3-Bis(stearoiloxy)propil (2-(tripropilamonio)etil)**

**Clorură de N-(2-(((2,3-Bis(stearoiloxy)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-N,N-dipropilpropan-1-aminiiu**

20



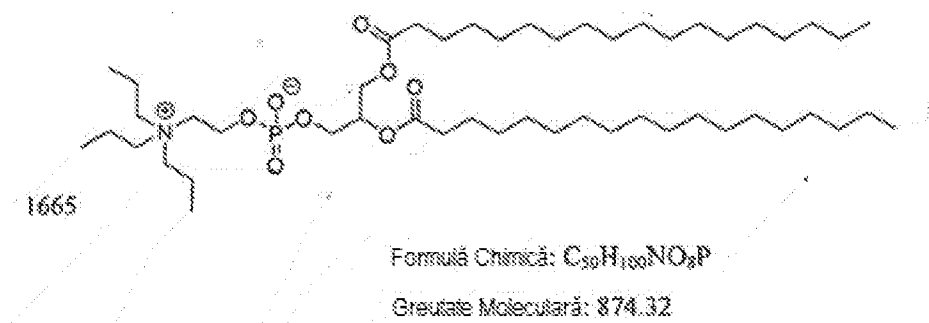
Formula Chimică:  $C_{53}H_{104}ClN_2O_5P$

Greutate Moleculară: 963.84

25 La o soluție de distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (700 mg, 0,848 mmol) și bromură de N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dipropilpropan-1-aminiiu (227 mg, 0,848 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,9 mL, 0,848 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a distearatului de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat t-BuOOH (0,68 mL, 3,39 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub  
30 vid, reziduul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de N-(2-(((2,3-bis(stearoiloxy)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-N,N-dipropilpropan-1-aminiiu ca o spumă gălbuie (535 mg, 68%).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,82 (bs, 1H), 5,18-5,27 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,12-4,42 (m, 4H), 3,98 (m, 1H), 3,27-3,34 (m, 4H), 2,84-2,91 (m, 1H), 2,27-2,35 (m, 3H), 1,69-1,82 (m, 4H), 1,52-1,64 (m, 5H), 1,39  
35 (d, 12H, J = 6,3 Hz), 1,19-1,33 (bs, 56H), 0,99-1,06 (m, 5H), 0,87 (t, 6H, J = 6,8 Hz).

**Fosfat de 2,3-Bis(stearoiloxy)propil (2-(tripropilamonio)etil) Compus**

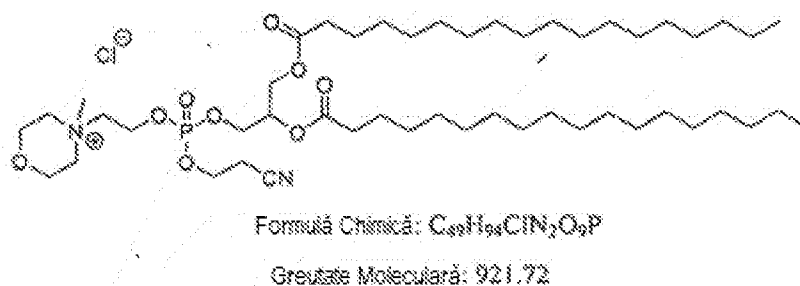




- 5 O soluție de clorură de 2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi) fosforil)oxi)-*N,N,N*-tripropiletanaminu (535 mg, 0,57 mmol) și diizopropiletilamină (0,70 mL, 4,03 mmol) în 20 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a da produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (2-(tripropilamonio)etil) ca un solid alb (472 mg, 94%).
- 10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,16-5,23 (*m*, 1H), 4,41 (*dd*, 1H, *J* = 11,9 Hz, 3,3 Hz), 4,26 (*m*, 2H), 4,13 (*dd*, 1H, *J* = 11,9 Hz, 7,1 Hz), 4,02 (*t*, 2H, *J* = 6,3 Hz), 3,60 (*m*, 2H), 3,228-3,37 (*m*, 6H), 2,22-2,31 (*m*, 4H), 1,33-1,96 (*m*, 15H), 1,24 (*bs*, 51H), 1,04 (*t*, 9H, *J* = 7,1 Hz), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,6 Hz).

**Compusul 166: Fosfat de 2,3-Bis(stearoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil)**

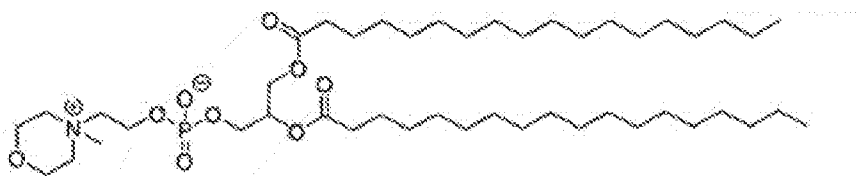
- 15 **Clorură de 4-(2-(((2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-4-metilmorfolin-4-ium**



- 20 La o soluție de distearat de 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil (700 mg, 0,848 mmol) și 4-metilbenzensulfonat de 3-hidroxi-4-metilmorfolin-4-ium (269 mg, 0,848 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de tetrazol în MeCN (0,45 M, 1,9 mL, 0,848 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. După dispariția confirmată a distearatului de
- 25 3-(((2-cianoetoxi)(diizopropilamino)fosfanil)oxi)propan-1,2-diil, s-a adăugat 'BuOOH (0,68 mL, 3,39 mmol) și amestecul s-a agitat timp de 4 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu diclorometan, s-a spălat cu bisulfat de sodiu 10% și saramură, și apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrarea sub vid, rezidul sub formă de spumă galbenă s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da clorură de 4-(2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforil)oxi)etil)-4-
- 30 metilmorfolin-4-ium ca o spumă gălbuie (456 mg, 60%).
- <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,26 (*m*, 1H), 4,72 (*m*, 2H), 4,12-4,40 (*m*, 8H), 3,96-4,08 (*m*, 4H), 3,72 (*m*, 4H), 3,52 (*s*, 3H), 2,84 (*m*, 2H), 2,32 (*q*, 6H, *J* = 7,9 Hz), 1,59 (*m*, 4H), 1,14-1,31 (*m*, 54H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,6 Hz).

**2,3-Bis(stearoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil) fosfat Compusul 166**

35



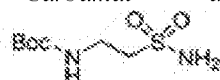
Formulă Chimică:  $C_{69}H_{120}NO_9P$

Greutate Moleculară: 832,20

- 5 O soluție de clorură de 4-(2-(((2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)(2-cianoetoxi)fosforiloxi)etil)-4-metilmorfolin-4-ium (456 mg, 0,51 mmol) și diizopropiletilamină (0,63 mL, 4,03 mmol) în 15 mL MeCN s-a încălzit la 60 °C timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a concentrat sub vid și s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 60%) pentru a da produsul dorit, fosfat de 2,3-bis(stearoiloxi)propil (2-(4-metilmorfolino-4-ium)etil) ca un solid alb (360 mg, 84%).
- 10 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,21 (m, 1H), 4,36-4,42 (m, 3H), 4,10 (dd, 1H, J = 12,1 Hz, 7,4 Hz), 3,93-4,06 (m, 8H), 3,66-3,72 (m, 4H), 3,52 (s, 3H), 2,27 (q, 4H, J = 7,1 Hz), 1,92-2,06 (m, 2H), 1,52-1,62 (m, 4H), 1,24 (m, 54H), 0,87 (t, 6H, J = 6,6 Hz).

**Trifluoroacetat de N-((2-Aminoetil)sulfonil)oleamidă**

- 15 **Carbamat de *terf*-Butil (2-sulfamoiletil)** (Ref: WO2007/041634)

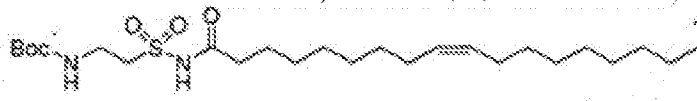


Formulă Chimică:  $C_7H_{16}N_2O_4S$

Greutate Moleculară: 224,28

- 20 Un amestec de 2-aminoetan-1-sulfonamidă (3,37 g, 21 mmol), dicarbonat de di-*terf*-butil (6,87 g, 31,5 mmol), trietilamină (11,7 mL, 84 mmol) și *N,N*-dimetilpiridin-4-amină (260 mg, 2,1 mmol) în 120 mL diclorometan s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, rezidul s-a purificat prin ISCO (80 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/hexani 0 la 100%) pentru a da carbamat de *terf*-butil (2-sulfamoiletil) ca un solid alb (1,40 g, 30%).
- 25 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,08 (bs, 1H), 4,87 (bs, 1H), 3,67 (q, 2H, J = 6,0 Hz), 3,28 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 1,44 (s, 9H).

30 **Carbamat de *terf*-Butil (2-(*N*-oleilsulfamoil)etil)** (Ref: WO2008/087190)



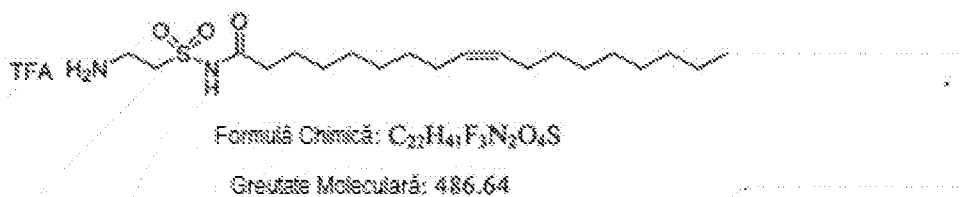
Formulă Chimică:  $C_{29}H_{48}N_2O_5S$

Greutate Moleculară: 488,73

- 35 Un amestec de carbamat de *terf*-butil (2-sulfamoiletil) (1,40 g, 6,24 mmol), acid oleic (2,0 mL, 6,24 mmol), 1,1'-carbonildiimidazol (1,01 g, 6,24 mmol) și 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-enă (2,0 mL, 13,7 mmol) în 60 mL *N,N*-dimetilformamidă s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat formarea produsului. Amestecul de reacție s-a acidulat cu soluție de HCl 4N la pH = 2, și apoi s-a extras cu eter. După s-a uscat pe sulfat de sodiu, soluția s-a filtrat și s-a concentrat. Rezidul s-a purificat prin ISCO (80 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/hexani, 0 la 10%) pentru a da carbamat de *terf*-butil (2-(*N*-oleilsulfamoil)etil) (2,34 g, 76%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,29-5,34 (m, 2H), 5,07 (bs, 1H), 3,60 (bs, 4H), 2,33 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 1,97-2,03 (m, 4H), 1,62-1,68 (m, 3H), 1,43 (s, 9H), 1,23-1,30 (m, 20 H), 0,87 (t, 3H, J = 5,8 Hz).

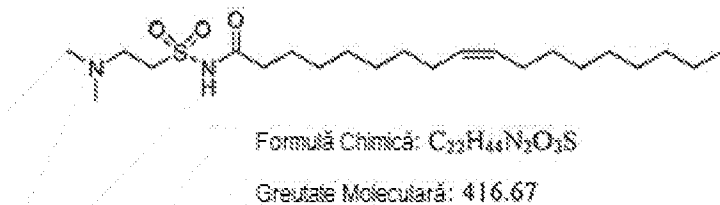
- 40 **Trifluoroacetat de N-((2-Aminoetil)sulfonil)oleamidă**



5 La o soluție de carbamat de *terț*-butil (2-(*N*-oleilsulfamoil)etil) (378 mmol, 0,77 mmol) în 10 mL diclorometan, s-a adăugat lent acid trifluoroacetic (2 mL), și s-a agitat la temperatura camerei timp de 4 h. TLC a arătat dispariția carbamatului de *terț*-butil (2-(*N*-oleilsulfamoil)etil). Amestecul de reacție s-a concentrat la sec și triturat cu hexani pentru a da trifluoroacetat de *N*-((2-aminoetil)sulfonil)oleamidă ca un solid alb (344 mg, 88%).

10  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,85 (*bs*, 2H), 5,28-5,36 (*m*, 2H), 3,84 (*bs*, 2H), 3,48 (*bs*, 2H), 2,30-2,40 (*m*, 2H), 1,94-2,04 (*m*, 4H), 1,18-1,36 (*m*, 20H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 389,3, 371,3.

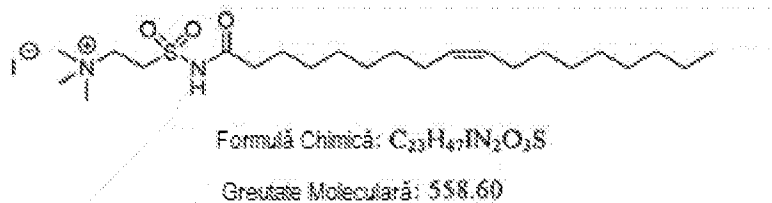
#### 15 *N*-((2-(Dimetilamino)etil)sulfonil)oleamidă



20 (Ref: WO2008/087190) La o soluție de 2-(dimetilamino)etane-1-sulfonamidă (500 mg, 3,28 mmol), trietilamină (0,92 mL, 6,57 mmol) și *N,N*-dimetilpiridin-4-amină (40 mg, 0,33 mmol) în 30 mL diclorometan, s-a adăugat în picături clorură de oleoil (1,3 mL, 3,94 mmol) și amestecul de reacție s-a încălzit până la temperatura camerei. MS a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, rezidul s-a purificat prin ISCO (24 g  $SiO_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da *N*-((2-(dimetilamino)etil)sulfonil)oleamidă ca un solid alb (437 mg, 32%).

25  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5,28-5,34 (*m*, 2H), 3,44 (*t*, 2H,  $J = 6,3$  Hz), 3,03 (*t*, 2H,  $J = 6,3$  Hz), 2,48 (*s*, 6H), 2,32 (*t*, 2H,  $J = 7,6$  Hz), 1,95-2,02 (*m*, 4H), 1,56-1,64 (*m*, 2H), 1,20-1,38 (*m*, 20H), 0,87 (*t*, 3H,  $J = 6,6$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 417,3.

#### 35 Iodură de *N,N,N*-Trimetil-2-(*N*-oleilsulfamoil)etan-1-aminu



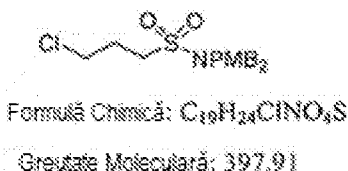
40 O soluție de *N*-((2-(dimetilamino)etil)sulfonil)oleamidă (172 mg, 0,41 mmol) și iodometan (3 mL) în 15 mL dimetoxietan s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. După concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (aur 24 g  $SiO_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 20%) pentru a se obține iodură de *N,N,N*-trimetil-2-(*N*-oleilsulfamoil)etan-1-aminu ca o spumă galben deschis (217 mg, 94%).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,28-5,38 (*m*, 2H), 4,24 (*bs*, 4H), 3,45 (*s*, 9H), 2,54-2,64 (*m*, 2H), 1,94-2,06 (*m*, 4H), 1,56-1,68 (*m*, 2H), 1,20-1,38 (*m*, 20H), 0,87 (*t*, 3H,  $J = 6,6$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 417,3, 391,3.

## 5 *N*-((3-(Dimetilamino)propil)sulfonil)oleamidă

### 3-Cloro-*N,N*-bis(4-metoxibenzil)propan-1-sulfonamidă

10



15

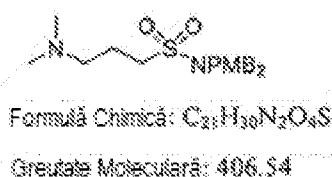
La 0 °C, la o soluție de clorură de 3-cloropropan-1-sulfonil (2,68 mL, 22 mmol) și trietilamină (7,8 mL, 56 mmol) în 80 mL diclorometan, s-a adăugat lent o soluție de bis(4-metoxibenzil)amină (5,15g, 20 mmol) în 20 mL diclorometan, și apoi reacția s-a încălzit până la temperatura camerei timp de 16 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. Soluția s-a filtrat printr-un dop de silicagel și s-a eluat cu 30% EtOAc în hexani. După concentrare, produsul brut s-a purificat cu ISCO (120 g  $\text{SiO}_2$ : EtOAc/Hexani 0 la 30%) pentru a da 3-cloro-*N,N*-bis(4-metoxibenzil)propan-1-sulfonamidă ca un ulei maroniu (4,95, 62%).

20

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,20-7,25 (*m*, 4H), 6,85-6,90 (*m*, 4H), 4,27 (*s*, 4H), 3,81 (*s*, 6H), 3,60 (*t*, 2H,  $J = 6,8$  Hz), 2,99 (*t*, 2H,  $J = 7,1$  Hz), 2,19-2,28 (*m*, 2H).

### 3-(Dimetilamino)-*N,N*-bis(4-metoxibenzil)propan-1-sulfonamidă

25



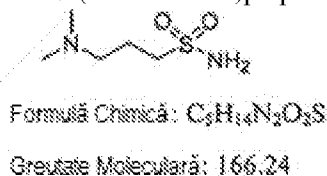
30

Într-un tub etanș, un amestec de 3-cloro-*N,N*-bis(4-metoxibenzil)propan-1-sulfonamidă (4,95 g, 12,4 mmol) în soluție de dimetilamină în THF (2,0 M, 30 mL, 60 mmol) s-a încălzit la 70 °C timp de 16 h. MS a arătat produsul. După răcirea la temperatura camerei, amestecul de reacție s-a filtrat și s-a spălat cu diclorometan. Filtratul s-a concentrat și produsul brut s-a purificat cu ISCO (120 g  $\text{SiO}_2$ : MeOH/diclorometan 0 la 7%) pentru a da 3-(dimetilamino)-*N,N*-bis(4-metoxibenzil)propan-1-sulfonamida ca un ulei maroniu (4,04, 80%).

35

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,15-7,25 (*m*, 4H), 6,82-6,89 (*m*, 4H), 4,25 (*s*, 4H), 3,80 (*s*, 6H), 2,85-2,95 (*m*, 2H), 2,28 (*t*, 2H,  $J = 6,6$  Hz), 2,17 (*s*, 6H), 1,87-1,96 (*m*, 2H).

### 3-(Dimetilamino)propan-1-sulfonamidă (Ref: WO2015/112441)



40

La o soluție de 3-(dimetilamino)-*N,N*-bis(4-metoxibenzil)propan-1-sulfonamidă (1,22 g, 3,0 mmol) și anisol (3,3 mL) în 15 mL diclorometan, s-au adăugat în picături 22 mL acid trifluoroacetic, și apoi s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. MS a arătat produsul. Amestecul de reacție s-a concentrat la sec pentru a da 3-(dimetilamino)propan-1-sulfonamida ca un semi-solid (1,00 g, cant.), care s-a utilizat pentru etapa următoare fără altă purificare.

45

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  3,28-3,34 (*m*, 2H), 3,18 (*t*, 2H,  $J = 6,6$  Hz), 2,90 (*s*, 6H), 2,17-2,29 (*m*, 2H).

MS (APCI):  $m/z$  (MH<sup>+</sup>) 167,1.

***N*-((3-(Dimetilamino)propil)sulfonil)oleamidă**

5



Formulă Chimică: C<sub>23</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

Greutate Moleculară: 430.69

La o soluție de 3-(dimetilamino)propan-1-sulfonamidă (1,00 g, 3,0 mmol), trietilamină (1,26 mL, 9,0 mmol) și *N,N*-dimetilpiridin-4-amină (37 mg, 0,3 mmol) în 60 mL diclorometan, s-a adăugat în picături o soluție de clorură de oleoil de (1,2 mL, 3,6 mmol), și apoi s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. MS a arătat produsul. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, rezidul s-a purificat prin ISCO (40 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 10%) pentru a da *N*-((3-(dimetilamino)propil)sulfonil)oleamidă ca un solid alb (255 mg, 20%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,31-5,36 (m, 2H), 3,37 (t, 2H, *J* = 7,1 Hz), 2,99 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 2,82 (bs, 1H), 2,68 (s, 6H), 2,37 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz), 2,21-2,29 (m, 2H), 1,96-2,02 (m, 4H), 1,57-1,66 (m, 2H), 1,20-1,36 (m, 20H), 0,87 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz).

MS (APCI):  $m/z$  (MH<sup>+</sup>) 431,3.

20

**Iodură de *N,N,N*-trimetil-3-(*N*-oleoilsulfamoil)propan-1-aminii**



Formulă Chimică: C<sub>26</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

Greutate Moleculară: 572.63

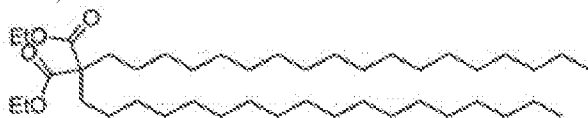
25

La o soluție de *N*-((3-(dimetilamino)propil)sulfonil)oleamidă (389 mg, 0,90 mmol) în 20 mL dimetoxietan, s-a adăugat iodometan (5 mL) și amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. Fie mai mult iodometan fie un timp mai lung nu au îmbunătățit randamentul. Amestecul de reacție s-a concentrat și s-a purificat cu ISCO aur (24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 30%) pentru a da iodură de *N,N,N*-trimetil-3-(*N*-oleoilsulfamoil)propan-1-aminii ca o spumă galbenă (237 mg, 46%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5,32-5,36 (m, 2H), 3,48-3,57 (m, 4H), 3,17 (s, 9H), 2,28-2,37 (m, 4H), 1,99-2,06 (m, 4H), 1,57-1,66 (m, 2H), 1,24-1,37 (m, 20H), 0,87 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz).

**Acid 2-octadecilicosanoic**

35

2,2-Dioctadecilmalonat de dietil (Ref: WO2014/195432)



Formulă Chimică: C<sub>43</sub>H<sub>84</sub>O<sub>4</sub>

Greutate Moleculară: 663.14

40

La 0 °C, s-a adăugat NaH (1,20 g, 30 mmol) într-o soluție de malonat de dietil (1,52 mL, 10 mmol) în 60 mL *N,N*-dimetilformamidă. După agitarea timp de 30 min, s-a adăugat lent o soluție de 1-bromooctadecan (8,33 g, 25 mmol) în 60 mL THF, și amestecul de reacție s-a încălzit până la temperatura camerei și apoi s-a încălzit la 50 °C timp de 6 h. Apoi reacția s-a răcit la temperatura camerei, s-au

adăugat MeOH, acid acetic și apă rece ca gheața (5 mL fiecare) pentru a stinge reacția. Apoi s-a extras cu diclorometan, stratul organic combinat s-a spălat cu saramură (difícil de separat). După uscarea pe sulfat de sodiu, soluția s-a filtrat și s-a concentrat, și produsul brut s-a purificat cu ISCO (220 SiO<sub>2</sub>: eter/hexani 0 la 5%) pentru a da 2,2-dioctadecilmalonat de dietil ca un solid alb (5,96 g, 85%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,16 (q, 4H, J = 7,1 Hz), 1,81-1,87 (m, 4H). 1,06-1,33 (m, 70H), 0,87 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

#### Acid 2,2-Dioctadecilmalonic

10



Formulă Chimică: C<sub>38</sub>H<sub>78</sub>O<sub>4</sub>

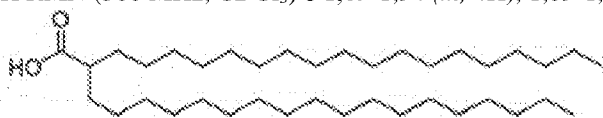
Greutate Moleculară: 609.03

La o soluție de 2,2-dioctadecilmalonat de dietil (3,39 g, 5,1 mmol) în 60 mL *i*PrOH, s-a adăugat o soluție de hidroxid de potasiu (11,0 g) în 60 mL apă, și amestecul s-a încălzit la reflux timp de 48 h.

TLC a arătat dispariția materialului de pornire cu o cantitate mică de mono-ester. Amestecul de reacție s-a răcit la temperatura camerei și s-a diluat cu apă. S-a adăugat acid sulfuric 47% pentru a se ajusta la pH = 2, și s-a observat un precipitat. Suspensia s-a filtrat și s-a spălat cu apă și diclorometan. Solidul s-a dizolvat în eter și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, s-a obținut acid 2,2-dioctadecilmalonic ca un solid alb (2,13 g, 68%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,89-1,94 (m, 4H), 1,09-1,32 (m, 66H), 0,88 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

20



Formulă Chimică: C<sub>38</sub>H<sub>76</sub>O<sub>2</sub>

Greutate Moleculară: 565.02

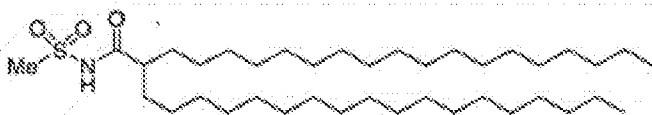
Un amestec de acid 2,2-dioctadecilmalonic (2,13 g, 3,5 mmol) în 60 mL *n*-decan s-a încălzit la reflux timp de 16 h. După îndepărtarea volatilelor sub vid, produsul brut s-a precipitat în cloroform pentru a da acid 2-octadecilicosanoic ca un solid alb (1,76g, 89%).

25

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2,28-2,36 (m, 1H), 1,40-1,56 (m, 4H), 1,08-1,33 (m, 64H), 0,87 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

#### *N*-(Metilsulfonyl)-2-octadecilicosanamidă

30



Formulă Chimică: C<sub>39</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>2</sub>S

Greutate Moleculară: 642.13

La 0 °C, clorură de oxalil (85 μL, 1 mmol) s-a adăugat lent într-o suspensie de acid 2-octadecilicosanoic (565 mg, 1 mmol) în 20 mL diclorometan și a fost urmată de 5 picături de *N,N*-dimetilformamidă, și apoi amestecul de reacție s-a încălzit până la temperatura camerei timp de 1h până când s-a transformat într-o soluție limpede. S-au adăugat trietilamină (0,56 mL, 4 mmol), metansulfonamidă (95 mg, 1 mmol) și *N,N*-dimetilpiridin-4-amină (12 mg, 0,1 mmol), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 48 h. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a precipitat în diclorometan pentru a da *N*-(metilsulfonyl)-2-

35

40

octadecilicosanamidă ca un solid alb (502 mg, 78%).  
 $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,30 (s, 3H), 2,10-2,16 (m, 1H), 1,40-1,62 (m, 4H), 1,24 (m, 64H), 0,87 (t, 6H,  $J = 7,1$  Hz).

***N*-(Metilsulfil)stearamidă**

5



Formulă Chimică:  $\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{NO}_2\text{S}$

Greutate Moleculară: 361.59

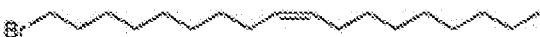
(Ref: WO2008/087190). La o soluție de metansulfonamidă (380 mg, 4,0 mmol), trietilamină (1,1 mL, 8,0 mmol) și *N,N*-dimetilpiridin-4-amină (49 mg, 0,4 mmol) în 30 mL diclorometan, s-a adăugat în picături o soluție de clorură de stearoil (1,21 g, 4 mmol), și apoi s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. MS a arătat produsul. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a precipitat în diclorometan pentru a da *N*-(metilsulfil)stearamidă ca un solid alb (580 mg, 40%).  
 $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,30 (s, 3H), 2,32 (t, 2H,  $J = 7,4$ Hz), 1,60-1,69 (m, 2H), 1,24 (m, 28H), 0,87 (t, 3H,  $J = 6,8$  Hz).

15

**Acid (Z)-2-((Z)-Octadec-9-en-1-il)icos-11-enoic**

**(Z)-1-Bromooctadec-9-enă**

20



Formulă Chimică:  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{Br}$

Greutate Moleculară: 331.38

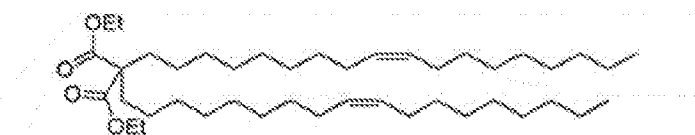
Un amestec de metansulfonat de (Z)-octadec-9-en-1-il (3,40 g, 9,81 mmol) și LiBr (4,00 g, 45 mmol) în 40 mL acetonă s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h, și apoi s-a încălzit la reflux timp de 4 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. După filtrare, filtratul s-a diluat cu apă și diclorometan. Stratul organic s-a separat și s-a spălat cu saramură. Apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu și s-a filtrat, filtratul s-a concentrat pentru a da (Z)-1-bromooctadec-9-enă (3,74 g, cant.).

25

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,32-5,36 (m, 2H), 3,40 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz), 1,97-2,02 (m, 4H), 1,82-1,88 (m, 2H), 1,10-1,44 (m, 22H), 0,87 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz).

30

**2,2-Di((Z)-octadec-9-en-1-il)malonat de dietil**



Formulă Chimică:  $\text{C}_{63}\text{H}_{104}\text{O}_4$

Greutate Moleculară: 661.11

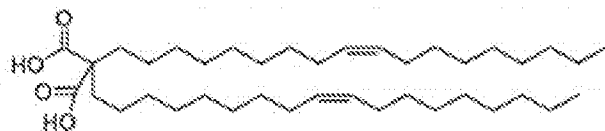
35

La o soluție de malonat de dietil (0,6 mL, 3,92 mmol) în 40 mL *N,N*-dimetilformamidă, s-a adăugat, la 0 °C NaH (470 mg, 11,76 mmol). După 45 min, s-a adăugat lent o soluție de (Z)-1-bromooctadec-9-enă (3,74 g, 9,8 mmol), și apoi s-a încălzit până la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat produsul dorit cu produs mono-substituit. Reacția s-a stins cu MeOH/AcOH/apă (5 mL fiecare), și apoi s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (80 g  $\text{SiO}_2$ ; eter/hexani

40

0 la 100%) pentru a da 2,2-di((Z)-octadec-9-en-1-il)malonat de dietil (1,68 g, 64%) și (Z)-2-(octadec-9-en-1-il)malonat de dietil (0,91 g).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,28-5,35 (m, 4H), 4,16 (q, 4H, J = 7,1 Hz), 1,94-2,04 (m, 8H), 1,80-1,87 (m, 4H), 1,06-1,36 (m, 54H), 0,87 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

5 **Acid 2,2-di((Z)-octadec-9-en-1-il)malonic**



Formulă Chimică: C<sub>39</sub>H<sub>72</sub>O<sub>4</sub>

Greutate Moleculară: 605.00

10

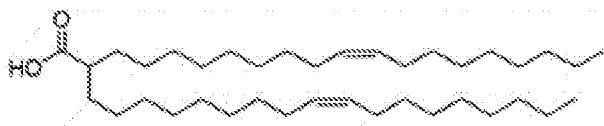
La o soluție de 2,2-di((Z)-octadec-9-en-1-il)malonat de dietil (1,68 g, 2,54 mmol) în 40 mL i-PrOH, s-a adăugat o soluție de hidroxid de potasiu (6 g) în 40 mL apă și amestecul s-a încălzit la reflux timp de 48 h. Amestecul de reacție s-a răcit la temperatura camerei și s-a diluat cu apă, s-a acidulat cu acid sulfuric 47% la pH = 2, nu s-a format solid. Amestecul s-a extras cu eter, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, reziduul s-a purificat cu ISCO (40 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani 0 la 35%) pentru a da acid 2,2-di((Z)-octadec-9-en-1-il)malonic ca un ulei incolor (1,36 g, 88%).

15

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,30-5,34 (m, 4H), 1,88-2,02 (m, 12H), 1,13-1,32 (m, 48H), 0,87 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

20

**Acid (Z)-2-((Z)-Octadec-9-en-1-il)icos-11-enoic**



Formulă Chimică: C<sub>38</sub>H<sub>72</sub>O<sub>2</sub>

Greutate Moleculară: 560.99

25

soluție de acid 2,2-di((Z)-octadec-9-en-1-il)malonic (1,36 g, 2,24 mmol) în 40 mL n-decan s-a încălzit la reflux timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. După concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (40 g SiO<sub>2</sub>:EtOAc/Hexani 0 la 20%) pentru a da acid (Z)-2-((Z)-octadec-9-en-1-il)icos-11-enoic ca un ulei incolor (0,96 g, 76%).

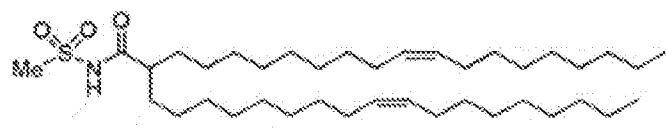
30

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,30-5,34 (m, 4H), 2,28-2,36 (m, 1H), 1,97-2,02 (m, 8H), 1,40-1,65 (m, 4H), 1,26 (m, 48H), 0,87 (t, 6H, J = 7,1 Hz).

MS (APCI): m/z (MH<sup>+</sup>) 561,6.

(Z)-N-(Metilsulfonil)-2-((Z)-octadec-9-en-1-il)icos-11-enamidă

35



Formulă Chimică: C<sub>39</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>2</sub>S

Greutate Moleculară: 638.09

40

La 0 °C, clorură de oxalil (70 μL, 0,82 mmol) s-a adăugat în picături într-o soluție de acid (Z)-2-



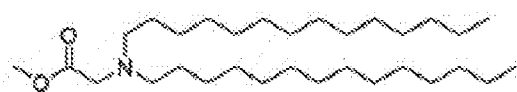
((Z)-octadec-9-en-1-il)icos-11-enoic 462 mg, 0,82 mmol) în 20 mL diclorometan și urmată de 5 picături de *N,N*-dimetilformamidă, și apoi s-a încălzit până la temperatura camerei timp de 1,5 h. S-au adăugat metansulfonamidă (78 mg, 0,82 mmol), trietilamină (0,46 mL, 3,29 mmol) și *N,N*-dimetilpiridin-4-amină (20 mg, 0,16 mmol) și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani 0 la 60%) pentru a da (Z)-*N*-(metilsulfonil)-2-((Z)-octadec-9-en-1-il)icos-11-enamidă ca o spumă albă.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,30-5,34 (*m*, 4H), 3,30 (*s*, 3H), 2,08-2,15 (*m*, 1H), 1,97-2,02 (*m*, 8H), 1,40-1,62 (*m*, 4H), 1,26 (*m*, 48H), 0,87 (*t*, 6H, *J*= 6,6 Hz).

MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 638,5.

#### Ditetradecilglicinat de litiu

#### 15 Ditetradecilglicinat de metil



Formulă Chimică: C<sub>31</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>2</sub>

Greutate Moleculară: 481,85

20

O soluție de clorhidrat de ester metilic de glicină (564 mg, 4,49 mmol) și trietilamină (0,93 mL, 6,74 mmol) în DCE (11 mL) a fost lăsat să se agite la temperatura camerei. După 15 minute, s-a adăugat tetradecanal (2,1 g, 9,89 mmol) în DCE (11 mL) și amestecul s-a răcit la 0 °C înainte de adăugarea triacetoxiborhidurii de sodiu (2,1 g, 9,89 mmol) și acid acetic (0,6 mL, 9,89 mmol). Reacția a fost lăsată să revină la temperatura camerei și s-a agitat timp de 16 ore. Reacția s-a stins prin adăugarea lentă de bicarbonat de sodiu saturat, și apoi s-a extras cu DCM. Extractele combinate s-au spălat cu saramură, s-au uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-au filtrat, și s-au concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-30% EtOAc/hexani) a dat ditetradecilglicinat de metil (1,93 g, 89%).  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,72 (*s*, 3H); 3,34 (*s*, 2H); 1,56 (*t*, 4H); 1,60-1,03 (*br. m*, 48H); 0,91 (*t*, 6H).

30

#### Ditetradecilglicinat de litiu



Formulă Chimică: C<sub>30</sub>H<sub>60</sub>LiNO<sub>2</sub>

Greutate Moleculară: 473,76

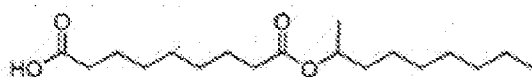
35

La o soluție de ditetradecilglicinat de metil (1,93 g, 4,0 mmol) în THF (100 mL) s-a adăugat LiOH 1M (90 mL, 90 mmol), și reacția a fost lăsată să se agite la 65°C timp de 16 ore. După răcirea la temperatura camerei, reacția s-a concentrat *in vid* la o pulbere albă. Pulberea s-a suspendat în apă, s-a filtrat, s-a spălat cu apă și eter etilic, și s-au uscat sub vid pentru a se obține ditetradecilglicinat de litiu (1,81g, 97%).  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,17 (*s*, 2H); 2,64 (*t*, 4H); 1,52 (*br. m*, 4H); 1,31 (*br. m*, 44H); 0,93 (*t*, 6H).

40

#### Compus : Acid 9-(Nonan-2-iloxi)-9-oxononanoic

45

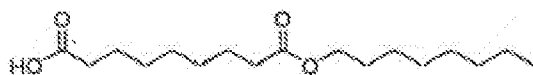


Formulă Chimică:  $C_{18}H_{34}O_4$   
Greutate Moleculară: 314,47

- 5 O soluție de acid nonandioic (500 mg, 2,66 mmol), nonan-2-ol (556  $\mu$ L, 3,19 mmol) și DMAP (65 mg, 0,53 mmol) în DCM (13 mL) s-a tratat cu EDC HCl (509 mg, 2,66 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la temperatura camerei sub azot timp de 20 ore. Reacția s-a stins cu  $H_2O$  și s-a extras de trei ori cu DCM. S-au spălat straturile organice cu  $NaHCO_3$  apos saturat urmat de 10% acid citric și saramură. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin
- 10 cromatografie pe silicagel (0-20% MeOH în DCM) pentru a se obține acid 9-(nonan-2-iloxi)-9-oxononanoic (350 mg, 1,11 mmol, 42%).
- UPLC/ELSD: RT = 2,21 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 313,0 pentru  $C_{18}H_{34}O_4$
- $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 6,27 (br. s, 1H); 4,87 (m, 1H); 2,27 (m, 4H); 1,60-1,39 (br. m, 6H); 1,31-1,25 (br. m, 16H); 1,17 (d, 3H); 0,86 (m, 3H).

15

#### Acid 9-(Octiloxi)-9-oxononanoic



Formulă Chimică:  $C_{17}H_{32}O_4$   
Greutate Moleculară: 300,44

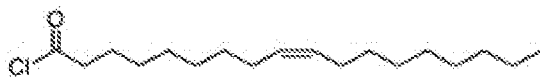
20

- O soluție de acid nonandioic (500 mg, 2,66 mmol), octan-1-ol (418  $\mu$ L, 3,19 mmol) și DMAP (65 mg, 0,53 mmol) în DCM (13 mL) s-a tratat cu EDC HCl (509 mg, 2,66 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la temperatura camerei sub azot timp de 20 ore. Reacția s-a stins cu  $H_2O$  și s-a extras de trei ori cu DCM. S-au spălat straturile organice cu  $NaHCO_3$  apos saturat urmat de 10% acid citric și saramură. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin
- 25 cromatografie pe silicagel (0-20% MeOH în DCM) pentru a se obține acid 9-(octiloxi)-9-oxononanoic (350 mg, 1,16 mmol, 44%).
- UPLC/ELSD: RT = 2,05 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 299,0 pentru  $C_{17}H_{32}O_4$
- 30  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 7,88 (br. s, 1H); 3,99 (t, 2H); 2,24 (m, 4H); 1,57-1,53 (br. m, 6H); 1,26-1,21 (br. m, 16H); 0,86 (m, 3H).
- Compusul : *N*-(Metilsulfonil)oleamidă

30

#### Clorură de oleoil

35

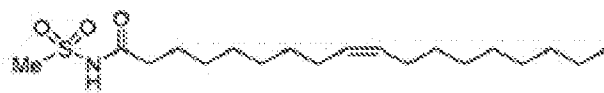


Formulă Chimică:  $C_{18}H_{33}ClO$   
Greutate Moleculară: 300,91

40

- La o soluție de acid oleic (5g, 17,70 mmol) în DCM (60 mL) la 0 °C s-a adăugat clorură de oxalil (1,65 mL, 19,47 mmol) urmată de DMF (13,8  $\mu$ L, 0,177 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la temperatura camerei și s-a agitat timp de 20 ore la temperatura camerei. Amestecul de reacție s-a concentrat *in vid* și s-a transportat fără altă purificare pentru a se obține clorură de oleoil (5,5 g, 18,28 mmol, >99%).
- 45  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 5,37 (m, 2H); 2,90 (t, 2H); 2,04 (m, 4H); 1,73 (m, 2H); 1,34-1,29 (br. m, 20H); 0,91 (m, 3H).

#### *N*-(metilsulfonil)oleamidă



Formulă Chimică:  $C_{19}H_{37}NO_3S$   
Greutate Moleculară: 359,57

- 5 La o soluție de clorură de oleoil (500 mg, 1,66 mmol) în DCM (8,3mL) s-a adăugat DMAP (305 mg, 2,49 mmol) și metansulfonamidă (237 mg, 2,49 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la temperatura camerei timp de 24 ore sub azot. Amestecul de reacție s-a stins cu HCl 1N și s-a extras cu EtOAc. Straturile organice s-au spălat cu  $NaHCO_3$ , apos saturat urmat de saramură. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. S-au triturat cu EtOAc și s-au concentrat prin filtrare *in vid* pentru a se obține N-(metilsulfonil)oleamidă (75 mg, 0,209 mmol, 13%).
- 10 UPLC/ELSD: RT = 2,67 min. MS (ES):  $m/z$  (M+Na) 382,0 pentru  $C_{19}H_{37}NO_3S$   
 $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 7,70 (br s, 1H); 5,37 (m, 2H); 3,33 (s, 3H); 2,35 (t, 2H); 2,04 (m, 4H); 1,69 (m, 2H); 1,34-1,29 (br. m, 20H); 0,90 (m, 3H).

### 15 N-(Ciclopropilsulfonil)oleamidă

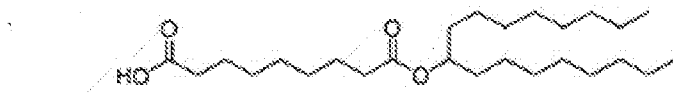


Formulă Chimică:  $C_{21}H_{39}NO_3S$   
Greutate Moleculară: 385,61

- 20 Un amestec de clorură de oleoil (500 mg, 1,66 mmol), DIPEA (868  $\mu$ L, 4,99 mmol), ciclopropansulfonamidă (242 mg, 1,99 mmol) și DMAP (102 mg, 0,83 mmol) s-au dizolvat în DCM (8,3 mL) și s-au lăsat să se agite la temperatura camerei timp de 24 ore sub azot.
- 25 Amestecul de reacție s-a stins cu în HCl și s-a extras cu EtOAc. Straturile organice s-au spălat cu  $NaHCO_3$ , apos saturat urmat de saramură. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-100% EtOAc în hexani) pentru a se obține N-(ciclopropilsulfonil)oleamidă (315 mg, 0,82 mmol, 42%).
- 30 UPLC/ELSD: RT = 2,83 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 384,0 pentru  $C_{21}H_{39}NO_3S$   
 $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 8,66 (br s, 1H); 5,35 (m, 2H); 2,98 (m, 1H); 2,34 (t, 2H); 2,02 (m, 4H); 1,66 (m, 2H); 1,37-1,28 (br. m, 22H); 1,13 (m, 2H); 0,89 (m, 3H).

### Acid 9-(Heptadecan-9-iloxi)-9-oxononanoic

35

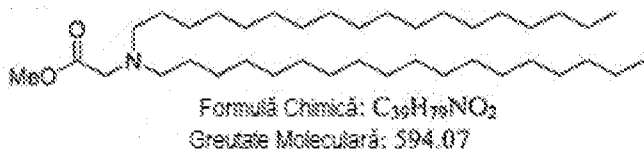


Formulă Chimică:  $C_{26}H_{50}O_4$   
Greutate Moleculară: 426,68

- 40 O soluție de acid nonandioic (500 mg, 2,66 mmol), heptadecan-9-ol (681 mg, 2,66 mmol) și DMAP (65 mg, 0,53 mmol) în DCM (13 mL) s-a tratat cu EDC·HCl (509 mg, 2,66 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la temperatura camerei sub azot timp de 20 ore. Reacția s-a stins cu  $H_2O$  și s-a extras de trei ori cu DCM. Straturile organice s-au spălat cu  $NaHCO_3$  apos saturat urmat de acid citric 10% și saramură. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-20% MeOH în DCM) pentru a se obține acid 9-(heptadecan-9-iloxi)-9-oxononanoic (350 mg, 1,05 mmol, 40%).
- 45 UPLC/ELSD: RT = 3,49 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 425,0 pentru  $C_{26}H_{50}O_4$   
 $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 11,02 (br. s, 1H); 4,89 (m, 1H); 2,33 (m, 4H); 1,66-1,64 (br. m, 4H); 1,53-1,51 (br. m, 4H); 1,35-1,28 (br. m, 30H); 0,90 (m, 6H).

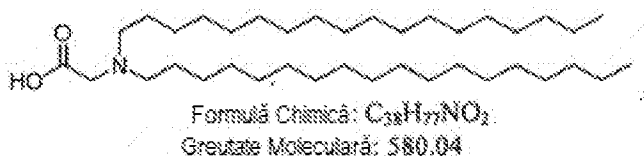
**Diocetadecilglicină****Diocetadecilglicinat de metil**

5



10 La o soluție de glicinat de metil (1 g, 11,22 mmol) și I -bromooctadecan (9,36 g, 28,06 mmol) în 1:1 CPME (10 mL):MeCN (10 mL) s-a adăugat  $K_2CO_3$  (9,31 g, 67,35 mmol) și KI (4,66 g, 28,06 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 81 °C timp de 72 ore. Amestecul de reacție brut a fost lăsat să se răcească la temperatura camerei, s-a filtrat și s-a concentrat *in vid*. Reziduul s-a dizolvat în EtOAc și s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras de trei ori cu EtOAc. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-40% (amestec de 1%  $NH_4OH$ , 20% MeOH în diclorometan) în diclorometan) pentru a se obține diocetadecilglicinat de metil (1,80 g, 3,03 mmol, 27%).

15  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 3,72 (s, 3H); 3,35 (s, 2H); 2,57 (m, 4H); 1,48-1,44 (br. m, 4H); 1,30-1,26 (br. m, 60H); 0,90 (m, 6H).

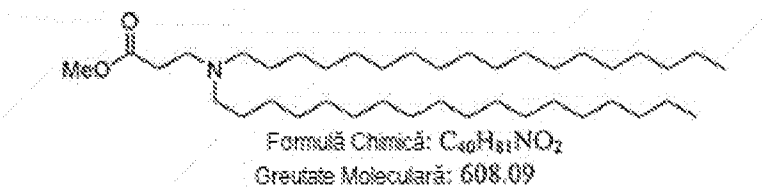
**Diocetadecilglicină**

25

S-a dizolvat diocetadecilglicinat de metil (1,8 g, 3,03 mmol) în EtOH (7,6 mL) și s-a adăugat 7,6 mL NaOH 2M la amestecul de reacție și reacția s-a lăsat să se agite la 80 °C timp de 2 ore. Amestecul de reacție s-a lăsat să se răcească la la temperatura camerei și s-a concentrat *in vid*. Amestecul de reacție s-a acidulat la pH 1 cu HCl 10%. Reziduul s-a extras de trei ori cu hexani și s-a concentrat *in vid* pentru a se obține diocetadecilglicină (305 mg, 0,526 mmol, 17%). UPLC/ELSD: RT = 3,81 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 581,0,0 pentru  $C_{38}H_{77}NO_2$

30  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 3,95 (s, 2H); 3,28 (m, 4H); 1,81 (m, 4H); 1,34-1,28 (br. m, 60H); 0,90 (m, 6H).

35

**Acid 3-(diocetadecilamino)propanoic****3-(Diocetadecilamino)propanoat de metil**

40

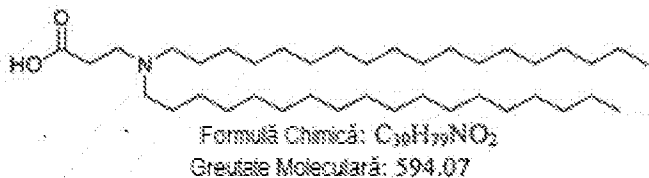
La o soluție de clorhidrat de 3-aminopropanoat de metil (1 g, 7,16 mmol) și 1-bromooctadecan (5,97 g, 17,91 mmol) în 1:1 CPME (10 mL):MeCN (10 mL) s-a adăugat  $K_2CO_3$  (5,94 g, 42,99 mmol) și KI (2,97 g, 17,91 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 81 °C timp de 18 ore. Amestecul de reacție brut a fost lăsat să se răcească la temperatura camerei, s-a filtrat și s-a concentrat *in vid*. Reziduul s-a dizolvat în EtOAc și s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras de trei ori cu EtOAc. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin

45

cromatografie pe silicagel (0-20% (amestec de 1% NH<sub>4</sub>OH, 20% MeOH în diclorometan) în diclorometan) pentru a se obține 3-(dioctadecilamino)propanoat de metil (5,01 g, 8,24 mmol, >99%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 2,80 (t, 2H); 2,49-2,38 (br. m, 6H); 1,46-1,41 (br. m, 4H); 1,32-1,28 (br. m, 60H); 0,90 (m, 6H).

### 5 Acid 3-(dioctadecilamino)propanoic



10

S-a dizolvat 3-(dioctadecilamino)propanoat de metil (5,01 g, 8,24 mmol) în EtOH (20,6 mL) și la amestecul de reacție s-au adăugat 20,6 mL NaOH 2M și reacția s-a lăsat să se agite la 80 °C timp de 2 ore. Amestecul de reacție s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei și s-a concentrat *in vid*.

Amestecul de reacție s-a acidulat la pH 1 cu HCl 10%. Reziduul s-a extras de trei ori cu hexani și s-a concentrat *in vid* pentru a se obține acid 3-(dioctadecilamino)propanoic (305 mg, 0,513 mmol, 6%).

15

UPLC/ELSD: RT = 3,75 min. MS (ES): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 595,0 pentru C<sub>39</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>2</sub>

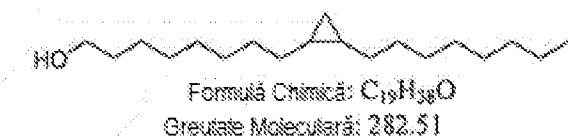
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 11,48 (br s, 1H); 3,34 (m, 2H); 3,07 (m, 6H); 1,80 (m, 4H); 1,35-1,28 (br. m, 60H); 0,90 (m, 6H).

20

### Acid 3-(Bis(8-(2-octilciclopropil)octil)amino)propanoic

#### 8-(2-Octilciclopropil)octan-1-ol

25



La o soluție de dietil zinc (20 mL, 20 mmol, 1M în hexani) în diclorometan (20 mL), s-a adăugat în picături o soluție de diiodometan (3,22 mL, 40 mmol) în diclorometan (10 mL). Amestecul de reacție s-a lăsat să se răcească la -40 °C timp de 5 min. Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite timp de 1 oră la -

30

40 °C și s-a adăugat o soluție de acid tricloroacetic (0,327 mg, 2 mmol) și DME (1mL, 9,6 mmol) în diclorometan (10 mL). Amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la -15 °C și lăsat să se agite la temperatura de -15 °C timp de 1 oră. S-a adăugat, la -15 °C o soluție de (Z)-octadec-9-en-1-ol (2,68, 10 mmol) în diclorometan (10 mL). Amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească lent la temperatura camerei și lăsat să se agite timp de 18 ore. Amestecul de reacție s-a spălat cu NH<sub>4</sub>Cl apos saturat (200

35

mL) și s-a extras cu diclorometan de trei ori. Straturile organice s-au spălat cu saramură, s-au uscat pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-20% acetat de etil în hexani). Solvenții s-au concentrat *in vid* și reziduul s-a repurificat prin cromatografie pe silicagel C18 (50-100% [MeCN cu 0,1%TFA]/ [apă cu 0,1% TFA]) pentru a se obține 8-(2-octilciclopropil)octan-1-ol (1,6 g, 5,7 mmol, 57%).

40

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,67 (t, 2H); 1,60 (m, 2H); 1,50-1,06 (m, 27H); 0,90 (m, 3H); 0,63 (m, 3H); -0,31 (m, 1H).

#### 1-(8-Bromoocil)-2-octilciclopropan

45



La o soluție de PPh<sub>3</sub> (1,33 g, 5,1 mmol) și 8-(2-octilciclopropil)octan-1-ol (1,35 g, 4,7 mmol) în DCM (15 mL) la 0 °C s-a adăugat, într-o porție, NBS (0,986 g, 5,5 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite

la 0 °C timp de 1 oră și apoi s-a încălzit la temperatura camerei și a fost lăsată să se agite timp de 1 oră. La amestecul de reacție s-au adăugat 300 mL de hexani, s-au filtrat printr-un dop de silicagel și s-au concentrat *in vid*. La amestecul de reacție s-au adăugat 200 mL de hexani, s-au filtrat printr-un dop de silicagel și s-au concentrat *in vid* pentru a se obține 1-(8-bromooctil)-2-octilciclopropan (1,44 g, 4,2

5 mmol, 89%).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,43 (t, 2H); 1,88 (m, 2H); 1,57-1,06 (m, 26H); 0,91 (m, 3H); 0,66 (m, 3H); -0,30 (m, 1H).

### 3-((8-(2-Octilciclopropil)octil)amino)propanoat de metil



Formulă Chimică: C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>2</sub>

Greutate Moleculară: 367,62

La o soluție de metil 3-aminopropanoate clorhidrat (200 mg, 1,45 mmol) și 1-(8-bromooctil)-2-octilciclopropan (1,26 g, 3,63 mmol) în 1:1 CPME (2 mL):MeCN (2 mL) s-a adăugat K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,21 g, 8,72 mmol) și KI (603,35 mg, 17,91 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 81 °C timp de 6 ore. Amestecul de reacție brut a fost lăsată să se răcească la temperatura camerei, s-a filtrat și s-a concentrat *in vid*. Reziduul s-a dizolvat în EtOAc și s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras de trei ori cu EtOAc. Straturile organice s-au uscat pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-20% DCM în MeOH) pentru a se obține 3-((8-(2-octilciclopropil)octil)amino)propanoat de metil (700 mg, 1,11 mmol, 76%).  
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,71 (s, 3H); 2,92 (t, 2H); 2,64 (t, 2H); 2,57 (t, 2H); 1,98 (br. s, 1H); 1,53-1,14 (br. m, 28H); 0,90 (m, 3H); 0,68-0,54 (br. m, 3H); -0,32 (m, 1H).

### 3-(bis(8-(2-Octilciclopropil)octil)amino)propanoat de metil



Formulă Chimică: C<sub>42</sub>H<sub>81</sub>NO<sub>2</sub>

Greutate Moleculară: 632,12

La o soluție de 3-((8-(2-octilciclopropil)octil)amino)propanoat de metil (700 mg, 1,9 mmol) și 1-(8-bromooctil)-2-octilciclopropan (280 mg, 0,82 mmol) în 1:1 CPME (7 mL):MeCN (7 mL) s-a adăugat K<sub>3</sub>CO<sub>3</sub> (0,23 mg, 1,63 mmol) și KI (135,47 mg, 0,82 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 81 °C timp de 6 ore. Amestecul de reacție brut a fost lăsată să se răcească la temperatura camerei, s-a filtrat și s-a concentrat *in vid*. Reziduul s-a dizolvat în EtOAc și s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras de trei ori cu EtOAc. Straturile organice s-au uscat pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-20% DCM în MeOH) pentru a se obține 3-(bis(8-(2-octilciclopropil)octil)amino)propanoat de metil (145 mg, 0,23 mmol, 28%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,70 (s, 3H); 2,91 (m, 2H); 2,67-2,52 (br. m, 6H); 1,51-1,14 (br. m, 56H); 0,91 (m, 6H); 0,68-0,55 (br. m, 6H); -0,32 (m, 2H).

### Acid 3-(Bis(8-(2-octilciclopropil)octil)amino)propanoic



Formulă Chimică: C<sub>41</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>2</sub>

Greutate Moleculară: 618,09

S-a dizolvat 3-(diocetadecilamino)propanoat de metil (145 mg, 0,23 mmol) în EtOH (0,6 mL) și la amestecul de reacție s-a adăugat NaOH 2M (0,6 mL) și reacția s-a lăsat să se agite la 40 °C timp de 2

ore. Amestecul de reacție s-a lăsat să se răcească la la temperatura camerei și s-a concentrat *in vid*. Amestecul de reacție s-a acidulat la pH 1 cu HCl 2N. Reziduul s-a extras de trei ori cu hexani și s-a concentrat *in vid* pentru a se obține acid 3-(bis(8-(2-octilciclopropil)octil)amino)propanoic (140 mg, 0,23 mmol, 98%).

5 UPLC/ELSD: RT = 3,67 min. MS (ES): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 619,0 pentru C<sub>41</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 11,10 (br s, 1H); 3,37 (m, 2H); 3,04 (br. m, 6H); 1,79 (br. m, 4H); 1,38-1,13 (br. m, 52H); 0,90 (m, 6H) 0,66-0,55 (br. m, 6H), -0,32 (m, 2H). 3-(di((Z)-Octadec-9-en-1-il)amino)propanoat de metil

## 10 (Z)-1-Bromooctadec-9-ene



15

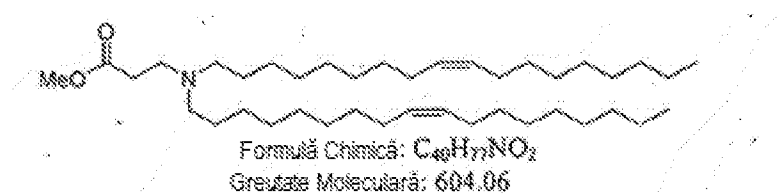
La o soluție de (Z)-octadec-9-en-1-ol (5 g, 18,62 mmol) și PPh<sub>3</sub> (5,18 g, 19,74 mmol) în DCM (60 mL) la 0 °C, s-a adăugat NBS (3,85 g, 21,60 mmol) într-o porție. Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 0 °C timp de 1 oră și apoi a fost lăsat să se încălzească lent la temperatura camerei și a fost lăsată să se agite timp de 1 oră. La amestecul de reacție s-au adăugat 240 mL de hexani, s-a filtrat printr-un dop de silicagel și s-a concentrat *in vid*. La amestecul de reacție s-au adăugat 200 mL de hexani, s-a filtrat printr-un dop de silicagel și s-a concentrat *in vid* pentru a se obține (Z)-1-bromooctadec-9-enă (4,70 g, 14,18 mmol, 76%).

20

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,37 (m, 2H); 3,43 (t, 2H); 2,04 (m, 4H); 1,87 (m, 2H); 1,47-1,30 (br. m, 22H); 0,91 (m, 3H).

25

## 3-(di((Z)-Octadec-9-en-il)amino)propanoat de metil



30

La o soluție de clorhidrat de 3-aminopropanoat de metil (100 mg, 0,72 mmol) și (Z)-1-bromooctadec-9-enă (594 mg, 1,79 mmol) în 1:1 CPME (2 mL):MeCN (2 mL) s-a adăugat K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (598 mg, 4,30 mmol) și KI (297 mg, 1,79 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 81 °C timp de 18 ore. Amestecul de reacție brut a fost lăsată să se răcească la temperatura camerei, s-a filtrat și s-a concentrat *in vid*. Reziduul s-a dizolvat în EtOAc și s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras de trei ori cu EtOAc. Stratul organic s-a uscat pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, s-a filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-20% (amestec de 1% NH<sub>4</sub>OH, 20% MeOH în diclorometan) în diclorometan) pentru a se obține 3-(di((Z)-octadec-9-en-il)amino)propanoat de metil (56 mg, 0,09 mmol, 13%).

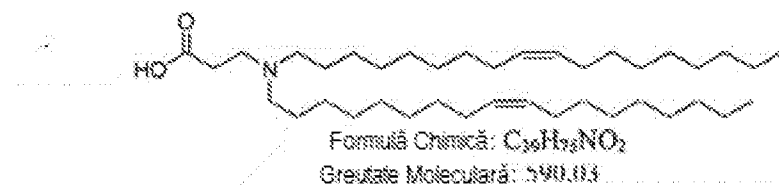
35

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,37 (m, 4H); 3,69 (s, 3H); 2,80 (t, 2H); 2,48-2,38 (br. m, 6H); 2,06-2,00 (br. m, 8H); 1,48-1,29 (br. m, 48H); 0,90 (m, 6H).

40

## Acid 3-(di((Z)-octadec-9-en-il)amino)propanoic

45



S-a dizolvat 3-(di((Z)-octadec-9-en-il)amino)propanoat de metil (56 mg, 0,09 mmol) în EtOH

(0,23 mL) și la amestecul de reacție s-a adăugat NaOH 2M (0,23 mL) și s-a lăsat amestecul de reacție să se agite la 30 °C timp de 30 min. Amestecul de reacție s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei și s-a concentrat *in vid*. Amestecul de reacție s-a acidulat la pH 1 cu HCl 2N. Reziduul s-a extras de trei ori cu hexani și s-a concentrat *in vid* pentru a se obține acid 3-(di((Z)-octadec-9-en-il)amino)propanoic (54 mg, 0,09 mmol, >99%).

UPLC/ELSD: RT = 3,55 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 591,0 pentru  $C_{39}H_{75}NO_2$

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 5,28 (m, 4H); 2,83 (m, 2H); 2,64 (m, 4H); 2,43 (m, 2H); 1,95-1,91 (br. m, 8H); 1,50 (m, 4H); 1,28-1,20 (br. m, 44H); 0,90 (m, 6H).

Acid (Z)-3-(octadec-9-en-1-ilamino)propanoic

### (Z)-3-(Octadec-9-en-1-ilamino)propanoat de metil



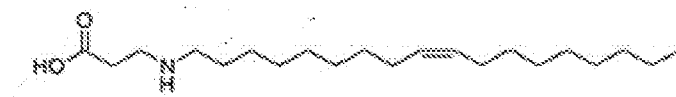
Formulă Chimică:  $C_{22}H_{43}NO_2$

Greutate Moleculară: 353,59

La o soluție de clorhidrat de 3-aminopropanoat de metil (100 mg, 0,72 mmol) și (Z)-1-bromo-octadec-9-ene (594 mg, 1,79 mmol) în 1:1 CPME (2 mL):MeCN (2 mL) s-a adăugat  $K_2CO_3$  (598 mg, 4,30 mmol) și KI (297 mg, 1,79 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 81 °C timp de 18 ore. Amestecul de reacție brut a fost lăsat să se răcească la temperatura camerei, s-a filtrat și s-a concentrat *in vid*. Reziduul s-a dizolvat în EtOAc și s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras de trei ori cu EtOAc. Straturile organice s-au uscat pe  $Na_2SO_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-20% MeOH în diclorometan) pentru a se obține (Z)-3-(octadec-9-en-1-ilamino)propanoat de metil (64 mg, 0,18 mmol, 25%).

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 5,36 (m, 2H); 3,70 (s, 3H); 2,90 (t, 2H); 2,62 (t, 2H); 2,54 (t, 2H); 2,18 (br. s, 1H); 2,05-1,98 (br. m, 4H); 1,52-1,45 (br. m, 2H); 1,36-1,28 (br. m, 22H); 0,89 (m, 3H).

Acid (Z)-3-(octadec-9-en-1-ilamino)propanoic



Formulă Chimică:  $C_{21}H_{41}NO_2$

Greutate Moleculară: 339,56

S-a dizolvat (Z)-3-(octadec-9-en-1-ilamino)propanoat de metil (64 mg, 0,18 mmol) în EtOH (0,91 mL) și la amestecul de reacție s-a adăugat NaOH 2M (0,91 mL) amestecul de reacție s-a lăsat să se agite la temperatura camerei timp de 1 oră. Amestecul de reacție s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei și s-a concentrat *in vid*. Amestecul de reacție s-a acidulat la pH 1 cu HCl 2N. Reziduul s-a extras de trei ori cu hexani și s-a concentrat *in vid* pentru a se obține acid (Z)-3-(octadec-9-en-1-ilamino)propanoic (60 mg, 0,18 mmol, 98%).

UPLC/ELSD: RT= 1,85 min. MS (ES):  $m/z$  ( $MH^+$ ) 340,3 pentru  $C_{21}H_{41}NO_2$

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 8,59 (br. s, 1H); 5,27 (m, 2H); 4,88 (br. s, 1H); 3,18 (m, 2H); 2,98-2,92 (br. m, 4H); 1,97-1,90 (br. m, 4H); 1,78 (m, 2H); 1,26-1,19 (br. m, 22H); 0,81 (m, 3H).

### Acid 3-(di((9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-il)amino)propanoic (6Z,9Z)-18-Bromo-octadeca-6,9-dienă



Formulă Chimică:  $C_{18}H_{33}Br$

Greutate Moleculară: 329,37

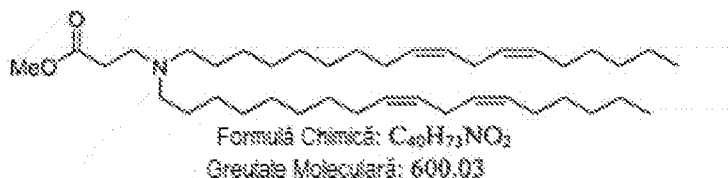
La o soluție de (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ol (5 g, 18,76 mmol) și  $PPh_3$  (5,22 g, 19,89



mmol) în DCM (60 mL) la 0 °C, s-a adăugat, într-o porție, NBS (3,87 g, 21,77 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 0 °C timp de 1 oră și apoi s-a lăsat să se încălzească lent la temperatura camerei și a fost lăsată să se agite timp de 1 oră. La amestecul de reacție s-au adăugat 240 mL de hexani, s-au filtrat printr-un dop de silicagel și s-au concentrat *in vid*. La amestecul de reacție s-au adăugat 200 mL de hexani, s-au filtrat printr-un dop de silicagel și s-au concentrat *in vid* pentru a se obține (6Z,9Z)-18-bromooctadeca-6,9-dienă (4,06 g, 12,33 mmol, 66%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,45-5,31 (br. m, 4H); 3,43 (t, 2H); 2,80 (m, 2H); 2,11-2,04 (br. m, 4H); 1,88 (m, 2H); 1,47-1,33 (br. m, 16H); 0,92 (m, 3H).

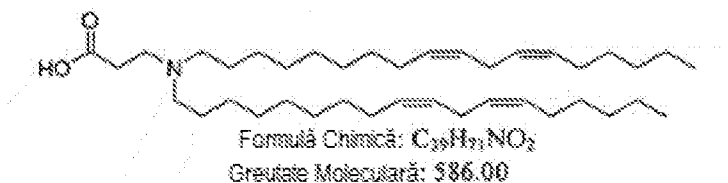
### 3-(di((9Z,12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-il)amino)propanoat de metil



La o soluție de metil 3-aminopropanoat clorhidrat (100 mg, 0,72 mmol) și (6Z,9Z)-18-bromooctadeca-6,9-diene (590 mg, 1,79 mmol) în 1:1 CPME (2 mL):MeCN (2 mL) s-a adăugat K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (600 mg, 4,30 mmol) și KI (300 mg, 1,79 mmol). Amestecul de reacție a fost lăsat să se agite la 50 °C timp de 18 ore apoi la 60 °C timp de 24 ore. Amestecul de reacție brut a fost lăsată să se răcească la temperatura camerei, s-a filtrat și s-a concentrat *in vid*. Reziduul s-a dizolvat în EtOAc și s-a spălat cu apă. Stratul apos s-a extras de trei ori cu EtOAc. Straturile organice s-au uscat pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziduul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-15% MeOH în diclorometan) pentru a se obține 3-(di((9Z,12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-il)amino)propanoat de metil (56 mg, 0,09 mmol, 13%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,38 (m, 8H); 3,69 (s, 3H); 2,83-2,77 (br. m, 6H); 2,50-2,39 (br. m, 6H); 2,11-2,04 (br. m, 8H); 1,46-1,30 (br. m, 36H); 0,91 (m, 6H).

### Acid 3-(di((9Z,12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-il)amino)propanoic

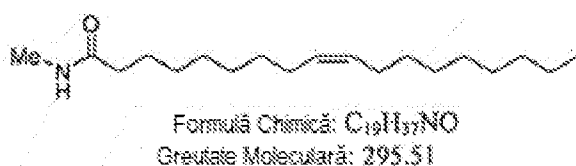


S-a dizolvat 3-(di((9Z,12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-il)amino)propanoat de metil (113 mg, 0,19 mmol) în EtOH (0,94 mL) și la amestecul de reacție s-a adăugat NaOH 2M (0,94 mL) și amestecul de reacție s-a lăsat să se agite la temperatura camerei timp de 1 oră și s-a concentrat *in vid*. Amestecul de reacție s-a acidulat la pH 1 cu HCl 1N. Reziduul s-a extras de trei ori cu hexani și s-a concentrat *in vid* pentru a se obține acid 3-(di((9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-il)amino)propanoic (106 mg, 0,18 mmol, 95%).

UPLC/ELSD: RT = 3,32 min. MS (ES): m/z (MH<sup>+</sup>) 586,8 pentru C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,38 (m, 8H); 2,88-2,77 (br. m, 6H); 2,65 (m, 4H); 2,47 (m, 2H); 2,11-2,04 (br. m, 8H); 1,58-1,52 (br. m, 4H); 1,43-1,28 (br. m, 32H); 0,91 (m, 6H).

### N-Metiloleamidă

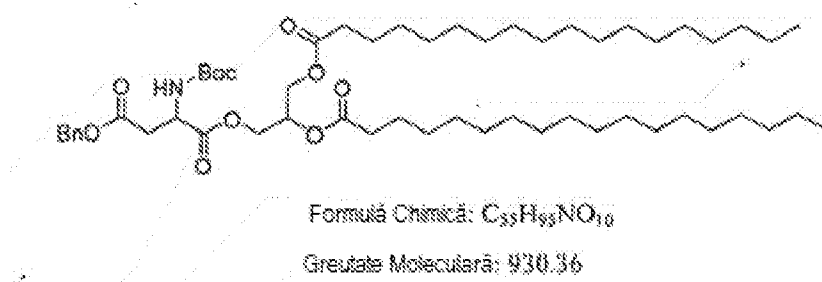


La o soluție de acid oleic (500 mg, 1,77 mmol) în THF (8 mL) s-a adăugat metilamină (885  $\mu$ L, 1,77 mmol) HATU (673 mg, 1,77 mmol) și DIPEA (617  $\mu$ L, 3,54 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la temperatura camerei timp de 3 ore. Reacția s-a stins cu acid citric 1N și s-a extras de trei ori cu eter etilic. Straturile organice s-au spălat cu apă și saramură. Straturile organice s-au uscat pe  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , s-au filtrat și s-au concentrat *in vid*. Reziuul s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (10-100% EtOAc în hexani) pentru a se obține *N*-metiloleamidă (495 mg, 1,67 mmol, 95%).

UPLC/ELSD: RT = 2,67 min. MS (ES):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 295,9 pentru  $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{NO}$

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 5,36 (m, 2H); 3,26 (br. s, 1H); 2,83 (d, 3H); 2,18 (t, 2H); 2,05-2,00 (br. m, 4H); 1,66-1,62 (br. m, 4H); 1,37-1,29 (br. m, 18H); 0,90 (m, 3H). 3-Amonio-4-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-oxobutanoat

#### Aspartat de 4-benzil 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) (*terț*-butoxicarbonil)

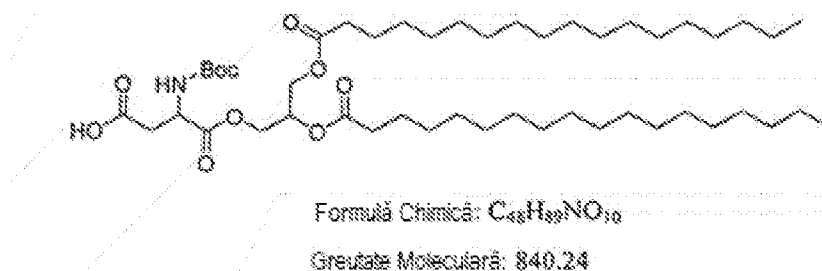


Un amestec de distearat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (625 mg, 1,0 mmol), acid 4-(benziloxi)-2-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic (647 mg, 2,0 mmol), EDCI (384 mg, 2,0 mmol) și DMAP (12 mg, 0,1 mmol) în 40 mL diclorometan s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (24 g  $\text{SiO}_2$ : EtOAc/Hexani 0 la 40%) pentru a da aspartat de 4-benzil 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) (*terț*-butoxicarbonil) ca un solid alb (918 mg, 98%).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,31-7,36 (m, 5H), 5,48 (m, 1H), 5,21 (m, 1H), 5,17 (s, 2H), 4,58-4,63 (m, 1H), 4,19-4,26 (m, 2H), 4,05-4,13 (m, 2H), 2,95-3,08 (m, 1H), 2,78-2,87 (m, 1H), 2,29 (dt, 4H,  $J = 7,4$  Hz, 1,9 Hz), 1,55-1,64 (m, 6H), 1,42 (s, 9H), 1,24 (bs, 54H), 0,87 (t, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 830,6.

#### Acid 4-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-3-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic



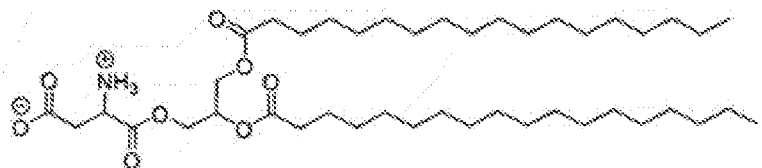
Un amestec de aspartat de 4-benzil 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) (*terț*-butoxicarbonil) (918 mg, 0,98 mmol) și Pd/C (5%, 300 mg) în 80 mL EtOAc s-a agitat timp de 16 h sub balon de hidrogen. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a filtrat prin Celită și s-a spălat cu diclorometan. Filtratul s-a concentrat pentru a da acid 4-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-3-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic ca un solid alb (805 mg, cant.), care s-a utilizat pentru etapa următoare fără purificare.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,46-5,52 (m, 1H), 5,26 (m, 1H), 4,58 (m, 1H), 4,07-4,44 (m, 4H), 2,76-3,06 (m, 2H), 2,30 (t, 4H,  $J = 7,4$  Hz), 1,54-1,64 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,24 (bs, 56H), 0,87 (t, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

MS (APCI):  $m/z$  (MH<sup>+</sup>) 740,6.

### 3-Amonio-4-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-oxobutanoat

5



Formulă Chimică: C<sub>43</sub>H<sub>83</sub>NO<sub>8</sub>

Greutate Moleculară: 740.12

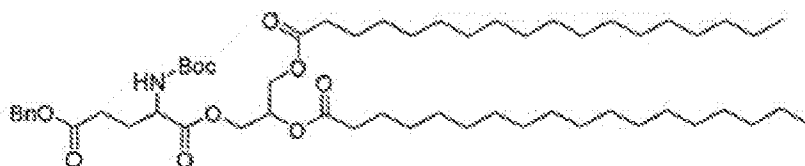
10 Acid 4-(2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)-3-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic (800 mg, 0,98 mmol) s-a dizolvat în 4M HCl în dioxan (5 mL), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 2 h. TLC a arătat dispariția materialului de pornire. În amestecul de reacție s-au adăugat hexani și s-a triturat pentru a da produsul dorit, 3-amonio-4-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-oxobutanoate ca un solid alb (701 mg, 92%).

15 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,23 (*bs*, 2H), 5,31 (*m*, 1H), 4,08-4,54 (*m*, 5H), 3,14-3,36 (*m*, 2H), 2,31 (*q*, 4H, *J* = 7,4 Hz), 1,58 (*m*, 4H), 1,24 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,1 Hz).

MS (APCI):  $m/z$  (MH<sup>+</sup>) 740,6.

### Clorură de 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-carboxi-1-oxobutan-2-aminu

20 **1-(2,3-Bis(stearoiloxi)propil) (*terț*-butoxicarbonil)glutamat de 5-benzil**



Formulă Chimică: C<sub>58</sub>H<sub>107</sub>NO<sub>10</sub>

Greutate Moleculară: 944.39

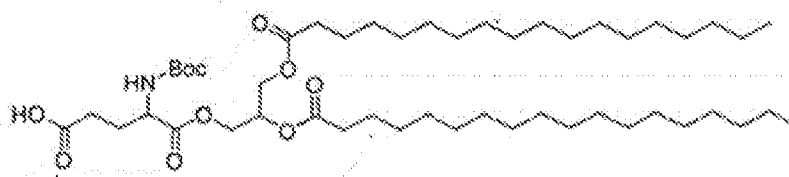
25

Un amestec de distearat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (625 mg, 1,0 mmol), acid 5-(benziloxi)-2-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoic (674 mg, 2,0 mmol), EDCI (384 mg, 2,0 mmol) și DMAP (12 mg, 0,1 mmol) în 40 mL diclorometan s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani 0 la 40%) pentru a da (*terț*-butoxicarbonil)glutamat de 5-benzil 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) ca un solid alb (950 mg, Cant.).

30 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,34 (*m*, 5H), 5,25 (*m*, 1H), 5,04-5,11 (*m*, 3H), 4,09-4,37 (*m*, 6H), 2,43-2,49 (*m*, 2H), 2,26-2,32 (*m*, 4H), 2,14-2,20 (*m*, 2H), 1,88-2,02 (*m*, 2H), 1,58 (*m*, 3H), 1,42 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 54H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,1 Hz).

35 MS (APCI):  $m/z$  (MH<sup>+</sup>) 844,6.

### Acid 5-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoic

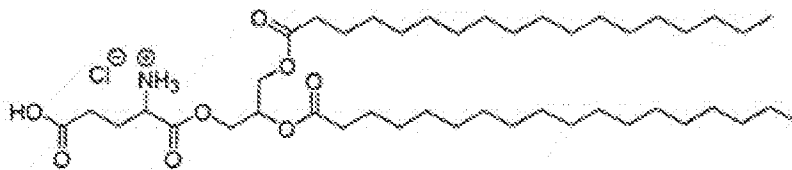


Formulă Chimică:  $C_{66}H_{117}NO_{13}$

Greutate Moleculară: 854.26

- 5 Un amestec de (*terț*-butoxicarbonil)glutamat de 5-benzil 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) (950 mg, 1,0 mmol) și Pd/C (5%, 300 mg) în 80 mL EtOAc s-a agitat timp de 16 h sub balon de hidrogen. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a filtrat prin Celită și s-a spălat cu diclorometan. Filtratul s-a concentrat pentru a da acid 5-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoic ca un solid alb (848 mg, 99%), care s-a utilizat pentru etapa următoare fără purificare.
- 10  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,39 (*m*, 0,5H), 6,25 (*m*, 0,5H), 5,10-5,29 (*m*, 2H), 4,06-4,34 (*m*, 3H), 3,74 (*m*, 1H), 3,25 (*m*, 1H), 2,44-2,52 (*m*, 2H), 2,31 (*q*, 2H,  $J = 6,8$  Hz), 2,00-2,21 (*m*, 5H), 1,54-1,66 (*m*, 4H), 1,44 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 54H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 754,6.

15 **Clorură de 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-carboxi-1-oxobutan-2-aminu**



Formulă Chimică:  $C_{64}H_{115}ClNO_8$

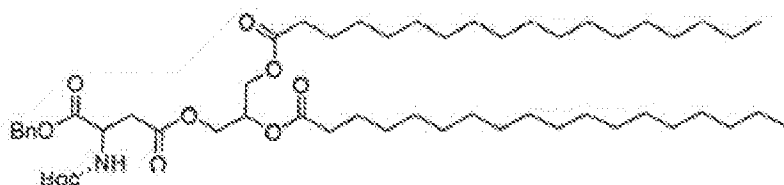
Greutate Moleculară: 790.61

- 20 Acid 4-(2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)-3-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic (848 mg, 0,99 mmol) s-a dizolvat în 4M HCl în dioxan (20 mL), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat dispariția materialului de pornire. În amestecul de reacție s-au adăugat hexani și s-a triturat pentru a da produsul dorit, clorura de 1-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-4-carboxi-1-oxobutan-2-
- 25 aminu ca un solid alb (740 mg, 94%).  
 $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,32 (*m*, 2H), 4,17-4,44 (*m*, 6H), 2,72 (*m*, 2H), 2,28-2,36 (*m*, 5H), 1,55-1,64 (*m*, 4H), 1,20-1,37 (*bs*, 58H), 0,88 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 754,6.

30 **Clorură de 3-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-1-carboxi-3-oxopropan-1-aminu**

**Aspartat de 1-benzil 4-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) (*terț*-butoxicarbonil)**

35



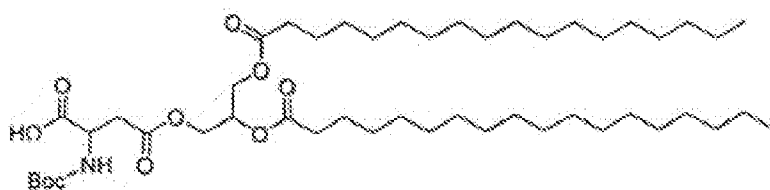
Formulă Chimică:  $C_{62}H_{113}NO_{13}$

Greutate Moleculară: 930.36

Un amestec de distearat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (625 mg, 1,0 mmol), acid 4-(benziloxi)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic (647 mg, 2,0 mmol), EDCI (384 mg, 2,0 mmol) și DMAP (12 mg, 0,1 mmol) în 40 mL diclorometan s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (40 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani 0 la 20%) pentru a da aspartat de 1-benzil 4-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) (*tert*-butoxicarbonil) ca un solid alb (942 mg, Cant.)

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,28-7,37 (*m*, 5H), 5,46-5,53 (*m*, 1H), 5,21 (*m*, 1H), 5,17 (*s*, 2H), 4,56-4,64 (*m*, 1H), 4,20-4,25 (*m*, 2H), 4,05-4,12 (*m*, 2H), 2,94-3,04 (*m*, 1H), 2,78-2,87 (*m*, 1H), 2,29 (*dt*, 4H, *J* = 7,6 Hz, 1,9 Hz), 1,56-1,64 (*m*, 4H), 1,42 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,8 Hz).  
MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 830:6.

#### Acid 4-(2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic



Formula Chimică: C<sub>43</sub>H<sub>89</sub>NO<sub>10</sub>

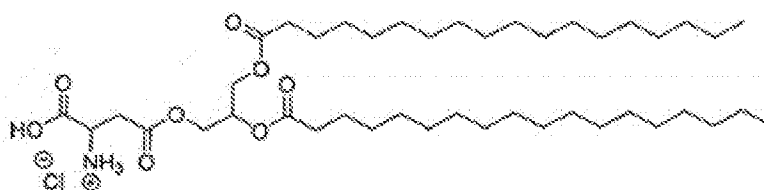
Greutate Moleculară: 840,24

Un amestec de 1-benzil 4-(2,3-bis(stearoiloxi)propil) (*tert*-butoxicarbonil)aspartat (942 mg, 1,0 mmol) și Pd/C (5%, 300 mg) în 80 mL EtOAc s-a agitat timp de 16 h sub balon de hidrogen. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a filtrat prin Celită și s-a spălat cu diclorometan. Filtratul s-a concentrat pentru a da acid 4-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic ca un solid alb (800 mg, 95%), care s-a utilizat pentru etapa următoare fără purificare.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,56 (*m*, 1H), 5,23-5,28 (*m*, 1H), 4,56 (*m*, 1H), 4,12-4,32 (*m*, 5H), 2,98-3,07 (*m*, 2H), 2,81-2,89 (*m*, 2H), 2,28-2,35 (*m*, 4H), 1,60 (*m*, 4H), 1,45 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 54H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 7,1 Hz).

MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 740,6.

#### Clorură de 3-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-1-carboxi-3-oxopropan-1-aminu



Formula Chimică: C<sub>43</sub>H<sub>82</sub>ClNO<sub>8</sub>

Greutate moleculară: 776,58

Acid 4-(2,3-Bis(stearoiloxi)propoxi)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic (800 mg, 0,95 mmol) s-a dizolvat în 4M HCl în dioxan (20 mL), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat dispariția materialului de pornire. În amestecul de reacție s-au adăugat hexani și s-a triturat pentru a da produsul dorit, clorură de 3-(2,3-bis(stearoiloxi)propoxi)-1-carboxi-3-oxopropan-1-aminu ca un solid alb (718 mg, 97%).

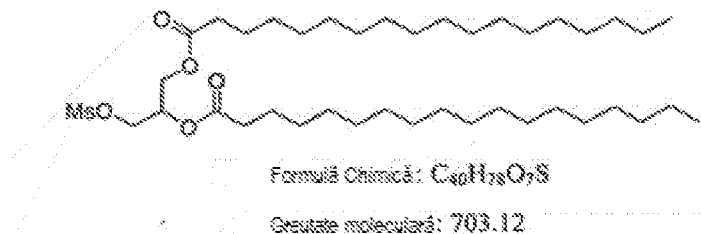
<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,29 (*m*, 1H), 4,53 (*m*, 1H), 4,12-4,38 (*m*, 5H), 3,28 (*m*, 2H), 2,32 (*q*, 4H, *J* = 7,7 Hz), 1,60 (*m*, 4H), 1,24 (*bs*, 59H), 0,88 (*t*, 6H, *J* = 6,6 Hz).

MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 740,6.

## Clorură de 1-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-4-carboxi-1-oxobutan-2-aminiu

## Distearat de 3-((metilsulfonil)oxi)propan-1,2-diil

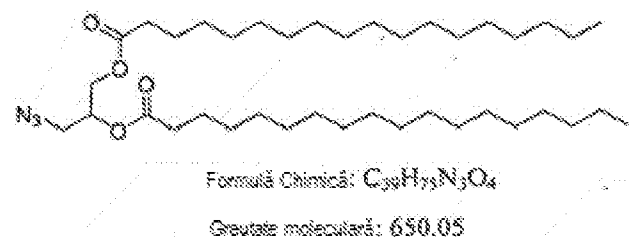
5



10 La o soluție de distearat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (6,25 g, 10 mmol) și trietilamină (1,81 mL, 12,5 mmol) în 100 mL diclorometan, s-a adăugat, în picături, la 0 °C clorură de metansulfonil (0,97 mL, 12,5 mmol), și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 48 h. TLC a arătat că reacția a fost completă, și amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan. Stratul organic combinat

15 s-a spălat cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu și saramură. După ce s-a uscat pe sulfat de sodiu, filtratul s-a concentrat pentru a da distearat de 3-((metilsulfonil)oxi)propan-1,2-diil ca un solid alb (7,07 g, cant.). RMN a arătat un amestec de mesilat și clorură, care s-a utilizat pentru etapa următoare fără altă purificare.

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5,23-5,30 (m, 1H), 4,29-4,41 (m, 3H), 4,17 (dd, 1H,  $J = 11,9$  Hz, 5,7 Hz), 2,43 (q, 4H,  $J = 7,6$  Hz), 1,61 (m, 3H), 1,24 (bs, 60H), 0,87 (t, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

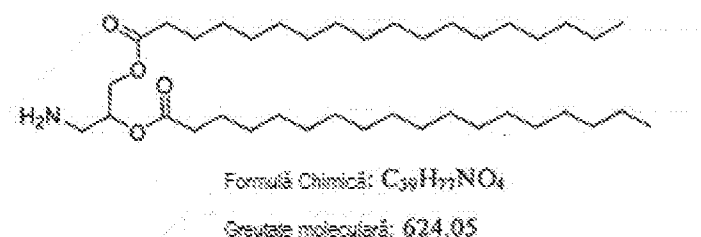
20 **Distearat de 3-azidopropan-1,2-diil**

25

Într-un tub etanș, un amestec de distearat de 3-((metilsulfonil)oxi)propan-1,2-diil (7,07 g, 10 mmol) și azidă de sodiu (3,26 g, 50 mmol) în 40 mL DMF s-a încălzit la 100 °C timp de 16 h. După răcirea la temperatura camerei, amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu un amestec de hexani/eter. Stratul organic s-a spălat cu apă și saramură. După s-a uscat pe sulfat de sodiu, filtratul s-a

30 concentrat și s-a purificat prin ISCO (120 g  $SiO_2$ : EtOAc/hexani 0 la 50%) pentru a da distearat de 3-azidopropan-1,2-diil ca un solid alb (5,40 g, 83%).

$^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5,17 (pent, 1H,  $J = 4,9$  Hz), 4,29 (dd, 1H,  $J = 11,9$  Hz, 4,6 Hz), 4,14 (dd, 1H,  $J = 11,9$  Hz, 5,5 Hz), 3,45 (t, 2H,  $J = 3,3$  Hz), 2,34 (dt, 4H,  $J = 10,2$  Hz, 7,4 Hz), 1,57-1,65 (m, 4H), 1,24 (bs, 56H), 0,87 (t, 6H,  $J = 7,1$  Hz).

35 **Distearat de 3-aminopropan-1,2-diil**

40

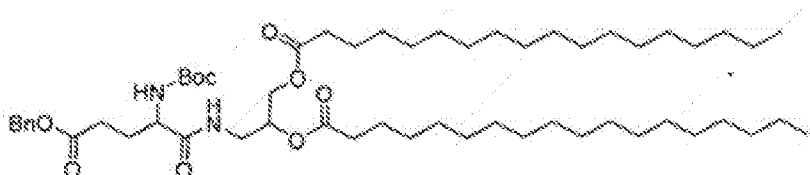
Un amestec de distearat de 3-azidopropan-1,2-diil (3,71 g, 5,7 mmol) și Pd/C (5%, Degussa

E10002U/W, Aldrich 330124, 370 mg) în 100 mL EtOAc s-a purjat cu azot și hidrogen de 3 ori, respectiv, și apoi reacția s-a agitat la temperatura camerei cu balon timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a filtrat prin Celită și s-a spălat cu diclorometan cald pentru a da distearat de 3-aminopropan-1,2-diil ca un solid alb (2,20 g, 62%). Acest compus are o solubilitate scăzută în majoritatea solvenților la temperatura camerei.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,90 (*m*, 0,5H), 5,74 (*m*, 0,5H), 3,91-4,20 (*m*, 2H), 3,12-3,70 (*m*, 2H), 2,30-2,36 (*m*, 3H), 2,18-2,25 (*m*, 1H), 1,53-1,66 (*m*, 6H), 1,24 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 7,1$  Hz).

MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 624,6.

#### 10 Distearat de 3-(5-(benziloxi)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanamido)propan-1,2-diil



Formulă Chimică:  $\text{C}_{526}\text{H}_{988}\text{N}_2\text{O}_{10}$

Greutate moleculară: 943,41

15

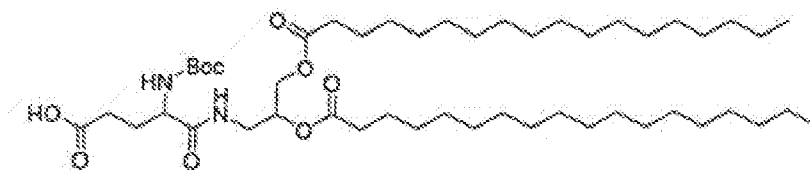
Un amestec de distearat de 3-aminopropan-1,2-diil (624 mg, 1,0 mmol), acid 5-(benziloxi)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoic (674 mg, 2,0 mmol), EDCI (384 mg, 2,0 mmol) și DMAP (12 mg, 0,1 mmol) în 70 mL/70 mL diclorometan/THF s-a încălzit la 45°C timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (40 g  $\text{SiO}_2$ : EtOAc/Hexani 0 la 20%) pentru a da distearat de 3-(5-(benziloxi)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanamido)propan-1,2-diil ca un solid alb (840 mg, 89%).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,31-7,39 (*m*, 5H), 6,25 (*m*, 1H), 5,39-5,44 (*m*, 1H), 5,12-5,22 (*m*, 3H), 4,08-4,53 (*m*, 4H), 2,44-2,49 (*m*, 4H), 2,20-2,38 (*m*, 2H), 2,30 (*m*, 4H), 2,16 (*m*, 1H), 1,95 (*m*, 1H), 1,55-1,64 (*m*, 1H), 1,43 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 943,7. 843,7.

30

#### Acid 5-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoic



Formulă Chimică:  $\text{C}_{526}\text{H}_{988}\text{N}_2\text{O}_{10}$

Greutate moleculară: 853,28

35

Un amestec de distearat de 3-(5-(benziloxi)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanamido)propan-1,2-diil (840 mg, 0,89 mmol) și Pd/C (5%, 250 mg) în 80 mL EtOAc s-a agitat timp de 16 h sub balon de hidrogen. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a filtrat prin Celită și s-a spălat cu diclorometan. Filtratul s-a concentrat pentru a da acid 5-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoic ca un solid alb (722 mg, 84%), care s-a utilizat pentru etapa următoare fără purificare.

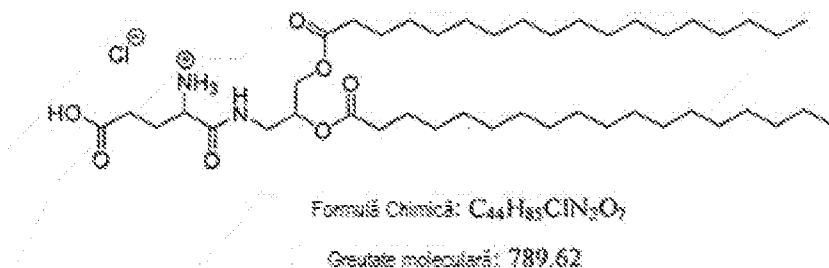
40

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,23-5,29 (*m*, 1H), 5,12-5,16 (*m*, 1H), 4,08-4,42 (*m*, 6H), 2,44-2,49 (*m*, 4H), 2,20-2,38 (*m*, 2H), 2,30 (*t*, 4H,  $J = 7,6$  Hz), 2,16 (*m*, 1H), 1,95 (*m*, 1H), 1,55-1,64 (*m*, 2H), 1,43 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 54H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 853,7, 753,6.

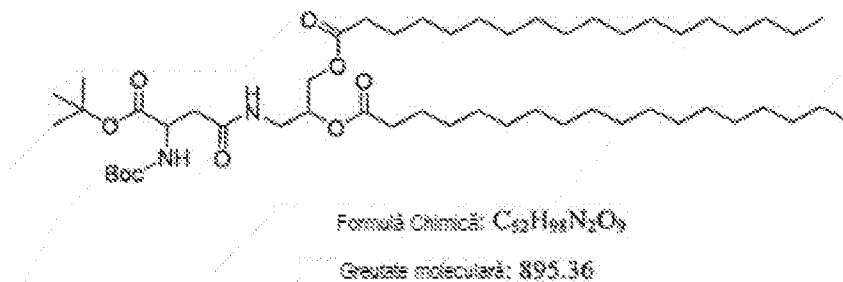
**Clorură de 1-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-4-carboxi-1-oxobutan-2-aminiiu**

5



Acid 5-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxopentanoic (722 mg, 0,84 mmol) s-a dizolvat în HCl 4M în dioxan (20 mL), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat dispariția materialului de pornire, și amestecul de reacție este o soluție limpede. După concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (aur 24 g SiO<sub>2</sub>: MeOH/diclorometan 0 la 50%) pentru a da produsul dorit, clorură de 1-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-4-carboxi-1-oxobutan-2-aminiiu ca un solid alb (610 mg, 91%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,43 (*bs*, 2H), 5,21 (*m*, 1H), 4,18-4,38 (*m*, 3H), 3,36-3,75 (*m*, 3H), 2,68 (*m*, 2H), 2,20-2,35 (*m*, 6H), 1,57 (*m*, 4H), 1,24 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,8 Hz).  
MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 753,6.

**Clorură de 3-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-1-carboxi-3-oxopropan-1-aminiiu**20 **Distearat de 3-(4-((*tert*-butoxi)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanamido)propan-1,2-diil**

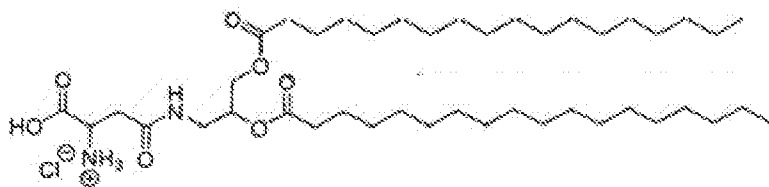
25

Un amestec de distearat de 3-aminopropan-1,2-diil (500 mg, 0,80 mmol), acid 4-((*tert*-butoxi)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)4-oxobutanoic (463 mg, 1,60 mmol), EDCI (307 mg, 1,60 mmol) și DMAP (10 mg, 0,08 mmol) în 70 mL/70 mL diclorometan/THF s-a încălzit la 45°C timp de 16 h. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (24 g SiO<sub>2</sub>: EtOAc/Hexani 0 la 40%) pentru a da distearat de 3-(4-((*tert*-butoxi)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanamido)propan-1,2-diil ca un solid alb (685 mg, 76%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,48 (*m*, 0,5H), 6,20 (*m*, 0,5H), 5,38 (*m*, 1H), 5,08-5,14 (*m*, 1H), 4,42-4,54 (*m*, 1H), 4,06-4,28 (*m*, 2H), 3,60-3,68 (*m*, 0,5H), 3,46-3,53 (*m*, 1H), 3,26-3,34 (*m*, 0,5H), 2,74-2,92 (*m*, 2H), 2,31 (*dt*, 2H, *J* = 7,5 Hz, 1,9 Hz), 2,19 (*t*, 2H, *J* = 7,7 Hz), 1,56-1,66 (*m*, 2H), 1,47 (*s*, 9H), 1,41-1,45 (*m*, 9H), 1,24 (*bs*, 58H), 0,87 (*t*, 6H, *J* = 6,8 Hz).  
MS (APCI): *m/z* (MH<sup>+</sup>) 895,7, 795,6.

40 **Clorură de 3-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-1-carboxi-3-oxopropan-1-aminiiu**





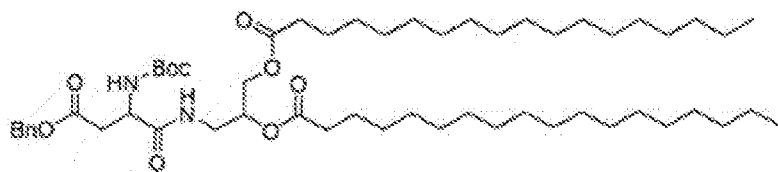
Formulă Chimică:  $C_{43}H_{83}ClN_2O_7$

Greutate moleculară: 775,59

- 5 Distearat de 3-(4-(*terț*-Butoxi)-3-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanamido)propan-1,2-diil (685 mg, 0,76 mmol) s-a dizolvat în HCl 4M în dioxan (10 mL), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat dispariția materialului de pornire. În amestecul de reacție s-au adăugat hexani și s-a triturat pentru a da produsul dorit, clorură de 3-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-1-carboxi-3-oxopropan-1-aminu ca un solid alb (520 mg, 88%).
- 10  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,26 (*bs*, 2H), 5,15 (*m*, 1H), 4,50 (*m*, 1H), 4,22 (*m*, 2H), 3,16-3,54 (*m*, 4H), 2,20-2,38 (*m*, 4H), 1,58 (*m*, 4H), 1,24 (*bs*, 56H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 739,6

15 **Clorură de 1-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-3-carboxi-1-oxopropan-2-aminu**

15 **Distearat de 3-(4-(Benziloxi)-2-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanamido)propan-1,2-diil**

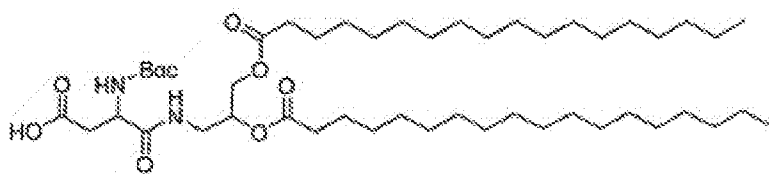


Formulă Chimică:  $C_{53}H_{106}N_2O_9$

Greutate moleculară: 929,38

- 20 Un amestec de distearat de 3-aminopropan-1,2-diil (320 mg, 0,51 mmol), acid 4-(benziloxi)-2-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic (332 mg, 1,02 mmol), EDCI (197 mg, 1,02 mmol) și DMAP (6 mg, 0,05 mmol) în 30 mL/30 mL diclorometan/THF s-a încălzit la 50 °C timp de 16 h. TLC a arătat produsul. Amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu diclorometan, și stratul organic combinat s-a spălat cu saramură și s-a uscat pe sulfat de sodiu. După filtrare și concentrare, produsul brut s-a purificat prin ISCO (24 g  $\text{SiO}_2$ : EtOAc/Hexani 0 la 40%) pentru a da distearat de 3-(4-(benziloxi)-2-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanamido)propan-1,2-diil ca un solid alb (310 mg, 64%).
- 25  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,31-7,39 (*m*, 5H), 6,24 (*m*, 1H), 5,39-5,43 (*m*, 1H), 5,11-5,22 (*m*, 3H), 4,53 (*m*, 1H), 4,06-4,22 (*m*, 2H), 3,72-3,80 (*m*, 1H), 2,88-3,10 (*m*, 2H), 2,26-2,32 (*m*, 2H), 2,12-2,17 (*m*, 2H), 1,53-1,64 (*m*, 9H), 1,44 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 50H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 929,7, 829,6.

35 **Acid 4-((2,3-Bis(stearoiloxi)propil)amino)-3-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic**



Formulă Chimică:  $C_{43}H_{80}N_2O_7$

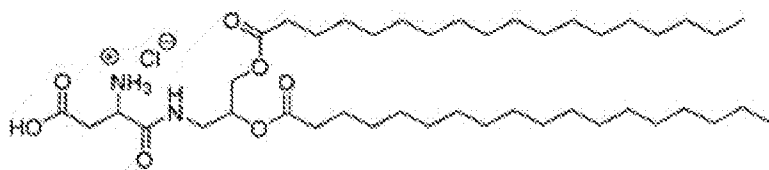
Greutate moleculară: 839,25

5 Un amestec de distearat de 3-(4-(benziloxi)-2-((terț-butoxicarbonil)amino)4-oxobutanamido)propan-1,2-diil (310 mg, 0,33 mmol) și Pd/C (5%, 100 mg) în 45 mL EtOAc s-a agitat timp de 16 h sub balon de hidrogen. TLC a arătat că reacția a fost completă. Amestecul de reacție s-a filtrat prin Celită și s-a spălat cu diclorometan. Filtratul s-a concentrat pentru a da acid 4-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-3-((terț-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic ca un solid alb (248 mg, 88%), care s-a utilizat pentru etapa următoare fără purificare.

10  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,29 (*m*, 1H), 5,54 (*m*, 1H), 5,17 (*m*, 1H), 4,52 (*m*, 1H), 4,128-4,26 (*m*, 1H), 4,11 (*q*, 2H,  $J = 6,8$  Hz), 3,72 (*m*, 1H), 3,25 (*m*, 1H), 2,85-3,08 (*m*, 2H), 2,26-2,34 (*m*, 2H), 2,12-2,20 (*m*, 2H), 2,04 (*s*, 2H), 1,59 (*m*, 4H), 1,44 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 52H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,6$  Hz).  
MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 839,7, 739,6.

15

#### Clorură de 1-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-3-carboxi-1-oxopropan-2-aminu



Formulă Chimică:  $C_{43}H_{83}ClN_2O_7$

Greutate moleculară: 775,59

20

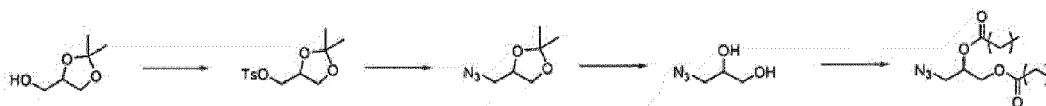
Acid 4-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-3-((terț-butoxicarbonil)amino)-4-oxobutanoic (248 mg, 0,29 mmol) s-a dizolvat în HCl 4M în dioxan (20 mL), și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 16 h. TLC a arătat dispariția materialului de pornire. În amestecul de reacție s-au adăugat hexani și s-a triturat pentru a da produsul dorit, clorură de 1-((2,3-bis(stearoiloxi)propil)amino)-3-carboxi-1-oxopropan-2-aminu ca un solid alb (170 mg, 78%).

25  $^1\text{HNMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,32 (*bs*, 2H), 5,19 (*m*, 1H), 4,24 (*m*, 2H), 3,14-3,65 (*m*, 4H), 2,20-2,38 (*m*, 4H), 1,58 (*m*, 4H), 1,44 (*s*, 9H), 1,24 (*bs*, 50H), 0,87 (*t*, 6H,  $J = 6,8$  Hz).

MS (APCI):  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) 739,6.

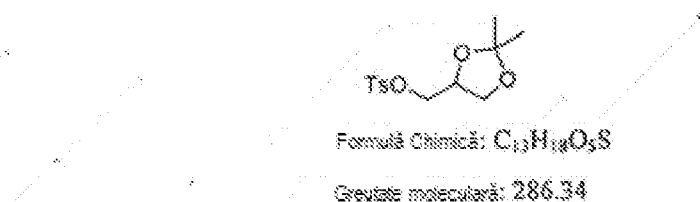
30

#### Procedura reprezentativă 1:



35

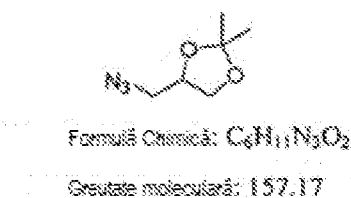
#### 4-Metilbenzensulfonat de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil



5 La o soluție la 0°C de Solketal (2,0 g, 15,1 mmol) în piridină (30 mL) s-a adăugat clorură de tosil (3,2 g, 16,6 mmol), și reacția a fost lăsată să revină la RT și s-a agitat timp de 12 ore. Amestecul s-a concentrat, și azeotropizat de două ori cu toluen. Materialul brut s-a preluat în DCM și s-a spălat cu apă, clorură de amoniu saturată, saramură, s-au uscat pe  $Na_2SO_4$  anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat *in vid*.  
10 Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-30% EtOAc/hexani) a furnizat 4-metilbenzensulfonat de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil (4,18 g, 96%).  
 $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 7,82 (d, 2H); 7,38 (d, 2H); 4,30 (m, 1H); 4,03 (m, 3H); 3,78 (m, 1H); 2,489 (s, 3H); 1,35 (m, 6H).

#### 4-(Azidometil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan

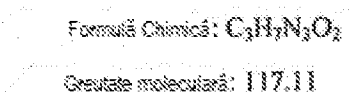
15



20 La o soluție de 4-metilbenzensulfonat de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil (4,18 g, 14,6 mmol) în DMF (36 mL) s-a adăugat azidă de sodiu (2,37 g, 36,5 mmol) și reacția a fost lăsată să se agite la 80°C timp de 12 ore. După răcirea la RT, reacția s-a stins cu bicarbonat de sodiu saturat și suspensia s-a filtrat. Soluția s-a extras x3 cu eter, și extractele eterice combinate s-au spălat cu saramură, s-au uscat pe  $MgSO_4$  anhidru, s-au filtrat, și s-au concentrat *in vid* în absență de căldură externă pentru a da 4-(azidometil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan cu DMF rezidual (3,37 g, 146%).  
25  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 4,29 (m, 1H); 4,08 (m, 1H); 3,79 (m, 1H); 3,50-3,26 (br. m, 2H); 1,49 (s, 3H); 1,38 (s, 3H).

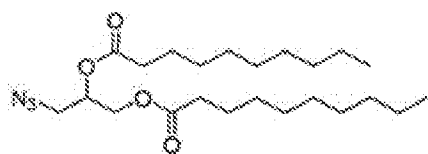
#### 3-Azidopropan-1,2-diol

30



35 La o soluție de 4-(azidometil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan (2,29 g, 14,6 mmol) în MeOH (75 mL) s-a adăugat acid tosilic monohidrat (1,39 g, 7,3 mmol) și reacția a fost lăsată să se agite la RT. După 4 ore, s-a adăugat carbonat de sodiu solid (3 g) și amestecul a fost lăsat să se agite timp de 20 minute. Suspensia s-a filtrat și s-a concentrat *in vid* în absență de căldurii externe. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (50-100% EtOAc/hexani) a furnizat 3-azidopropan-1,2-diol (1,35 g, 79%).  
40  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : ppm 3,90 (m, 1H); 3,80-3,57 (br. m, 2H); 3,44 (m, 2H); 2,42 (br, 2H).

#### 3-Azidopropan-1,2-diil bis(decanoat)



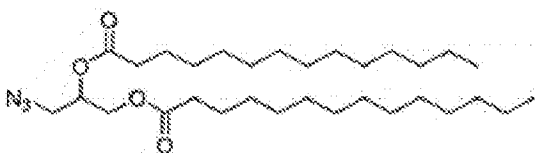
Formulă Chimică:  $C_{25}H_{43}N_3O_4$

Greutate moleculară: 425.61

- 5 La o soluție de 3-azidopropan-1,2-diol (100 mg, 0,854 mmol) și acid decanoic (368 mg, 2,13 mmol) în DCM (4 mL) s-a adăugat DCC (440 mg, 2,13 mmol) și DMAP (260 mg, 2,13 mmol), și reacția a fost lăsată să se agite la RT timp de 48 ore. Amestecul s-a filtrat, și solidele s-au clătit cu DCM. Filtratul s-a spălat cu acid citric 10%, bicarbonat de sodiu saturat, saramură, s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-30% EtOAc/hexani) a furnizat 3-azidopropan-1,2-diil bis(decanoat) (318 mg, 88%).
- 10  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 5,20 (chint, 1H); 4,37-4,12 (br. m, 2H); 3,49 (m, 2H); 2,35 (m, 4H); 1,65 (m, 4H); 1,42-1,10 (br. m, 24H); 0,90 (t, 6H).

#### Ditradecanoat de 3-Azidopropan-1,2-diil

15



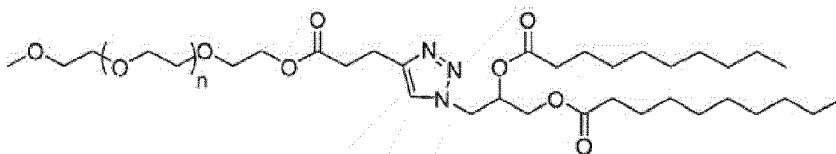
Formulă Chimică:  $C_{31}H_{59}N_3O_4$

Greutate moleculară: 537.83

- 20 În aceeași manieră ca 3-azidopropan-1,2-diil bis(decanoat), ditradecanoat de 3-azidopropan-1,2-diil s-a sintetizat din 3-azidopropan-1,2-diol (300 mg, 2,56 mmol), acid miristic (1,46 g, 6,40 mmol), DCC (1,32 g, 6,40 mmol), și DMAP (782 mg, 6,40 mmol) în DCM (12 mL). Randament (1,21 g, 88%).
- $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 5,20 (chint, 1H); 4,37-4,12 (br. m, 2H); 3,49 (m, 2H); 2,35 (m, 4H); 1,65 (m, 4H); 1,42-1,10 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).



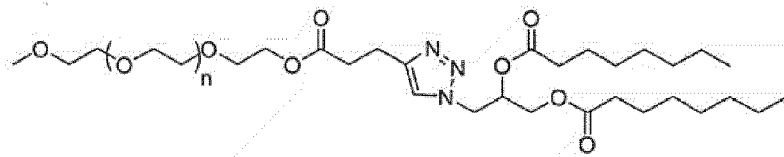
- 25 **Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C10**



30

- 35 La o soluție de O-(2-Azidoetil)-O'-metilpolietilen glicol 2000 (587 mg, 0,29 mmol) și 3-azidopropan-1,2-diil bis(decanoat) (150 mg, 0,35 mmol) în t-butanol (1,5 mL) și apă (1,5 mL) s-a adăugat  $\text{CuSO}_4$  (12 mg, 0,07 mmol) și ascorbat de sodiu (29 mg, 0,15 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la RT timp de 24 ore și apoi s-a concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) a furnizat produsul dorit (205 mg, 29%).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 7,46 (s, 1H); 5,39 (chint, 1H); 4,58 (m, 2H); 4,38-4,20 (br. m, 4H); 4,09 (m, 2H); 3,89 (m, 2H); 3,67 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 3,07 (m, 2H); 2,77 (m, 2H); 2,33 (m, 4H); 1,86 (br, 4,6H, apă); 1,60 (m, 4H); 1,29 (br. m, 24H); 0,90 (t, 6H).

**Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C8**

5

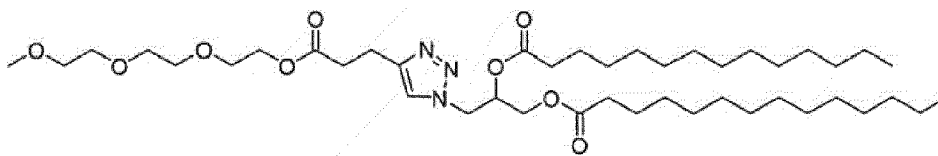
În aceeași manieră ca C10, C8 s-a sintetizat din O-(2-Azidoetil)-O'-metilpolietilenglicol 2000 (250 mg, 0,125 mmol), dioctanoat de 3-azidopropan-1,2-diil (56 mg, 0,15 mmol), CuSO<sub>4</sub> (5 mg, 0,03 mmol) și ascorbat de sodiu (13 mg, 0,06 mmol) în t-butanol (1,5 mL) și apă (1,5 mL). Randament (73 mg, 25%).

10

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,44 (s, 1H); 5,39 (chint, 1H); 4,58 (m, 2H); 4,38-4,20 (br. m, 4H); 4,09 (m, 2H); 3,89 (m, 2H); 3,67 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 3,07 (m, 2H); 2,77 (m, 2H); 2,33 (m, 4H); 1,86 (br, 3H, apă); 1,60 (m, 4H); 1,29 (br. m, 16H); 0,90 (t, 6H).

**Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C14**

15

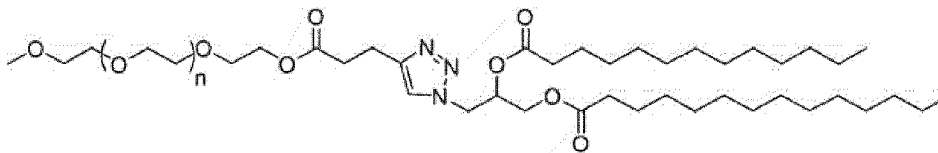


20

În aceeași manieră ca C10, C14 s-a sintetizat din ditetradecanoat de 3-azidopropan-1,2-diil. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,57 (s, 1H); 5,39 (chint, 1H); 4,62 (m, 2H); 4,42-3,85 (br. m, 8H); 3,77-3,49 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 3,11 (m, 2H); 2,80 (m, 2H); 2,33 (m, 4H); 1,87-1,45 (br. m, 4H + 20H apă); 1,42-1,16 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

**Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C13/C14**

25

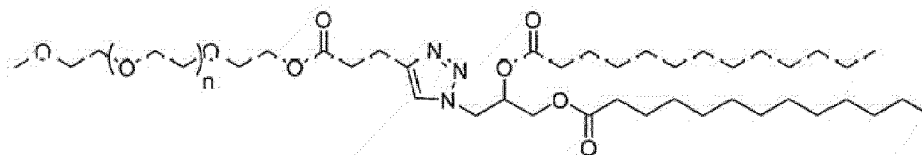


30

În aceeași manieră ca C10, C13/14 s-a sintetizat din tetradecanoat de 1-azido-3-(tridecanoiloxi)propan-2-il.

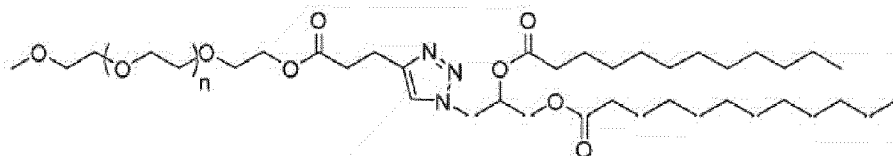
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,55 (s, 1H); 5,39 (chint, 1H); 4,61 (m, 2H); 4,39-3,81 (br. m, 8H); 3,79-3,49 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 3,10 (m, 2H); 2,80 (m, 2H); 2,33 (m, 4H); 1,75-1,47 (m, 4H); 1,42-1,16 (br. m, 38H); 0,90 (t, 6H).

35

**Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C13**

40

În aceeași manieră ca C10, C13 s-a sintetizat din ditridecanoat de 3-azidopropan-1,2-diil. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,68 (s, 1H); 5,33 (chint, 1H); 4,65 (m, 2H); 4,36-3,85 (br. m, 8H); 3,78-3,55 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 3,15 (m, 2H); 2,80 (m, 2H); 2,33 (m, 4H); 1,78-1,38 (m, 4H + 24H apă); 1,38-1,20 (br. m, 36H); 0,90 (t, 6H).

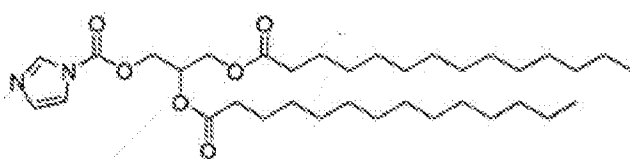
**Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C12**

5

În aceeași manieră ca C10, C12 s-a sintetizat din didodecanoat de 3-azidopropan-1,2-diil.  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,59 (s, 1H); 5,40 (chint, 1H); 4,62 (m, 2H); 4,37-3,83 (br. m, 8H); 3,78-3,48 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 3,12 (m, 2H); 2,82 (m, 2H); 2,33 (m, 4H); 2,09-1,82 (br. m, 7H apă); 1,60 (m, 4H); 1,39-1,17 (br. m, 32H); 0,90 (t, 6H)

10

**Compus: Ditetradecanoat de 3-((1H-imidazol-1-carbonil)oxi)propan-1,2-diil**



Formula Chimică: C<sub>32</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

Greutate moleculară: 606.89

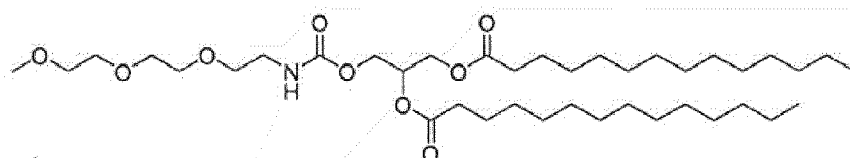
15

O soluție de ditetradecanoat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (0,10 g, 0,2 mmol), CDI (65 mg, 0,40 mmol) și Et<sub>3</sub>N în DCM (1 mL) a fost lăsat să se agite la RT timp de 2 h. După acest timp reacția s-a stins cu acid citric 10% și straturile s-au separat. Organicele s-au spălat cu sare, s-au uscat pe MgSO<sub>4</sub>, s-au filtrat și s-au concentrat pentru a se obține ditetradecanoat de 3-((1H-imidazol-1-carbonil)oxi)propan-1,2-diil (97 mg, 80%) care s-a trecut mai departe fără nicio purificare.

20

**Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-carbamat-glicerol C14**

25

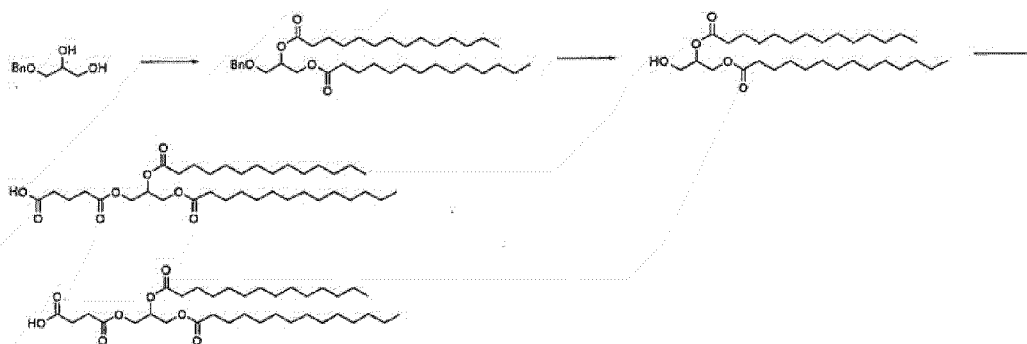


Ditetradecanoat de 3-((1H-Imidazol-1-carbonil)oxi)propan-1,2-diil (97 mg, 0,16 mmol) MeO-PEG<sub>2K</sub>-NH<sub>2</sub> (100 mg, 0,053 mmol), DMAP (2 mg, 0,011 mmol) și bază Hunig (0,055 mL, 0,32 mmol) s-au combinat în THF și s-au lăsat să se agite la 65 °C timp de 6 h și apoi la RT timp de 48 h. Reacția s-a concentrat și s-a dizolvat în DCM pentru purificare. Materialul brut s-a purificat prin cromatografie pe silicagel (0-20% MeOH în DCM cu 1% NH<sub>4</sub>OH) pentru a da 107 mg din produsul dorit.  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,26 (m, 1H); 4,36-4,06 (br. m, 4H); 3,93-3,42 (br. m, 170-200H); 3,39 (s, 3H); 3,30 (m, 2H); 2,32 (t, 4H); 1,78 (m, 4H); 1,61 (br. m, 5H apă); 1,42-1,20 (br. m, 40H); 0,89 (t, 6H).

30

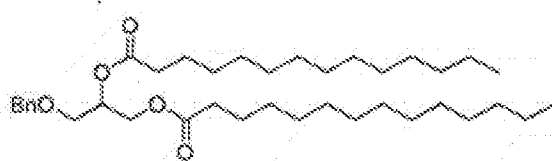
35

**Procedura reprezentativă 2**



Ditetradecanoat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil

5

Formulă Chimică:  $C_{348}H_{600}O_8$ 

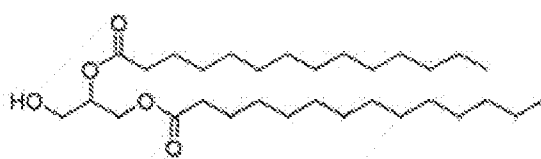
Greutate moleculară: 602.94

10 La o soluție de 3-(benziloxi)propan-1,2-diol (1,0 g, 5,5 mmol) și acid miristic (3,1 g, 13,7 mmol) în DCM (26 mL) s-a adăugat DCC (2,8 g, 13,7 mmol) și DMAP (1,7 g, 13,7 mmol), și reacția a fost lăsată să se agite la RT timp de 72 ore. Amestecul s-a filtrat, și solidele s-au clătit cu DCM. Filtratul s-a spălat cu acid citric 10%, bicarbonat de sodiu saturat, saramură, s-au uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-au filtrat, și s-au concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-30% EtOAc/hexani) a furnizat ditetradecanoat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil (2,78 g, 84%).

15  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 7,34 (br. m, 5H); 5,27 (chint, 1H); 4,56 (m, 2H); 4,44-4,14 (br. m, 2H); 3,61 (m, 2H); 2,32 (m, 4H); 1,62 (m, 4H); 1,40-1,06 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

Ditetradecanoat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil

20

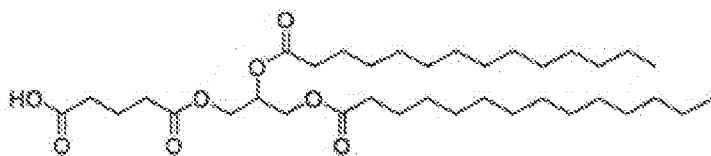
Formulă Chimică:  $C_{332}H_{584}O_7$ 

Greutate moleculară: 512.82

25 Într-un balon de reacție umplut cu azot care conține paladiu pe carbon (10 gr. %, 490 mg, 0,461 mmol) s-a adăugat ditetradecanoat de 3-(benziloxi)propan-1,2-diil (2,78 g, 4,61 mmol) și EtOH (22 mL). Balonul s-a evacuat și s-a reumplut cu  $\text{H}_2$  de trei ori, și s-a lăsat la agitat la RT și 1 atm  $\text{H}_2$  timp de 12 ore. Amestecul s-a filtrat prin celită, clătind cu EtOAc, și filtratul s-a concentrat *in vid* pentru a da ditetradecanoat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (1,50 g, 64%).

30  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 5,11 (chint, 1H); 4,30 (m, 2H); 3,75 (m, 2H); 2,36 (m, 4H); 1,72-1,10 (br. m, 44H); 0,91 (t, 6H).

Acid 5-(2,3-Bis(tetradecanoiloxi)propoxi)-5-oxopentanoic



Formula Chimică:  $C_{36}H_{74}O_8$

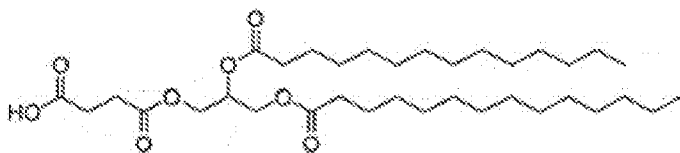
Greutate moleculară: 626.92

5 La o soluție de ditetradecanoat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (300 mg, 0,585 mmol) și acid glutaric (77 mg, 0,585 mmol) în DCM (4 mL) s-a adăugat DCC (121 mg, 0,585 mmol) și DMAP (71 mg, 0,585 mmol), și reacția a fost lăsată să se agite la RT timp de 12 ore. Amestecul s-a filtrat și solidele s-au clătit cu DCM. Filtratul s-a spălat cu acid citric la 10%, saramură, s-au uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) a furnizat acid 5-(2,3-bis(tetradecanoiloxy)propoxi)-5-oxopentanoic (93 mg, 25%).

10  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 5,29 (chint, 1H); 4,41-4,11 (br. m, 4H); 2,46 (m, 4H); 2,34 (m, 4H); 1,99 (m, 2H); 1,63 (m, 4H); 1,40-1,10 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

**Acid 4-(2,3-bis(tetradecanoiloxy)propoxi)-4-oxobutanoic**

15



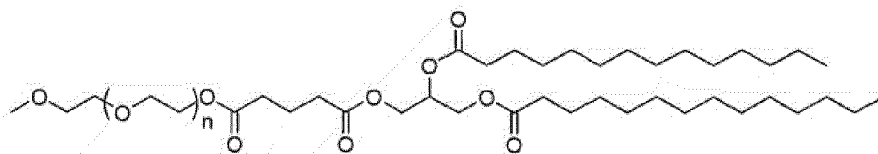
Formula Chimică:  $C_{33}H_{64}O_8$

Greutate moleculară: 612.89

20 În aceeași manieră ca acidul 5-(2,3-bis(tetradecanoiloxy)propoxi)-5-oxopentanoic, s-a sintetizat acidul 4-(2,3-bis(tetradecanoiloxy)propoxi)-4-oxobutanoic din ditetradecanoat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (300 mg, 0,585 mmol), acid glutaric (69 mg, 0,585 mmol), DCC (121 mg, 0,585 mmol) și DMAP (71 mg, 0,585 mmol) în DCM (4 mL). Randament (267 mg, 75%).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 5,29 (chint, 1H); 4,41-4,11 (br. m, 4H); 2,69 (m, 4H); 2,34 (m, 4H); 1,63 (m, 4H); 1,46-1,10 (br. m, 10H); 0,90 (t, 6H).

25 **Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-propil-ester-glicerol C14**



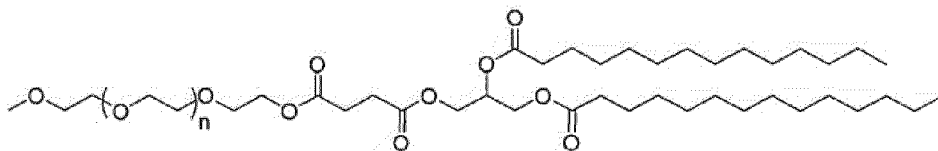
30

La o soluție de metoxi-PEG<sub>2000</sub> (247 mg, 0,124 mmol) și acid 5-(2,3-bis(tetradecanoiloxy)propoxi)-5-oxopentanoic (93 mg, 0,148 mmol) în DCM (2 mL) s-a adăugat DCC (31 mg, 0,148 mmol) și DMAP (19 mg, 0,148 mmol) și reacția a fost lăsată să se agite la 40°C timp de 12 ore. Amestecul a fost lăsat să se răcească la RT și s-a concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă ISCO C18 (50-100% [MeCN 0,1% TFA]/[apă 0,1% TFA]) a furnizat produsul dorit (75 mg, 23%).

35  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 5,28 (chint, 1H); 4,38-4,07 (br. m, 6H); 3,90 (m, 2H); 3,79-3,48 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 2,48-1,89 (br. m, 10H); 1,64 (br. m, 4H + 7,25H apă); 1,41-1,08 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

**Compus : Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-etil-ester-glicerol C14**





5 În aceeași manieră ca în procedura reprezentativă 2, compusul s-a sintetizat din metoxi-PEG<sub>2000</sub> (272 mg, 0,136 mmol), acid 4-(2,3-bis(tetradecanoiloxi)propoxi)-4-oxobutanoic (100 mg, 0,163 mmol), DCC (34 mg, 0,163 mmol), și DMAP (20 mg, 0,163 mmol) în DCM (2 mL). Randament (134 mg, 38%).  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,28 (m, 1H); 4,39-4,10 (br. m, 6H); 3,89 (m, 2H); 3,79-3,48 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 2,67 (m, 4H); 2,33 (m, 4H); 1,63 (m, 4H + 7,25 H apă); 1,42-1,16 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

10 **Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18**

*Procedura reprezentativă 3*

**Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18**

15

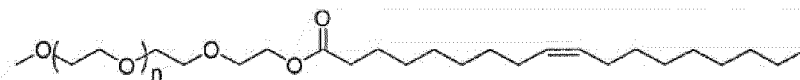


20 La o soluție de metoxi-PEG<sub>2000</sub> (1,0 g, 0,50 mmol) și acid stearic (171 mg, 0,60 mmol) în DCM (10 mL) s-a adăugat DCC (124 mg, 0,60 mmol) și DMAP (73 mg, 0,60 mmol) și reacția a fost lăsată să se agite la RT timp de 48 ore. Reacția s-a concentrat *in vid*, și purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) a furnizat produsul dorit (620 mg, 55%).

25 <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 4,24 (t, 2H); 3,94-3,52 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 2,34 (t, 2H); 1,65 (m, 4H); 1,28 (br. m, 2H + 2H apă); 0,90 (t, 3H).

**Compusul : Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18:1 (9)**

30



35 În aceeași manieră ca procedura reprezentativă 3, compusul s-a sintetizat din metoxi-PEG<sub>2000</sub> (1,0 g, 0,50 mmol), acid oleic (169 mg, 0,60 mmol), DCC (124 mg, 0,60 mmol), și DMAP (73 mg, 0,60 mmol) în DCM (10 mL). Randament (298 mg, 26%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,37 (m, 2H); 4,24 (t, 2H); 3,94-3,46 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 2,34 (t, 2H); 2,04 (m, 4H); 1,68 (m, 2H + 3H apă); 1,46-1,18 (br. m, 20H); 0,90 (t, 3H).

**Compusul Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18:2 (9,12)**

40

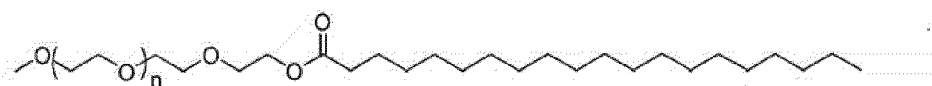


45 În aceeași manieră ca procedura reprezentativă 3, compusul s-a sintetizat din metoxi-PEG<sub>2000</sub> (10 g, 0,50 mmol), linoleic acid (168 mg, 0,60 mmol), DCC (124 mg, 0,60 mmol), și DMAP (73 mg, 0,60 mmol) în DCM (10 mL). Randament (451 mg, 40%).

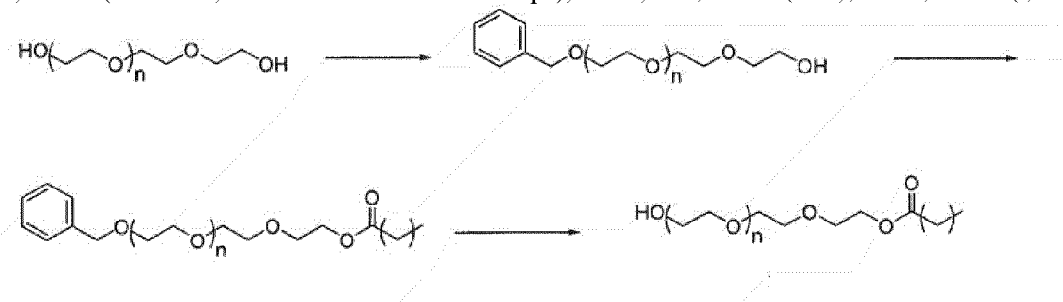
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,38 (br. m, 4H); 4,24 (t, 2H); 3,94-3,50 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 2,79 (t, 2H); 2,34 (t, 2H); 2,06 (m, 4H); 1,67 (br. m, 2H + 2H apă); 1,47-1,21 (br. m, 14H); 0,91 (t, 3H).

**Compusul : Metoxi-PEG<sub>2000</sub>-ester-C20**

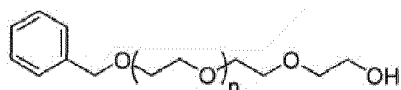
50



- 5 În aceeași manieră ca procedura reprezentativă 3, compusul s-a sintetizat din metoxi-PEG<sub>2000</sub> (1,0 g, 0,50 mmol), arachidic acid (188 mg, 0,60 mmol), DCC (124 mg, 0,60 mmol), și DMAP (73 mg, 0,60 mmol) în DCM (10 mL). Randament (739 mg, 64%).  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 4,24 (t, 2H); 3,96-3,50 (br. m, 170-200H); 3,40 (s, 3H); 2,34 (t, 2H); 1,63 (br. m, 2H + 1H apă); 1,44-1,10 (32H); 0,90 (t, 3H).



10

**Benzil-PEG<sub>2000</sub>-OH**

15

- La o soluție de PEG<sub>2000</sub> (6,0 g, 3,0 mmol) în THF (30 mL) s-a adăugat terț-butoxid de potasiu (168 mg, 1,50 mmol) și soluția a fost lăsată să se agite timp de 30 minute înainte de adăugarea de bromură de benzil (180 μL, 1,50 mmol) în THF (6 mL) în decurs de 12 ore (0,125 mmol/hr). După ce adăugarea a fost completă, reacția a fost lăsată să continue să se agite la RT timp de 4 ore și apoi s-a concentrat *in vacuo*. Purificarea prin cromatografie rapidă ISCO C18 (0-100% [MeCN 0,1% TFA]/[apă 0,1% TFA]) a furnizat produsul dorit (1,80 g, 29%).

20

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,35 (br. m, 5H); 4,59 (s, 2H); 3,94-3,37 (br. m, 170-200H); 2,07-1,78 (br, 3,5H apă).

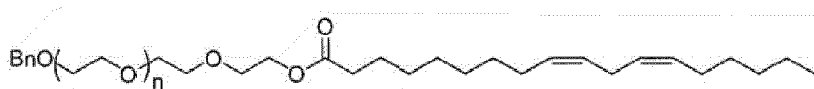
25

**Compus : Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18**

30

- În aceeași manieră ca procedura reprezentativă 3, compusul s-a sintetizat din Benzil-PEG<sub>2000</sub>-OH (218 mg, 0,104 mmol), acid stearic (36 mg, 0,125 mmol), DCC (26 mg, 0,125 mmol), și DMAP (16 mg, 0,125 mmol) în DCM (2 mL). Randament (150 mg, 61%).  
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,35 (br. m, 5H); 4,59 (s, 2H); 4,24 (m, 2H); 3,95-3,31 (br. m, 170-200H); 2,34 (t, 2H); 1,64 (br. m, 2H + 2H apă); 1,41-1,15 (br. m, 28H); 0,90 (t, 3H).

35

**Compus : Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18:2 (9,12)**

40

- În aceeași manieră ca procedura reprezentativă 3, compusul s-a sintetizat din Benzil-PEG<sub>2000</sub>-OH (200 mg, 0,095 mmol), acid linoleic (32 mg, 0,114 mmol), DCC (24 mg, 0,114 mmol), și DMAP (14 mg,

0,114 mmol) în DCM (2 mL). Randament (110 mg, 49%).  
 $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 7,36 (br. m, 5H); 5,46-5,26 (br. m, 4H); 4,59 (s, 2H); 4,24 (t, 2H); 3,94-3,39 (br. m, 170-200H); 2,79 (t, 2H); 2,34 (t, 2H); 2,06 (m, 4H); 1,68 (br. m, 2H + 5H apă); 1,48-1,23 (br. m, 14H); 0,91 (t, 3H).

5 **Compus : Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18:1 (9)**

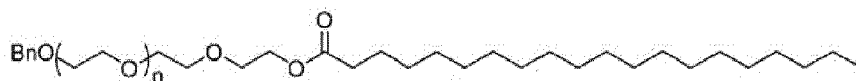


10

În aceeași manieră ca procedura reprezentativă 3, compusul s-a sintetizat din Benzil-PEG<sub>2000</sub>-OH (200 mg, 0,095 mmol), acid oleic (32 mg, 0,114 mmol), DCC (24 mg, 0,114 mmol), și DMAP (14 mg, 0,114 mmol) în DCM (2 mL). Randament (94 mg, 42%).  
 $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 7,36 (br. m, 5H); 5,36 (m, 2H); 4,59 (s, 2H); 4,24 (t, 2H); 3,95-3,35 (br. m, 170-200H); 2,35 (t, 2H); 2,03 (m, 4H); 1,64 (m, 2H); 1,48-1,16 (br. m, 20H); 0,90 (t, 3H).

15

**Compus : Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-C20**



20

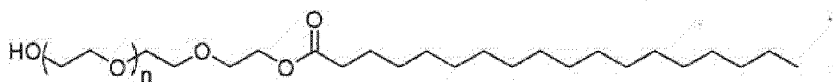
În aceeași manieră ca procedura reprezentativă 3, compusul s-a sintetizat din Benzil-PEG<sub>2000</sub>-OH (200 mg, 0,095 mmol), acid arachidic (36 mg, 0,114 mmol), DCC (24 mg, 0,114 mmol), și DMAP (14 mg, 0,114 mmol) în DCM (2 mL). Randament (101 mg, 44%).

25

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 7,36 (br. m, 5H); 4,59 (s, 2H); 4,24 (t, 2H); 3,95-3,35 (br. m, 170-200H); 2,34 (t, 2H); 1,78 (br, 3H apă); 1,63 (m, 2H); 1,40-1,17 (br. m, 34H); 0,90 (t, 3H).

**Compusul : HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18**

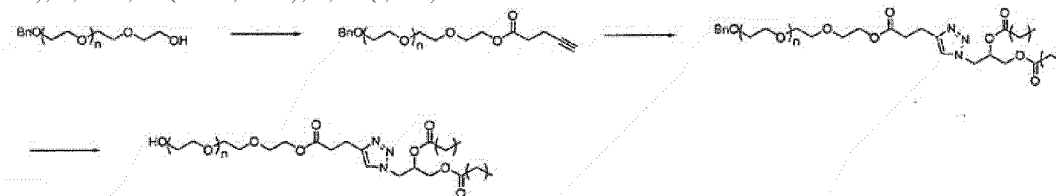
30



35

Într-un balon de reacție umplut cu azot care conține paladiu pe carbon (10 gr. %, 74mg, 0,070 mmol) s-a adăugat Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18 (822 mg, 0,35 mmol) și MeOH (20 mL). Balonul s-a evacuat și s-a reumplut cu  $\text{H}_2$  de trei ori, și s-a lăsat la agitat la RT și 1 atm  $\text{H}_2$  timp de 12 ore. Amestecul s-a filtrat prin celită, clătind cu DCM, și filtratul s-a concentrat *in vid* pentru a da produsul dorit (692 mg, 88%).

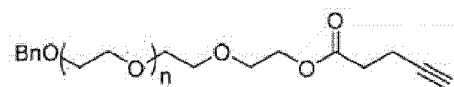
$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : ppm 4,24 (t, 2H); 3,95-3,34 (br. m, 170-200H); 2,34 (t, 2H); 1,63 (m, 2H); 1,40-1,17 (br. m, 28H); 0,90 (t, 3H).



40

**Compus : Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-etil-alchină**

45

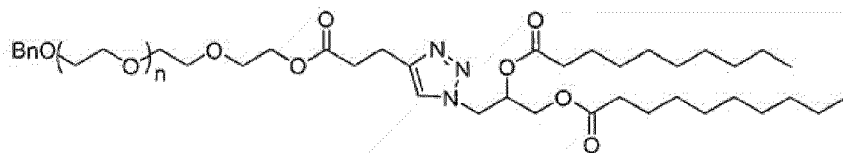


La o soluție de benzil-PEG<sub>2000</sub>-OH (1,0 g, 0,48 mmol) și 4-pentinoic acid (70 mg, 0,71 mmol) în DCM (10 mL) s-a adăugat DCC (147 mg, 0,71 mmol) și DMAP (87 mg, 0,71 mmol), și reacția a fost lăsată să se agite la RT for 12 ore. Amestecul s-a filtrat, solidele s-au clătit cu DCM, și s-au concentrat *in*

*vid.* Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-100%DCM/[DCM 20% MeOH 1% NH<sub>4</sub>OH]) a furnizat produsul dorit (436 mg, 42%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,36 (br. m, 5H); 4,59 (s, 2H); 4,29 (t, 2H); 3,95-3,35 (br. m, 170-200H); 2,67-2,47 (br. m, 4H); 2,01 (m, 1H); 1,67 (br, 3H apă).

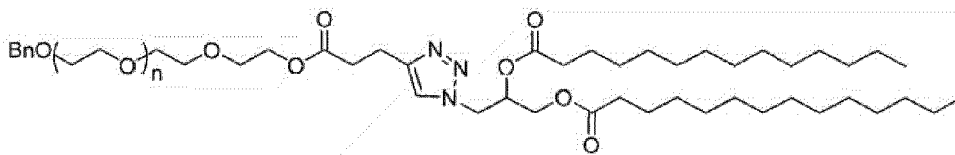
**Compus : Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C10**



La o soluție de benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-etil-alchină (175 mg, 0,080 mmol) și bis(decanoat) de 3-azidopropan-1,2-diil (51 mg, 0,119 mmol) în terț-butanol (2 mL) și apă (2 mL) s-a adăugat CuSO<sub>4</sub> (7 mg, 0,040 mmol) și ascorbat de sodiu (16 mg, 0,080 mmol) și reacția a fost lăsată să se agite la RT timp de 12 ore. Amestecul s-a concentrat *in* *vid.* Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0,100% DCM/[DCM 20% MeOH 1% NH<sub>4</sub>OH]) a furnizat produsul dorit (161 mg, 77%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 8,08 (m, 1H); 7,53-7,30 (br. m, 5H); 5,39 (m, 1H); 4,59 (s, 2H); 4,54-3,98 (br. m, 4H); 3,94-3,36 (br. m, 170-200H); 3,06 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,34 (m, 4H); 2,01-1,75 (br, 2H apă); 1,62 (m, 4H); 1,45-1,12 (br. m, 24H); 0,90 (t, 6H).

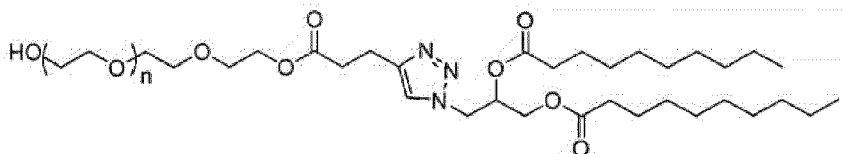
**Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C10**



În aceeași manieră ca Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C10, s-a sintetizat Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C10 din Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-etil-alchină (175 mg, 0,080 mmol), ditetradecanoat de 3-azidopropan-1,2-diil (64 mg, 0,119 mmol), CuSO<sub>4</sub> (7 mg, 0,040 mmol) și ascorbat de sodiu (16 mg, 0,080 mmol) în in terț-butanol (2 mL) și apă (2 mL). Randament (156 mg, 72%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 8,07 (s, 1H); 7,57-7,30 (br. m, 5H); 5,39 (m, 1H); 4,59 (s, 2H); 4,54-4,00 (br. m, 4H); 3,97-3,38 (br. m, 170-200H); 3,08 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,33 (m, 4H); 1,97-1,44 (br. m, 4H + 8H apă); 1,44-1,16 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

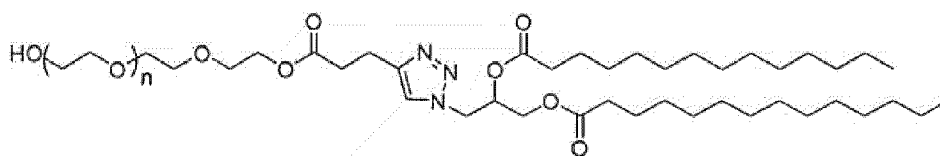
**HO-PEG<sub>2000</sub>-ater-click-glicerol-C10**



În aceeași manieră ca HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18, s-a sintetizat HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol-C10 din Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C10 (161 mg, 0,061 mmol) și paladiu pe carbon (10 gr. %, 7 mg, 0,061 mmol) sub 1 atm H<sub>2</sub> în MeOH (2 mL). Randament (58 mg, 37%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,45 (s, 1H); 5,39 (m, 1H); 4,59 (m, 2H); 4,39-4,03 (br. m, 4H); 3,95-3,37 (br. m, 170-200H); 3,06 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,33 (m, 4H); 2,04 (br, 4H apă); 1,61 (m, 4H); 1,44-1,19 (br. m, 24H); 0,90 (t, 6H).

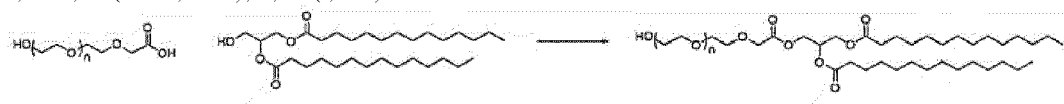
**HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol-C14**



5

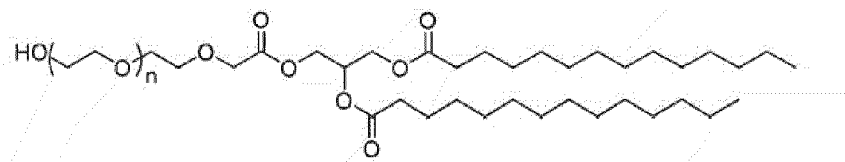
În aceeași manieră ca **HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18**, s-a sintetizat **HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol-C14** din Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol C14 (156 mg, 0,057 mmol) și paladiu pe carbon (10 gr, %, 6 mg, 0,057 mmol) sub 1 atm H<sub>2</sub> în MeOH (2 mL). Randament (42 mg, 28%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,45 (s, 1H); 5,39 (m, 1H); 4,59 (m, 2H); 4,39-4,03 (br. m, 4H); 3,95-3,37 (br. m, 170-200H); 3,06 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,33 (m, 4H); 2,04 (br, 4H apă); 1,61 (m, 4H); 1,44-1,19 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).



#### O-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol-C14

15



La o soluție de ditetradecanoat de 3-hidroxiopropan-1,2-diil (78 mg, 0,15 mmol), DCC (31 mg, 0,15 mmol), și DMAP (19 mg, 0,15 mmol) în DCM (4 mL) s-a adăugat HO-PEG<sub>2000</sub>,COOH în DCM (2 mL) la o rată de 50 mg/hr timp de 5 ore. După ce adăugarea a fost completă, reacția a fost lăsată să continue cu agitare la RT timp de 12 ore. Reacția s-a filtrat, clătind solidele cu DCM, și filtratul s-a concentrat *in vid*. Purificarea prin cromatografie rapidă pe silice ISCO (0-100% [MeCN 0,1% TFA]/[apă 01% TFA]).

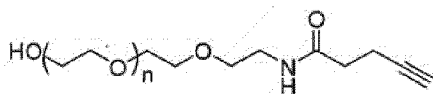
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 5,30 (m, 1H); 4,45-4,10 (br. m, 6H); 3,95-3,34 (br. m, 170-200H); 2,33 (t, 4H); 1,81 (br, 4H apă); 1,63 (m, 4H); 1,39-1,16 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

25



#### Benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-etil-alchină

30



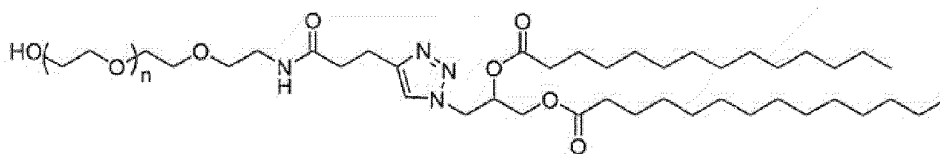
La o soluție de HO-PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> (250 mg, 0,125 mmol) și acid 4-pentinoic (12 mg, 0,125 mmol) în THF (4 mL) s-a adăugat (benzotriazol-1-iloxi)tripirolidinofosfoniu hexafluorofosfat (228 mg, 0,438 mmol) și trietilamină (61 μL, 0,438 mmol) și reacția a fost lăsată să se agite la RT timp de 12 ore. Amestecul s-a concentrat *in vid*. Produsul brut s-a purificat prin cromatografie rapidă ISCO C18 (0-100% [MeCN 0,1% TFA]/[apă 0,1% TFA]). Produsul s-a preluat în DCM și s-a spălat cu carbonat de sodiu 5%, saramură, s-au uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat *in vid*. Randament (91 mg, 35%).

35

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 3,98-3,30 (br. m, 170-200H); 2,55 (m, 2H); 2,44 (m, 2H); 2,06-1,73 (br. m, 3H + 5H apă).

40

#### HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-click-glicerol-C14



5 La o soluție de benzil-PEG<sub>2000</sub>-ester-etil-alchină (91 mg, 0,043 mmol) și ditetradecanoat de 3-azidopropan-1,2-diil (28 mg, 0,052 mmol) în terț-butanol (1,5 mL) și apă (1,5 mL) s-a adăugat CuSO<sub>4</sub> (4 mg, 0,022 mmol) și ascorbat de sodiu (9 mg, 0,043 mmol). Reacția a fost lăsată să se agite la RT peste noapte. Amestecul s-a concentrat *in vid*. Produsul brut s-a purificat prin cromatografie rapidă ISCO C18 (0-100%[MeCN 0,1% TFA]/[apă 0,1% TFA]). Produsul s-a preluat în DCM și s-a spălat cu carbonat de sodiu 5%, saramură, s-au uscat pe sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat, și s-a concentrat *in vid*. Randament (34 mg, 30%).

10 <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: ppm 7,52 (s, 1H); 5,38 (m, 1H); 4,65-3,98 (br. m, 6H); 3,95-3,30 (br. m, 170-200H); 3,09 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 1,76 (m, 4H); 1,82-1,52 (br. m, 4H + 2H apă); 1,41-1,16 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

### 15 ECHIVALENȚE

Toate definițiile, așa cum sunt definite și utilizate aici, ar trebui să fie înțelese pentru a controla definițiile dicționarului și/sau semnificațiile obișnuite ale termenilor definiți.

20

Articolele nedefinite "o" și "un", așa cum sunt utilizate aici în descriere și în revendicări, dacă nu se indică clar contrariul, ar trebui să fie înțelese ca însemnând "cel puțin unul".

Exprimarea "și/sau", așa cum este utilizată aici în descriere și în revendicări, ar trebui înțeleasă ca însemnând "oricare sau ambele" elemente astfel unite, adică elemente care sunt prezente conjunctiv în unele cazuri și prezente disjunctiv în alte cazuri. Elementele multiple enumerate cu "și/sau" ar trebui interpretate în același mod, adică "unul sau mai multe" dintre elementele astfel combinate. Opțional pot fi prezente și alte elemente, altele decât elementele identificate specific prin clauza "și/sau", indiferent dacă sunt legate sau nu de acele elemente identificate specific. Astfel, ca exemplu nelimitativ, o referire la "A și/sau B", atunci când este utilizată împreună cu un limbaj deschis, cum ar fi "cuprinzând" se poate referi, într-o variantă de realizare, numai la A (incluzând opțional alte elemente decât B); într-o altă variantă de realizare, numai la B (incluzând opțional alte elemente decât A); încă într-o altă variantă de realizare, atât la A cât și la B (incluzând opțional alte elemente); etc. Așa cum se utilizează aici în descriere și în revendicări, "sau" trebuie înțeles ca având aceeași semnificație ca "și/sau" așa cum a fost definit mai sus. De exemplu, atunci când separă elementele dintr-o listă, "sau" sau "și/sau" va fi interpretat ca fiind inclusiv, adică includerea a cel puțin unui număr sau a unei liste de elemente, dar care include și mai mult de unul, și, opțional, articole suplimentare nelistate. Numai termenii despre care este indicat clar contrariul, cum ar fi "doar unul dintre" sau "exact unul dintre" sau, atunci când sunt utilizați în revendicări, "constând din", se vor referi la includerea exact a unui element dintr-un număr sau dintr-o listă de elemente. În general, termenul "sau" așa cum se utilizează aici trebuie interpretat numai ca indicând alternative exclusive (adică "una sau cealaltă, dar nu ambele") atunci când este precedată de termeni de exclusivitate, cum ar fi "fie unul", "unul dintre", "numai unul dintre" sau "exact unul dintre". "Constând în esență din", atunci când se utilizează în revendicări, va avea sensul său obișnuit așa cum se utilizează în domeniul dreptului brevetelor.

45

Așa cum se utilizează aici în descriere și în revendicări, exprimarea "cel puțin unul", cu referire la o listă de unul sau mai multe elemente, ar trebui să fie înțeleasă ca semnificând cel puțin un element selectat dintre unul sau mai multe dintre elementele din lista de elemente, dar nu include neapărat cel puțin unul dintre fiecare element enumerat specific în lista de elemente și nu exclude orice combinație de elemente din lista de elemente. Această definiție permite de asemenea ca unele elemente să poată fi prezente opțional, altele decât elementele identificate specific în lista de elemente la care se referă exprimarea "cel puțin unul", indiferent dacă sunt legate sau nu de acele elemente identificate specific. Astfel, ca exemplu nelimitativ, "cel puțin unul dintre A și B" (sau, echivalent, "cel puțin unul dintre A sau B," sau, echivalent "cel puțin unul dintre A și/sau B") se poate referi, într-o variantă de realizare, la cel puțin unul, incluzând opțional mai mult de unul, A, fără B prezent (și incluzând opțional alte elemente decât B); într-o altă variantă de realizare, la cel puțin unul, incluzând opțional mai mult de unul, B, fără A prezent (și opțional incluzând alte elemente decât A); într-o altă variantă de realizare, la cel puțin unul,

55

incluzând opțional mai mult de unul, A, și cel puțin unul, incluzând opțional mai mult de unul, B (și incluzând opțional alte elemente); etc. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de realizare separată a prezentei invenții.

- 5 De asemenea, trebuie să se înțeleagă că, cu excepția cazului în care se indică în mod clar contrariul, în oricare dintre metodele revendicate aici care includ mai mult de o etapă sau un act, ordinea etapelor sau a actelor metodei nu este neapărat limitată la ordinea în care pașii sau sunt recitate acte de metodă.
- 10 În revendicări, precum și în descrierea de mai sus, toate expresiile tranziționale precum "cuprinzând", "incluzând", "purtând", "având", "conținând", "implicând", "deținând", "compus din" și altele asemenea trebuie înțelese ca fiind deschise, anume ca însemnând incluzând, dar fără a se limita la. Numai frazele tranziționale "constând din" și "constând în esență din" trebuie să fie fraze tranziționale închise, respectiv, semi-închise, așa cum este stabilit în Manualul procedurilor de examinare a brevetelor
- 15 Oficiului de brevete al Statelor Unite, Secțiunea 21 11.03.

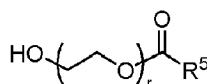
**(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:**

- DATABASE WPI Thomson Scientific, London, GB; AN 2015-453543 & CN 104 644 555 A
- WO-A1-2010/144740
- DATABASE WPI Thomson Scientific, London, GB; AN 2013-G67901 & CN 102 813 929 A
- WO-A1-2013/086373
- DATABASE WPI Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-H56476 & CN 102 068 701 A
- WO-A1-2013/086373
- ABU LILA, A.S. et al.: "Application of Polyglycerol Coating to Plasmid DNA Lipoplex for the Evasion of the Accelerated Blood Clearance Phenomenon in Nucleic Acid Delivery", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 103, 2014, pages 557-566, XP055389908,
- WO-A1-2014/144196
- ABU LILA, A.S. et al.: "Use of polyglycerol (PG), instead of polyethylene glycol (PEG), prevents induction of the accelerated blood clearance phenomenon against long-circulating liposomes upon repeated administration", International Journal of Pharmaceutics, vol. 456, 2013, pages 235-242, XP028717490,
- WO-A1-2015/058069
- TAGUCHI, K. et al.: "Hemoglobin Vesicles, Polyethylene Glycol (PEG)ylated Liposomes Developed as a Red Blood Cell Substitute, Do Not Induce the Accelerated Blood Clearance Phenomenon in Mice", Drug Metabolism and Disposition, vol. 37, 2009, pages 2197-2203, XP055156424,
- WO-A1-2015/148247
- OJA, C. et al.: "Doxorubicin entrapped within liposome-associated antigens results in a selective inhibition of the antibody response to the linked antigen", Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1468, 2000, pages 31-40, XP004273300,
- WO-A1-2015/164674
- SHIMIZU, T. et al.: "Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon", Immunobiology, vol. 218, 2013, pages 725-732, XP028529623,
- WO-A1-2015/164786
- TAGUCHI, K. et al.: "Effect of Repeated Injections of Adenosine Diphosphate-Encapsulated Liposomes Coated with a Fibrinogen  $\gamma$ -Chain Dodecapeptide Developed as a Synthetic Platelet Substitute on Accelerated Blood Clearance in a Healthy and an Anticancer Drug-Induced Thrombocytopenia Rat Model", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 104, 2015, pages 3084-3091, XP055390038,
- WO-A1-2015/199952
- DATABASE WPI Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-N81507 & CN 102 204 920 A
- WO-A1-2016/118724
- MARINA, N.M. et al.: "Dose Escalation and Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin (Doxil) in Children with Solid Tumors: A Pediatric Oncology Group Study", Clinical Cancer Research, vol. 8, 2002, pages 413-418, XP055547593,
- WO-A1-2016/118725

- WO-A1-2016/176330
- KRAUSE, W. et al.: "Prevention of Hemodynamic Effects of Iopromide-Carrying Liposomes in Rats and Pigs", Investigative Radiology, vol. 35, no. 8, 2000, pages 493-503, XP009510783,
- WO-A1-2017/201328
- HASHIMOTO, Y. et al.: "Relationship between the Concentration of Anti-polyethylene Glycol (PEG) Immunoglobulin M (IgM) and the Intensity of the Accelerated Blood Clearance (ABC) Phenomenon against PEGylated Liposomes in Mice", Biological and Pharmaceutical Bulletin, vol. 38, no. 3, 2015, pages 417-424, XP003032457,
- WO-A1-2017/201349
- POPOV, J. et al.: "Multivalent rituximab lipid nanoparticles as improved lymphoma therapies: indirect mechanisms of action and in vivo activity", Nanomedicine, vol. 6, no. 9, 2011, pages 1575-1591,
- WO-A2-2005/034979
- CHAMBERLAIN, M.C. et al.: "Recurrent lymphomatous meningitis treated with intra-CSF rituximab and liposomal ara-C", Journal of Neuro-Oncology, vol. 91, 2009, pages 271-277, XP019685257,
- WO-A2-2011/017108
- CORAZZELLI, G. et al.: "Biweekly rituximab, cyclophosphamide, vincristine, non-pegylated liposome-encapsulated doxorubicin and prednisone (R-COMP-14) in elderly patients with poor-risk diffuse large B- cell lymphoma and moderate to high 'life threat' impact cardiopathy", British Journal of Haematology, vol. 154, 2011, pages 579-589, XP055390076,
- WO-A2-2014/182661
- WO-A2-2017/015463
- WO-A2-2017/201340
- US-A1- 2005 143 336
- US-A1- 2014 206 753

**(57) Revendicări:**

1. Nanoparticulă lipidică (LNP) care încapsulează un ARNm care codifică o proteină terapeutică, în care LNP-ul cuprinde o lipidă cationică, o lipidă helper, o lipidă structurală și un stabilizator, în care lipida cationică este o lipidă ionizabilă, în care stabilizatorul este o lipidă PEG și în care lipida PEG este un compus cu Formula (V-OH):

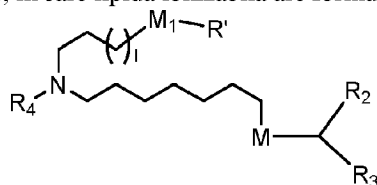


(V-OH),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

r este un întreg cuprins între 1 și 100, inclusiv; și R<sup>5</sup> este alchil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, alchenil C<sub>10-40</sub> opțional substituit, sau alchinil C<sub>10-40</sub> opțional substituit; și în care LNP-ul nu declanșează clearanceul accelerat al sângelui.

2. LNP conform revendicării 1, în care lipida ionizabilă are formula (XI):



(XI)

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, în care:

1 este selectat dintre 1, 2, 3, 4, și 5;

M și M' sunt selectați independent dintre -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -P(O)(OR')O-, -S-S-, o grupare aril, și o grupare heteroaril;

M<sub>1</sub> este o legătură sau M'.



R<sub>2</sub> și R<sub>3</sub> sunt selectate independent din grupul care constă din H alchil, C<sub>1-14</sub>, și alchenil C<sub>2-14</sub>;

R<sub>4</sub> este alchil C<sub>1-3</sub> nesubstituit, sau - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q, în care n este selectată dintre 2, 3, sau 4 și Q este OH, -NHC(S)N(R)<sub>2</sub>, -NHC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)R, -N(R)S(O)<sub>2</sub>R, -N(R)R<sub>8</sub>, -NHC(=NR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -NHC(=CR<sub>9</sub>)N(R)<sub>2</sub>, -OC(O)N(R)<sub>2</sub>, -N(R)C(O)OR, heteroaril sau heterocicloalchil;

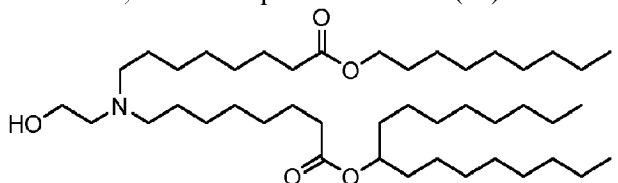
R' este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-8</sub>, alchenil C<sub>2-18</sub>, -R<sup>\*</sup>YR", - YR", și H;

R" este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>3-14</sub> și alchenil C<sub>3-14</sub>;

R\* este selectat independent din grupul care constă din alchil C<sub>1-12</sub> și alchenil C<sub>2-12</sub>; și

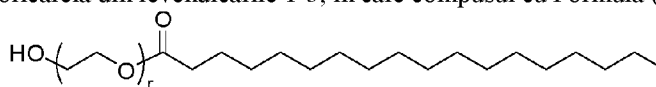
Y este independent un carbociclu C<sub>3-6</sub>.

3. LNP conform revendicării 2, în care compusul cu Formula (XI) are structura compusului 18:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

4. LNP conform oricăreia din revendicările 1-3, în care compusul cu Formula (V-OH) este:



(Cmpd452)

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

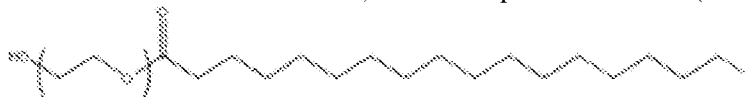
5. LNP conform oricăreia din revendicările 1-4, în care lipida PEG cuprinde o moleculă de PEG cu o greutate moleculară medie de :

(i) 2.000 Da; sau

(ii) mai puțin de 2.000 Da, opțional de aproximativ 1.500 Da, aproximativ 1.000 Da, sau aproximativ 500 Da.

6. LNP conform oricăreia din revendicările 1-2, în care compusul cu Formula (V-OH) este HO-PEG<sub>2000</sub>-ester-C18.

7. LNP conform oricăreia din revendicările 1-6, în care compusul cu Formula (V-OH) este:



(Comp403)

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

8. LNP conform oricăreia din revendicările 1-7, în care lipida helper este o lipidă necationică helper și lipida structurală este colesterol, și în care LNP-ul are un raport molar de aproximativ 45-65% lipidă cationică, aproximativ 0,15-15% lipidă PEG, aproximativ 15-45% colesterol și aproximativ 5-25% lipidă necationică helper.

9. LNP conform revendicării 8, în care LNP-ul cuprinde mai puțin de 0,5 % (gr/gr) de lipidă PEG.

10. LNP conform revendicării 8, în care LNP-ul cuprinde mai puțin de 0,25 % (gr/gr) de lipidă PEG.

11. LNP conform oricăreia din revendicările 1-7, în care lipida helper este:

(i) o lipidă necationică helper cuprinzând cel puțin un lanț de acid gras de cel puțin 8C și cel puțin un fragment de grupare de cap polară;

(ii) o lipidă necationică helper zwitterionică;

(iii) o lipidă care nu este o fosfatidil colină (PC); sau

(iv) 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolină (DSPC).

**12.** LNP conform oricăreia din revendicările 1-7 sau 11, în care lipida helper :

(i) inhibă competitiv fosfatidilcolina împotriva legării la CD36; sau

(ii) nu se leagă sau are o activitate de legare scăzută la CD36.

**13.** LNP conform oricăreia din revendicările 1-7, în care lipida structurală este un sterol, de exemplu colesterol.

**14.** LNP conform oricăreia din revendicările precedente, în care ARNm-ul cuprinde (a) baze sau zaharuri modificare chimic, și modificări de coloană vertebrală; și/sau (b) un situs de legare miR, în care opțional situsul de legare miR:

(i) este selectat dintre miR 126, miR 155 și miR 142 3p; sau

(ii) cuprinde un situs de legare miR-122 și de asemenea cuprinde unul sau mai multe situsuri de legare miR selectate din grupul care constă din miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27.

**15.** LNP conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care LNP este caracterizat ca având o legare redusă la celulele B1a și/sau o activitate redusă de activare a celulelor B1a.

**16.** Nanoparticulă lipidică (LNP) pentru utilizarea într-o metodă de livrare a unui nivel terapeutic al unei proteine de interes pentru un subiect,

în care LNP-ul este LNP-ul conform oricăreia dintre revendicările precedente,

în care metoda cuprinde administrarea unei prime doze și a unei a doua doze de LNP la subiect; și în care prima doză de LNP nu induce un răspuns imun care promovează clearanțul accelerat al sângelui (ABC) la administrarea unei a doua doze de LNP.

**17.** LNP pentru utilizarea conform revendicării 16, în care răspunsul imun este un răspuns IgM anti-PEG sau IgG anti-PEG.

**18.** LNP pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 16-17, în care prima doză de LNP nu activează o cale de semnalizare dependentă de CD36 într-o celulă imună la administrarea unei a doua doze de LNP.

**19.** LNP pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 16-18, în care intervalul dintre prima doză și a doua doză este de aproximativ 21 de zile sau mai puțin și/sau în care metoda cuprinde în plus administrarea la subiect a unui agent suplimentar care inhibă răspunsurile imune.

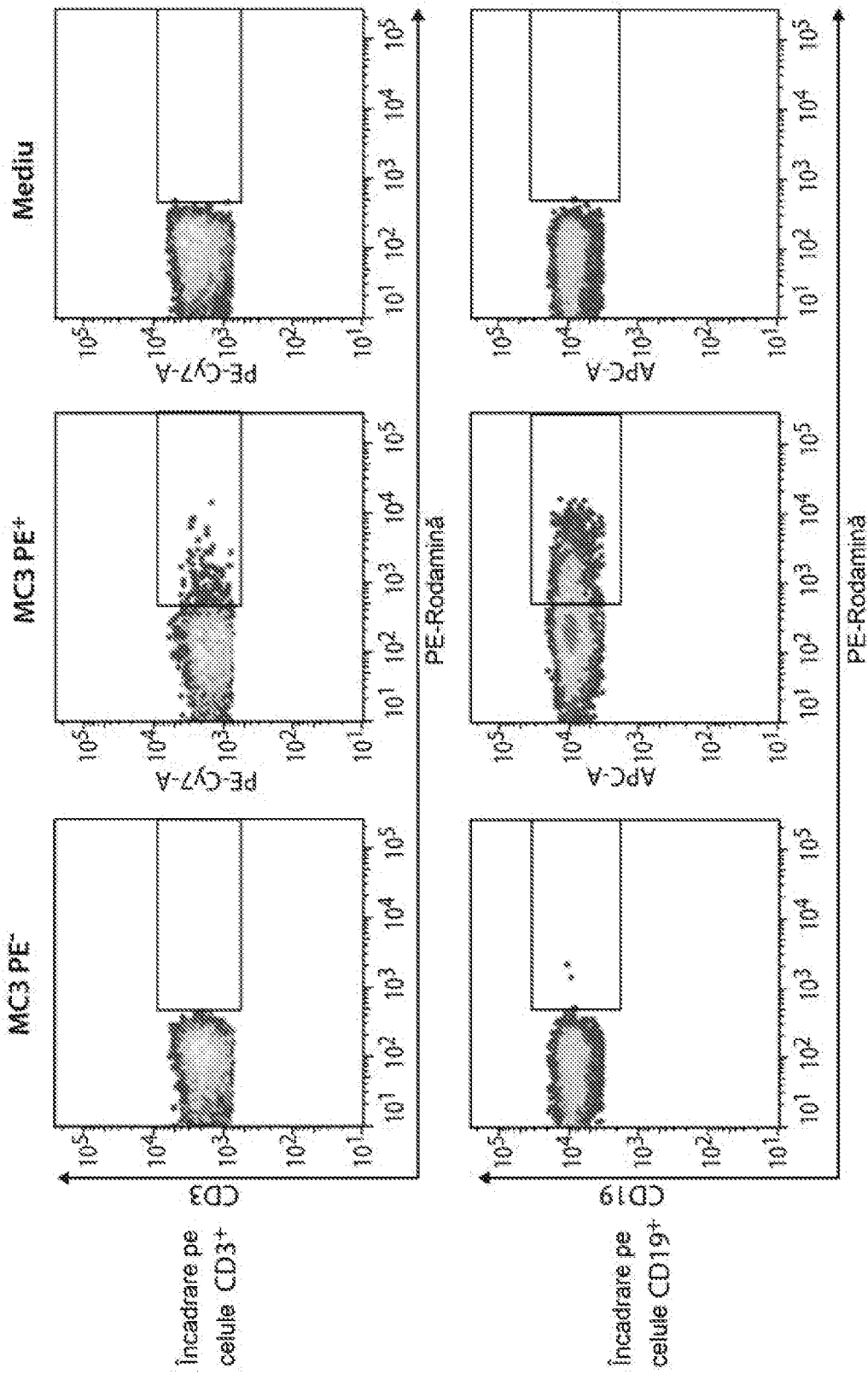


FIG.1

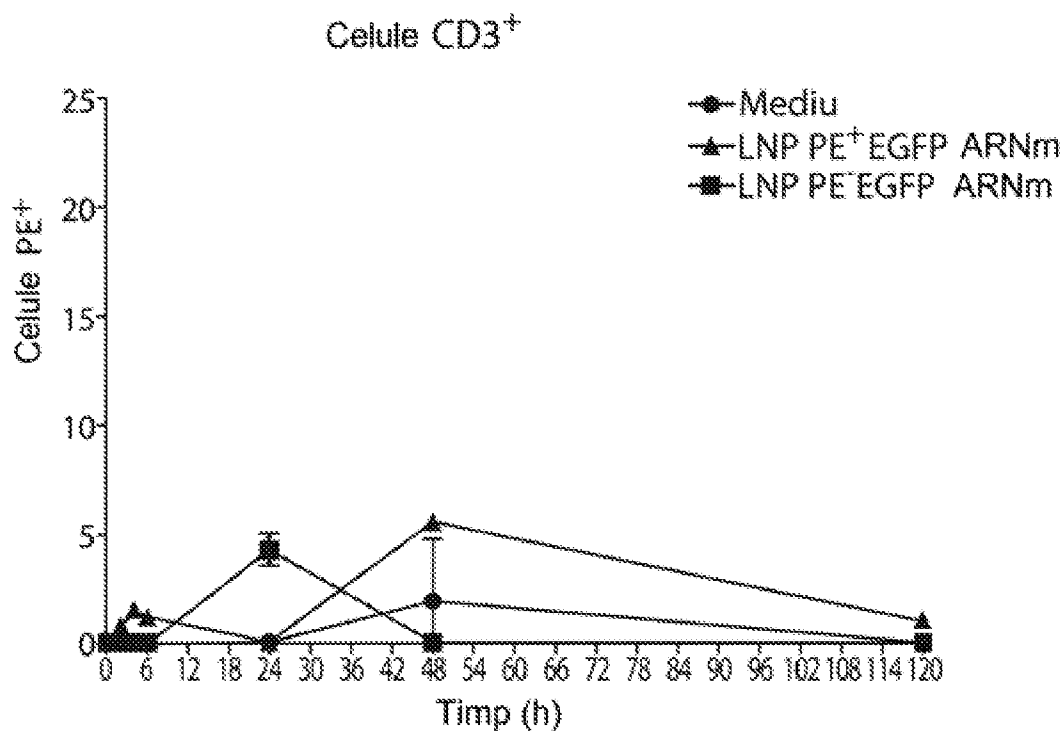


FIG. 2A

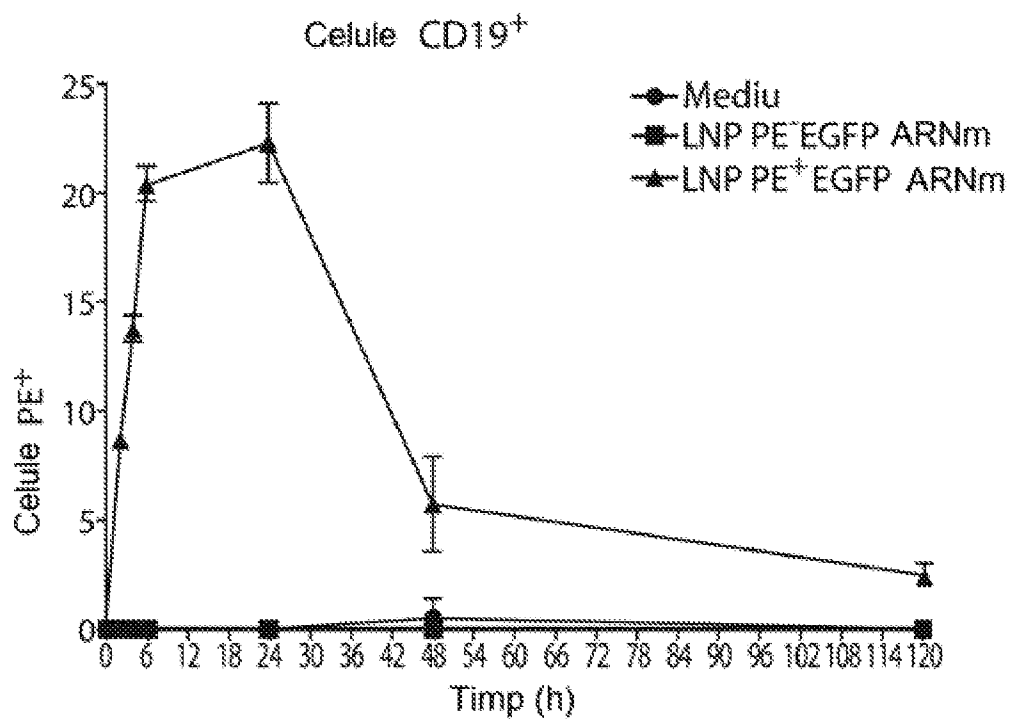


FIG. 2B

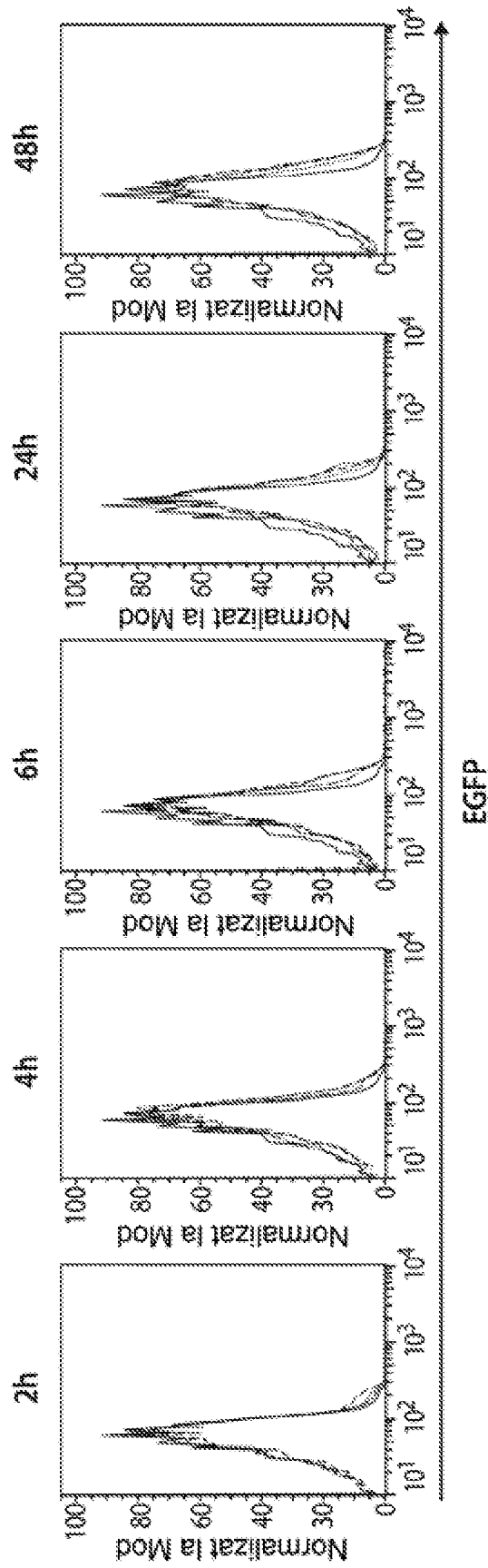


FIG. 3

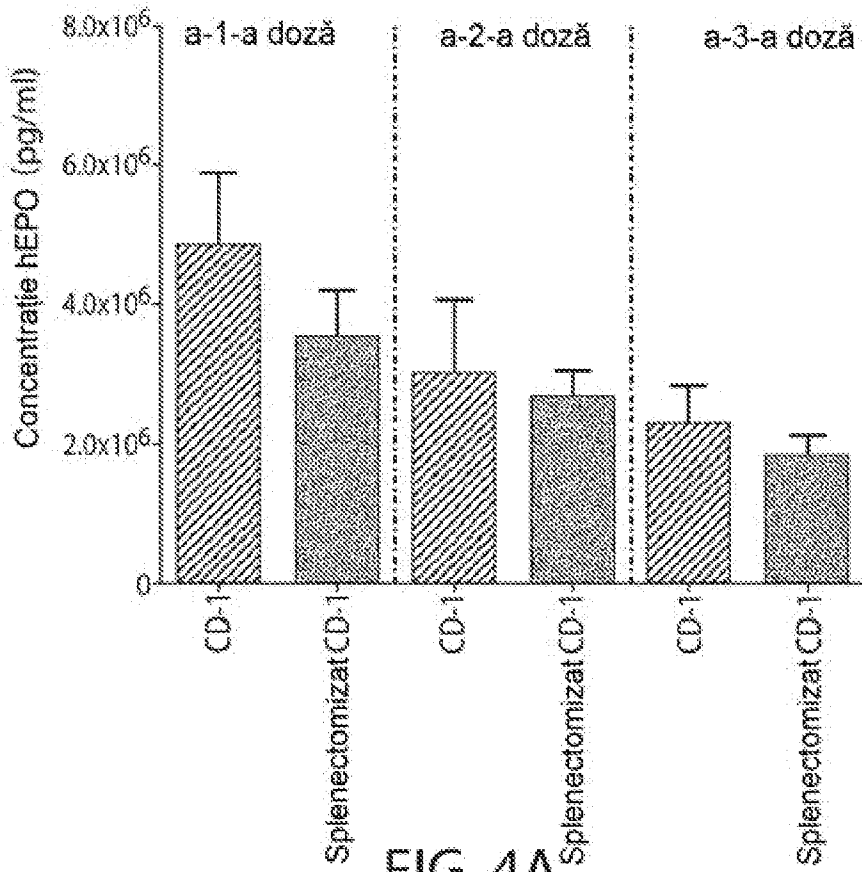


FIG. 4A

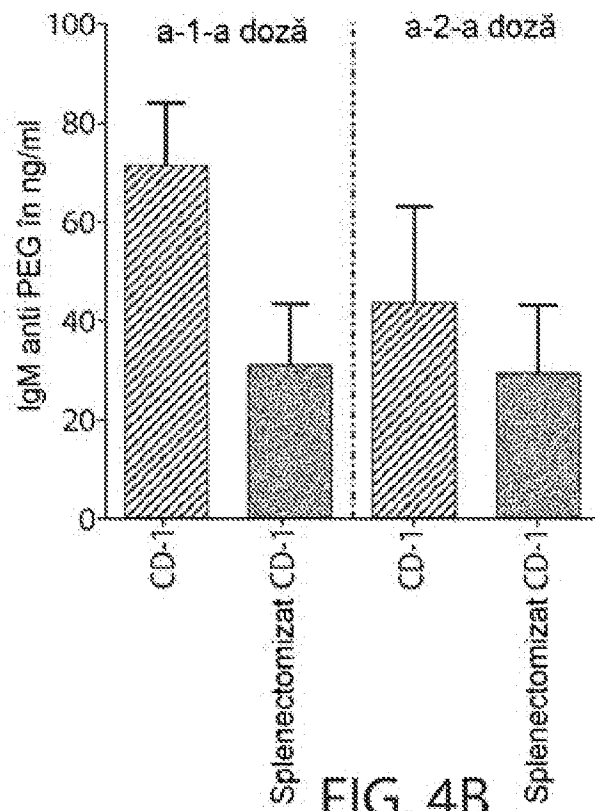


FIG. 4B

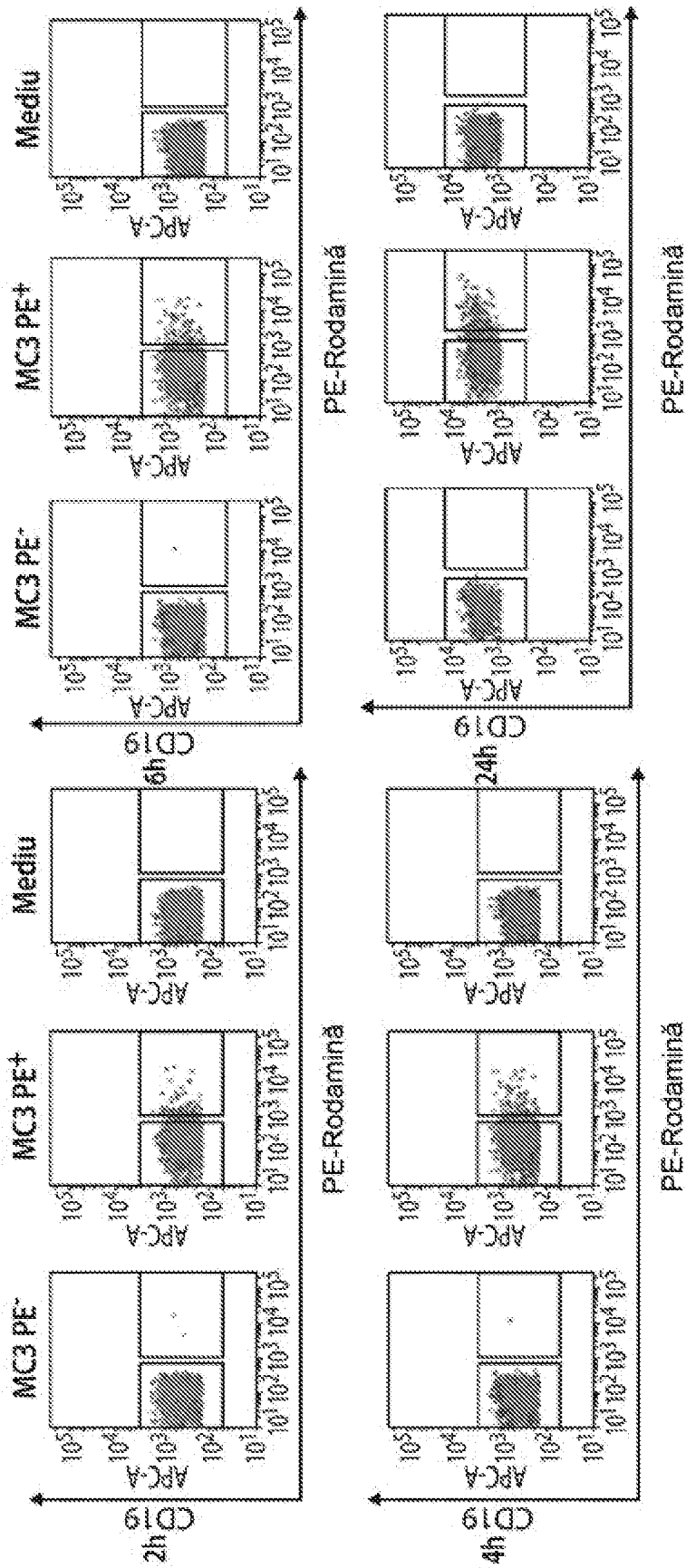


FIG. 5

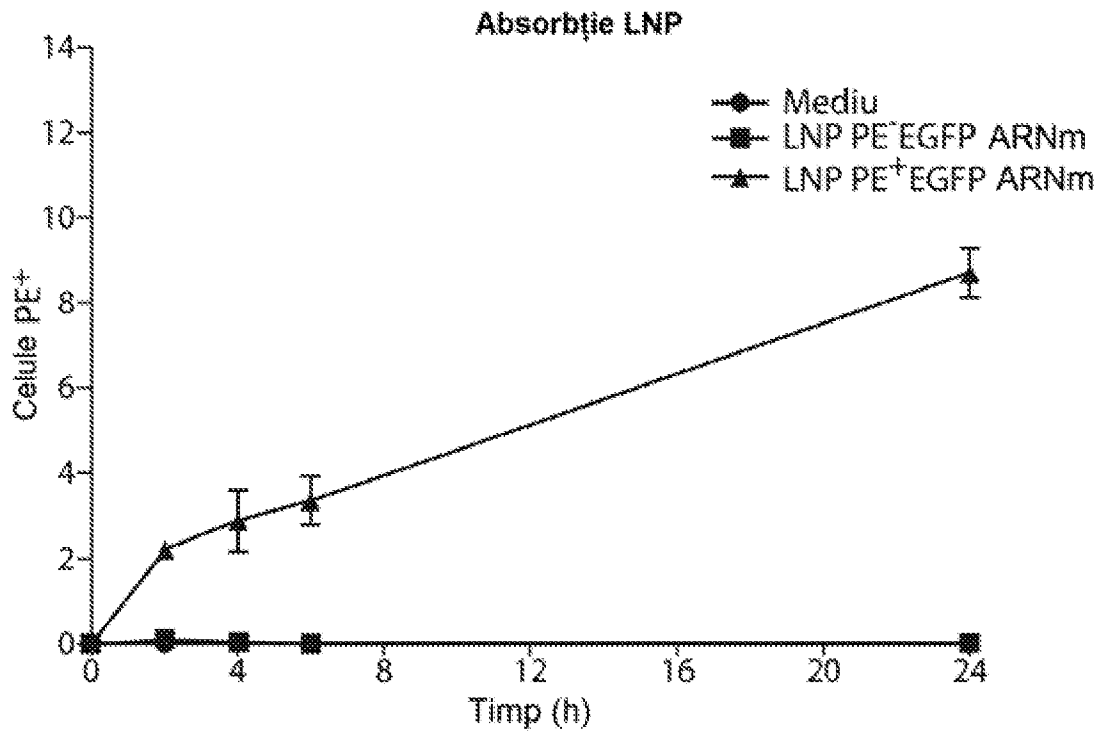


FIG. 6A



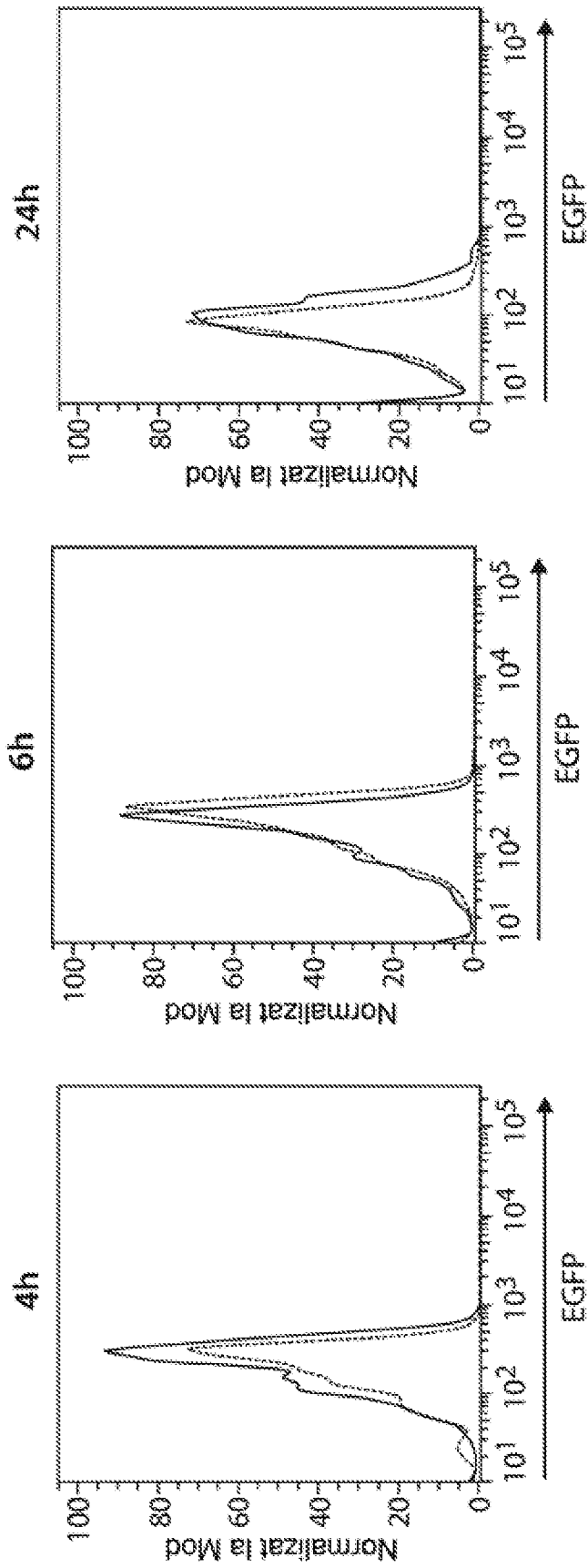


FIG. 6B

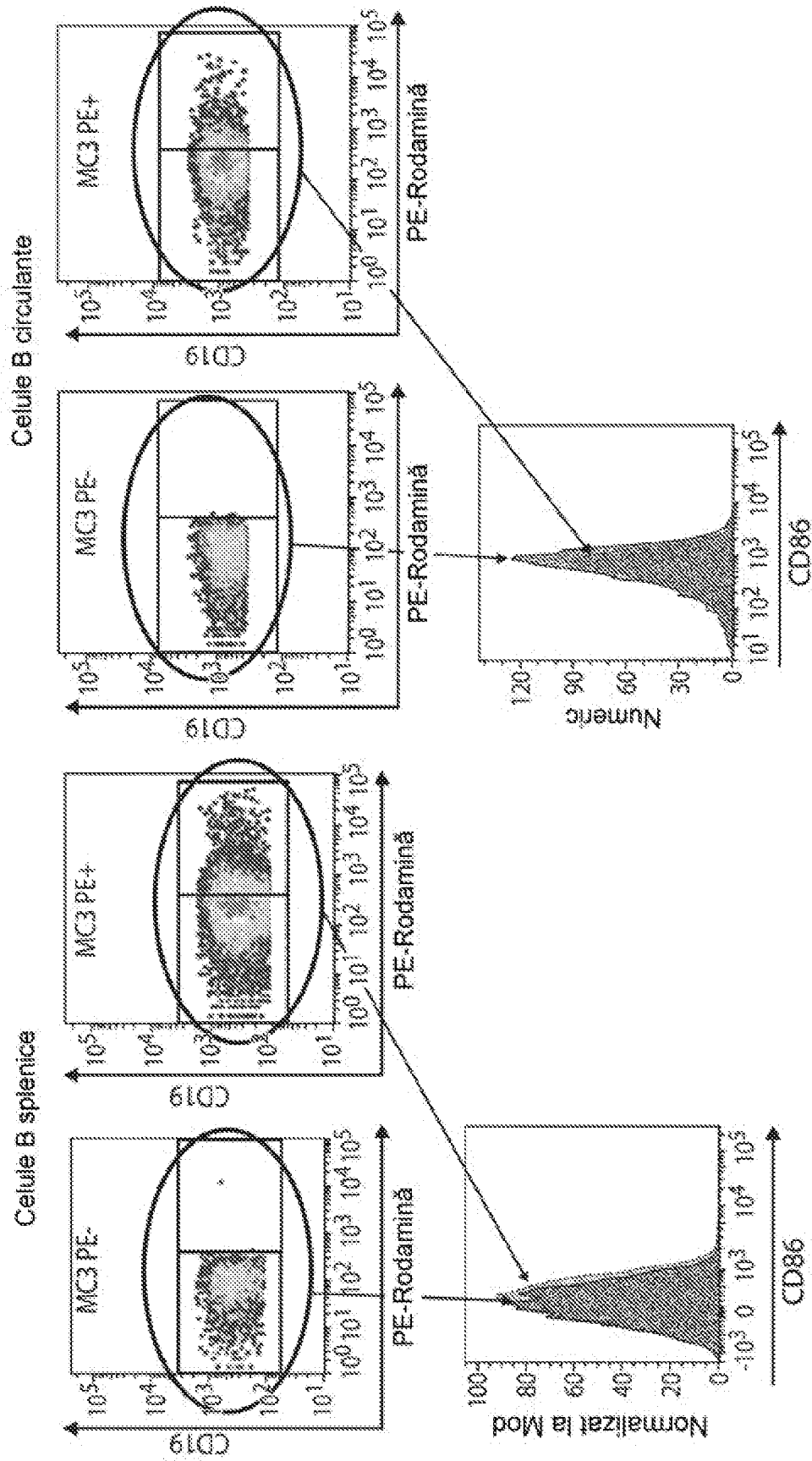


FIG. 7

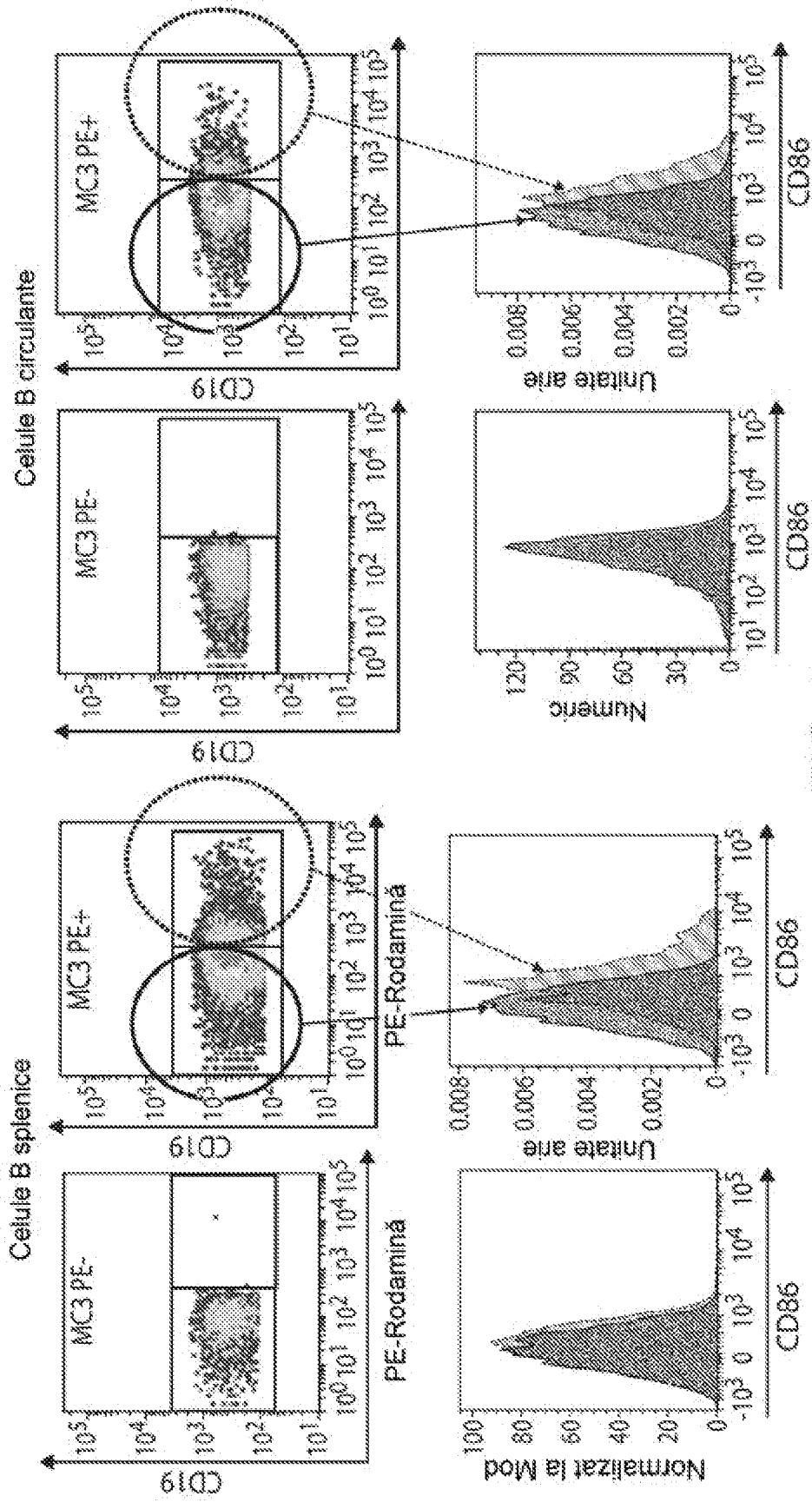


FIG. 8

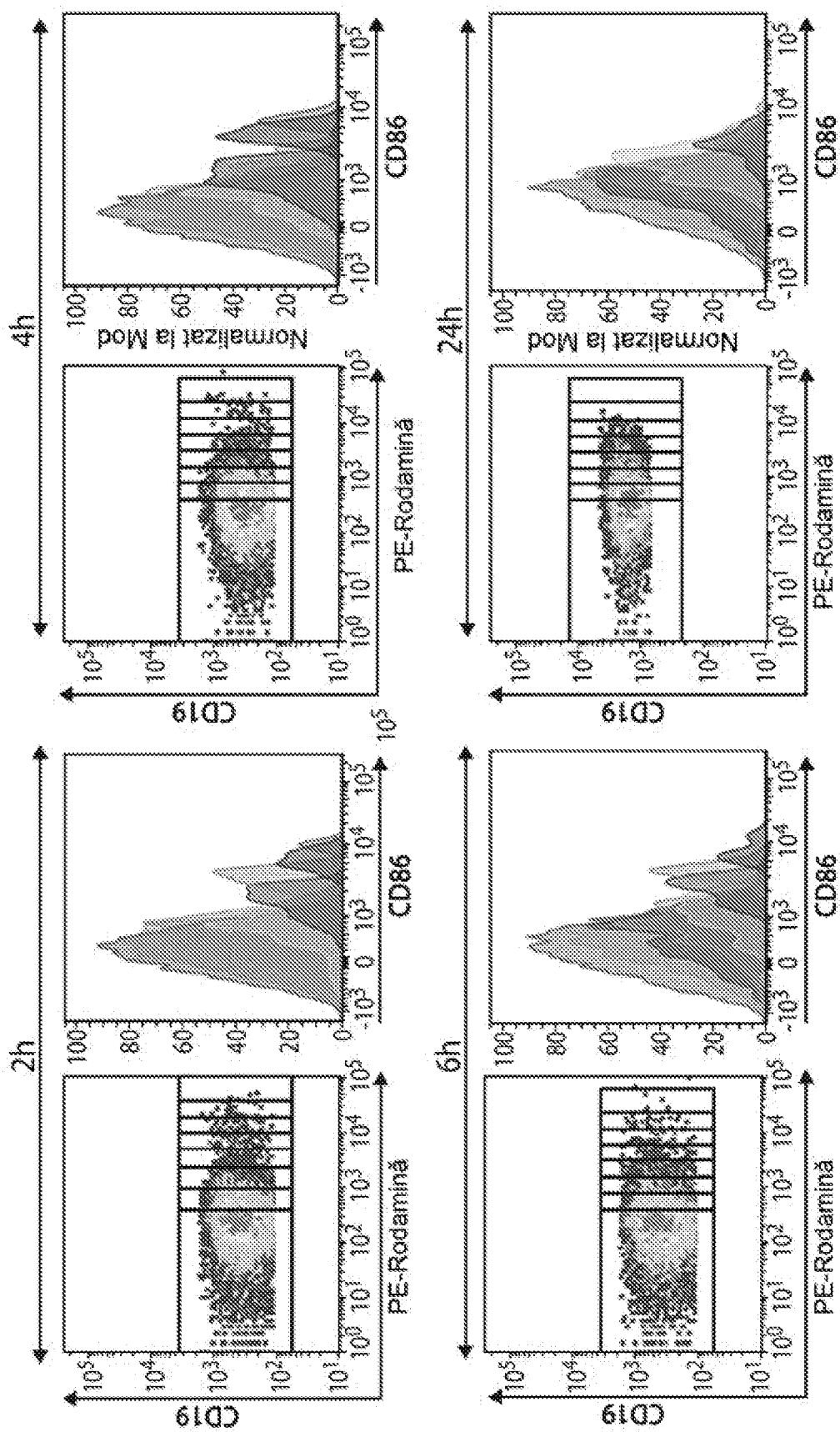


FIG. 9

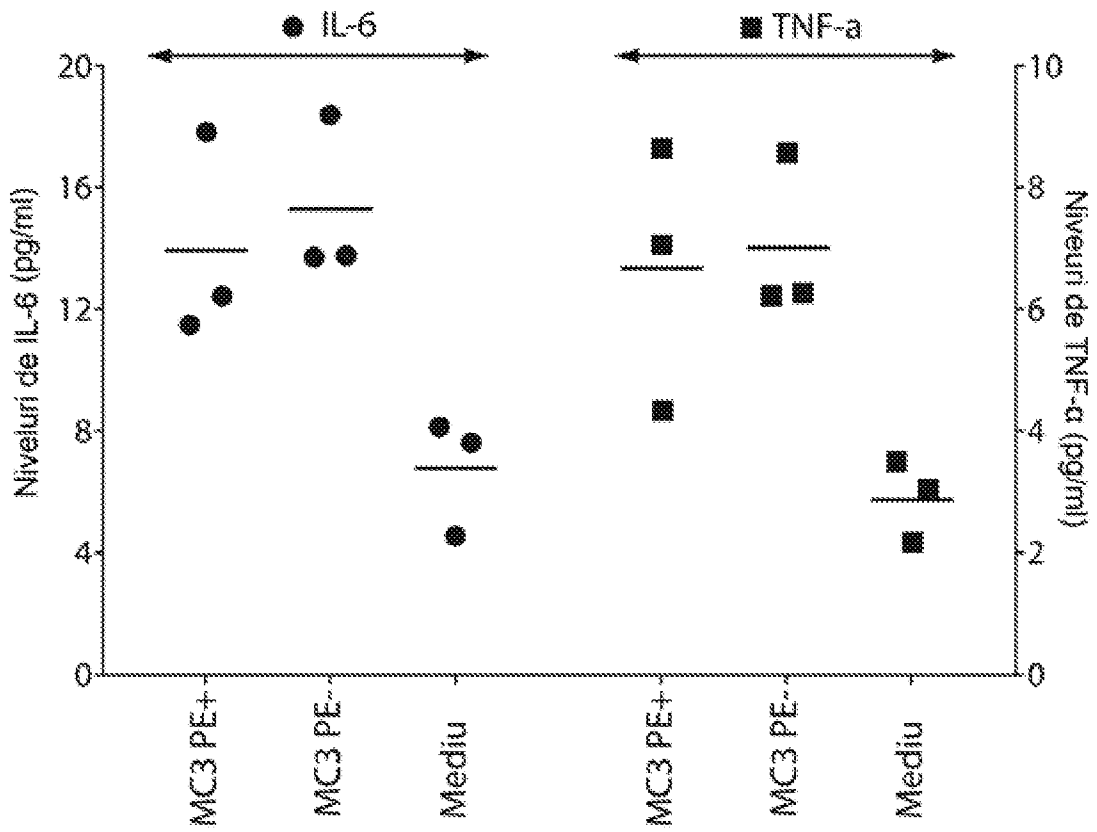


FIG. 10

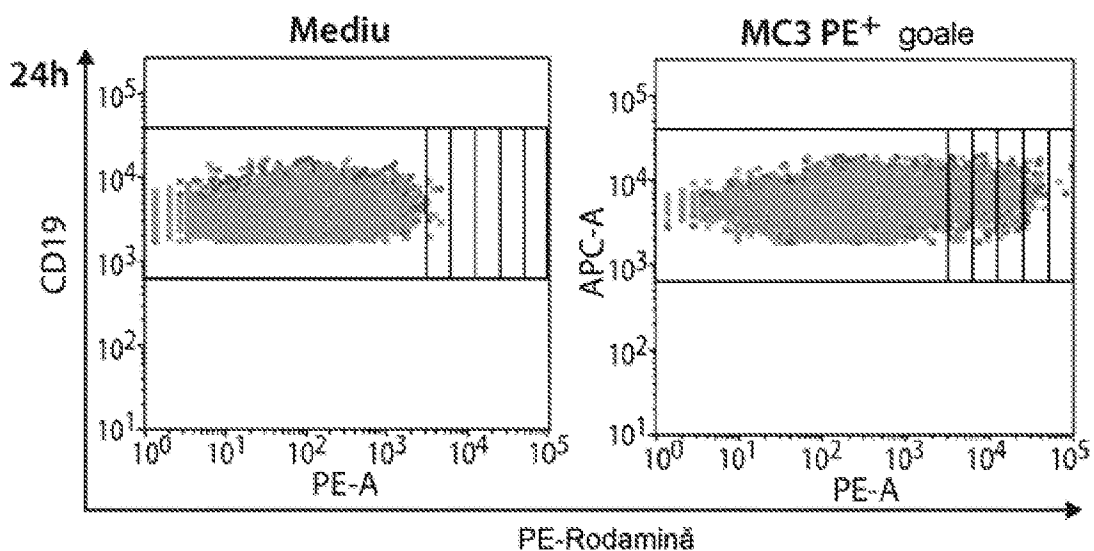


FIG. 11A

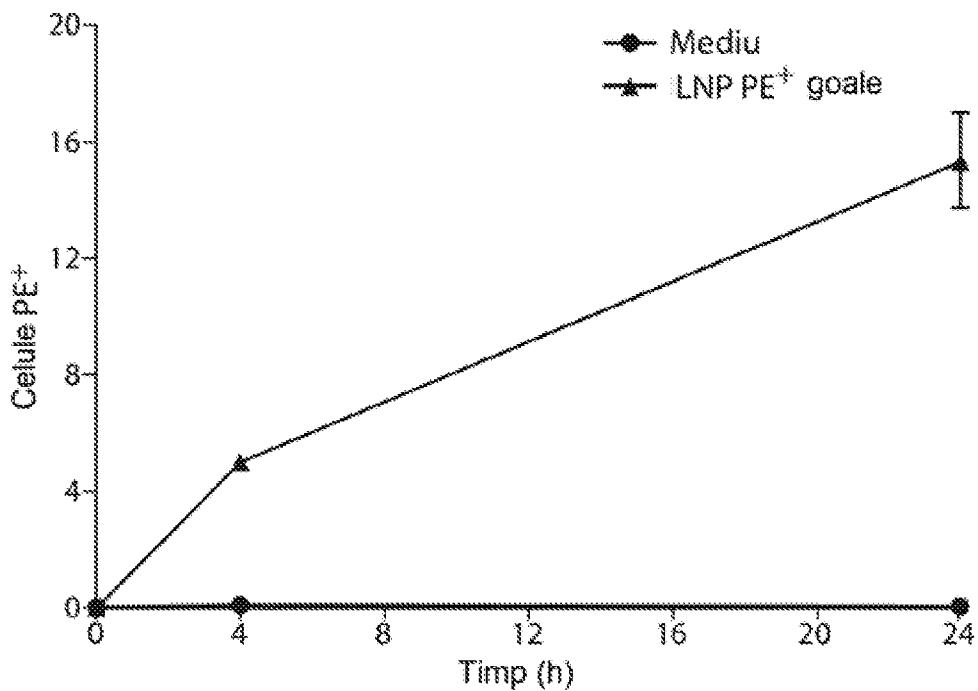


FIG. 11B

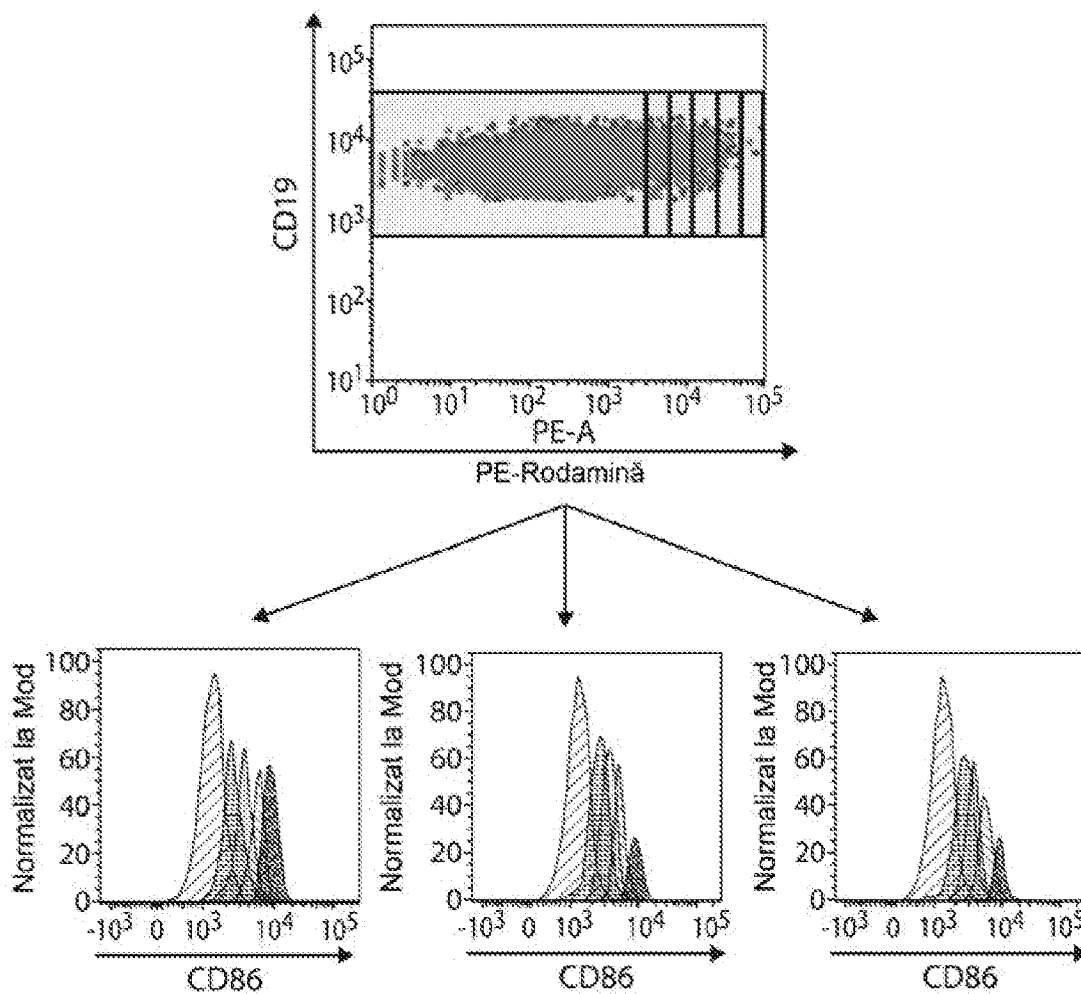


FIG. 12A

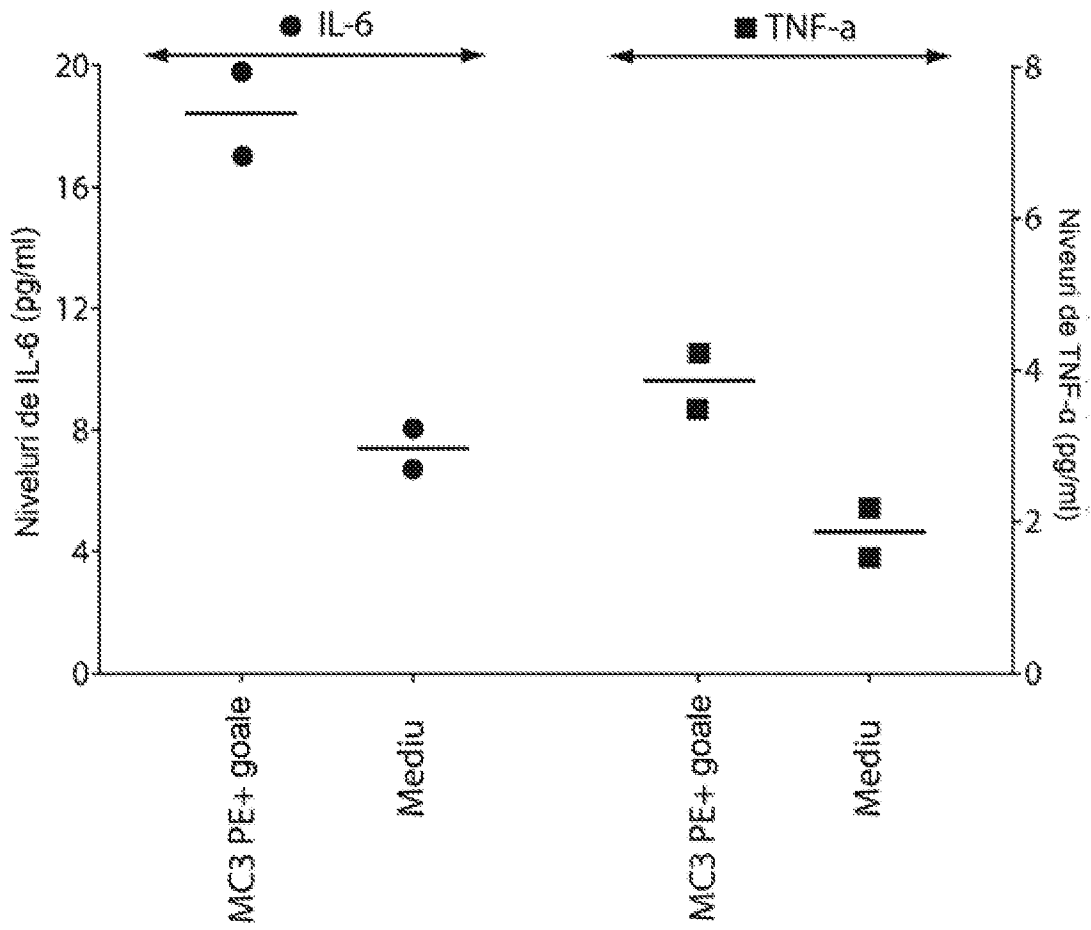
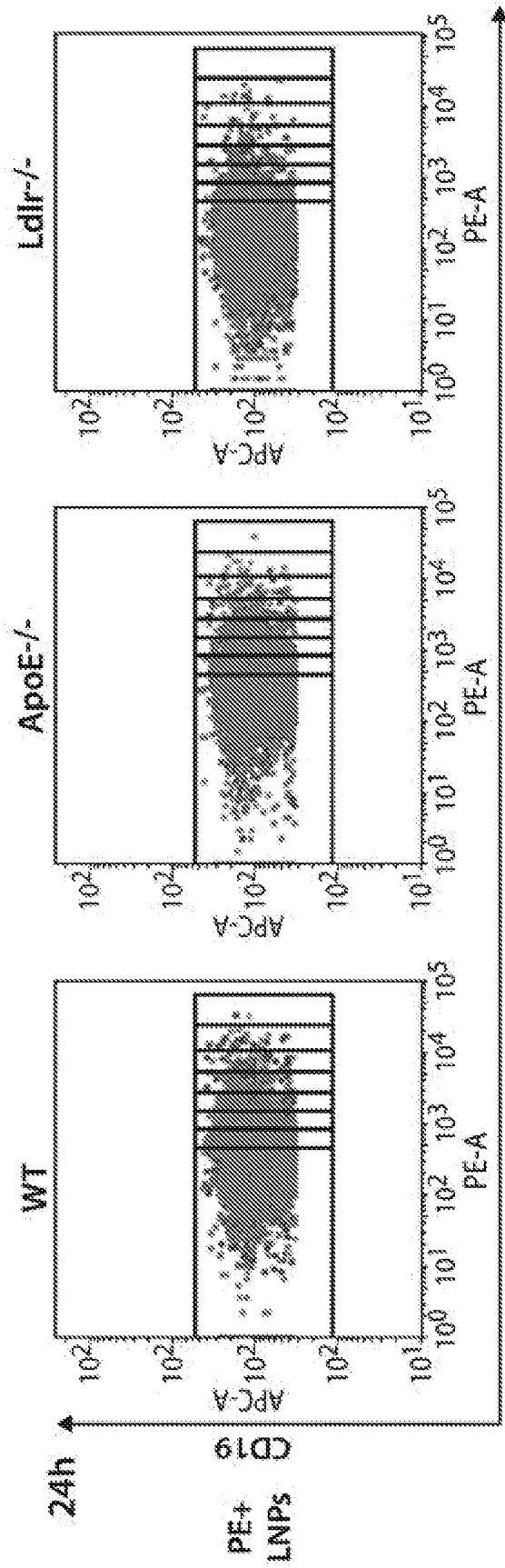
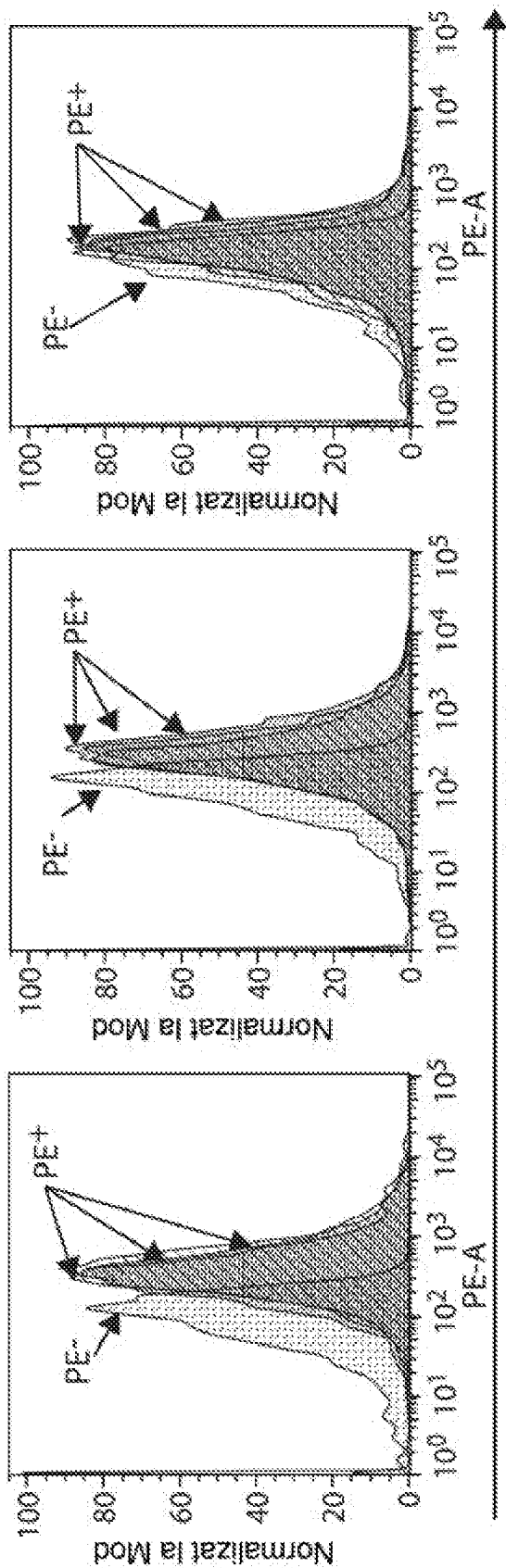


FIG. 12B







PE-Rodamină  
FIG. 13B

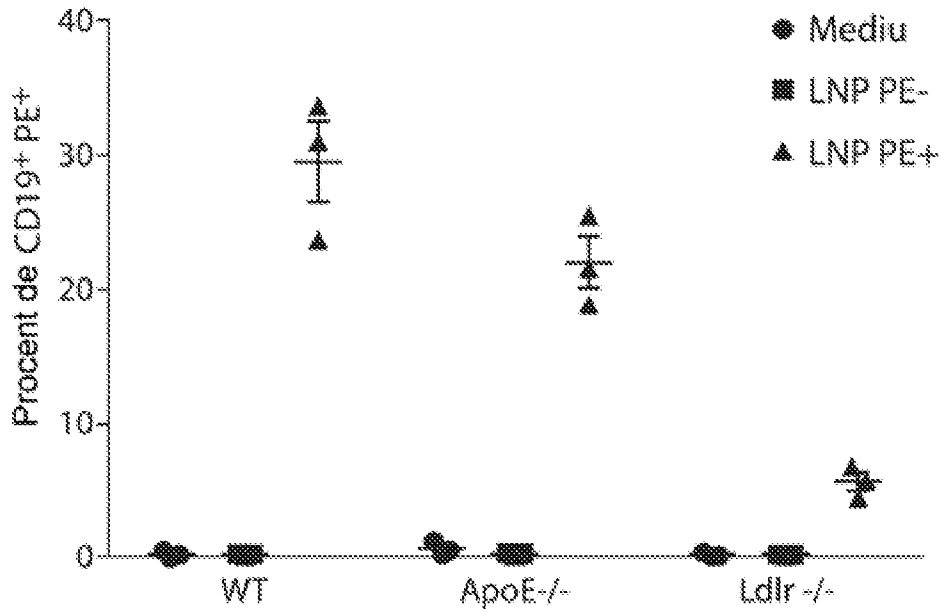


FIG. 13C

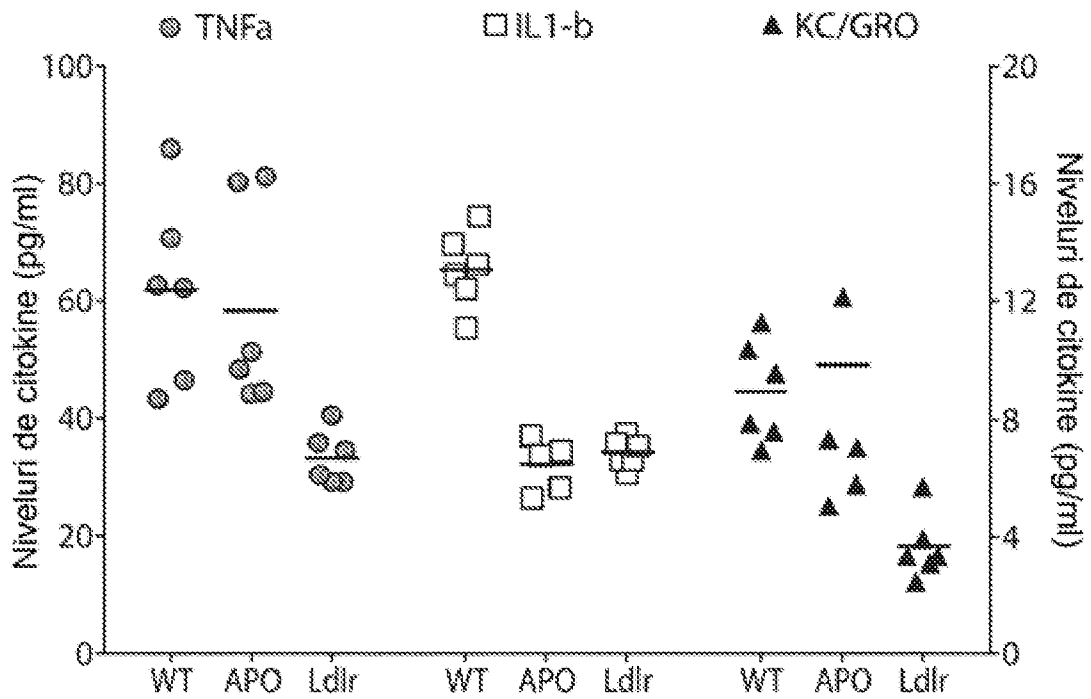


FIG. 13D

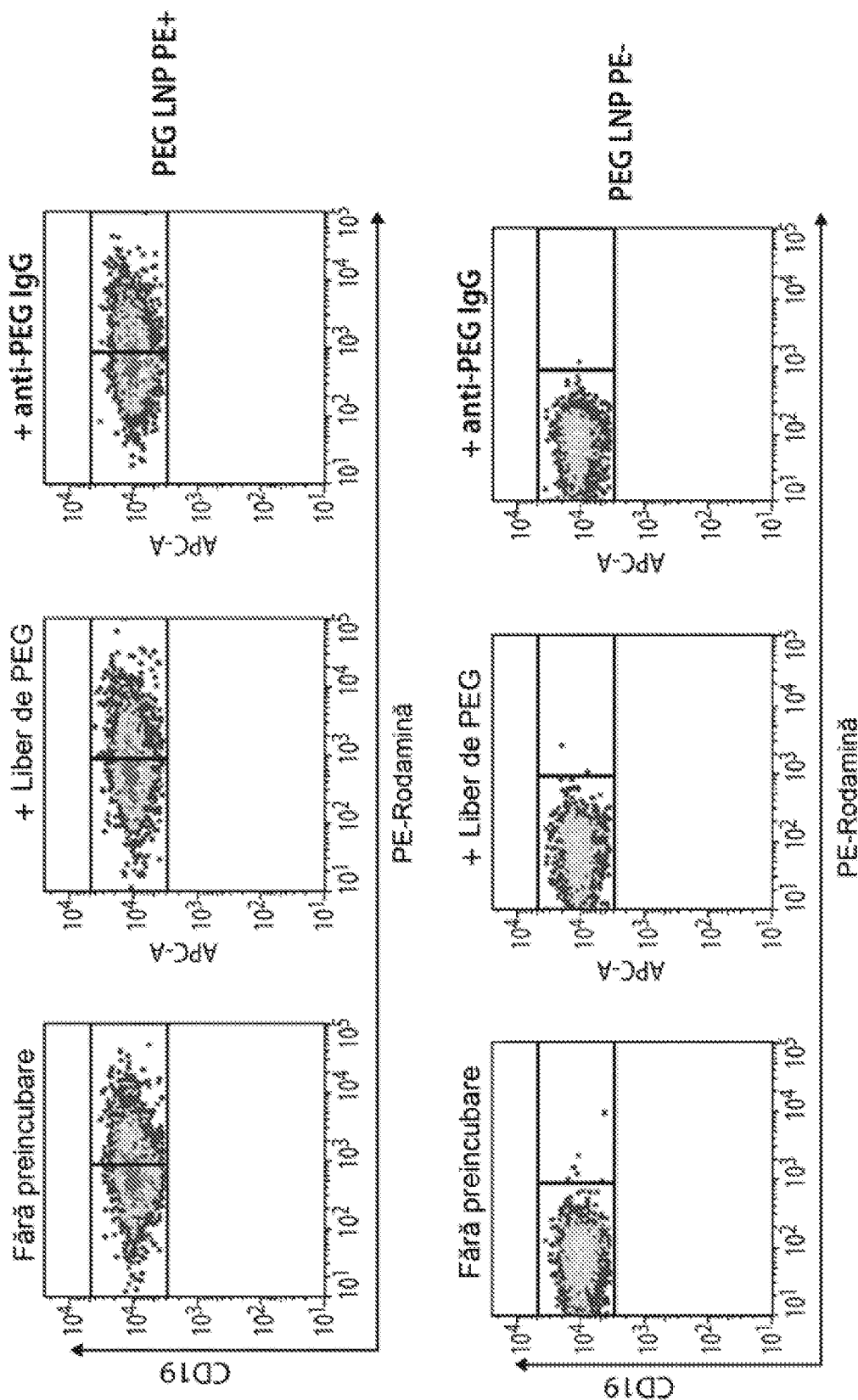
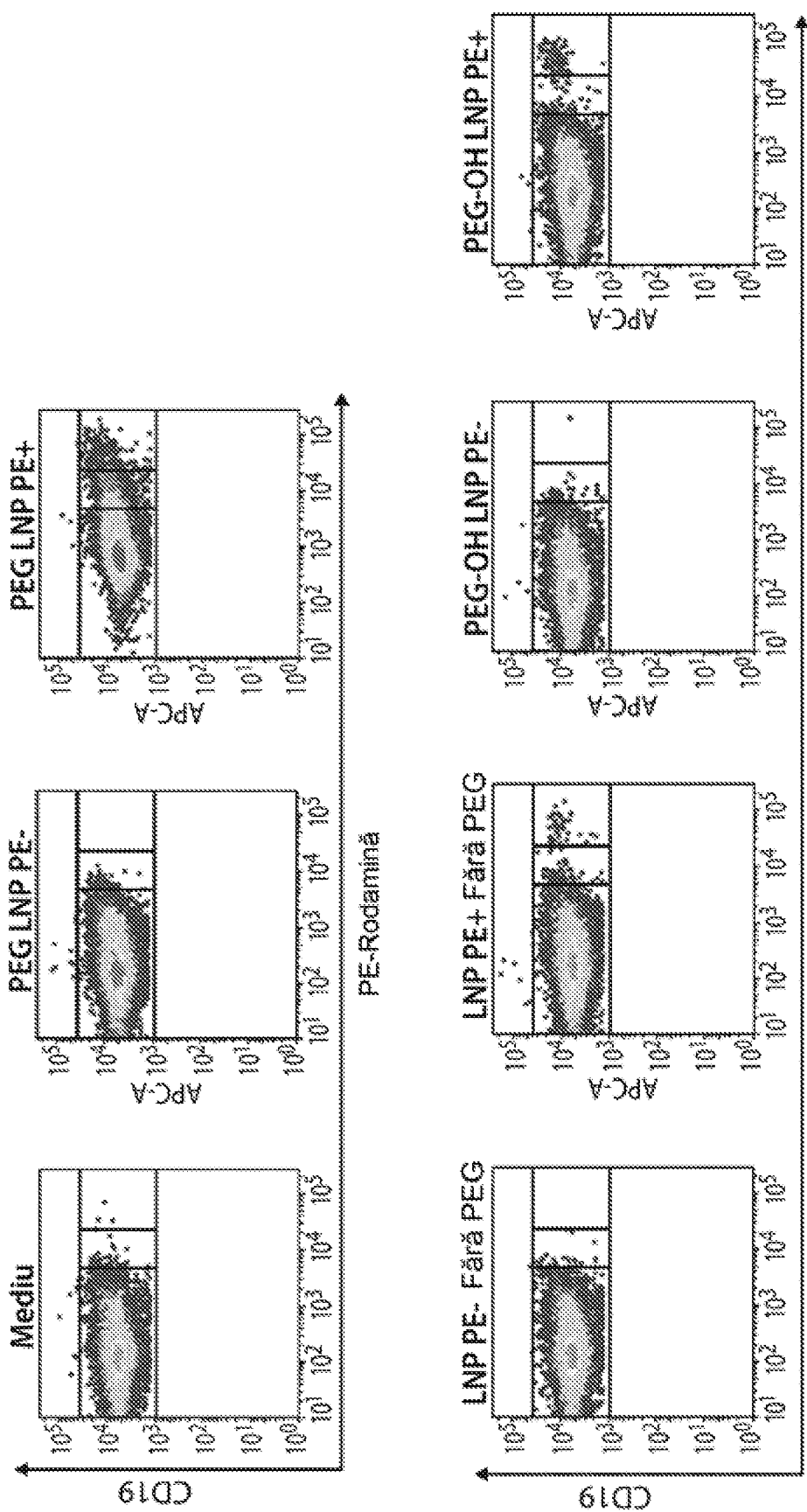


FIG. 14



PE-Rodamină

FIG. 15

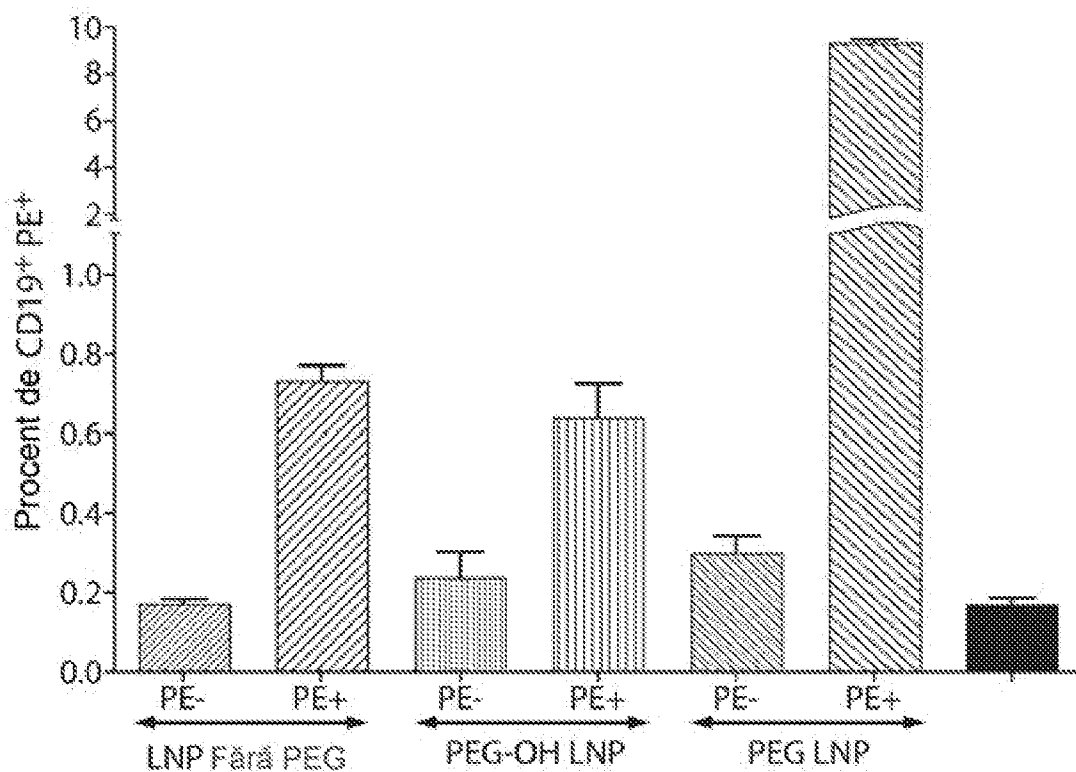


FIG. 16

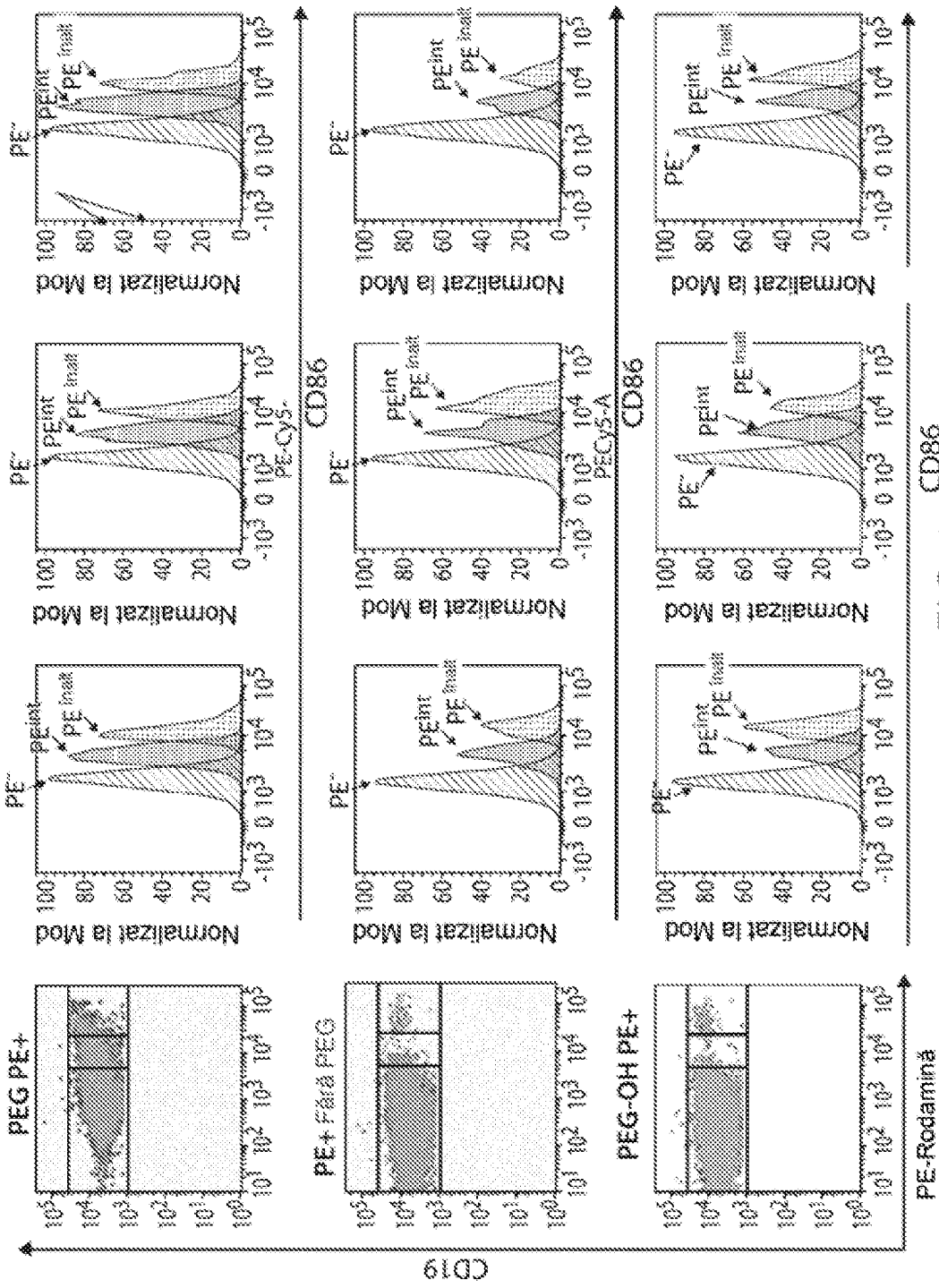


FIG. 17

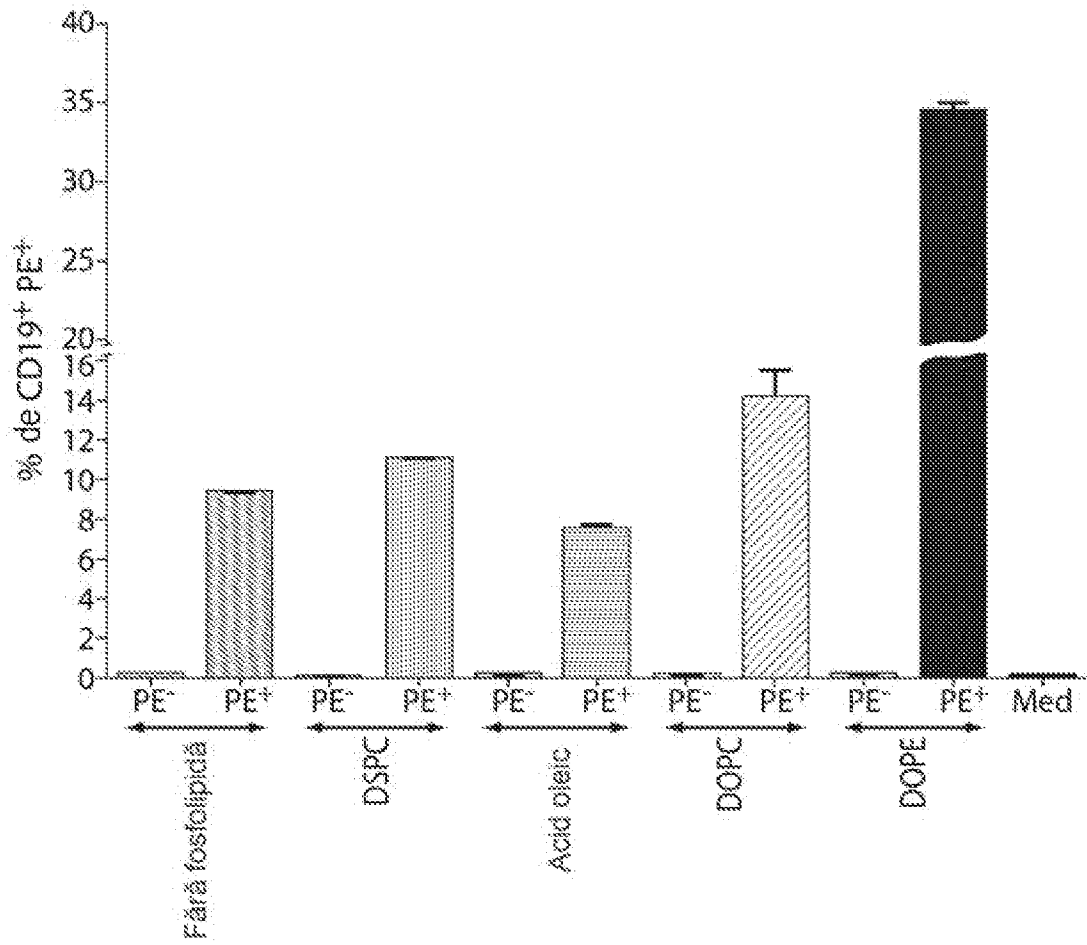


FIG. 18



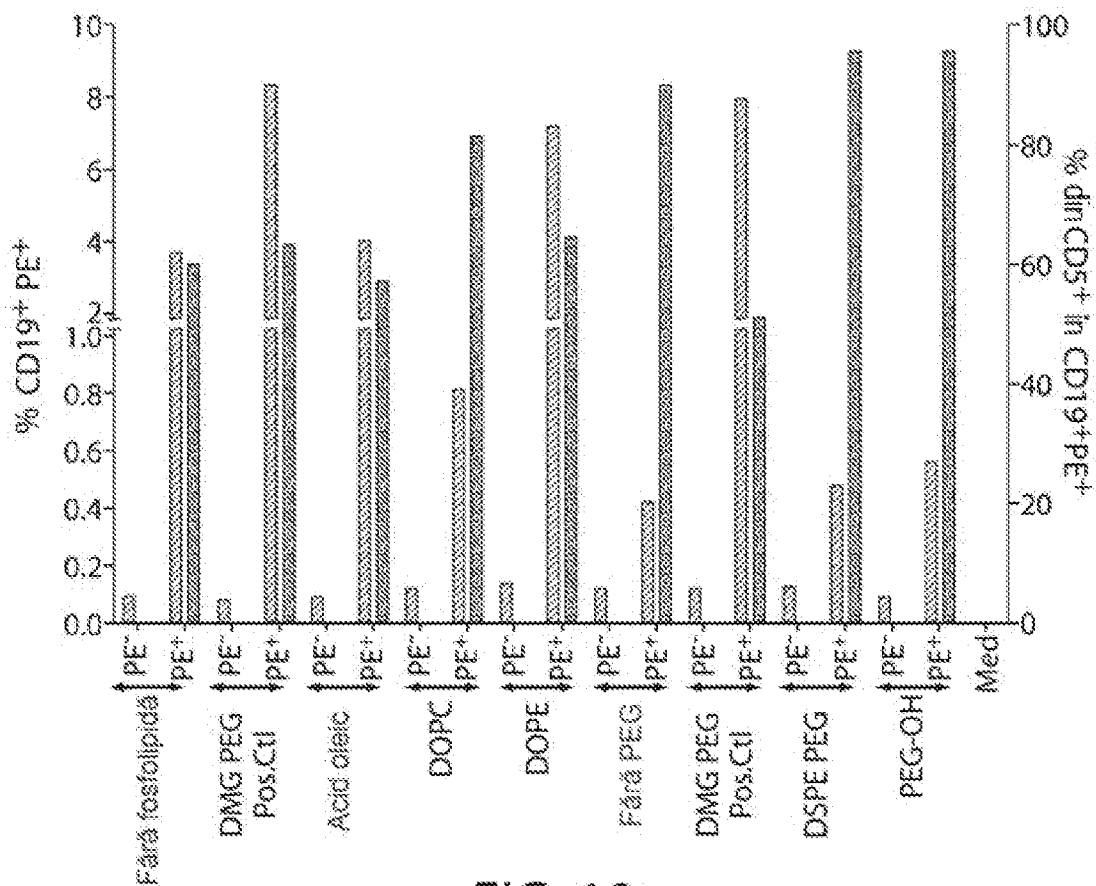


FIG. 19

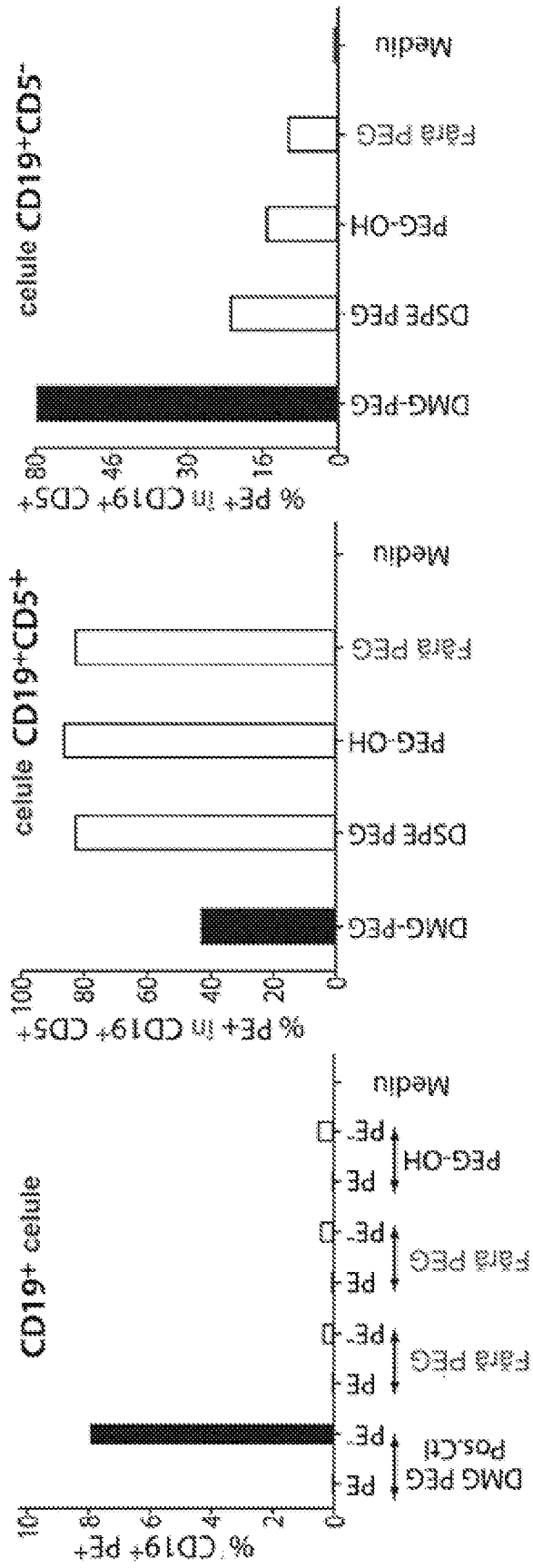


FIG. 20

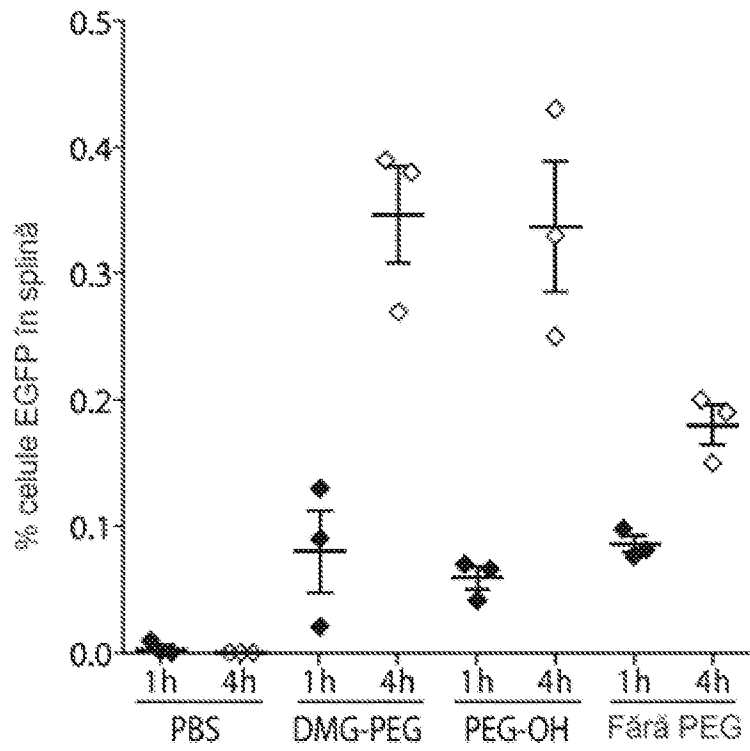


FIG. 21

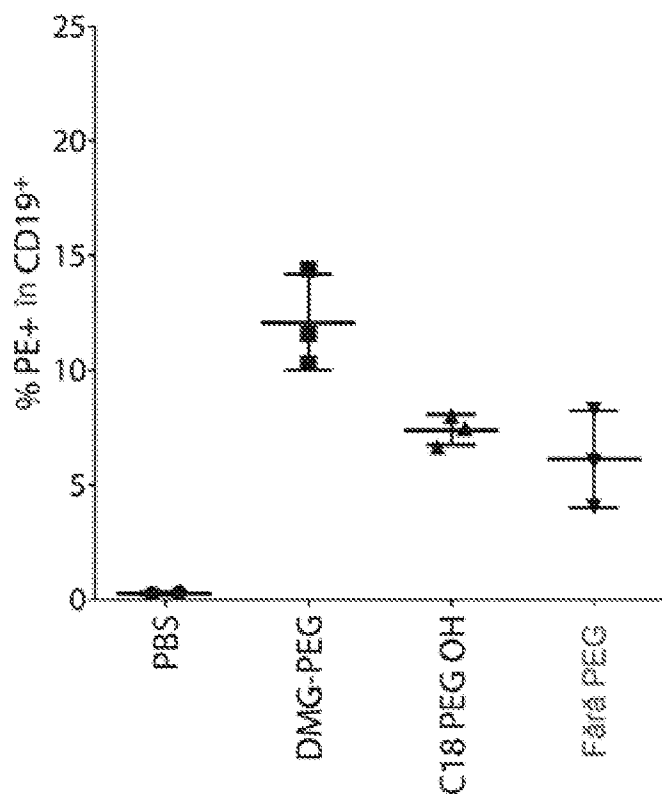


FIG. 22A

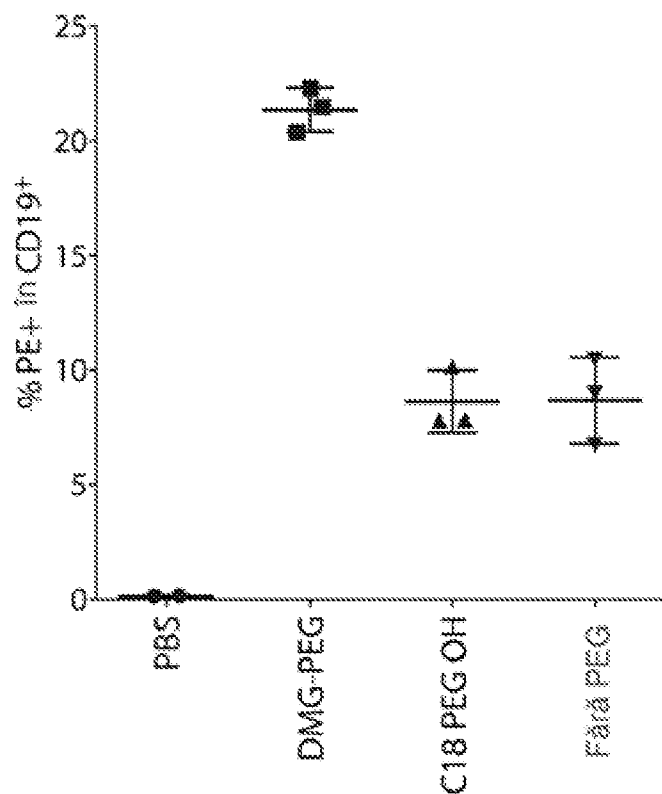
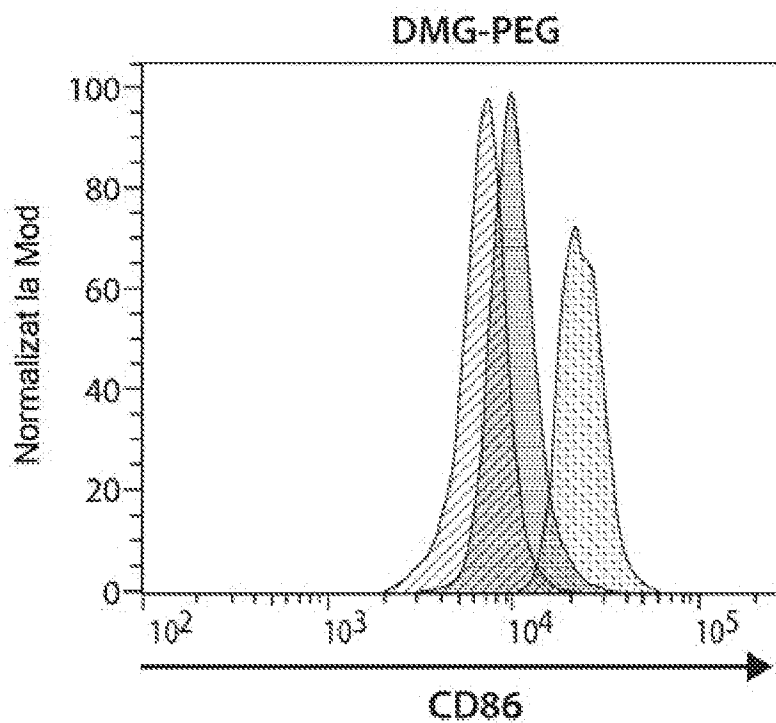
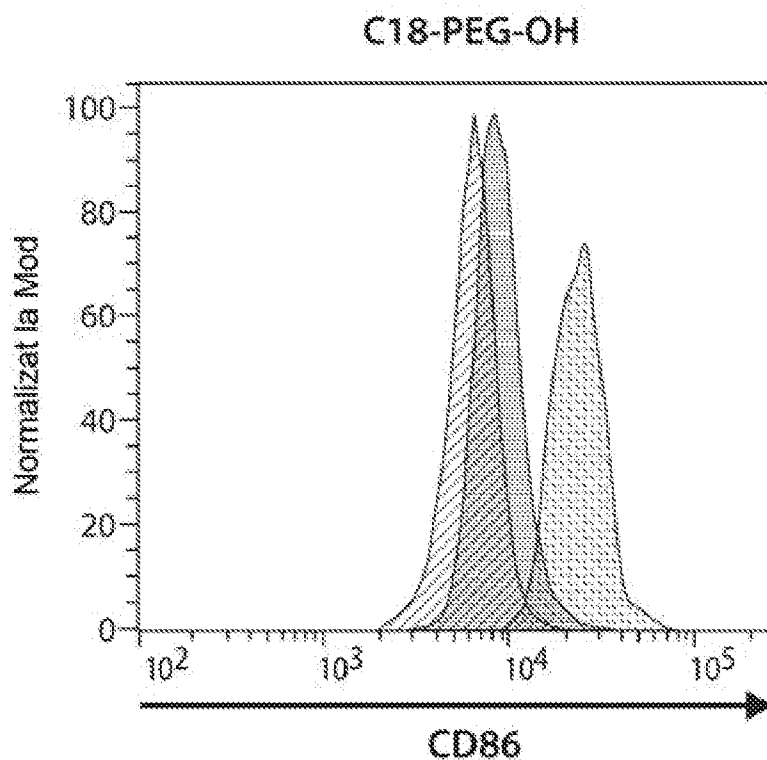


FIG. 22B



**FIG. 23A**



**FIG. 23B**

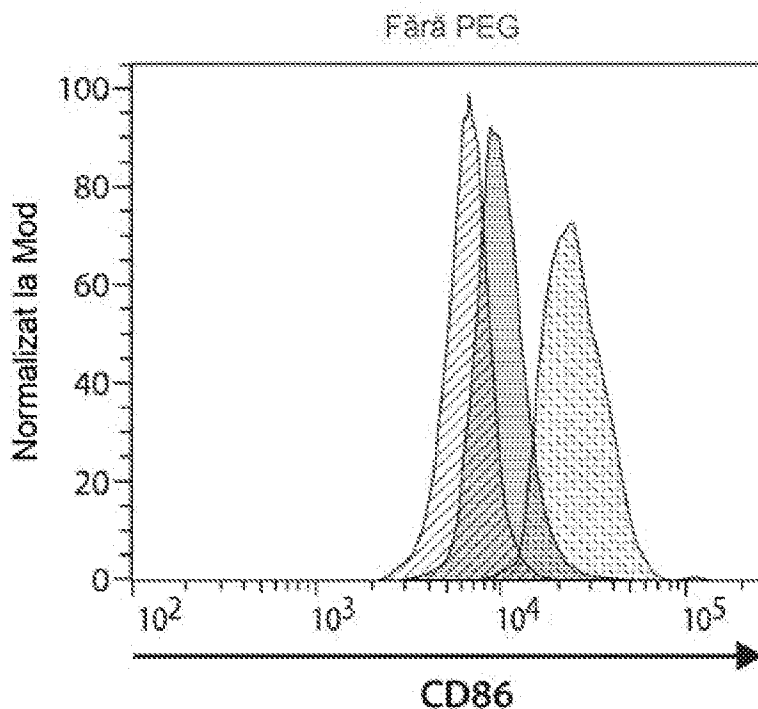


FIG. 23C

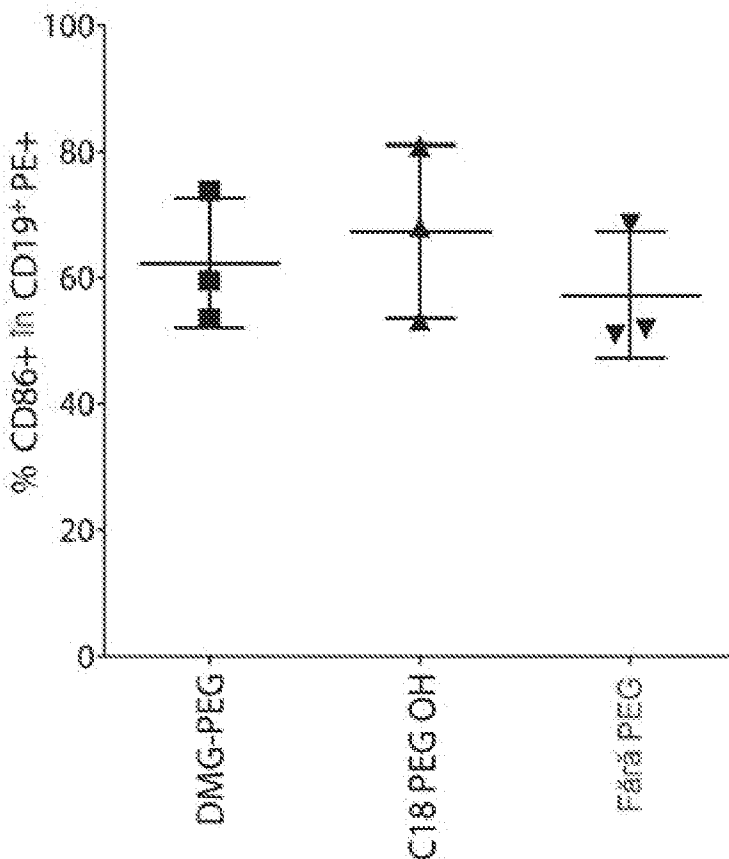


FIG. 23D

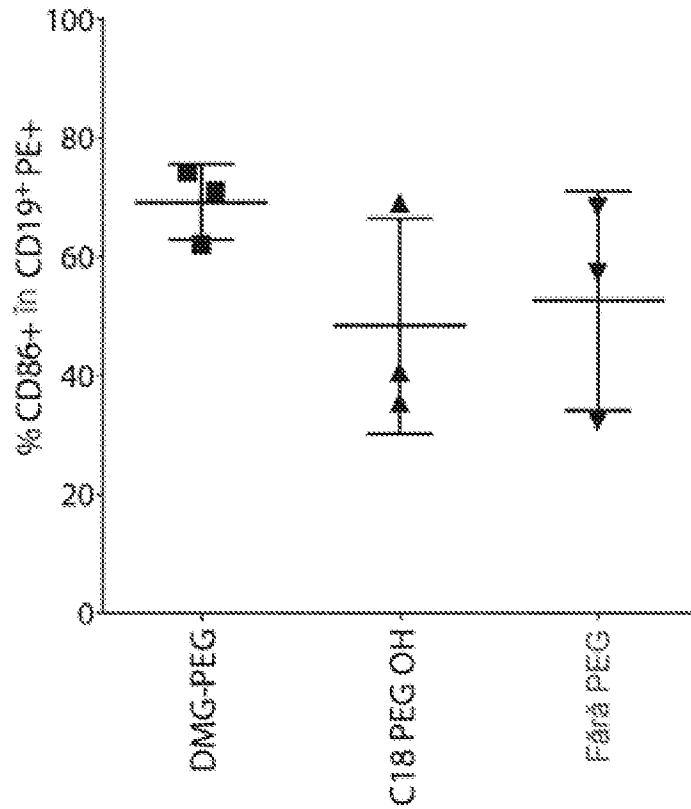


FIG. 23E

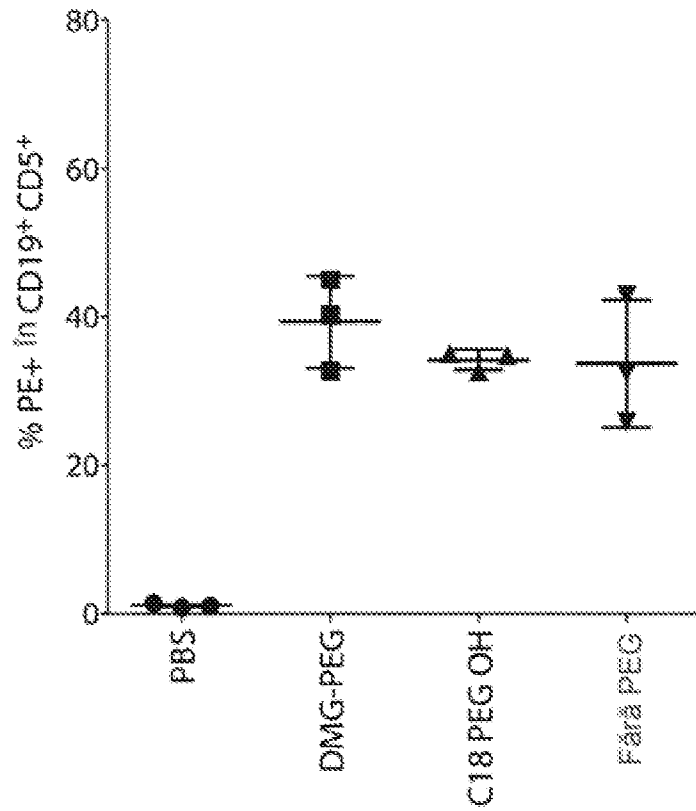


FIG. 24A

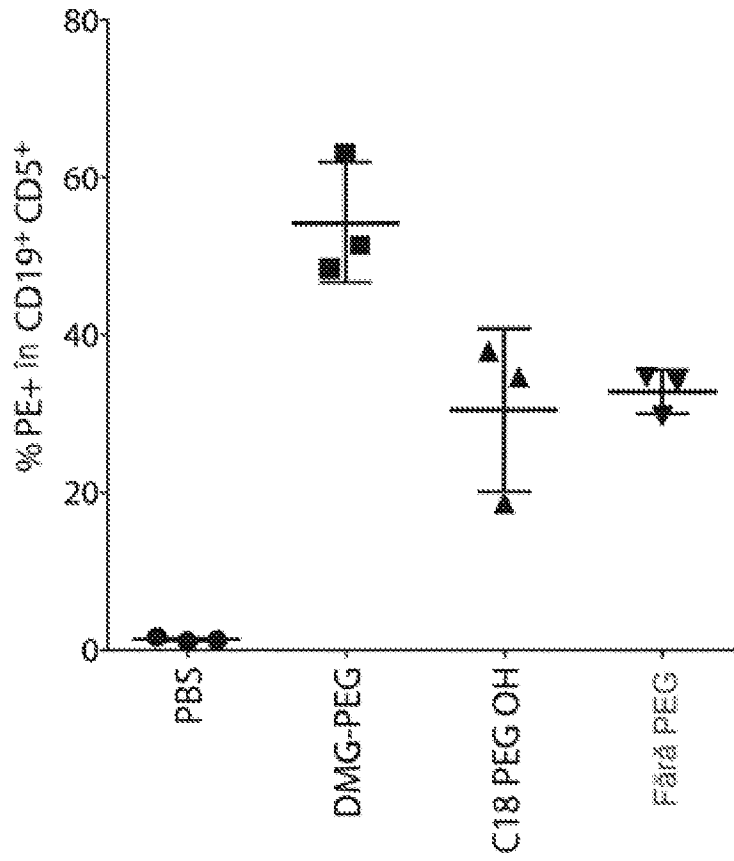


FIG. 24B



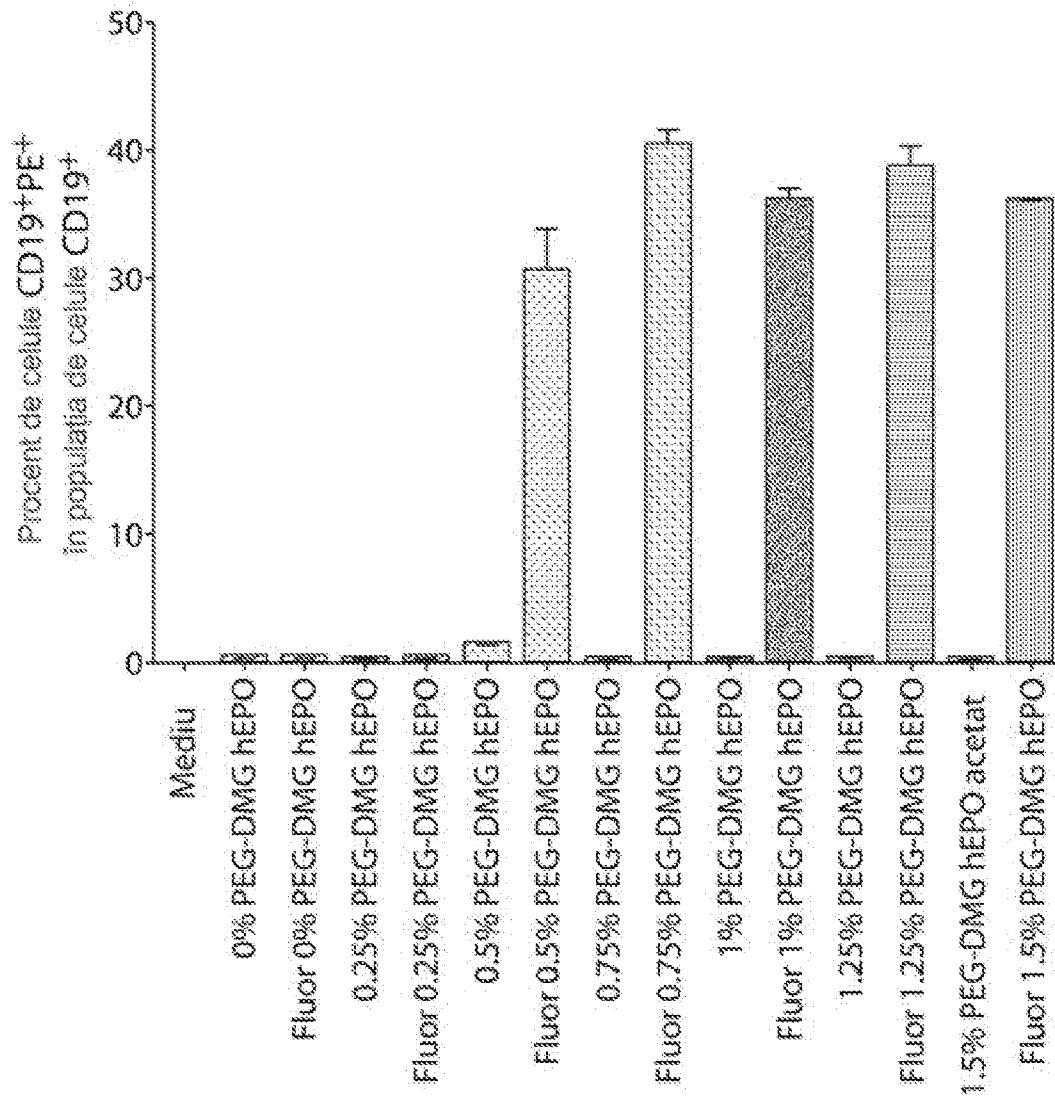


FIG. 25

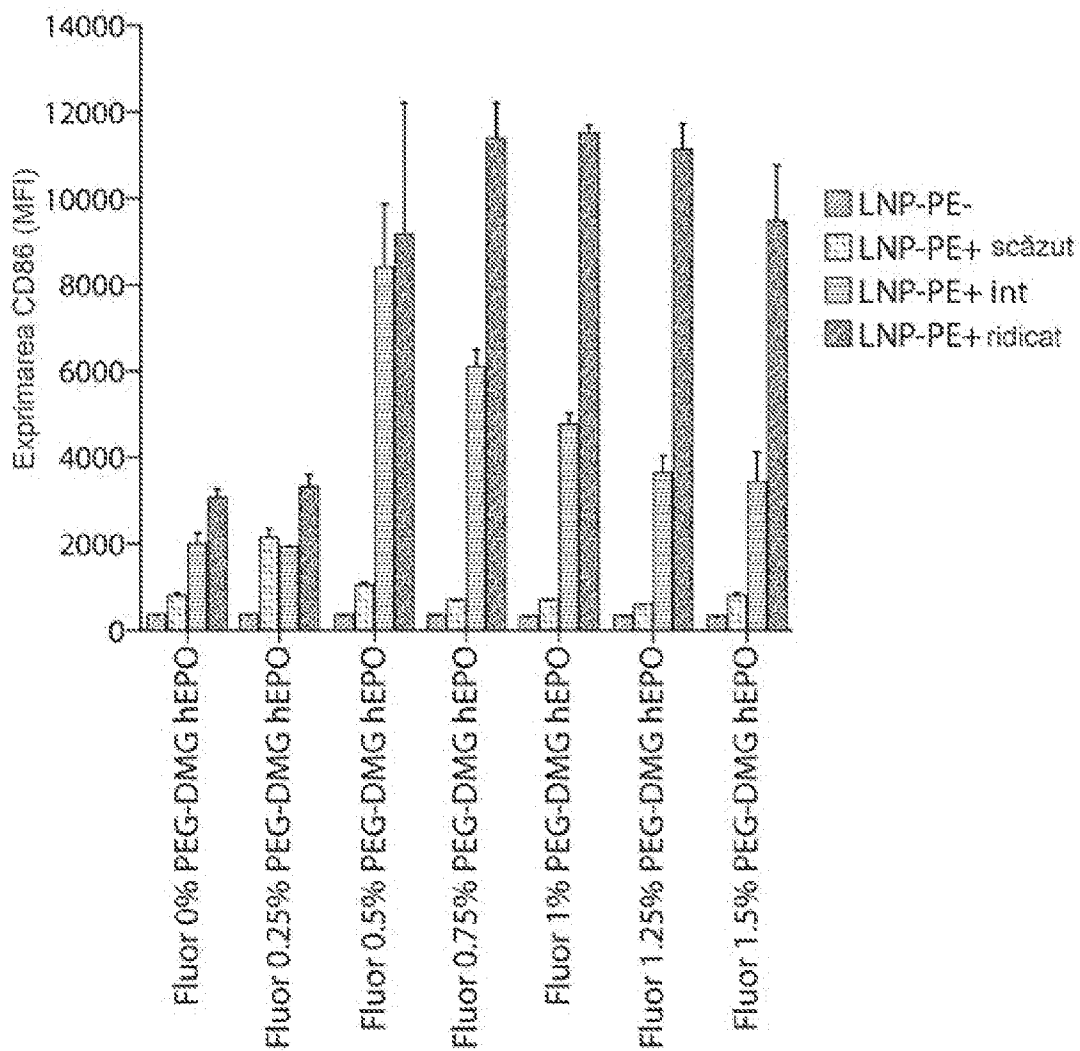
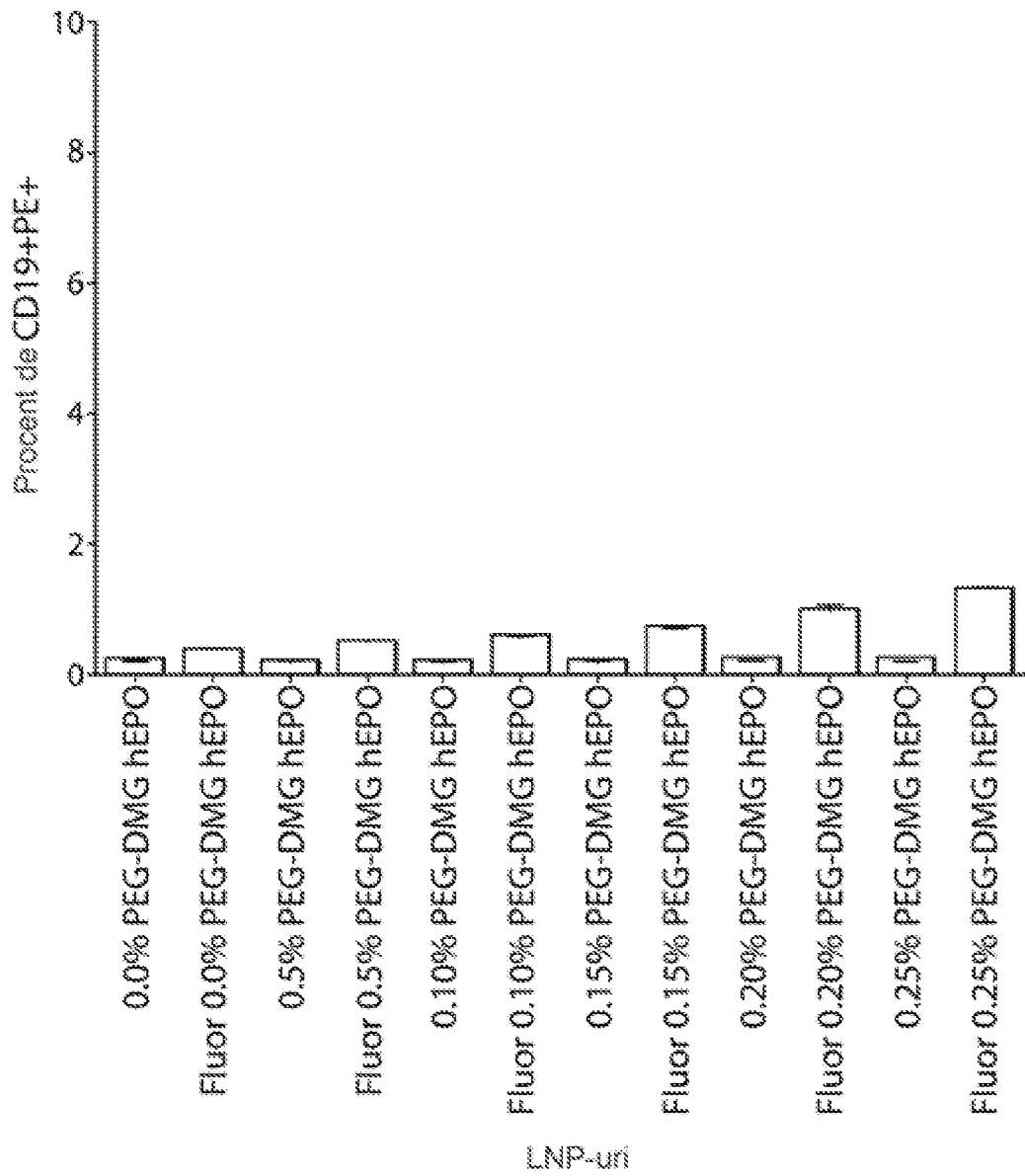


FIG. 26



LNP-urf

FIG. 27

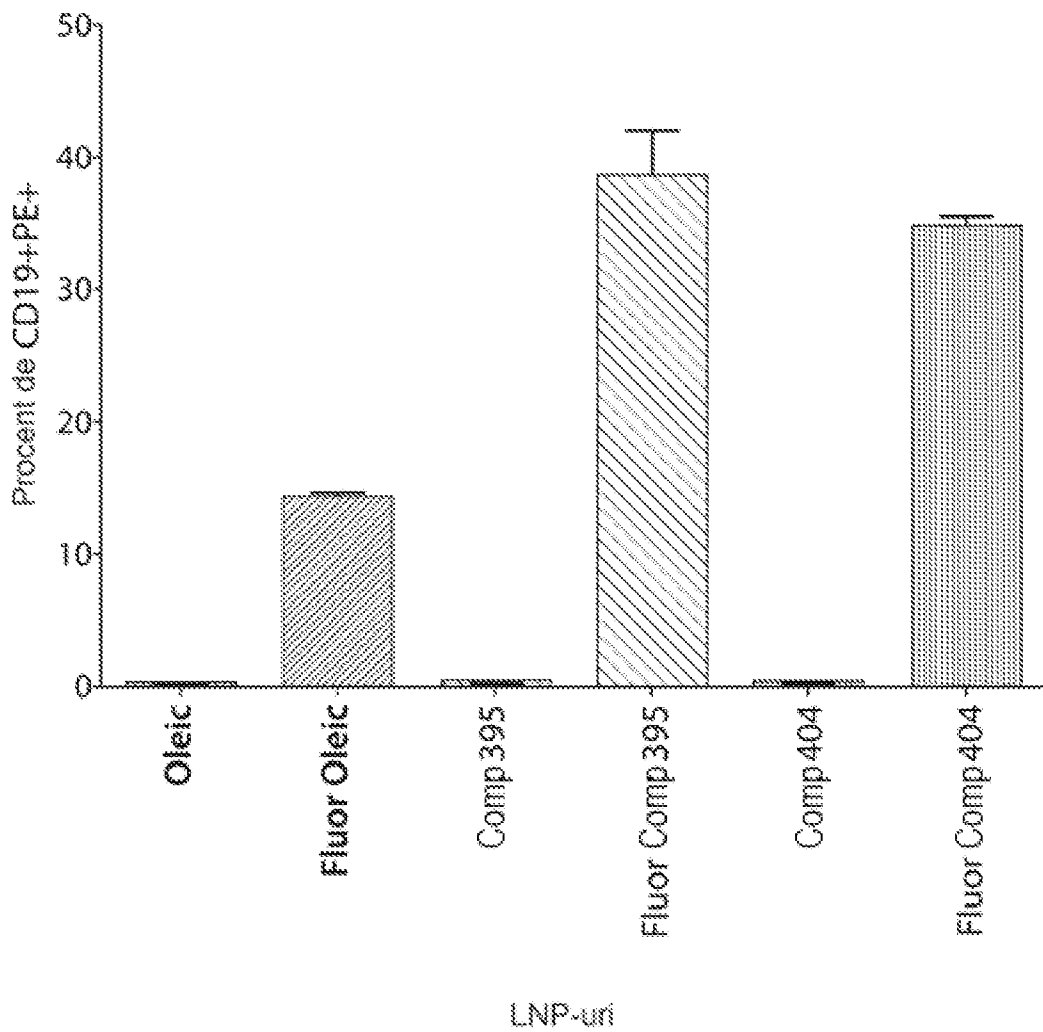


FIG. 28

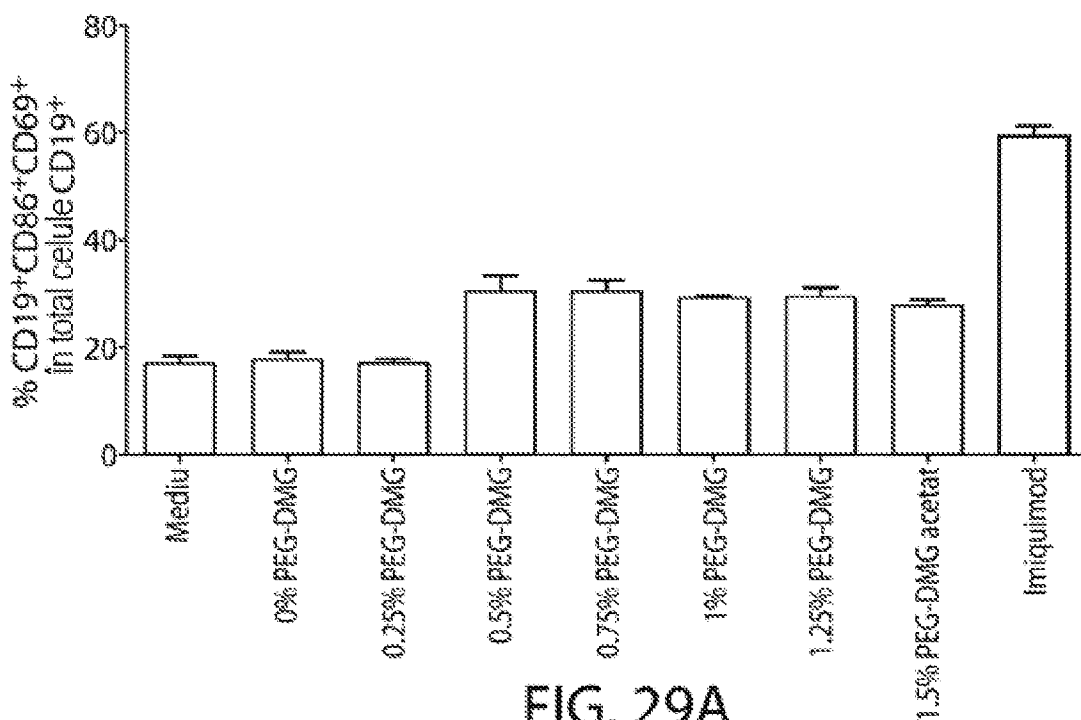


FIG. 29A

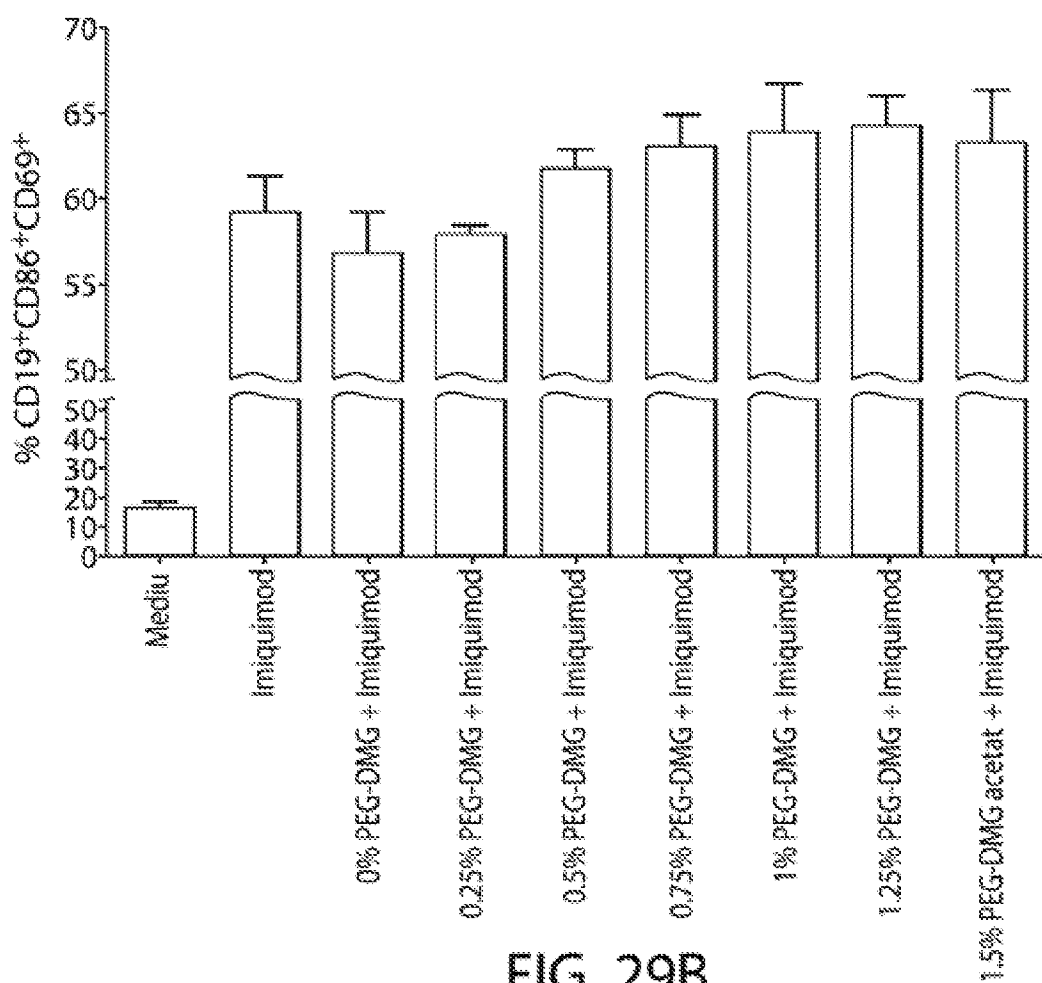


FIG. 29B

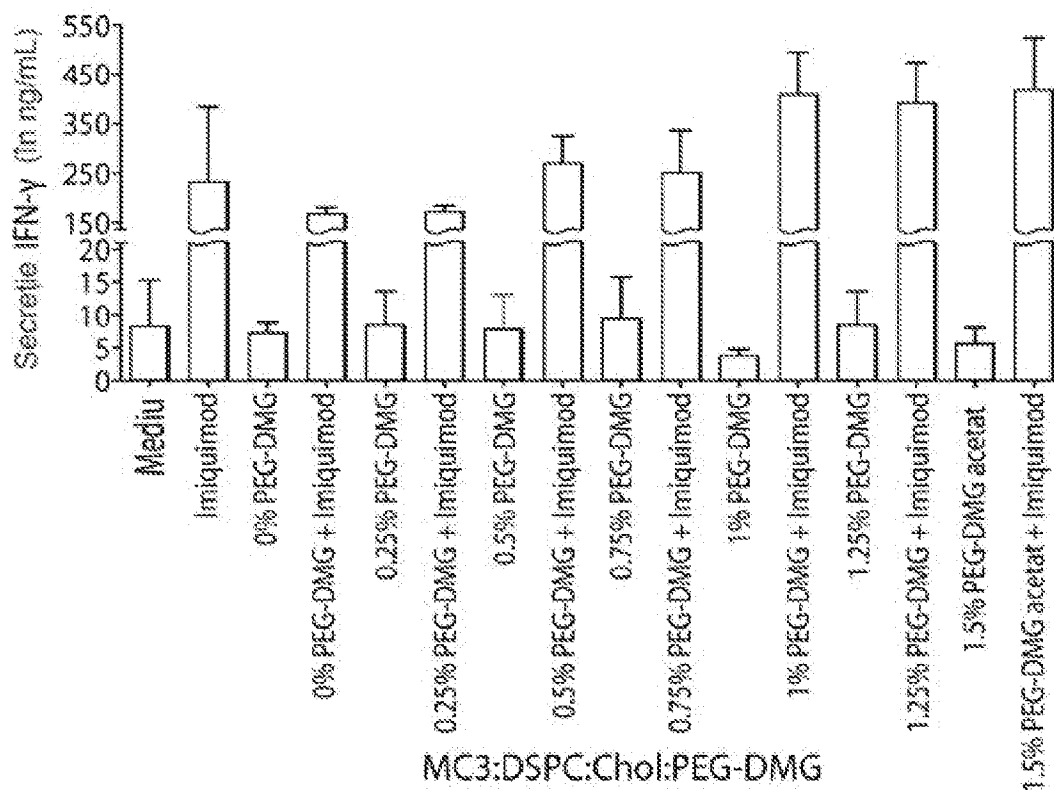


FIG. 30A

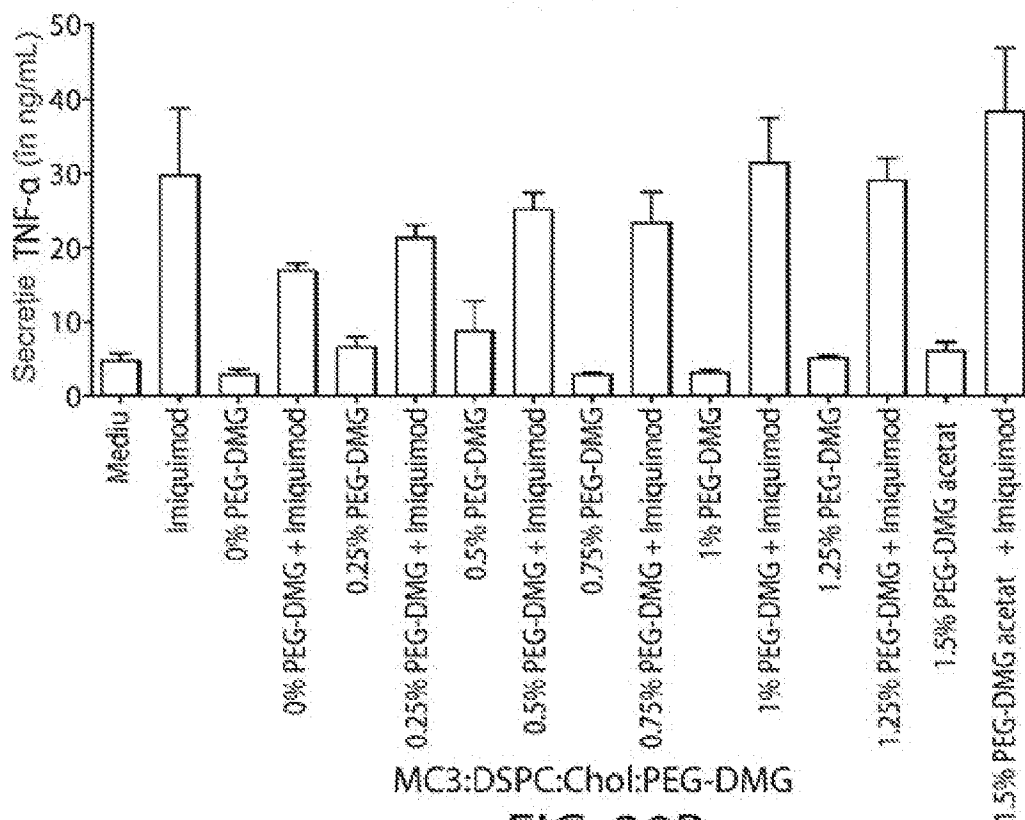


FIG. 30B

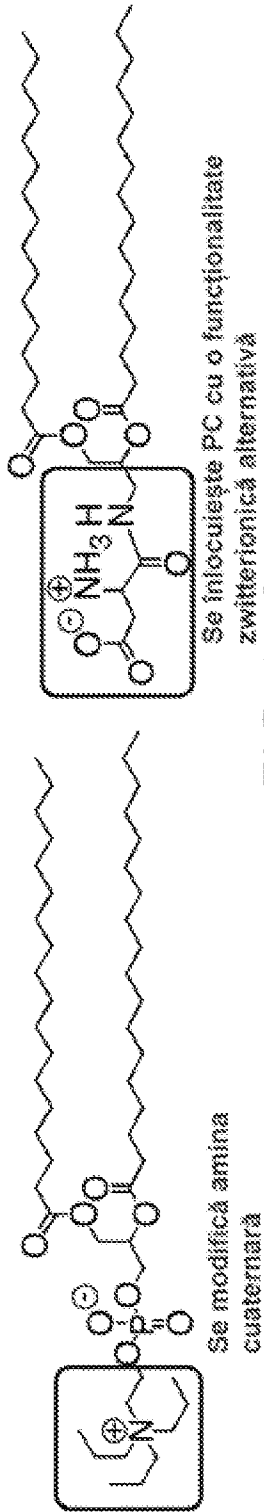


FIG. 31A

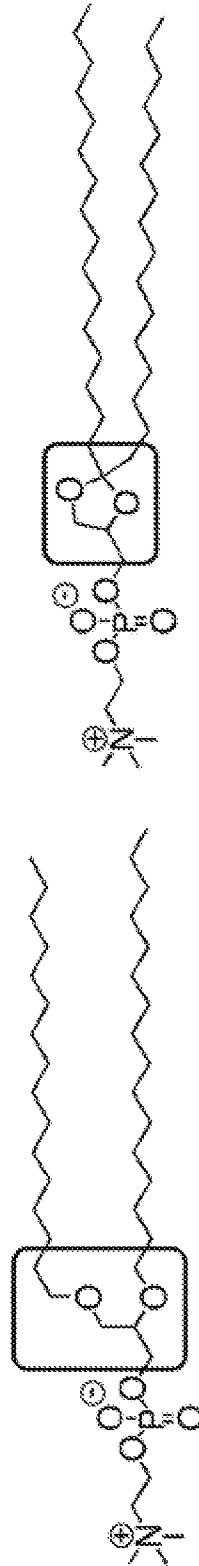


FIG. 31B

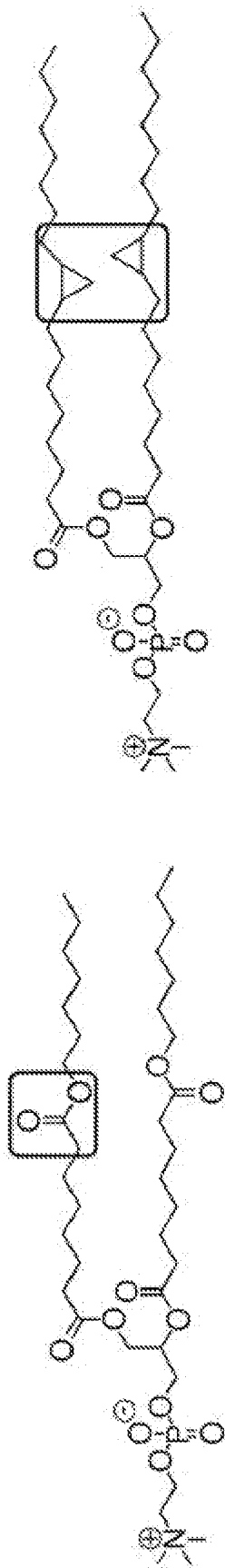


FIG. 31C

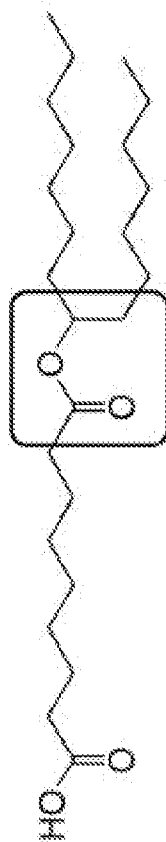


FIG. 31D



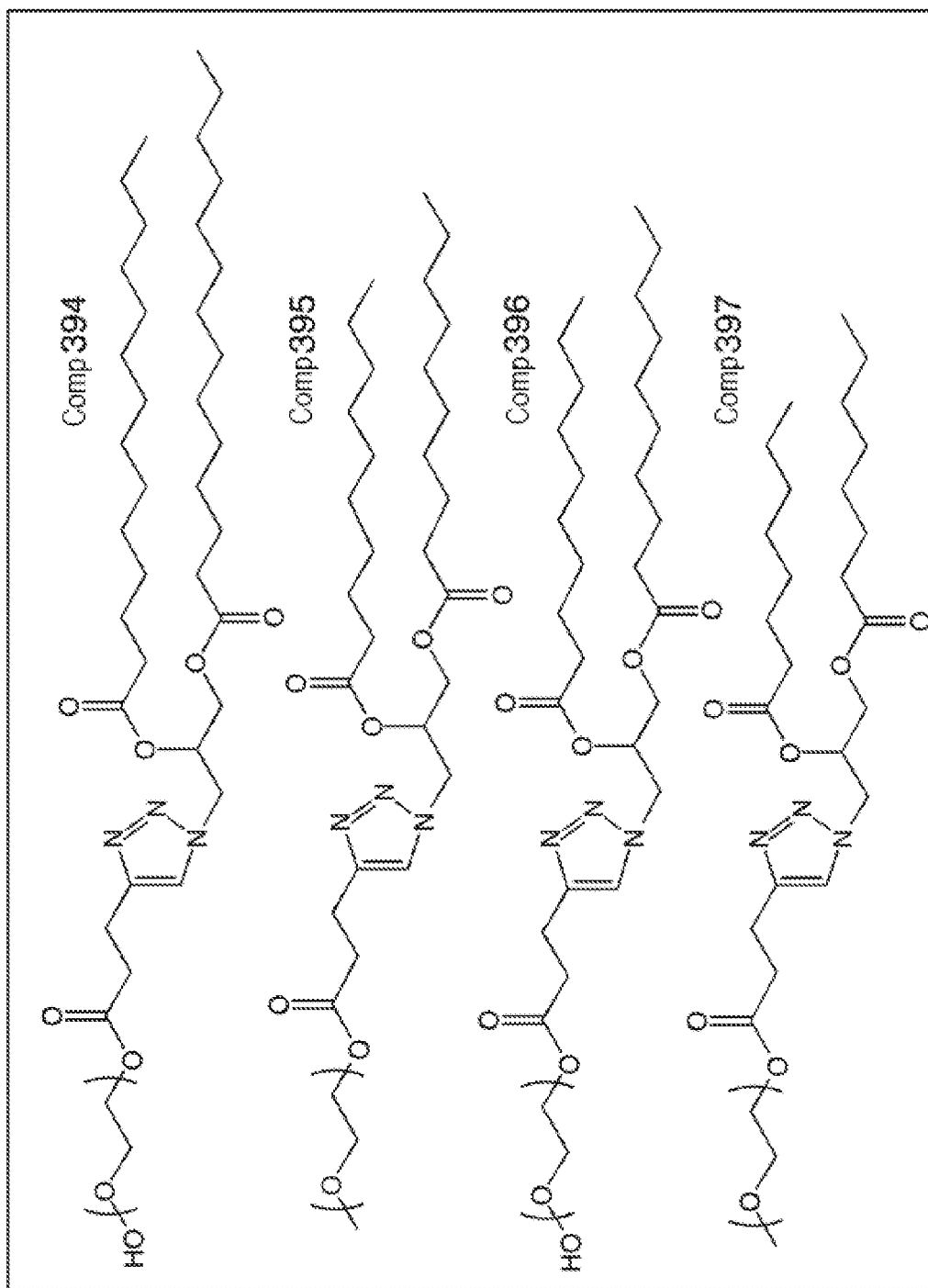


FIG. 32A

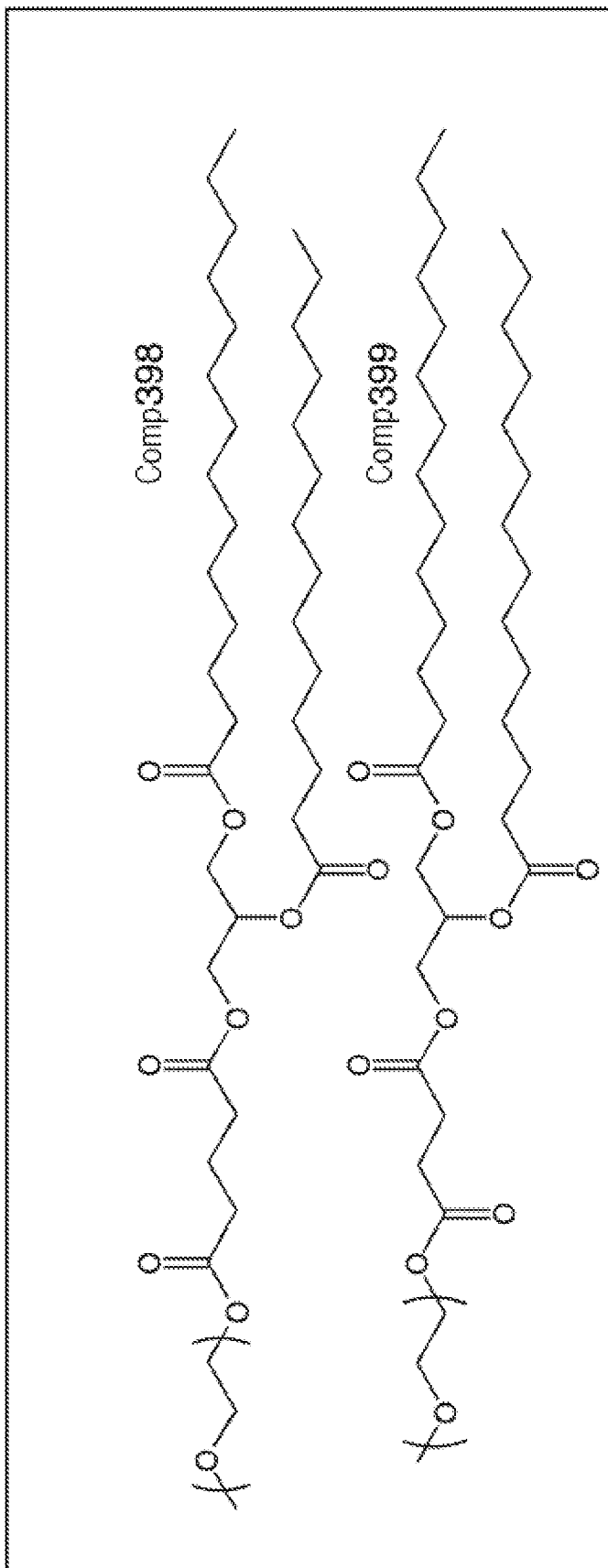


FIG. 32B

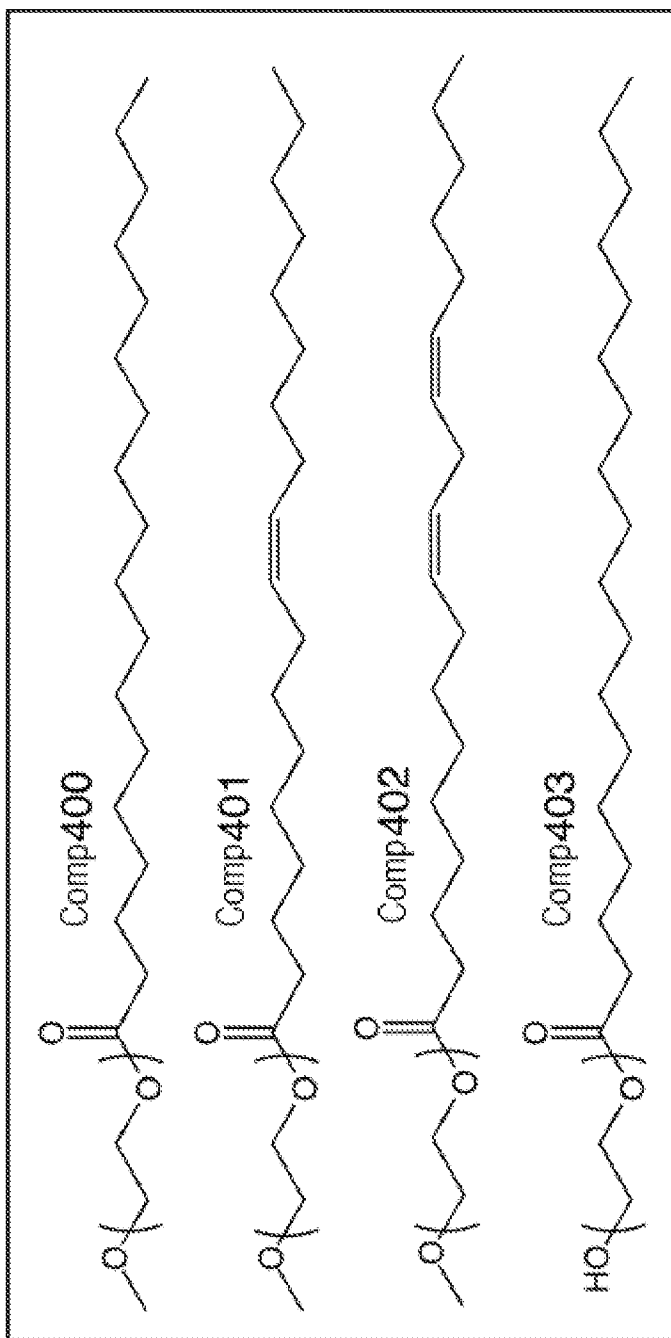


FIG. 32C

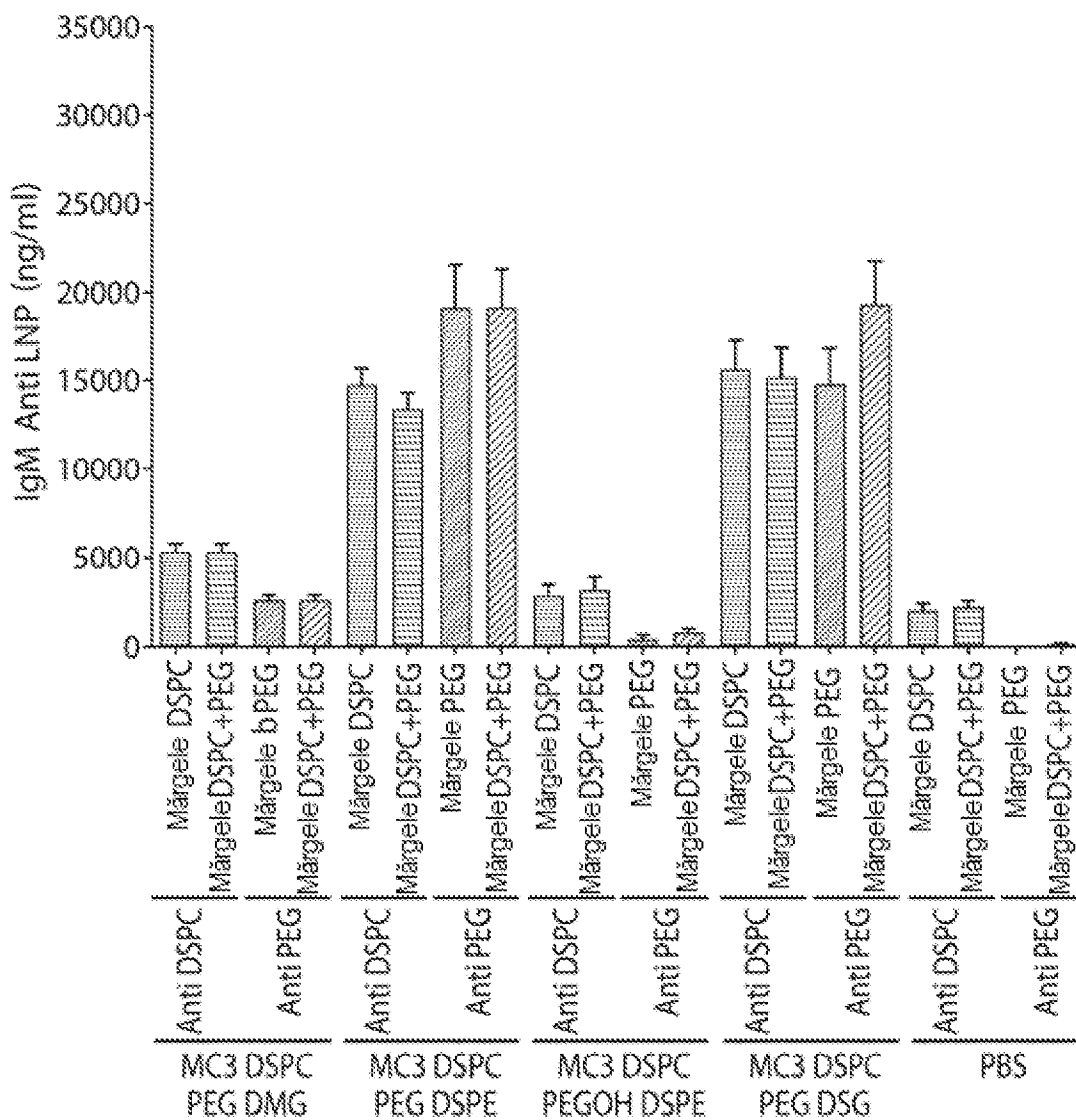


FIG. 33

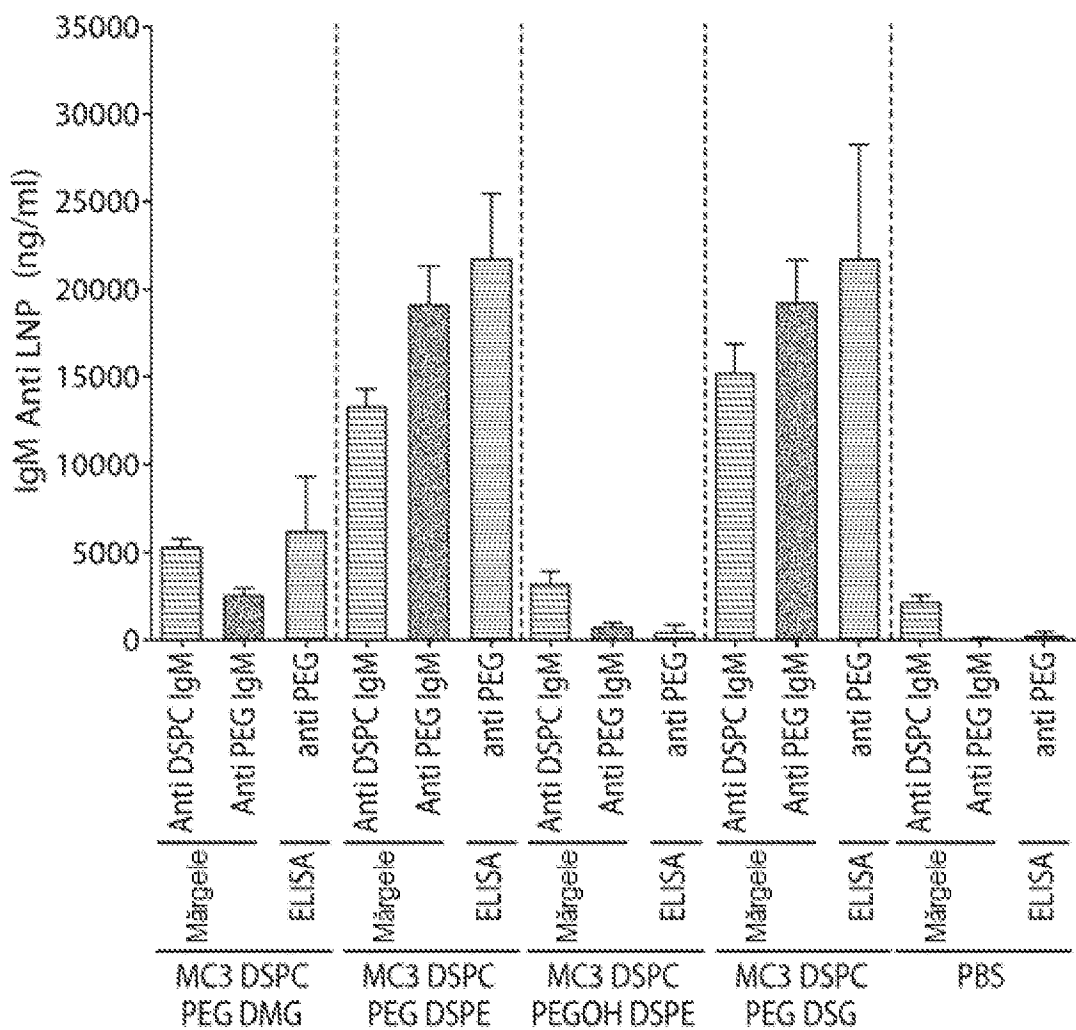


FIG. 34

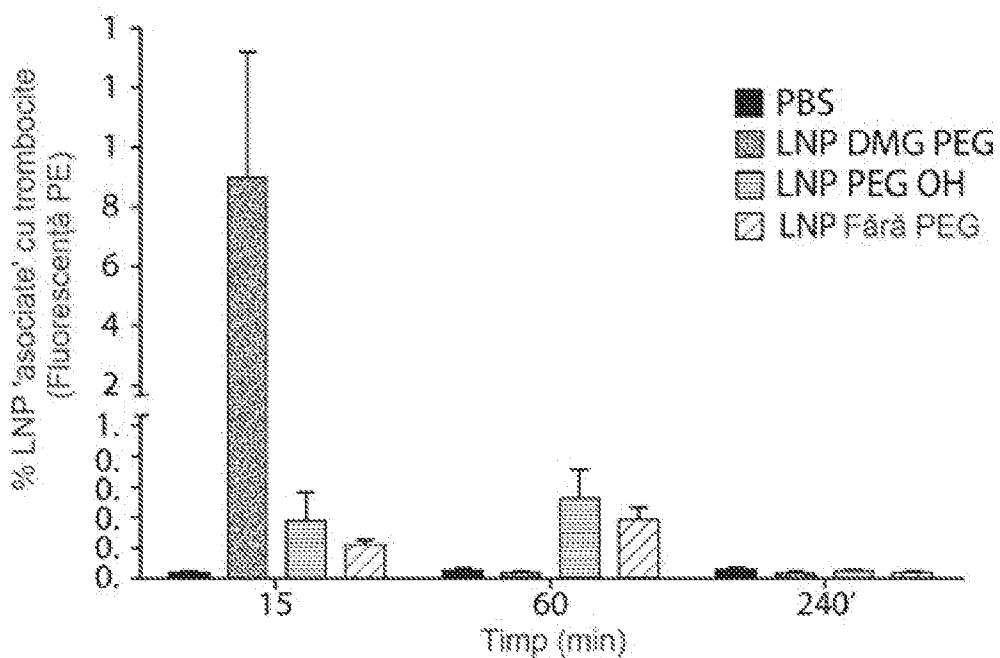


FIG. 35

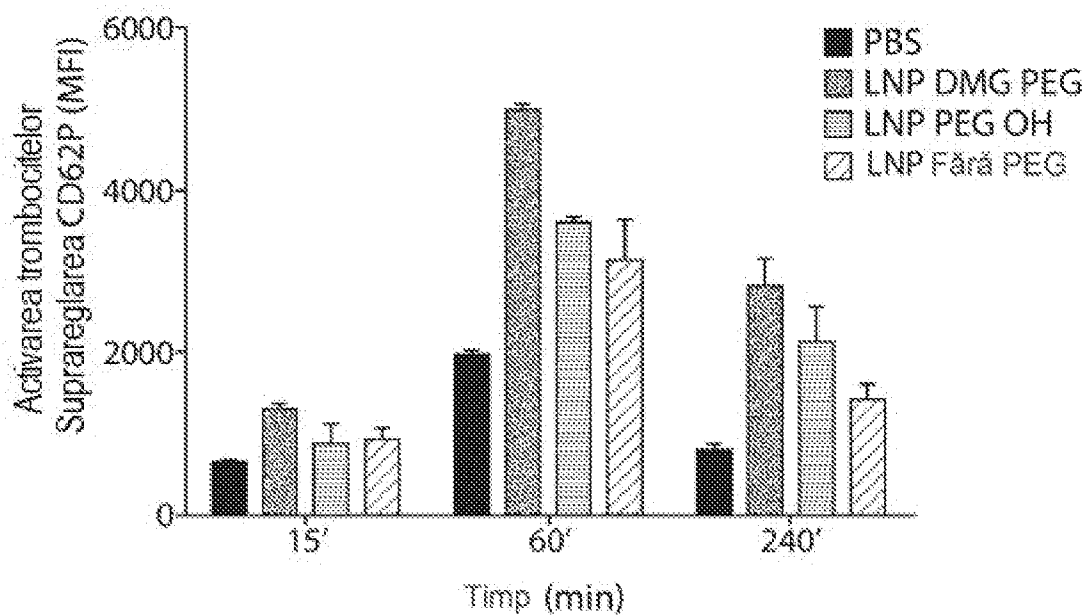


FIG. 36

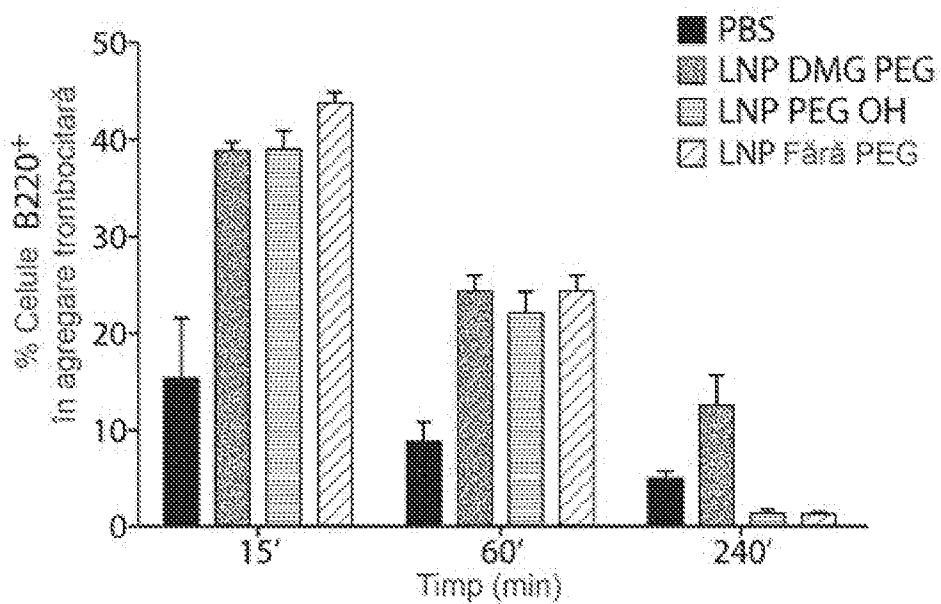


FIG. 37A

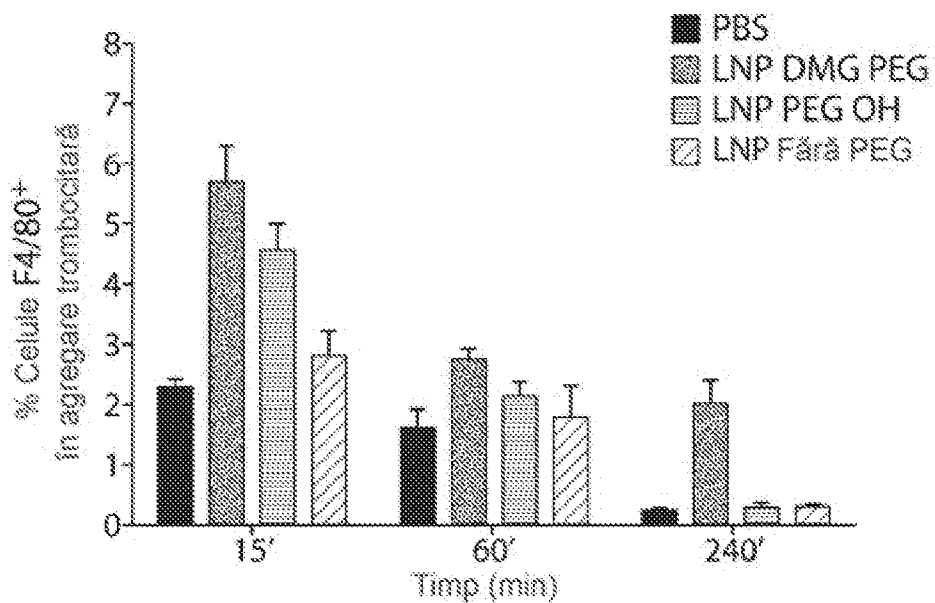


FIG. 37B

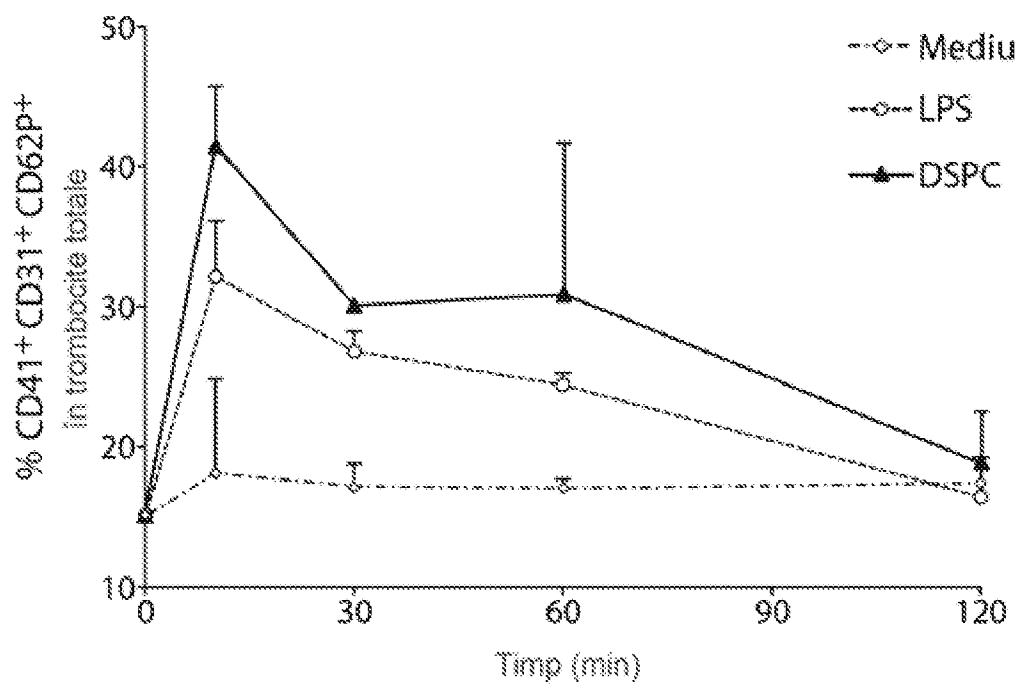


FIG. 38



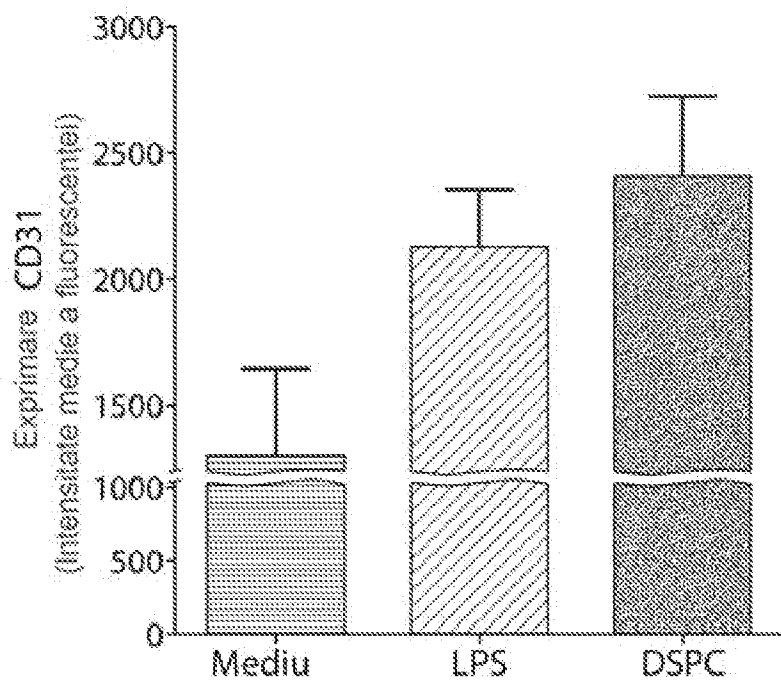


FIG. 39A

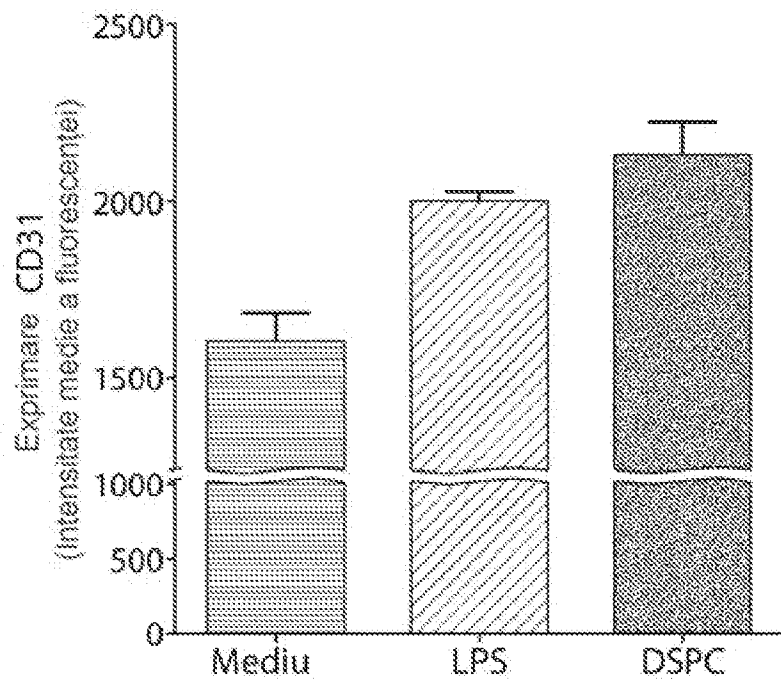


FIG. 39B

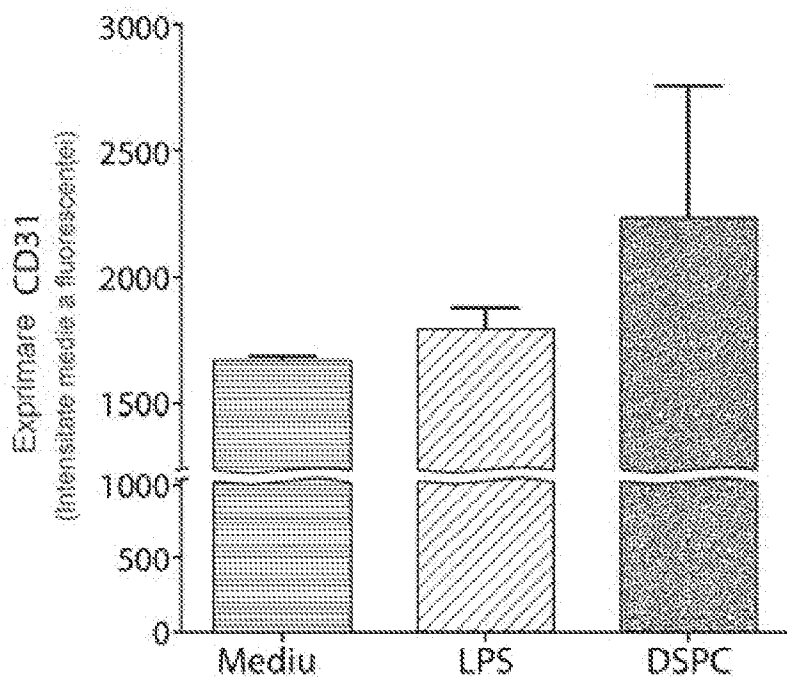


FIG. 39C

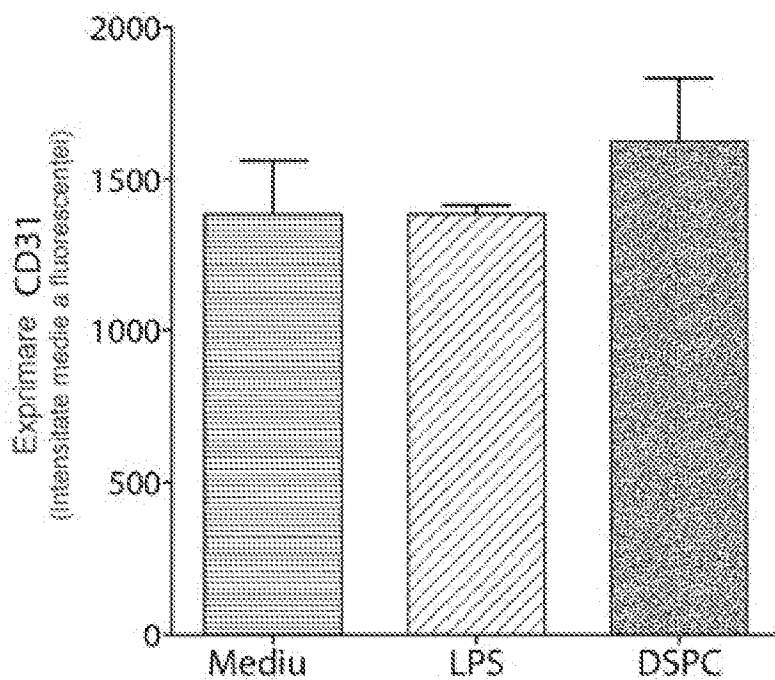


FIG. 39D

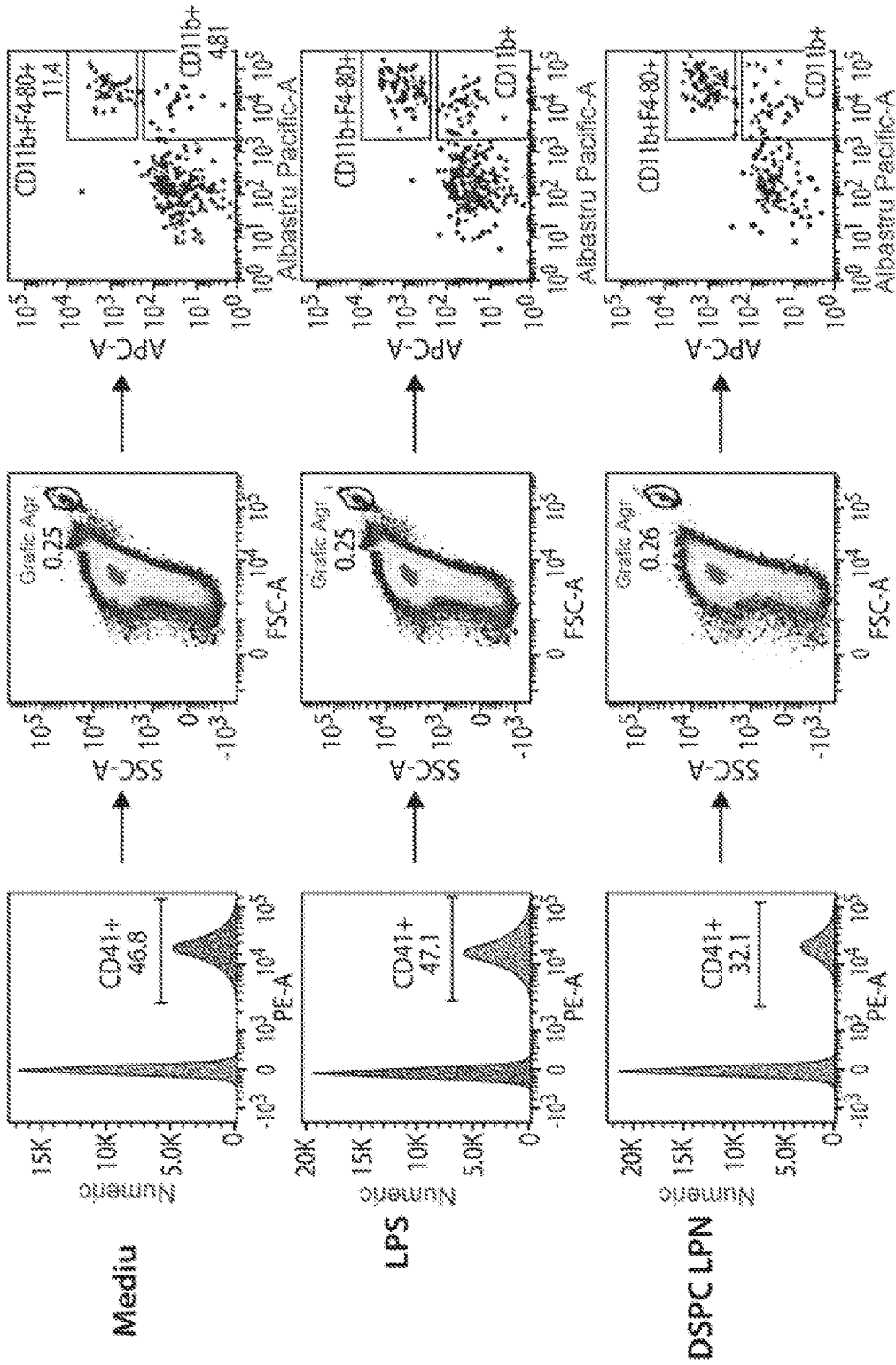


FIG. 40A

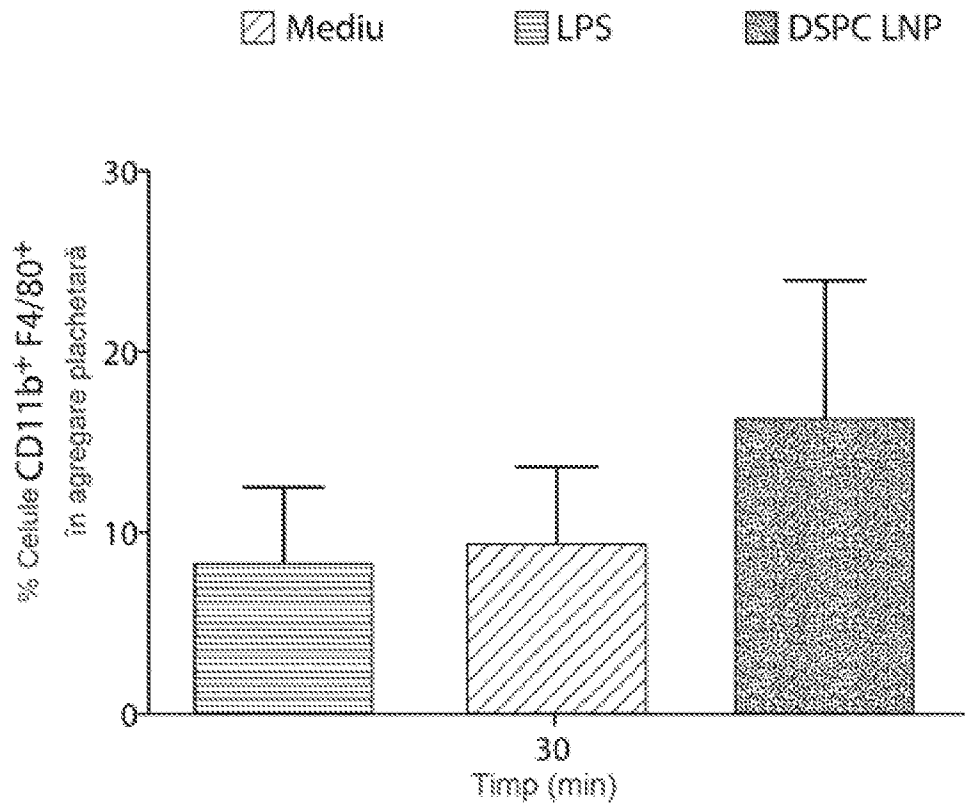


FIG. 40B

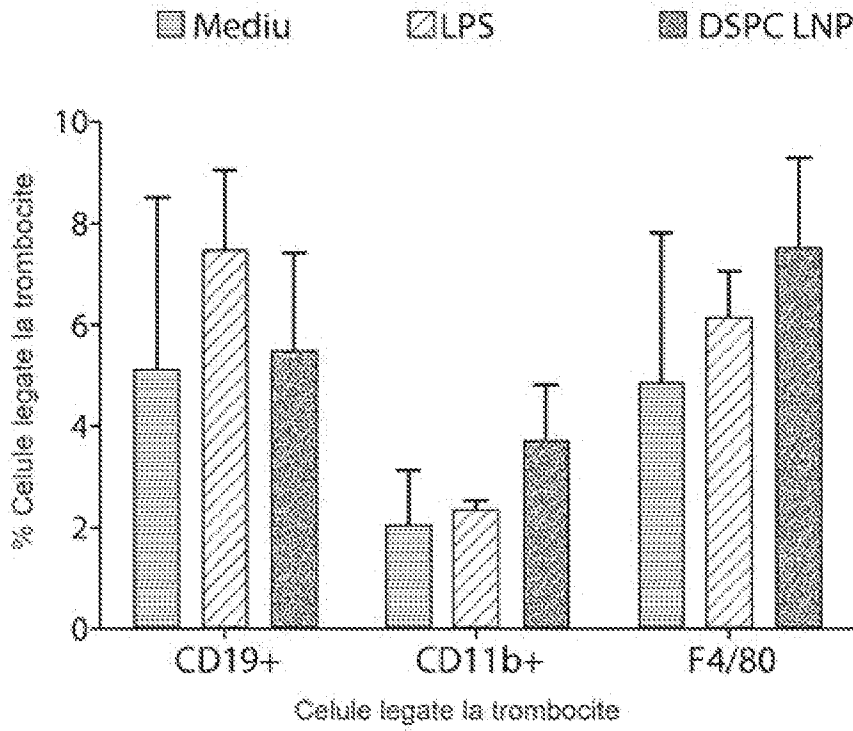


FIG. 41A

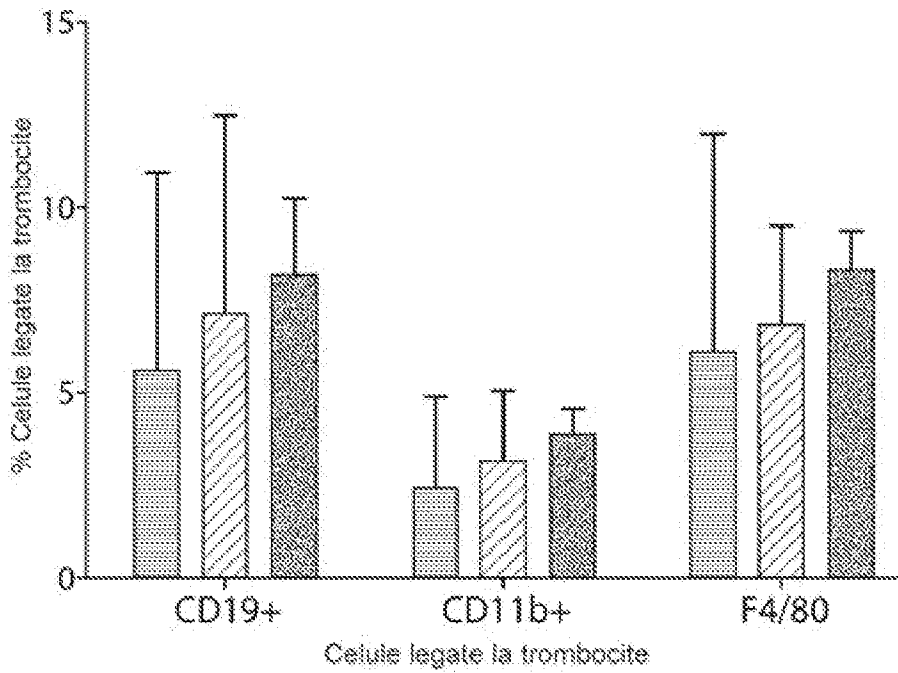


FIG. 41B

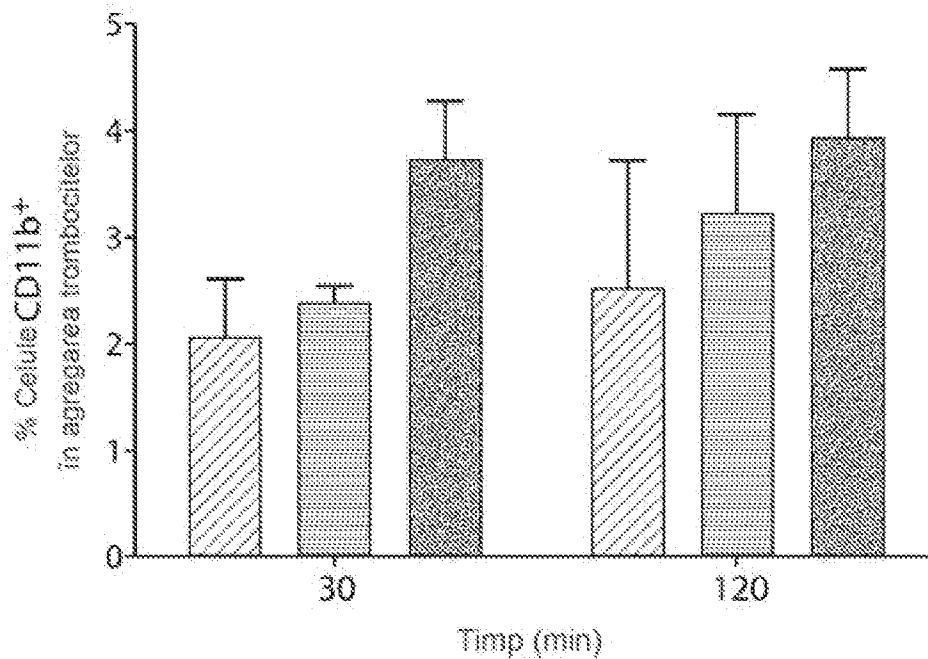


FIG. 42A

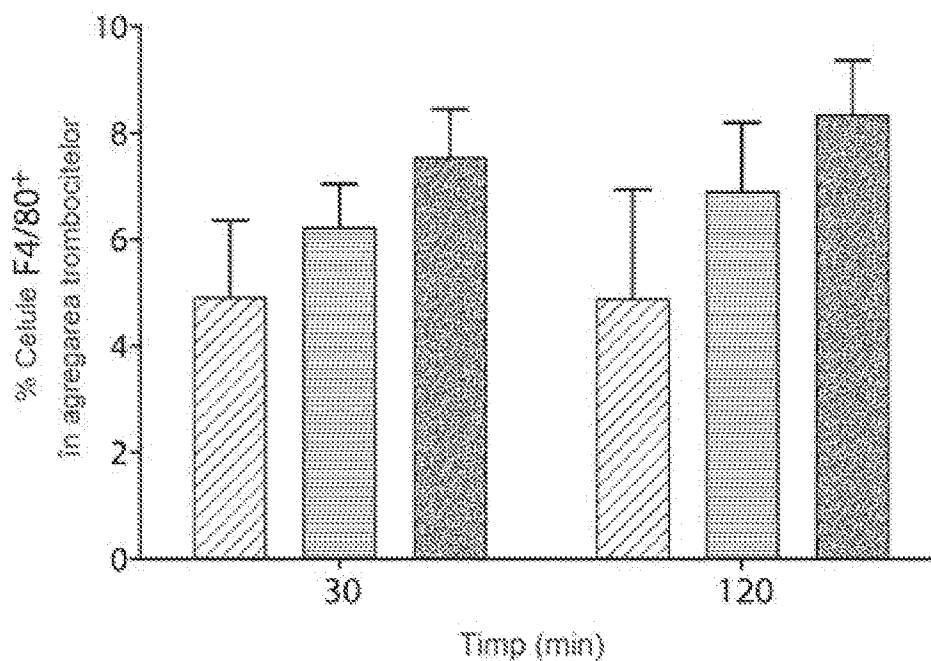


FIG. 42B

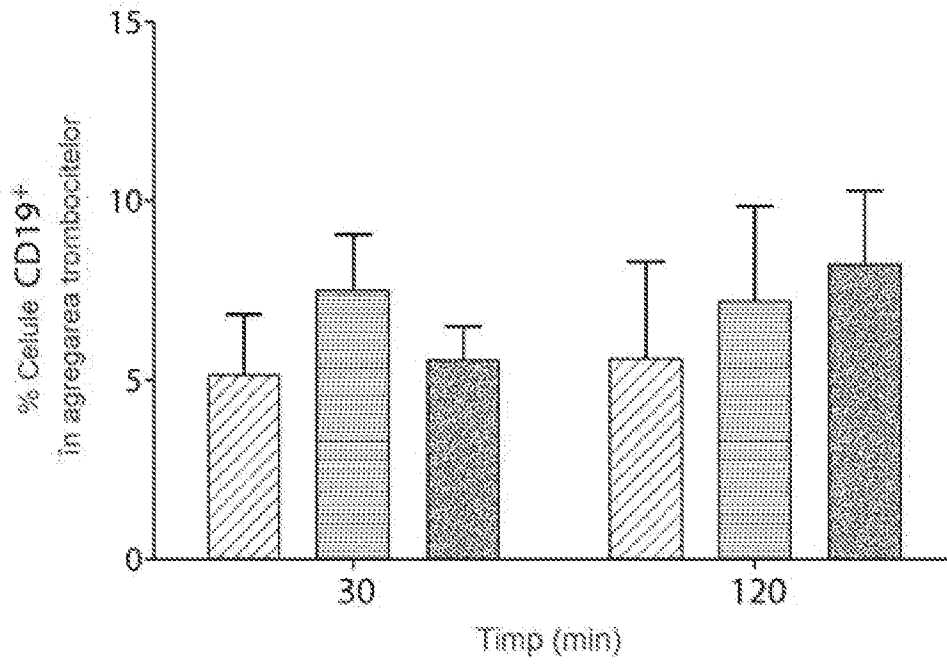


FIG. 42C

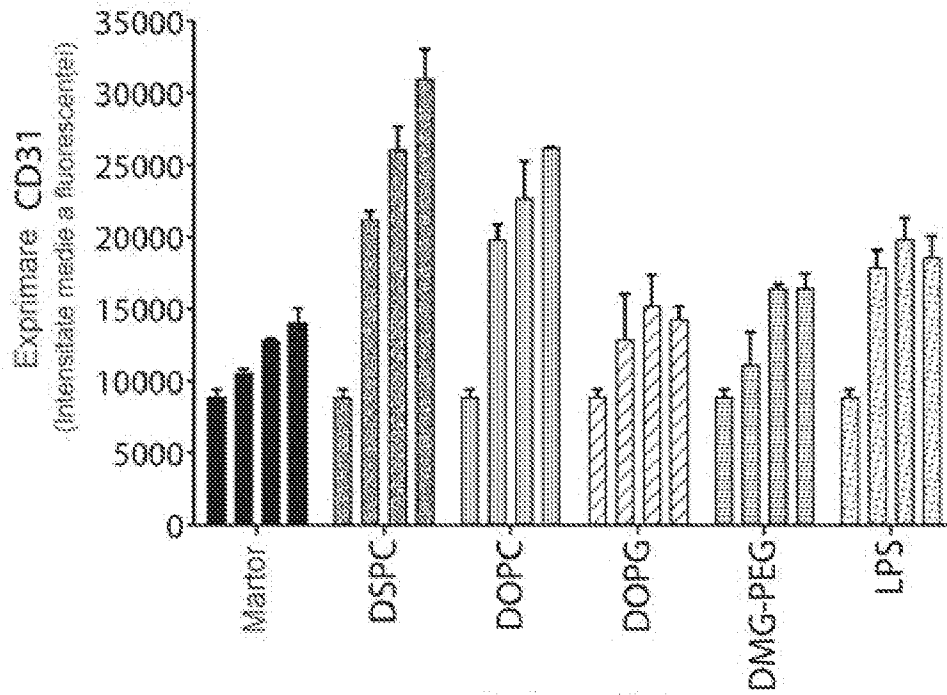


FIG. 43A

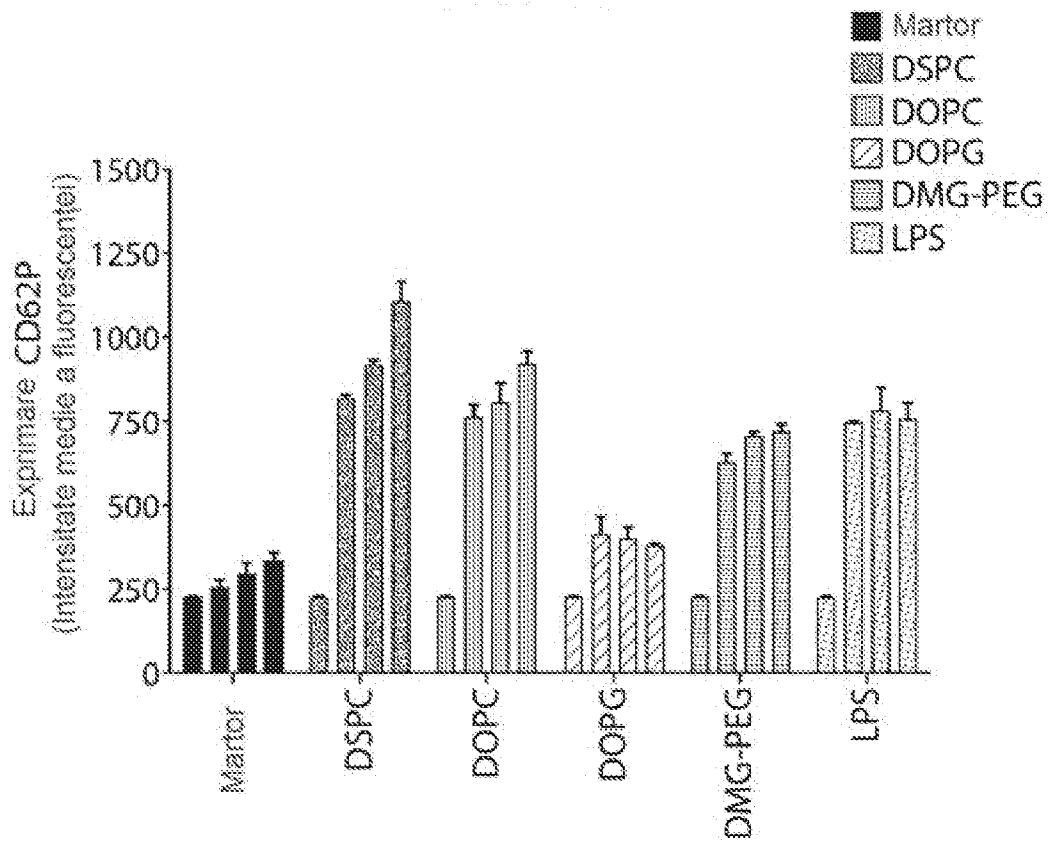


FIG. 43B



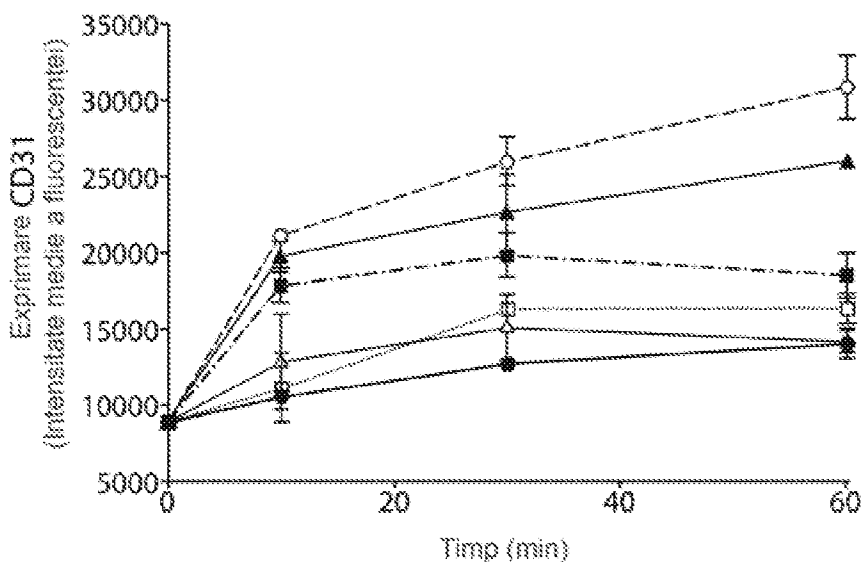


FIG. 44A

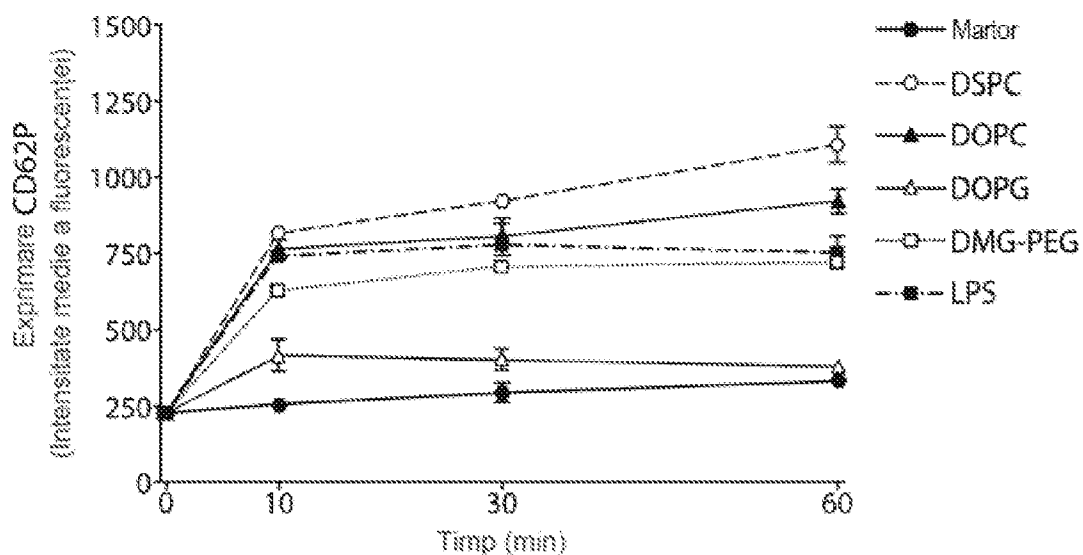


FIG. 44B

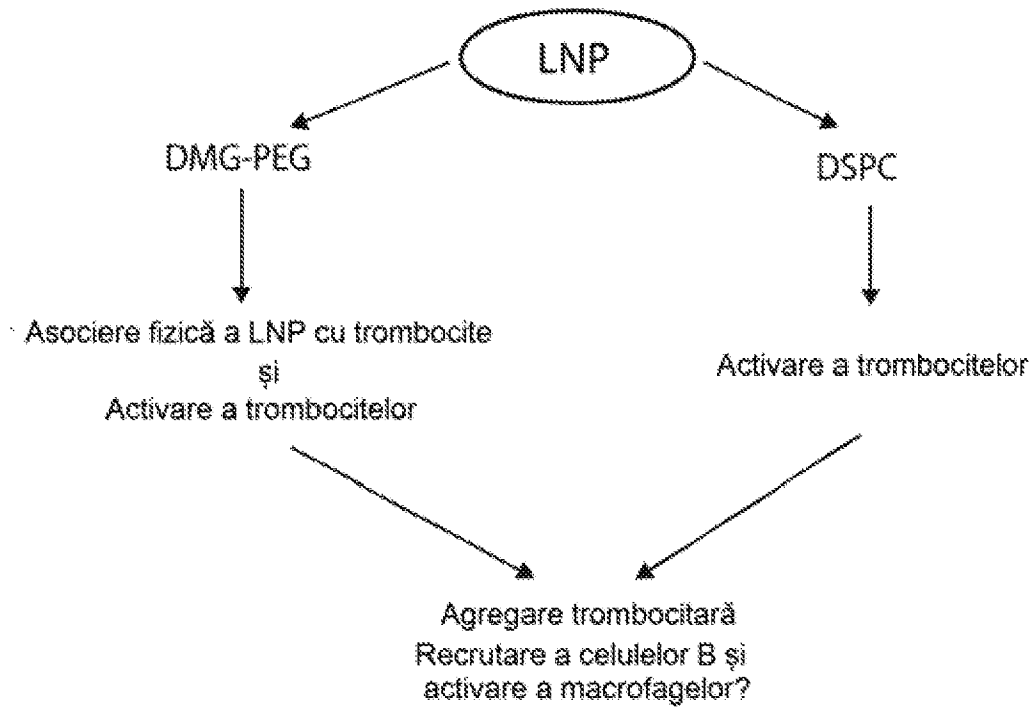


FIG. 45

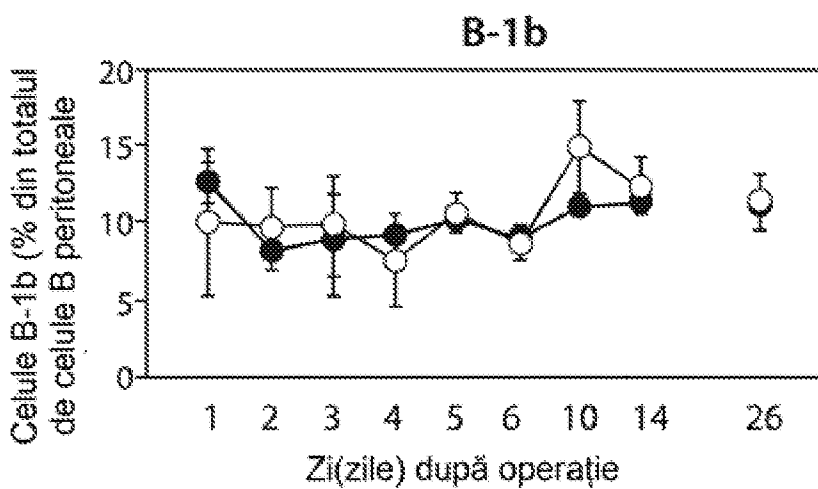
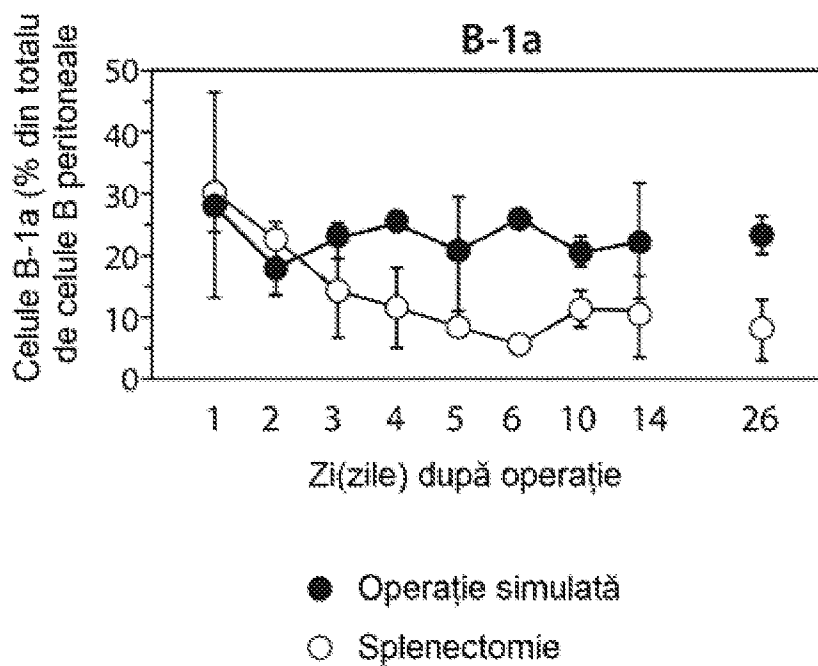


FIG. 46A

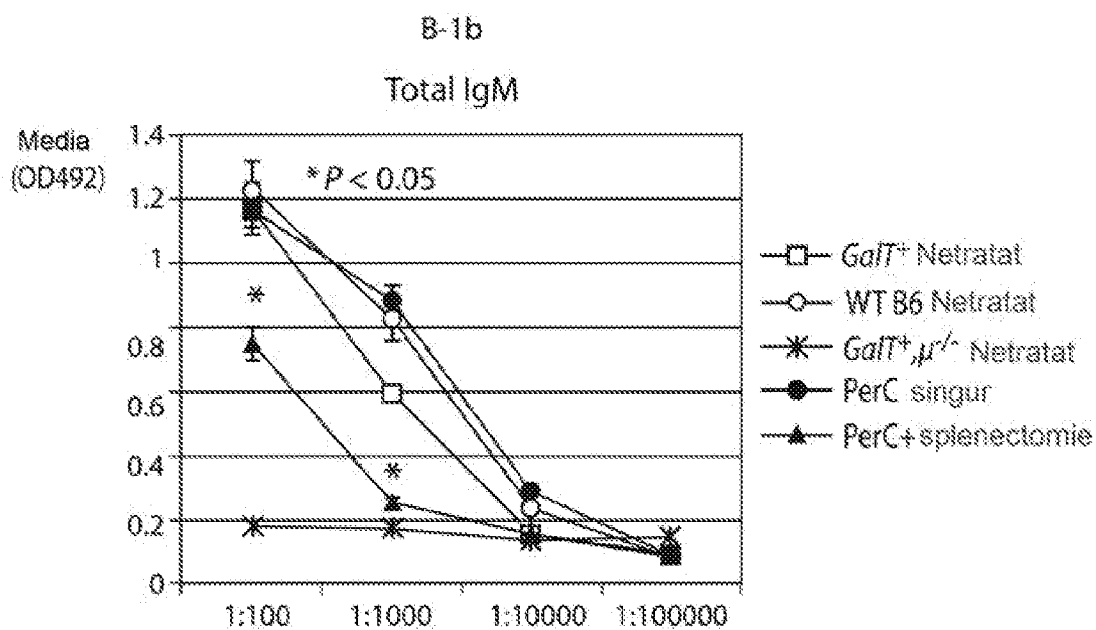
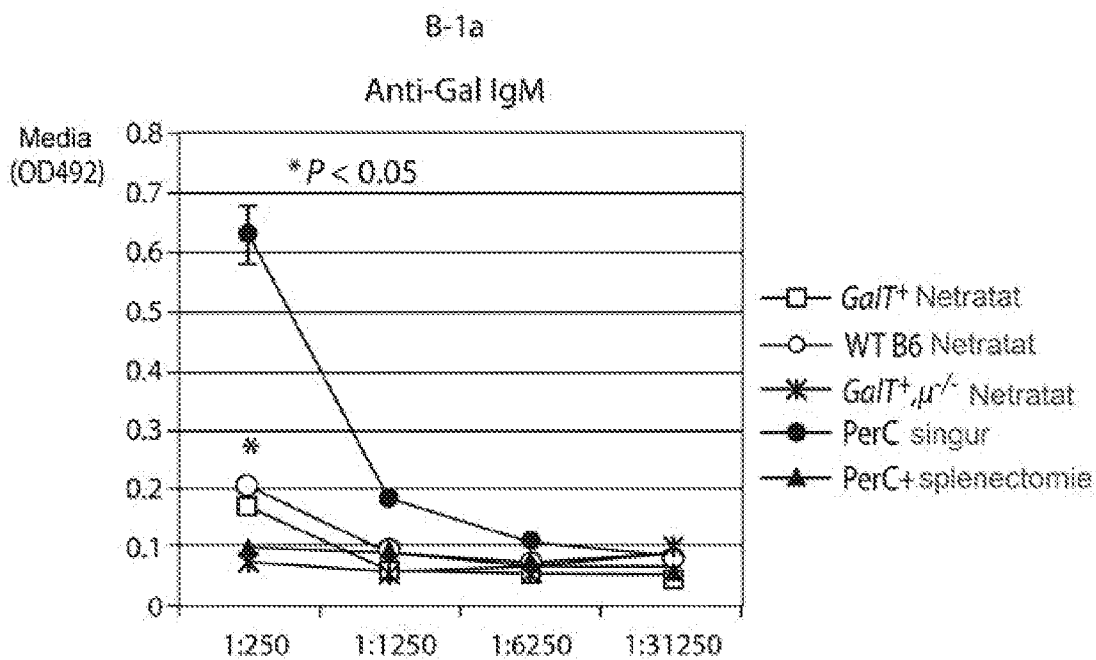
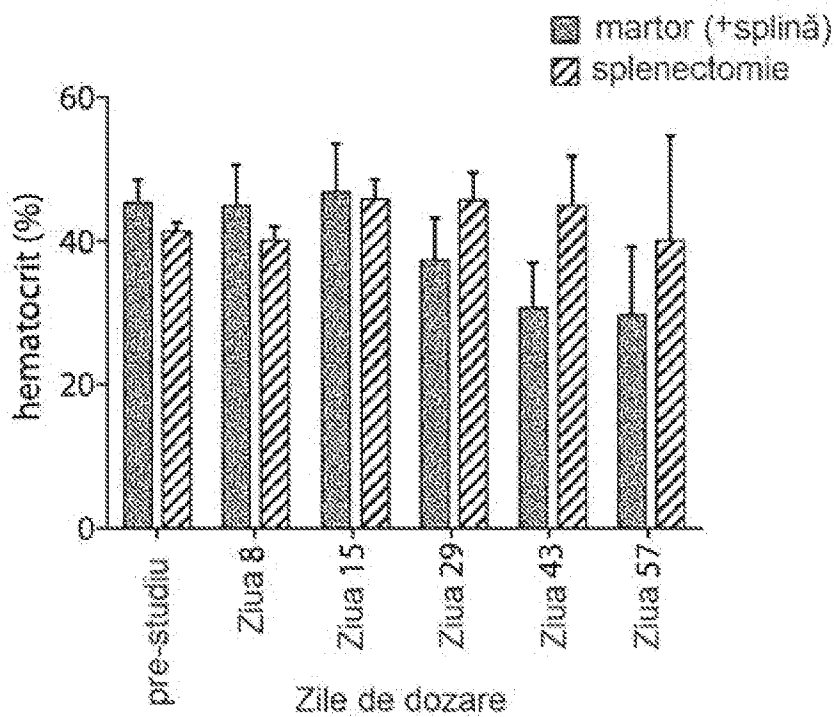
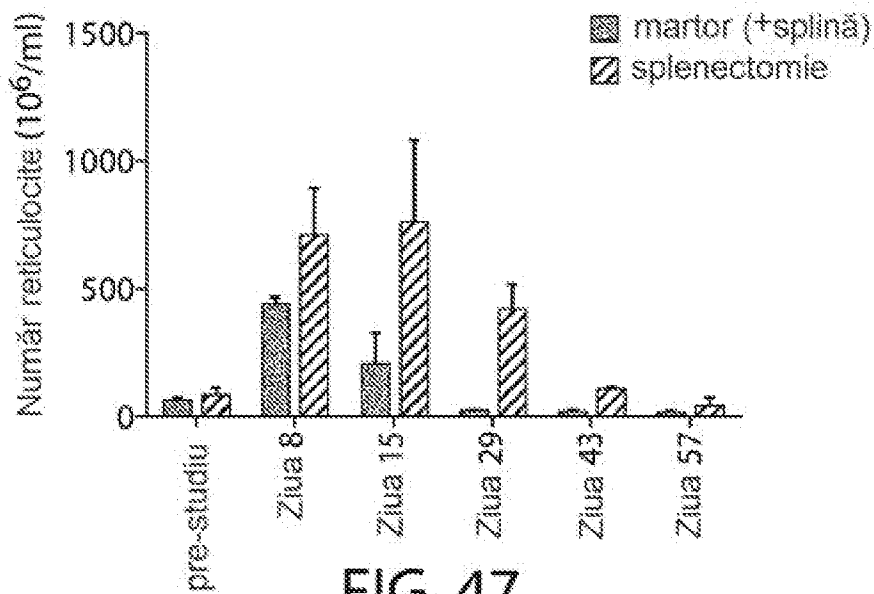


FIG. 46B



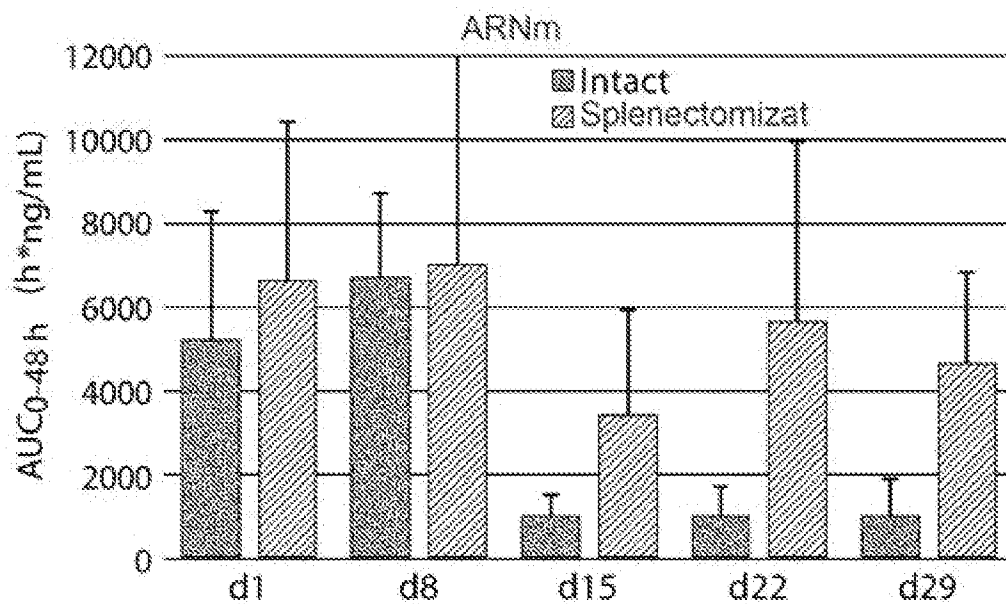


FIG. 49A

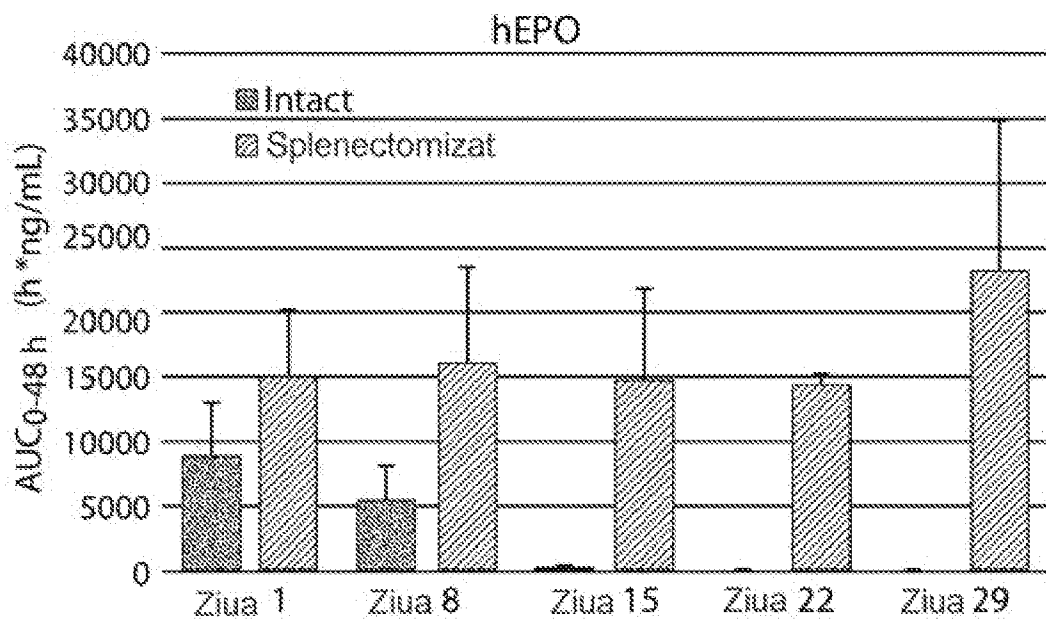


FIG. 49B

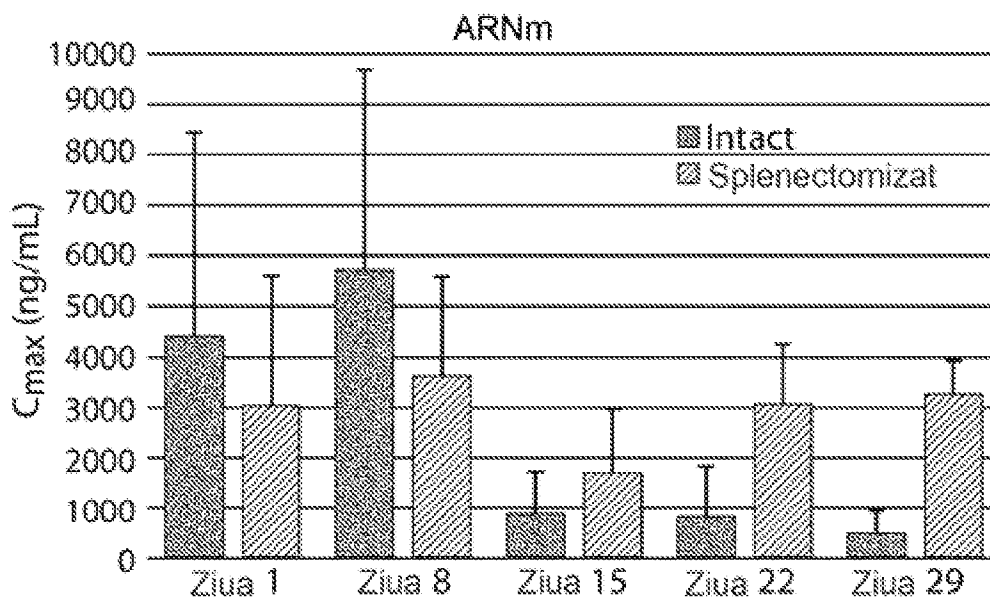


FIG. 49C

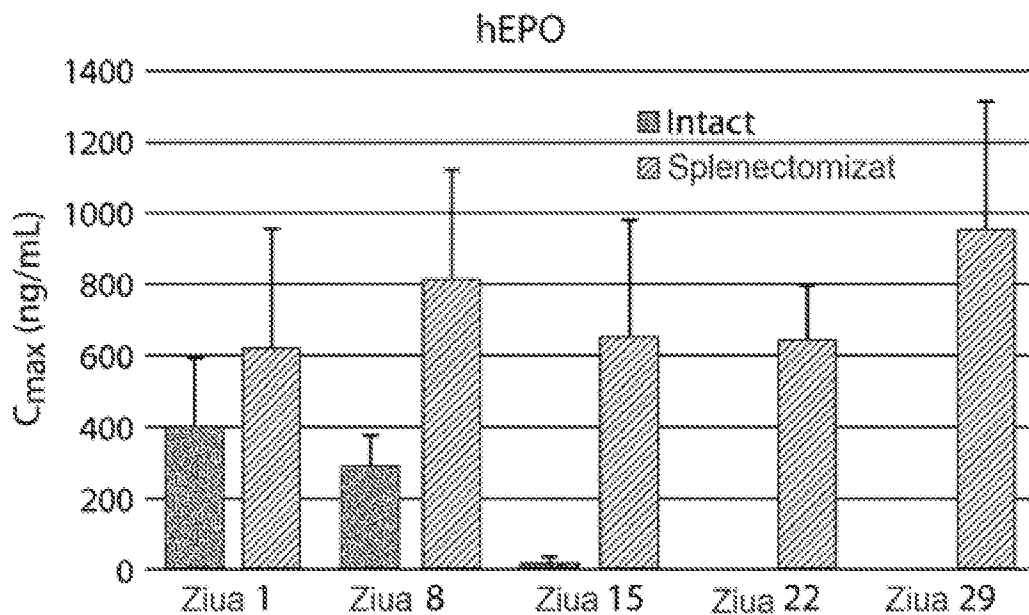


FIG. 49D

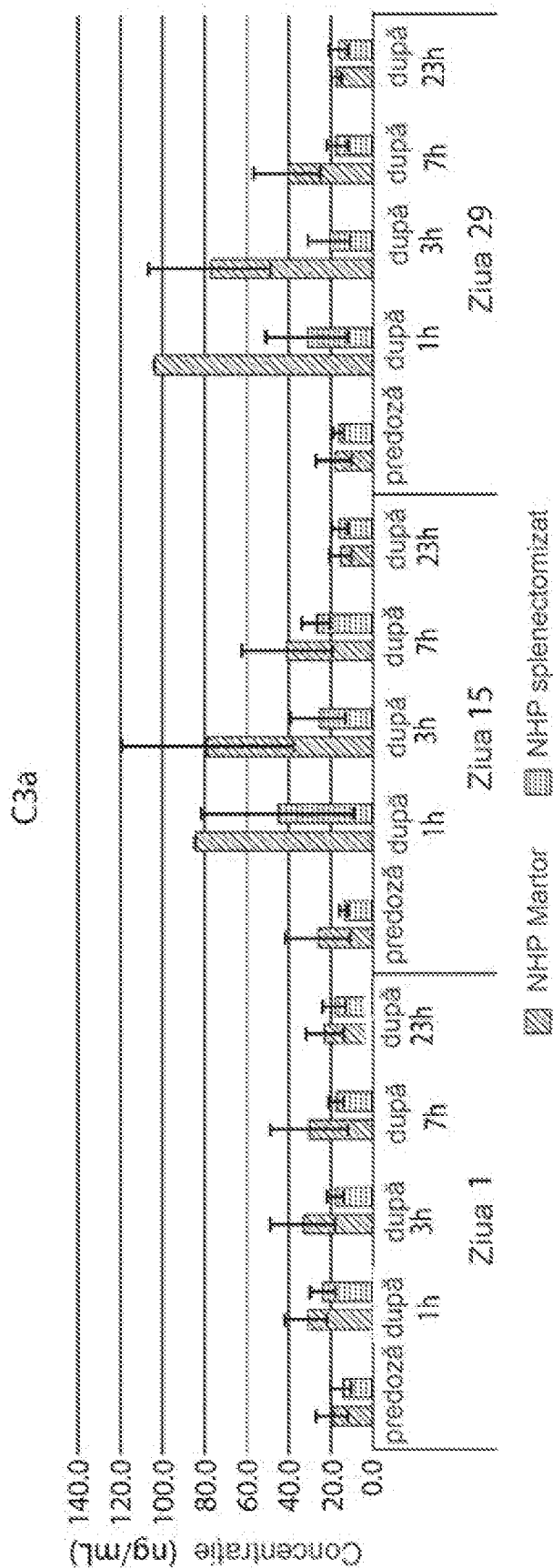
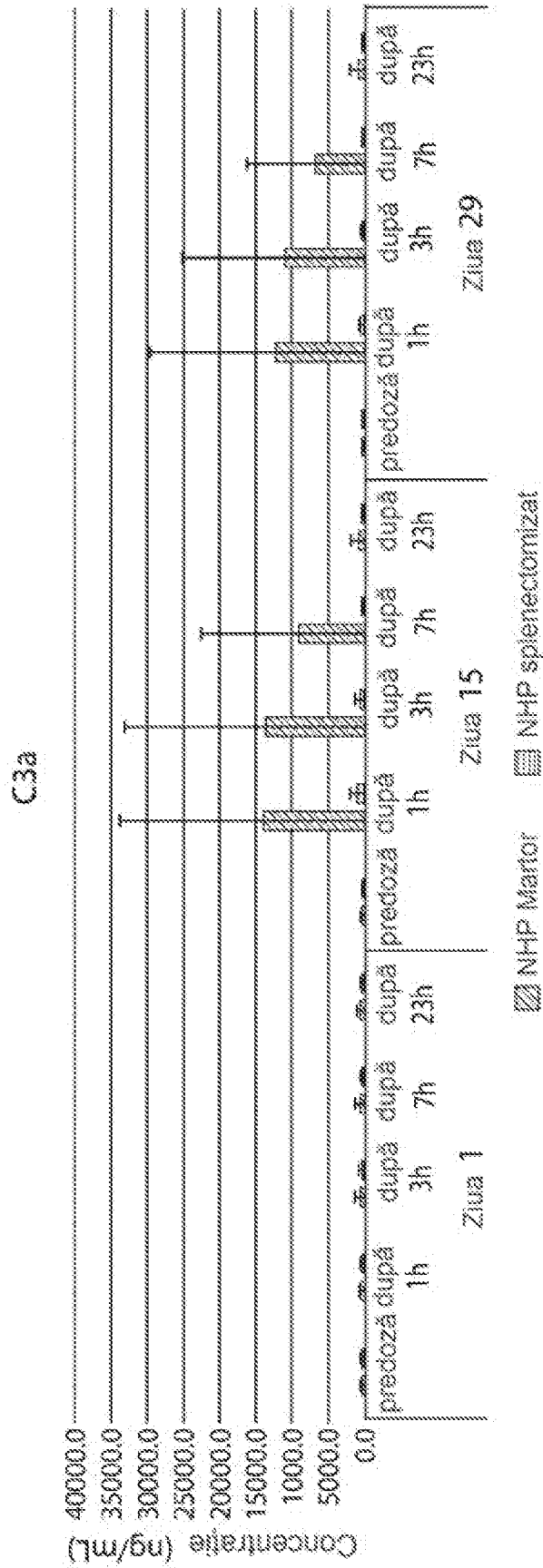


FIG. 50A





**FIG. 50B**

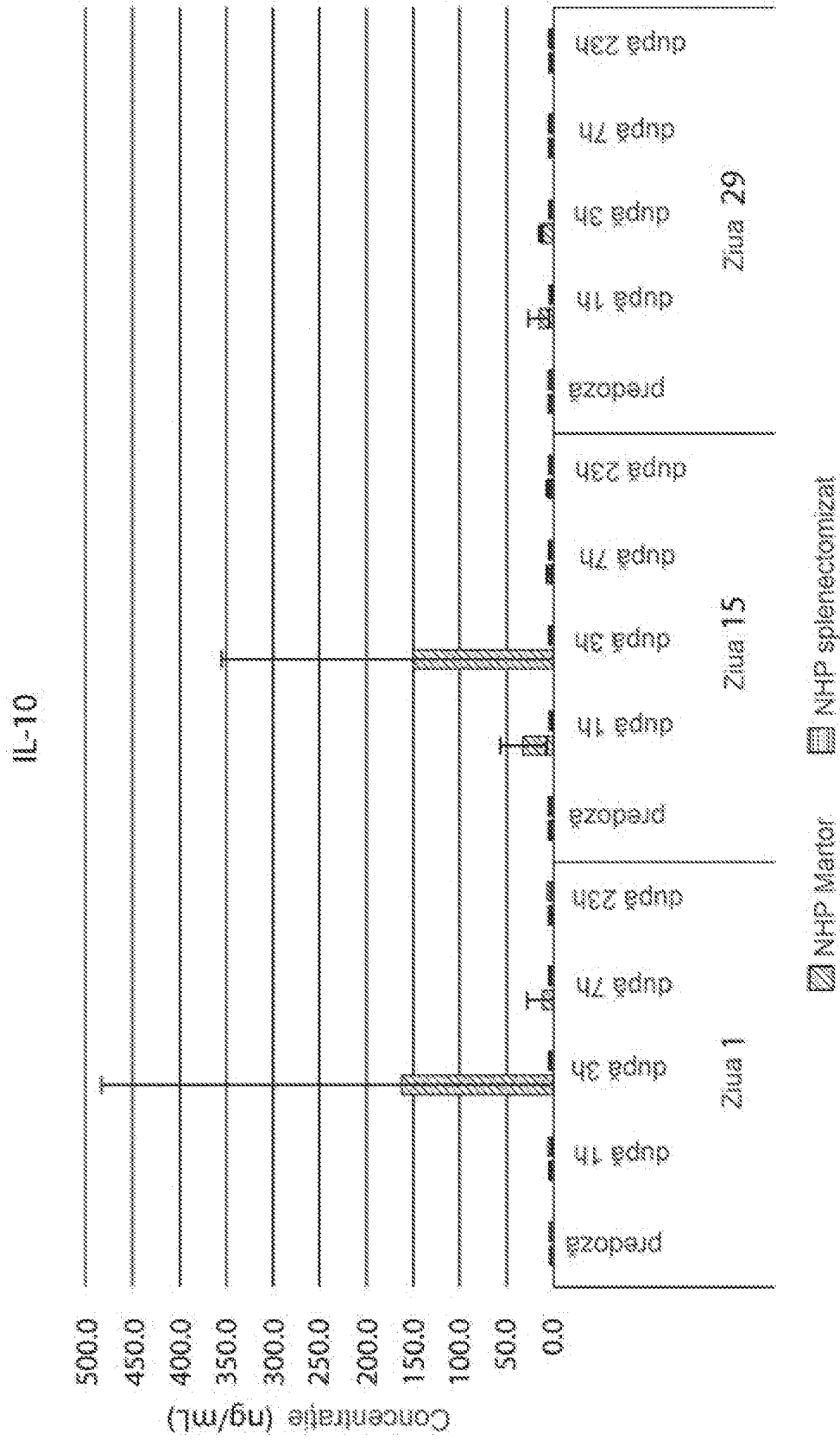


FIG. 51B

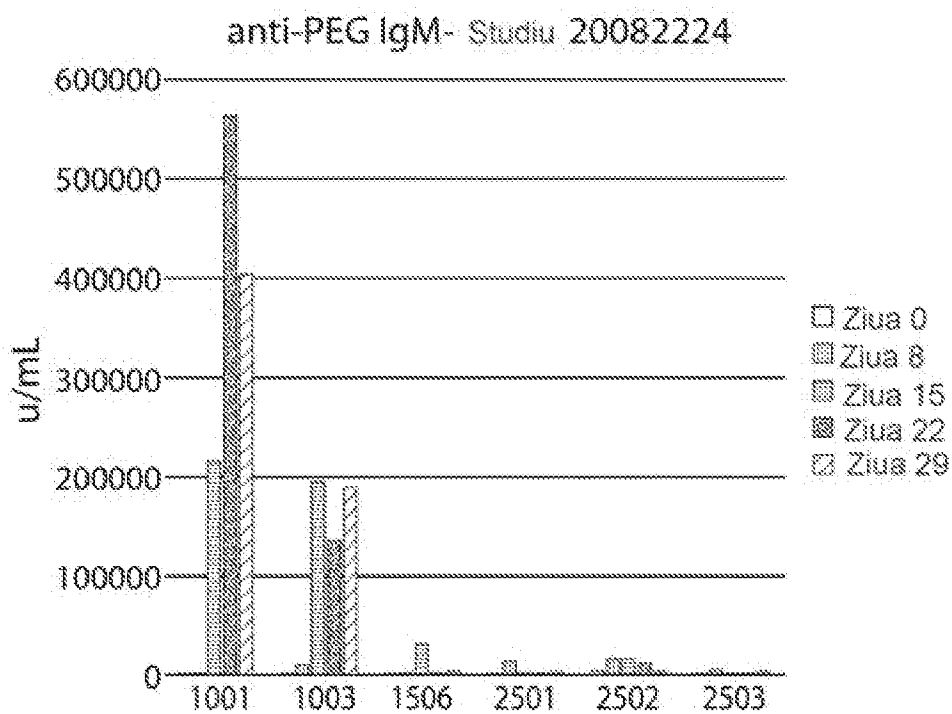


FIG. 52A

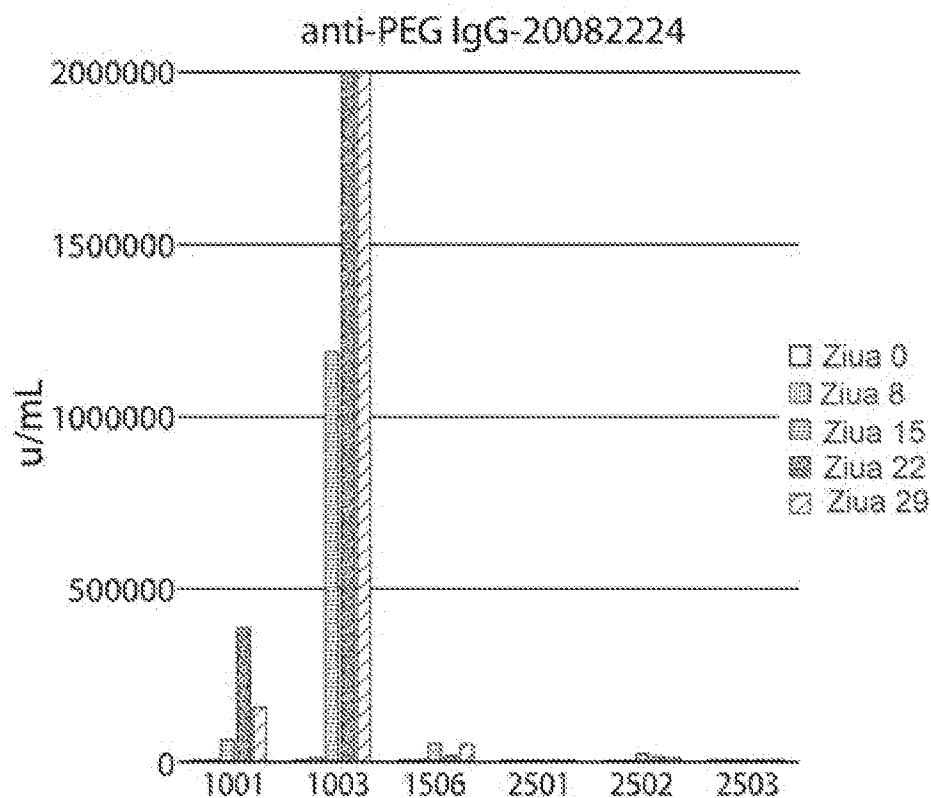


FIG. 52B

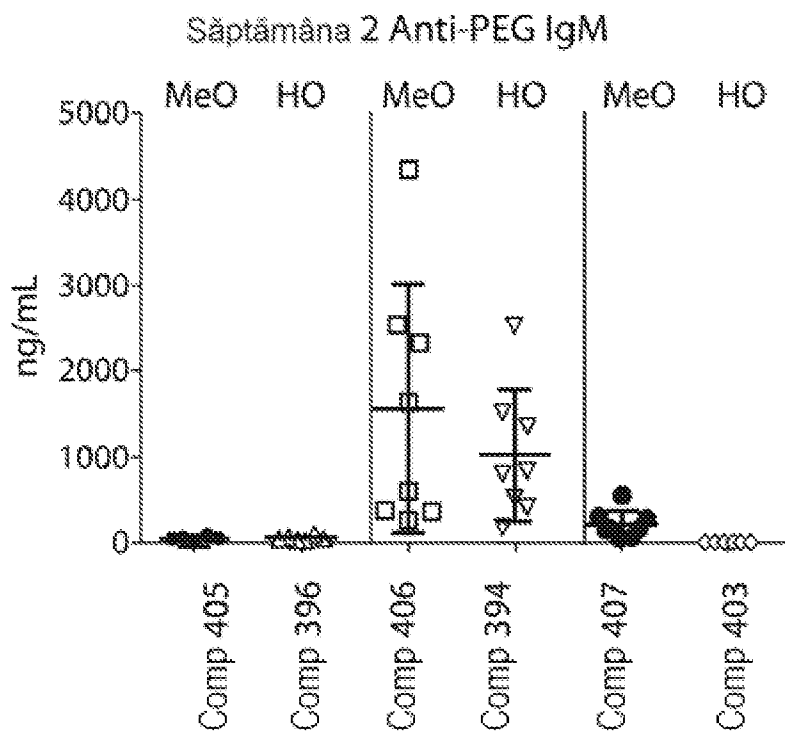


FIG. 53A

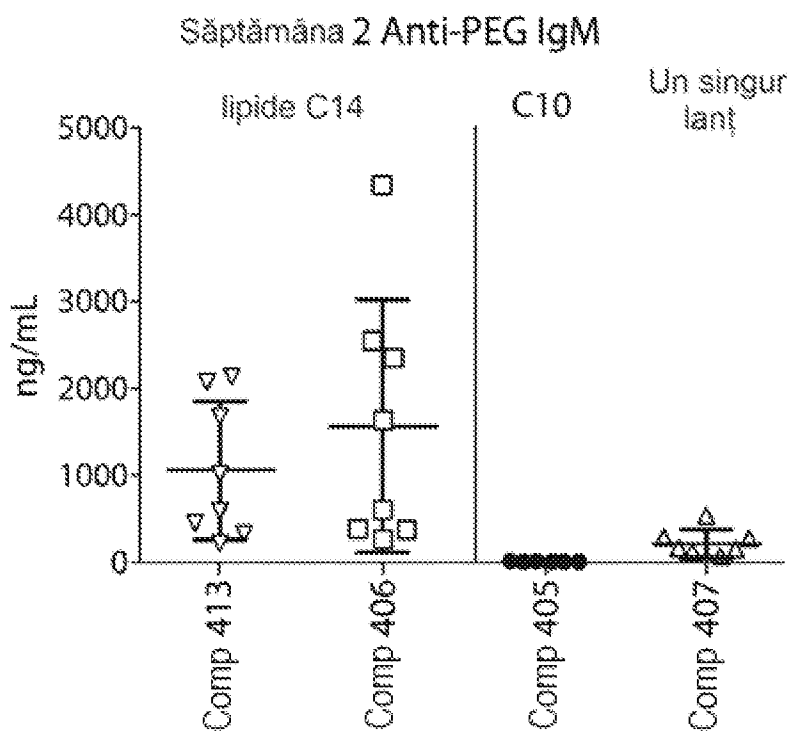


FIG. 53B

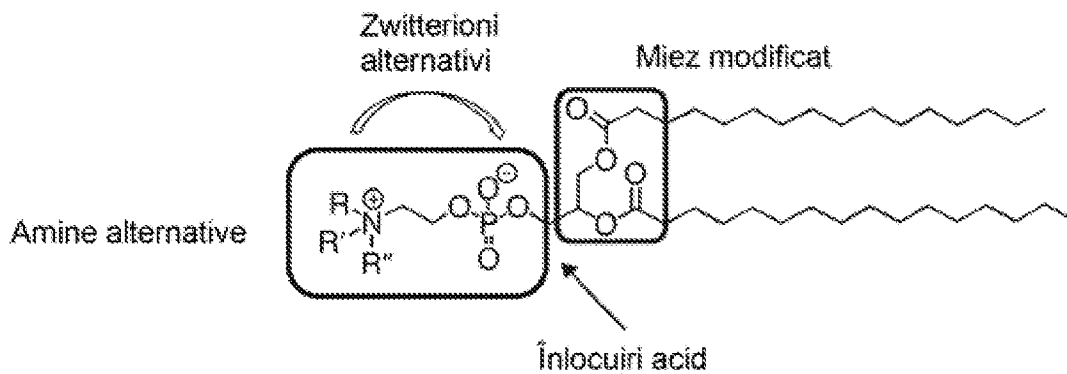


FIG. 54

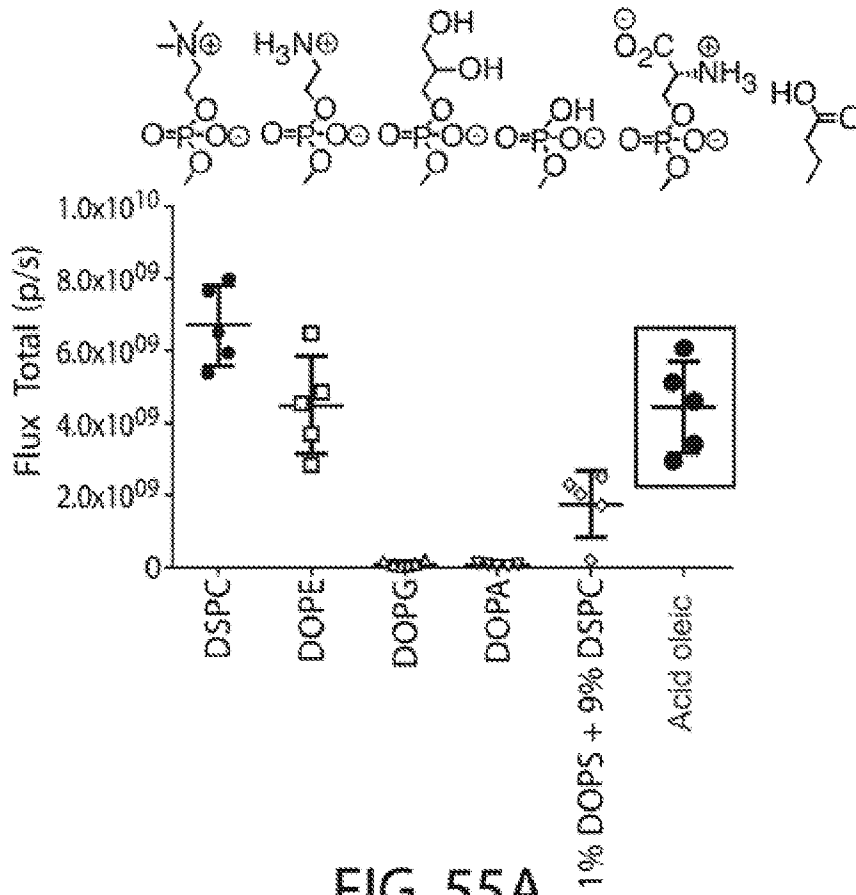


FIG. 55A

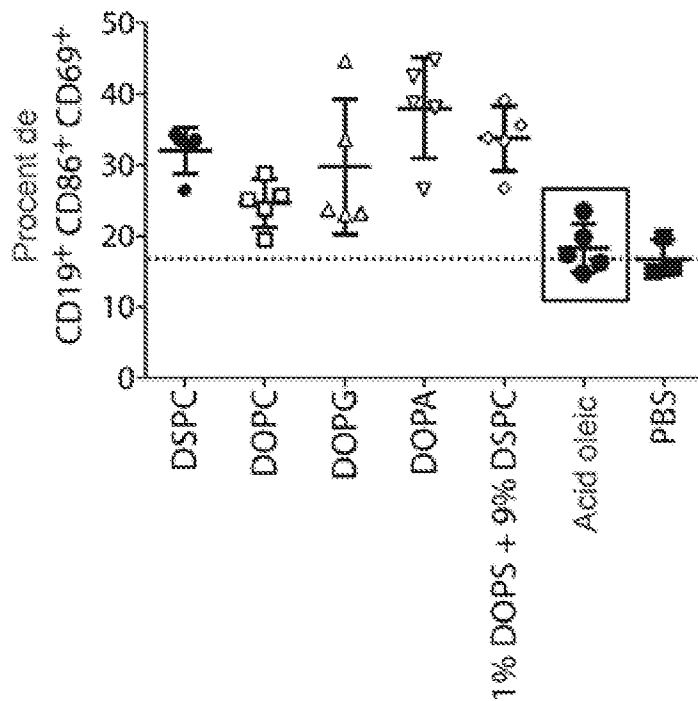


FIG. 55B

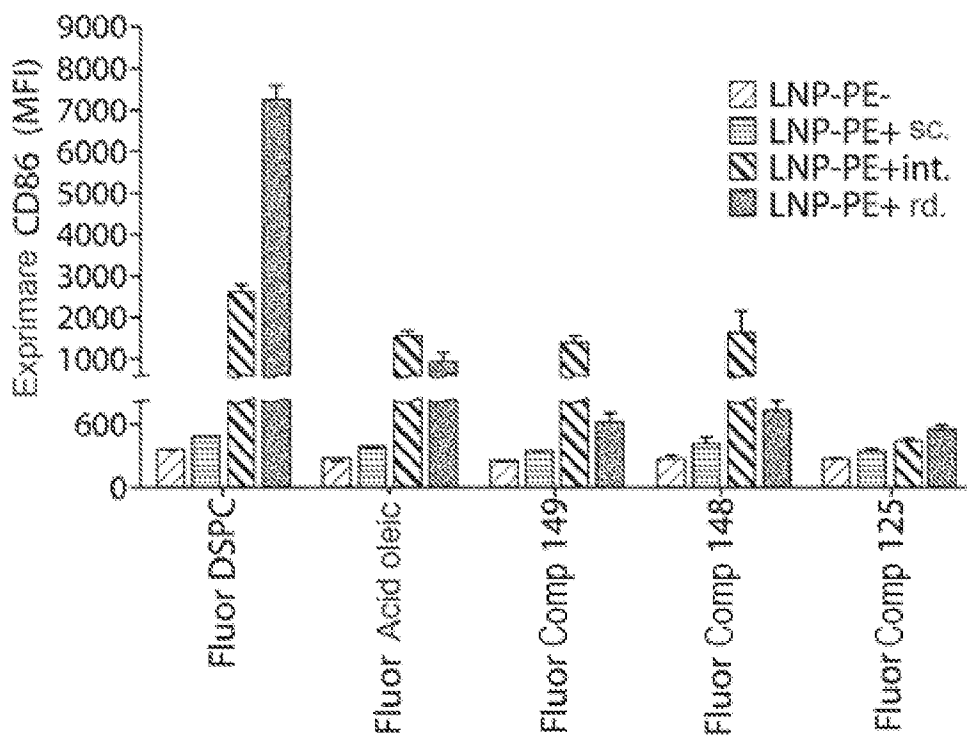


FIG. 56B

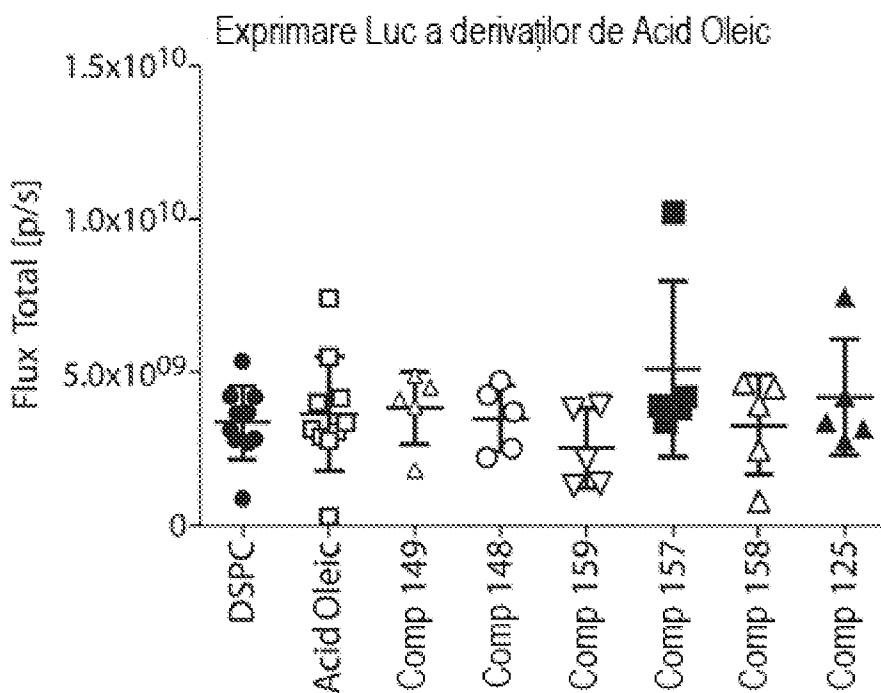


FIG. 56C

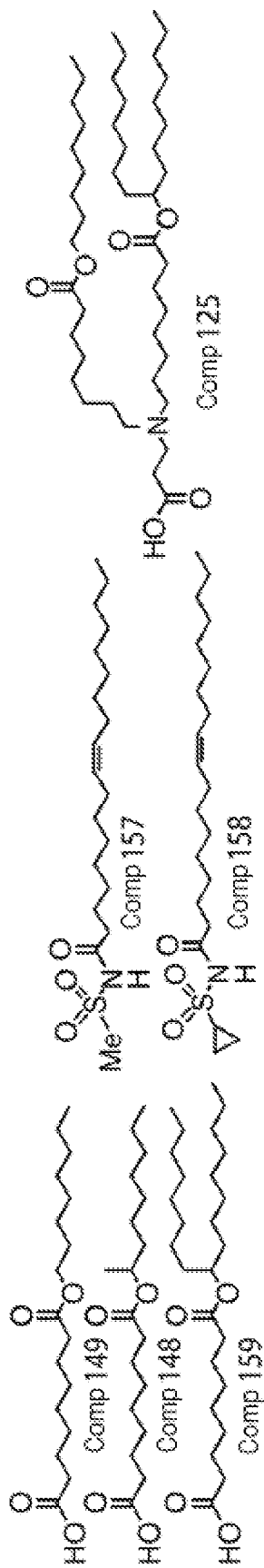


FIG. 56E



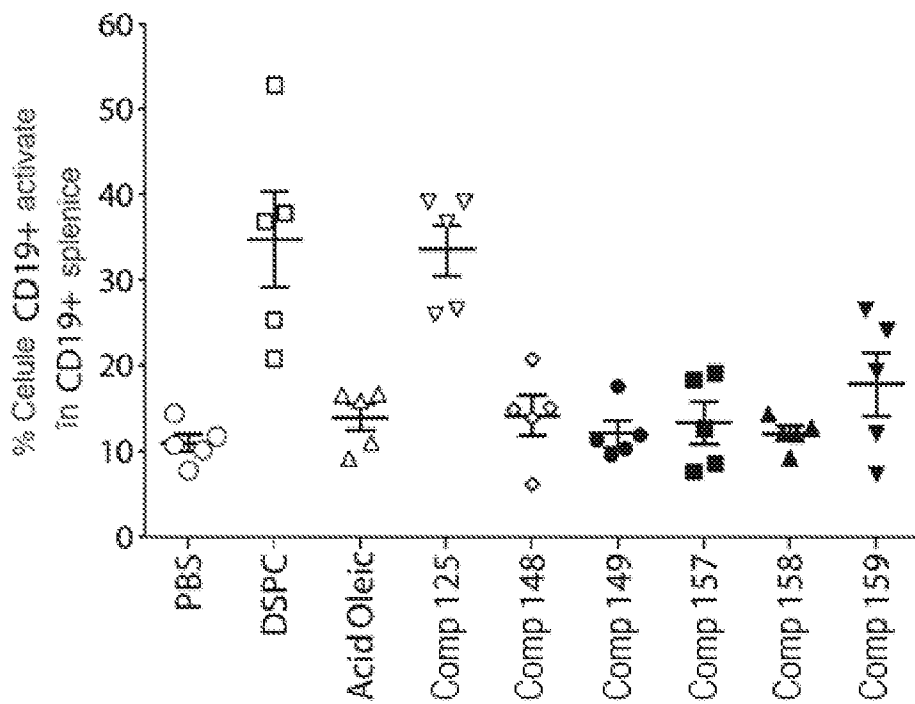


FIG. 57A

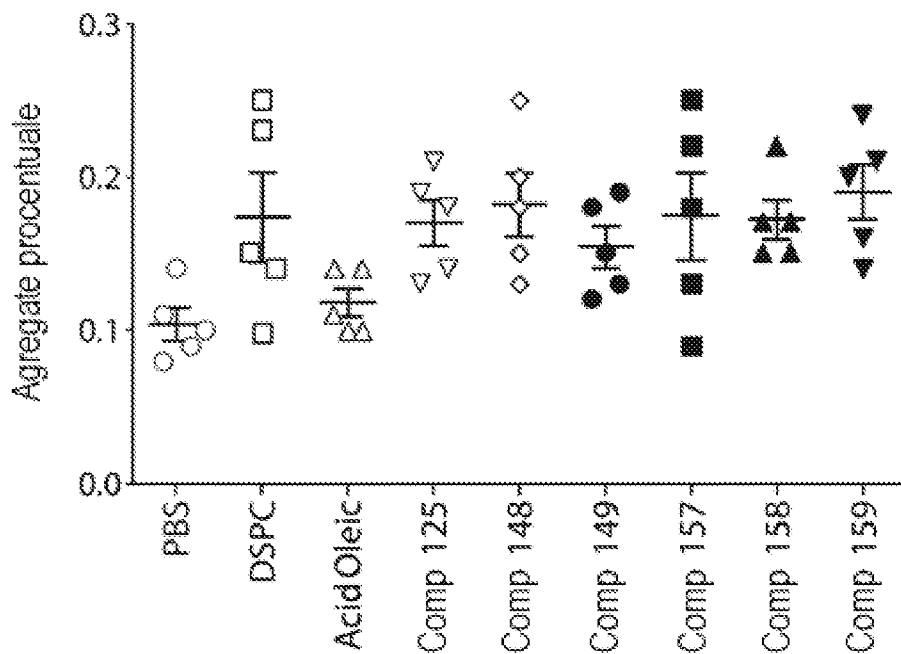
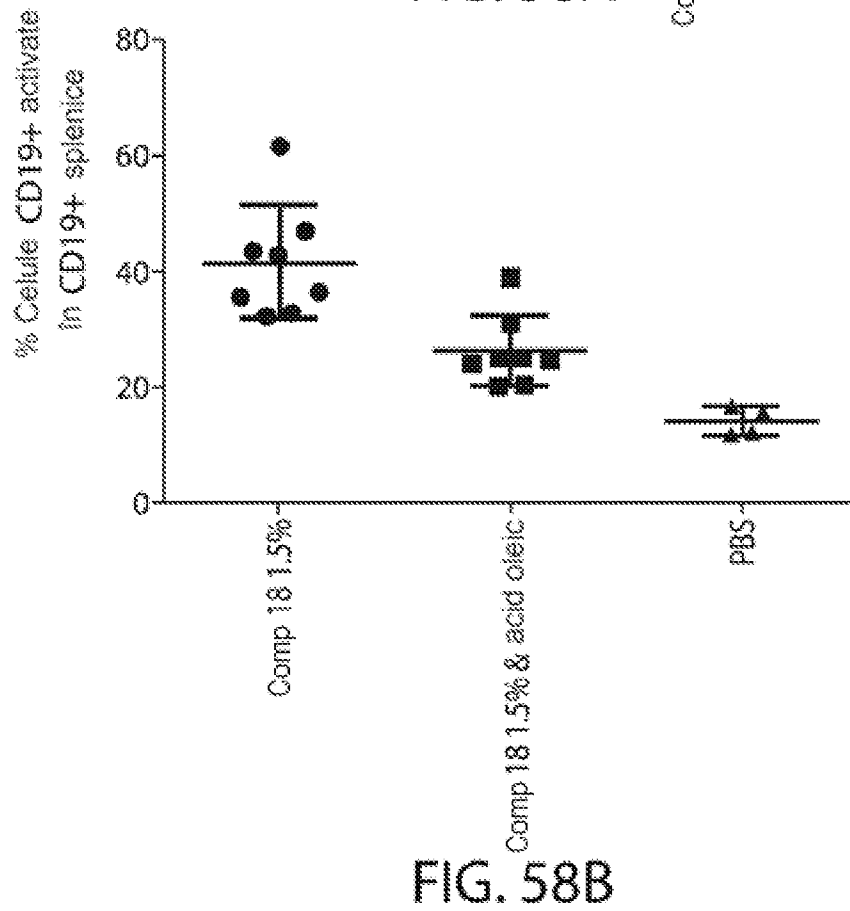
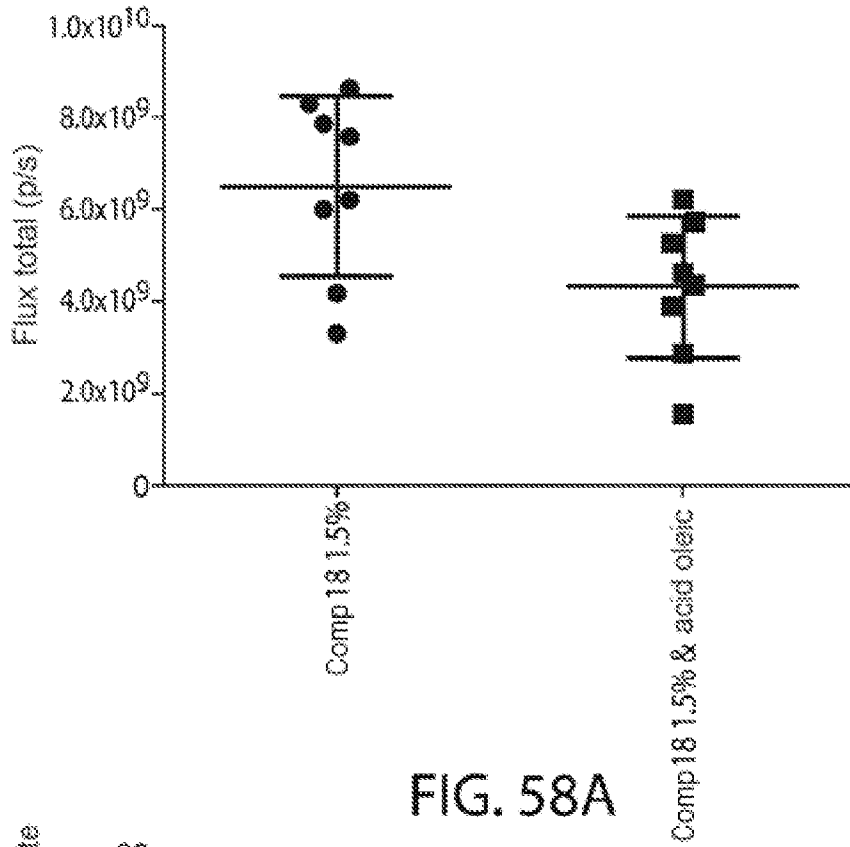


FIG. 57B



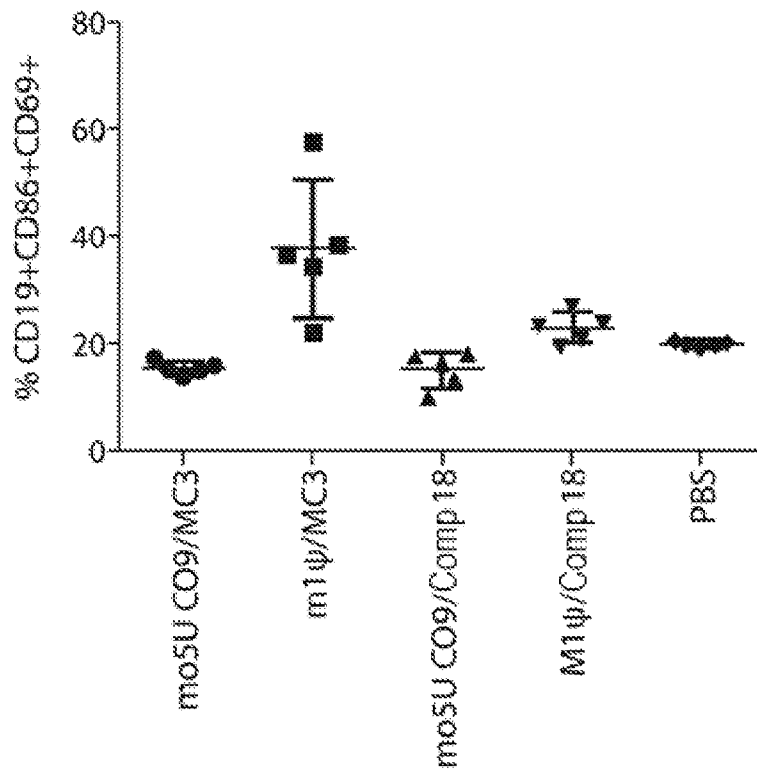


FIG. 60A

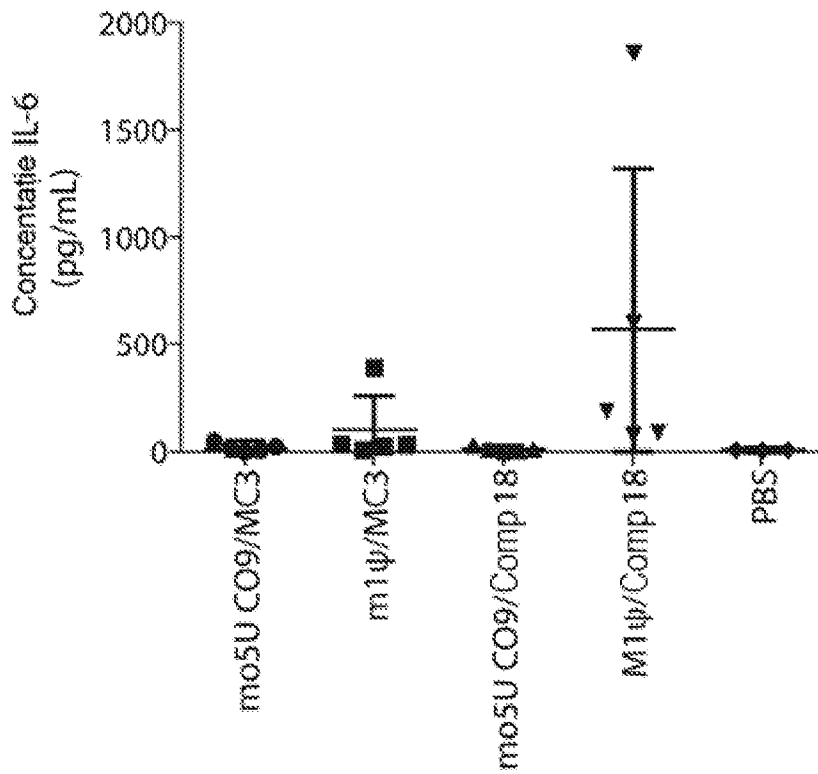


FIG. 60B

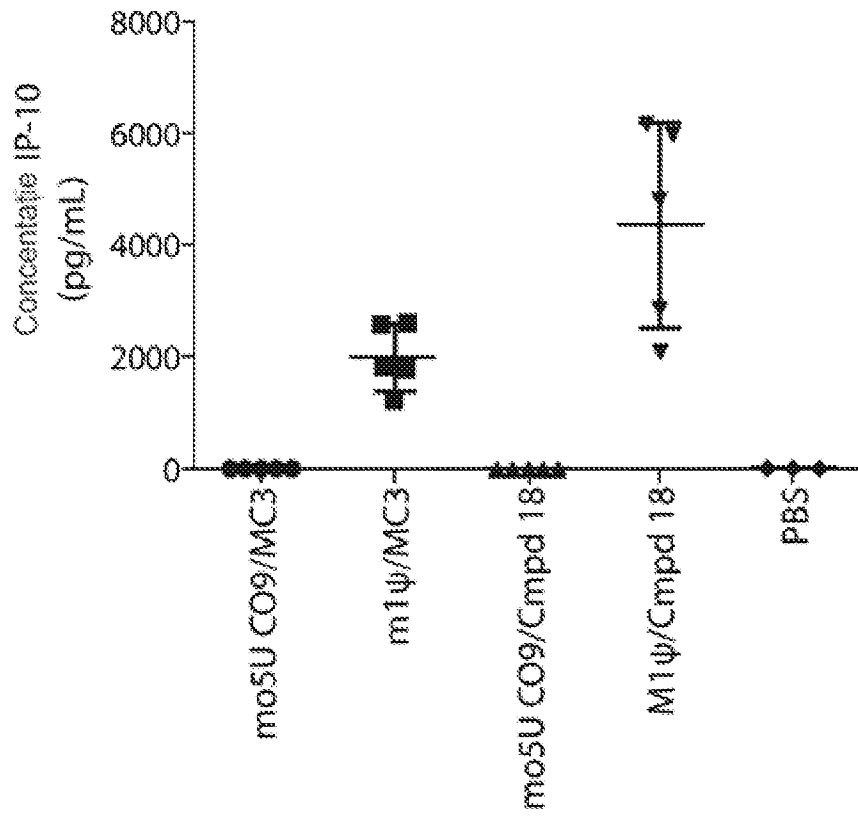


FIG. 60C

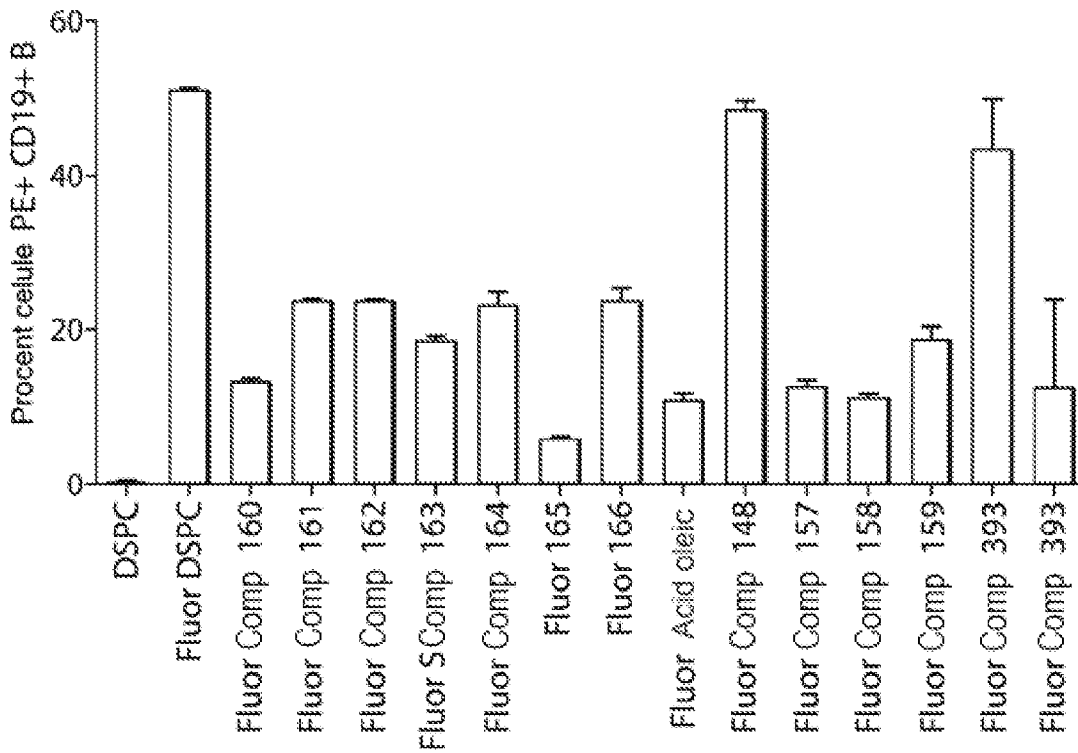
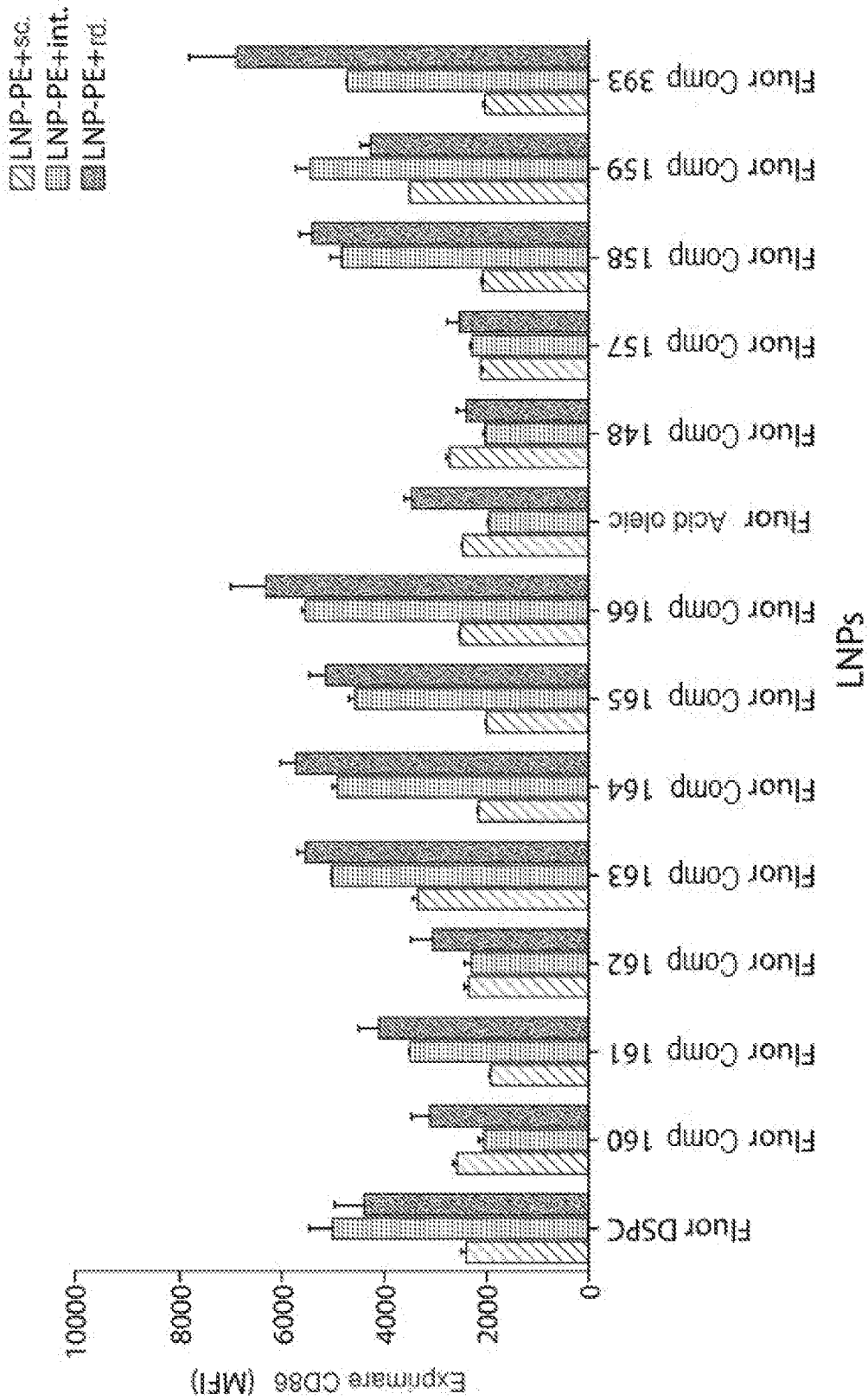


FIG. 61



LNPs  
FIG. 62

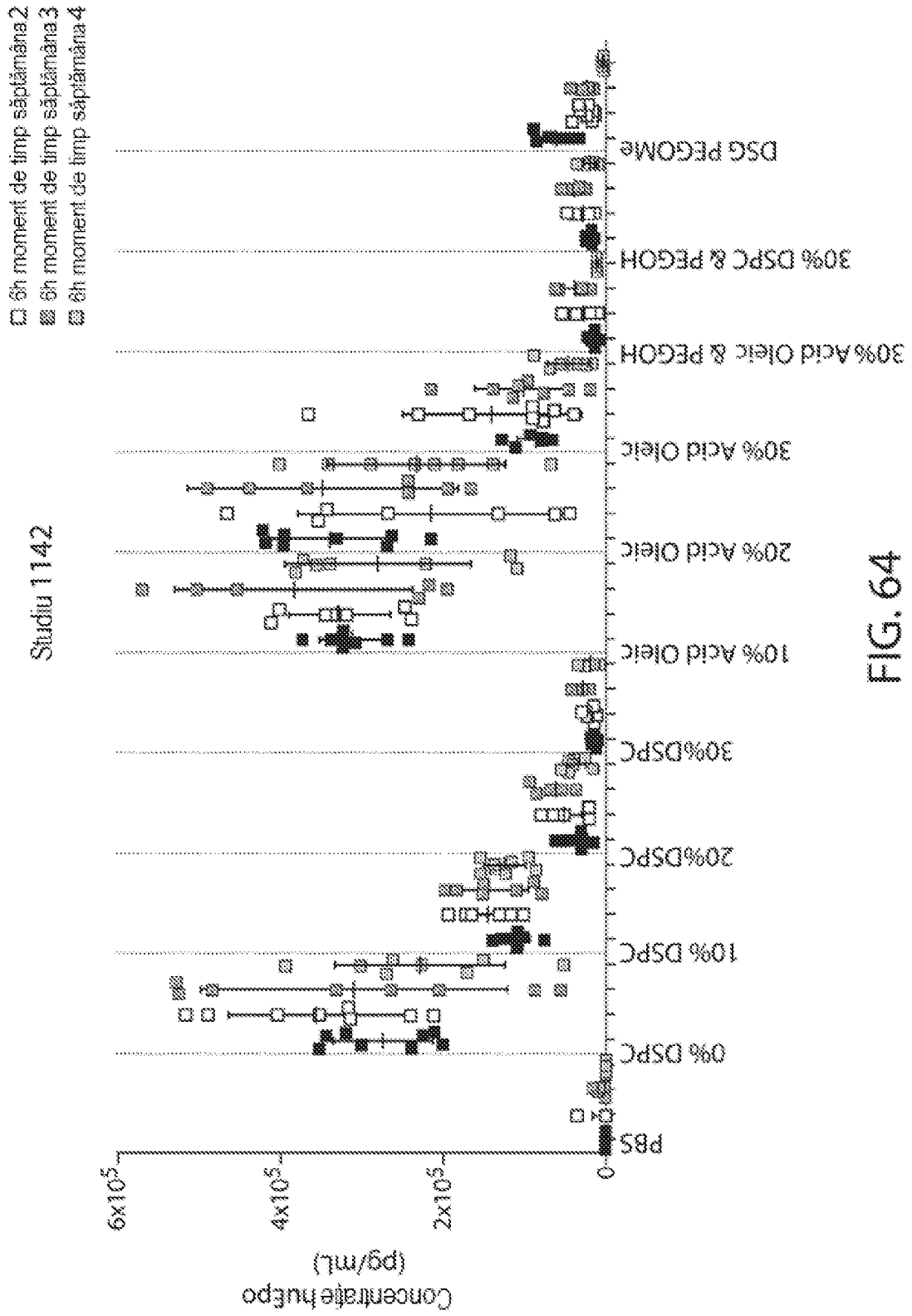


FIG. 64

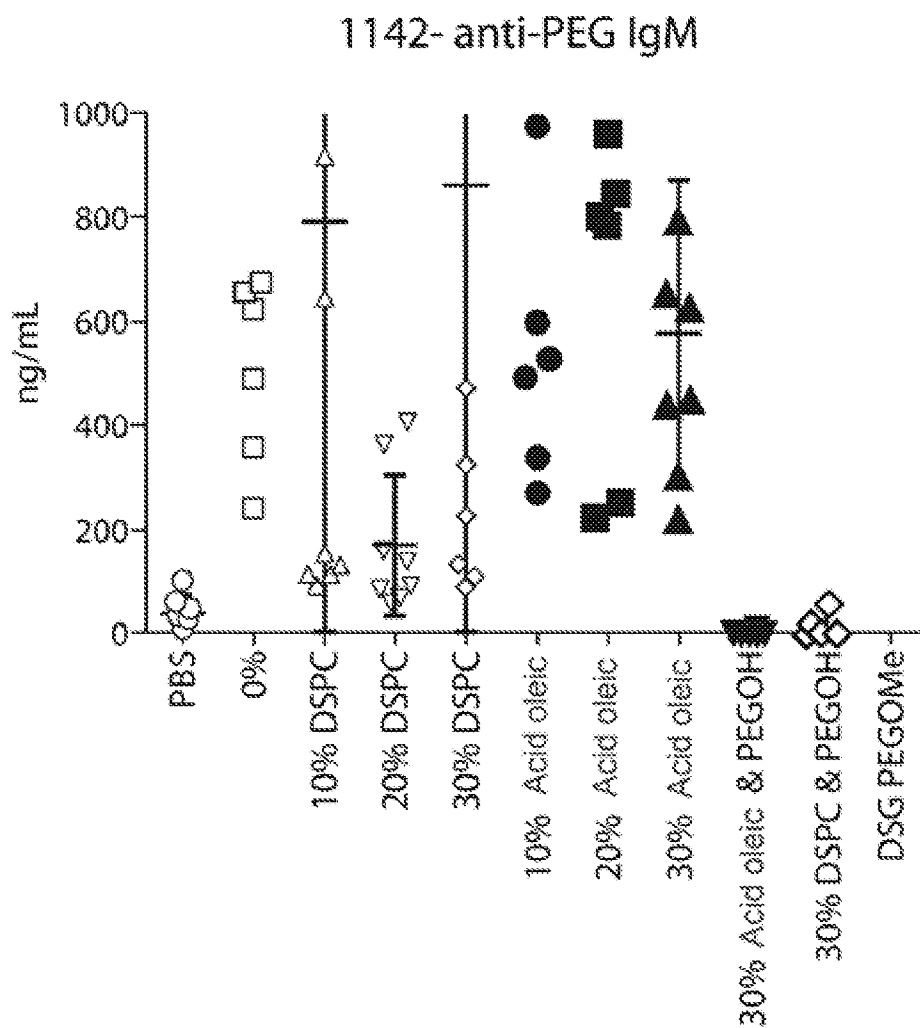


FIG. 65





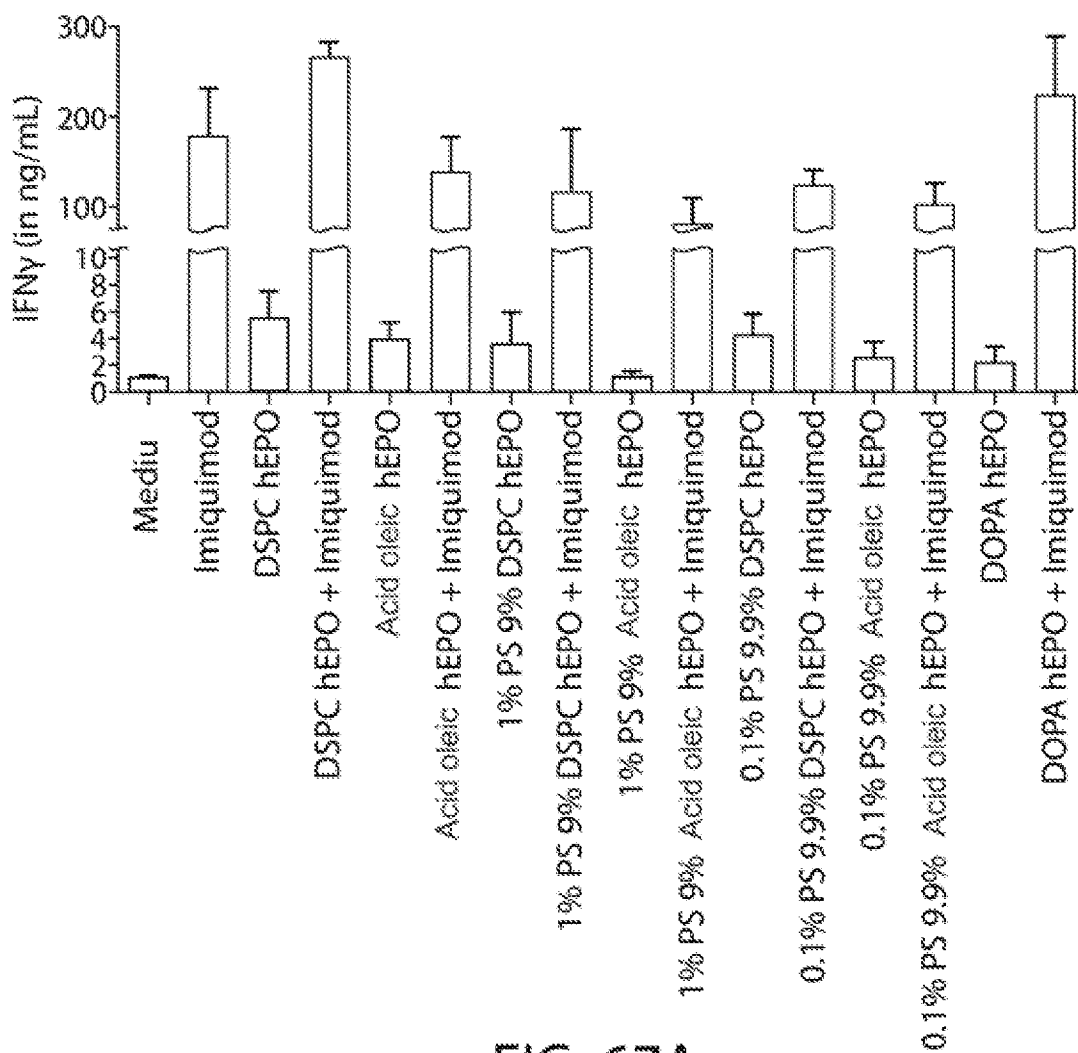


FIG. 67A

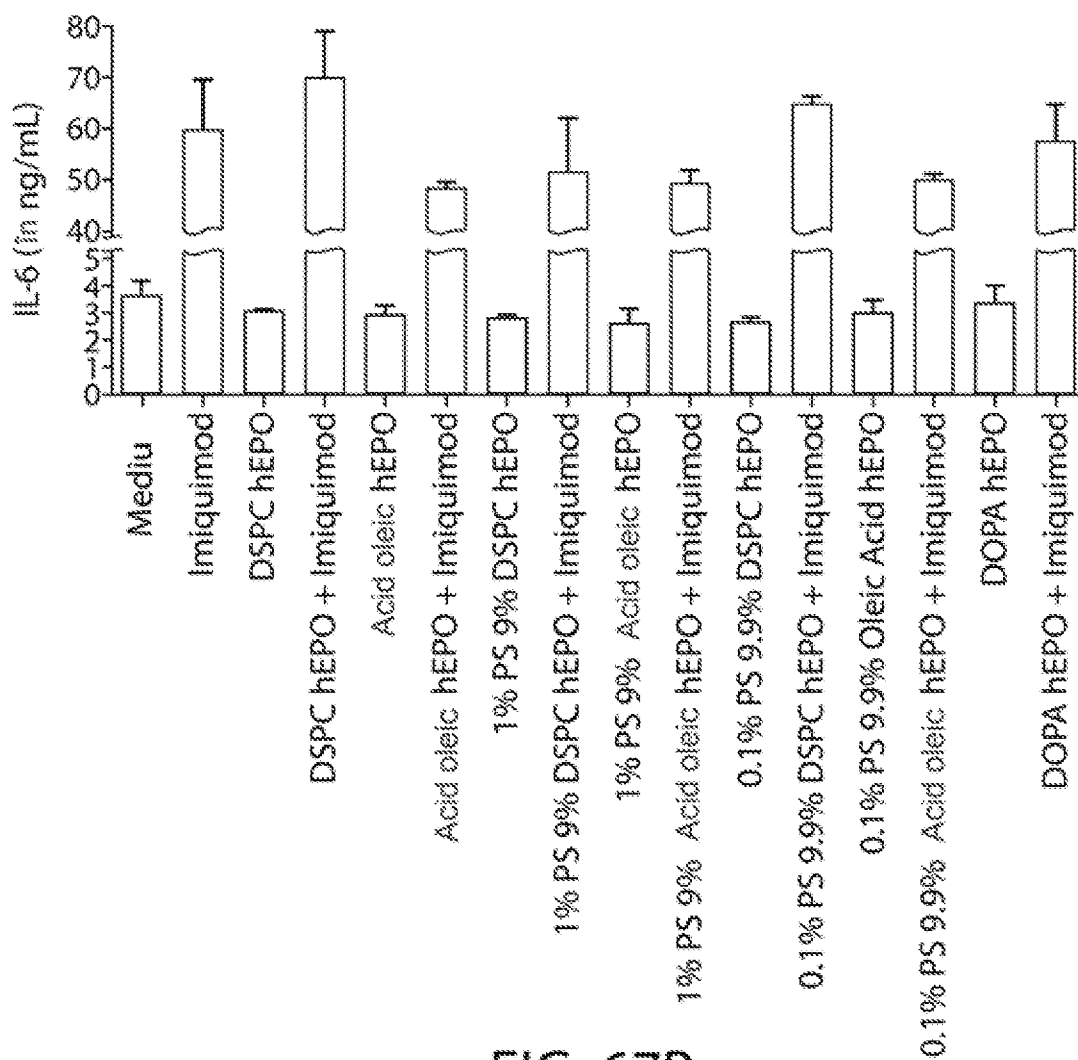


FIG. 67B

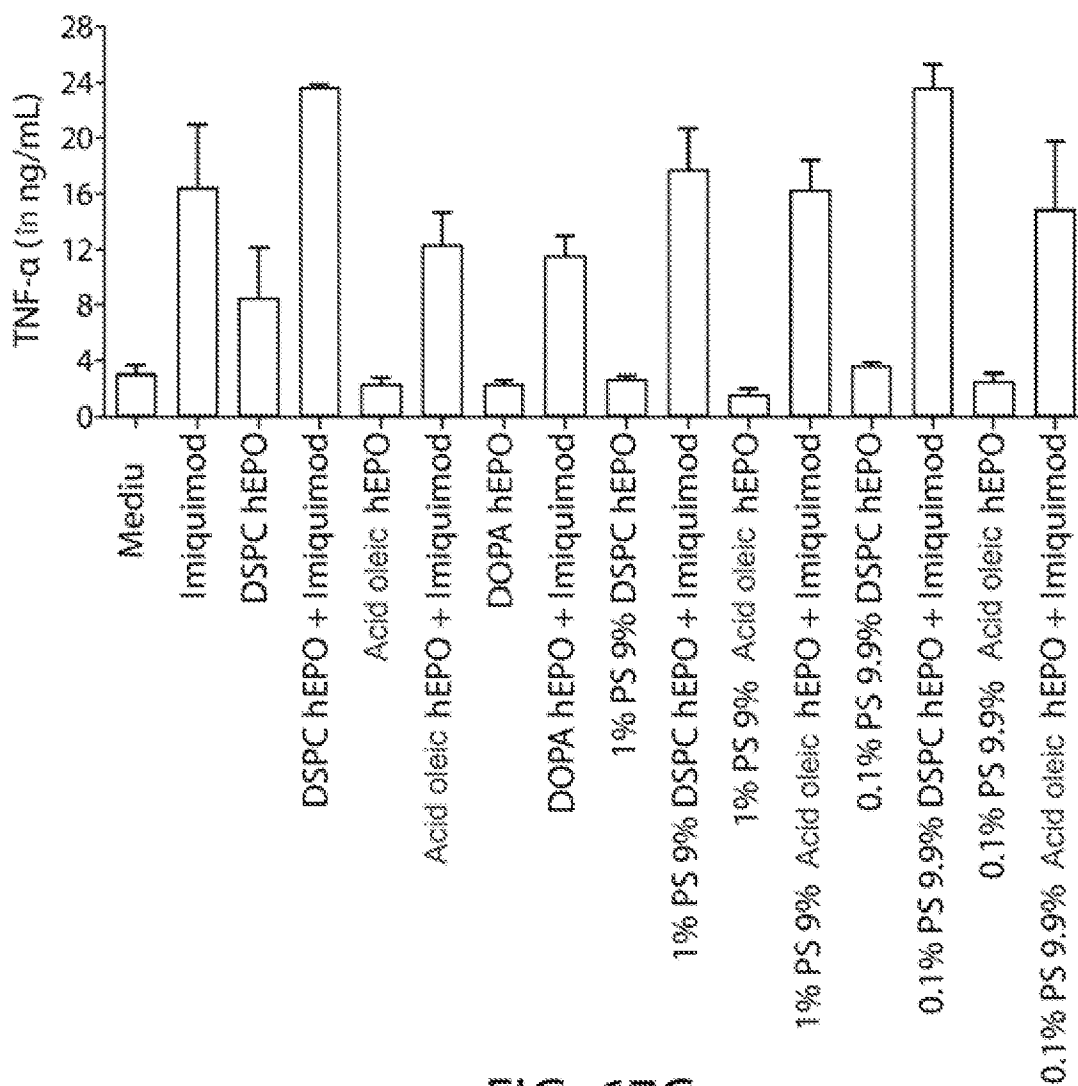


FIG. 67C

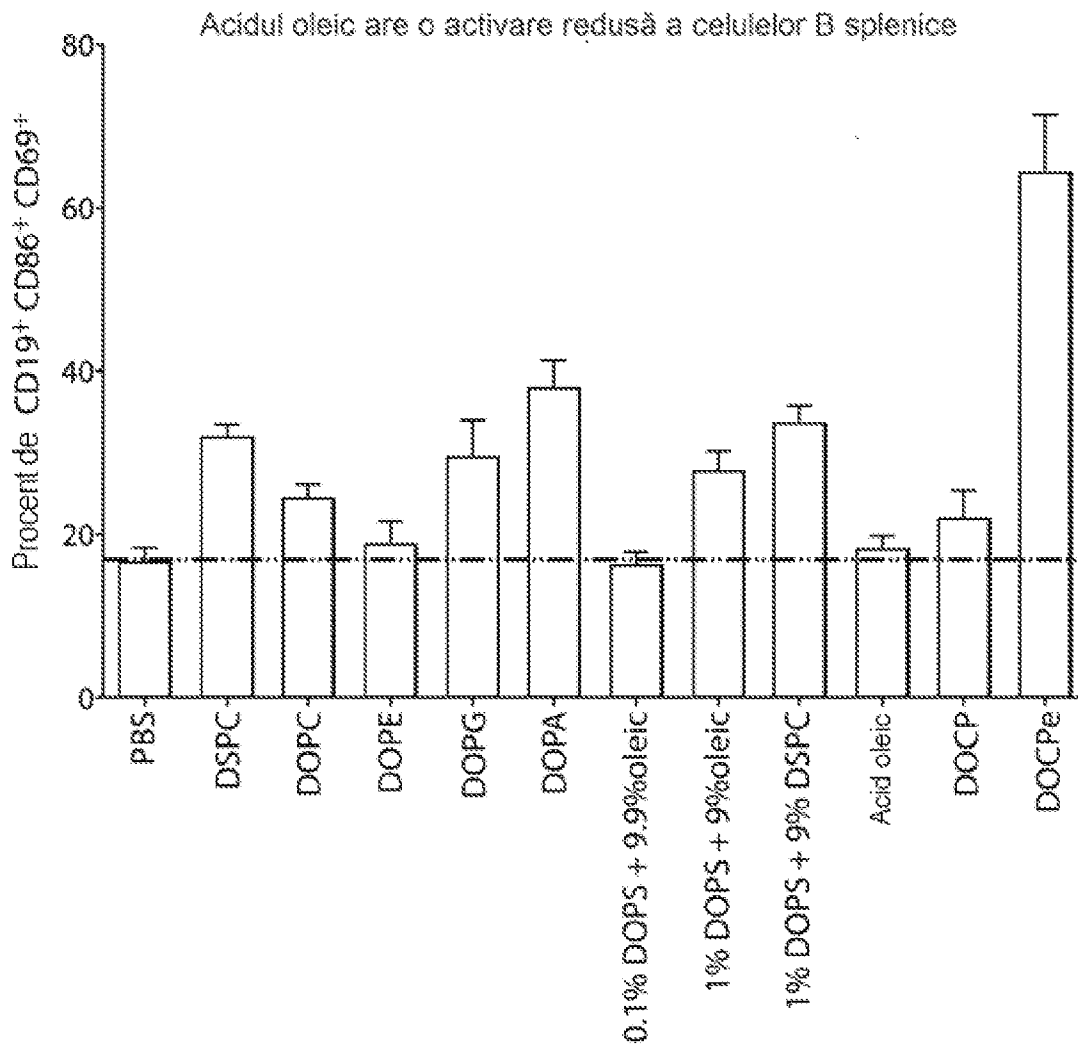


FIG. 68

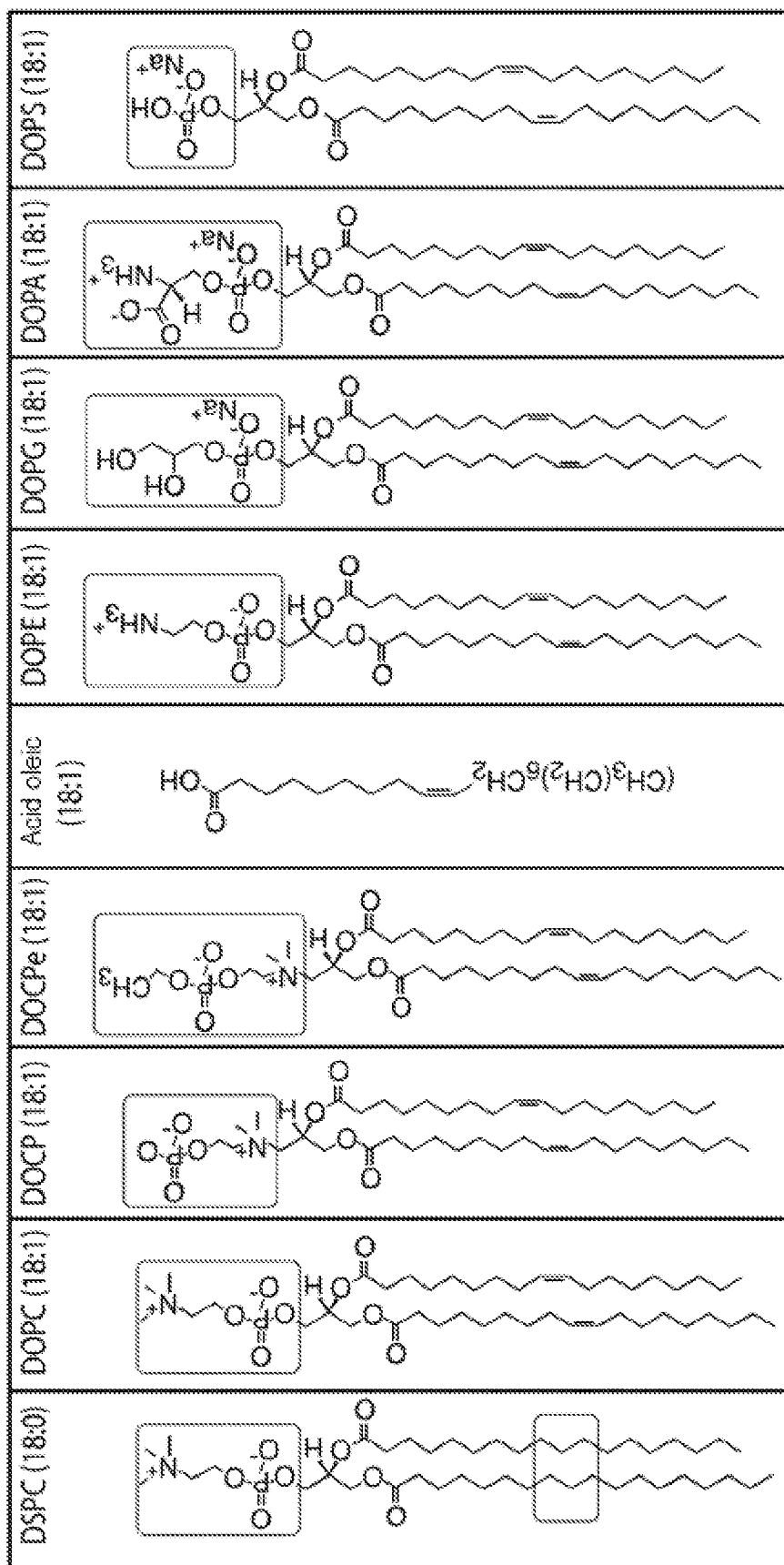


FIG. 69

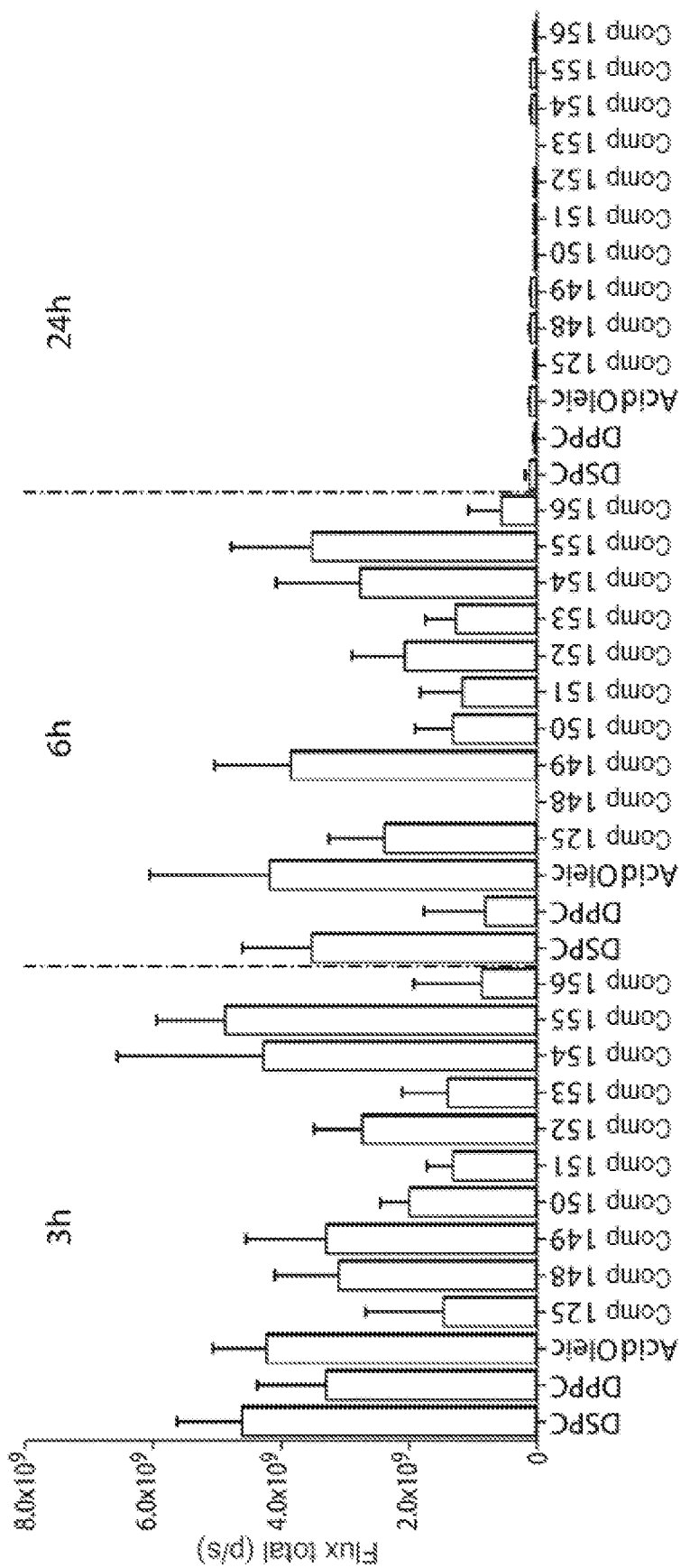
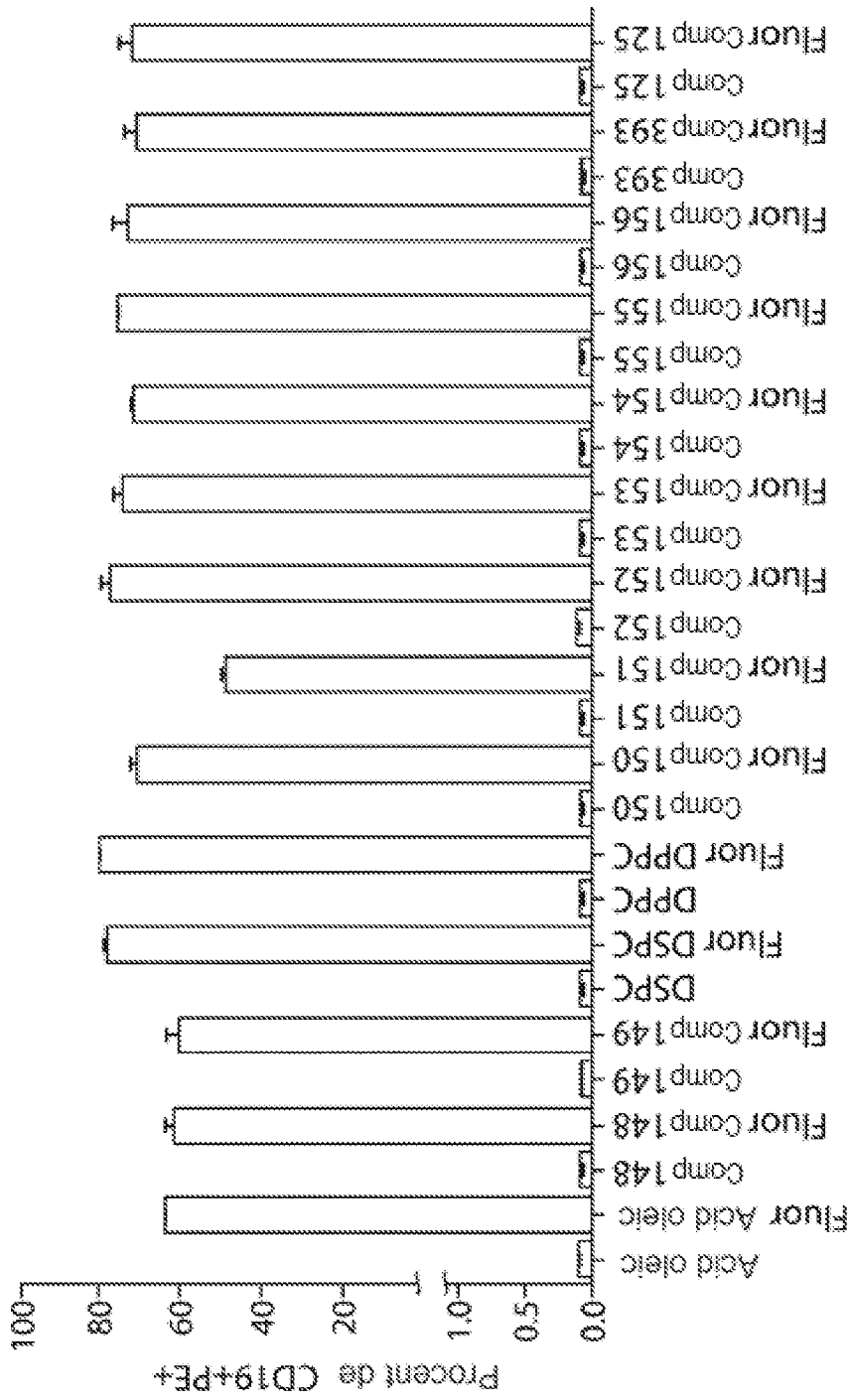


FIG. 70



LNPS  
FIG. 71A

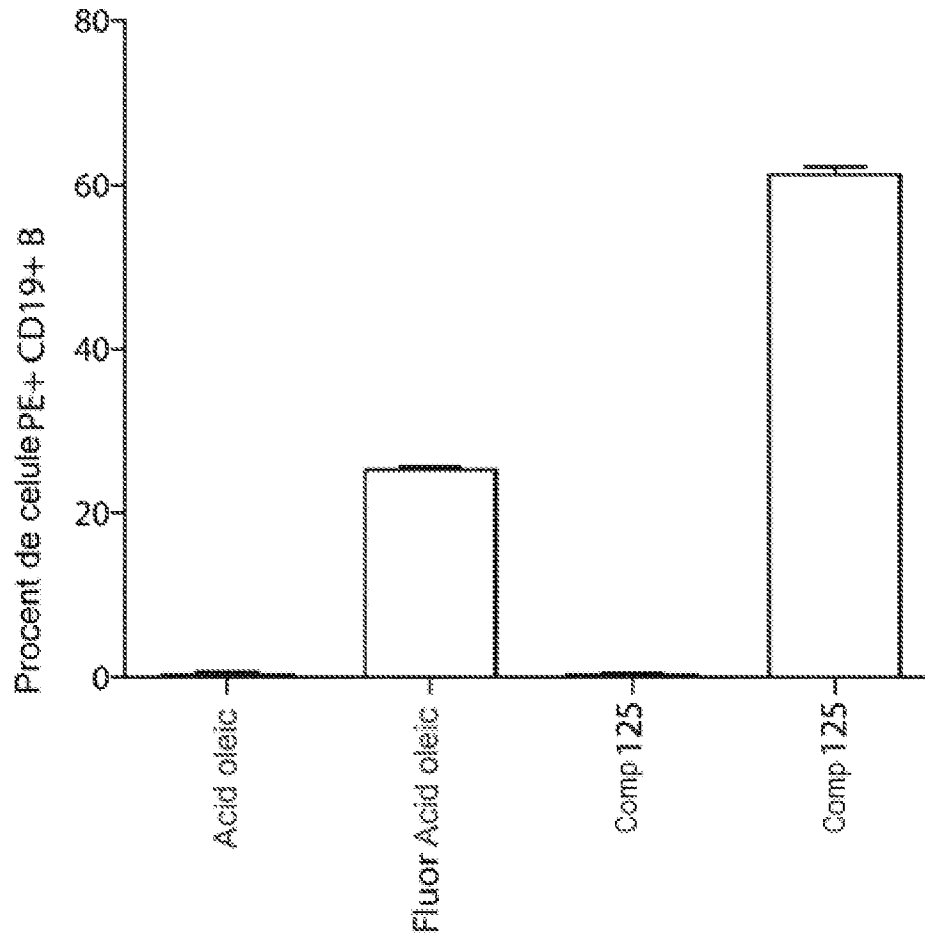
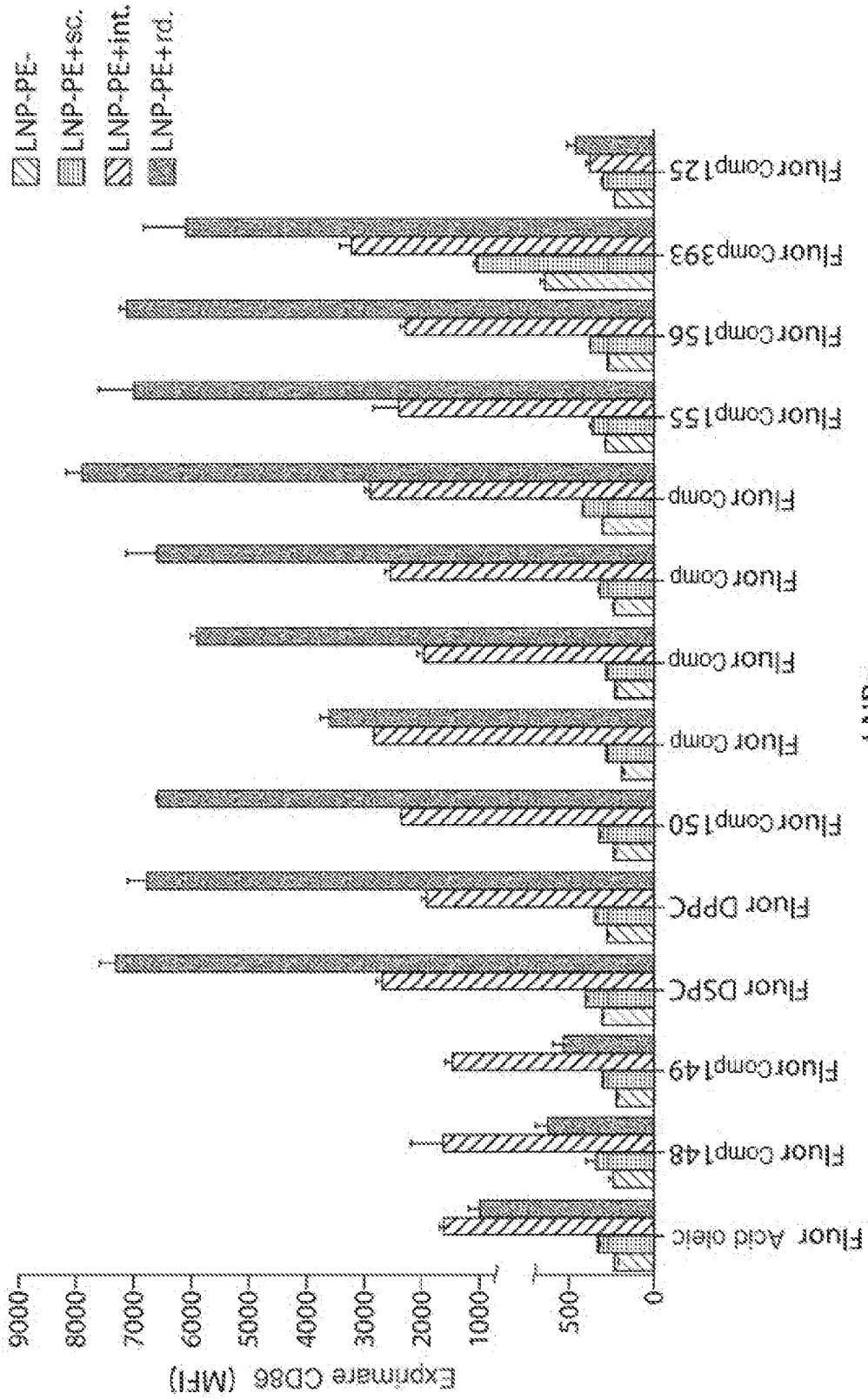
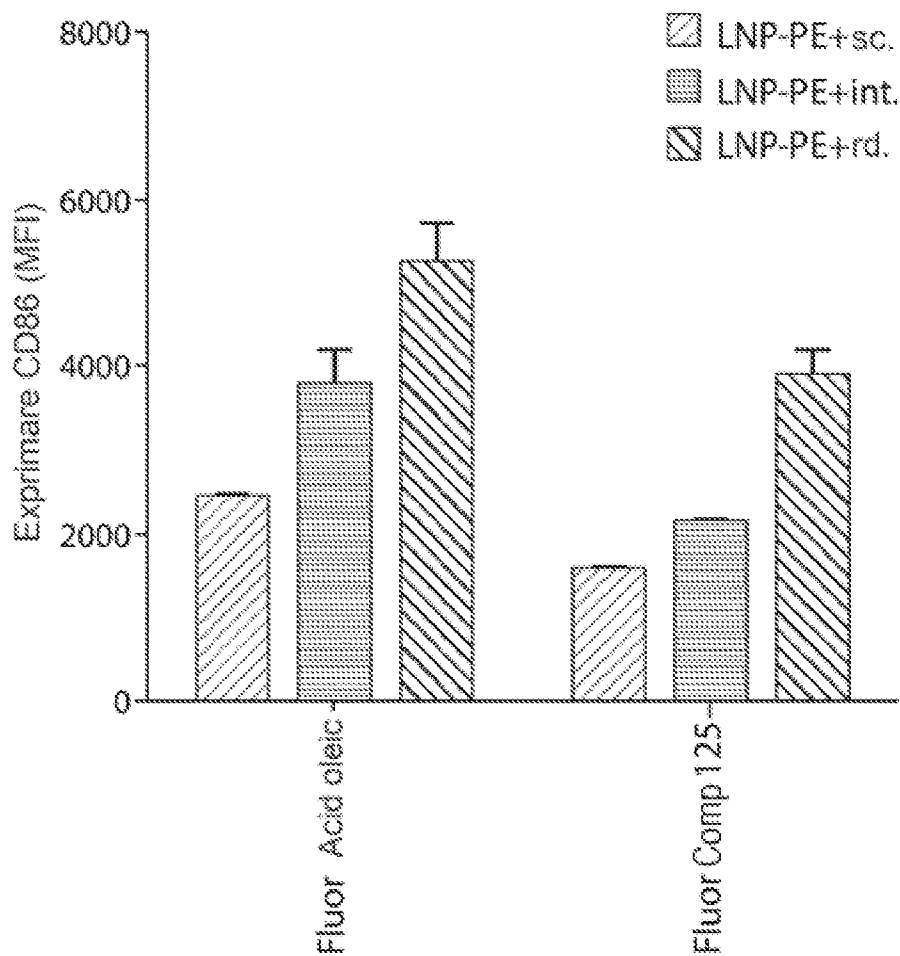


FIG. 71B





LNPs  
FIG. 72A



LNP-uri

FIG. 72B

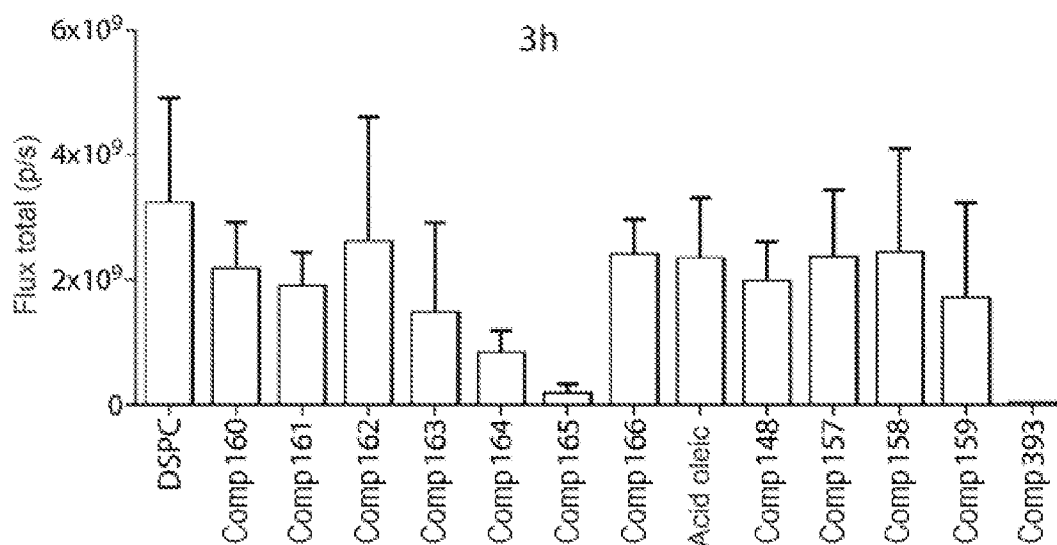


FIG. 73A

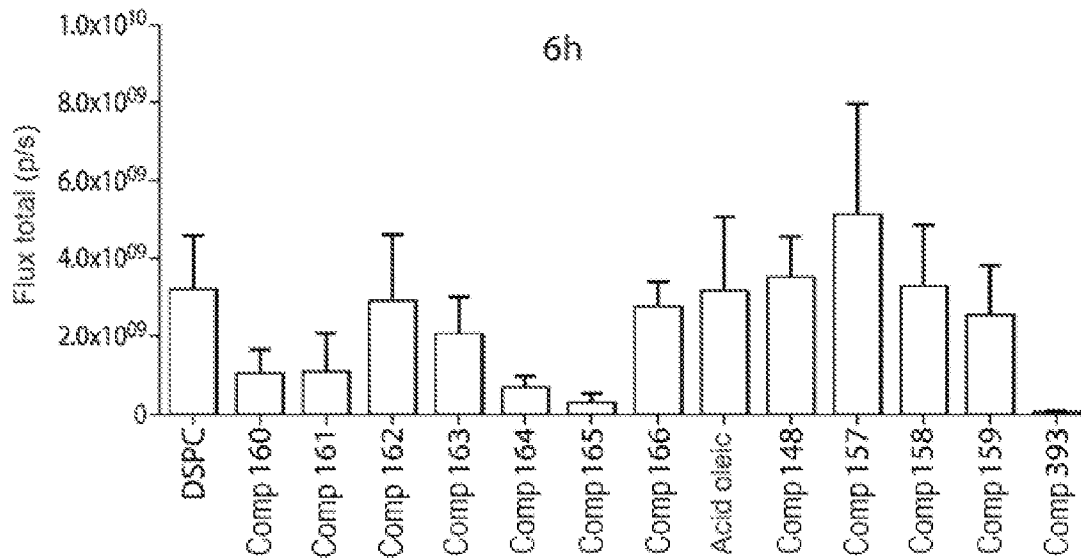


FIG. 73B

332

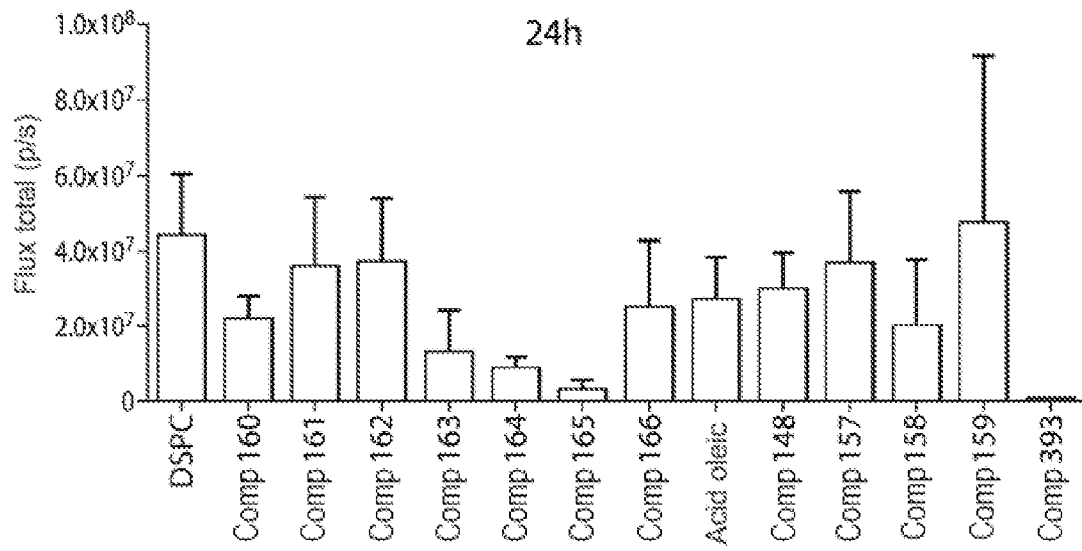


FIG. 73C

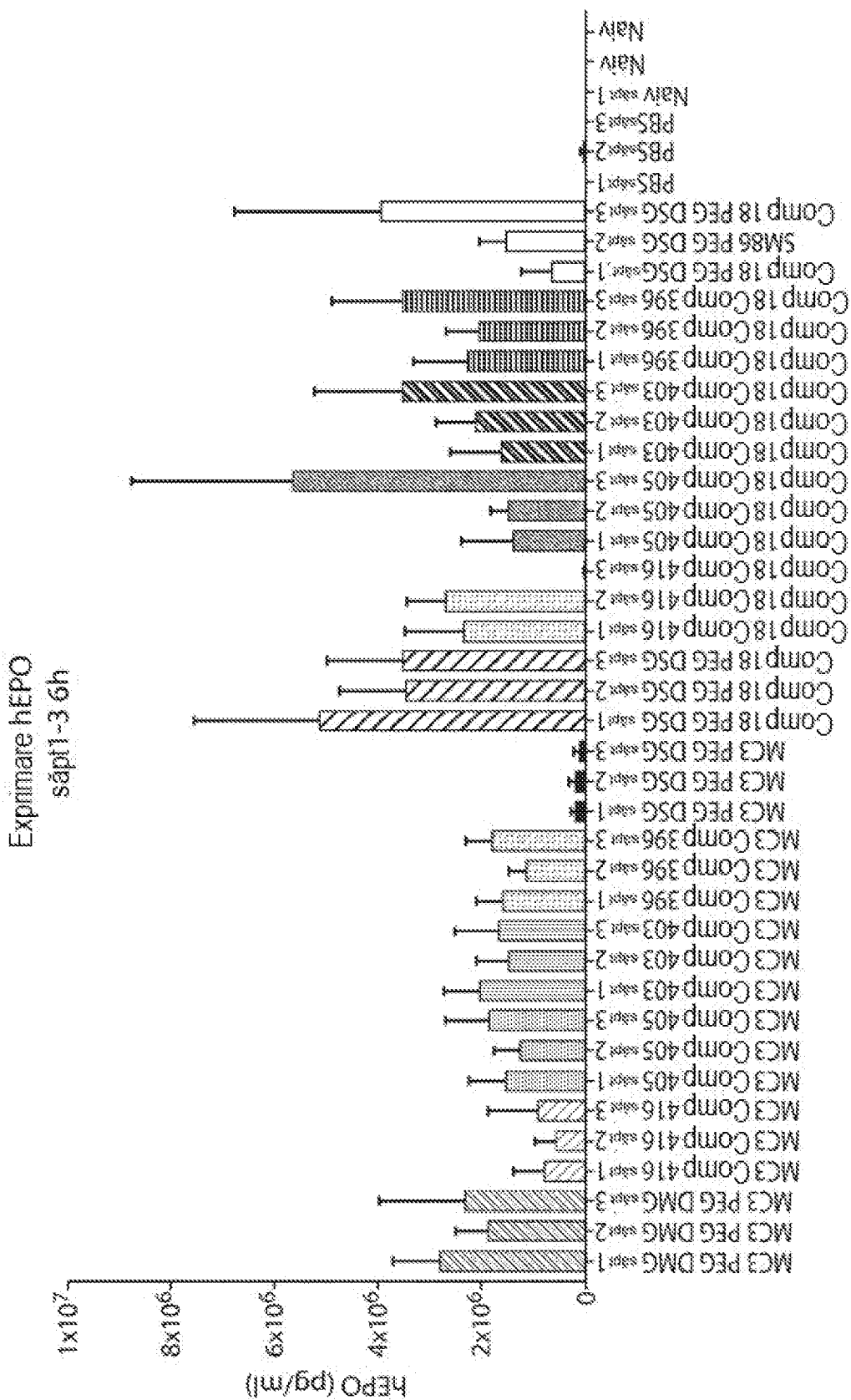


FIG. 74



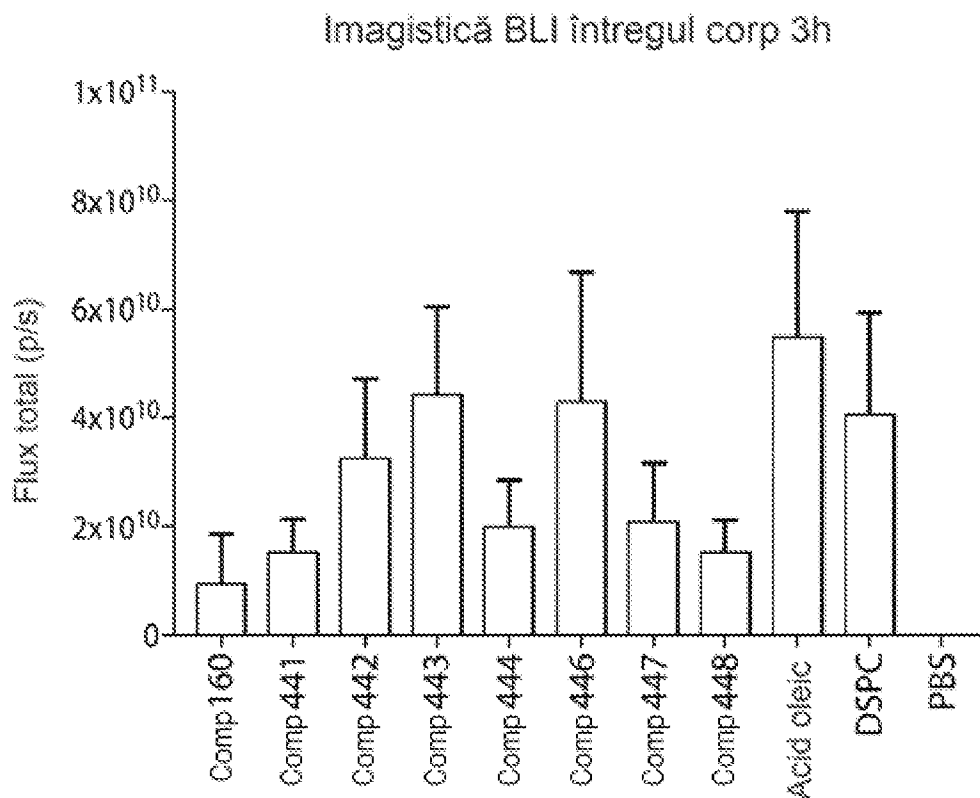


FIG. 76

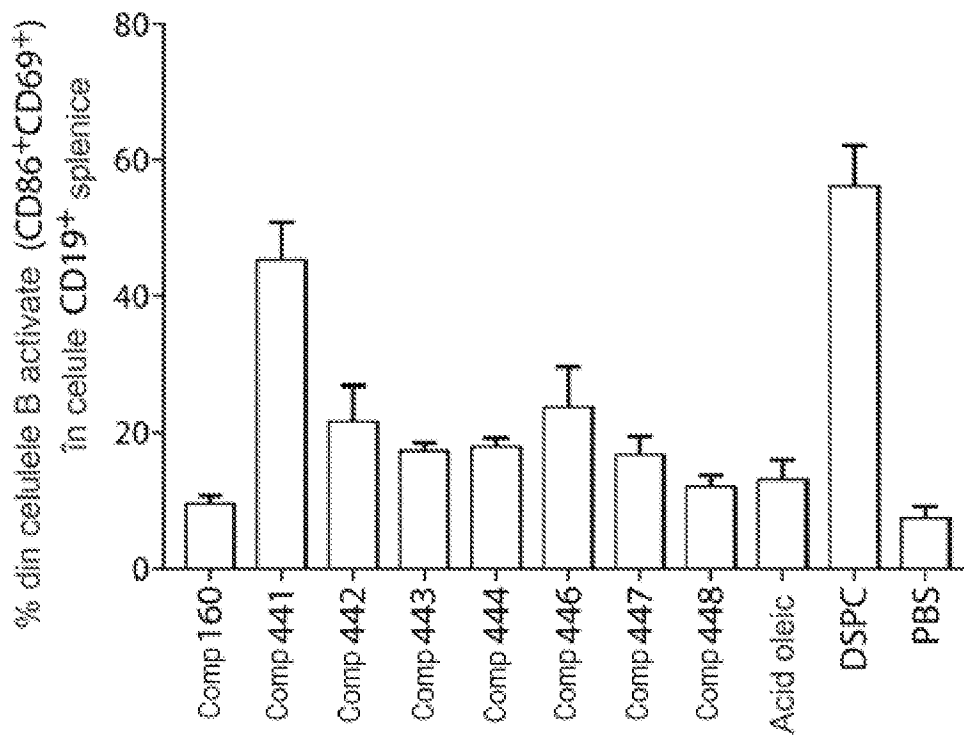
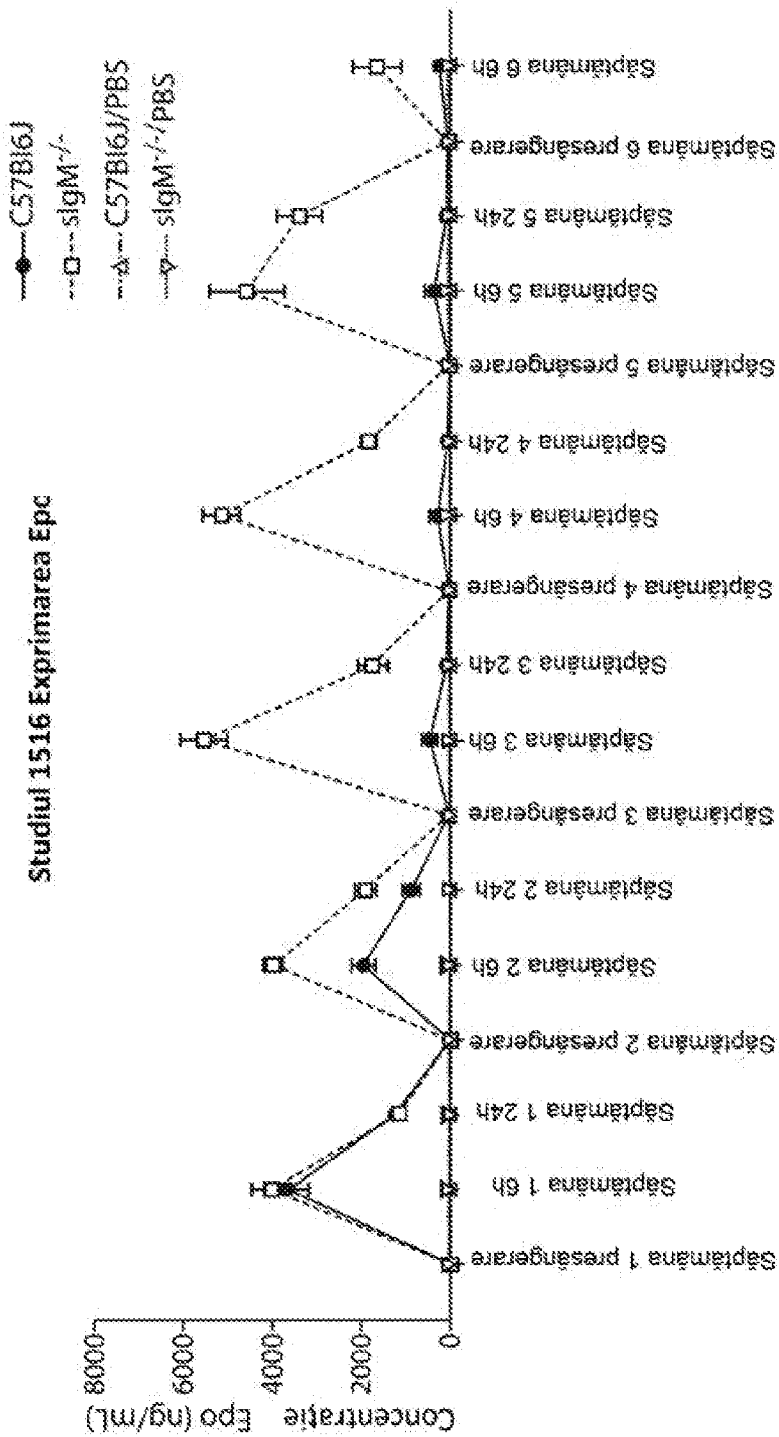


FIG. 77



Studiu 1516

FIG. 78



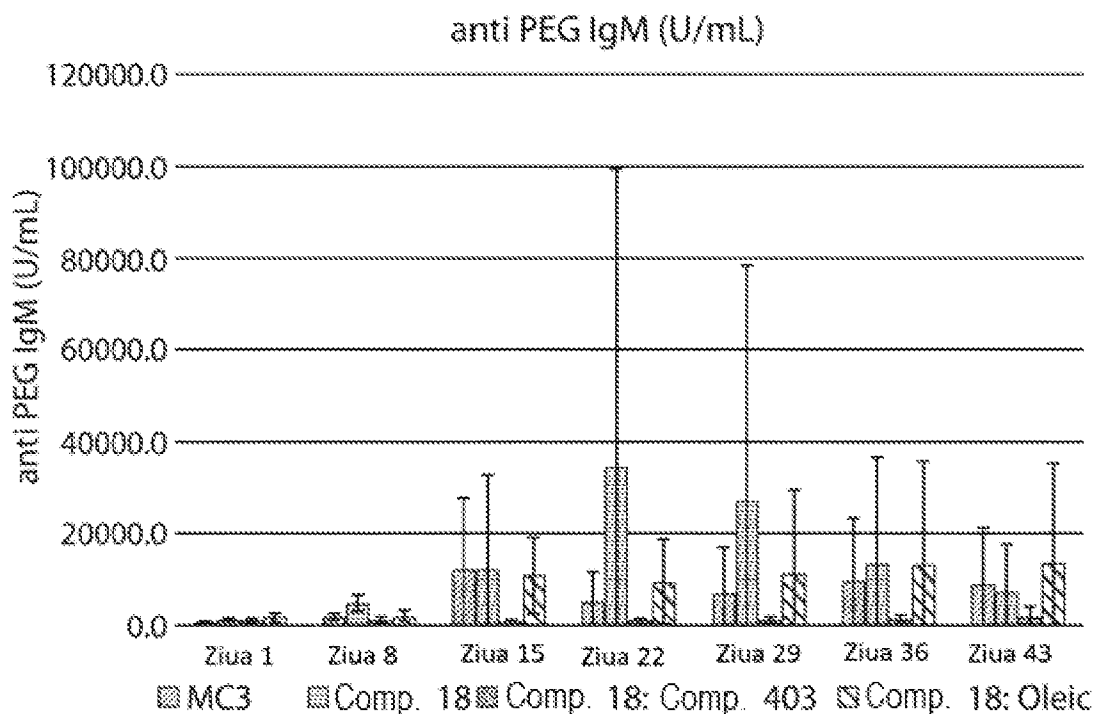


FIG. 80

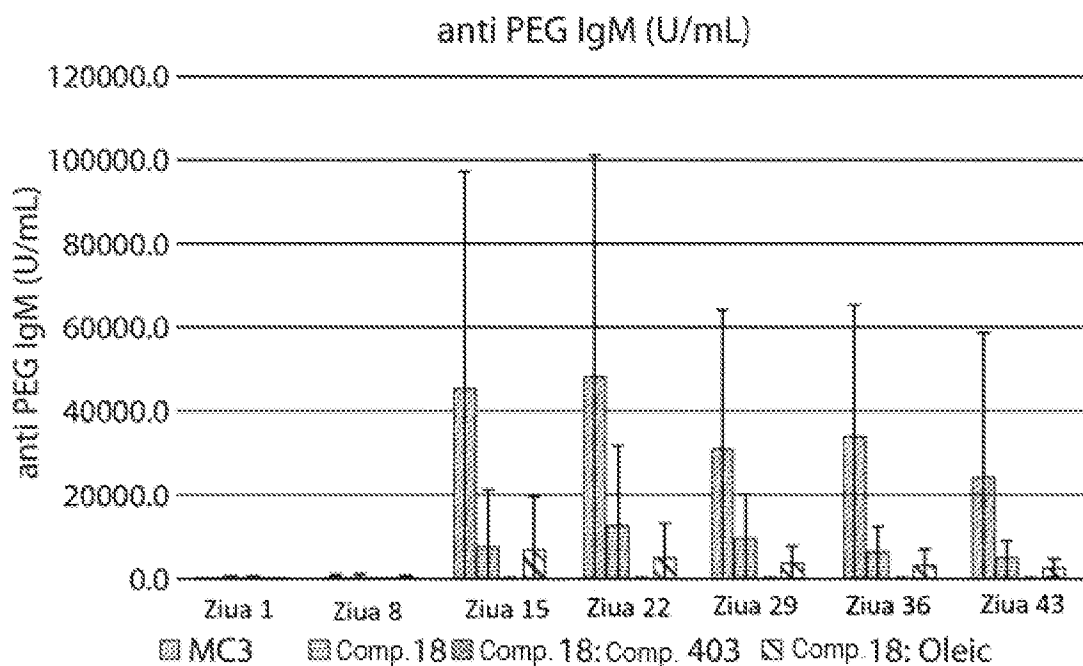


FIG. 81

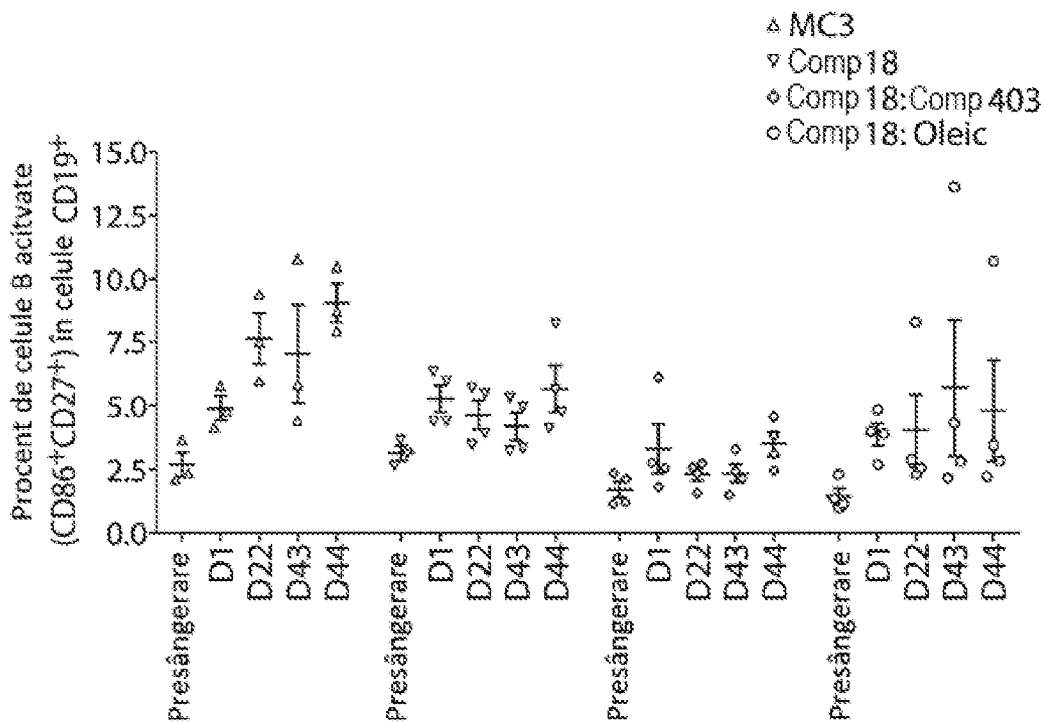


FIG. 82

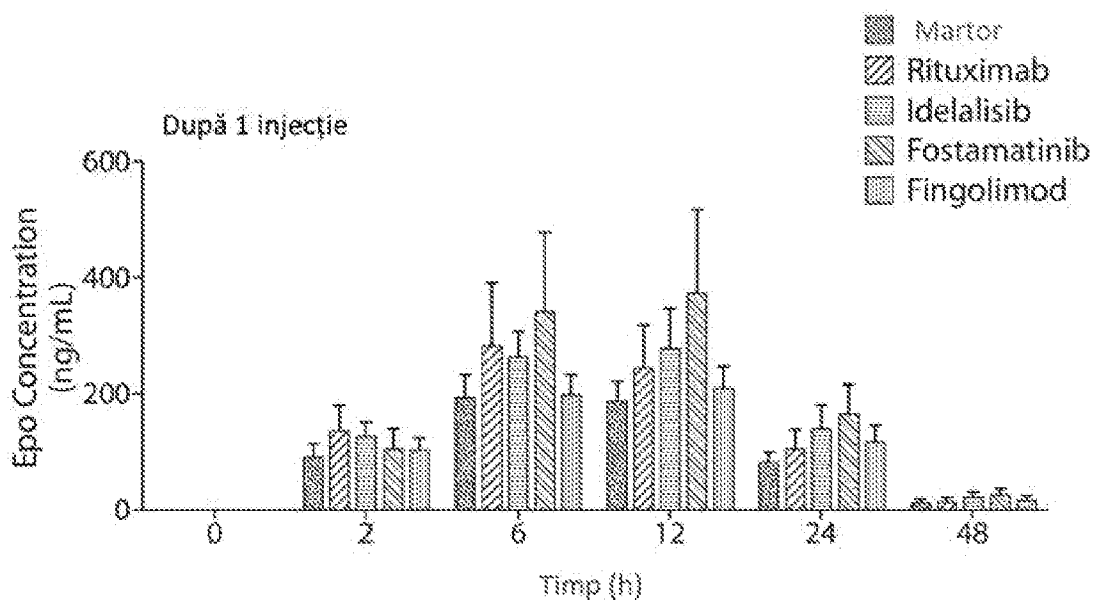


FIG. 84A

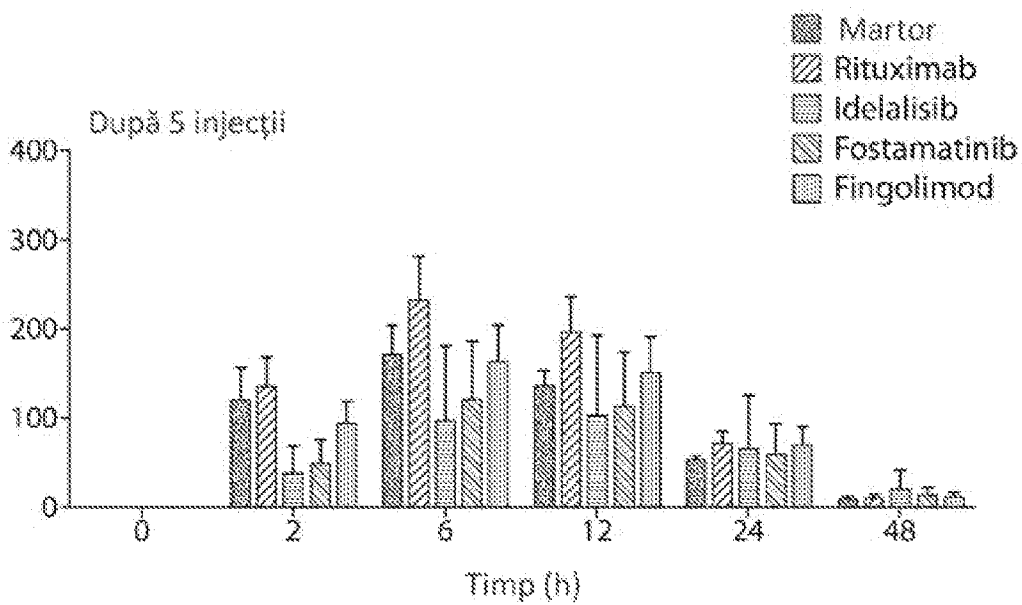
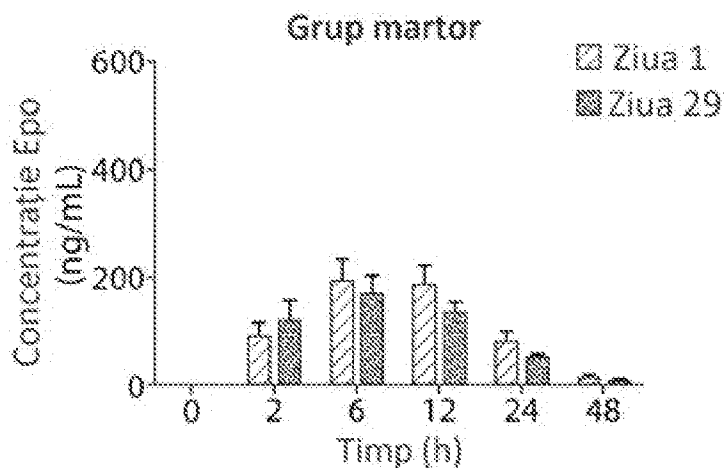
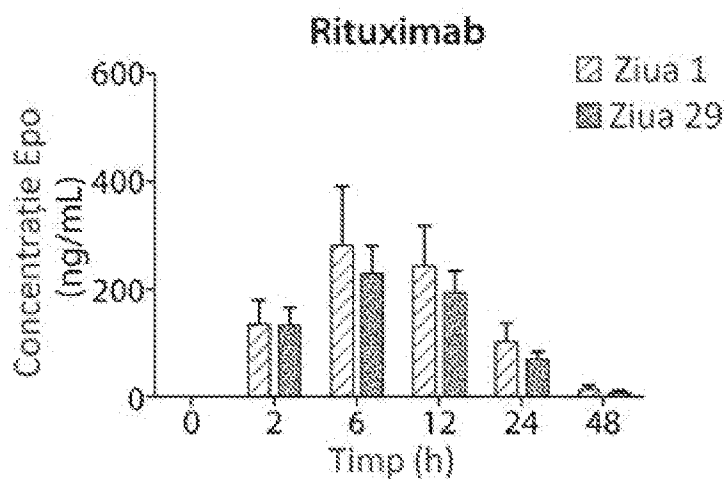


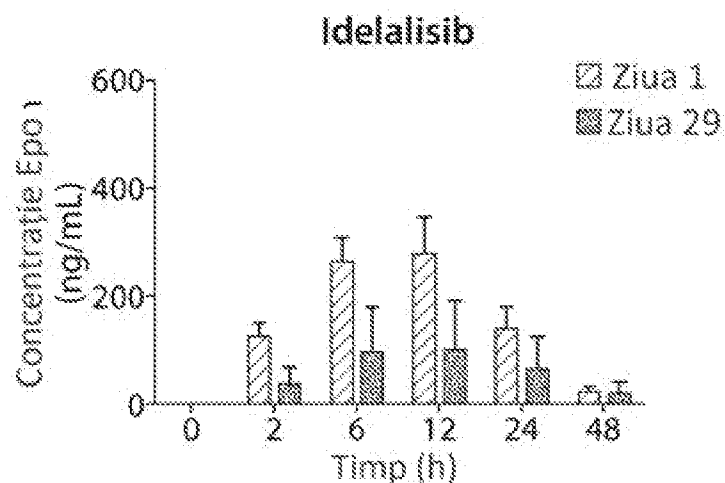
FIG. 84B



**Fig. 85A**



**Fig. 85B**



**Fig. 85C**

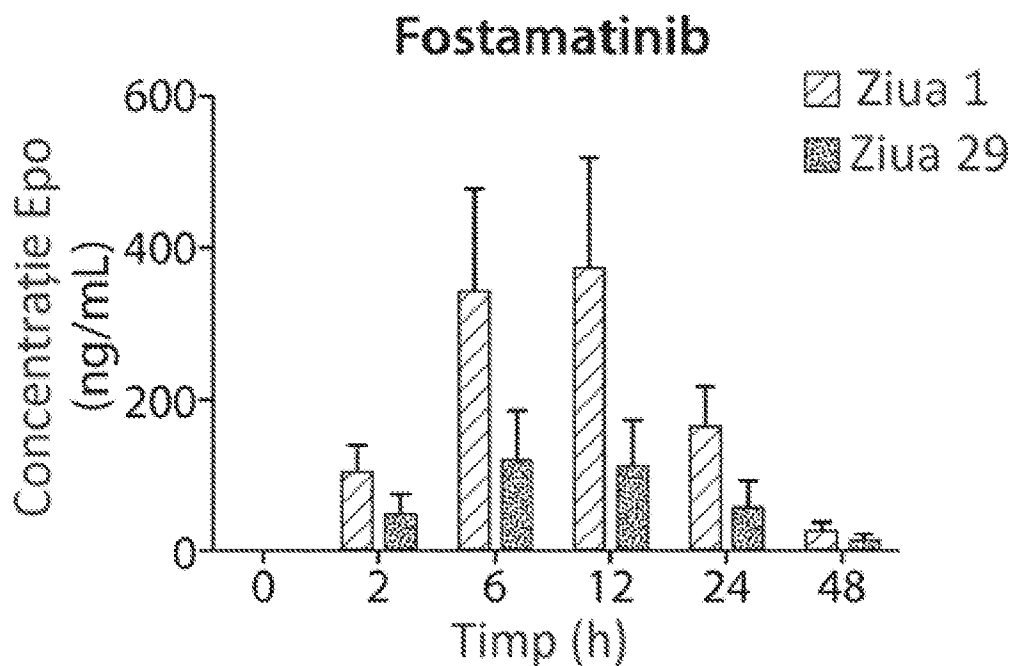


Fig. 85D

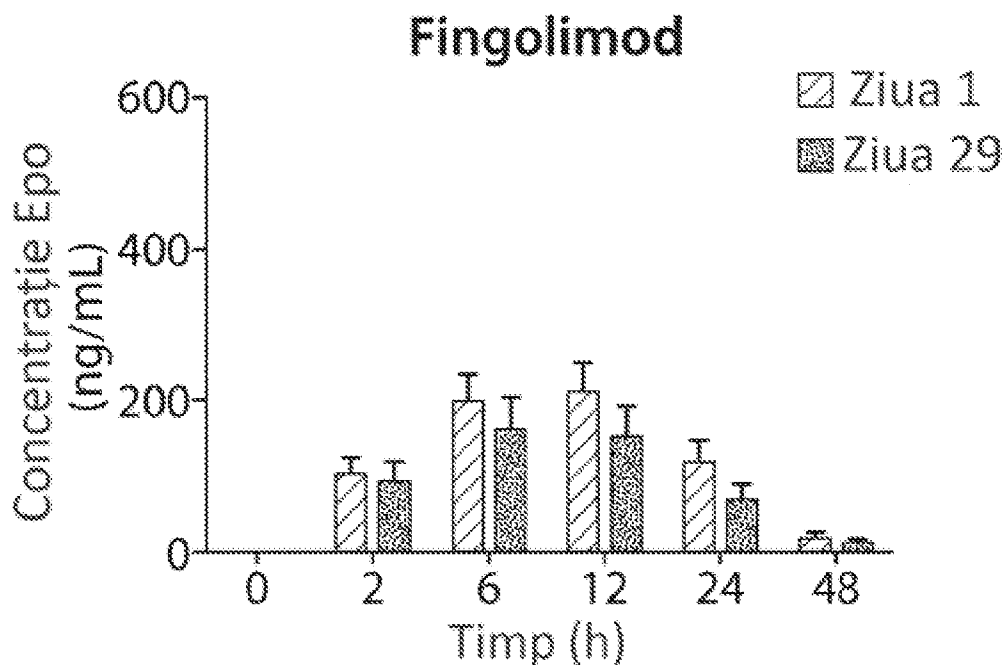


Fig. 85E

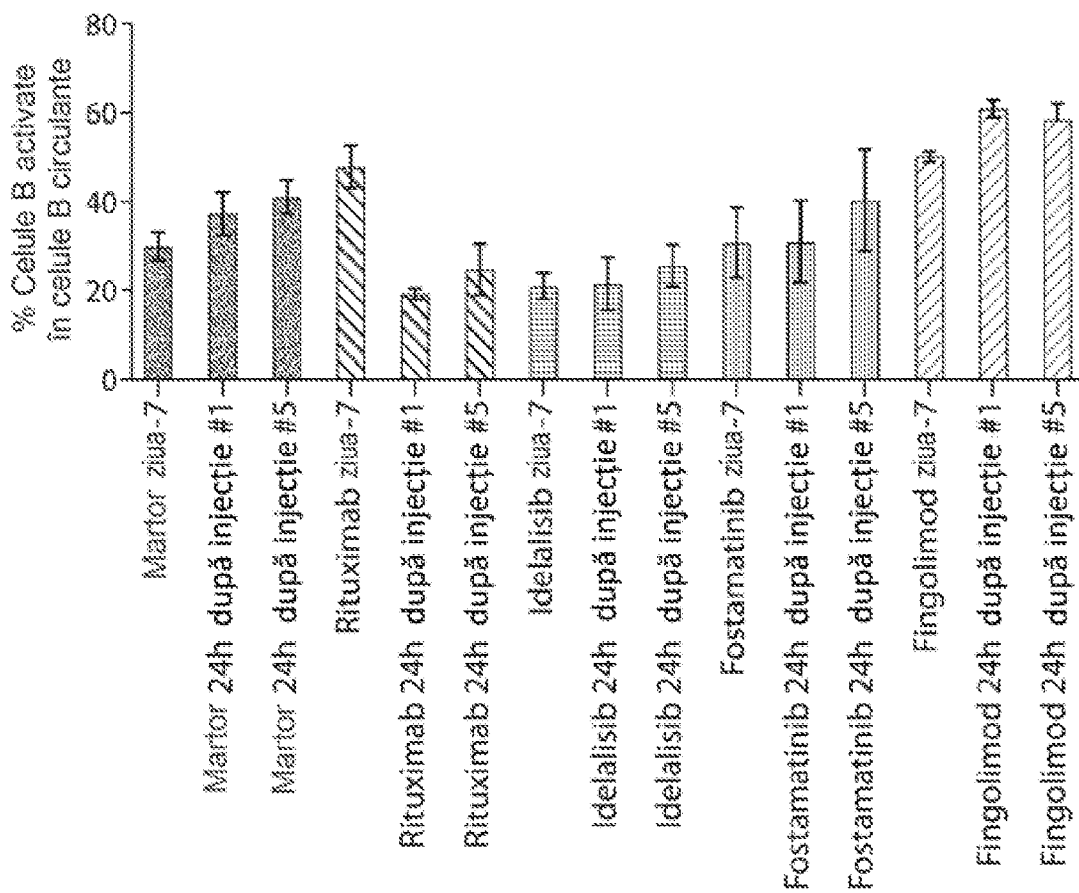
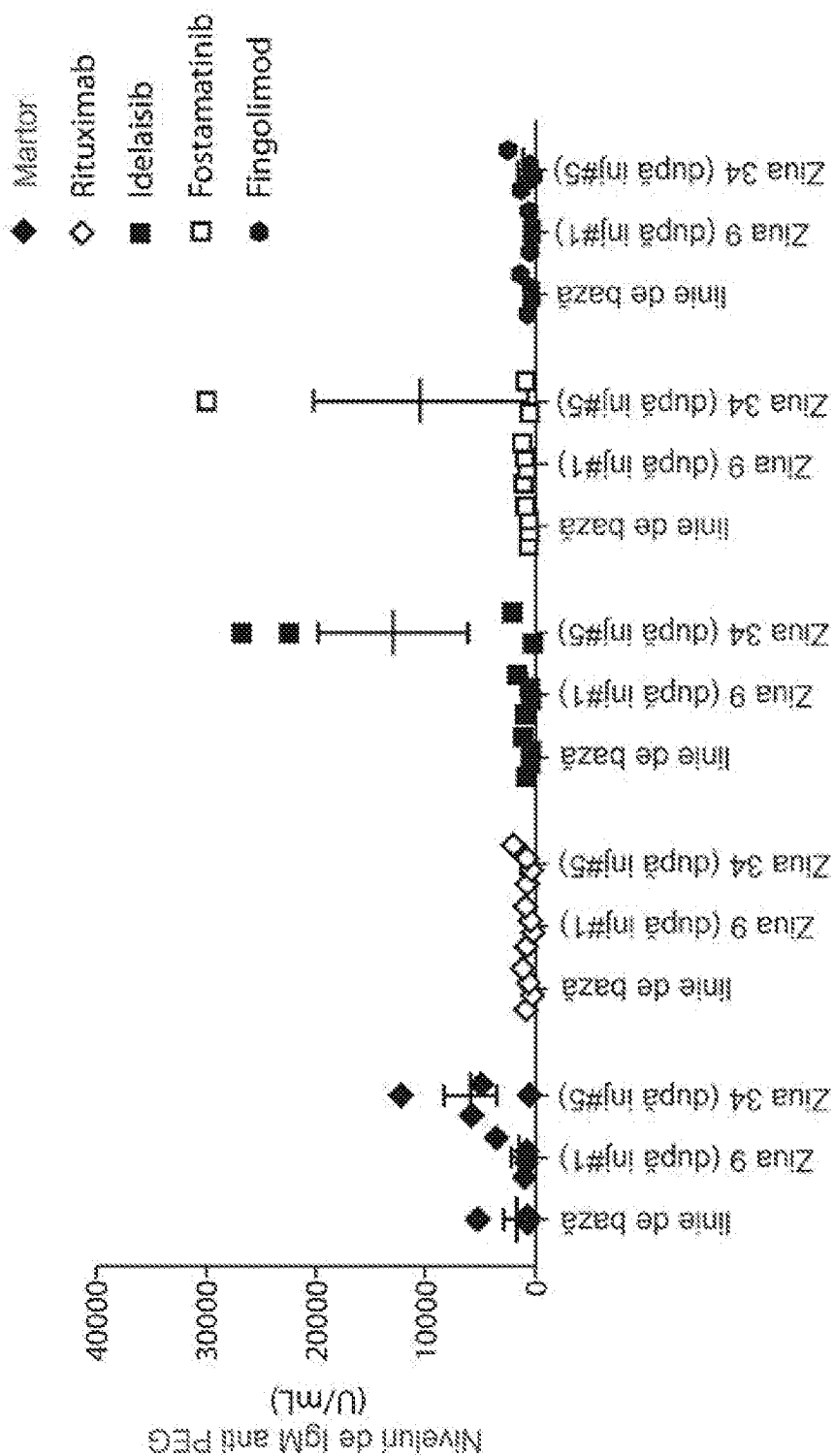
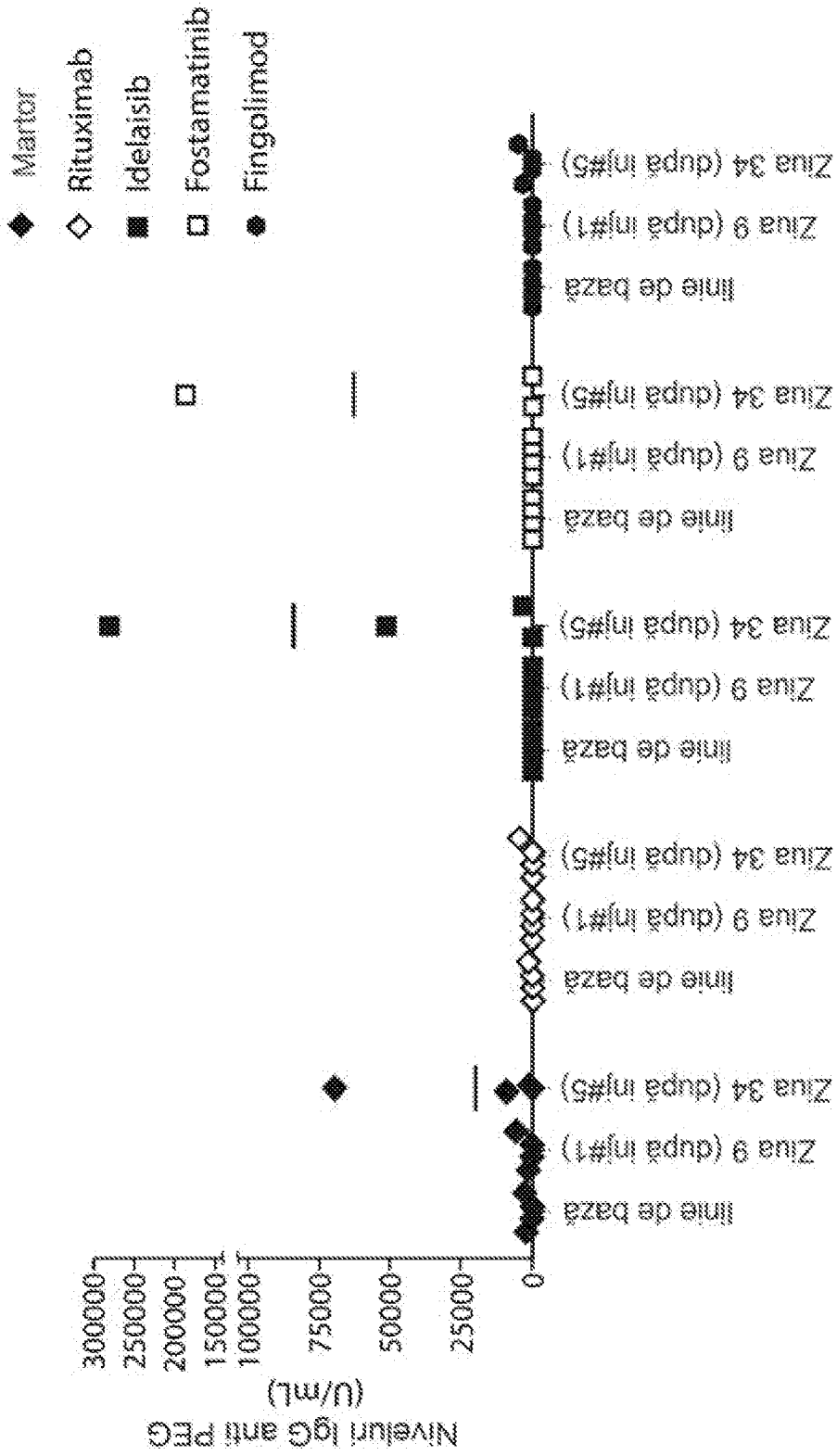


FIG. 87



Time (Zi)  
FIG. 89A



Time (Zi)  
**FIG. 89B**



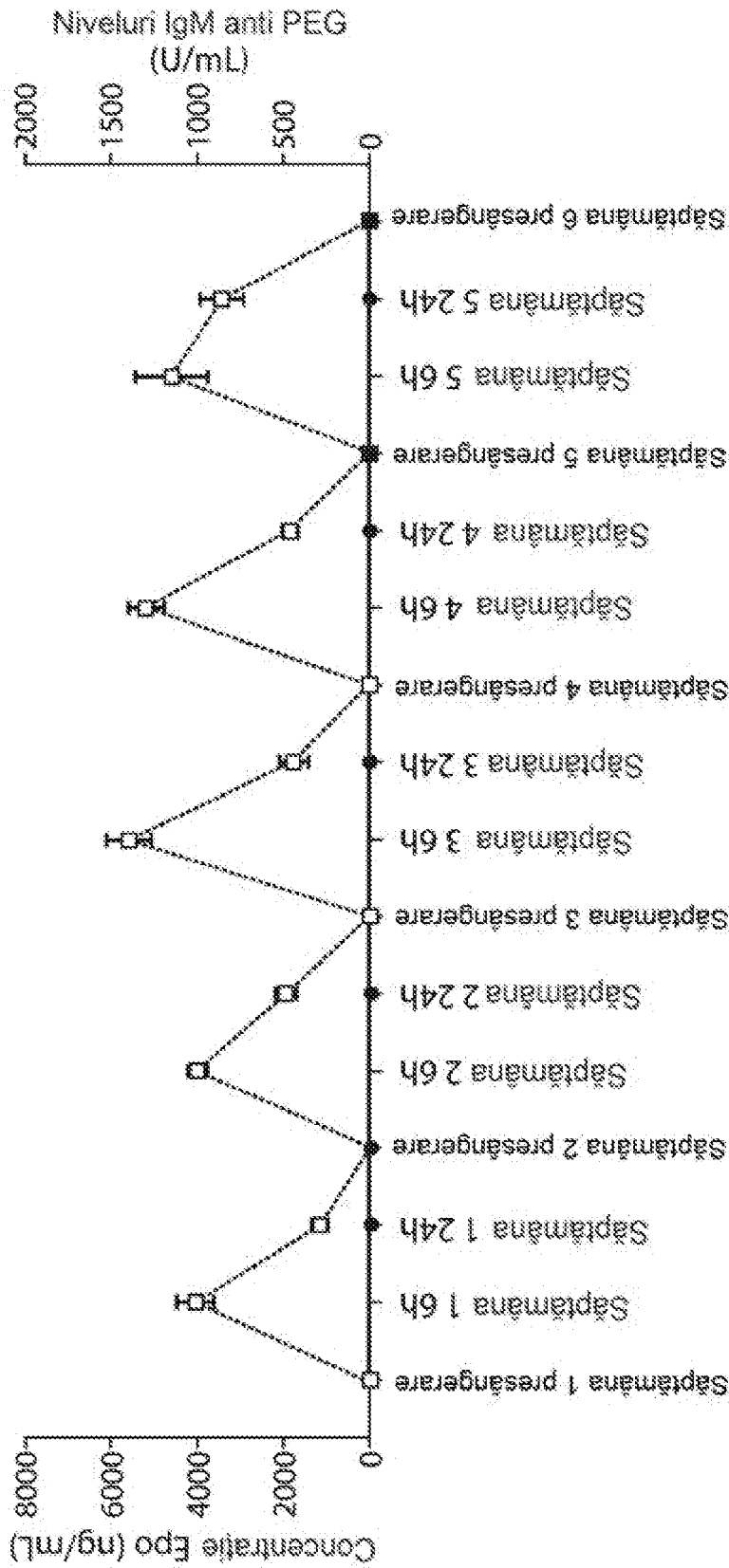


FIG. 90B

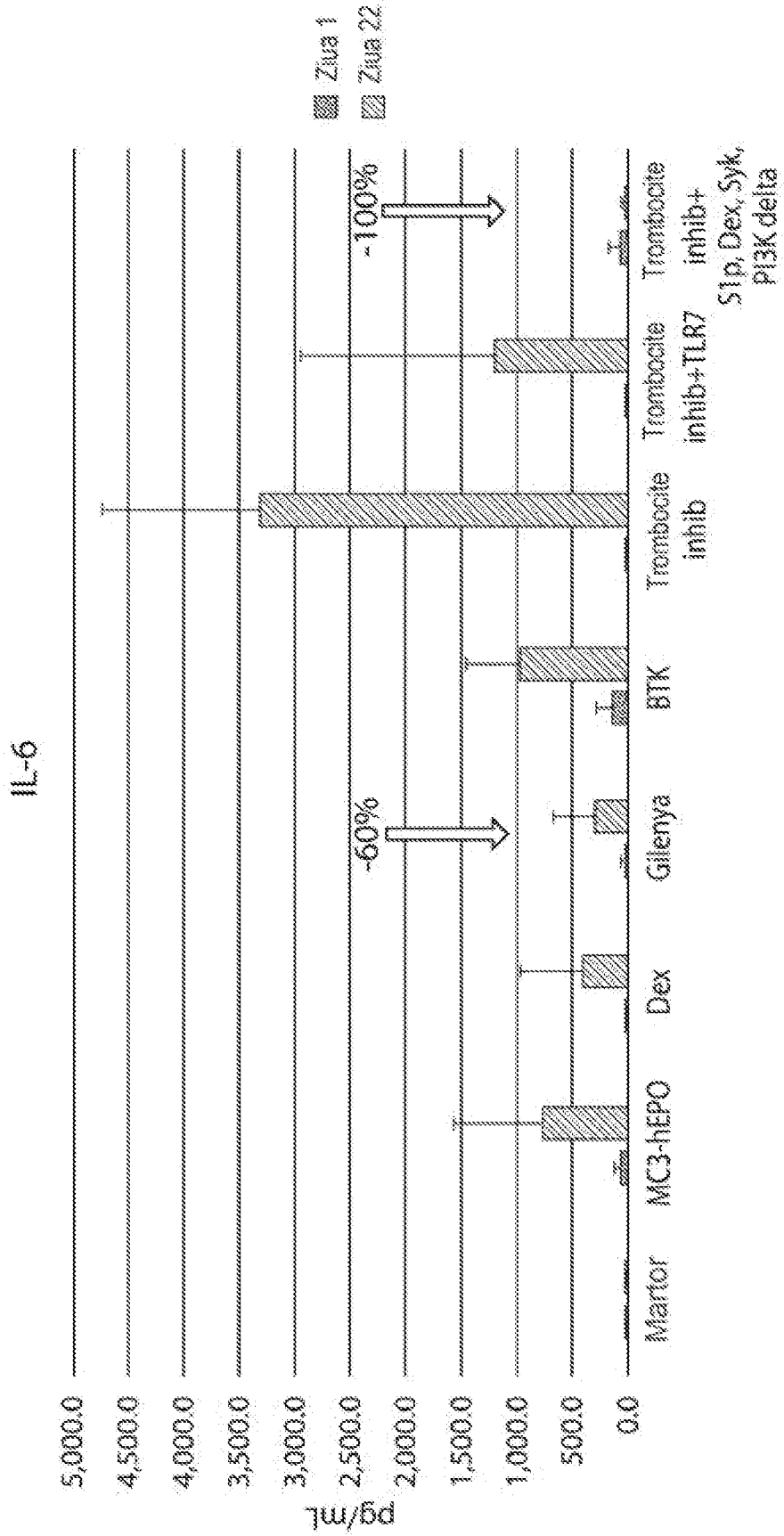
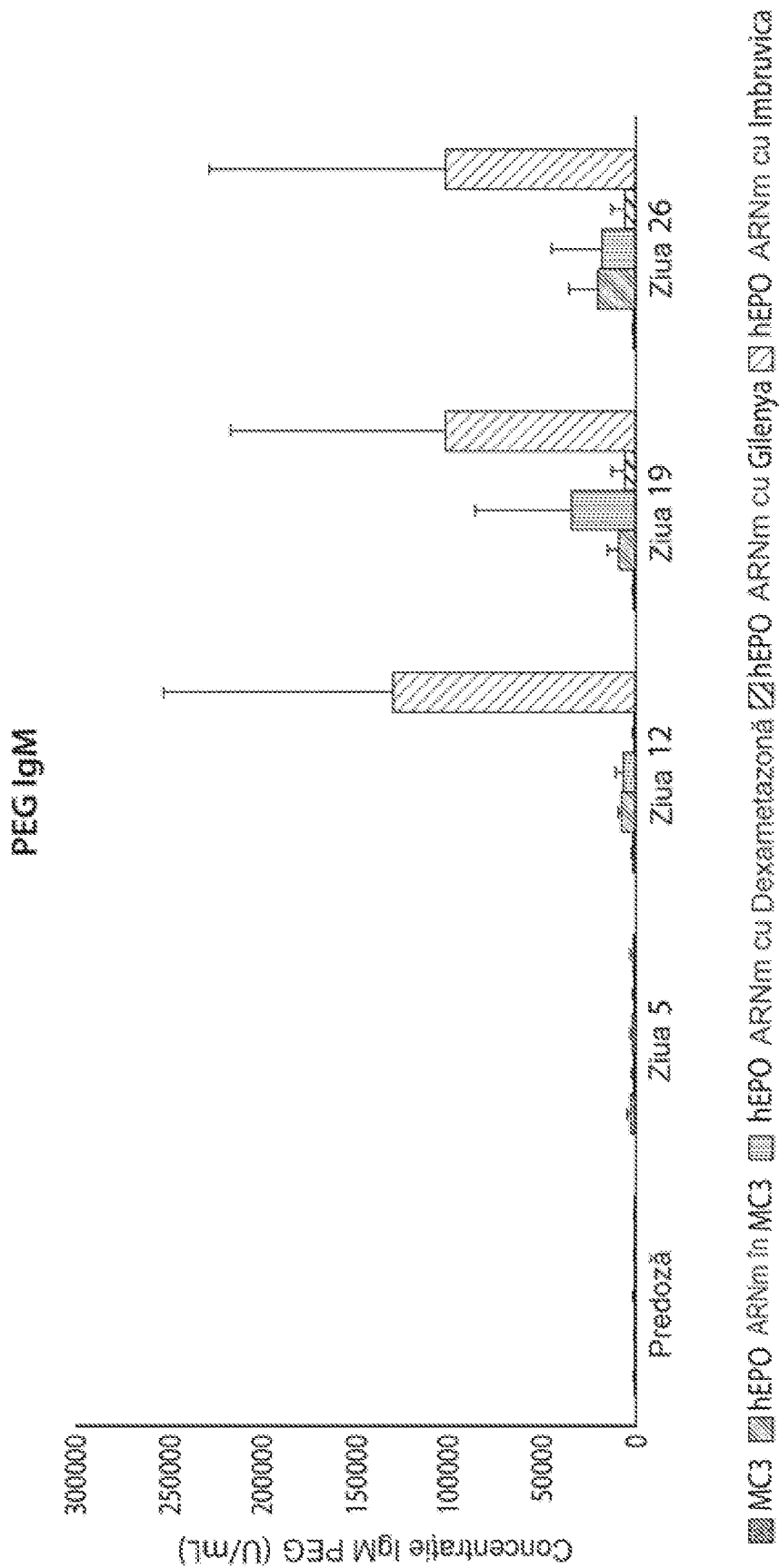


FIG. 91A



**FIG. 91B**

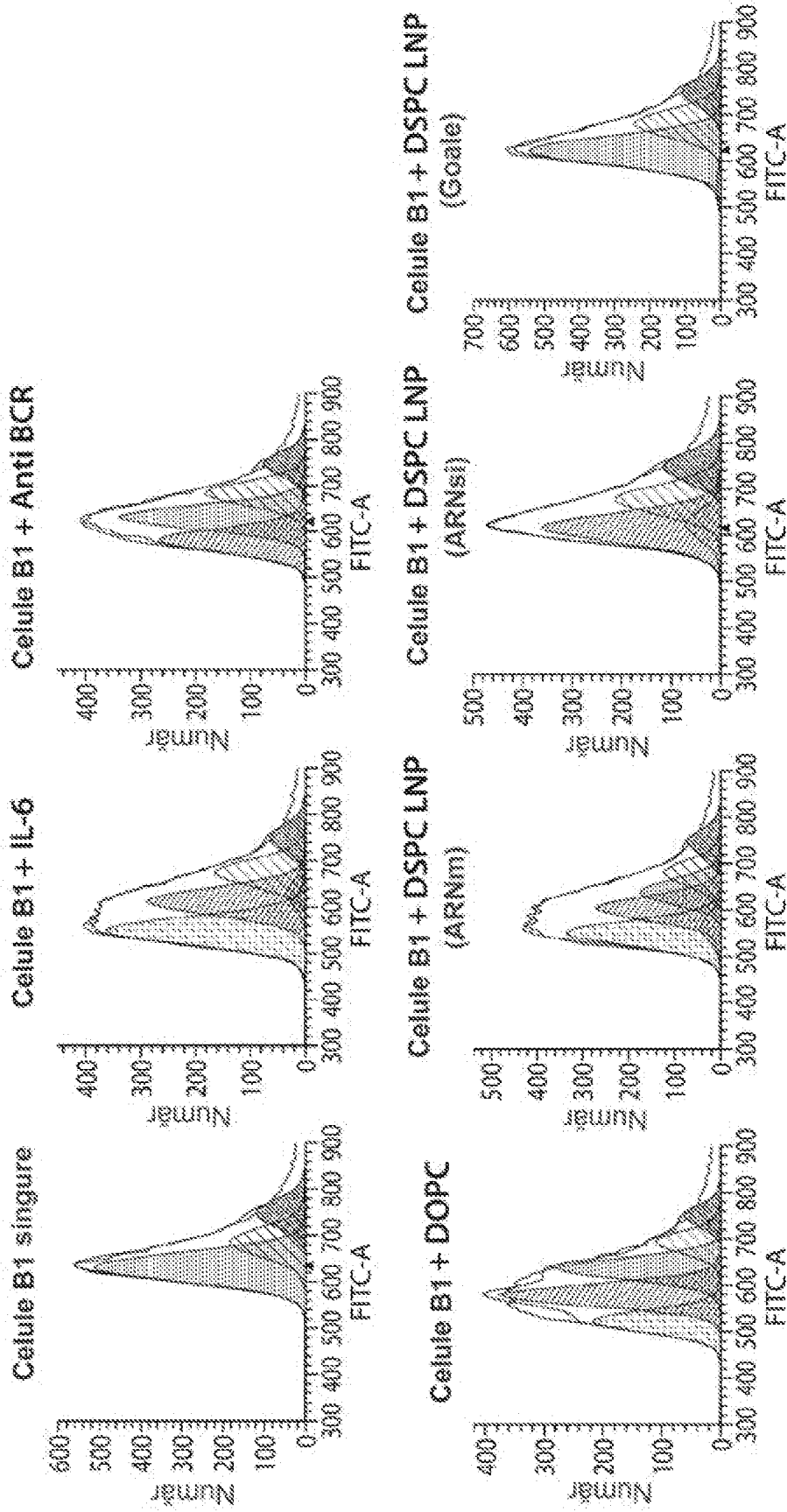


FIG. 92

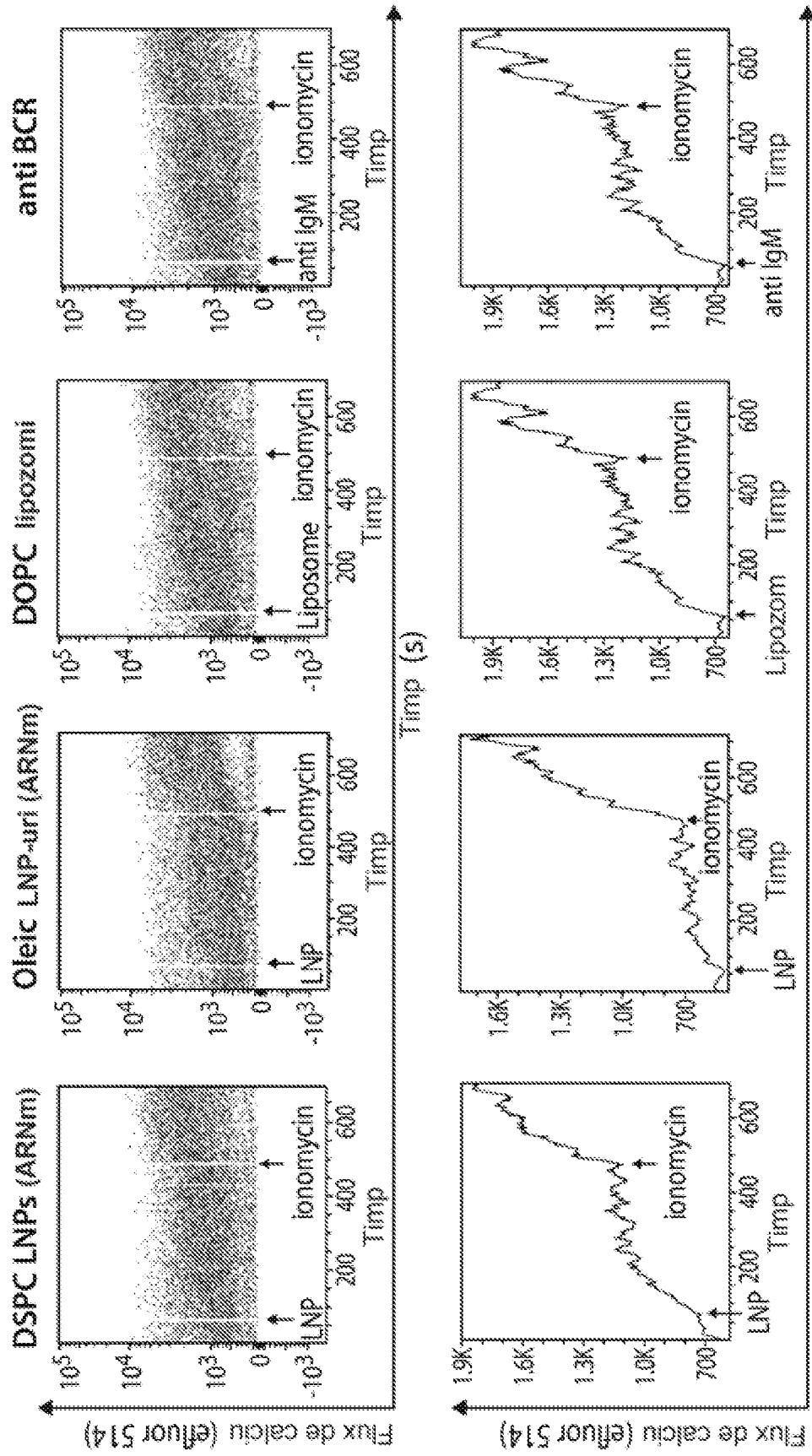


FIG. 93