

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 087**

51 Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)
C07C 229/12 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/88 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/44 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2011 PCT/US2011/039164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11153493**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2011 E 11726579 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2575764**

54 Título: **Lípidos biodegradables para la administración de agentes activos**

30 Prioridad:

23.05.2011 US 201161489197 P
03.06.2010 US 351146 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2017

73 Titular/es:

ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
300 Third Street, 3rd Floor
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

MANOHARAN, MUTHIAH;
MAIER, MARTIN;
JAYARAMAN, MUTHUSAMY;
MATSUDA, SHIGEO;
JAYAPRAKASH, NARAYANANNAIR, K.;
RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL, G.;
AKINC, AKIN y
BAILLIE, THOMAS, A.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

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

ES 2 634 087 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lípidos biodegradables para la administración de agentes activos

La presente invención se refiere a lípidos biodegradables y a su uso para la administración de agentes activos tales como ácidos nucleicos.

5 Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip), micro ARN (miARN), oligonucleótidos antisentido, ribozimas, plásmidos, ácidos nucleicos inmunoestimulantes, antisentido, antagomir, antimir, mimético de microARN, supermir, adaptador de U1 y aptámero. Estos ácidos nucleicos actúan mediante una
 10 introducción de ARNip o miARN en el citoplasma de la célula, estas construcciones de ARN bicatenario pueden unirse a una proteína llamada RISC. La hebra codificante del ARNip o miARN es desplazada del complejo de RISC, proporcionando un molde dentro de RISC que puede reconocer y unir ARNm con una secuencia complementaria a la del ARNip o miARN unido. Habiendo unido el ARNm complementario, el complejo de RISC escinde el ARNm y libera las hebras escindidas. La iARN puede proporcionar regulación por disminución de proteínas específicas dirigiendo la destrucción específica del ARNm correspondiente que codifica la síntesis de proteínas.

15 Las aplicaciones terapéuticas de iARN son extremadamente amplias, ya que las construcciones de ARNip y miARN pueden sintetizarse con cualquier secuencia de nucleótidos dirigida contra una proteína diana. Hasta la fecha, las construcciones de ARNip han mostrado la capacidad de regular específicamente por disminución las proteínas diana en tanto modelos *in vitro* como *in vivo*. Además, las construcciones de ARNip están siendo actualmente evaluadas en estudios clínicos.

20 Sin embargo, dos problemas actualmente afrontado por las construcciones de ARNip o miARN son, primero, su susceptibilidad a la digestión por nucleasa en el plasma y, segundo, su capacidad limitada para obtener acceso al compartimento intracelular donde pueden unirse a RISC cuando se administran por vía sistémica como el ARNip o miARN libre. Estas construcciones bicatenarias pueden estabilizarse por incorporación de conectores de nucleótido químicamente modificados dentro de la molécula, por ejemplo, grupos fosfotioato. Sin embargo, estas
 25 modificaciones químicas proporcionan solo protección limitada de la digestión por nucleasa y pueden disminuir la actividad de la construcción. La administración intracelular de ARNip o miARN puede facilitarse por el uso de sistemas de vehículo tales como polímeros, liposomas catiónicos o por modificación química de la construcción, por ejemplo por la unión covalente de moléculas de colesterol. Sin embargo, se requieren sistemas de administración mejorada para aumentar la potencia de moléculas de ARNip y miARN y reducir o eliminar el requisito de la modificación química.

30 Oligonucleótidos antisentido y ribozimas también pueden inhibir la traducción de ARNm en proteína. En el caso de construcciones antisentido, estos ácidos desoxinucleicos monocatenarios tienen una secuencia complementaria a la del ARNm de proteína diana y pueden unirse al ARNm por apareamiento de bases de Watson-Crick. Esta unión
 35 tanto previene la traducción del ARNm diana y/o desencadena la degradación de RNasa H de los transcritos de ARNm. Por consiguiente, los oligonucleótidos antisentido tienen enormes posibilidades de especificidad de acción (es decir, regulación por disminución de una proteína relacionada con enfermedad específica). Hasta la fecha, estos compuestos han mostrado promesa en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, que incluyen modelos de enfermedad inflamatoria, cáncer y VIH (revisado en Agrawal, Trends in Biotech. 14:376-387 (1996)). Antisentido también puede
 40 afectar la actividad celular hibridándose específicamente con ADN cromosómico. Evaluaciones clínicas humanas avanzadas de varios fármacos antisentido están actualmente en curso. Dianas para estos fármacos incluyen los genes bcl2 y de apolipoproteína B y productos de ARNm.

45 Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes incluyen ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos. En el caso de ácidos desoxirribonucleicos, se ha mostrado que ciertas secuencias o motivos provocan estimulación inmunitaria en mamíferos. Estas secuencias o motivos incluyen el motivo CpG, secuencias ricas en pirimidina y secuencias palindrómicas. Se cree que el motivo CpG en ácidos desoxirribonucleicos es específicamente reconocido por un receptor endosómico, el receptor de tipo toll 9 (TLR-9), que entonces desencadena tanto la vía de estimulación inmunitaria innata como adquirida. También se ha informado de ciertas secuencias de ácidos ribonucleicos
 50 inmunoestimulantes. Se cree que estas secuencias de ARN desencadenan la activación inmunitaria uniéndose a receptores de tipo toll 6 y 7 (TLR-6 y TLR-7). Además, también se informa que el ARN bicatenario es inmunoestimulante y se cree que activa mediante unión a TLR-3.

55 Un problema muy conocido con el uso de ácidos nucleicos terapéuticos se refiere a la estabilidad del enlace internucleotídico fosfodiéster y la susceptibilidad de este conector a nucleasas. La presencia de exonucleasas y endonucleasas en suero produce la rápida digestión de ácidos nucleicos que poseen conectores fosfodiéster y, por consiguiente, los ácidos nucleicos terapéuticos pueden tener semividas muy cortas en presencia de suero o dentro de células (Zelphati, O., et al., Antisense. Res. Dev. 3:323-338 (1993); y Thierry, A.R., et al., pp147-161 en Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA (Eds. Erickson, RP and Izant, JG; Raven Press, NY (1992)). El ácido nucleico terapéutico que está siendo actualmente desarrollado no emplea la química de fosfodiéster básica encontrada en ácidos nucleicos naturales, debido a este y otros problemas conocidos.

Este problema ha sido parcialmente vencido por modificaciones químicas que reducen la degradación de suero o intracelular. Se han probado modificaciones en el puente de fosfodiéster internucleotídico (por ejemplo, usando enlaces fosfortioato, metilfosfonato o fosforamido), en la base de nucleótido (por ejemplo, 5-propinil-pirimidinas), o en el azúcar (por ejemplo, azúcares modificados en 2') (Uhlmann E., et al. *Antisense: Chemical Modifications*. Encyclopedia of Cancer, Vol. X., pp 64-81 Academic Press Inc. (1997)). Otros han intentado mejorar la estabilidad usando enlaces 2'-5' azúcar (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.532.130). Se han intentado otros cambios. Sin embargo, ninguna de estas soluciones ha demostrado ser completamente satisfactoria, y los ácidos nucleicos terapéuticos libres *in vivo* todavía tienen solo eficacia limitada.

Además, como se observa anteriormente con referencia a ARNip y miARN, sigue habiendo problemas con la capacidad limitada de ácidos nucleicos terapéuticos para cruzar membranas celulares (véase, Vlassov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1197:95-1082 (1994)) y en los problemas asociados a toxicidad sistémica, tal como anafilaxis relacionada con el complemento, propiedades de coagulación alterada y citopenia (Galbraith, et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994)).

Para intentar mejorar la eficacia, los investigadores también han empleado sistemas de vehículo basados en lípidos para administrar ácidos nucleicos terapéuticos químicamente modificados o no modificados. En Zelphati, O y Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), los autores se refieren al uso de liposomas aniónicos (convencionales), liposomas sensibles al pH, inmunoliposomas, liposomas fusogénicos y agregados de lípido catiónico/antisentido. Similarmente, se ha administrado ARNip por vía sistémica en liposomas catiónicos, y se ha informado que estas partículas de ácido nucleico-lípido proporcionan regulación por disminución mejorada de proteínas diana en mamíferos que incluyen primates no humanos (Zimmermann et al., *Nature* 441: 111-114 (2006)).

En este contexto, Chesnoy y Huang (Chesnoy, S. and Huang, L.; *Structure and Function of Lipid-DNA Complexes for Gene Delivery*; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29; 2000; pp. 27-47) describen la estructura y función de ciertos complejos de lípido-ADN para administración génica. Adicionalmente, Lv et al. (Lv, H. et al.; *Journal of Controlled Release*, 114; 2006; pp. 100-109) describen la toxicidad de ciertos lípidos catiónicos y polímeros catiónicos en administración génica.

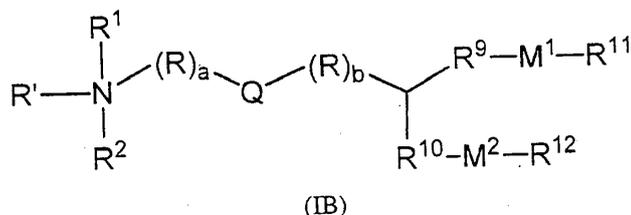
A pesar de este progreso, sigue existiendo una necesidad en la materia de composiciones de lípido-ácido nucleico terapéutico mejoradas que sean adecuadas para uso terapéutico general. Preferentemente, estas composiciones encapsularían ácidos nucleicos con alta eficiencia, tendrían altas relaciones fármaco:lípido, protegerían el ácido nucleico encapsulado de la degradación y eliminación en suero, serían adecuados para administración sistémica y proporcionarían administración intracelular del ácido nucleico encapsulado. Además, estas partículas de lípido-ácido nucleico deberían ser bien toleradas y proporcionarían un índice terapéutico adecuado, de forma que el tratamiento del paciente a una dosis eficaz del ácido nucleico no se asocie a toxicidad y/o riesgo significativo al paciente. Se proporcionan composiciones, métodos de preparación de las composiciones y métodos de uso de las composiciones para introducir ácidos nucleicos en células, que incluyen para el tratamiento de enfermedades.

La presente invención se refiere a un lípido catiónico que tiene grupos biodegradables localizados en el resto lipídico del lípido catiónico. Estos lípidos catiónicos pueden incorporarse en una partícula de lípido para administrar un agente activo, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARNip). La incorporación del (de los) grupo(s) biodegradable(s) en el lípido catiónico produce metabolismo más rápido y eliminación del lípido catiónico del cuerpo

tras la administración del agente activo a un área diana. Como resultado, estos lípidos catiónicos tienen toxicidad sustancialmente más baja que los lípidos catiónicos similares sin los grupos biodegradables.

En particular, la presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Un compuesto de fórmula IB



en la que

R¹ y R² son cada uno, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, o heterociclo; o

R¹ y R², junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido;

- cada aparición de R es, independientemente, $-(CR^3R^4)-$;
- cada aparición de R^3 y R^4 son, independientemente H, OH, alquilo, alcoxi, $-NH_2$, alquilamino o dialquilamino (en una realización preferida, cada aparición de R^3 y R^4 son, independientemente H o alquilo C_1-C_4);
- 5 o R^3 y R^4 , junto con el átomo de carbono al que están directamente unidos, forman un grupo cicloalquilo, en la que no más de tres grupos R en cada cadena unida al carbono C^* son cicloalquilo (por ejemplo, ciclopropilo);
- 10 Q está ausente o es $-O-$, $-NH-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^4)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-S-S-$, $-OC(O)O-$, $-O-N=C(R^5)-$, $-C(R^5)=N-O-$, $-OC(O)N(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)O-$, $-C(O)S-$, $-C(S)O-$ o $-C(R^5)=N-O-C(O)-$;
- R^5 es H o metilo;
- a es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;
- b es 0, 1, 2 o 3;
- R' está ausente, es hidrógeno, o alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_4);
- 15 M^1 y M^2 son cada uno, independientemente, un grupo biodegradable;
- cada uno de R^9 y R^{10} son independientemente alquilenos, o alquenileno; y
- cada uno de R^{11} y R^{12} son independientemente alquilo o alquenilo, opcionalmente terminado por $COOR^{13}$ donde cada R^{13} es independientemente alquilo;
- con la condición de que:
- 20 R^9 , M^1 y R^{11} sean juntos al menos 8 átomos de carbono de longitud; y
- R^{10} , M^2 y R^{12} sean juntos al menos 8 átomos de carbono de longitud.
2. El compuesto del punto 1, en el que R^9 y R^{10} son cada uno independientemente alquilenos C_4-C_{12} o alquenileno C_4-C_{12} , M^1 y M^2 son $-C(O)O-$, y R^{11} y R^{12} son alquilenos C_4-C_{12} o alquenileno C_4-C_{12} .
- 25 3. El compuesto del punto 1 o 2, en el que R^9 , M^1 y R^{11} tienen juntos 12 a 24 átomos de carbono de longitud, o en el que R^{10} , M^2 y R^{12} tienen juntos 12 a 24 átomos de carbono de longitud.
4. El compuesto de uno cualquiera de los puntos 1 - 3, en el que el grupo $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b-$ es $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(O)O-$, $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-NH-C(O)O-$, $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-OC(O)-NH-$ o $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(CH_3)=N-O-$.
5. El compuesto de cualquiera de los puntos precedentes, en el que el compuesto está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o en forma de un lípido catiónico.
- 30 6. Una partícula de lípido que comprende un lípido neutro, un lípido capaz de reducir la agregación y un lípido catiónico del punto 5.
7. La partícula de lípido del punto 6, en la que el lípido neutro está seleccionado de DSPC, DPPC, POPC, DOPE o SM; el lípido capaz de reducir la agregación es un lípido de PEG; y la partícula de lípido comprende además un esteroles.
- 35 8. La partícula de lípido de uno cualquiera de los puntos 6 y 7, en la que el lípido catiónico está presente en un porcentaje en moles del 20 % al 60 %; el lípido neutro está presente en un porcentaje en moles de 5 % al 25 %; el esteroles está presente en un porcentaje en moles de 25 % al 55 %; y el lípido de PEG es PEG-DMA, PEG-DMG, o una combinación de los mismos, y está presente en un porcentaje en moles del 0,5 % al 15 %.
- 40 9. La partícula de lípido de cualquiera de los puntos 6 a 8, que comprende además un agente activo, seleccionado de un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulante, un ARNip, un oligonucleótido antisentido, un microARN, un antagomir, un aptámero y una ribozima.
10. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de lípido de uno cualquiera de los puntos 6 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 11. La partícula de lípido de uno cualquiera de los puntos 6 a 9 para su uso en un método de modulación de la expresión de un gen diana en una célula.

12. La composición farmacéutica del punto 10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión en exceso de un polipéptido en un sujeto, en la que el agente activo es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ARNip, un microARN y un oligonucleótido antisentido, y en la que el ARNip, microARN o oligonucleótido antisentido incluye un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

13. La composición farmacéutica del punto 10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por subexpresión de un polipéptido en un sujeto, en la que el agente activo es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.

14. La composición farmacéutica del punto 10 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, en la que el agente activo es un oligonucleótido inmunoestimulante.

15. La composición farmacéutica para el uso del punto 14, en la que el gen diana está seleccionado del grupo que consiste en factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen de ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen de ciclina A, gen de ciclina E, gen WNT-1, gen de beta-catenina, gen c-MET, gen PKC, gen NFkB, gen STAT3, gen de survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen de la topoisomerasa I, gen de la topoisomerasa II alfa, gen p73, gen p21(WAF1/CIP1), gen p27 (KIP 1), gen PPM ID, gen RAS, gen de caveolina I, gen MIB I, gen MTAI, gen M68, genes supresores de tumor y genes supresores de tumor p53.

Las figuras muestran:

20 La Figura 1 es un gráfico de la concentración de un lípido catiónico (Compuestos 1-3 y lípido de referencia) en el hígado de ratones con el tiempo, después de la administración del lípido catiónico en una partícula de lípido como se describe en el Ejemplo 14.

La Figura 2 muestra la vía metabólica esperada para los compuestos 1 y 3 del Ejemplo 14.

25 La Figura 3 es un gráfico de la concentración de un lípido catiónico (Compuestos 1-3 y lípido de referencia) en el bazo de ratones con el tiempo, después de la administración del lípido catiónico en una partícula de lípido como se describe en el Ejemplo 14.

La Figura 4 es un gráfico de la concentración de un lípido catiónico (Compuestos 1-3 y lípido de referencia) en el plasma de ratones con el tiempo, después de la administración del lípido catiónico en una partícula de lípido como se describe en el Ejemplo 14.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a una partícula de lípido que incluye un lípido neutro, un lípido capaz de reducir la agregación, un lípido catiónico, y opcionalmente un esteroles. En ciertas realizaciones, la partícula de lípido incluye además un agente activo (por ejemplo, un agente terapéutico). Diversas realizaciones a modo de ejemplo de estos lípidos, partículas de lípido y composiciones que comprenden las mismas, y su uso para administrar agentes terapéuticos y modular la expresión génica y de proteínas, se describen en más detalle a continuación.

El lípido catiónico

Según la presente invención, el lípido catiónico es un compuesto de fórmula IB. La siguiente divulgación representa diversas realizaciones de un compuesto de fórmula IB.

En una realización, M^1 y M^2 son cada uno, independientemente:

40 $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-SC(O)-$, $-C(O)S-$, $-OC(S)-$, $-C(S)O-$, $-S-S-$, $-C(R^5)=N-$, $-N=C(R^5)-$, $-C(R^5)=N-O-$, $-O-N=C(R^5)-$, $-C(O)(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-C(S)(NR^5)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$, $-OC(O)O-$, $-OSi(R^5)_2O-$, $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$ o $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$.

En otra realización, M^1 y M^2 son cada uno, independientemente:

45 $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-C(R^5)=N-$, $-N=C(R^5)-$, $-C(R^5)=N-O-$, $-O-N=C(R^5)-$, $-O-C(O)O-$, $-C(O)N(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-C(O)S-$, $-SC(O)-$, $-C(S)O-$, $-OC(S)-$, $-OSi(R^5)_2O-$, $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$ o $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$.

En otra realización más, M^1 y M^2 son cada uno, independientemente:

$-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(R^5)=N-$, $-C(R^5)=N-O-$, $-O-C(O)O-$, $-C(O)N(R^5)-$, $-C(O)S-$, $-C(S)O-$, $-OSi(R^5)_2O-$, $-C(O)(CR^3R^4)C(O)O-$ o $-OC(O)(CR^3R^4)C(O)-$.

En otra realización, M^1 y M^2 son cada uno $-C(O)O-$.

5 En una realización, R^1 y R^2 son cada uno, individualmente, alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, cicloalquilalquilo o heterociclo. En una realización, R^1 es alquilo y R^2 es alquilo, cicloalquilo o cicloalquilalquilo. En una realización, R^1 y R^2 son cada uno, individualmente, alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_4 , tal como metilo, etilo o isopropilo). En una realización, R^1 y R^2 son ambos metilo. En otra realización, R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, N-metilpiperazinilo).

En una realización, R' es hidrógeno o alquilo. En otra realización, R' es hidrógeno o metilo. En una realización, R' está ausente. En una realización, R' está ausente o es metilo.

10 Para compuestos en los que R' no está ausente, el átomo de nitrógeno al que R' está unido lleva una carga positiva, y el compuesto también contiene un contraión negativamente cargado. El contraión puede ser cualquier anión, tal como un anión orgánico o inorgánico. Ejemplos adecuados de aniones incluyen, pero no se limitan a, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, α -glicerofosfato, haluro (por ejemplo, cloruro), sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. En una realización, el contraión es un haluro (por ejemplo, Cl).

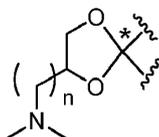
15 Según la presente invención, cada R es, independientemente, $-(CR^3R^4)-$, en la que R^3 y R^4 son cada uno, independientemente, H o alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_4). Por ejemplo, en una realización cada R es, independientemente, $-(CHR^4)-$, en la que cada R^4 es, independientemente H o alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_4). En otra realización, cada R es, independientemente, $-CH_2-$, $-C(CH_3)_2-$ o $-CH(iPr)-$ (donde iPr es isopropilo). En otra realización, cada R es $-CH_2-$.

20 Según la presente invención, R^5 es, en cada caso, hidrógeno o metilo. Por ejemplo, R^5 puede ser, en cada caso, hidrógeno.

En una realización, Q está ausente, es $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^4)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-S-S-$, $-OC(O)O-$, $-C(R^5)=N-O-$, $-OC(O)N(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)O-$, $-C(O)S-$, $-C(S)O-$ o $-C(R^5)=N-O-C(O)-$. En una realización, Q es $-C(O)O-$.

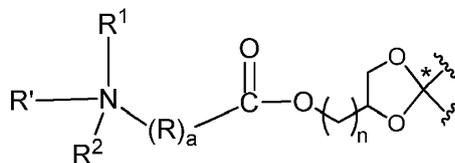
25 En una realización, Q^1 y Q^2 están cada uno, independientemente, ausentes o son $-O-$. Por ejemplo, en una realización, Q^1 y Q^2 están cada uno ausentes. En otra realización, Q^1 y Q^2 son cada uno $-O-$.

En una realización, la línea discontinua a Q está ausente, b es 0 y $R'R^1R^2N-(R)_a Q-$ y el carbono terciario adyacente a él (C^*) forma el siguiente grupo:



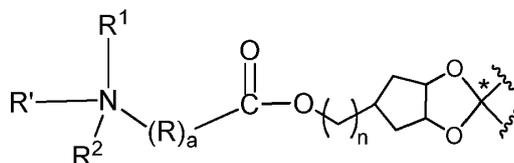
30 donde n es 1 a 4 (por ejemplo, n es 2).

En una realización, la línea discontinua a Q está ausente, b es 0 y $R'R^1R^2N-(R)_a Q-$ y el carbono terciario adyacente a él forma el siguiente grupo:



35 donde n es 1 a 4 (por ejemplo, n es 2), y R^1 , R^2 , R , a , y b son como se definen con respecto a la fórmula (I). En una realización, a es 3.

En una realización, la línea discontinua a Q está ausente, b es 0 y $R'R^1R^2N-(R)_a Q-$ y el carbono terciario adyacente a él forma el siguiente grupo:



40 En el presente documento se describe un lípido catiónico que tiene un grupo de cabeza, una o más colas hidrófobas, y un conector entre el grupo de cabeza y la una o más colas. El grupo de cabeza puede incluir una amina; por

ejemplo, una amina que tiene un pK_a deseado. El pK_a puede influirse por la estructura del lípido, particularmente la naturaleza del grupo de cabeza; por ejemplo, la presencia, ausencia y localización de grupos funcionales tales como grupos funcionales aniónicos, grupos funcionales donantes de enlaces de hidrógeno, grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, grupos hidrófobos (por ejemplo, grupos alifáticos), grupos hidrófilos (por ejemplo, hidroxilo o metoxi), o grupos arilo. La amina del grupo de cabeza puede ser una amina catiónica; una amina primaria, secundaria o terciaria; el grupo de cabeza puede incluir un grupo amina (monoamina), dos grupos amina (diamina), tres grupos amina (triamina), o un número mayor de grupos amina, como en una oligoamina o poliamina. El grupo de cabeza puede incluir un grupo funcional que es menos fuertemente básico que una amina, tal como, por ejemplo, un imidazol, una piridina, o un grupo guanidinio. El grupo de cabeza puede ser de ión bipolar. También son adecuados otros grupos de cabeza.

La una o más colas hidrófobas pueden incluir dos cadenas hidrófobas, que pueden ser iguales o diferentes. Las colas pueden ser alifáticas, por ejemplo, pueden estar compuestas de carbono e hidrógeno, tanto saturadas como insaturadas, pero sin anillos aromáticos. Las colas pueden ser colas de ácido graso. Algunos de tales grupos incluyen octanilo, nonanilo, decilo, laurilo, miristilo, palmitilo, estearilo, α -linoleilo, estearidonilo, linoleilo, γ -linolenilo, araquidonilo y oleilo. También son adecuadas otras colas hidrófobas.

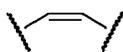
El conector puede incluir, por ejemplo, un conector de glicérido, un conector de análogo de glicérido acíclico, o un conector cíclico (incluyendo un espiroconector, un conector bicíclico y un conector policíclico). El conector puede incluir grupos funcionales tales como un éter, un éster, un fosfato, un fosfonato, un fosforotioato, un sulfonato, un disulfuro, un acetal, un cetel, una imina, una hidrazona o una oxima. También son adecuados otros conectores y grupos funcionales.

En una realización, el lípido catiónico es una mezcla racémica. En otra realización, el lípido catiónico está enriquecido en un diaestereómero, por ejemplo el lípido catiónico tiene al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 80 % o al menos el 70 % de exceso diaestereomérico. En otra realización más, el lípido catiónico está enriquecido en un enantiómero, por ejemplo el lípido tiene al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 80 % o al menos el 70 % de exceso enantiomérico. En otra realización más, el lípido catiónico es quiralmente puro, por ejemplo es un único isómero óptico. En otra realización más, el lípido catiónico está enriquecido en un isómero óptico.

Donde está presente un doble enlace (por ejemplo, un doble enlace carbono-carbono o doble enlace carbono-nitrógeno), puede haber isomería en la configuración alrededor del doble enlace (es decir, isomería en cis/trans o E/Z). Donde la configuración de un doble enlace se ilustra en una estructura química, se entiende que el isómero correspondiente también puede estar presente. La cantidad de isómero presente puede variar, dependiendo de las estabildades relativas de los isómeros y la energía requerida para convertir entre los isómeros. Por consiguiente, algunos dobles enlaces están presentes, para fines prácticos, en solo una única configuración, mientras que otros (por ejemplo, donde las estabildades relativas son similares y la energía de conversión baja) pueden estar presentes como mezcla en equilibrio inseparable de configuraciones.

En algunos casos, una insaturación de doble enlace puede sustituirse por una insaturación cíclica. La insaturación cíclica puede ser una insaturación cicloalifática, por ejemplo, un grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. En algunos casos, el grupo cíclico puede ser un grupo policíclico, por ejemplo, un grupo bicíclico o grupo tricíclico. Un grupo bicíclico puede estar unido por puente, condensado o tener una estructura espiro.

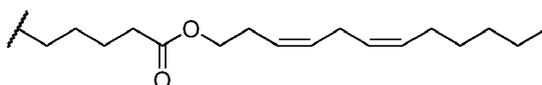
En algunos casos, un resto de doble enlace puede sustituirse con un resto ciclopropilo, por ejemplo,



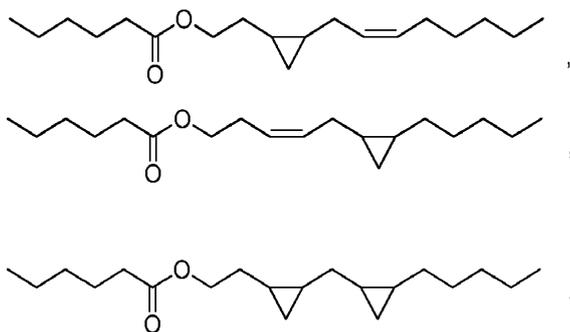
puede sustituirse con



Por ejemplo, el resto mostrado a continuación tiene dos dobles enlaces carbono-carbono, cada uno de los cuales puede sustituirse independientemente con un resto cíclico, por ejemplo, un resto ciclopropilo. Así, sustitutos de:

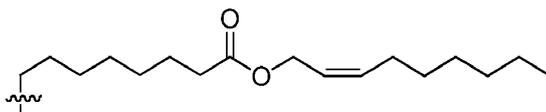


pueden incluir:

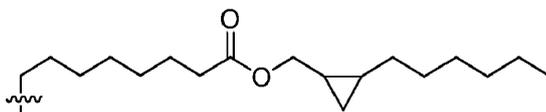


y

5 Para ejemplo adicional, sustitutos de

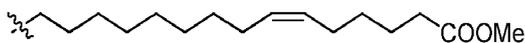


incluyen:



Para ejemplo adicional, sustitutos de

10

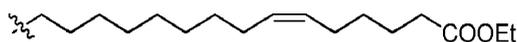


incluyen:

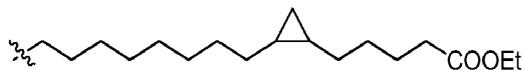


Para ejemplo adicional, sustitutos de

15



incluyen:

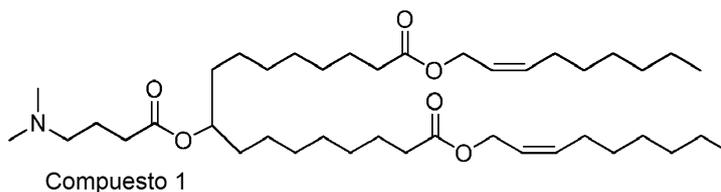


20

El lípido catiónico incluye uno o más grupos biodegradables. El (Los) grupo(s) biodegradable(s) incluyen uno o más enlaces que pueden experimentar reacciones de rotura de enlaces en un entorno biológico, por ejemplo, en un organismo, órgano, tejido, célula u orgánulo. Grupos funcionales que contienen un enlace biodegradable incluyen, por ejemplo, ésteres, ditioles y oximas. La biodegradación puede ser un factor que influye en la eliminación del compuesto del cuerpo cuando se administra a un sujeto. La biodegradación puede medirse en un ensayo basado en célula, donde una formulación que incluye un lípido catiónico se expone a células, y se toman muestras en diversos momentos de tiempo. Las fracciones de lípido pueden extraerse de las células y separarse y analizarse por CL-EM. De los datos de CL-EM, pueden medirse las velocidades de biodegradación (por ejemplo, como valores de $t_{1/2}$).

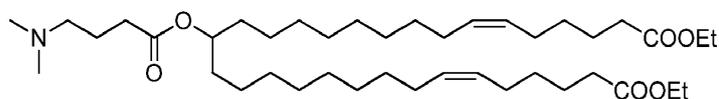
25

Por ejemplo, el compuesto



incluye un enlace éster en cada cadena alifática, que puede experimentar hidrólisis en un entorno biológico, por ejemplo, cuando se expone a, por ejemplo, una lipasa o una esterasa. La estructura del compuesto, por supuesto,

influye en la velocidad a la que el compuesto experimenta la biodegradación. Así, cabría esperar que un compuesto relacionado tal como



Compuesto 2

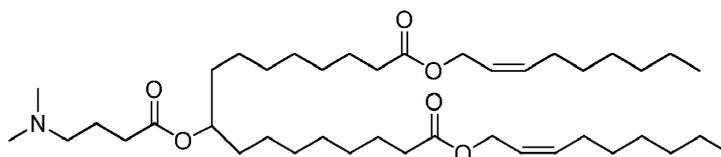
5 presentara una velocidad diferente de biodegradación. Cabría esperar mayores efectos sobre esa velocidad de cambios en la estructura del compuesto en el sitio de hidrólisis. Una modificación que puede influir en la velocidad de hidrólisis, y así influir en la tasa de biodegradación y eliminación del cuerpo de un sujeto, es hacer que el grupo saliente de la reacción de hidrólisis tenga un alcohol primario, en vez de secundario.

Por ejemplo, sin desear quedar ligado a teoría, los Compuestos 1 y 2 mostrados anteriormente pueden ser metabolizados como se muestra en la Figura 2.

10 En una realización, un lípido catiónico de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento tiene una semivida *in vivo* ($t_{1/2}$) (por ejemplo, en el hígado, bazo o plasma) inferior a aproximadamente 3 horas, tal como inferior a aproximadamente 2,5 horas, inferior a aproximadamente 2 horas, inferior a aproximadamente 1,5 horas, inferior a aproximadamente 1 hora, inferior a aproximadamente 0,5 horas o inferior a aproximadamente 0,25 horas.

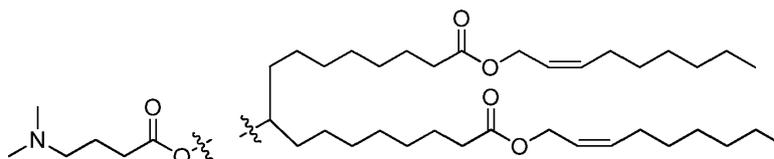
15 En otra realización, un lípido catiónico de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento que contiene un grupo biodegradable o grupos tiene una semivida *in vivo* ($t_{1/2}$) (por ejemplo, en el hígado, bazo o plasma) inferior a aproximadamente el 10 % (por ejemplo, inferior a aproximadamente el 7,5 %, inferior a aproximadamente el 5 %, inferior a aproximadamente el 2,5 %) de aquella para el mismo lípido catiónico sin el grupo biodegradable o grupos.

20 Algunos lípidos catiónicos pueden ser convenientemente representados como un grupo hidrófobo combinado con un grupo de cabeza. A modo de ejemplo, el compuesto:



Compuesto 1

puede ser considerado como una combinación de un grupo de cabeza y un grupo hidrófobo del siguiente modo:



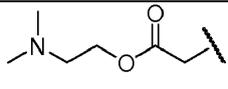
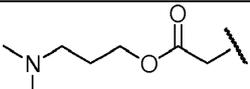
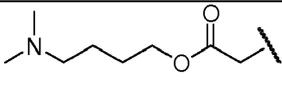
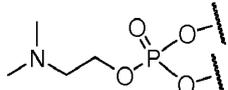
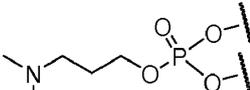
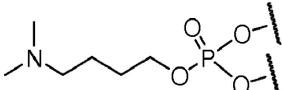
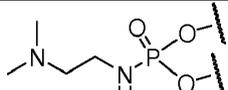
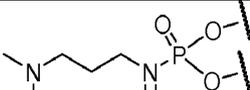
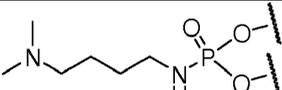
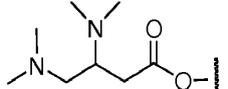
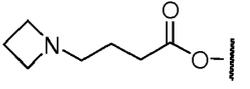
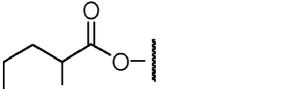
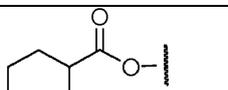
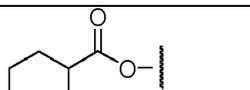
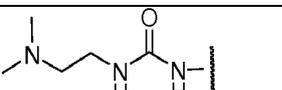
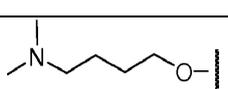
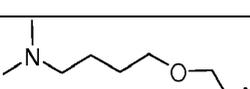
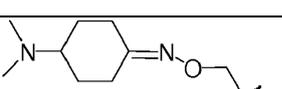
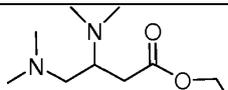
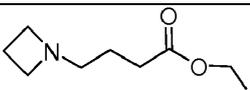
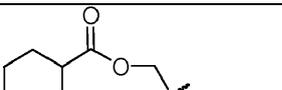
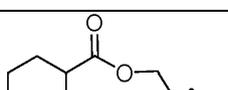
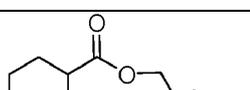
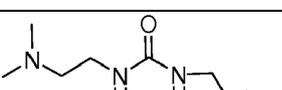
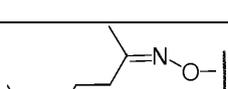
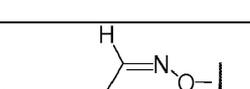
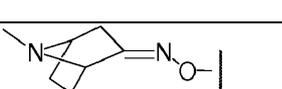
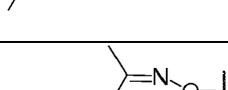
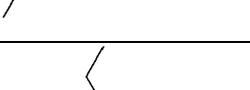
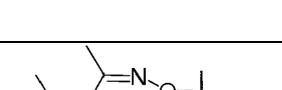
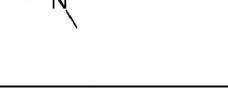
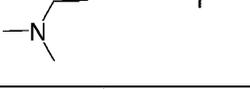
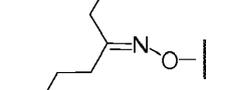
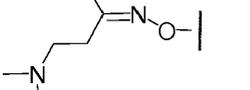
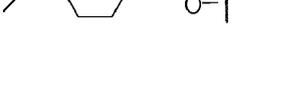
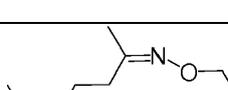
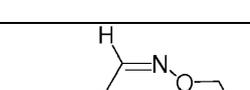
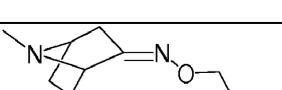
Grupo de cabeza

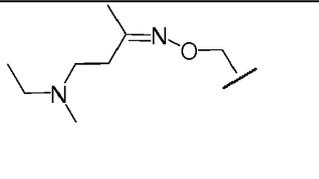
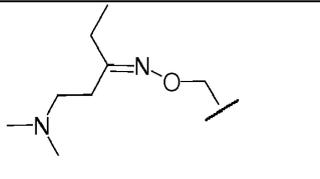
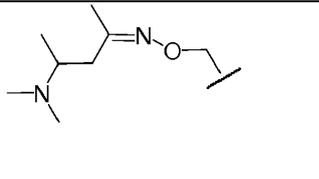
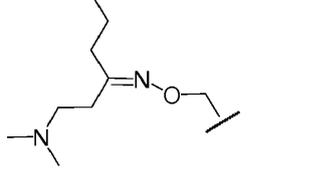
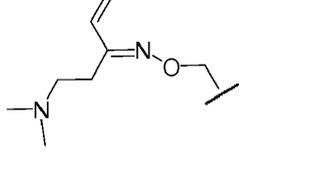
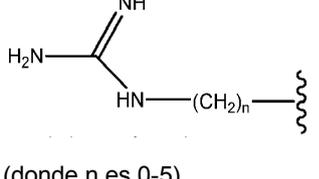
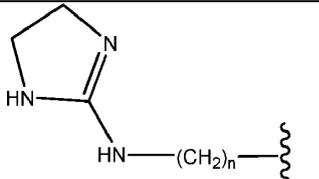
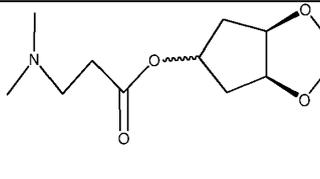
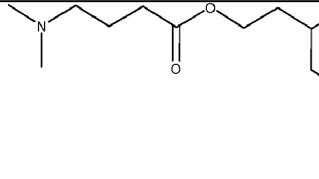
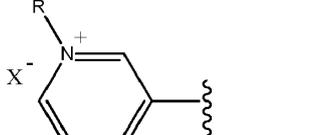
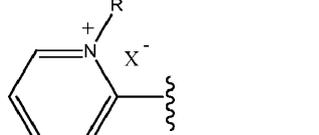
Grupo hidrófobo

Así, algunos grupos de cabeza adecuados incluyen aquellos representados en la Tabla 1:

25

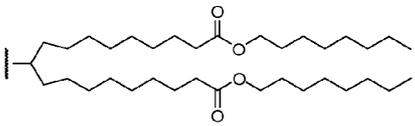
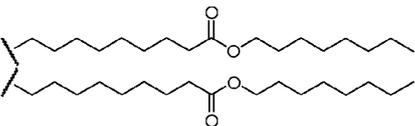
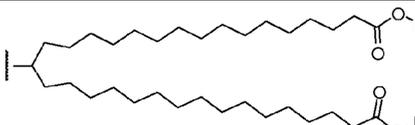
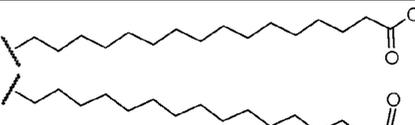
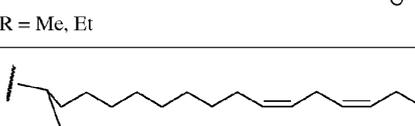
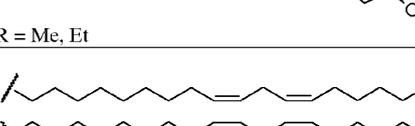
TABLA 1

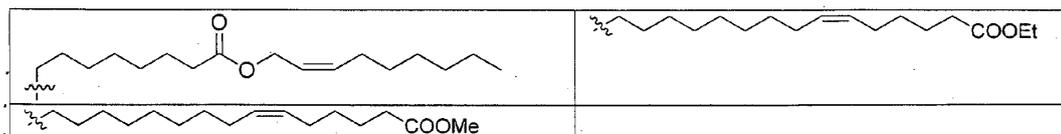
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		
		

		
		 (donde n es 0-5)
 (donde n es 0-5)	 (el carbono con un asterisco es el carbono terciario del lípido catiónico y no es parte del grupo de cabeza)	 (el carbono con un asterisco es el carbono terciario del lípido catiónico y no es parte del grupo de cabeza)
 R = H, alquilo (por ejemplo, metilo) X = halógeno (por ejemplo, Cl)	 R = H, alquilo (por ejemplo, metilo) X = halógeno (por ejemplo, Cl)	 R = H, alquilo (por ejemplo, metilo) X = halógeno (por ejemplo, Cl)

Algunos grupos de cola hidrófobos adecuados incluyen aquellos representados en la Tabla 2:

TABLA 2

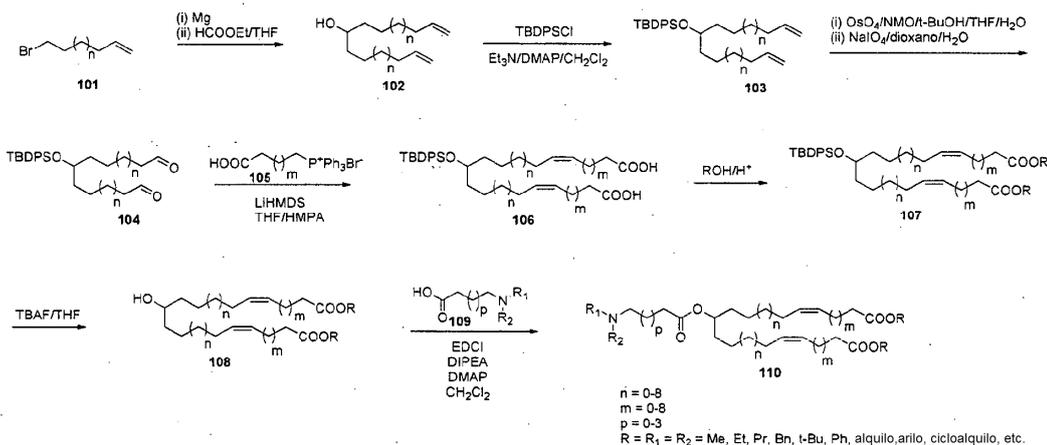
	
 R = Me, Et	 R = Me, Et
 R = Me, Et	 R = Me, Et



En el presente documento se describe un método de preparación de un compuesto de cualquiera de las fórmulas I-XXIII. Métodos sintéticos a modo de ejemplo adecuados se ilustran en los Esquemas A-G a continuación. Las variables en los siguientes esquemas son las mismas que aquellas variables en la misma posición en las fórmulas I-XXIII anteriores.

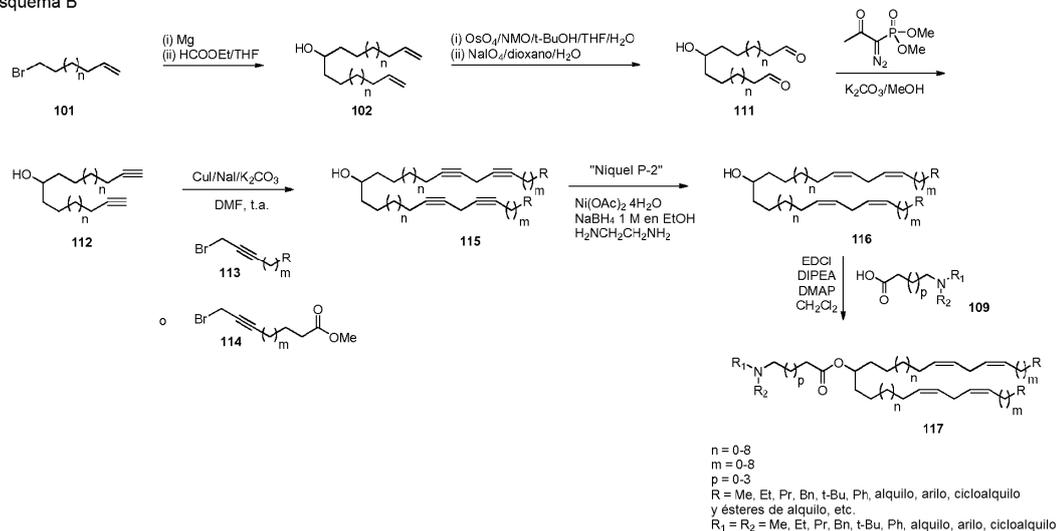
5

Esquema A



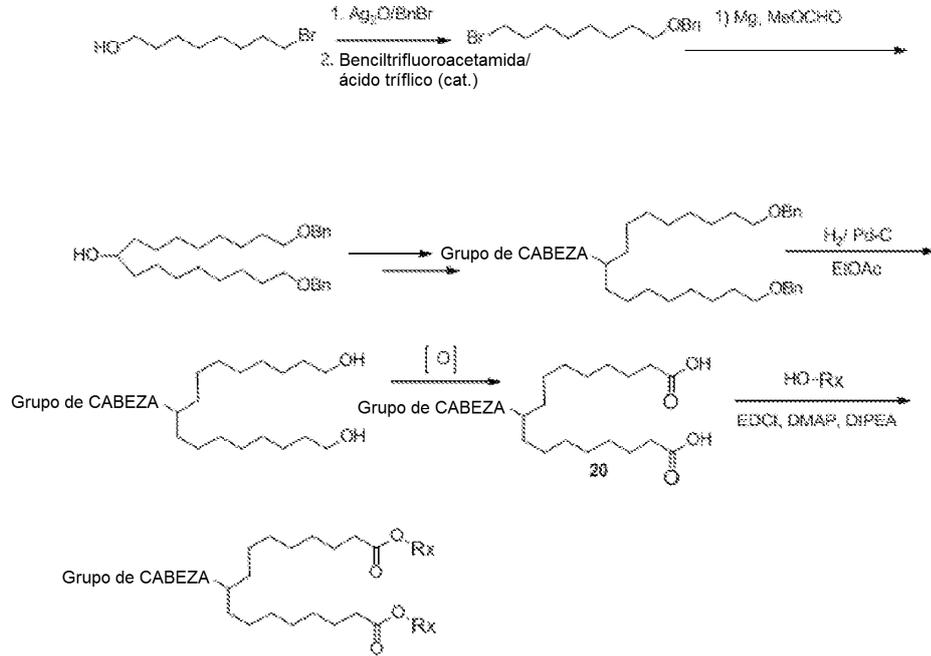
Pueden variarse la longitud de cadena del lípido y la longitud del conector en el Esquema A. Adicionalmente, pueden derivatizarse el grupo R en la funcionalidad éster y sustituyentes en el átomo de nitrógeno.

Esquema B



10 Como se muestra en el Esquema B, el acoplamiento mediado por cobre proporciona una cadena de lípido que contiene di-ino con grupos funcionales terminales R, que pueden reducirse para generar cadenas de lípido que contiene di-eno. Pueden variarse la longitud del conector y la cadena de lípido, y pueden derivatizarse los grupos sustituyentes funcionales (R, R₁, R₂).

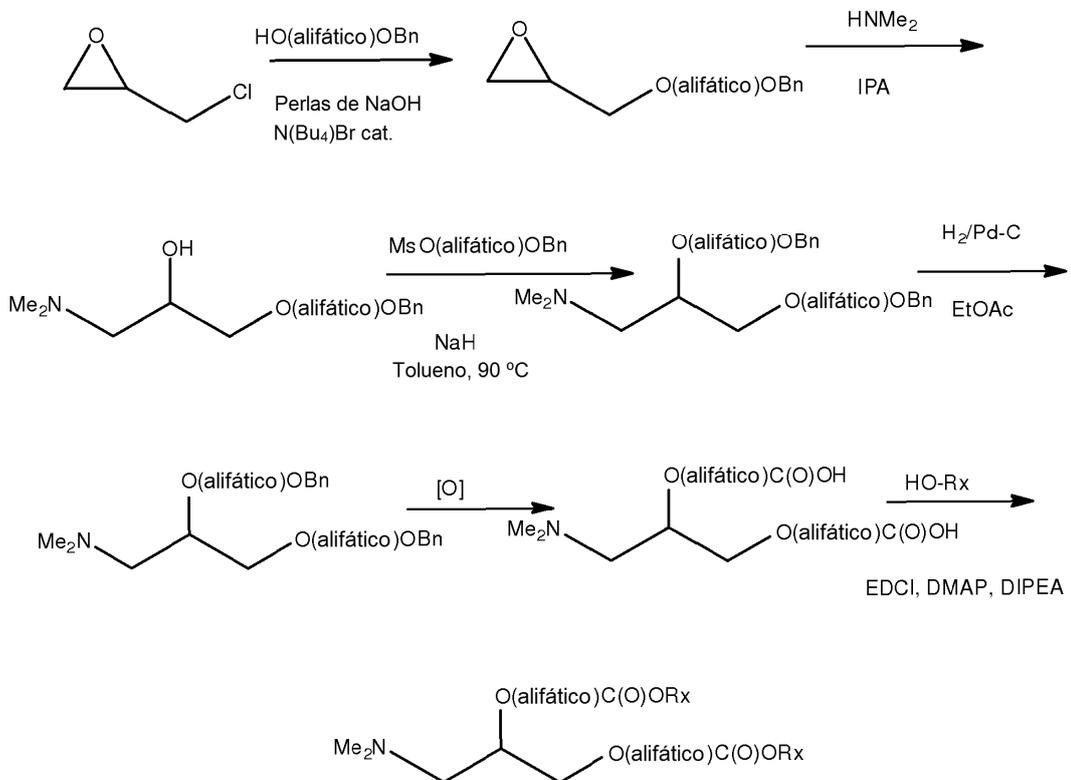
Esquema C



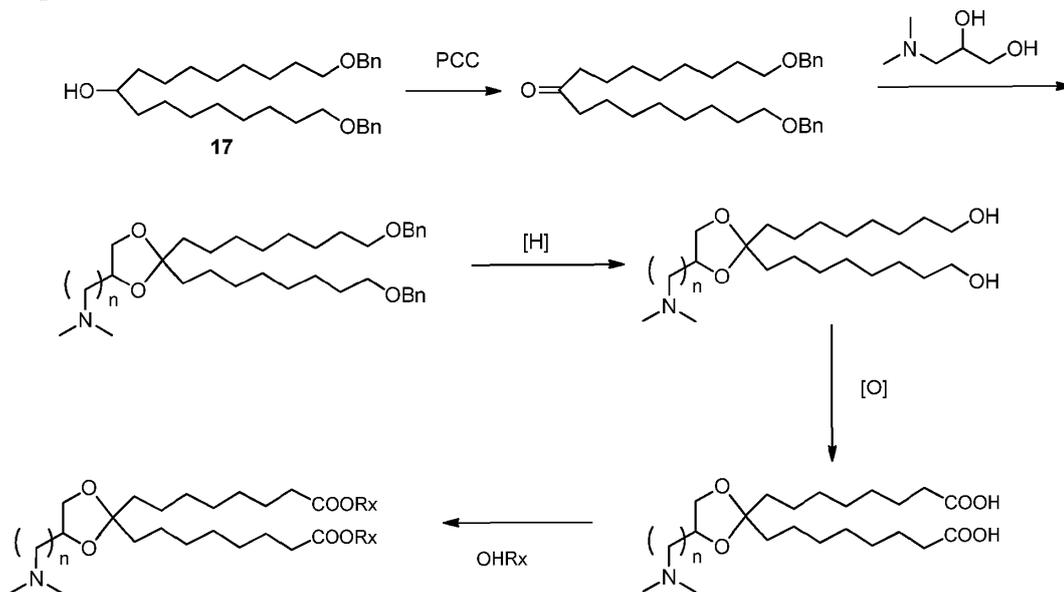
donde Rx es alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo o arilo sustituido, y el grupo de cabeza se define en la Tabla 1.

5 El grupo de cabeza en el Esquema C puede ser cualquier grupo de cabeza desvelado en el presente documento (véase, por ejemplo, la Tabla 1).

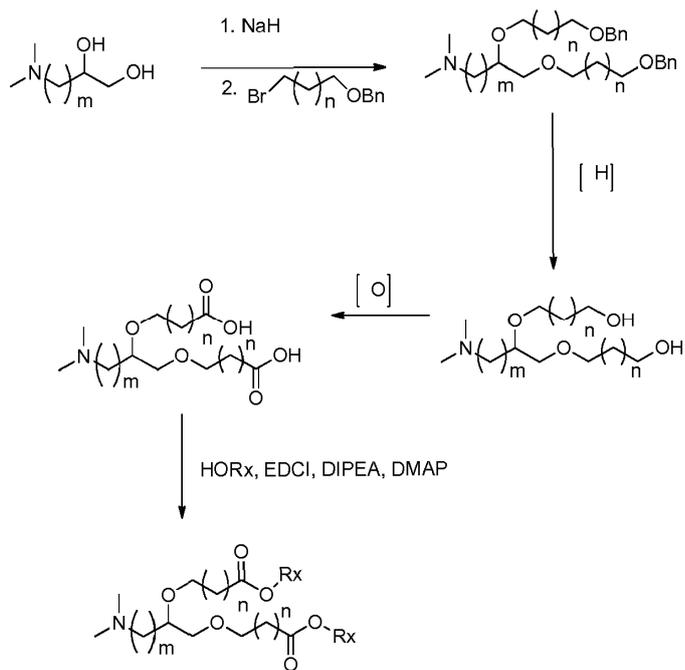
Esquema D



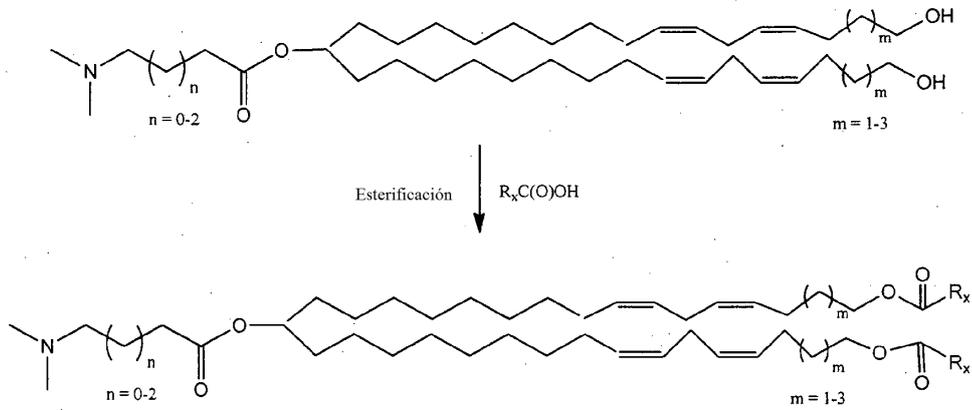
Esquema E



Esquema F



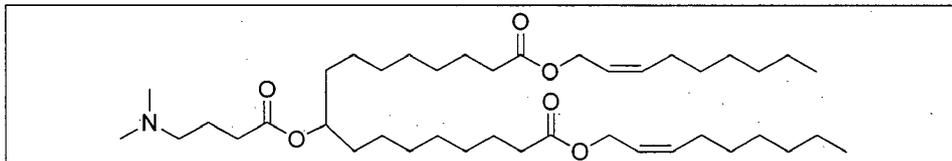
Esquema G

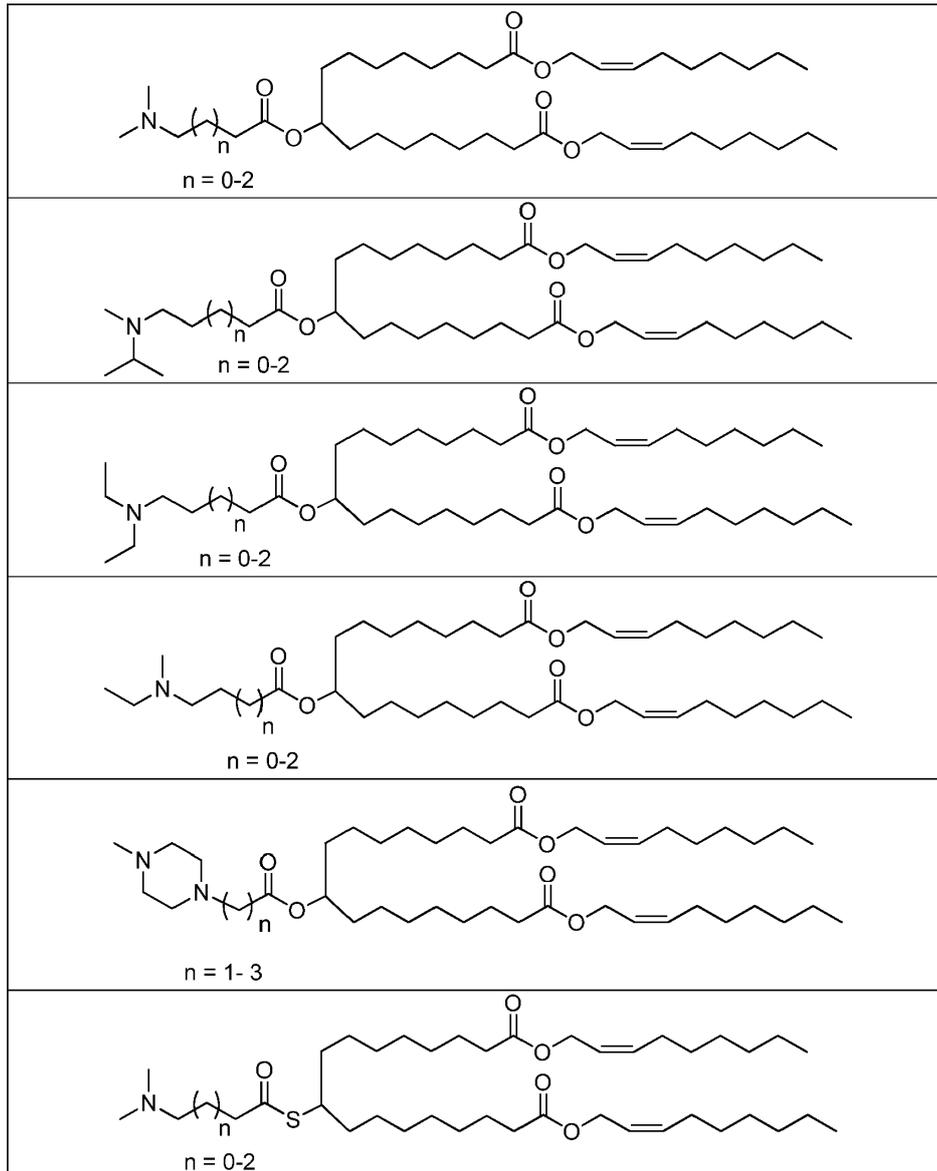


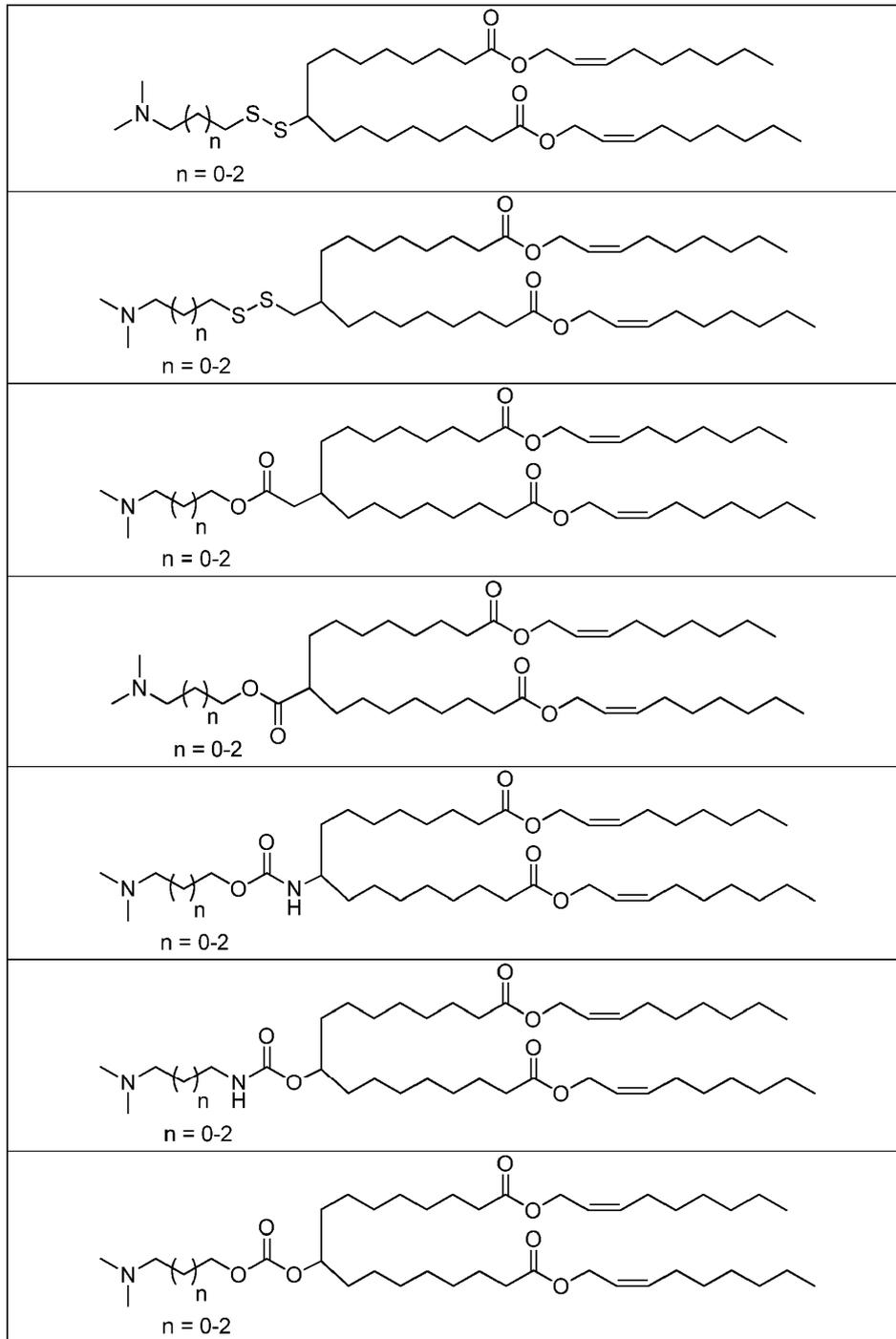
Ejemplos de lípidos catiónicos descritos en el presente documento incluyen aquellos mostrados en las Tablas 3-13 a continuación, y sales de los mismos (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de los mismos).

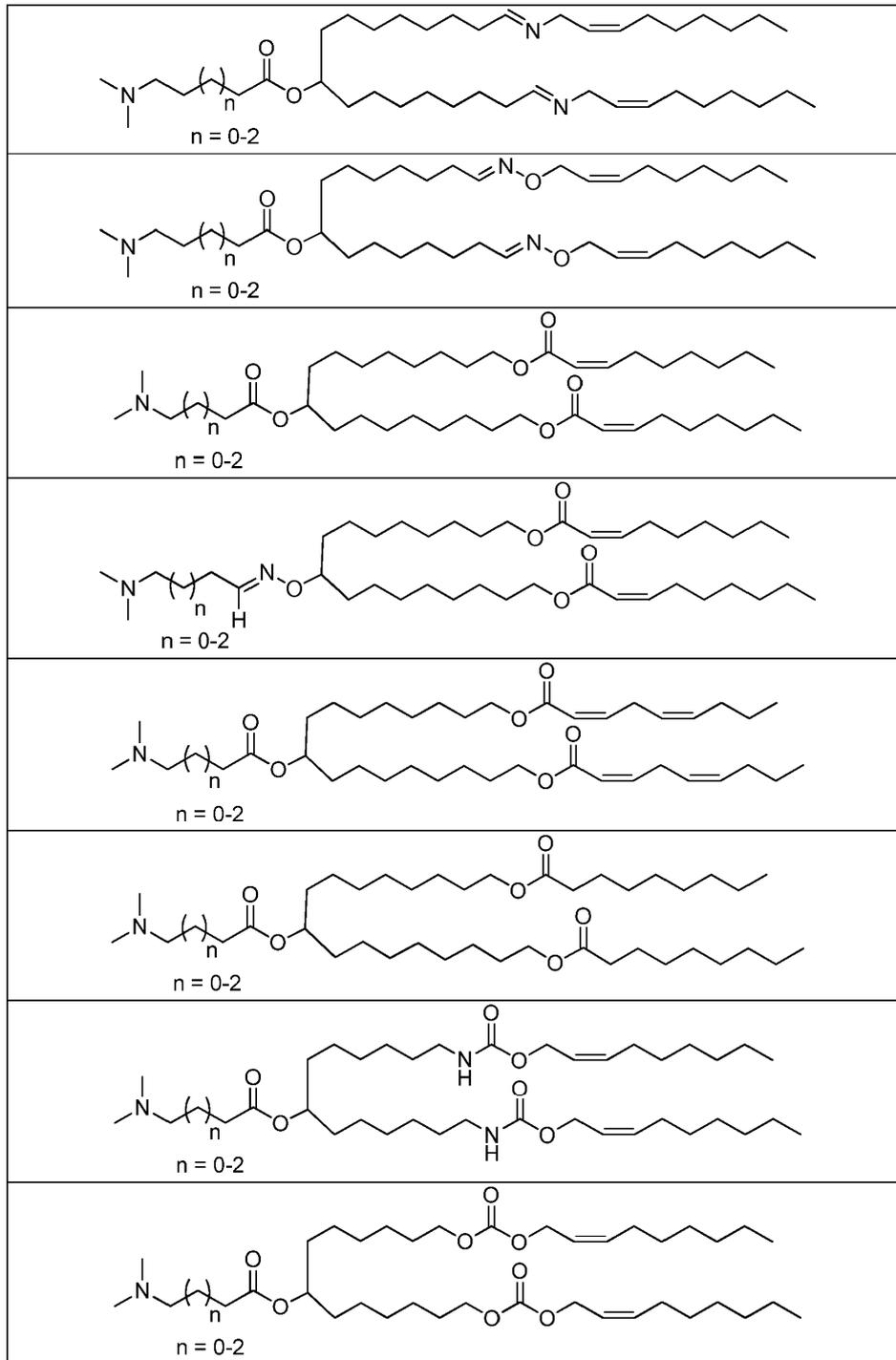
TABLA 3

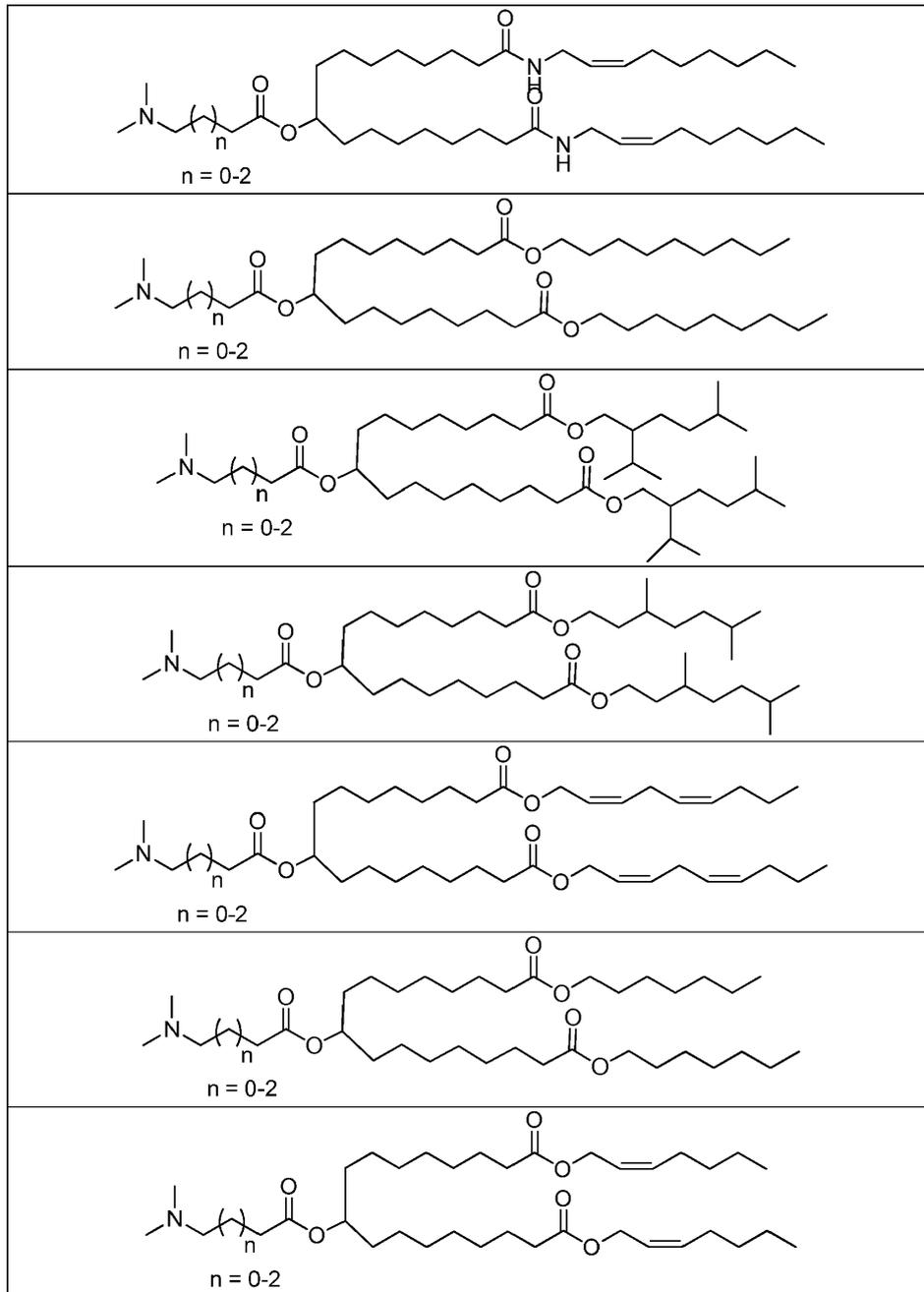
TABLA 4

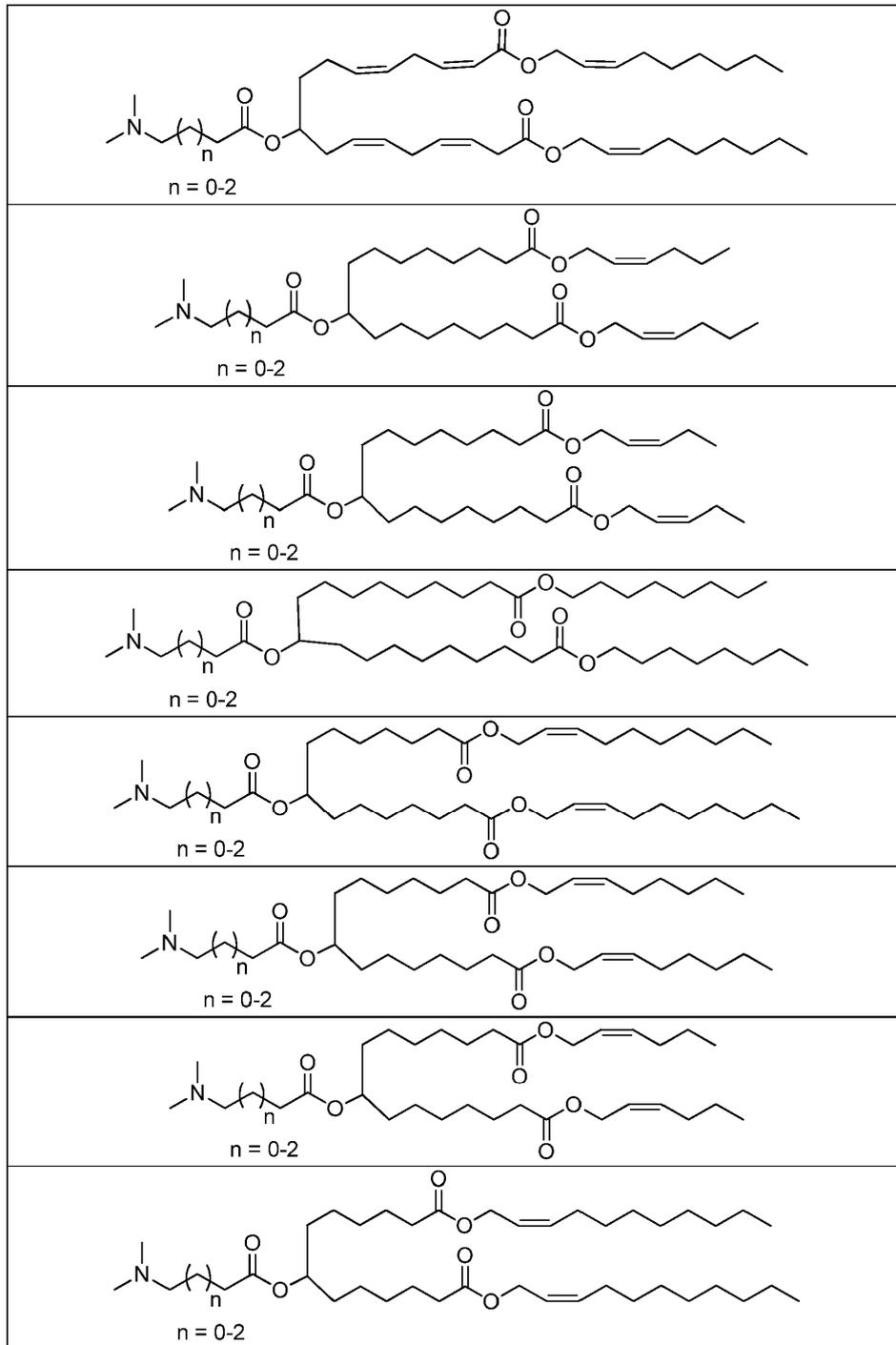


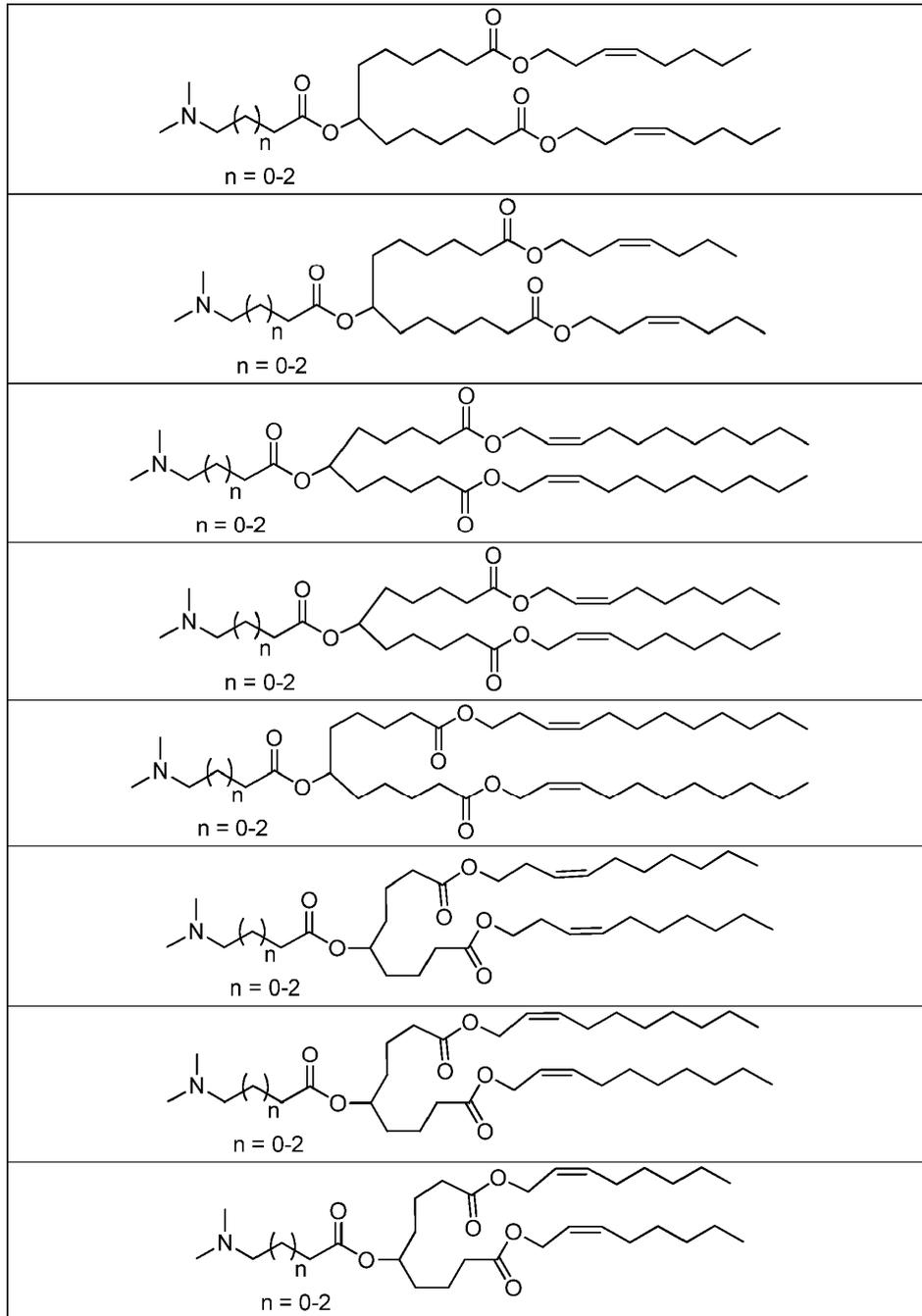


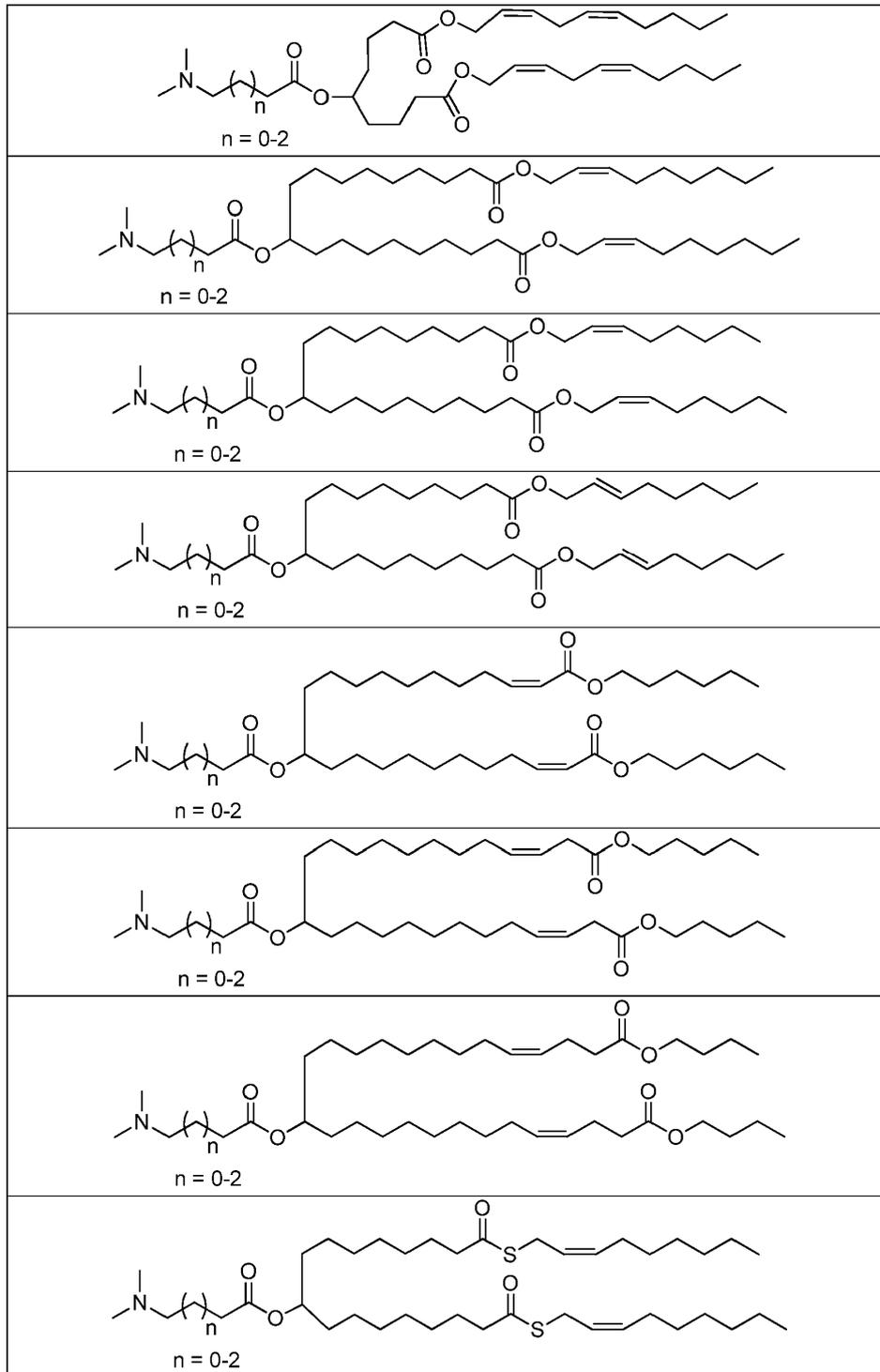


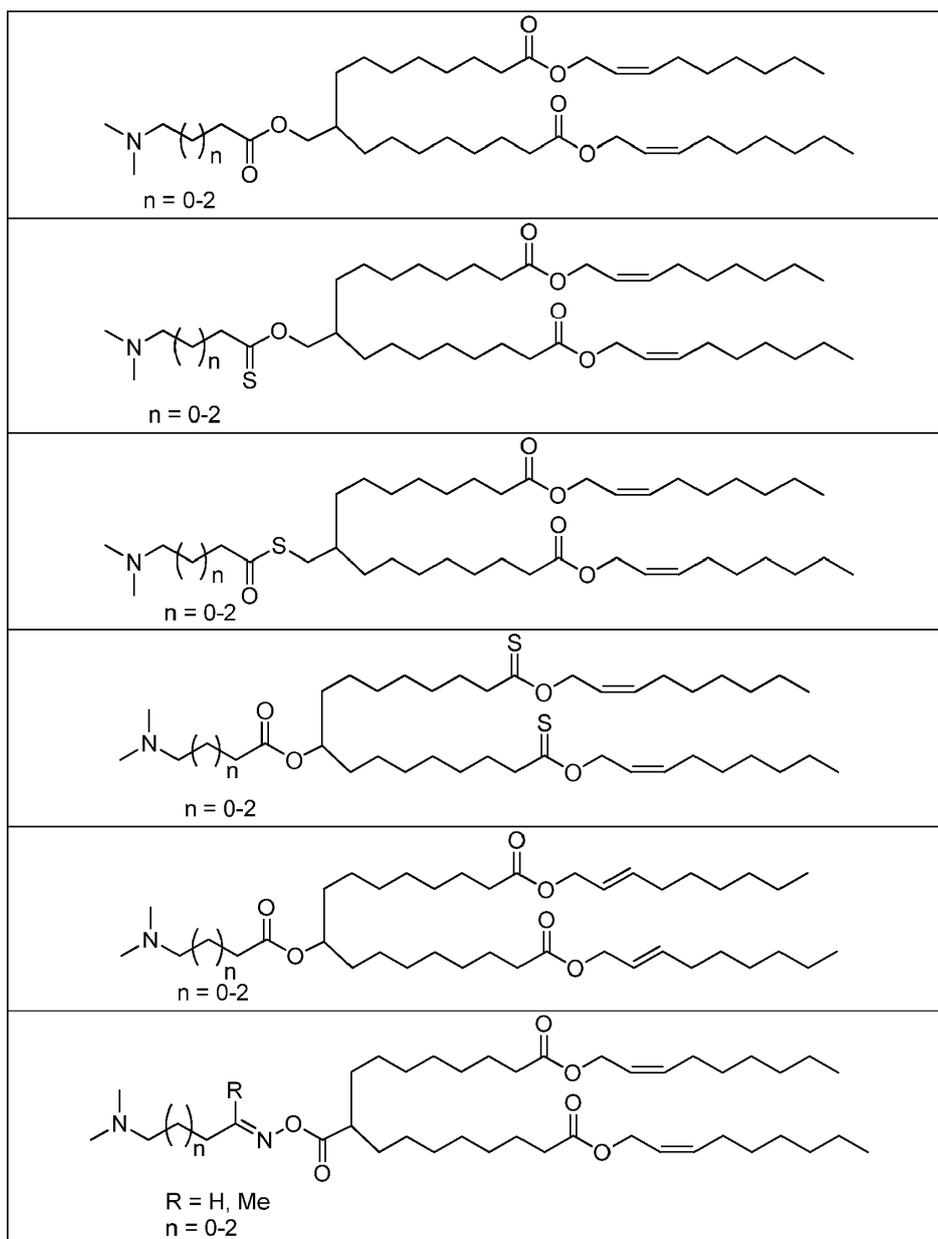


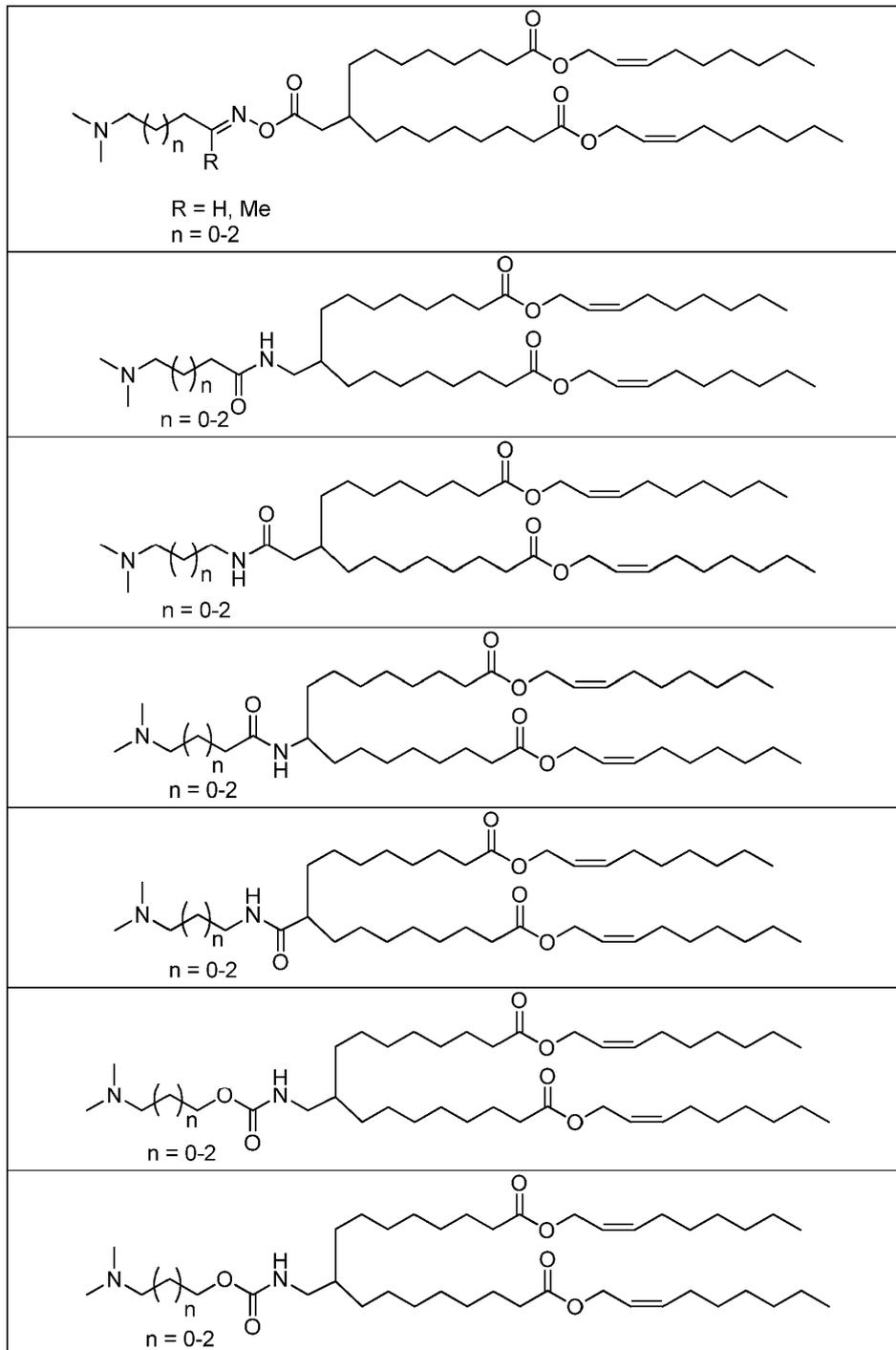


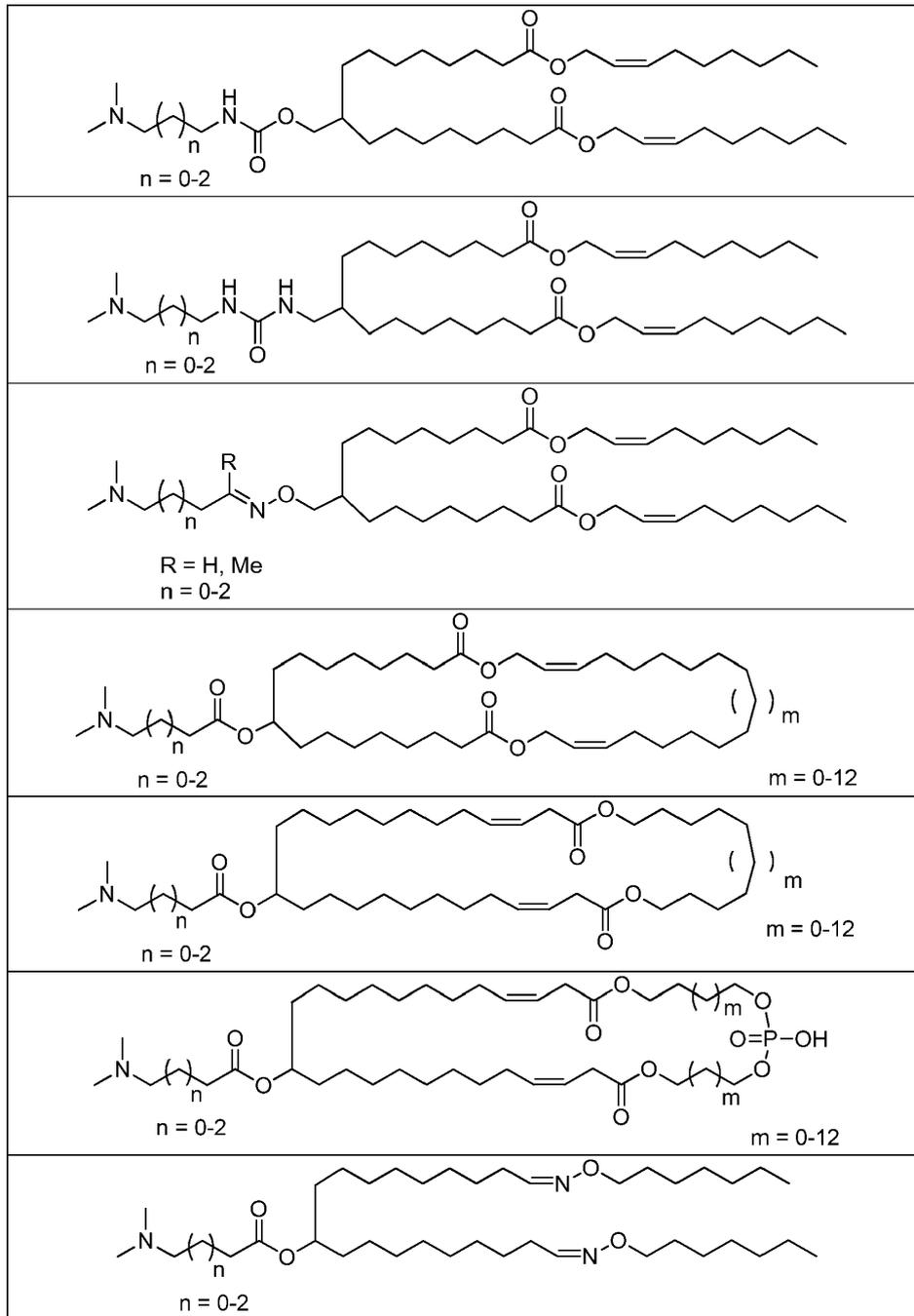


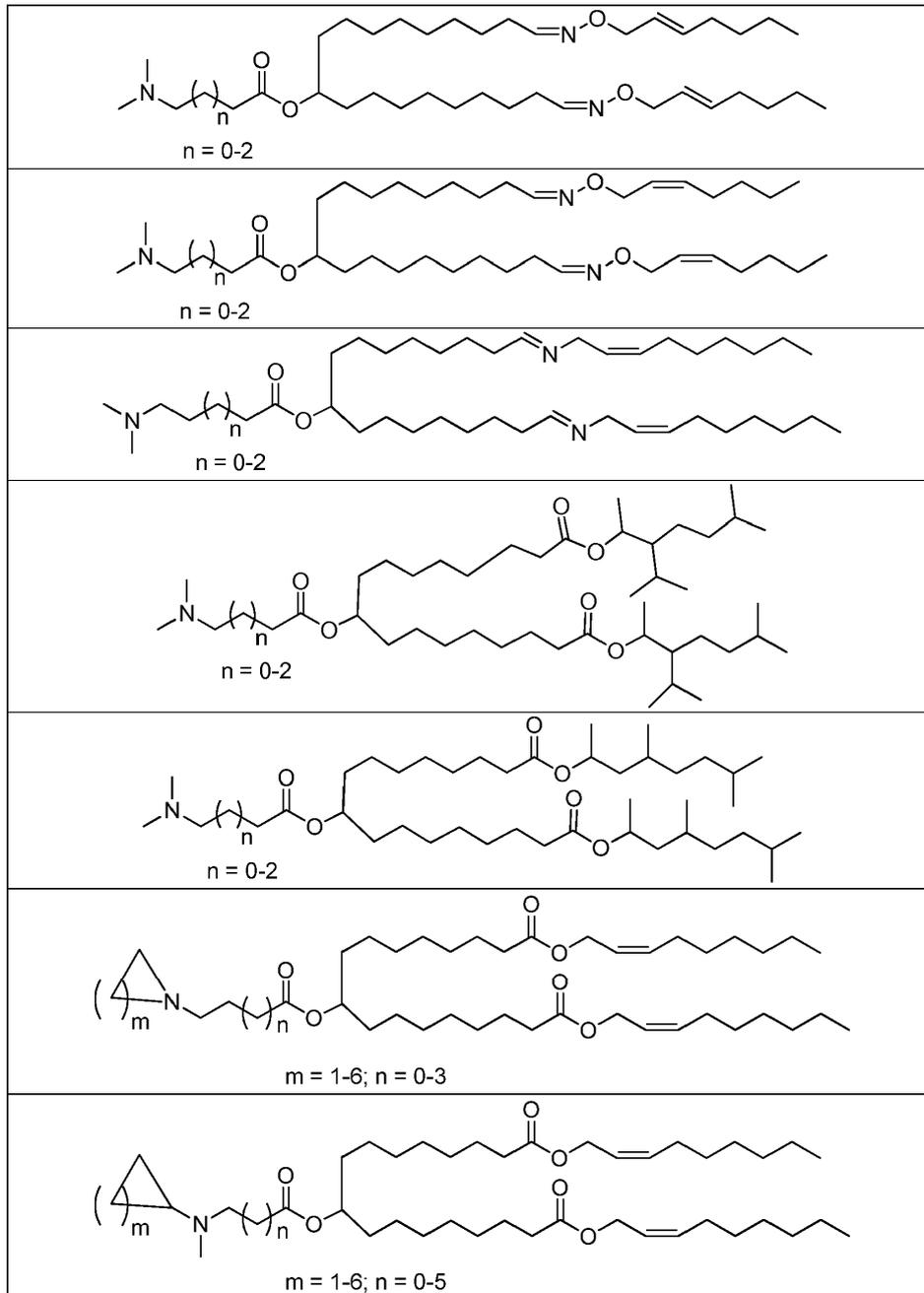


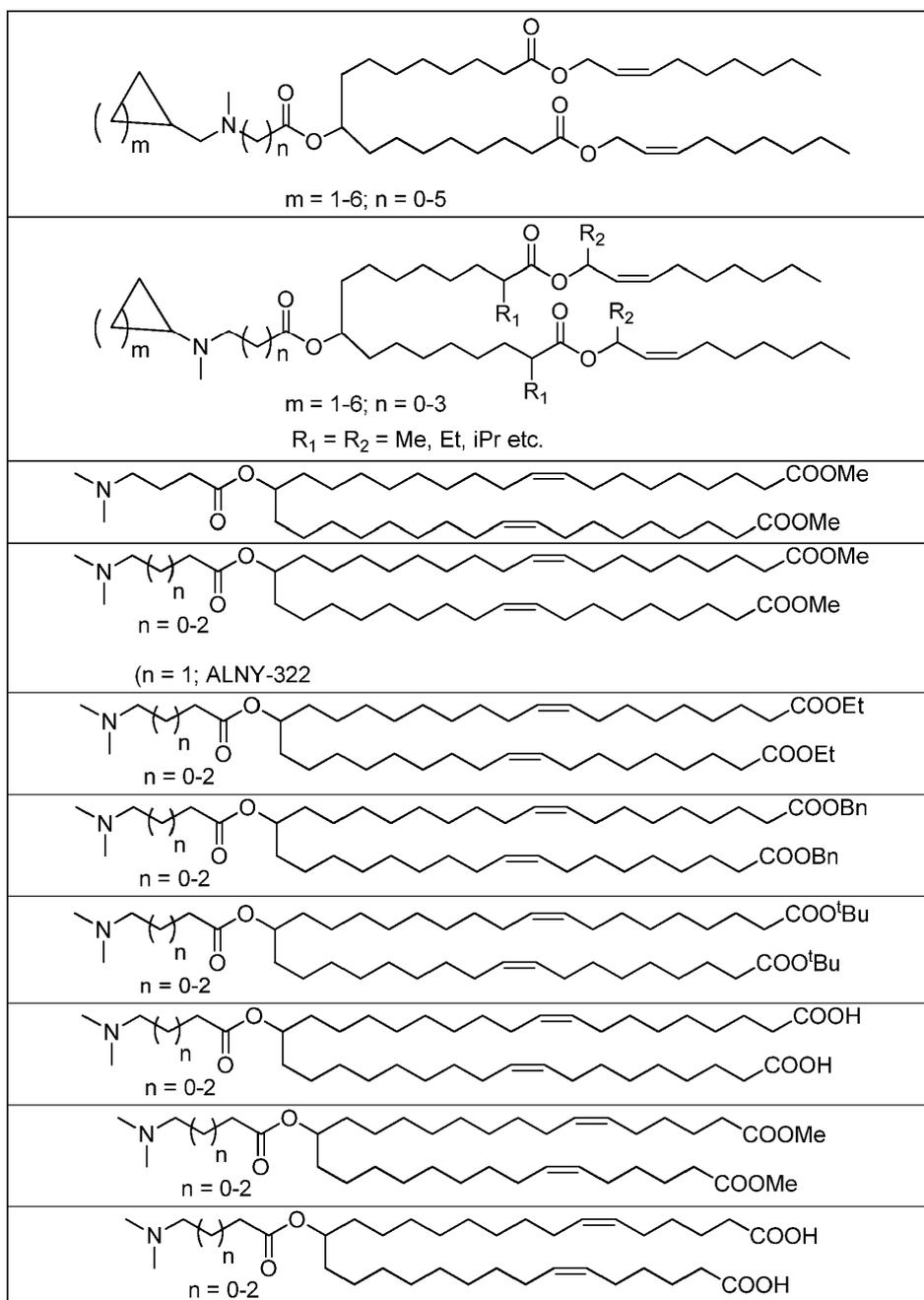


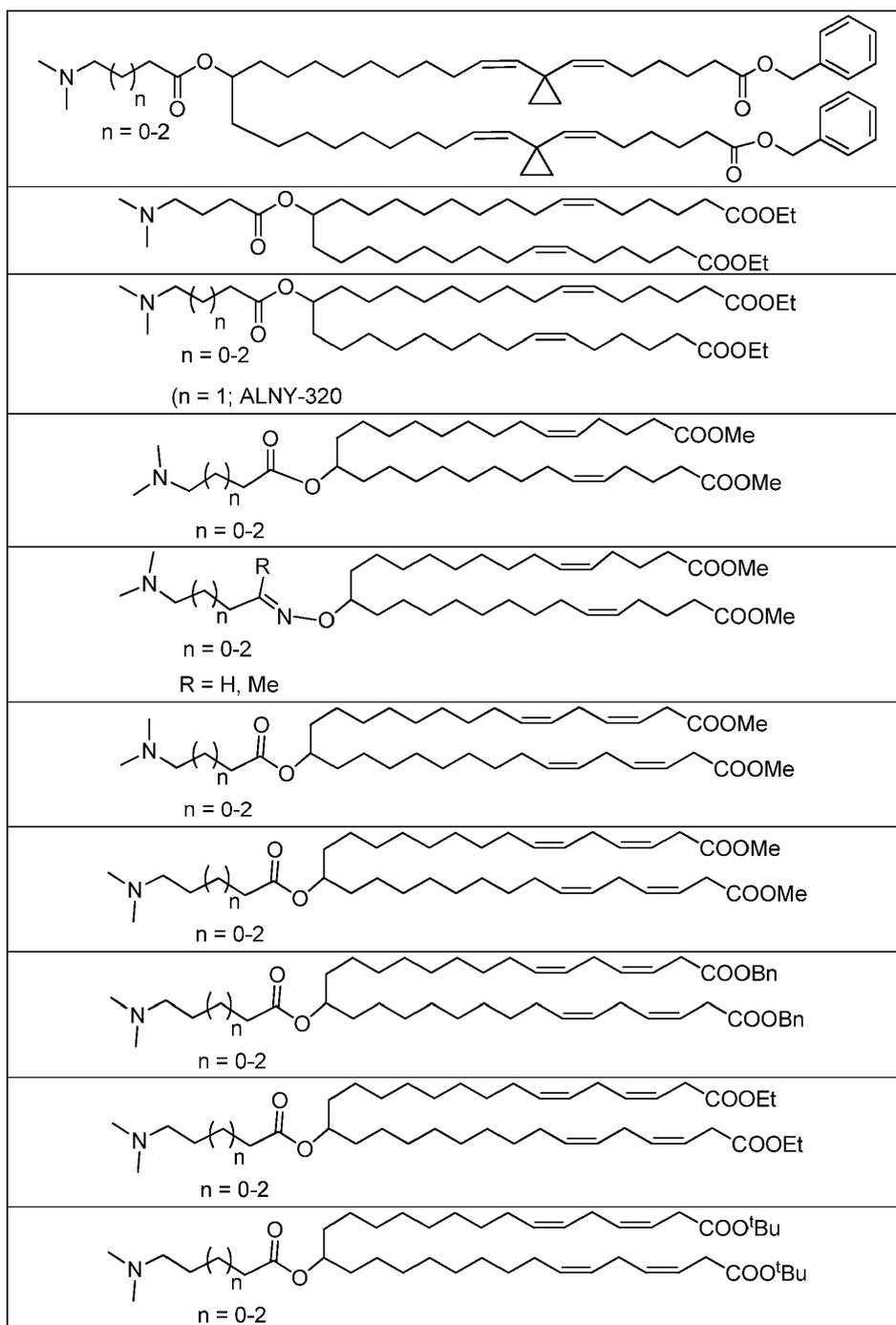


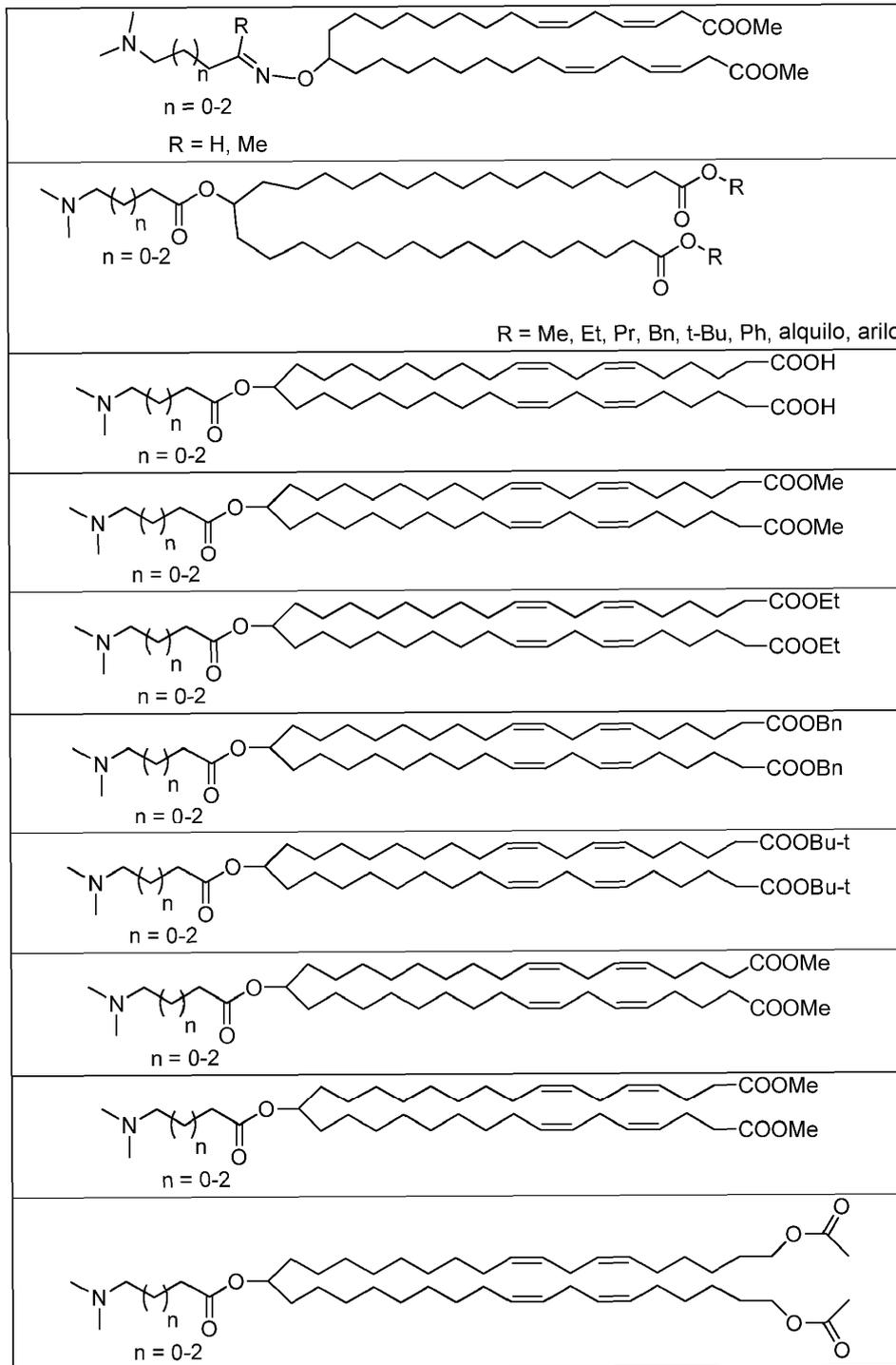


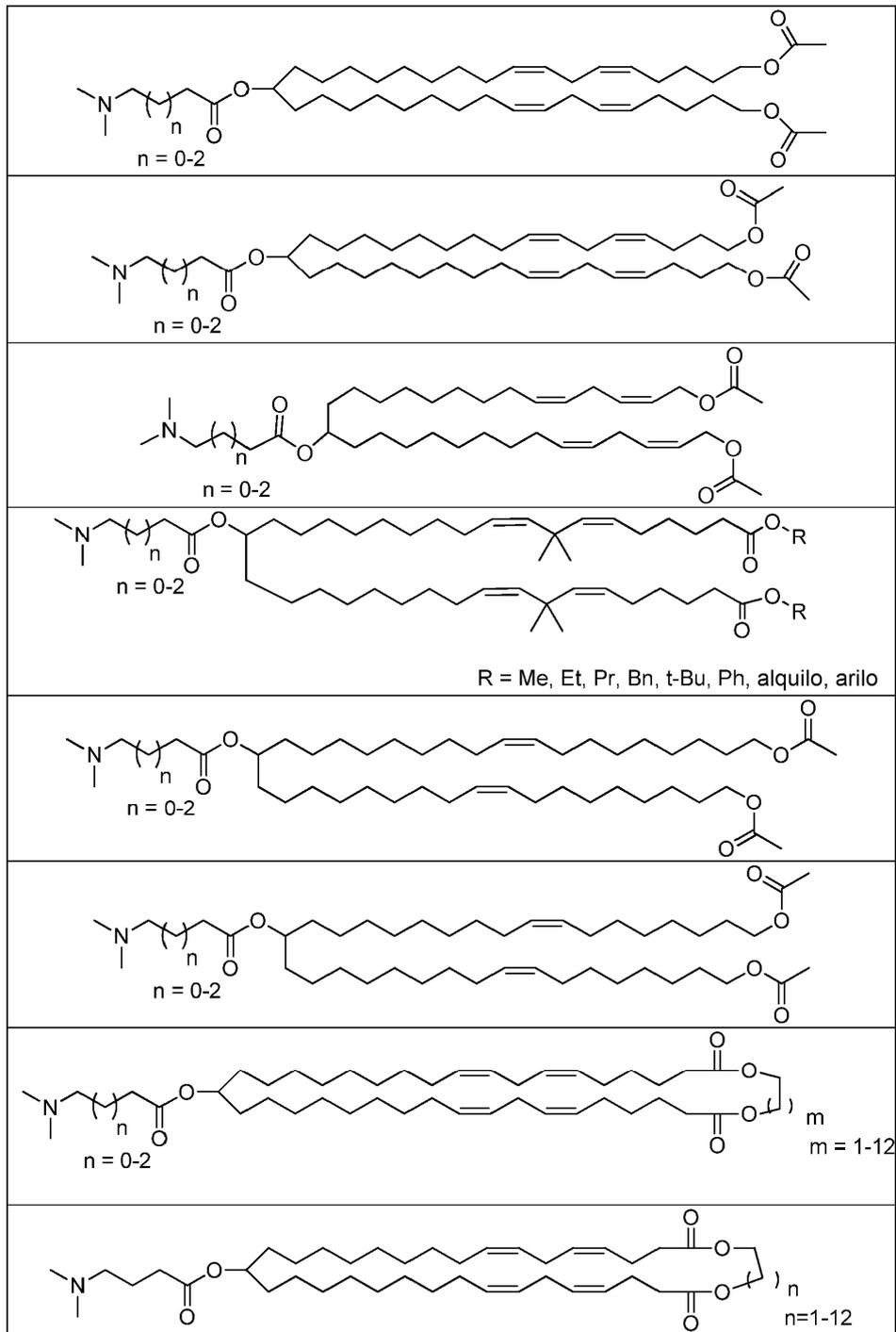


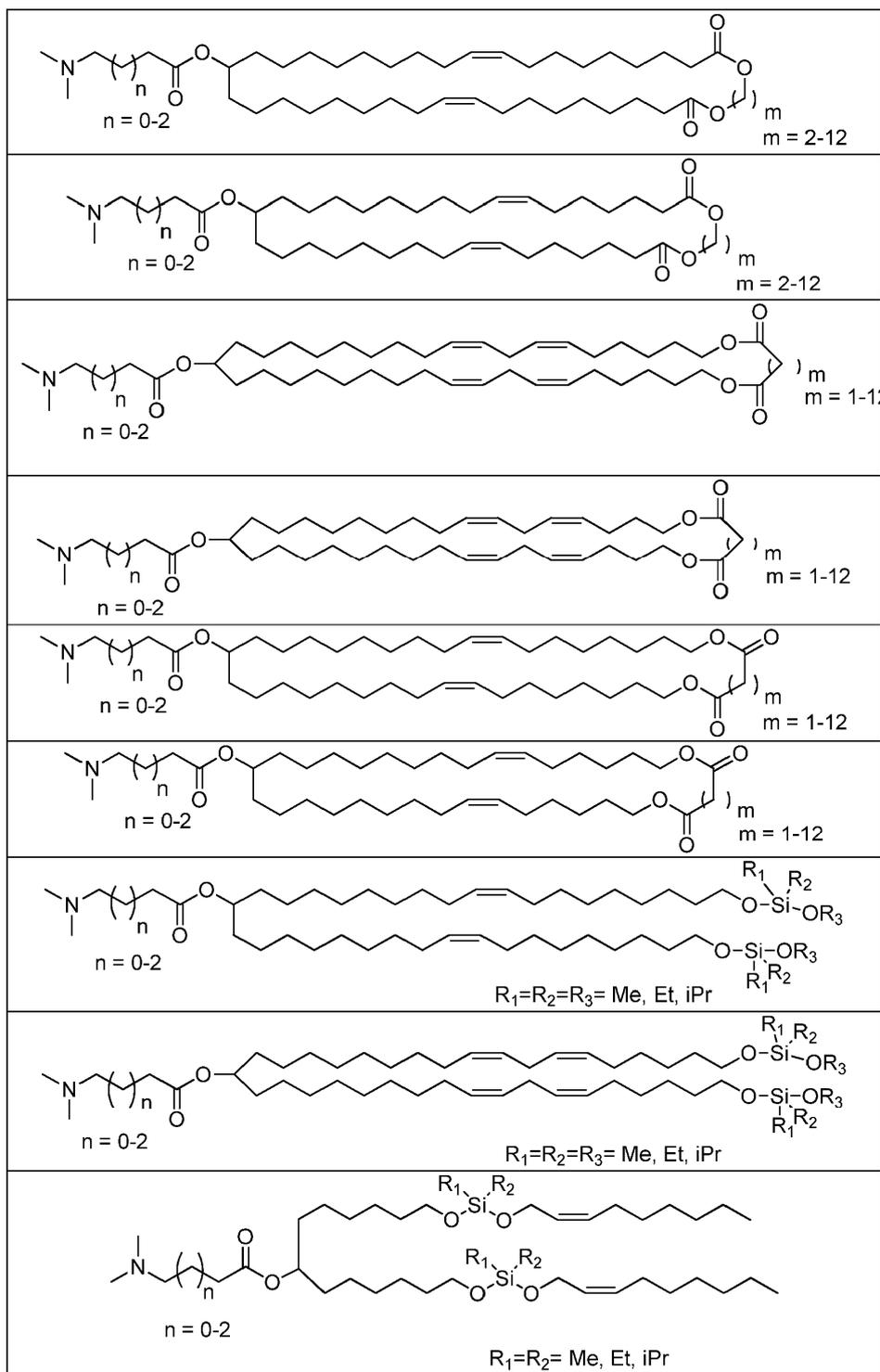


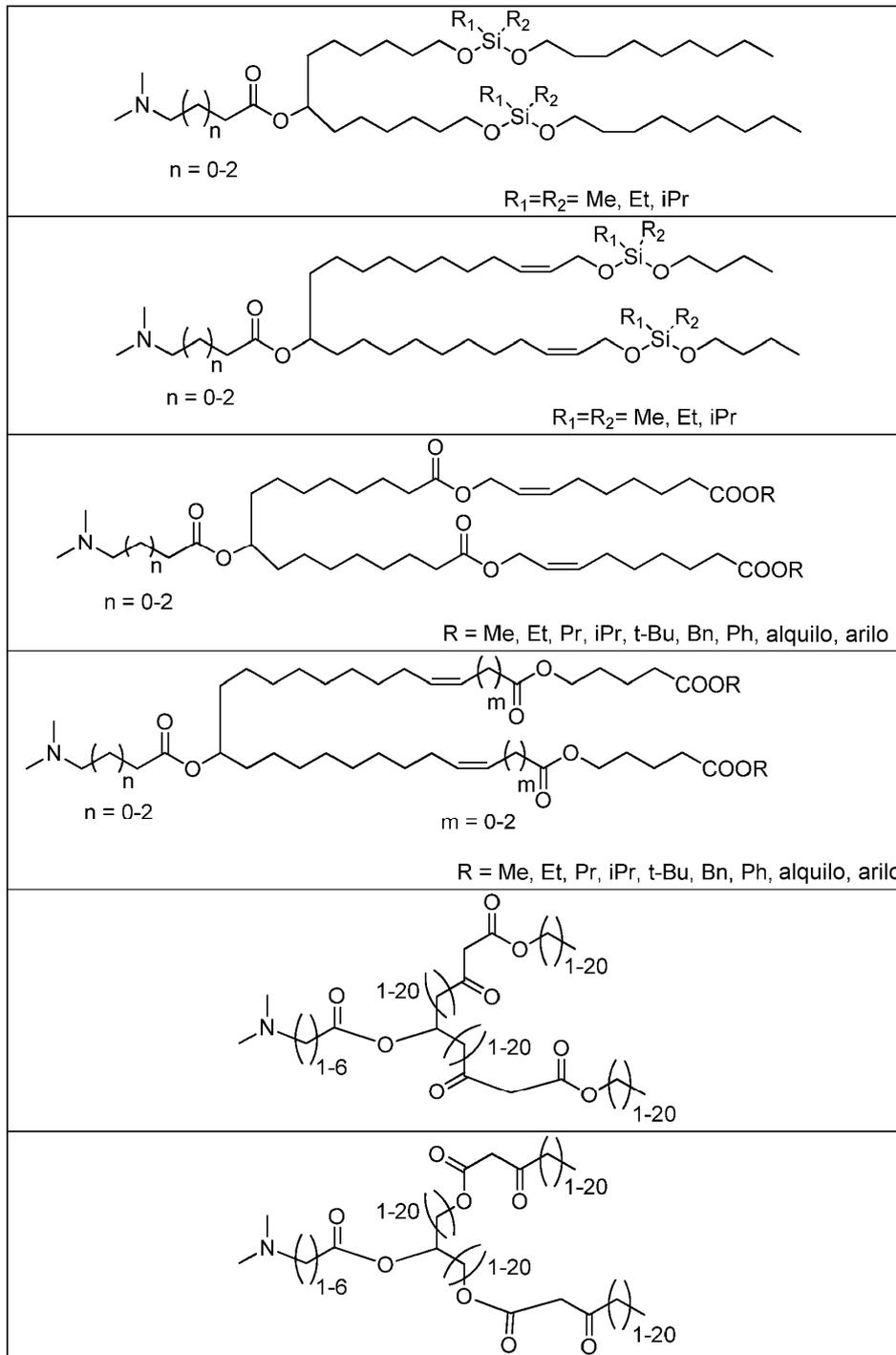












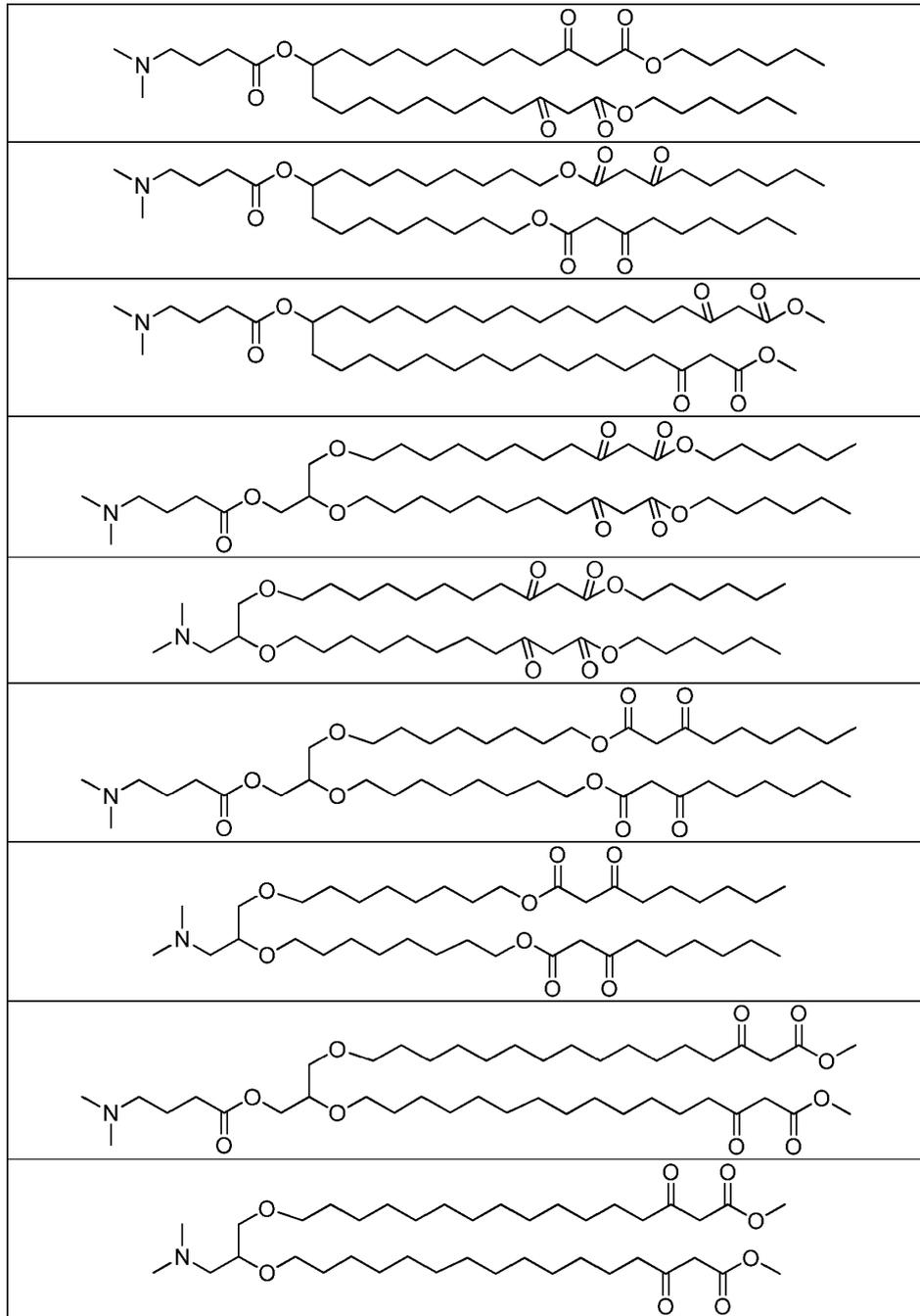


TABLA 5

m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4

ES 2 634 087 T3

5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3
3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8
8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9
8	5	10	3	5	8	3	10
9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6

ES 2 634 087 T3

4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2
9	4	3	10	4	9	10	3
10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8

3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

TABLA 6

m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4
5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3
3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8

ES 2 634 087 T3

8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9
8	5	10	3	5	8	3	10
9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6
4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10

ES 2 634 087 T3

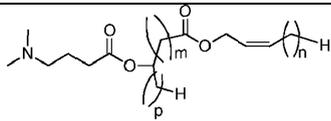
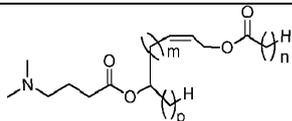
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2
9	4	3	10	4	9	10	3
10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8
3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

TABLA 7

m	n	p	q	m	n	p	q
1	13	1	13	1	13	1	13
2	12	2	12	2	12	2	12
3	11	3	11	3	11	3	11
4	10	4	10	4	10	4	10
5	9	5	9	5	9	5	9
6	8	6	8	6	8	6	8
7	7	7	7	7	7	7	7
8	6	8	6	8	6	8	6
9	5	9	5	9	5	9	5
10	4	10	4	10	4	10	4
11	3	11	3	11	3	11	3
12	2	12	2	12	2	12	2
13	1	13	1	13	1	13	1
1	13	2	12	1	13	2	12
2	12	3	11	2	12	3	11
3	11	4	10	3	11	4	10
4	10	5	9	4	10	5	9
5	9	6	8	5	9	6	8
6	8	7	7	6	8	7	7
7	7	8	6	7	7	8	6
8	6	9	5	8	6	9	5
9	5	10	4	9	5	10	4
10	4	11	3	10	4	11	3
11	3	12	2	11	3	12	2
12	2	13	1	12	2	13	1
13	1	1	13	13	1	1	13
1	13	3	11	1	13	3	11
2	12	4	10	2	12	4	10
3	11	5	9	3	11	5	9

4	10	6	8	4	10	6	8
5	9	7	7	5	9	7	7
6	8	8	6	6	8	8	6
7	7	9	5	7	7	9	5
8	6	10	4	8	6	10	4
9	5	11	3	9	5	11	3
10	4	12	2	10	4	12	2
11	3	13	1	11	3	13	1
12	2	1	13	12	2	1	13
13	1	2	12	13	1	2	14

TABLA 8

							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	

ES 2 634 087 T3

8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	
8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	

ES 2 634 087 T3

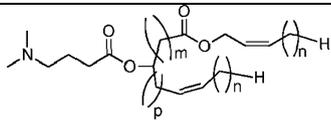
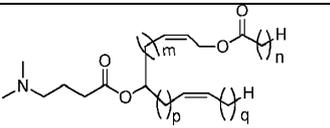
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	
10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	

ES 2 634 087 T3

6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	
11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	

4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

TABLA 9

							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7

ES 2 634 087 T3

9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6
8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4

ES 2 634 087 T3

8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3
10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9

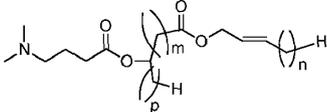
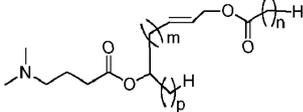
ES 2 634 087 T3

7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10
11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12

ES 2 634 087 T3

5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

TABLA 10

							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	

ES 2 634 087 T3

10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	
8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	

ES 2 634 087 T3

9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	
10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	

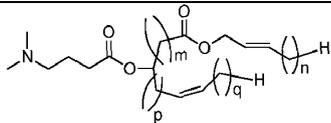
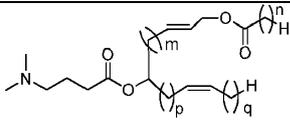
ES 2 634 087 T3

8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	
11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	

ES 2 634 087 T3

6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

TABLA 11

							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7

ES 2 634 087 T3

11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6
8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4

ES 2 634 087 T3

10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3
10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9

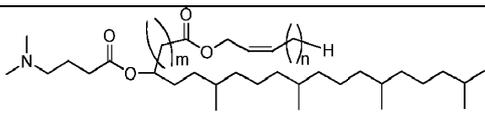
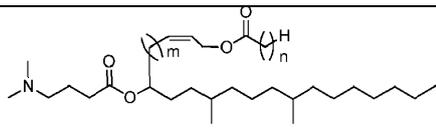
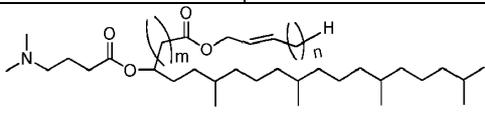
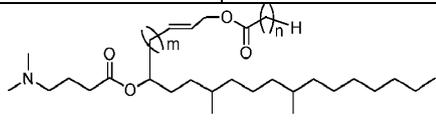
ES 2 634 087 T3

9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10
11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12

ES 2 634 087 T3

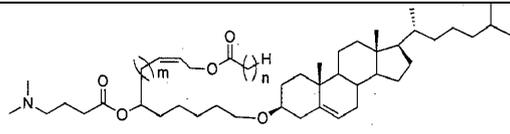
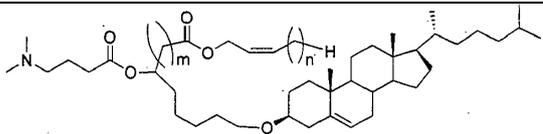
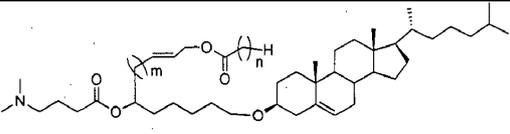
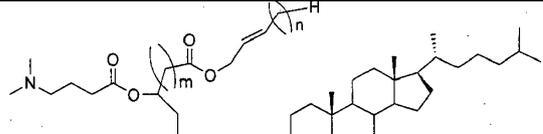
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

TABLA 12

			
m	n	m	n
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12
			
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9

10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12

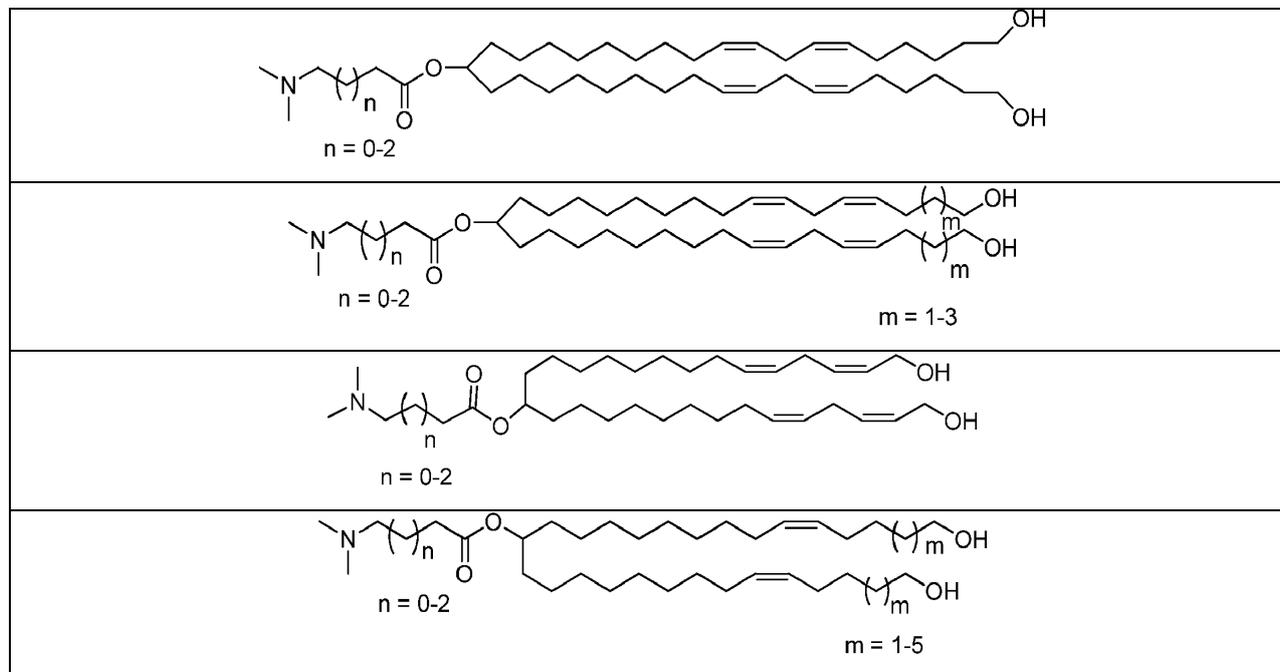
TABLA 13

			
m	n	m	n
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12
			
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11

12	1	1	12
----	---	---	----

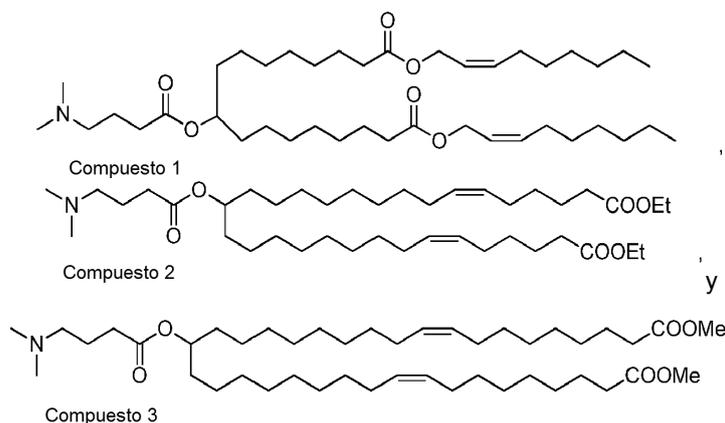
TABLA 14

Los siguientes compuestos pueden usarse como productos intermedios en la síntesis de los lípidos catiónicos descritos en el presente documento.



5

En una realización, el lípido catiónico de la presente invención está seleccionado de los siguientes compuestos, y sales de los mismos (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de los mismos):



10

15

20

Lípidos catiónicos incluyen aquellos que tienen grupos ácido graso alternativos y otros grupos dialquilamino, que incluyen aquellos en los que los sustituyentes alquilo son diferentes (por ejemplo, N-etil-N-metilamino-, N-propil-N-etilamino- y similares). Para aquellas realizaciones en las que R^1 y R^2 son ambos grupos alquilo, alquénilo, alquínilo, o cicloalquilalquilo de cadena larga, pueden ser iguales o diferentes. En general, lípidos (por ejemplo, un lípido catiónico) que tienen cadenas acilo menos saturadas son más fácilmente dimensionados, particularmente cuando los complejos están dimensionados por debajo de aproximadamente 0,3 micrómetros, para los fines de esterilización por filtración. Son típicos lípidos catiónicos que contienen ácidos grasos insaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C_{10} a C_{20} . También pueden usarse otros armazones para separar el grupo amino (por ejemplo, el grupo amino del lípido catiónico) y el ácido graso o porción de alquilo graso del lípido catiónico. Armazones adecuados son conocidos para aquellos expertos en la materia.

En ciertas realizaciones, los lípidos catiónicos tienen al menos un grupo protonable o desprotonable, de forma que el lípido esté positivamente cargado a un pH a o por debajo del pH fisiológico (por ejemplo, pH 7,4), y neutro a un

segundo pH, preferentemente a pH fisiológico o por encima. Tales lípidos también se denominan lípidos catiónicos. Se entenderá, por supuesto, que la adición o eliminación de protones en función del pH es un proceso en equilibrio, y que referencia a un lípido cargado o neutro se refiere a la naturaleza de las especies predominantes y no requiere que todo el lípido esté presente en la forma cargada o neutra. Los lípidos pueden tener más de un grupo protonable o desprotonable, o pueden ser de ión bipolar.

En ciertas realizaciones, los lípidos protonables (es decir, lípidos catiónicos) tienen un pK_a del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. Normalmente, los lípidos tendrán un pK_a de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y 7, tal como entre aproximadamente 5,5 y 6,8, cuando se incorporen en partículas de lípido. Tales lípidos serán catiónicos en una etapa de formulación de pH más bajo, mientras que partículas serán ampliamente (aunque no completamente) neutralizadas en la superficie a pH fisiológico de aproximadamente pH 7,4. Uno de los beneficios de un pK_a en el intervalo de entre aproximadamente 4 y 7 es que al menos algunos ácidos nucleicos asociados a la superficie exterior de la partícula perderán su interacción electrostática a pH fisiológico y se eliminarán por diálisis simple; reduciendo así enormemente la susceptibilidad de las partículas a la eliminación. Las mediciones de pK_a de lípidos dentro de partículas de lípido pueden realizarse, por ejemplo, usando la sonda fluorescente ácido 2-(p-toluidino)-6-naftalenosulfónico (TNS), usando métodos descritos en Cullis et al., (1986) Chem Phys Lipids 40, 127-144, que se incorpora por referencia en su totalidad.

En realizaciones particulares, los lípidos son lípidos cargados. Como se usa en el presente documento, el término "lípido cargado" pretende incluir aquellos lípidos que tienen una o dos cadenas de alquilo graso o de acilo graso y un grupo de cabeza de amina cuaternario. La amina cuaternaria lleva una carga positiva permanente. El grupo de cabeza puede incluir opcionalmente un grupo ionizable, tal como una amina primaria, secundaria o terciaria que puede estar protonada a pH fisiológico. La presencia de la amina cuaternaria puede alterar el pK_a del grupo ionizable con respecto al pK_a del grupo en un compuesto estructuralmente similar que carece de la amina cuaternaria (por ejemplo, la amina cuaternaria está sustituida con una amina terciaria) En algunas realizaciones, un lípido cargado se denomina un "aminolípido." Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. provisional 61/267.419, presentada el 7 de diciembre de 2009, que se incorpora por referencia en su totalidad.

Uno o más lípidos catiónicos adicionales, que llevan una carga positiva neta a pH aproximadamente fisiológico, además de aquellos específicamente descritos anteriormente, también pueden incluirse en partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento. Tales lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleoiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); sal de cloruro de 1,2-dioleiloxi-3-trimetilaminopropano ("DOTAP.Cl"); 3 β -(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol ("DC-Col"), trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetilamonio ("DOSPA"), carboxiespermina de dioctadecilamidoglicilo ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"), 1,2-dioleil-3-dimetilamoniopropano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina ("DODMA") y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio ("DMRIE"). Adicionalmente, pueden usarse varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, por ejemplo, LIPOFECTIN (incluyendo DOTMA y DOPE, disponible de GIBCO/BRL) y LIPOFECTAMINE (que comprende DOSPA y DOPE, disponible de GIBCO/BRL). En realizaciones particulares, un lípido catiónico es un aminolípido.

El lípido neutro

Las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento también pueden incluir uno o más lípidos neutros. Los lípidos neutros, cuando están presentes, pueden ser cualquiera de varias especies de lípido que existen tanto en una forma de ión bipolar no cargado como neutro a pH fisiológico. Tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiélinea, dihidroesfingomiélinea, cefalina y cerebrósidos. La selección de los lípidos neutros para su uso en las partículas descritas en el presente documento está generalmente guiada por la consideración de, por ejemplo, tamaño de liposoma y estabilidad de los liposomas en la circulación sanguínea. Preferentemente, el componente de lípido neutro es un lípido que tiene dos grupos acilo (es decir, diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina). Lípidos que tienen una variedad de grupos de cadena de acilo de longitud de cadena y grado de saturación variables están disponibles o pueden aislarse o sintetizarse por técnicas muy conocidas. En un grupo de realizaciones, se prefieren los lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C_{10} a C_{20} . En otro grupo de realizaciones, se usan lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C_{10} a C_{20} . Adicionalmente, pueden usarse lípidos que tienen mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. Preferentemente, los lípidos neutros usados son DOPE, DSPC, POPC, DPCC o cualquier fosfatidilcolina relacionada. Los lípidos neutros también pueden estar compuestos de esfingomiélinea, dihidroesfingomiélinea o fosfolípidos con otros grupos de cabeza, tales como serina e inositol.

El lípido capaz de reducir la agregación

Las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento también pueden incluir uno o más lípidos capaces de reducir la agregación. Ejemplos de lípidos que reducen la agregación de partículas durante la formación incluyen lípidos modificados con polietilenglicol (PEG), monosialogangliósido Gm1 y oligómeros de

poliamida ("PAO") tales como (descritos en la patente de EE.UU. N.º 6.320.017, que se incorpora por referencia en su totalidad). Otros compuestos con restos de barrera estérica hidrófilos no cargados, que previenen la agregación durante la formulación, como PEG, Gm1 o ATTA, también pueden acoplarse a lípidos. ATTA-lípidos se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.320.017, y conjugados de PEG-lípido se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.820.873, 5.534.499 y 5.885.613, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Normalmente, la concentración del componente de lípido seleccionado para reducir la agregación es aproximadamente del 1 al 15 % (por porcentaje en moles de lípidos).

Ejemplos específicos de lípidos modificados con PEG (o conjugados de lípido-polioxitileno) que pueden tener una variedad de porciones de lípido de "anclaje" para asegurar la porción de PEG a la superficie de la vesícula de lípido incluyen fosfatidiletanolamina modificada con PEG y ácido fosfatídico, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20) que se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.820.873, incorporado en el presente documento por referencia, dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Particularmente se prefieren diacilgliceroles modificados con PEG y dialquilgliceroles.

En realizaciones donde un resto estéricamente grande tal como PEG o ATTA está conjugado con un anclaje de lípido, la selección del anclaje de lípido depende de qué tipo de asociación va a tener el conjugado con la partícula de lípido. Es muy sabido que mPEG (mw2000)-diaestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) seguirá asociado a un liposoma hasta que la partícula se elimine de la circulación, posiblemente una cuestión de días. Otros conjugados, tales como PEG-CerC20, tienen capacidad de permanencia similar. PEG-CerC14, sin embargo, se intercambia rápidamente de la formulación tras la exposición a suero, con un $T_{1/2}$ inferior a 60 min en algunos ensayos. Como se ilustra en la patente de EE.UU. N.º 5.820.873, al menos tres características influyen en la tasa de intercambio: longitud de la cadena de acilo, saturación de la cadena de acilo y tamaño del grupo de cabeza de barrera estérica. Compuestos que tienen variaciones adecuadas de estas características pueden ser útiles. Para algunas aplicaciones terapéuticas puede ser preferible que el lípido modificado con PEG sea rápidamente perdido de la partícula de ácido nucleico-lípido *in vivo* y, por consiguiente, el lípido modificado con PEG poseerá anclaje de lípido relativamente cortos. En otras aplicaciones terapéuticas puede ser preferible que la partícula de ácido nucleico-lípido presente una vida en la circulación plasmática más larga y, por consiguiente, el lípido modificado con PEG poseerá anclajes de lípido relativamente más largos.

Debe observarse que los compuestos que previenen la agregación no requieran necesariamente la conjugación de lípido para funcionar apropiadamente. PEG libre o ATTA libre en disolución pueden ser suficientes para prevenir la agregación. Si las partículas son estables después de la formulación, el PEG o ATTA puede dializarse antes de la administración a un sujeto.

Partícula de lípidos

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a partículas de lípido que incluyen uno o más de los lípidos catiónicos descritos en el presente documento. En una realización, la partícula de lípido incluye uno o más compuestos de fórmula I-XXIII. En otra realización, la partícula de lípido incluye uno o más compuestos de fórmula II-XXIII. En otra realización, la partícula de lípido incluye uno o más compuestos de fórmula I. Según la presente invención, la partícula de lípido incluye un compuesto de fórmula IB.

Las partículas de lípido incluyen, pero no se limitan a, liposomas. Como se usa en el presente documento, un liposoma es una estructura que tiene membranas que contienen lípido que encierran un interior acuoso. Los liposomas pueden tener una o más membranas de lípido. Los liposomas pueden ser de una sola capa, denominados unilaminares, o multi-capa, denominado multilaminares. Cuando están complejados con ácidos nucleicos, las partículas de lípido también pueden ser lipoplejos, que están compuestos de bicapas de lípido catiónico intercaladas entre capas de ADN.

Las partículas de lípido pueden comprender además uno o más lípidos adicionales y/u otros componentes tales como colesterol. Otros lípidos pueden incluirse en las composiciones de liposoma para una variedad de fines, tales como para prevenir la oxidación de lípidos o para unir ligandos sobre la superficie del liposoma. Cualquiera de varios lípidos puede estar presente en los liposomas, que incluyen lípidos anfipáticos, neutros, catiónicos y aniónicos. Tales lípidos pueden usarse solos o en combinación.

Componentes adicionales que pueden estar presentes en una partícula de lípido incluyen componentes estabilizadores de bicapa tales como oligómeros de poliamida (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.320.017), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípido tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado con ceramidas (véase la patente de EE.UU. N.º 5.885.613).

En una realización, las partículas de lípido incluyen uno o más de un segundo aminolípido o lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroles y un lípido seleccionado para reducir la agregación de partículas de lípido durante la formación, que pueden resultar de estabilización estérica de partículas que previene la agregación inducida por carga durante la formación.

Las partículas de lípido pueden incluir dos o más lípidos catiónicos. Los lípidos pueden seleccionarse para contribuir a diferentes propiedades ventajosas. Por ejemplo, pueden usarse lípidos catiónicos que se diferencian en

propiedades tales como pK_a de amina, estabilidad química, semivida en circulación, semivida en tejido, acumulación neta en tejido o toxicidad en una partícula de lípido. En particular, los lípidos catiónicos pueden elegirse de manera que las propiedades de la partícula de lípido mixto sean más deseables que las propiedades de una única partícula de lípido de lípidos individuales.

5 La acumulación de tejido neta y toxicidad a largo plazo (si la hay) de los lípidos catiónicos pueden modularse de una forma favorable eligiendo mezclas de lípidos catiónicos en lugar de seleccionando un único lípido catiónico en una formulación dada. Tales mezclas también pueden proporcionar mejor encapsulación y/o liberación del fármaco. Una combinación de lípidos catiónicos también puede afectar la estabilidad sistémica cuando se compara con la entidad individual en una formulación.

10 En un ejemplo, una serie de compuestos estructuralmente similares puede tener valores de pK_a variables que abarcan un intervalo, por ejemplo, de inferior a 1 unidad de pK_a , de 1 a 2 unidades de pK_a , o un intervalo de más de 2 unidades de pK_a . Dentro de la serie, puede encontrarse que un pK_a en el centro del intervalo está asociado con un potenciamiento de propiedades mejoradas (mayor eficacia) o una disminución en propiedades desventajosas (por ejemplo, toxicidad reducida), en comparación con compuestos que tienen valores de pK_a hacia los extremos del intervalo. En un caso tal, dos (o más) compuestos diferentes que tienen valores de pK_a hacia extremos opuestos del intervalo pueden seleccionarse para su uso conjunto en una partícula de lípido. De esta forma, las propiedades netas de la partícula de lípido (por ejemplo, carga en función del pH local) pueden estar más próximas a las de una partícula que incluye un único lípido del centro del intervalo. También pueden usarse lípidos catiónicos que son estructuralmente distintos (por ejemplo, no parte de las series de compuestos estructuralmente similares mencionados anteriormente) en una partícula de lípido mixta.

En algunos casos, dos o más lípidos catiónicos diferentes pueden tener valores de pK_a ampliamente diferentes, por ejemplo, que se diferencian por 3 o más unidades de pK_a . En este caso, el comportamiento neto de una partícula de lípido mixta no imitará necesariamente la de una partícula de lípido individual que tiene un pK_a intermedio. Más bien, el comportamiento neto puede ser el de una partícula que tiene dos sitios protonables distintos (o desprotonables, según sea el caso) con diferentes valores de pK_a . En el caso de un único lípido, la fracción de sitios protonables que son de hecho protonados varía rápidamente a medida que el pH se mueve de por debajo del pK_a a por encima del pK_a (cuando el pH es igual al valor de pK_a , el 50 % de los sitios están protonados). Cuando dos o más lípidos catiónicos diferentes que pueden tener valores de pK_a ampliamente diferentes (por ejemplo, que se diferencian 3 o más unidades de pK_a) se combinan en una partícula de lípido, la partícula de lípido puede mostrar una transición más gradual de no protonada a protonada a medida que se varía el pH.

En otros ejemplos, pueden seleccionarse dos o más lípidos basándose en otras consideraciones. Por ejemplo, si un lípido por sí mismo es altamente eficaz pero moderadamente tóxico, podría combinarse con un lípido que es menos eficaz pero no tóxico. En algunos casos, la combinación puede seguir siendo altamente eficaz, pero tiene una toxicidad enormemente reducida, incluso donde podría predecirse que la combinación sería solo moderadamente eficaz y solo ligeramente menos tóxica.

La selección puede ser guiada por un valor medido de una característica experimentalmente determinable, por ejemplo, un característica a la que puede asignarse un valor numérico de los resultados de un experimento. Características experimentalmente determinables pueden incluir una medida de seguridad, una medida de eficacia, una medida de interacción con una biomolécula predeterminada, o pK_a .

40 Una medida de seguridad podría incluir una tasa de supervivencia, una DL_{50} , o un nivel de un biomarcador (tal como un biomarcador de suero) asociado a daño de tejido (por ejemplo, enzimas del hígado para hígado; CPK para músculo; equilibrio iónico para riñón). Una medida de eficacia puede ser cualquier medición que indique si un agente terapéutico está produciendo un efecto; particularmente, si y/o a qué grado está produciendo un efecto deseado, tal como tratar, prevenir, corregir, o mejorar de otro modo una enfermedad, trastorno, u otro estado clínico. La medida de eficacia puede ser una medida indirecta; por ejemplo, si un agente terapéutico pretende producir un efecto particular a un nivel celular, mediciones de ese efecto sobre cultivos celulares pueden ser una medida de la eficacia. Una medida de interacción con biomoléculas predeterminadas puede incluir una K_d para unirse a una proteína particular o una medida del carácter, grado o extensión de la interacción con otros lípidos, que incluyen subestructuras celulares tales como membranas celulares, membranas endosómicas, membranas nucleares y similares.

Los lípidos catiónicos pueden seleccionarse basándose en el mecanismo de acción, por ejemplo, si, bajo qué condiciones, o a qué grado, los lípidos interaccionan con biomoléculas predeterminadas. Por ejemplo, un primer lípido catiónico puede elegirse, en parte, debido a que está asociado con un mecanismo dependiente de ApoE; puede elegirse un segundo lípido catiónico, en parte, debido a que está asociado con un mecanismo independiente de ApoE.

Por ejemplo, una partícula de lípido también puede incluir una mezcla de los lípidos catiónicos descritos en, por ejemplo, el documento WO 2009/086558, y la solicitud de EE.UU. provisional 61/104.219, presentada el 9 de octubre de 2008 (cada uno de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad), y análogos de éster de los mismos. En otro ejemplo, una partícula de lípido puede incluir una mezcla de un lípido, por ejemplo, lípido A, descrita en el

documento PCT/US10/22614, presentado el 29 de enero de 2010 y un lípido, por ejemplo, el lípido de fórmula V o fórmula VI, descritos en la solicitud provisional de EE.UU. 61/175.770, presentada el 5 de mayo de 2009.

En ciertas realizaciones, se desea dirigir las partículas de lípido usando restos de direccionamiento que son específicos para un tipo de célula o tejido. Previamente se ha descrito el direccionamiento de partículas de lípido usando una variedad de restos de direccionamiento, tales como ligandos, receptores de la superficie celular, glucoproteínas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina) y anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.957.773 y 4.603.044, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad). Los restos de direccionamiento pueden comprender la proteína entera o fragmentos de la misma. Los mecanismos de direccionamiento generalmente requieren que los agentes de direccionamiento estén posicionados sobre la superficie de la partícula de lípido de tal manera que el resto diana esté disponible para interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de la superficie celular. Se conocen una variedad de diferentes agentes de direccionamiento y métodos y están disponibles en la materia, que incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en Sapra, P. y Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); y Abra, RM et al., *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

Se ha propuesto el uso de partículas de lípido, es decir, liposomas, con un recubrimiento de superficie de cadenas de polímero hidrófilo, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG), para el direccionamiento (Allen, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104 (1996); Blume, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180-184 (1993); Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); patente de EE.UU. N.º 5.013.556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71-74 (1994); Zalipsky, en *Stealth Liposomes* Capítulo 9 (Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton F1 (1995). En un enfoque, un ligando, tal como un anticuerpo, para dirigir la partícula de lípido se une al grupo de cabeza polar de lípidos que forman la partícula de lípido. En otro enfoque, el ligando de direccionamiento está unido a los extremos distales de las cadenas de PEG que forman el recubrimiento de polímero hidrófilo (Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388: 115-118 (1996)).

Pueden usarse métodos convencionales para acoplar los agentes diana. Por ejemplo, puede usarse fosfatidiletanolamina, que puede activarse para la unión de agentes diana, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como bleomicina derivatizada con lípido. Pueden construirse liposomas dirigidos a anticuerpo, por ejemplo, liposomas que incorporan la proteína A (véase, Renneisen, et al., *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) y Leonetti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1990). Otros ejemplos de conjugación de anticuerpos se desvelan en la patente de EE.UU. N.º 6.027.726, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento por referencia. Ejemplos de restos de direccionamiento también pueden incluir otras proteínas, específicas para componentes celulares, que incluyen antígenos asociados a neoplasias o tumores. Las proteínas usadas como restos de direccionamiento pueden unirse a los liposomas mediante enlaces covalentes (véase, Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros métodos de direccionamiento incluyen el sistema de biotina-avidina.

En algunas realizaciones, la partícula de lípido incluye una mezcla de un lípido catiónico y un lípido promotor de la fusión. La partícula de lípido puede incluir además un lípido neutro, un esteroles, un lípido modificado con PEG o una combinación de éstos. Por ejemplo, la partícula de lípido puede incluir un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión (por ejemplo, DPPC) y un lípido neutro, pero no esteroles o lípido modificado con PEG. La partícula de lípido puede incluir un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión y un lípido neutro, pero no esteroles o lípido modificado con PEG. La partícula de lípido puede incluir un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión, un lípido neutro, pero no esteroles o lípido modificado con PEG. La partícula de lípido puede incluir un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión, un esteroles y un lípido modificado con PEG, pero no lípido neutro. La partícula de lípido puede incluir un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión, un lípido neutro y un lípido modificado con PEG, pero no esteroles. La partícula de lípido puede incluir un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión, un esteroles, lípido neutro y un lípido modificado con PEG.

En una realización a modo de ejemplo, la partícula de lípido comprende una mezcla de un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión, lípidos neutros (distintos de un lípido catiónico), un esteroles (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-DMG o PEG-DMA). En ciertas realizaciones, la mezcla de lípidos consiste en o consiste esencialmente en un lípido catiónico, un lípido promotor de la fusión, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG. En realizaciones preferidas adicionales, la partícula de lípido incluye la mezcla de lípidos anterior en relaciones molares de aproximadamente el 20-70 % de lípido catiónico: 0,1-50 % de lípido promotor de la fusión: 5-45 % de lípido neutro: 20-55 % de colesterol: 0,5-15 % de lípido modificado con PEG. En algunas realizaciones, el lípido promotor de la fusión puede estar presente en una relación molar del 0,1-50 %, 0,5-50 %, 1-50 %, 5 %-45 %, 10 %-40 % o 15 %-35 %. En algunas realizaciones, el lípido promotor de la fusión puede estar presente en una relación molar del 0,1-50 %, 0,5-50 %, 1-50 %, 5 %-45 %, 10 %-40 % o 15 %-35 %. En algunas realizaciones, el lípido promotor de la fusión puede estar presente en una relación molar del 0,1-50 %, 10-50 %, 20-50 % o 30-50 %. En algunas realizaciones, el lípido promotor de la fusión puede estar presentes en una relación molar del 0,1-50 %, 0,5-45 %, 1-40 %, 1 %-35 %, 1 %-30 % o 1 %-20 %.

En realizaciones preferidas adicionales, la partícula de lípido consiste en o consiste esencialmente en la mezcla de lípidos anterior en relaciones molares de aproximadamente el 20-70 % de lípido catiónico: 0,1-50 % de lípido promotor de la fusión: 5-45 % de lípido neutro: 20-55 % de colesterol: 0,5-15 % de lípido modificado con PEG.

5 En realizaciones particulares, la relación de lípidos molar, con respecto al % en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) es aproximadamente 40/10/40/10, 35/15/40/10 o 52/13/30/5; esta mezcla se combina además con un lípido promotor de la fusión en una relación molar del 0,1-50 %, 0,1-50 %, 0,5-50 %, 1-50 %, 5 %-45 %, 10 %-40 %, o 15 %-35 %; en otras palabras, cuando una mezcla 40/10/40/10 de lípido/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA se combina con un péptido promotor de la fusión en una relación molar de 10 50 %, las partículas de lípido resultantes pueden tener una relación molar total de (% en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA/péptido promotor de la fusión) 20/5/20/5/50. En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro, DSPC, en estas composiciones se sustituye por POPC, DPPC, DOPE o SM.

15 Las partículas de lípido descritas en el presente documento pueden incluir además uno o más agentes terapéuticos. Así, se proporcionan composiciones que incluyen una partícula de lípido y un agente activo, donde el agente activo está asociado con la partícula de lípido. En realizaciones particulares, el agente activo es un agente terapéutico. En realizaciones particulares, el agente activo está encapsulado dentro de un interior acuoso de la partícula de lípido. En otras realizaciones, el agente activo está presente dentro de una o más capas de lípido de la partícula de lípido. En otras realizaciones, el agente activo está unido a la superficie de lípido exterior o interior de una partícula de lípido.

20 "Completamente encapsulado", como se usa en el presente documento, indica que el ácido nucleico en las partículas no se degrada significativamente después de la exposición a suero o un ensayo de nucleasa que degradaría significativamente ácidos nucleicos libres. En un sistema completamente encapsulado, preferentemente menos del 25 % del ácido nucleico de partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría el 100 % de ácido nucleico libre, más preferentemente menos del 10 % y lo más preferentemente se degrada menos del 5 % del ácido nucleico de partícula. Alternativamente, la encapsulación completa puede determinarse por un ensayo 25 Oligreen[®]. Oligreen[®] es una tinción de ácidos nucleicos fluorescente ultra-sensible para cuantificar oligonucleótidos y ADN monocatenario en disolución (disponible de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Completamente encapsulado también sugiere que las partículas son estables en suero, es decir, no se descomponen rápidamente en sus partes componentes tras la administración *in vivo*.

30 En una realización, las partículas de lípido comprenden un lípido catiónico de la presente invención, un lípido neutro, un esteroles y un lípido modificado con PEG. En una realización, las partículas de lípido incluyen de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 75 % en una base molar de lípido catiónico, por ejemplo, de aproximadamente el 35 a aproximadamente el 65 %, de aproximadamente el 45 a aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 57,5 %, aproximadamente el 57,1 %, aproximadamente el 50 % o aproximadamente el 40 % en una base molar. En una realización, las partículas de lípido incluyen de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 15 % en una base molar del lípido neutro, por ejemplo, de aproximadamente el 3 a aproximadamente el 12 %, de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 7,5 %, aproximadamente el 7,1 % o aproximadamente 0 % en una base molar. En una 35 realización, el lípido neutro es DPPC. En una realización, el lípido neutro es DSPC.

40 En una realización, la formulación incluye de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 50 % en una base molar del esteroles, por ejemplo, aproximadamente el 15 a aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 20 a aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 38,5 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 34,4 %, aproximadamente el 31,5 % o aproximadamente el 31 % en una base molar. En una realización, el esteroles es colesterol.

45 En una realización, las partículas de lípido incluyen de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 20 % en una base molar del lípido modificado con PEG, por ejemplo, aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 3,5 %, aproximadamente el 1,5 %, aproximadamente el 0,5 %, o aproximadamente 0,3 % en una base molar. En una realización, el lípido modificado con PEG es PEG-DMG. En una realización, el lípido modificado con PEG es PEG-c-DMA. En una realización, las partículas de lípido incluyen 25-75 % de lípido 50 catiónico, 0,5-15 % de lípido neutro, 5-50 % de esteroles y 0,5-20 % de lípido modificado con PEG en una base molar.

55 En una realización, las partículas de lípido incluyen 35-65 % de lípido catiónico, 3-12 % de lípido neutro, 15-45 % de esteroles y 0,5-10 % de lípido modificado con PEG en una base molar. En una realización, las partículas de lípido incluyen 45-65 % de lípido catiónico, 5-10 % de lípido neutro, 25-40 % de esteroles y 0,5-5 % de lípido modificado con PEG en una base molar. En una realización, el lípido modificado con PEG comprende una molécula de PEG de un peso molecular promedio de 2.000 Da. En una realización, el lípido modificado con PEG es PEG-diestirilglicerol (PEG-DSG).

En una realización, la relación de lípido:ARNip es al menos aproximadamente 0,5:1, al menos aproximadamente 1:1, al menos aproximadamente 2:1, al menos aproximadamente 3:1, al menos aproximadamente 4:1, al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente

11:1 o al menos aproximadamente 33:1. En una realización, la relación de relación de lípido:ARNip está entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 35:1, aproximadamente 3:1 y aproximadamente 15:1, aproximadamente 4:1 y aproximadamente 15:1, o aproximadamente 5:1 y aproximadamente 13:1. En una realización, la relación de relación de lípido:ARNip está entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 12:1.

5 En una realización, las partículas de lípido son nanopartículas. En realizaciones adicionales, las partículas de lípido tienen un tamaño de diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 300 nm, tal como de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 250 nm, por ejemplo, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm.

10 En una realización, una partícula de lípido que contiene un lípido catiónico de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento tiene una semivida *in vivo* ($t_{1/2}$) (por ejemplo, en el hígado, bazo o plasma) de inferior a aproximadamente 3 horas, tal como inferior a aproximadamente 2,5 horas, inferior a aproximadamente 2 horas, inferior a aproximadamente 1,5 horas, inferior a aproximadamente 1 hora, inferior a aproximadamente 0,5 horas o inferior a aproximadamente 0,25 horas.

15 En otra realización, una partícula de lípido que contiene un lípido catiónico de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento tiene una semivida *in vivo* ($t_{1/2}$) (por ejemplo, en el hígado, bazo o plasma) de inferior a aproximadamente el 10 % (por ejemplo, inferior a aproximadamente el 7,5 %, inferior a aproximadamente el 5 %, inferior a aproximadamente el 2,5 %) de aquella para el mismo lípido catiónico sin el grupo biodegradable o grupos.

Componentes adicionales

20 Las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además una apolipoproteína. Como se usa en el presente documento, el término "apolipoproteína" o "lipoproteína" se refiere a apolipoproteínas conocidas para aquellos expertos en la materia y variantes y fragmentos de las mismas y a agonistas de apolipoproteína, análogos o fragmentos de los mismos descritos a continuación.

25 Apolipoproteínas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V y ApoE, y formas polimórficas activas, isoformas, variantes y mutantes, además de fragmentos o formas truncadas de las mismas. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína es una apolipoproteína que contiene tiol. "Apolipoproteína que contiene tiol" se refiere a una apolipoproteína, variante, fragmento o isoforma que contiene al menos un resto de cisteína. Las apolipoproteínas que contienen tiol más comunes son ApoA-I Milano (ApoA-I_M) y ApoA-I Paris (ApoA-I_P) que contienen un resto de cisteína (Jia et al., 2002, Biochem. Biophys. Res. Comm. 297: 206-13; Bielicki y Oda, 2002, Biochemistry 41: 2089-96). ApoA-II, ApoE2 y ApoE3 también son apolipoproteínas que contienen tiol. ApoE aislada y/o fragmentos activos y análogos de polipéptido de las mismas, que incluyen formas recombinantemente producidas de las mismas, se describen en las patentes de EE.UU. N.º 5.672.685; 5.525.472; 5.473.039; 5.182.364; 5.177.189; 5.168.045; 5.116.739; cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. ApoE3 se desvela en Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms," J. Biol. Chem. (1981) 256: 9077-9083; y Rall, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects," Proc. Nat. Acad. Sci. (1982) 79: 4696-4700. Véase también el número de acceso de GenBank K00396.

40 En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede estar en su forma madura en su forma de preproapolipoproteína o en su forma de proapolipoproteína. También pueden utilizarse homo- y heterodímeros (donde sea factible) de pro-ApoA-I y ApoA-I madura (Duverger et al., 1996, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(12):1424-29), ApoA-I Milano (Klon et al., 2000, Biophys. J. 79(3):1679-87; Franceschini et al., 1985, J. Biol. Chem. 260: 1632-35), ApoA-I Paris (Daum et al., 1999, J. Mol. Med. 77:614-22), ApoA-II (Shelness et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(14):8637-46; Shelness et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(15):9929-35), ApoA-IV (Duverger et al., 1991, Euro. J. Biochem. 201(2):373-83) y ApoE (McLean et al., 1983, J. Biol. Chem. 258(14):8993-9000).

45 En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser un fragmento, variante o isoforma de la apolipoproteína. El término "fragmento" se refiere a cualquier apolipoproteína que tiene una secuencia de aminoácidos más corta que la de una apolipoproteína nativa y cuyo fragmento retiene la actividad de apolipoproteína nativa, que incluye propiedades de unión a lípido. Por "variante" se indican sustituciones o alteraciones en las secuencias de aminoácidos de la apolipoproteína, cuyas sustituciones o alteraciones, por ejemplo, adiciones y deleciones de restos de aminoácidos, no suprimen la actividad de apolipoproteína nativa, que incluye propiedades de unión a lípido. Así, una variante puede comprender una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una apolipoproteína nativa proporcionada en el presente documento en la que uno o más restos de aminoácidos han sido conservativamente sustituidos con aminoácidos químicamente similares. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de al menos un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina con otro. Asimismo, por ejemplo, la sustitución de al menos un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, y entre glicina y serina (véanse las patentes de EE.UU. N.º 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166) son sustituciones conservativas. El término "isoforma" se refiere a una proteína que tiene función igual, mayor o parcial y secuencia similar, idéntica o parcial, y puede o puede no ser el producto del mismo gen y normalmente específica de tejido (véanse Weisgraber 1990, J. Lipid Res. 31(8):1503-11; Hixson

and Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sacre et al., 2003, *FEBS Lett.* 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, *Biophys. Chem.* 100(1-3):481-92; Gong et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277(33):29919-26; Ohta et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(23):14888-93 y la patente de EE.UU. N.º 6.372.886).

En ciertas realizaciones, las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento incluyen una construcción quimérica de una apolipoproteína. Por ejemplo, una construcción quimérica de una apolipoproteína puede comprender un dominio de apolipoproteína con alta capacidad de unión a lípido asociada a un dominio de apolipoproteína que contiene propiedades protectoras de isquemia-reperusión. Una construcción quimérica de una apolipoproteína puede ser una construcción que incluye regiones separadas dentro de una apolipoproteína (es decir, construcción homóloga) o una construcción quimérica puede ser una construcción que incluye regiones separadas entre diferentes apolipoproteínas (es decir, construcciones heterólogas). Composiciones que comprenden una construcción quimérica también pueden incluir segmentos que son variantes de apolipoproteína o segmentos diseñados para tener un carácter específico (por ejemplo, propiedad de unión de lípido, unión de receptor, enzimática, activadora de enzimas, antioxidante o de reducción-oxidación) (véanse Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(2):328-38; Thurberg et al., *J. Biol. Chem.* 271(11):6062-70; Dyer 1991, *J. Biol. Chem.* 266(23):150009-15; Hill 1998, *J. Biol. Chem.* 273(47):30979-84).

Apolipoproteínas utilizadas también incluyen apolipoproteínas recombinantes, sintéticas, semi-sintéticas o purificadas. Métodos de obtención de apolipoproteínas o equivalentes de las mismas son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, las apolipoproteínas pueden separarse de plasma o productos naturales por, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad o cromatografía de inmunoafinidad, o producirse sintéticamente, semi-sintéticamente o usando técnicas de ADN recombinante conocidas para aquellos de la materia (véanse, por ejemplo, Mulugeta et al., 1998, *J. Chromatogr.* 798(1-2): 83-90; Chung et al., 1980, *J. Lipid Res.* 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, *J. Lipid Res.* 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, *J. Chromatogr.* 711:97-109; las patentes de EE.UU. N.º 5.059.528, 5.834.596, 5.876.968 y 5.721.114; y publicaciones PCT WO 86/04920 y WO 87/02062).

Las apolipoproteínas incluyen además agonistas de apolipoproteína tales como péptidos y análogos de péptido que imitan la actividad de ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-I_M), ApoA-I Paris (ApoA-I_P), ApoA-II, ApoA-IV y ApoE. Por ejemplo, la apolipoproteína puede ser cualquiera de aquellas descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.004.925, 6.037.323, 6.046.166 y 5.840.688, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en sus totalidades.

Pueden sintetizarse o fabricarse péptidos agonistas de apolipoproteína o análogos de péptido usando cualquier técnica para la síntesis de péptidos conocida en la técnica que incluye, por ejemplo, las técnicas descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166. Por ejemplo, los péptidos pueden prepararse usando la técnica sintética en fase sólida inicialmente descrita por Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Otras técnicas de síntesis de péptidos pueden encontrarse en Bodanszky et al., *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2ª Ed., (1976) y otras referencias fácilmente disponibles para aquellos expertos en la materia. Un resumen de técnicas de síntesis de polipéptidos puede encontrarse en Stuart and Young, *Solid Phase Peptide. Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). También pueden sintetizarse péptidos por métodos de disolución como se describen en *The Proteins*, Vol. II, 3d Ed., Neurath et. al., Eds., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976). Grupos protectores apropiados para su uso en diferentes síntesis de péptidos se describen en los textos anteriormente mencionados, además de en McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, New York, N.Y. (1973). Los péptidos también podrían prepararse por escisión química o enzimática de porciones más grandes de, por ejemplo, apolipoproteína A-I.

En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser una mezcla de apolipoproteínas. En una realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla homogénea, es decir, un único tipo de apolipoproteína. En otra realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla heterogénea de apolipoproteínas, es decir, una mezcla de dos o más apolipoproteínas diferentes. Realizaciones de mezclas heterogéneas de apolipoproteínas pueden comprender, por ejemplo, una mezcla de una apolipoproteína de una fuente de animal y una apolipoproteína de una fuente semi-sintética. En ciertas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de ApoA-I y ApoA-I Milano. En ciertas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de ApoA-I Milano y ApoA-I Paris. Mezclas adecuadas para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento serán evidentes para un experto en la materia.

Si la apolipoproteína se obtiene de fuentes naturales, puede obtenerse de una fuente de planta o animal. Si la apolipoproteína se obtiene de una fuente de animal, la apolipoproteína puede ser de cualquier especie. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede obtenerse de una fuente de animal. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede obtenerse de una fuente humana. En realizaciones preferidas, la apolipoproteína se deriva de la misma especie que el individuo al que se administra la apolipoproteína.

Las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento pueden contener además un componente de esteroles de la mezcla de lípidos. Cuando está presente, el esteroles puede ser cualquiera de aquellos esteroides convencionalmente usados en el campo de la preparación de liposomas, vesículas de lípidos o partículas de lípido. En una realización, el esteroles es colesterol.

Las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además un lípido aniónico. Lípidos aniónicos adecuados para su uso en partículas de lípido incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoilfosfatidiletanolamina, N-succinilfosfatidiletanolamina, N-glutarilfosfatidiletanolamina, lisilfosfatidilglicerol, y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

En realizaciones adicionales, también están incluidos lípidos anfipáticos en las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento. "Lípidos anfipáticos" se refiere a cualquier material adecuado, en el que la porción hidrófoba del material de lípido se orienta en una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Fosfolípidos representativos incluyen esfingomiélin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o dilinoleoilfosfatidilcolina. También pueden usarse otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glucoesfingolípidos, diacilglicérols y β -aciloxiácidos. Adicionalmente, tales lípidos anfipáticos pueden ser fácilmente mezclados con otros lípidos, tales como triglicéridos y esteroides.

También son adecuados para la inclusión en las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento lípidos de fusión programables o lípidos promotores de la fusión. Tales partículas de lípido tienen poca tendencia a fusionarse con membranas celulares y administrar su carga hasta que se produce un evento señal dado. Esto permite que la partícula de lípido se distribuya más uniformemente después de la inyección en un organismo o sitio de enfermedad antes de que empiece a fusionarse con células. El evento señal puede ser, por ejemplo, un cambio en pH, temperatura, entorno iónico o tiempo. Los lípidos promotores de la fusión pueden ser, por ejemplo, compuestos de fórmula (I) como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, el evento señal puede ser un cambio en el pH, por ejemplo, tal como la diferencia en el pH entre un entorno extracelular y un entorno intracelular, o entre un entorno intracelular y un entorno endosómico.

Cuando el tiempo es el evento señal, un componente de retraso de la fusión o de "ocultación", tal como un conjugado de ATTA-lípido o un conjugado de PEG-lípido, puede simplemente intercambiarse de la partícula de lípido membrana con el tiempo. Por el momento en el que la partícula de lípido se ha distribuido adecuadamente en el cuerpo, ha perdido suficiente agente de ocultación de manera que es fusogénico. Con otros eventos señal, puede desearse elegir una señal que está asociada con el sitio de enfermedad o célula diana, tal como elevada temperatura en un sitio de inflamación.

Agentes activos (terapéuticos)

Las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento pueden incluir además uno o más agentes activos (por ejemplo, agentes terapéuticos). Agentes activos, como se usa en el presente documento, incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado sobre una célula, tejido, órgano o sujeto. Tales efectos pueden ser, por ejemplo, biológicos, fisiológicos o cosméticos. Las partículas de lípido y composiciones pueden usarse para administrar cualquiera de una variedad de agentes activos. El agente activo puede ser un ácido nucleico, péptido, polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo), citocinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores inductores de la diferenciación, receptores de la superficie celular y sus ligandos, hormonas y moléculas pequeñas. Agentes terapéuticos adecuados también incluyen compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicación anticonceptiva, antipiréticos, vasodilatadores, antiangiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de la transducción de señales, fármacos cardiovasculares, por ejemplo, agentes antiarrítmicos, vasoconstrictores, hormonas y esteroides. Las partículas de lípido de la presente invención también pueden administrar aptámeros.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un fármaco de oncología, que también puede denominarse un fármaco antitumoral, un fármaco contra el cáncer, un fármaco para tumor, un agente antineoplásico, o similares. Ejemplos de fármacos de oncología que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, Alkeran, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido arsénico, azatioprina, bexaroteno, biCNU, bleomicina, busulfán intravenoso, busulfán oral, capecitabina (Xeloda), carboplatino, carmustina, CCNU, celecoxib, clorambucilo, cisplatino, cladribina, ciclosporina A, citarabina, arabinósido de citosina, daunorubicina, Cytoxan, daunorubicina, dexametasona, dexrazoxana, docetaxel, doxorubicina, doxorubicina, DTIC, epirubicina, estramustina, fosfato de

etopósido, etopósido y VP-16, exemestano, FK506, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, gemcitabina (Gemzar), gemtuzumab-ozogamicina, acetato de goserelina, Hydrea, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón, irinotecán (Campostar, CPT-111), letrozol, leucovorina, leustatina, leuprolida, levamisol, litretinoína, megastrol, melfalán, L-PAM, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, paclitaxel, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfimer sodio, prednisona, rituxan, estreptozocina, STI-571, tamoxifeno, taxotere, temozolamida, tenipósido, VM-26, topotecán (Hycamtin), toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, velban, vinblastina, vincristina, VP16 y vinorelbina. Otros ejemplos de fármacos de oncología que pueden usarse son elipticina y análogos o derivados de elipticina, epotilonas, inhibidores de cinasas intracelulares y camptotecinas.

En una realización preferida, el agente activo es un ácido nucleico, tal como un ARNip. Por ejemplo, el agente activo puede ser un ácido nucleico codificado con un producto de interés, que incluye, pero no se limita a, ARN, oligonucleótido antisentido, un antagomir, un ADN, un plásmido, un ARN ribosómico (ARNr), un microARN (miARN) (por ejemplo, un miARN que es monocatenario y 17-25 nucleótidos de longitud), ARN de transferencia (ARNt), un ARN interferente pequeño (ARNip), ARN nuclear pequeño (ARNnp), antígenos, fragmentos de los mismos, proteínas, péptidos, vacunas y moléculas pequeñas o mezclas de los mismos. En una realización más preferida, el ácido nucleico es un oligonucleótido (por ejemplo, 15-50 nucleótidos de longitud (o 15-30 o 20-30 nucleótidos de longitud)). Un ARNip puede tener, por ejemplo, una región de dúplex que tiene 16-30 nucleótidos de longitud. En otra realización, el ácido nucleico es un oligonucleótido inmunoestimulante, oligonucleótido de señuelo, supermir, mimético de miARN o inhibidor de miARN. Un supermir se refiere a un oligómero monocatenario, bicatenario o parcialmente bicatenario, o polímero de ácido ribonucleico (ARN), o ácido desoxirribonucleico (ADN), o ambos, o modificaciones de los mismos, que tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a un miARN y que es antisentido con respecto a su diana. Los miméticos de miARN representan una clase de moléculas que puede usarse para imitar la capacidad de silenciamiento génico de uno o más miARN. Así, el término "miméticos de microARN" se refiere a ARN no codificantes sintéticos (es decir, el miARN no se obtiene por purificación de una fuente del miARN endógeno) que son capaces de entrar en la vía de iARN y regular la expresión génica.

El ácido nucleico que está presente en un partícula de lípido-ácido nucleico puede ser de cualquier forma. El ácido nucleico puede, por ejemplo, ser ADN o ARN monocatenario, o ADN o ARN bicatenario, o híbridos de ADN-ARN. Ejemplos no limitantes de ARN bicatenario incluyen ARNip. Ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN y oligonucleótidos formadores de tríplex. Las partículas de lípido de la presente invención también pueden administrar ácidos nucleicos que están conjugados con uno o más ligandos.

Composiciones farmacéuticas

Las partículas de lípido, particularmente cuando se asocian a un agente terapéutico, pueden formularse como una composición farmacéutica, por ejemplo, que comprende además un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica o tampón fosfato, seleccionado según la vía de administración y práctica farmacéutica estándar.

En ciertas realizaciones, se describen composiciones para la administración de moléculas de ARNip. Estas composiciones son eficaces en regular por disminución los niveles de proteína y/o niveles de ARNm de proteínas diana. La actividad de estas composiciones puede influirse por la presencia de lípidos catiónicos y la relación molar de lípido catiónico en la formulación.

En realizaciones particulares, composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas de lípido-ácido nucleico se preparan según técnicas convencionales y comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Generalmente, se empleará solución salina normal como el vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, 0,9 % de solución salina, 0,3 % de glicina, y similares, que incluyen glucoproteínas para estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En composiciones que comprenden solución salina u otros vehículos que contienen sal, el vehículo se añade preferentemente tras la formación de las partículas de lípido. Así, después de formarse las composiciones de lípido-ácido nucleico, las composiciones pueden diluirse en vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina normal.

Las preparaciones farmacéuticas resultantes pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Las disoluciones acuosas pueden entonces envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, siendo la preparación liofilizada combinada con una disolución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como ajuste del pH y agentes de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Adicionalmente, la suspensión lipídica puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen a los lípidos contra los daños por radicales libres y peroxidativos de lípidos tras el almacenamiento. Son adecuados extintores de radicales libres lipófilos, tales como α -tocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina.

La concentración de partícula de lípido o partícula de lípido-ácido nucleico en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 0,01 %, normalmente a o al menos aproximadamente el 0,05-5 % a tanto como del 10 al 30 % en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para reducir la carga de fluido asociada al tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardíaca congestiva asociada a aterosclerosis o hipertensión grave. Alternativamente, pueden diluirse complejos compuestos de lípidos irritantes a bajas concentraciones para reducir la inflamación en el sitio de administración. En un grupo de realizaciones, el ácido nucleico tendrá una marca unida y se usará para diagnosticar (indicando la presencia de ácido nucleico complementario). En este caso, la cantidad de complejos administrados dependerá de la marca particular usada, el estado de enfermedad que se diagnostica y el criterio del profesional clínico, pero generalmente estará entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.

Como se observa anteriormente, las partículas de lípido-agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) pueden incluir fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida o lípidos modificados con gangliósido G_{M1} u otros lípidos eficaces para prevenir o limitar la agregación. La adición de tales componentes no previene simplemente la agregación de complejos. Más bien, también proporciona un medio para aumentar la vida en circulación y aumentar la administración de la composición de lípido-ácido nucleico a los tejidos diana.

También pueden proporcionarse composiciones de lípido-agente terapéutico en forma de kit. El kit normalmente comprenderá un recipiente que está compartimentalizado para contener los diversos elementos del kit. El kit contendrá las partículas o composiciones farmacéuticas, preferentemente en forma deshidratada o concentrada, con instrucciones para su rehidratación o dilución y administración. En ciertas realizaciones, las partículas comprenden el agente activo, mientras que en otras realizaciones, no.

Métodos de fabricación

Métodos de preparación de lípidos catiónicos, partículas de lípido que los contienen y composiciones farmacéuticas que contienen los lípidos catiónicos y/o partículas de lípido se describen en, por ejemplo, las publicaciones internacionales N.º WO 2010/054406, WO 2010/054401, WO 2010/054405 y WO 2010/054384, documentos WO 2010/042877, WO 2010/129709, WO 2009/086558 y WO 2008/042973, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

Métodos de preparación de partículas de lípido y composiciones farmacéuticas que contienen las partículas de lípido también se describen en, por ejemplo, las publicaciones de EE.UU. N.º 2004/0142025, 2006/0051405 y 2007/0042031, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Además, se describen métodos de preparación de partículas de lípido, que incluyen aquellos asociados a un agente terapéutico, por ejemplo, un ácido nucleico. En los métodos descritos en el presente documento, una mezcla de lípidos se combina con una disolución acuosa tamponada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado en partículas de lípido. En una realización, los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una relación de ácido nucleico/lípido de aproximadamente el 3 % en peso a aproximadamente el 25 % en peso, preferentemente del 5 al 15 % en peso. La mezcla intermedia puede dimensionarse opcionalmente para obtener partículas de ácido nucleico encapsulado en lípido en las que las porciones de lípido son vesículas unilaminares, preferentemente que tienen un diámetro de 30 a 150 nm, más preferentemente aproximadamente 40 a 90 nm. El pH se aumenta entonces para neutralizar al menos una porción de las cargas superficiales sobre las partículas de lípido-ácido nucleico, proporcionando así una composición de lípido-ácido nucleico encapsulado al menos parcialmente neutralizada en la superficie.

Por ejemplo, en una realización, se prepara una disolución de uno o más lípidos (incluyendo un lípido catiónico de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento) en una disolución orgánica (por ejemplo, etanol). Similarmente, se prepara una disolución de uno o más agentes activos (terapéuticos) (tal como, por ejemplo, una molécula de ARNip o una mezcla molar 1:1 de dos moléculas de ARNip) en una disolución acuosa tamponada (por ejemplo, tampón citrato). Las dos disoluciones se mezclan y se diluyen para formar una suspensión coloidal de partículas de lípido de ARNip. En una realización, las partículas de lípido de ARNip tienen un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 80-90 nm. En realizaciones adicionales, la dispersión puede filtrarse a través de filtros de 0,45/2 micrómetros, concentrarse y diafiltrarse por filtración de flujo tangencial. En otra realización, la concentración del producto resultante se ajusta a aproximadamente 2 mg/ml. En otra realización, el producto se esteriliza por filtración, se filtra asépticamente y se envasa. Como se ha descrito anteriormente, varios de estos lípidos catiónicos son aminolípidos que se cargan a un pH inferior al pK_a del grupo amino y sustancialmente neutro a un pH por encima del pK_a . Estos lípidos catiónicos se llaman lípidos catiónicos valorables y pueden usarse en las formulaciones usando un proceso de dos etapas. Primero, pueden formarse vesículas de lípido al pH más bajo con lípidos catiónicos valorables y otros componentes de vesícula en presencia de ácidos nucleicos. De este modo, las vesículas encapsularán y atraparán los ácidos nucleicos. Segundo, la carga superficial de las vesículas recientemente formadas puede neutralizarse aumentando el pH del medio a un nivel por encima del pK_a de los lípidos catiónicos valorables presentes, es decir, a un pH fisiológico o más alto. Aspectos de este proceso particularmente ventajoso incluyen tanto la fácil eliminación de cualquier ácido nucleico adsorbido en la superficie

como un vehículo de administración de ácido nucleico resultante que tiene una superficie neutra. Se espera que liposomas o partículas de lípido que tienen una superficie neutral eviten la rápida eliminación de la circulación y prevengan ciertas toxicidades que están asociadas a las preparaciones de liposomas catiónicos. Detalles adicionales referentes a estos usos de tales lípidos catiónicos valorables en la formulación de partículas de ácido nucleico-lípido se proporcionan en la patente de EE.UU. 6.287.591 y la patente de EE.UU. 6.858.225, incorporadas en el presente documento por referencia.

Se indica además que las vesículas formadas de este modo proporcionan formulaciones de tamaño de vesícula uniforme con alto contenido de ácidos nucleicos. Adicionalmente, las vesículas pueden tener un intervalo de tamaño de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 nm, más preferentemente aproximadamente 30 a aproximadamente 90 nm.

Sin pretender quedar ligado por teoría particular alguna, se cree que la eficiencia muy alta de la encapsulación de ácido nucleico es un resultado de la interacción electrostática a pH bajo. A pH ácido (por ejemplo, pH 4,0), la superficie de vesícula se carga y se une a la porción de los ácidos nucleicos mediante interacciones electrostáticas. Cuando el tampón ácido externo se intercambia por un tampón más neutro (por ejemplo, pH 7,5), se neutraliza la superficie de la partícula de lípido o liposoma, permitiendo que se elimine cualquier ácido nucleico externo. Más información detallada sobre el proceso de formulación se proporciona en diversas publicaciones (por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.287.591 y la patente de EE.UU. 6.858.225).

En vista de lo anterior, se describen métodos de preparación de formulaciones de lípido/ácido nucleico. En los métodos descritos en el presente documento, se combina una mezcla de lípidos con una disolución acuosa tamponada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado en partículas de lípido, por ejemplo, en la que los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una relación de ácido nucleico/lípido de aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 20 % en peso. La mezcla intermedia puede dimensionarse opcionalmente para obtener partículas de ácido nucleico encapsulado en lípido en las que las porciones de lípido son vesículas unilaminares, preferentemente que tienen un diámetro de 30 a 150 nm, más preferentemente aproximadamente 40 a 90 nm. El pH se aumenta entonces para neutralizar al menos una porción de las cargas superficiales sobre las partículas de lípido-ácido nucleico, proporcionando así una composición de ácido nucleico encapsulado al menos parcialmente neutralizada en la superficie.

En ciertas realizaciones, la mezcla de lípidos incluye al menos dos componentes de lípido: un primer componente de lípido que está seleccionado de entre lípidos que tienen un pK_a de forma que el lípido sea catiónico a pH por debajo del pK_a y neutro a pH por encima del pK_a , y un segundo componente de lípido que está seleccionado de entre lípidos que previenen la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-ácido nucleico. En realizaciones particulares, el aminolípido es un lípido catiónico.

En la preparación de las partículas de ácido nucleico-lípido, la mezcla de lípidos normalmente es una disolución de lípidos en un disolvente orgánico. Esta mezcla de lípidos puede entonces secarse para formar una película delgada o liofilizarse para formar un polvo antes de ser hidratada con un tampón acuoso para formar liposomas. Alternativamente, en un método preferido, la mezcla de lípidos puede solubilizarse en un alcohol miscible en agua, tal como etanol, y añadirse esta disolución etanólica a un tampón acuoso que produce la formación de liposomas espontánea. En la mayoría de las realizaciones, el alcohol se usa en la forma en la que está comercialmente disponible. Por ejemplo, puede usarse etanol como etanol absoluto (100 %), o como 95 % de etanol, siendo el resto agua. Este método se describe en más detalle en la patente de EE.UU. 5.976.567).

En una realización a modo de ejemplo, la mezcla de lípidos es una mezcla de lípidos catiónicos, lípidos neutros (distintos de un lípido catiónico), un esteroles (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-DMG o PEG-DMA) en un disolvente de alcohol. En realizaciones preferidas, la mezcla de lípidos consiste esencialmente en un lípido catiónico, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG en alcohol, más preferentemente etanol. En realizaciones preferidas adicionales, la primera disolución consiste en la mezcla de lípidos anterior en relaciones molares de aproximadamente el 20-70 % de lípido catiónico: 5-45 % de lípido neutro:20-55 % de colesterol:0,5-15 % de lípido modificado con PEG. En todavía realizaciones preferidas adicionales, la primera disolución consiste esencialmente en una mezcla de lípidos catiónicos elegida de los lípidos descritos en las Tablas 1-5, DSPC, Col y PEG-DMG o PEG-DMA, más preferentemente en una relación molar de aproximadamente el 20-60 % de lípido catiónico: 5-25 % de DSPC:25-55 % de Col:0,5-15 % de PEG-DMG o PEG-DMA. En realizaciones particulares, la relación de lípidos molar es aproximadamente 40/10/40/10 (% en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones preferidas, el lípido neutro en estas composiciones se sustituye por POPC, DPPC, DOPE o SM.

La mezcla de lípidos se combina con una disolución acuosa tamponada que puede contener los ácidos nucleicos. La disolución acuosa tamponada es normalmente una disolución en la que el tampón tiene un pH inferior al pK_a del lípido protonable en la mezcla de lípidos. Ejemplos de tampones adecuados incluyen citrato, fosfato, acetato y MES. Un tampón particularmente preferido es tampón citrato. Tampones preferidos estarán en el intervalo de 1-1000 mM del anión, dependiendo de la química del ácido nucleico que se encapsula, y la optimización de la concentración de tampón puede ser significativa para lograr altos niveles de carga (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU.

6.287.591 y la patente de EE.UU. 6.858.225, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad). Alternativamente, puede ser útil agua pura acidificada a pH 5-6 con cloruro, sulfato o similares. En este caso, puede ser adecuado añadir 5 % de glucosa, u otro soluto no iónico que equilibrará el potencial osmótico a través de la membrana de partícula cuando las partículas se dialicen para eliminar etanol, aumentar el pH, o mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina normal. La cantidad de ácido nucleico en tampón puede variar, pero normalmente será de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, más preferentemente de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml.

Se combina la mezcla de lípidos y la disolución acuosa tamponada de ácidos nucleicos terapéuticos para proporcionar una mezcla intermedia. La mezcla intermedia normalmente es una mezcla de partículas de lípido que tienen ácidos nucleicos encapsulados. Adicionalmente, la mezcla intermedia también puede contener alguna porción de ácidos nucleicos que están unidos a la superficie de las partículas de lípido (liposomas o vesículas de lípido) debido a la atracción iónica de los ácidos nucleicos negativamente cargados y lípidos positivamente cargados sobre la superficie de la partícula de lípido (los aminolípidos u otro lípido que constituye el primer componente de lípido protonable están positivamente cargados en un tampón que tiene un pH inferior al pK_a del grupo protonable sobre el lípido). En un grupo de realizaciones preferidas, la mezcla de lípidos es una disolución en alcohol de lípidos y los volúmenes de cada una de las disoluciones se ajustan de manera que tras la combinación, el contenido de alcohol resultante sea de aproximadamente el 20 % en volumen a aproximadamente el 45 % en volumen. El método de combinación de las mezclas puede incluir cualquiera de una variedad de procesos, que frecuentemente dependen de la escala de formulación producida. Por ejemplo, cuando el volumen total es aproximadamente 10-20 ml o menos, las disoluciones pueden combinarse en un tubo de ensayo y agitarse juntas usando una mezcladora de vórtex. Pueden llevarse a cabo procesos a gran escala en material de vidrio a escala de producción adecuada.

Opcionalmente, los complejos de agente terapéutico encapsulado en lípido (por ejemplo, ácido nucleico) que se producen combinando la mezcla de lípidos y la disolución acuosa tamponada de agentes terapéuticos (ácidos nucleicos) pueden dimensionarse para lograr un intervalo de tamaño deseado y distribución relativamente estrecha de tamaños de partícula de lípido. Preferentemente, las composiciones proporcionadas en el presente documento se dimensionarán a un diámetro medio de aproximadamente 70 a aproximadamente 200 nm, más preferentemente aproximadamente 90 a aproximadamente 130 nm. Están disponibles varias técnicas para dimensionar los liposomas un tamaño deseado. Un método de dimensionamiento se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.737.323, incorporada en el presente documento por referencia. La sonicación de una suspensión de liposomas tanto por sonicación en baño como por sonda produce una reducción de tamaño progresiva hasta vesículas unilaminares pequeñas (SUV) inferiores a aproximadamente 0,05 micrómetros de tamaño. La homogenización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar liposomas grandes en más pequeños. En un procedimiento de homogenización típico, se recirculan vesículas multilaminares a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposoma seleccionados, normalmente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula puede monitorizarse por determinación del tamaño de partícula de haz de láser convencional. Para ciertos métodos en el presente documento, se usa extrusión para obtener un tamaño de vesícula uniforme.

La extrusión de composiciones de liposoma través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica produce una distribución de tamaño relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión se recircula a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño del complejo de liposoma deseada. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de poro sucesivamente más pequeñas, para lograr una reducción gradual en el tamaño de liposoma. En algunos casos, las composiciones de lípido-ácido nucleico que se forman puede usarse sin ningún dimensionamiento.

En realizaciones particulares, métodos comprenden además una etapa de neutralizar al menos algunas de las cargas superficiales sobre las porciones de lípido de las composiciones de lípido-ácido nucleico. Neutralizando al menos parcialmente las cargas superficiales, el ácido nucleico no encapsulado se libera de la superficie de la partícula de lípido y puede eliminarse de la composición usando técnicas convencionales. Preferentemente, ácidos nucleicos no encapsulados y adsorbidos en la superficie se eliminan de las composiciones resultantes a través de intercambio de disoluciones de tampón. Por ejemplo, la sustitución de un tampón citrato (pH aproximadamente 4,0, usado para formar las composiciones) con una solución salina tamponada con HEPES (HBS, pH aproximadamente 7,5), produce la neutralización de la superficie del liposoma y liberación de ácidos nucleicos de la superficie. El ácido nucleico liberado puede entonces eliminarse por cromatografía usando métodos convencionales, y entonces se cambia en un tampón con un pH por encima del pK_a del lípido usado.

Opcionalmente, pueden formarse vesículas de lípido (es decir, partículas de lípido) por hidratación en un tampón acuoso y dimensionarse usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente antes de la adición del ácido nucleico. Como se ha descrito anteriormente, el tampón acuoso debe ser de un pH inferior al pK_a del aminolípido. Entonces puede añadirse una disolución de los ácidos nucleicos a estas vesículas preformadas dimensionadas. Para permitir la encapsulación de ácidos nucleicos en tales vesículas "pre-formadas", la mezcla debe contener un alcohol, tal como etanol. En el caso de etanol, debe estar presente a una concentración de aproximadamente el 20 % (peso/peso) a aproximadamente el 45 % (peso/peso). Además, puede ser necesario calentar la mezcla de vesículas pre-formadas y ácido nucleico en la mezcla de tampón acuoso-etanol a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 50 °C dependiendo de la composición de las vesículas de lípido y la

naturaleza del ácido nucleico. Será evidente para un experto habitual en la materia que la optimización del proceso de encapsulación para lograr un nivel deseado de ácido nucleico en las vesículas de lípido requerirá la manipulación de variables tales como concentración de etanol y temperatura. Ejemplos de condiciones adecuadas para la encapsulación de ácidos nucleicos se proporcionan en los ejemplos. Una vez los ácidos nucleicos están encapsulados dentro de las vesículas preformadas, el pH externo puede aumentarse para neutralizar al menos parcialmente la carga superficial. Entonces pueden eliminarse ácidos nucleicos adsorbidos no encapsulados y de superficie como se ha descrito anteriormente.

Métodos de tratamiento

Las partículas de lípido y composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para una variedad de fines, que incluyen la administración de agentes terapéuticos asociados o encapsulados a células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto en necesidad del mismo pueden incluir poner en contacto el sujeto con una partícula de lípido asociada a un agente terapéutico adecuado.

Como se describe en el presente documento, las partículas de lípido son particularmente útiles para la administración de ácidos nucleicos, que incluyen, por ejemplo, moléculas de ARNip y plásmidos. Por tanto, las partículas de lípido y composiciones pueden usarse para modular la expresión de genes diana y proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una partícula de lípido asociada a un ácido nucleico que reduce la expresión del gen diana (por ejemplo, un ARNip) o un ácido nucleico que puede usarse para aumentar la expresión de una proteína deseada (por ejemplo, un plásmido que codifica la proteína deseada).

Las partículas de lípido pueden usarse para administrar un agente terapéutico a una célula, *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones particulares, el agente terapéutico es un ácido nucleico, que se administra a una célula usando partículas de ácido nucleico-lípido. Aunque la siguiente descripción de diversos métodos de uso de las partículas de lípido y composiciones farmacéuticas relacionadas se ejemplifica por descripción relacionada con partículas de ácido nucleico-lípido, se entiende que estos métodos y composiciones pueden ser fácilmente adaptados para la administración de cualquier agente terapéutico para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que se beneficiaría de tal tratamiento.

En ciertas realizaciones, se describen métodos de introducción de un ácido nucleico en una célula. Ácidos nucleicos preferidos para la introducción en células son ARNip, oligonucleótidos inmunoestimulantes, plásmidos, antisentido y ribozimas. Estos métodos pueden llevarse a cabo poniendo en contacto las partículas o composiciones con las células durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la administración intracelular.

Las composiciones pueden adsorberse a casi cualquier tipo de célula. Una vez adsorbidas, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden tanto ser endocitosadas por una porción de las células, intercambiar lípidos con membranas celulares, o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la porción de ácido nucleico del complejo puede tener lugar mediante una cualquiera de estas vías. Sin pretender limitarse, se cree que en el caso de partículas absorbidas en la célula por endocitosis, las partículas interaccionan entonces con la membrana endosómica, produciendo la desestabilización de la membrana endosómica, posiblemente por formación de fases no bicapa, produciendo la introducción del ácido nucleico encapsulado en el citoplasma celular. Similarmente, en el caso de fusión directa de las partículas con la membrana plasmática celular, cuando tiene lugar la fusión, la membrana de liposoma se integra en la membrana celular y el contenido del liposoma se combina con el fluido intracelular. El contacto entre las células y las composiciones de lípido-ácido nucleico, cuando se lleva a cabo *in vitro*, tendrá lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de composiciones puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero está generalmente entre aproximadamente 1 μmol y aproximadamente 10 mmoles. En ciertas realizaciones, el tratamiento de las células con las composiciones de lípido-ácido nucleico generalmente se llevará a cabo a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37 °C) durante periodos de tiempo de aproximadamente 1 a 24 horas, preferentemente de aproximadamente 2 a 8 horas. Para aplicaciones *in vitro*, la administración de ácidos nucleicos puede ser a cualquier célula cultivada en cultivo, tanto de origen de planta como animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas, las células serán células de animales, más preferentemente células de mamífero, y lo más preferentemente células humanas.

En un grupo de realizaciones, se añade una suspensión de partículas de lípido-ácido nucleico al 60-80 % de células en placa confluentes que tienen una densidad celular de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/ml, más preferentemente aproximadamente 2×10^4 células/ml. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferentemente de aproximadamente 0,01 a 20 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$.

En otra realización, las partículas de lípido pueden ser usadas para administrar un ácido nucleico a una célula o línea celular (por ejemplo, una línea de células tumorales). Ejemplos no limitantes de tales líneas celulares incluyen: HELA (Cat ATCC N.º: CCL-2), KB (Cat ATCC N.º: CCL-17), HEP3B (Cat ATCC N.º: HB-8064), SKOV-3 (Cat ATCC N.º: HTB-77), HCT-116 (Cat ATCC N.º: CCL-247), HT-29 (Cat ATCC N.º: HTB-38), PC-3 (Cat ATCC N.º: CRL-1435), A549 (Cat ATCC N.º: CCL-185), MDA-MB-231 (Cat ATCC N.º: HTB-26).

Aplicaciones típicas incluyen usar procedimientos muy conocidos para proporcionar administración intracelular de ARNip para inactivar o silenciar dianas celulares específicas. Alternativamente, aplicaciones incluyen administración de ADN o secuencias de ARNm que codifican polipéptidos terapéuticamente útiles. De este modo, se proporciona terapia para enfermedades genéticas suministrando productos génicos deficientes o ausentes (es decir, para distrofia de Duchenne, véase Kunkel, et al., Brit. Med. Bull. 45(3):630-643 (1989), y para fibrosis quística, véase Goodfellow, Nature 341:102-103 (1989)). Otros usos para las composiciones incluyen introducción de oligonucleótidos antisentido en células (véase, Bennett, et al., Mol. Pharm. 41:1023-1033 (1992)).

Alternativamente, las composiciones también pueden usarse para la administración de ácidos nucleicos a células *in vivo*, usando métodos que son conocidos para aquellos expertos en la materia. Con respecto a la administración de ADN o secuencias de ARNm, Zhu, et al., Science 261:209-211 (1993), incorporado en el presente documento por referencia, describe la administración intravenosa de plásmido de expresión de citomegalovirus (CMV)-cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) usando complejos de DOTMA-DOPE. Hyde, et al., Nature 362:250-256 (1993), incorporado en el presente documento por referencia, describe la administración del gen regulador de la conductancia transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR) a epitelios de las vías respiratorias y a alveolos en el pulmón de ratones, usando liposomas. Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278-281 (1989), incorporado en el presente documento por referencia, describe la transfección *in vivo* de pulmones de ratones con un gen procarionota funcionante que codifica la enzima intracelular, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Así, las composiciones pueden usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Para la administración *in vivo*, las composiciones farmacéuticas se administran preferentemente por vía parenteral, es decir, por vía intrarticular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, o por vía intramuscular. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o por vía intraperitoneal por una inyección en bolo. Para un ejemplo, véase Stadler, et al., patente de EE.UU. N.º 5.286.634, que se incorpora en el presente documento por referencia. También se ha tratado la administración de ácido nucleico intracelular en Straubinger, et al., Methods in Enzymology, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Mannino, et al., Biotechniques 6:682-690 (1988); Nicolau, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:239-271 (1989), y Behr, Acc. Chem. Res. 26:274-278 (1993). Todavía otros métodos de administración de terapéuticos basados en lípidos se describen en, por ejemplo, Rahman et al., patente de EE.UU. N.º 3.993.754; Sears, patente de EE.UU. N.º 4.145.410; Papahadjopoulos et al., patente de EE.UU. N.º 4.235.871; Schneider, patente de EE.UU. N.º 4.224.179; Lenk et al., patente de EE.UU. N.º 4.522.803; y Fountain et al., patente de EE.UU. N.º 4.588.578.

En otros métodos, las preparaciones farmacéuticas pueden ponerse en contacto con el tejido diana por aplicación directa de la preparación al tejido. La aplicación puede prepararse por procedimientos tópicos, "abiertos" o "cerrados". Por "tópico" se indica la aplicación directa de la preparación farmacéutica a un tejido expuesto al entorno, tal como la piel, orofaringe, canal auditivo externo, y similares. Procedimientos "abiertos" son aquellos procedimientos que incluyen hacer una incisión de la piel de un paciente y visualizar directamente el tejido subyacente al que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Esto se realiza generalmente mediante un procedimiento quirúrgico, tal como una toracotomía para acceder a los pulmones, laparotomía abdominal para acceder a la víscera abdominal, u otro enfoque quirúrgico directo para el tejido diana. Procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos diana internos no se visualizan directamente, pero se accede insertando instrumentos a través de heridas de pequeñas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden administrarse al peritoneo por lavado con aguja. Asimismo, las preparaciones farmacéuticas pueden administrarse a las meninges o médula espinal por infusión durante una punción lumbar, seguido de posicionamiento apropiado del paciente como se practica comúnmente para anestesia espinal u obtención de imágenes con metrazamida de la médula espinal. Alternativamente, las preparaciones pueden administrarse mediante dispositivos endoscópicos.

Las composiciones de lípido-ácido nucleico también pueden administrarse en un aerosol inhalado en los pulmones (véase, Brigham, et al., Am. J. Sci. 298(4):278-281 (1989)) o por inyección directa en el sitio de enfermedad (Culver, Human Gene Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp. 70-71 (1994)).

Dosificaciones para las partículas de lípido-agente terapéutico dependerán de la relación de agente terapéutico con respecto al lípido y la opinión del método que administra basándose en la edad, peso y afección del paciente.

En una realización, se describe un método de modulación de la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Estos métodos generalmente comprenden poner en contacto una célula con una partícula de lípido que está asociada a un ácido nucleico capaz de modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Como se usa en el presente documento, el término "modular" se refiere a alterar la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. En diferentes realizaciones, modular puede significar aumentar o potenciar, o puede significar disminuir o reducir. Métodos de medición del nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana son conocidos y están disponibles en la materia e incluyen, por ejemplo, métodos que emplean reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y técnicas inmunohistoquímicas. En realizaciones particulares, el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana se aumenta o reduce al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o más del 50 % en comparación con un valor de control apropiado.

Por ejemplo, si se desea expresión elevada de un polipéptido, el ácido nucleico puede ser un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. Por otra parte, si se desea expresión reducida de

- 5 un polinucleótido o polipéptido, entonces el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, ARNip o microARN que comprende una secuencia de polinucleótidos que se hibrida específicamente con un polinucleótido que codifica el polipéptido diana, alterando así la expresión del polinucleótido o polipéptido diana. Alternativamente, el ácido nucleico puede ser un plásmido que expresa un oligonucleótido antisentido tal, ARNip o microARN.
- 10 En realizaciones particulares, el agente terapéutico está seleccionado de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN o un oligonucleótido antisentido, y en el que el ARNip, microARN o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo, de forma que se reduzca la expresión del polipéptido.
- En otras realizaciones, el ácido nucleico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, de forma que aumente la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento del mismo.
- 15 En realizaciones relacionadas, un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión en exceso de un polipéptido en un sujeto incluye proporcionar al sujeto una composición farmacéutica, en las que el agente terapéutico está seleccionado de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN o un oligonucleótido antisentido, y en las que el ARNip, microARN o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.
- 20 En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula de lípido que consiste en o consiste esencialmente en una mezcla de lípidos catiónicos elegida de los lípidos descritos en las Tablas 1-5, DSPC, Col y PEG-DMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de aproximadamente el 20-60 % de lípido catiónico: 5-25 % de DSPC:25-55 % de Col:0,5-15 % de PEG-DMG o PEG-DMA, en la que la partícula de lípido está asociada con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la relación de lípidos molar es aproximadamente
- 25 40/10/40/10 (% en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípido catiónico/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se sustituye por POPC, DPPC, DOPE o SM.
- En otra realización relacionada, un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por subexpresión de un polipéptido en un sujeto incluye proporcionar al sujeto una composición farmacéutica, en la que el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.
- Un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto puede incluir proporcionar al sujeto la composición farmacéutica, en el que el agente terapéutico es un oligonucleótido inmunoestimulante. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral o mucosa.
- 35 En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica se proporciona al sujeto en combinación con una vacuna o antígeno. Así, las vacunas pueden incluir una partícula de lípido, que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante, y también está asociado a un antígeno al que se desea una respuesta inmunitaria. En realizaciones particulares, el antígeno es un antígeno de tumor o está asociado con un agente infeccioso, tal como, por ejemplo, un virus, bacteria o parásito.
- 40 Una variedad de antígenos de tumor, antígenos de agente de infección y antígenos asociados a otra enfermedad son muy conocidos en la técnica y ejemplos de éstos se describen en referencias citadas en el presente documento. Ejemplos de antígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígenos de polipéptido y antígenos de ADN. Ejemplos específicos de antígenos son antígenos de hepatitis A, hepatitis B, viruela, poliomielitis, carbunco, gripe, tífus, tétanos, sarampión, rotavirus, difteria, pertussis, tuberculosis y rubeola. En una realización preferida, el
- 45 antígeno es un antígeno recombinante de la hepatitis B. En otros aspectos, el antígeno es un antígeno recombinante de la hepatitis A. En otro aspecto, el antígeno es un antígeno de tumor. Ejemplos de tales antígenos asociados a tumor son MUC-1, antígeno de EBV y antígenos asociados a linfoma de Burkitt. En un aspecto adicional, el antígeno es un antígeno de proteína relacionada con tirosinasa de antígeno recombinante de tumor. Aquellos expertos en la materia conocerán otros antígenos adecuados para su uso.
- 50 Antígenos asociados a tumor adecuados para su uso incluyen tanto moléculas mutadas como no mutadas que pueden ser indicativas de tipo de tumor único, compartido entre varios tipos de tumores, y/o exclusivamente expresados o expresados en exceso en células tumorales en comparación con células normales. Además de las proteínas y glucoproteínas, también se han documentado patrones de expresión específicos de tumor de hidratos de carbono, gangliósidos, glicolípidos y mucinas. Antígenos asociados a tumor a modo de ejemplo para su uso en las
- 55 vacunas contra el cáncer objeto incluyen productos de proteína de oncogenes, genes supresores de tumor y otros genes con mutaciones o transposiciones únicas para células tumorales, productos génicos embrionarios reactivados, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación específicos de tejido (pero no específicos de tumor), receptores

de factores de crecimiento, residuos de hidrato de carbono de la superficie celular, proteínas virales extrañas y varias otras auto-proteínas.

Realizaciones específicas de antígenos asociados a tumor incluyen, por ejemplo, antígenos mutados tales como los productos de proteína de los proto-oncogenes Ras p21, supresor tumoral p53 y oncogenes BCR-abl, además de CDK4, MUM1, caspasa 8 y beta-catenina; antígenos expresados en exceso tales como galectina 4, galectina 9, anhidrasa carbónica, aldolasa A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 y KSA, antígenos oncofetales tales como alfa-fetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana (hCG); auto-antígenos tales como antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígenos de diferenciación de melanocitos tales como Mart 1/Melan A, gp100, gp75, tirosinasa, TRP1 y TRP2; antígenos asociados a la próstata tales como PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 y PSM-P2; productos génicos embrionarios reactivados tales como MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE, y otros antígenos de cáncer-testiculares tales como NY-ESO1, SSX2 y SCP1; mucinas tales como Muc-1 y Muc-2; gangliósidos tales como GM2, GD2 y GD3, glucolípidos neutros y glucoproteínas tales como Lewis (y) y globo-H; y glucoproteínas tales como Tn, antígeno de Thompson-Freidenreich (TF) y sTn. También están incluidos como antígenos asociados a tumor en el presente documento lisados de célula completa y de célula tumoral, además de porciones inmunogénicas de los mismos, además de idiotipos de inmunoglobulina expresados en proliferaciones monoclonales de linfocitos B para su uso contra linfomas de linfocitos B.

Los patógenos incluyen, pero no se limitan a, agentes infecciosos, por ejemplo, virus, que infectan mamíferos, y más particularmente seres humanos. Ejemplos de virus infecciosos incluyen, pero no se limitan a: *Retroviridae* (por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana, tal como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III, y otras cepas aisladas, tales como HIV-LP); *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus humanos de Coxsackie, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que producen gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola); *Flaviviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo, virus Hanta, bunyavirus, flebovirus y nairovirus); *Arenaviridae* (virus de las fiebres hemorrágicas); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polio); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus de la variolovacuna, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis no A, no B (clase 1 = internamente transmitidos; clase 2 = parenteralmente por vía parenteral (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Por tanto, sirven bacterias Gram-negativas y Gram-positivas de antígenos en animales vertebrados. Tales bacterias Gram-positivas incluyen, pero no se limitan a, especies de *Pasteurella*, especies de estafilococos y especies de estreptococos. Las bacterias Gram-negativas incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógenas, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Ejemplos adicionales de patógenos incluyen, pero no se limitan a, hongos infecciosos que infectan mamíferos, y más particularmente seres humanos. Ejemplos de hongos infecciosos incluyen, pero no se limitan a: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Ejemplos de parásitos infecciosos incluyen *Plasmodium* tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen *Toxoplasma gondii*.

En una realización, las formulaciones pueden usarse para silenciar o modular un gen diana tal como, pero no se limitan, FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen de ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen de ciclina A, gen de ciclina E, gen WNT-1, gen de beta-catenina, gen c-MET, gen PKC, gen NFkB, gen STAT3, gen de survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen de la topoisomerasa I, gen de la topoisomerasa II alfa, gen p73, gen p21(WAF1/CIP1), gen p27 (KIP 1), gen PPM ID, gen RAS, gen de caveolina I, gen MIB I, gen MTAL, gen M68, genes supresores de tumor, genes supresores de tumor p53, miembro DN-p63 de la familia p53, gen supresor de tumor pRb, gen supresor de tumor APC1, gen supresor de

- tumor BRCA1, gen supresor de tumor PTEN, gen de fusión mLL, gen de fusión BCR/ABL, gen de fusión TEL/AML1, gen de fusión EWS/FLI1, gen de fusión TLS/FUS1, gen de fusión PAX3/FKHR, gen de fusión AML1/ETO, gen de fusión de alfa v-integrina, gen de receptor de Flt-1, gen de tubulina, gen del virus del papiloma humano, un gen requerido para la replicación del virus del papiloma humano, gen del virus de la inmunodeficiencia humana, un gen requerido para la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana, gen del virus de la hepatitis A, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis A, gen del virus de la hepatitis B, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis B, gen del virus de la hepatitis C, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis C, gen del virus de la hepatitis D, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis D, gen del virus de la hepatitis E, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis E, gen del virus de la hepatitis F, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis F, gen del virus de la hepatitis G, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis G, gen del virus de la hepatitis H, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis H, gen del virus respiratorio sincitial, un gen que se requiere para la replicación del virus respiratorio sincitial, gen del virus del herpes simple, un gen que se requiere para la replicación del virus del herpes simple, gen del citomegalovirus del herpes, un gen que se requiere para la replicación del citomegalovirus del herpes, gen del virus de herpes Epstein Barr, un gen que se requiere para la replicación del virus de herpes Epstein-Barr, gen del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, un gen que se requiere para la replicación del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, gen del virus JC, gen humano que se requiere para la replicación del virus JC, gen de mixovirus, un gen que se requiere para la replicación del gen de mixovirus, gen de rinovirus, un gen que se requiere para la replicación de rinovirus, gen de coronavirus, un gen que se requiere para la replicación de coronavirus, gen del virus del Nilo occidental, un gen que se requiere para la replicación del virus del Nilo occidental, gen de la encefalitis de San Luis, un gen que se requiere para la replicación de la encefalitis de San Luis, gen del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, un gen que se requiere para la replicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, gen del virus de la encefalitis del Valle de Murray, un gen que se requiere para la replicación del virus de la encefalitis del Valle de Murray, gen del virus del dengue, un gen que se requiere para la replicación del gen del virus del dengue, gen del virus 40 simio, un gen que se requiere para la replicación del virus 40 simio, gen del virus linfotrópico de linfocitos T humanos, un gen que se requiere para la replicación del virus linfotrópico de linfocitos T humanos, gen del virus de la leucemia murina de Moloney, un gen que se requiere para la replicación del virus de la leucemia murina de Moloney, gen del virus de la encefalomiocarditis, un gen que se requiere para la replicación del virus de la encefalomiocarditis, gen del virus del sarampión, un gen que se requiere para la replicación del virus del sarampión, gen del virus de la varicela zóster, un gen que se requiere para la replicación del virus de la varicela zóster, gen de adenovirus, un gen que se requiere para la replicación de adenovirus, gen del virus de la fiebre amarilla, un gen que se requiere para la replicación del virus de la fiebre amarilla, gen del virus de la poliomielitis, un gen que se requiere para la replicación del virus de la poliomielitis, gen de la viruela, un gen que se requiere para la replicación de viruela, gen de plasmodium, un gen que se requiere para la replicación de gen de plasmodium, gen de *Mycobacterium ulcerans*, un gen que se requiere para la replicación de *Mycobacterium ulcerans*, gen de *Mycobacterium tuberculosis*, un gen que se requiere para la replicación de *Mycobacterium tuberculosis*, gen de *Mycobacterium leprae*, un gen que se requiere para la replicación de *Mycobacterium leprae*, gen de *Staphylococcus aureus*, un gen que se requiere para la replicación de *Staphylococcus aureus*, gen de *Streptococcus pneumoniae*, un gen que se requiere para la replicación de *Streptococcus pneumoniae*, gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen que se requiere para la replicación de *Streptococcus pyogenes*, gen de *Chlamydia pneumoniae*, un gen que se requiere para la replicación de *Chlamydia pneumoniae*, gen de *Mycoplasma pneumoniae*, un gen que se requiere para la replicación de *Mycoplasma pneumoniae*, un gen de integrina, un gen de selectina, gen del sistema del complemento, gen de quimiocina, gen del receptor de quimiocina, gen GCSF, gen Gro1, gen Gro2, gen Gro3, gen PF4, gen MIG, gen de la pro-proteína básica de plaquetas, gen MIP-1I, gen MIP-1J, gen RANTES, gen MCP-1, gen MCP-2, gen MCP-3, gen CMBKR1, gen CMBKR2, gen CMBKR3, CMBKR5v, gen AIF-1, gen 1-309, un gen para un componente de un canal de iones, un gen para un receptor de neurotransmisor, un gen para un ligando de neurotransmisor, gen de la familia de amiloide, gen de presenilina, gen HD, gen DRPLA, gen SCA1, gen SCA2, gen MJD1, gen CACNL1A4, gen SCA7, gen SCA8, gen de alelo encontrado en células LOH, o un gen de alelo de un gen polimórfico.
- 50 En el presente documento se describe además un método de administración de una molécula de ácido nucleico que comprende administrar una partícula de nucleico-lípido que comprende la molécula de ácido nucleico y un lípido catiónico, teniendo el lípido catiónico
- (i) un átomo de carbono central,
 - (ii) un grupo de cabeza directamente unido al átomo central, y
 - (iii) dos colas hidrófobas directamente unidas al átomo de carbono central, comprendiendo cada cola hidrófoba un grupo alifático C₁₄ o mayor unido al átomo central, donde el grupo alifático está (a) interrumpido por un grupo biodegradable de forma que haya una cadena de al menos cuatro átomos de carbono entre el grupo biodegradable y el átomo de carbono central, o (b) incluye un grupo biodegradable en el extremo terminal de la cola hidrófoba, de forma que el lípido catiónico siga intacto hasta la administración de la molécula de ácido nucleico después de que se produzca la escisión de la cola hidrófoba *in vivo*.

Definiciones

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "lípidico catiónico" incluye aquellos lípidos que tienen una o dos cadenas de ácido graso o alifáticas grasas y un grupo de cabeza amino (incluyendo un grupo alquilamino o dialquilamino) que puede ser protonado para formar un lípido catiónico a pH fisiológico. En algunas realizaciones, un lípido catiónico se denomina un "aminolípido".
- 10 Un sujeto o paciente en el que la administración del complejo es una pauta terapéutica eficaz para una enfermedad o trastorno es preferentemente un ser humano, pero puede ser cualquier animal, que incluye un animal de laboratorio en el contexto de un ensayo clínico o experimento de cribado o de actividad. Así, como puede apreciarse fácilmente por un experto habitual en la materia, los métodos, compuestos y composiciones de la presente invención son particularmente adecuados para administración a cualquier animal, particularmente un mamífero, y que incluyen, pero ni mucho menos se limitan a, seres humanos, animales domésticos, tales como sujetos felinos o caninos, animales de granja, tales como, pero no se limitan a, sujetos bovinos, equinos, caprinos, ovinos y porcinos, animales salvajes (tanto en la naturaleza como en un zoológico), animales de investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros y gatos, especies aviares, tales como pollos, pavos y aves cantoras, es decir, para uso médico veterinario.
- 15 Muchos de los grupos químicos citados en las fórmulas genéricas anteriores se escriben en un orden particular (por ejemplo, $-OC(O)-$). Se pretende que el grupo químico se incorpore en la fórmula genérica en el orden presentado, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, una fórmula genérica de la forma $-(R)_i-(M^1)_k-(R)_m-$ donde M^1 es $-C(O)O-$ y k es 1 se refiere a $-(R)_i-C(O)O-(R)_m-$, a menos que se especifique lo contrario. Debe entenderse que cuando un grupo químico se escribe en un orden particular, también se contempla el orden inverso, a menos que se especifique de otro modo. Por ejemplo, en una fórmula genérica $-(R)_i-(M^1)_k-(R)_m-$ donde M^1 se define como $-C(O)NH-$ (es decir, $-(R)_i-C(O)-NH-(R)_m-$), también se contempla el compuesto donde M^1 es $-NHC(O)-$ (es decir, $-(R)_i-NHC(O)-(R)_m-$), a menos que se especifique de otro modo.
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "grupo biodegradable" se refiere a un grupo que incluye uno o más enlaces que pueden experimentar reacciones de rotura de enlaces en un entorno biológico, por ejemplo, en un organismo, órgano, tejido, célula u orgánulo. Por ejemplo, el grupo biodegradable puede ser metabolizable por el cuerpo de un mamífero, tal como un ser humano (por ejemplo, mediante hidrólisis). Algunos grupos que contienen un enlace biodegradable incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a ésteres, ditioles y oximas. Ejemplos no limitantes de grupos biodegradables son $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-SC(O)-$, $-C(O)S-$, $-OC(S)-$, $-C(S)O-$, $-S-S-$, $-C(R^5)=N-$, $-N=C(R^5)-$, $-C(R^5)=N-O-$, $-O-N=C(R^5)-$, $-C(O)(NR^5)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-C(S)(NR^5)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$, $-OC(O)O-$, $-OSi(R^5)_2O-$, $-C(O)(CR^2R^4)C(O)O-$ o $-OC(O)(CR^2R^4)C(O)-$.
- 25 Como se usa en el presente documento, un grupo "alifático" es un grupo no aromático en el que átomos de carbono están unidos en cadenas, y está tanto saturado como insaturado.
- 30 Los términos "alquilo" y "alquileo" se refieren a un resto de hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada. En una realización, el grupo alquilo es un hidrocarburo saturado de cadena lineal. A menos que se especifique de otro modo, el grupo "alquilo" o "alquileo" contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Grupos alquilo de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo y n-hexilo. Grupos alquilo ramificados representativos incluyen isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo e isopentilo.
- 35 El término "alqueno" se refiere a un resto de hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. En una realización, el grupo alqueno contiene 1, 2 o 3 dobles enlaces y está saturado de otro modo. A menos que se especifique de otro modo, el grupo "alqueno" contiene de 2 a 24 átomos de carbono. Grupos alqueno incluyen tanto isómeros *cis* como *trans*. Grupos alqueno de cadena lineal y ramificados representativos incluyen etileno, propileno, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutileno, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo y 2,3-dimetil-2-butenilo.
- 40 El término "alquino" se refiere a un resto de hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono. A menos que se especifique de otro modo, el grupo "alquino" contiene de 2 a 24 átomos de carbono. Grupos alquino de cadena lineal y ramificados representativos incluyen acetileno, propileno, 1-butileno, 2-butileno, 1-pentinilo, 2-pentinilo y 3-metil-1-butileno.
- 45 El término "alquino" se refiere a un resto de hidrocarburo de cadena lineal o ramificado que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono. A menos que se especifique de otro modo, el grupo "alquino" contiene de 2 a 24 átomos de carbono. Grupos alquino de cadena lineal y ramificados representativos incluyen acetileno, propileno, 1-butileno, 2-butileno, 1-pentinilo, 2-pentinilo y 3-metil-1-butileno.
- 50 El término "acilo" se refiere a un grupo carbonilo sustituido con hidrógeno, alquilo, cicloalquilo parcialmente saturado o completamente saturado, heterociclo parcialmente saturado o completamente saturado, arilo o heteroarilo. Por ejemplo, los grupos acilo incluyen grupos tales como alcanóilo (C_1-C_{20}) (por ejemplo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caproilo y t-butilacetilo), cicloalquil (C_3-C_{20})-carbonilo (por ejemplo, ciclopropilcarbonilo, ciclobutilcarbonilo, ciclopentilcarbonilo y ciclohexilcarbonilo), carbonilo heterocíclico (por ejemplo, pirrolidinilcarbonilo, pirrolid-2-on-5-carbonilo, piperidinilcarbonilo, piperazinilcarbonilo y tetrahidrofuranilcarbonilo), aroilo (por ejemplo, benzoílo) y heteroaróilo (por ejemplo, tiofenil-2-carbonilo, tiofenil-3-carbonilo, furanil-2-carbonilo, furanil-3-carbonilo, 1H-pirrol-2-carbonilo, 1H-pirrol-3-carbonilo y benzo[b]tiofenil-2-carbonilo).
- 55

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillos de hidrocarburo aromático monocíclico, bicíclico o tricíclico. A menos que se especifique de otro modo, el grupo "arilo" contiene de 6 a 14 átomos de carbono. Ejemplos de restos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, antraceno y pirenilo.

5 Los términos "cicloalquilo" y "cicloalquileno" se refieren a un resto de hidrocarburo saturado monocíclico o bicíclico tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. A menos que se especifique de otro modo, el grupo "cicloalquilo" o "cicloalquileno" contiene de 3 a 10 átomos de carbono.

El término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo unido a un grupo alquilo, donde el grupo alquilo está unido al resto de la molécula.

10 El término "heterociclo" (o "heterociclilo") se refiere a un sistema de anillos no aromático monocíclico de 5 a 8 miembros, o bicíclico de 7 a 12 miembros o tricíclico de 11 a 14 miembros que está tanto saturado como insaturado, y que contiene de 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Por ejemplo, el heterociclo puede ser un grupo cicloalcoxi. El heterociclo puede unirse al resto de la molécula mediante un heteroátomo o átomo de carbono en el heterociclo. Los heterociclos incluyen, pero no se limitan a, morfolinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo y tetrahidrotiopiranilo.

20 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillos aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 7-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, donde los heteroátomos están seleccionados de O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 o 1-9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente). Los grupos heteroarilo descritos en el presente documento también pueden contener anillos condensados que comparten un enlace carbono-carbono común.

25 El término "sustituido", a menos que se indique lo contrario, se refiere a la sustitución de uno o más radicales de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado que incluye, pero no se limita a: halógeno, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heterociclilo, tiol, alquiltio, oxo, tioxi, ariltio, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, haloalquilo, amino, trifluorometilo, ciano, nitro, alquilamino, arilamino, alquilaminoalquilo, arilaminoalquilo, aminoalquilamino, hidroxilo, alcoxialquilo, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminocarbonilalquilo, acilo, aralcoxycarbonilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfonilo, ácido fosfónico, arilo, heteroarilo, heterocíclico, y un grupo alifático. Se entiende que el sustituyente puede estar además sustituido. Sustituyentes a modo de ejemplo incluyen compuestos de amino, alquilamino, dialquilamino y amino cíclico.

35 El término "halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

Los términos "alquilamina" y "dialquilamina" se refieren a radicales -NH(alquilo) y -N(alquilo)₂, respectivamente.

El término "alquilfosfato" se refiere a -O-P(Q')(Q'')-O-R, en la que Q' y Q'' son cada uno independientemente O, S, N(R)₂, alquilo o alcoxi opcionalmente sustituido; y R es alquilo opcionalmente sustituido, ω-aminoalquilo o ω-aminoalquilo (sustituido).

40 El término "alquilfosforotioato" se refiere a un alquilfosfato en el que al menos uno de Q' o Q'' es S.

El término "alquilfosfonato" se refiere a un alquilfosfato en el que al menos uno de Q' o Q'' es alquilo.

El término "hidroxialquilo" se refiere al radical -O-alquilo.

El término "alquilheterociclo" se refiere a un alquilo donde al menos un metileno se ha sustituido con un heterociclo.

45 El término "ω-aminoalquilo" se refiere a radical -alquil-NH₂. Y el término "ω-aminoalquilo (sustituido)" se refiere a un ω-aminoalquilo en el que al menos uno del H en el N se ha sustituido con alquilo.

El término "ω-fosfoalquilo" se refiere a -alquil-O-P(Q')(Q'')-O-R, en la que Q' y Q'' son cada uno independientemente O o S y R alquilo opcionalmente sustituido.

El término "ω-tiofosfoalquilo" se refiere a ω-fosfoalquilo en el que al menos uno de Q' o Q'' es S.

Las siguientes abreviaturas se usan en la presente solicitud:

50 DSPC: diestearoilfosfatidilcolina; DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina; POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-fosfatidilcolina; DOPE: 1,2-dioleoil-sn-3-fosfoetanolamina; PEG-DMG generalmente se refiere a 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-metoxi-polietilenglicol (por ejemplo, PEG 2000); TBDPSCI: terc-butilclorodifenilsilano; DMAP:

dimetilaminopiridina; NMO: N-óxido de N-metilmorfolina; LiHMDS: bis(trimetilsilil)amida de litio; HMPA: hexametilfosforamida; EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; DIPEA: diisopropiletamina; DCM: diclorometano; TEA: trietilamina; TBAF: fluoruro de tetrabutilamonio

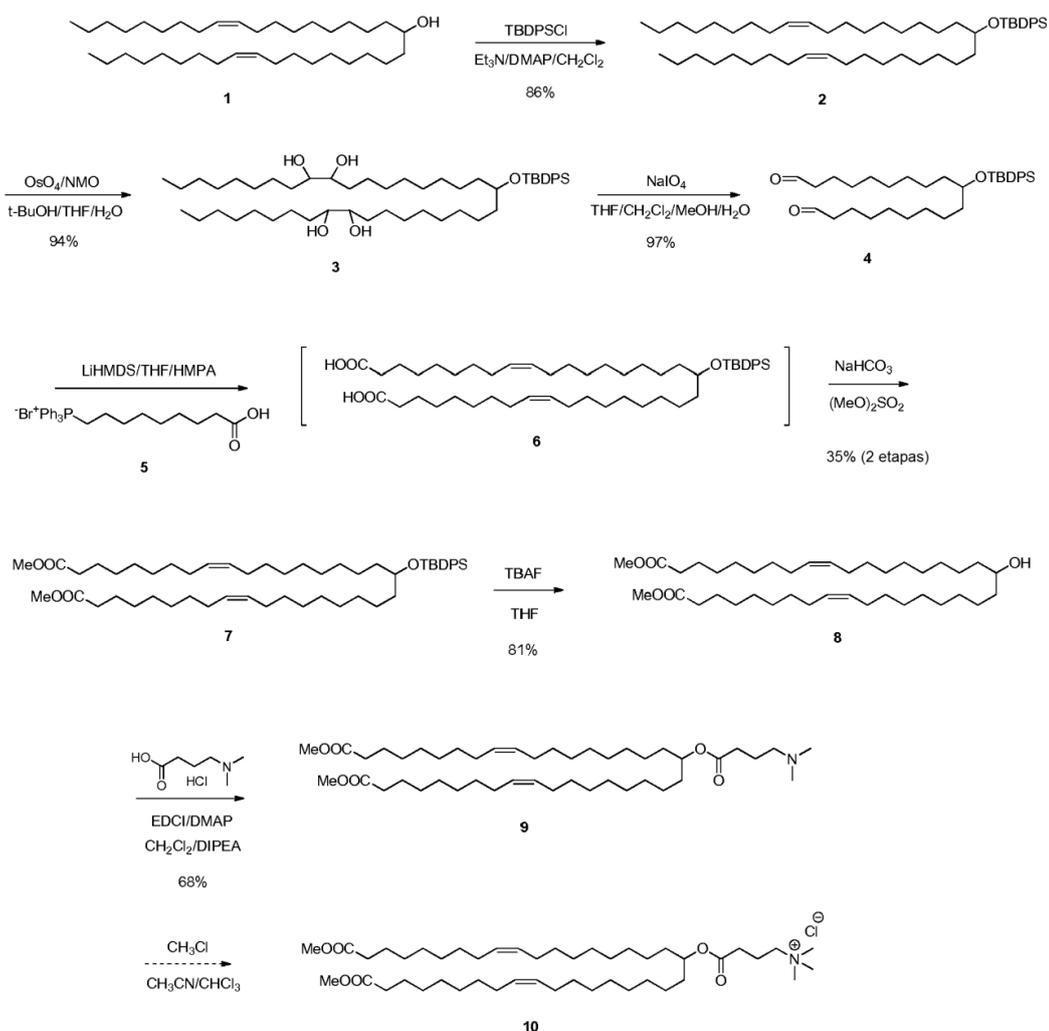
5 En algunas realizaciones, los métodos pueden requerir el uso de grupos protectores. La metodología de grupos protectores es muy conocida para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. et. al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Brevemente, los grupos protectores son cualquier grupo que reduce o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional. Un grupo protector puede añadirse a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante ciertas reacciones y entonces eliminarse para revelar el grupo funcional original. En algunas realizaciones se usa un "grupo protector de alcohol". Un "grupo protector de alcohol" es cualquier grupo que disminuya o elimine la reactividad no deseada de un grupo funcional alcohol. Pueden añadirse y eliminarse grupos protectores usando técnicas muy conocidas en la técnica.

Los compuestos pueden prepararse por al menos una de las técnicas descritas en el presente documento o técnicas de síntesis orgánica conocidas.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Esquema 1



20 **Compuesto 2:** A una disolución del compuesto **1** (10,0 g, 18,8 mmoles, véase la publicación internacional N.º WO 2010/054406) en CH₂Cl₂ (80 ml) se añadieron trietilamina (7,86 ml, 56,4 mmoles), DMAP (459 mg, 3,76 mmoles) y *tert*-butil(cloro)difenilsilano (9,62 ml, 37,6 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas. Entonces, la mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con disolución saturada acuosa de NaHCO₃. La fase orgánica se separó y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Después de la filtración y concentración, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5 % de EtOAc en hexano) proporcionando **2** (12,4 g, 16,1 mmoles,

86 %, $R_f = 0,24$ con hexano). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,66-7,68 (m, 4 H), 7,33-7,42 (m, 6 H), 5,30-5,39 (m, 4 H), 3,67-3,72 (m, 1 H), 1,97-2,04 (m, 8 H), 1,07-1,42 (m, 52 H), 1,05 (s, 9 H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 6 H).

5 **Compuesto 3:** A una disolución de **2** (12,4 g, 16,1 mmoles) en *tert*-butanol (100 ml), THF (30 ml) y H_2O (10 ml) se añadieron *N*-óxido de 4-metilmorfolina (4,15 g, 35,4 mmoles) y tetróxido de osmio (41 mg, 0,161 mg). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas, entonces se extinguió añadiendo bisulfito de sodio. Después de eliminar los disolventes mediante evaporación, el residuo se extrajo con Et_2O (500 ml) y H_2O (300 ml). La fase orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración, el bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: $\text{EtOAc} = 1:1$, $R_f = 0,49$) proporcionando **3** (12,7 g, 15,1 mmoles, 94 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,66-7,68 (m, 4 H), 7,33-7,43 (m, 6 H), 3,67-3,73 (m, 1 H), 3,57-3,62 (m, 4 H), 1,82 (t, $J = 5,0$ Hz, 4 H), 1,10-1,51 (m, 60 H), 1,04 (s, 9 H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 6 H).

10 **Compuesto 4:** A una disolución de **3** (12,6 g, 15,0 mmoles) en 1,4-dioxano (220 ml), CH_2Cl_2 (70 ml), MeOH (55 ml), y H_2O (55 ml) se añadió NaIO_4 (7,70 g, 36,0 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con Et_2O (500 ml) y H_2O (300 ml). La fase orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: $\text{EtOAc} = 9:1$, $R_f = 0,30$) proporcionando **4** (7,98 g, 14,5 mmoles, 97 %). Peso molecular para $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{NaO}_3\text{Si}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ Calc. 573,3740, Hallado 573,3.

15 **Compuesto 7:** A una disolución de **5** (véase Tetrahedron, 63, 1140-1145, 2006; 1,09 g, 2,18 mmoles) en THF (20 ml) y HMPA (4 ml) se añadió LiHMDS (disolución 1 M de THF, 4,36 ml, 4,36 mmoles) a -20 °C. La mezcla resultante se agitó durante 20 minutos a la misma temperatura, entonces se enfrió a -78 °C. Se añadió una disolución de **4** (500 mg, 0,908 mmoles) en THF (4 ml). La mezcla se agitó y se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. El análisis de EM mostró la formación del di-ácido (**6**; $\text{C}_{53}\text{H}_{85}\text{O}_5\text{Si}$ ($\text{M}-\text{H}$) $^-$ Calc. 829,6166, observado 829,5). A la mezcla, se añadieron NaHCO_3 (1,10 g, 13,1 mmoles) y sulfato de dimetilo (1,24 ml, 13,1 mmoles) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se inactivó añadiendo disolución acuosa saturada de NH_4Cl (50 ml), luego se extrajo con Et_2O (2 x 100 ml). La fase orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: $\text{EtOAc} = 9:1$, $R_f = 0,35$) proporcionando **7** (270 mg, 0,314 mmoles, 35 %). Peso molecular para $\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{NaO}_5\text{Si}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ Calc. 881,6455, Hallado 881,6484.

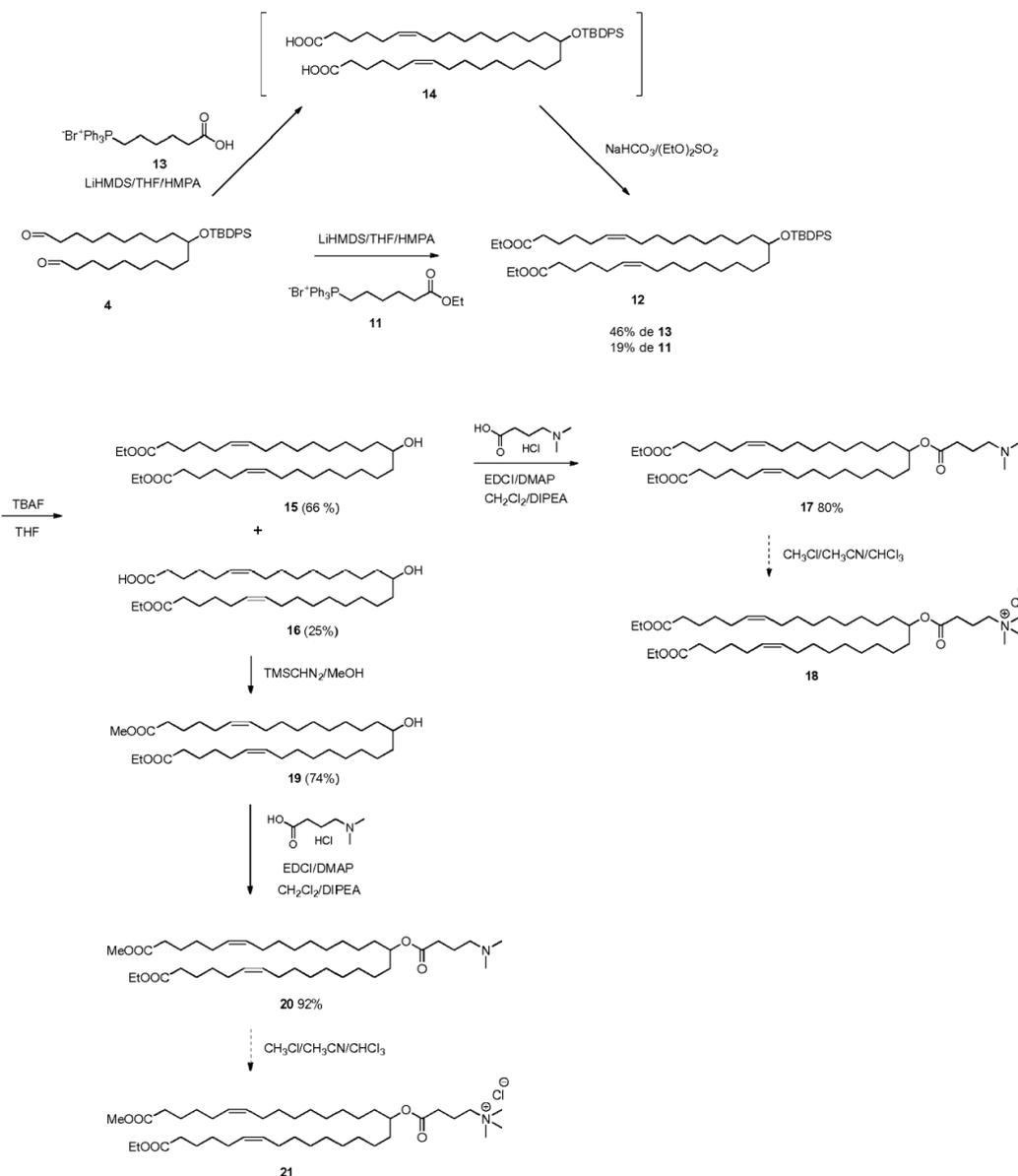
20 **Compuesto 8:** A una disolución de **7** (265 mg, 0,308 mmoles) en THF (2,5 ml) se añadió *n*-TBAF (disolución 1 M de THF, 0,555 ml, 0,555 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 14 horas a 45 °C. Después de la concentración, la mezcla se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano: $\text{EtOAc} = 3:1$, $R_f = 0,52$) proporcionando **8** (155 mg, 0,250 mmoles, 81 %). Peso molecular para $\text{C}_{39}\text{H}_{72}\text{NaO}_5$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ Calc. 643,5277, Hallado 643,5273.

25 **Compuesto 9:** A una disolución del compuesto **8** (150 mg, 0,242 mmoles) y clorhidrato de ácido 4-(dimetilamino)butírico (49 mg, 0,290 mmoles) en CH_2Cl_2 (5 ml) se añadieron diisopropiletamina (0,126 ml, 0,726 mmoles), clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (56 mg, 0,290 mmoles) y DMAP (6 mg, 0,0484 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. La mezcla de reacción se diluyó entonces con CH_2Cl_2 (100 ml) y se lavó con NaHCO_3 saturado ac. (50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5 % de MeOH en CH_2Cl_2) proporcionando el compuesto **9** (121 mg, 0,165 mmoles, 68 %, $R_f = 0,25$ desarrollado con 5 % de MeOH en CH_2Cl_2). Peso molecular para $\text{C}_{45}\text{H}_{84}\text{NO}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ Calc. 734,6299, Hallado 734,5.

30 **Compuesto 10:** El tratamiento del compuesto **9** con CH_3Cl en CH_3CN y CHCl_3 puede dar el compuesto **10**.

Ejemplo 2

Esquema 2



Compuesto 12: A una disolución de **11** (véase J. Med. Chem., 38, 636-46, 1995; 1,25 g, 2,58 mmoles) en THF (20 ml) y HMPA (4 ml) se añadió LiHMDS (disolución 1 M de THF, 2,58 ml, 2,58 mmoles) a -20°C . La mezcla se agitó durante 20 minutos a la misma temperatura, entonces se enfrió a -78°C . Se añadió una disolución de **4** (500 mg, 0,908 mmoles) en THF (9 ml) y HMPA (0,9 ml). La mezcla se agitó y se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactivó añadiendo H_2O (40 ml), entonces se extrajo con Et_2O (150 ml x 3). La fase orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de la filtración y concentración, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:EtOAc = 9:1, $R_f = 0,35$) proporcionando **12** (136 mg, 0,169 mmoles, 19 %). Peso molecular para $\text{C}_{51}\text{H}_{82}\text{NaO}_5\text{Si}$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ Calc. 825,5829, Hallado 825,5.

Usando **13** en lugar de **5**, se siguió un procedimiento análogo al descrito para el compuesto 7 proporcionando el compuesto **12** (135 mg, 0,168 mmoles, 46 %).

Compuesto 15/Compuesto 16: A una disolución de **12** (800 mg, 0,996 mmoles) en THF (5 ml) se añadió *n*-TBAF (disolución 1 M de THF, 5 ml, 5,00 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 45°C . Después de la concentración, la mezcla se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice proporcionando **15** (hexano:EtOAc = 3:1, $R_f = 0,46$, 372 mg, 0,659 mmoles, 66 %) y **16** ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 95:5$, $R_f = 0,36$, 135 mg, 0,251 mmoles, 25 %). Peso molecular para **15**; $\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{NaO}_5$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ Calc. 587,4651, Hallado 587,4652. Peso molecular para **16**; $\text{C}_{33}\text{H}_{61}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ Calc. 537,4519, Hallado 537,5.

Compuesto 17: A una disolución del compuesto **15** (164 mg, 0,290 mmoles) y clorhidrato de ácido 4-(dimetilamino)butírico (58 mg, 0,348 mmoles) en CH₂Cl₂ (5 ml) se añadieron diisopropiletilamina (0,152 ml, 0,870 mmoles), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (67 mg, 0,348 mmoles) y DMAP (7 mg, 0,058 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado ac. (50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5 % de MeOH en CH₂Cl₂) proporcionando el compuesto **17** (158 mg, 0,233 mmoles, 80 %, R_f = 0,24 desarrollado con 5 % de MeOH en CH₂Cl₂). Peso molecular para C₄₅H₈₄NO₆ (M+H)⁺ Calc. 734,6299, Hallado 734,5.

Compuesto 18: El tratamiento del compuesto **17** con CH₃Cl en CH₃CN y CHCl₃ puede dar el compuesto **18**.

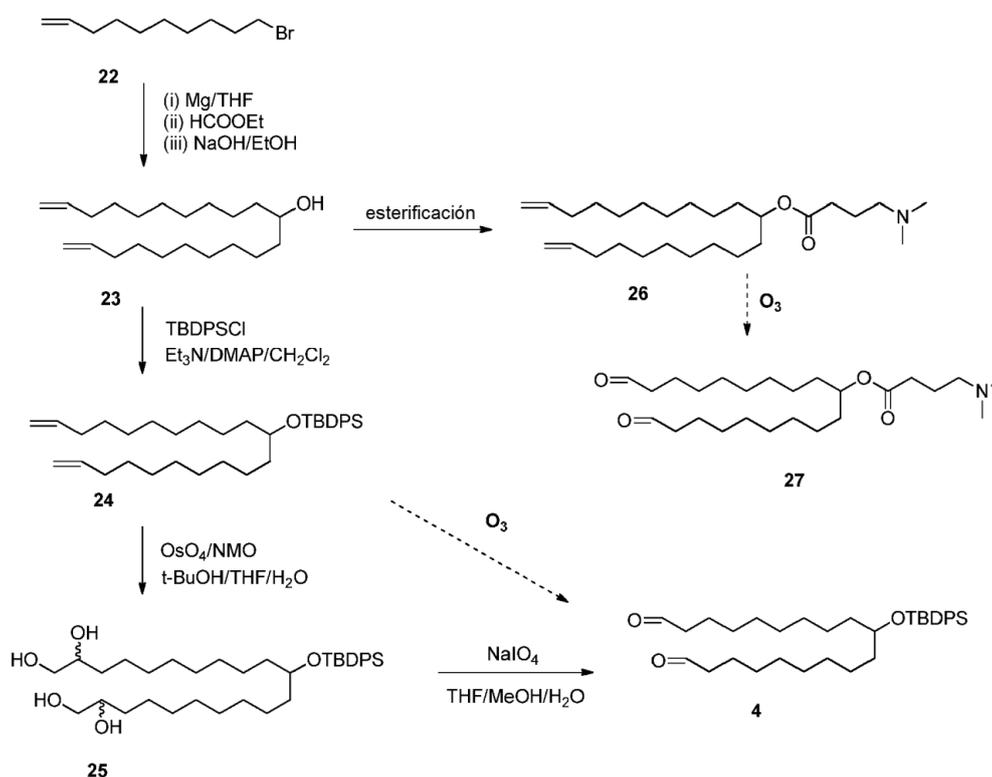
Compuesto 19: A una disolución de **16** (130 mg, 0,242 mmoles) en THF (2 ml) y MeOH (2 ml) se añadió trimetilsilildiazometano (disolución 2 M en Et₂O, 0,158 ml, 0,315 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 14 horas. Después de la evaporación, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:EtOAc = 3:1, R_f = 0,50) proporcionando **19** (99 mg, 0,180 mmoles, 74 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,29-5,40 (m, 4 H), 4,12 (q, J = 7,1 Hz, 2 H), 3,66 (s, 3 H), 3,55-3,59 (m, 1 H), 2,30 (dd, J = 14,7, 7,2 Hz, 4 H), 1,98-2,07 (m, 8 H), 1,60-1,68 (m, 4 H), 1,23-1,43 (m, 37 H).

Compuesto 20: A una disolución del compuesto **19** (95 mg, 0,168 mmoles) y clorhidrato de ácido 4-(dimetilamino)butírico (42 mg, 0,252 mmoles) en CH₂Cl₂ (3 ml) se añadieron diisopropiletilamina (0,088 ml, 0,504 mmoles), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (48 mg, 0,504 mmoles) y DMAP (4 mg, 0,034 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado ac. (50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5 % de MeOH en CH₂Cl₂) proporcionando el compuesto **20** (103 mg, 0,155 mmoles, 92 %, R_f = 0,19 desarrollado con 5 % de MeOH en CH₂Cl₂). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,29-5,40 (m, 4 H), 4,83-4,89 (m, 1 H), 4,12 (q, J = 7,1 Hz, 2 H), 3,67 (s, 3 H), 2,28-2,34 (m, 8 H), 2,23 (s, 6 H), 1,98-2,07 (m, 8 H), 1,76-1,83 (m, 2 H), 1,60-1,68 (m, 4 H), 1,23-1,51 (m, 35 H).

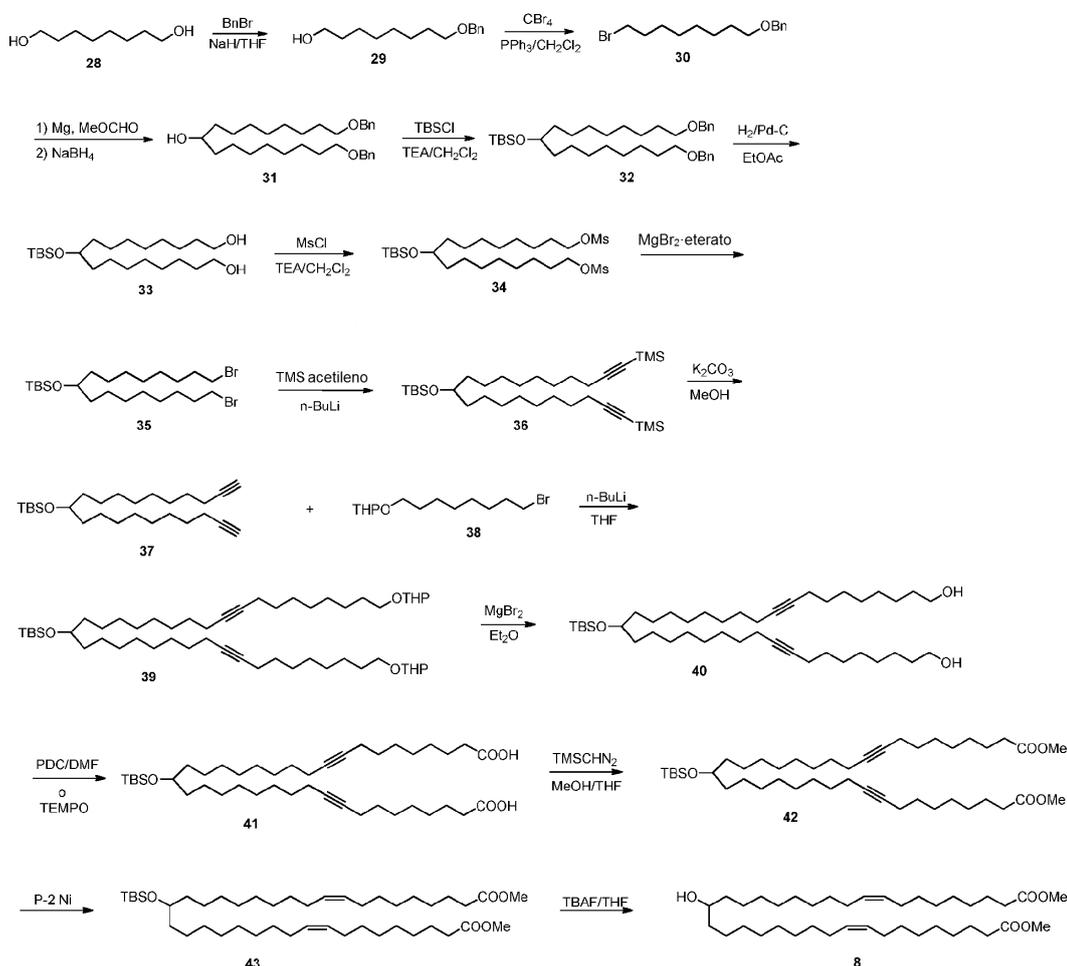
Compuesto 21: El tratamiento del compuesto **20** con CH₃Cl en CH₃CN y CHCl₃ puede dar el compuesto **21**.

Ejemplo 3: Síntesis alternativa para el producto intermedio de di-aldehído 4

Esquema 3



Puede sintetizarse el di-aldehído **4** como se muestra en el Esquema 3, usando 1-bromo-9-deceno. El di-aldehído que contiene un grupo de cabeza **27** puede ser útil para la síntesis de lípidos sustituidos con éster terminales usando, por ejemplo, una reacción de Wittig. La ozonólisis puede dar el di-aldehído **4** y **27**.

Ejemplo 4: Síntesis alternativa para el compuesto 8**Esquema 4**

El compuesto **8** puede sintetizarse como se muestra en el Esquema 4.

Compuesto 29: A una suspensión con agitación de NaH (60 % en aceite, 82 g, 1,7096 moles) en 500 ml de DMF anhidra se añadió lentamente una disolución del compuesto **28** (250 g, 1,7096 moles) en 1,5 l de DMF usando un embudo de goteo a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, luego se añadió lentamente bromuro de bencilo (208,86 ml, 1,7096 moles) bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se calentó entonces a temperatura ambiente y se agitó durante 10 horas. Entonces, la mezcla se inactivó con hielo picado (~2 kg) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 1 l). La fase orgánica se lavó con agua (1 l) para eliminar la DMF no deseada, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad a vacío. El compuesto en bruto se purificó sobre gel de sílice 60-120, se eluyó con 0-5 % de MeOH en DCM proporcionando el compuesto **29** (220 g, 54 %) como un líquido amarillo pálido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,33-7,24 (m, 5 H), 4,49 (s, 2 H), 3,63-3,60 (m, 2 H), 3,47-3,43 (m, 2 H), 1,63-1,51 (m, 4 H), 1,39-1,23 (m, 8 H).

Compuesto 30: Se disolvió el compuesto **29** (133 g, 0,5635 moles) en 1,5 l de DCM, se añadió CBr₄ (280,35 g, 0,8456 moles) en esta disolución con agitación y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera inerte. Entonces se añadió PPh₃ (251,03 g, 0,9571 moles) en porciones manteniendo la temperatura por debajo de 20 °C. Después de adición completa, la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, el sólido (PPh₃O) que precipitó en la mezcla de reacción se eliminó por filtración, y el filtrado se diluyó con hielo picado (~ 1,5 kg) y se extrajo con DCM (3 x 750 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se destiló a vacío. El compuesto en bruto resultante se purificó por cromatografía sobre columna de gel de sílice de 60-120 de malla usando 0-5 % de acetato de etilo en hexanos como sistema de elución proporcionando el compuesto **30** (150 g, 89 %) como líquido amarillo pálido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,33-7,25 (m, 5 H), 4,49 (s, 2 H), 3,47-3,41 (m, 2 H), 3,41-3,37 (m, 2 H), 1,86-1,80 (m, 4 H), 1,62-1,56 (m, 2 H), 1,42-1,29 (m, 8 H).

Compuesto 31: A virutas de Mg recién activadas (24,08 g, 1,003 moles) se añadieron 200 ml de THF anhidro, seguido de la adición de una pizca de yodo en la mezcla bajo una atmósfera inerte. Se añadió lentamente una

disolución del compuesto **30** (150 g, 0,5016 moles) en 1 l de THF seco, controlando la reacción exotérmica. La reacción se calentó entonces a reflujo durante 1 hora, luego se enfrió a temperatura ambiente. Entonces se añadió lentamente formiato de metilo (60,24 g, 1,0033 moles) y la reacción continuó durante 2 horas. Después de completarse, la reacción se inactivó por la adición lenta de 10 % de HCl seguido de agua (1 l) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 1 l). La fase orgánica se tomó en un vaso de precipitados de 5 litros, se diluyó con 500 ml de metanol y se enfrió a 0 °C. A esta disolución se añadió un exceso de NaBH₄ (~ 5 eq) en porciones para garantizar la hidrólisis del éster de formiato que no se escindió mediante la adición de HCl. La disolución resultante se agitó durante una hora y entonces los volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se recogió en agua (1 l) y se acidificó por disolución al 10 % de HCl (pH 4). El producto se extrajo entonces con acetato de etilo (3 x 1 l). Entonces, la fase orgánica se secó y se concentró en evaporador rotatorio proporcionando el compuesto deseado **31** (57 g, 24 %) como un sólido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,35-7,32 (m, 8 H), 7,29-7,24 (m, 2 H), 4,49 (s, 4 H), 3,56 (m, 1 H), 3,46-3,43 (m, 4 H), 1,63-1,56 (m, 4 H), 1,44-1,34 (m, 28 H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 138,56, 128,21, 127,49, 127,34, 72,72, 71,76, 70,37, 37,37, 29,64, 29,56, 29,47, 29,33, 26,07, 25,54.

Compuesto 32: Se disolvió el compuesto **31** (56 g, 0,1196 moles) en 700 ml de THF seco y se enfrió a 0 °C. Se añadió lentamente TBSCl (36,06 g, 0,2396 moles), seguido de la adición de imidazol (32,55 g, 0,4786 moles) bajo una atmósfera inerte. La reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 18 horas. Tras completarse, la reacción se inactivó con hielo (~1 kg) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ para eliminar impurezas ácidas, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó bajo presión reducida proporcionando un compuesto en bruto que se purificó por gel de sílice (60-120 de malla) y se eluyó con 0-10 % de acetato de etilo - hexano proporcionando (60 g, 82 %) del compuesto **32** como aceite amarillento. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,33-7,24 (m, 10 H), 4,49 (s, 4 H), 3,60-3,57 (m, 1 H), 3,46-3,43 (m, 4 H), 1,61-1,54 (m, 4 H), 1,41-1,26 (m, 28 H), 0,87 (s, 9 H), 0,02 (s, 6 H).

Compuesto 33: Se disolvió el compuesto **32** (60 g, 0,1030 moles) en 500 ml de acetato de etilo y se desgasificó con N₂ durante 20 minutos. Se añadió (10 % en peso) de Pd sobre carbón (12 g) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas. Después de completarse, la mezcla se filtró a través de un lecho de Celite y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se evaporó a vacío proporcionando el compuesto **33** (19 g, 46 %) que fue lo suficientemente puro como para usarse en la siguiente secuencia sintética. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 3,64-3,58 (m, 5 H), 1,59 (br, 2 H), 1,57-1,51 (m, 4 H), 1,38-1,22 (m, 28 H), 0,87 (s, 9 H), 0,02 (s, 6 H).

Compuesto 34: Se disolvió el compuesto **33** (8,2 g, 0,0199 moles) en 100 ml de DCM seco y se enfrió a 0 °C. Se añadió TEA (22,14 ml, 0,1592 moles) bajo una atmósfera inerte. Después de agitar la mezcla durante 5 minutos, se añadió gota a gota cloruro de mesilo (4,6 ml, 0,059 moles) y la reacción se agitó adicionalmente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, la mezcla se inactivó con hielo (~200 g) y se extrajo con DCM (3 x 75 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó proporcionando un compuesto en bruto que se purificó en una columna de gel de sílice de 60-120 de malla usando 0-30 % de acetato de etilo en hexano como sistema de elución proporcionando el compuesto **34** (8,2 g, 73 %) como un líquido amarillo pálido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,22-4,19 (m, 4 H), 3,60-3,58 (m, 1 H), 2,99 (s, 6 H), 1,75-1,69 (m, 4 H), 1,38-1,28 (m, 28 H), 0,86 (s, 9 H), 0,02 (s, 6 H).

Compuesto 35: A una disolución del compuesto **34** (8,2 g, 0,0146 moles) en 400 ml de éter seco se añadió MgBr₂·Et₂O (22,74 g, 0,08817 moles) en porciones a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de adición completa, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 28 horas. Después de completarse la reacción, el material inorgánico formado en la reacción se eliminó por filtración. El filtrado se evaporó y el compuesto en bruto resultante se purificó en columna de gel de sílice de 60-120 de malla usando 0-3 % de acetato de etilo en hexanos como sistema de elución proporcionando el compuesto **35** (6,6 g, 85 %) como un líquido incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 3,61-3,58 (m, 1 H), 3,41-3,37 (t, 4 H, J = 6,8 Hz), 1,87-1,80 (m, 4 H), 1,42-1,25 (m, 24 H), 0,87 (s, 9 H), 0,012 (s, 6 H).

Compuesto 36: Se enfrió una disolución de etiniltrimetilsilano (5,3 ml, 0,0378 moles) en 60 ml de THF seco a -78 °C y se añadió lentamente *n*-BuLi 1,4 M (23 ml, 0,03405 moles) en hexano bajo una atmósfera inerte. La reacción se agitó durante 10 minutos, entonces se añadió HMPA (2,3 g, 0,01324 moles) y la mezcla resultante se agitó entonces durante 2 horas a 0 °C, entonces se enfrió a -78 °C. A ésta se añadió lentamente una disolución del compuesto **35** (5 g, 0,0094 moles) en 60 ml de THF seco y después de adición completa, la reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se mantuvo durante 18 horas. El progreso de la reacción se monitorizó por RMN ¹H. Después de completarse, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se extinguió por la adición cuidadosa de disolución saturada de NH₄Cl (50 ml), seguido de agua (200 ml). La fase acuosa se extrajo con hexano (3 x 250 ml). Se secó la fase orgánica y el disolvente se eliminó a vacío proporcionando el compuesto **36** (5 g, 94 %), que se usó sin más purificación. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 3,62-3,56 (m, 1 H), 2,21-2,17 (m, 4 H), 1,49-1,47 (m, 4 H), 1,37-1,26 (m, 24 H), 0,87 (s, 9 H), 0,13 (s, 18 H), 0,021 (s, 6 H).

Compuesto 37: A una disolución con agitación del compuesto **36** (5 g, 0,0088 moles) en 50 ml de metanol se añadió K₂CO₃ (6,1 g, 0,044 moles) en una porción, y la mezcla resultante se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Entonces se eliminaron los volátiles en un evaporador rotatorio y la mezcla en bruto se diluyó con 100 ml de agua y se extrajo con hexano (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a vacío proporcionando el compuesto **37** (3,5 g, 97 %) que se usó que se usó sin más purificación. RMN ¹H (400 MHz,

CDCl₃): δ = 3,60-3,58 (m, 1 H), 2,19-2,14 (m, 4 H), 1,93-1,92 (m, 2 H), 1,54-1,49 (m, 4 H), 1,37-1,27 (m, 24 H), 0,87 (s, 9 H), 0,02 (s, 6 H).

5 **Compuesto 39:** Se disolvió el compuesto **37** (2,5 g, 0,00598 moles) en 25 ml de THF seco y se enfrió a -40 °C. Se añadió lentamente *n*-BuLi (1,4 M en hexano 12,9 ml, 0,01794 moles), seguido, después de un intervalo de 10 minutos, por la lenta adición de HMPA (25 ml). La mezcla resultante se mantuvo durante 30 minutos a -40 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. Entonces se añadió gota a gota una disolución del compuesto **38** (3,5 g, 1,01196 moles) en 25 ml de THF seco a la mezcla de reacción enfriada. La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente durante 2 horas, luego se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Entonces, la mezcla se inactivó añadiendo disolución saturada de NH₄Cl (~50 ml) y el producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). El disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio y el producto en bruto resultante se purificó por columna de gel de sílice (100-200 de malla) usando 0-3 % de acetato de etilo en diclorometano como sistema de elución proporcionando el compuesto **39** (0,9 g, 18 %) como un aceite amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,56-4,55 (m, 2 H), 3,87-3,83 (m, 2 H), 3,74-3,68 (m, 2 H), 3,59-3,57 (m, 1 H), 3,49-3,46 (m, 2 H), 3,39-3,33 (m, 2 H), 2,13-2,10 (m, 8 H), 1,87-1,75 (m, 2 H), 1,74-1,66 (m, 2 H), 1,57-1,42 (m, 20 H), 1,40-1,19 (m, 40 H), 0,87 (s, 9 H), 0,02 (s, 6 H).

15 **Compuesto 40:** A una disolución del compuesto **39** (504 mg, 0,598 mmoles) en 10 ml de éter seco se añadió MgBr₂·Et₂O (926 mg, 3,59 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 14 horas, entonces se extinguió añadiendo disolución acuosa saturada de NaHCO₃. El producto se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice proporcionando el compuesto **40** (307 mg, 0,455 mmoles, 76 %, R_f = 0,36 desarrollado con hexano:EtOAc = 2:1). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,59-3,66 (m, 5 H), 2,14 (t, *J* = 6,6 Hz, 8 H), 1,21-1,59 (m, 52 H), 0,88 (s, 9 H), 0,03 (s, 6 H).

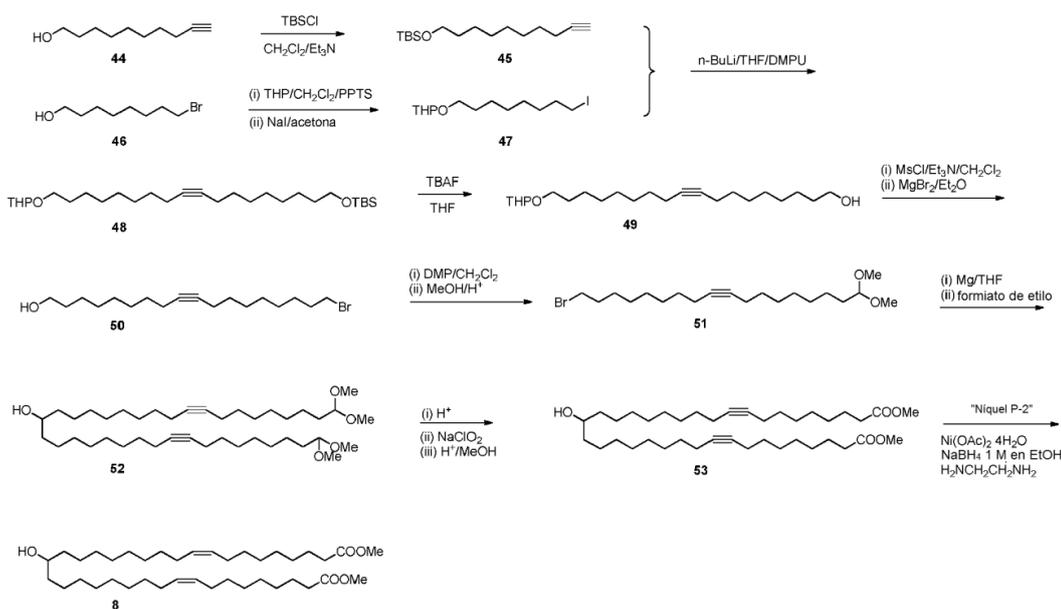
25 **Compuesto 41:** A una disolución con agitación de **40** (180 mg, 0,267 mmoles) en DMF anhidra (5 ml) se añadió dicromato de piridinio (603 mg, 1,60 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 48 horas. Después de la dilución con agua (20 ml), la mezcla se extrajo con Et₂O (3 x 40 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice proporcionando el compuesto **41** (53 mg, 0,075 mmoles, 28 %, R_f = 0,25 desarrollado con CH₂Cl₂:MeOH:AcOH = 95:4,5:0,5). Peso molecular para C₄₃H₇₇O₅Si (M-H)⁺ Calc. 701,5540, Hallado 701,5. Este compuesto puede sintetizarse por oxidación de TEMPO.

30 **Compuesto 42:** Un procedimiento análogo al descrito para el compuesto **19** proporcionó el compuesto **42** (23 mg, 0,032 mmoles, 21 % del compuesto **40**). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,67 (s, 6 H), 3,59-3,62 (m, 1 H), 2,30 (t, *J* = 7,5 Hz, 4 H), 2,13 (t, *J* = 6,8 Hz, 8 H), 1,27-1,64 (m, 48 H), 0,88 (s, 9 H), 0,03 (s, 6 H).

La reducción usando condiciones de níquel P-2 puede dar el compuesto **43** y la posterior desprotección por TBAF puede dar el compuesto **8**.

Ejemplo 5: Síntesis alternativa para el compuesto 8

Esquema 5

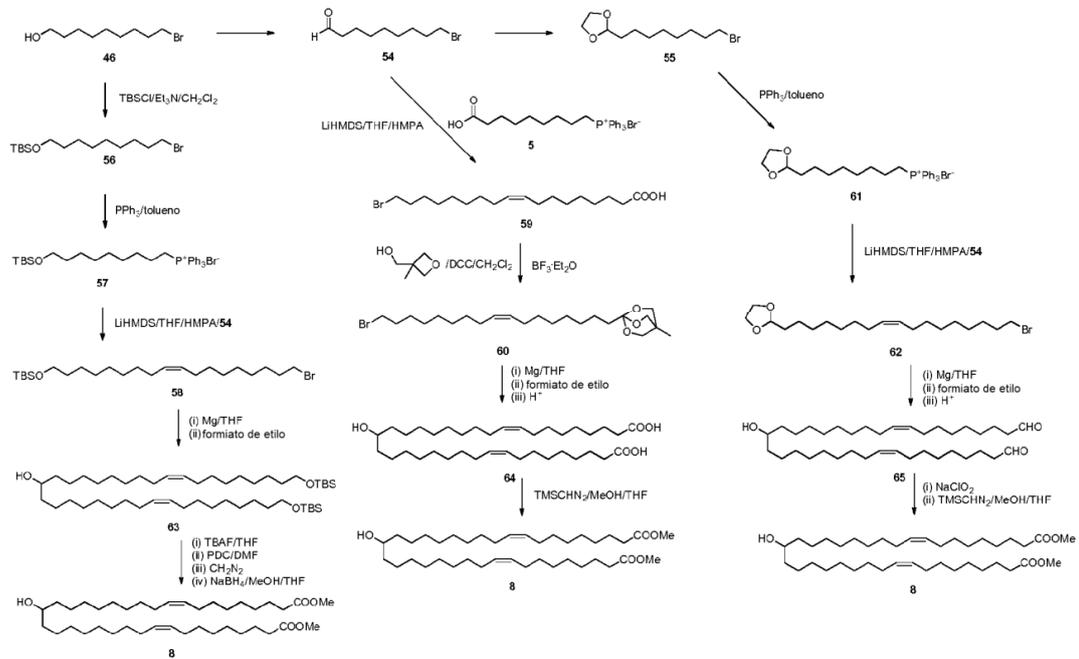


35

El compuesto **8** puede sintetizarse como se muestra en el Esquema 5. El bromuro **51** puede convertirse en su reactivo de Grignard, luego acoplarse con formiato de etilo, proporcionando el compuesto **52**. El posterior tratamiento con ácido, oxidación y reducción puede dar el compuesto **8**.

Ejemplo 6: Síntesis alternativa para el compuesto 8

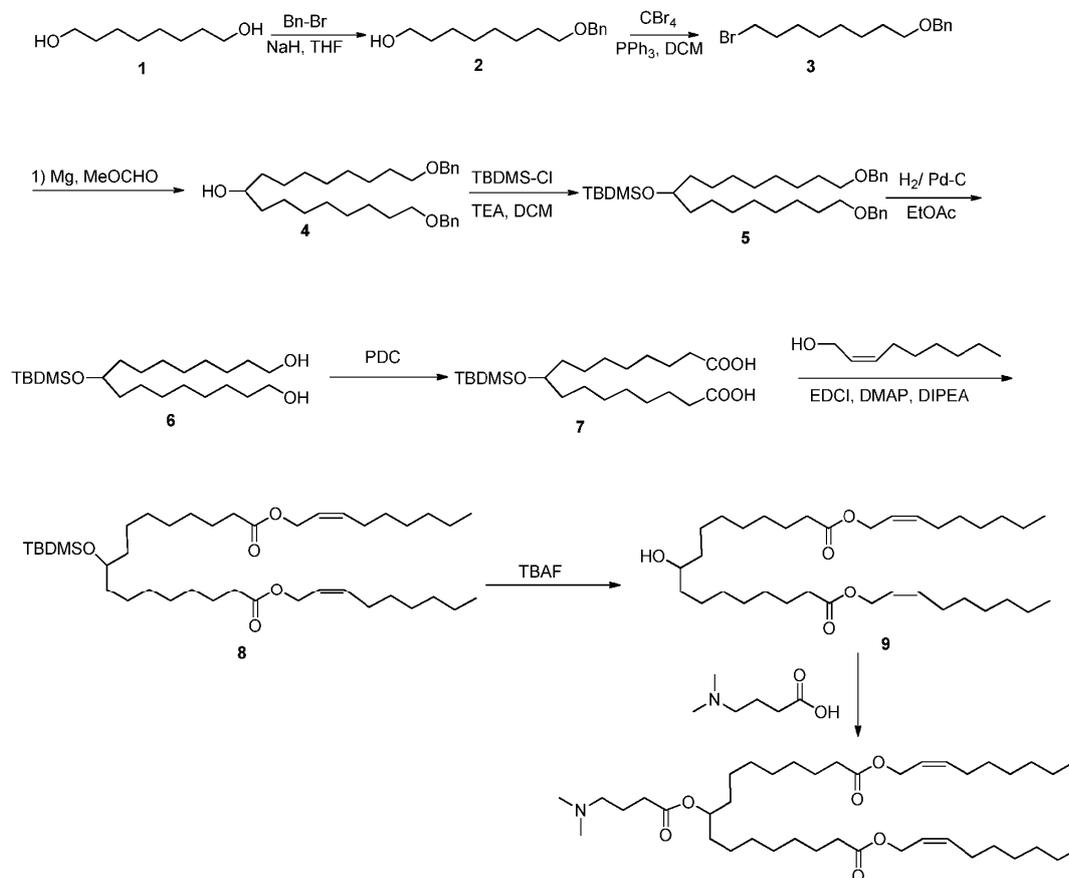
Esquema 6



5

El compuesto **8** puede sintetizarse como se muestra en el Esquema 6. Puede hacerse reaccionar cualquiera de los bromuros del compuesto **58**, **60** o **62** con formiato de etilo para generar cadena de di-olefina de funcionalización terminal. El compuesto **8** puede entonces prepararse a partir de los compuestos de cadena de diolefina usando reacciones químicas estándar.

10

Ejemplo 7**Esquema 7:****Síntesis de 8-benciloxi-octan-1-ol (2):**

5 A una suspensión con agitación de NaH (60 % en aceite, 82 g, 1,7096 moles) en 500 ml de DMF anhidra, se añadió lentamente una disolución del compuesto **1** (250 g, 1,7096 moles) en 1,5 l de DMF usando un embudo de goteo a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, entonces se añadió lentamente bromuro de bencilo (208,86 ml, 1,7096 moles) bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se calentó entonces a temperatura ambiente y se agitó durante 10 horas. Después de completarse la reacción, la mezcla se inactivó con hielo picado (2 kg) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 1 l). La fase orgánica se lavó con agua (1 l) para eliminar la DMF no deseada, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad a vacío. El compuesto en bruto se purificó sobre gel de sílice de 60-120, se eluyó con 0-5 % de MeOH en DCM proporcionando el compuesto **2** (220 g, 54 %) como líquido amarillo pálido. RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ = 7,33-7,24 (m, 5H), 4,49 (s, 2H), 3,63-3,60 (m, 2H), 3,47-3,43 (m, 2H), 1,63-1,51 (m, 4H), 1,39-1,23 (m, 8H).

15 **Síntesis de (8-bromo-octiloximetil)-benceno (3):** Se disolvió el compuesto **2** (133 g, 0,5635mol) en 1,5 l de DCM, se añadió CBr₄ (280,35 g, 0,8456 moles) a esta disolución con agitación y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera inerte. Entonces se añadió PPh₃ (251,03 g, 0,9571 moles) en porciones manteniendo la temperatura por debajo de 20 °C y después de adición completa, la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, el sólido (PPh₃O) precipitado en la mezcla de reacción se aisló por filtración y el filtrado se diluyó con hielo picado (~ 1,5 kg) y se extrajo con DCM (3 x 750 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se destiló a vacío. El compuesto en bruto resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice de 60-120 de malla usando 0-5 % de acetato de etilo en hexanos como sistema de elución proporcionando el compuesto **3** (150 g, 89 %) como líquido amarillo pálido. RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ = 7,33-7,25 (m, 5H), 4,49 (s, 2H), 3,47-3,41 (m, 2H), 3,41-3,37 (m, 2H), 1,86-1,80 (m, 4H), 1,62-1,56(m, 2H), 1,42-1,29 (m, 8H).

Síntesis de 1,17-bis-benciloxi-heptadecan-9-ol (4):

A virutas de Mg recién activadas (24,08 g, 1,003 moles) se añadieron 200 ml de THF anhidro, seguido de la adición de una pizca de yodo en la mezcla bajo una atmósfera inerte. Después del inicio de la formación de Grignard se añadió lentamente una disolución del compuesto **3** (150 g, 0,5016 moles) en 1 l de THF seco controlando la reacción

exotérmica. Después de adición completa, la reacción se calentó a reflujo durante 1 hora, luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Entonces se añadió lentamente formiato de metilo (60,24 g, 1,0033 moles) y la reacción continuó durante 2 horas. Después de completarse, la reacción se inactivó por la adición lenta de 10 % de HCl seguido de agua (1 l) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 1 l). La fase orgánica se recogió en vaso de precipitados de 5 litros, se diluyó con 500 ml de metanol y se enfrió a 0 °C. A esta disolución se añadió exceso de NaBH₄ (~ 5 eq) en porciones para garantizar la hidrólisis del éster de formiato que no se escindió mediante la adición de HCl. La disolución resultante se agitó durante una hora y entonces se eliminaron a vacío los volátiles. El residuo se recogió en agua (1 l) y se acidificó por disolución al 10 % de HCl (pH 4). Entonces, el producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 1 l). Entonces, la fase orgánica se secó y se concentró en evaporador rotatorio proporcionando el compuesto **4** (57 g, 24 %) como un sólido. RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ = 7,35-7,32 (m, 8H), 7,29-7,24 (m, 2H), 4,49 (s, 4H), 3,56 (m, 1H), 3,46-3,43 (m, 4H), 1,63-1,56 (m, 4H), 1,44-1,34 (m, 28H). RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃): δ = 138,56, 128,21, 127,49, 127,34, 72,72, 71,76, 70,37, 37,37, 29,64, 29,56, 29,47, 29,33, 26,07, 25,54.

Síntesis de [9-benciloxi-1-(8-bencilozy-octil)-noniloxi]-terc-butil-dimetil-silano (**5**):

Se disolvió el compuesto **4** (56 g, 0,1196 moles) en 700 ml de THF anhidro y se enfrió a 0 °C. Se añadió lentamente TBMS-Cl (36,06 g, 0,2396 moles), seguido por la adición de imidazol (32,55 g, 0,4786 moles), bajo una atmósfera inerte. Entonces, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, entonces se extinguió con hielo (~1 kg). El producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con disolución saturada de NaHCO₃ para eliminar la impureza ácida, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a presión reducida para obtener el compuesto en bruto que se purificó por gel de sílice (60-120 de malla) y se eluyó con 0-10 % de acetato de etilo en hexano proporcionando (60 g, 82 %) del compuesto **5** como aceite amarillento. RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ = 7,33-7,24 (m, 10H), 4,49 (s, 4H), 3,60-3,57 (m, 1H), 3,46-3,43 (m, 4H), 1,61-1,54 (m, 4H), 1,41-1,26 (m, 28H), 0,87 (s, 9H), 0,02 (s, 6H)

Síntesis de 9-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-heptadecano-1,17-diol (**6**):

Se disolvió el compuesto **5** (60 g, 0,1030 moles) en 500 ml de acetato de etilo y se desgasificó con N₂ durante 20 min. Se añadió (10 % en peso) de Pd sobre carbón (12 g) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 18 horas. Después de completarse, la mezcla se filtró a través de un lecho de Celite y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se evaporó a vacío. El compuesto **6** (19 g, 46 %) así obtenido fue lo suficientemente puro como para llevar a cabo la siguiente reacción. RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ = 3,64-3,58 (m, 5H), 1,59 (br, 2H), 1,57-1,51 (m, 4H), 1,38-1,22 (m, 28H), 0,87 (s, 9H), 0,02 (s, 6H).

Síntesis de ácido 9-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-heptadecanodioico (**7**):

A una disolución con agitación de **6** (2 g, 0,0049 moles) en DMF anhidra (40 ml) se añadió dicromato de piridinio (2,7 g, 0,0074 moles) a 0 °C bajo una atmósfera inerte. La mezcla de reacción se dejó entonces calentar a temperatura ambiente durante un periodo de 10-15 minutos y continuó durante 24 horas. Entonces, la reacción se diluyó con agua (100 ml). La fase acuosa se extrajo usando DCM (3 x 40 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (1 x 25 ml) y se concentró a vacío proporcionando ácido en bruto que entonces se purificó por columna de gel de sílice (100-200 de malla) usando el sistema de 0-30 % de acetato de etilo en hexanos. Se obtuvo el producto puro (**7**) (0,7 g, 33 %) como un aceite amarillo pálido.

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ = 3,61-3,56 (m, 1H), 2,35-2,32 (m, 4H), 1,64-1,59 (m, 4H), 1,40-1,19 (m, 24H), 0,86 (s, 9H), 0,017 (s, 6H); CL-EM [M+H] - 431,00; HPLC (ELSD) pureza - 96,94 %

Síntesis de 9-((terc-butildimetilsilil)oxi)heptadecanodioato de di((Z)-non-2-en-1-ilo) (**8**)

Se disolvió el diácido **7** (0,42 g, 0,97 mmoles) en 20 ml de diclorometano y a él se añadió *cis*-2-nonen-1-ol (0,35 g, 2,44 mmoles) seguido de base de Hunig (0,68 g, 4,9 mmoles) y DMAP (12 mg). A esta mezcla se añadió EDCI (0,47 g, 2,44 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó entonces con CH₂Cl₂ (40 ml) y se lavó con NaHCO₃ saturado (50 ml), agua (60 ml) y salmuera (60 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y los disolventes se eliminaron a vacío. El producto en bruto así obtenido se purificó por el sistema de purificación Combiflash Rf (40 g de gel de sílice, 0-10 % de MeOH en CH₂Cl₂) proporcionando el producto puro **8** (0,35 g, 53 %) como un aceite incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,64 (dt, J = 10,9, 7,4 Hz, 2H), 5,58 - 5,43 (m, 2H), 4,61 (d, J = 6,8 Hz, 4H), 3,71- 3,48 (m, 1H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 4H), 2,20 - 1,98 (m, 4H), 1,71 - 1,53 (m, 4H), 1,31 (ddd, J = 8,3, 7,0, 3,7 Hz, 34H), 1,07 - 0,68 (m, 14H), 0,02 (s, 5H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 178,18, 139,81, 127,78, 81,73, 81,42, 81,10, 76,72, 64,59, 41,52, 41,32, 38,76, 36,09, 34,10, 33,93, 33,80, 33,70, 33,59, 33,55, 33,26, 31,95, 30,34, 29,69, 29,58, 29,39, 27,01, 22,56, 18,48, 0,01.

Síntesis de 9-hidroxiheptadecanodioato de di((Z)-non-2-en-1-ilo) (**9**)

Se disolvió el diéster protegido con sililo **8** (0,3 g, 0,44 mmoles) en disolución 1 M de TBAF en THF (6 ml) y la disolución se mantuvo a 40 °C durante dos días. La mezcla de reacción se diluyó con agua (60 ml) y se extrajo con éter (2 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron y el producto en bruto así obtenido se purificó por columna para aislar el producto puro (0,097 g, 39 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,64 (dt, J = 10,9, 7,4 Hz, 2H),

5,52 (dt, $J = 11,0, 6,8$ Hz, 2H), 4,61 (d, $J = 6,8$ Hz, 4H), 3,57 (s, 1H), 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 4H), 2,09 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 1,75 - 1,53 (m, 4H), 1,53 - 1,06 (m, 36H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 173,98, 135,64, 123,57, 77,54, 77,22, 76,91, 72,14, 60,41, 37,69, 34,54, 31,89, 29,70, 29,60, 29,44, 29,29, 29,07, 27,76, 25,80, 25,15, 22,82, 14,29.

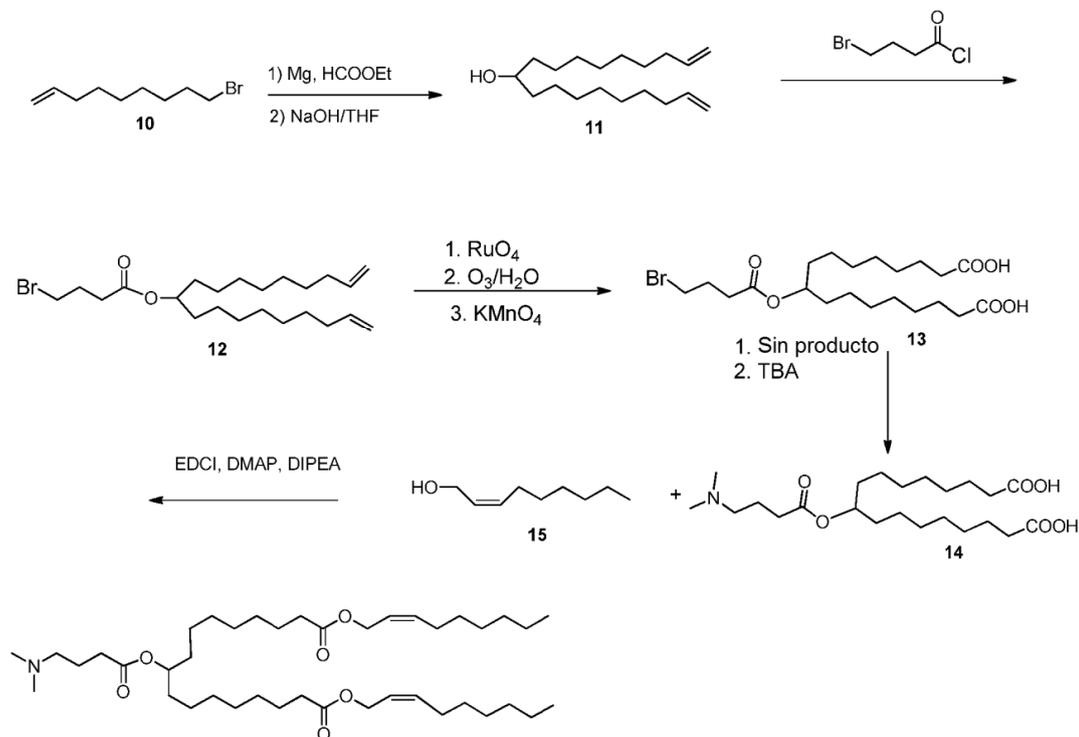
5 Síntesis de 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecanodioato de di((Z)-non-2-en-1-ilo)

Se disolvió el alcohol **9** (0,083 g, 0,147 mmoles) en 20 ml de diclorometano y a él se añadió clorhidrato de ácido dimetilaminobutírico (0,030 g, 0,176 mmoles) seguido de base de Hunig (0,045 g, 0,44 mmoles) y DMAP (2 mg). A esta mezcla se añadió EDCI (0,034 g, 0,176 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y la CCF (gel de sílice, 10 % de MeOH en CH_2Cl_2) mostró la desaparición completa del alcohol de partida. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (40 ml) y se lavó con NaHCO_3 saturado (50 ml), agua (60 ml) y salmuera (60 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anh. y los disolventes se eliminaron a vacío. El producto en bruto así obtenido se purificó por el sistema de purificación Combiflash Rf (40 g de gel de sílice, 0-10 % de MeOH en CH_2Cl_2) para aislar el producto puro (0,062 g, 62 %) como un aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,74 - 5,58 (m, 2H), 5,51 (dtt, $J = 9,7, 6,8, 1,3$ Hz, 2H), 4,95 - 4,75 (m, 1H), 4,61 (d, $J = 6,8$ Hz, 4H), 2,35 - 2,24 (m, 8H), 2,22 (d, $J = 7,9$ Hz, 6H), 2,09 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,83 - 1,72 (m, 2H), 1,60 (dd, $J = 14,4, 7,2$ Hz, 4H), 1,49 (d, $J = 5,7$ Hz, 4H), 1,41 - 1,13 (m, 30H), 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 173,72, 173,36, 135,40, 123,35, 74,12, 60,18, 58,95, 45,46, 34,30, 34,11, 32,45, 31,67, 29,38, 29,35, 29,17, 29,07, 28,84, 27,53, 25,28, 24,93, 23,16, 22,59, 14,06. MW calc. para $\text{C}_{41}\text{H}_{75}\text{NO}_6$ (MH^+): 678,04, hallado: 678,5.

Ejemplo 8

20 Puede usarse la siguiente vía más corta para la síntesis del compuesto 1 de la presente invención. Se trató el 9-bromonon-1-eno **10** comercial con magnesio para formar el reactivo de Grignard correspondiente que se hizo reaccionar con formiato de etilo para dar el aducto correspondiente **11** que en el tratamiento con cloruro de bromobutirilo proporcionó el bromoéster **12**. El bromoéster **12** en el tratamiento con RuO_4 proporcionó el diácido **13**. El bromodiácido **13** en el tratamiento con dimetilamina proporcionó el aminodiácido **14**. El aminodiácido **14** en el acoplamiento con el alcohol **15** proporcionó el producto con buenos rendimientos.

Esquema 8



Síntesis de nonadeca-1,18-dien-10-ol (11)

A un matraz RB de 500 ml secado a la llama se añadieron virutas de Mg recién activadas (9 g) y el matraz se equipó con una barra de agitación magnética, un embudo de adición y un condensador de reflujo. Esta disposición se desgasificó y se lavó con argón y se añadieron 100 ml de éter anhidro al matraz mediante jeringa. Se disolvió el bromuro **3** (51,3 g, 250 mmoles) en éter anhidro (100 ml) y se añadió al embudo de adición. Se añadieron

aproximadamente 5 ml de esta disolución de éter a las virutas de Mg mientras se agitaba vigorosamente. Se observó una reacción exotérmica (para confirmar/acelerar la formación de reactivo de Grignard, se añadieron 5 mg de yodo y se observó decoloración inmediata que confirmó la formación del reactivo de Grignard) y el éter empezó a hervir a reflujo. El resto de la disolución de bromuro se añadió gota a gota mientras que se mantenía la reacción bajo reflujo suave por enfriamiento del matraz en agua. Después de completarse la adición la mezcla de reacción se mantuvo a 35 °C durante 1 hora y luego se enfrió en baño de hielo. Se disolvió formiato de etilo (9 g, 121 mmoles) en éter anhidro (100 ml) y se transfirió al embudo de adición y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción con agitación. Se observó una reacción exotérmica y la mezcla de reacción empezó a hervir a reflujo. Después del inicio de la reacción el resto de la disolución etérea de formiato se añadió rápidamente como una corriente y la mezcla de reacción se agitó durante otro periodo de 1 h a temperatura ambiente. La reacción se inactivó añadiendo 10 ml de acetona gota a gota seguido de agua helada (60 ml). La mezcla de reacción se trató con H₂SO₄ ac. (10 % en volumen, 300 ml) hasta que la disolución fue homogénea y se separaron las fases. La fase ac. se extrajo con éter (2x200 ml). Se secaron las fases de éter combinadas (Na₂SO₄) y se concentraron, proporcionando el producto en bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 0-10 % de éter en hexanos). Las fracciones de producto se evaporaron proporcionando el producto en bruto **11** como un sólido blanco (30,6 g, 90 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (s, 1H), 5,81 (ddt, J = 16,9, 10,2, 6,7 Hz, 8H), 5,04 - 4,88 (m, 16H), 3,57 (dd, J = 7,6, 3,3 Hz, 4H), 2,04 (q, J = 6,9 Hz, 16H), 1,59 (s, 1H), 1,45 (d, J = 7,5 Hz, 8H), 1,43 - 1,12 (m, 94H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 139,40, 114,33, 77,54, 77,22, 76,90, 72,21, 37,70, 34,00, 29,86, 29,67, 29,29, 29,12, 25,85.

20 Síntesis de 4-bromobutanoato de nonadeca-1,18-dien-10-ilo (12)

A una disolución del alcohol **11** (5,6 g, 20 moles) en DCM anhidro (300 ml) se añadió lentamente y cuidadosamente cloruro de bromobutilo (20 mmoles) a 0 °C bajo una atmósfera inerte. La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente, se agitó durante 20 h y se monitorizó por CCF (gel de sílice, 10 % de acetato de etilo en hexanos). Tras completarse la reacción, la mezcla se diluyó con agua (400 ml) y se separó la fase orgánica. Entonces se lavó la fase orgánica con disolución sat. de NaHCO₃ (1 x 400 ml) seguido de salmuera (1 x 100 ml) y se concentró a vacío. Entonces se purificó el producto en bruto por columna en gel de sílice (100-200 de malla), se eluyó con 2-3 % de acetato de etilo en disolución de hexanos dando 6 g (90 %) del producto deseado **12** como líquido incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,80 (ddt, J = 16,9, 10,2, 6,7 Hz, 2H), 5,05 - 4,81 (m, 5H), 3,46 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,48 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,17 (p, J = 6,8 Hz, 2H), 2,11 - 1,93 (m, 4H), 1,65 - 1,44 (m, 4H), 1,43 - 1,17 (m, 19H). RMN ¹³C (101 MHz, cdcl₃) δ 172,51, 139,37, 114,35, 77,54, 77,23, 76,91, 74,86, 34,31, 33,99, 33,01, 32,96, 29,65, 29,56, 29,24, 29,09, 28,11, 25,52.

30 Síntesis de ácido 9-((4-bromobutanoil)oxi)heptadecanodioico (13)

A una disolución del bromoéster **12** (12,1 g, 28,2 mmoles) en diclorometano (300 ml) y acetonitrilo (300 ml), se añadió RuCl₃ (1,16 g, 5 % en moles) y la mezcla se enfrió a 10 °C y se añadió gota a gota metaperyodato de sodio (60 g) en agua (400 ml). Se agitó a 10 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua, se separaron las fases y a la fase orgánica se añadió disolución saturada de salmuera con agitación seguido de disolución al 3 % de sulfuro de sodio gota a gota para la decoloración (verde oscuro a amarillo pálido). Se separaron las fases, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida proporcionando el producto puro. MW calcd para C₂₀H₃₅BrO₇ 467,39; Hallado 465,4 (M-2H).

40 Síntesis de ácido 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecanodioico (14)

Se disuelve el bromoácido **13** (2 mmoles) en disolución 2 M de dimetilamina en THF (20 ml) y a ella se añadió 1 g de K₂CO₃ anhidro y la mezcla se calentó en un frasco a presión a 50 °C durante la noche. La CCF mostró la completitud de la reacción. La mezcla de reacción se acidificó con ácido acético y se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con diclorometano (2 x 60 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron, se secaron y se usaron como tales en la siguiente reacción. MW calcd para C₂₃H₄₃NO₆ 429,59; Hallado 430,6 (MH)⁺.

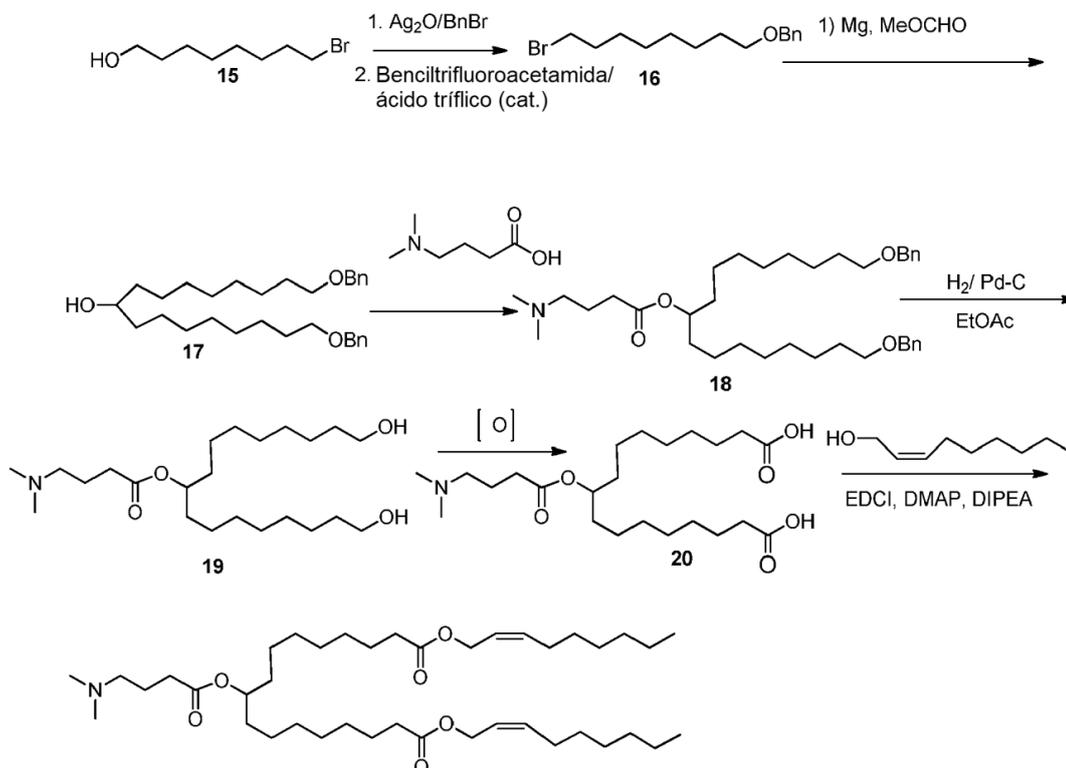
45 Síntesis de 9-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecanodioato de di((Z)-non-2-en-1-ilo)

El diácido **14** se convierte en el diéster correspondiente como se describe para la síntesis de **8** y los datos analíticos y espectrales estuvieron de acuerdo con aquellos del producto.

Ejemplo 9

50 En otro enfoque se usa el siguiente enfoque sintético para la síntesis del compuesto 1 de la presente invención.

Esquema 9



Ejemplo 10: Evaluación *in vivo* de FVII usando los liposomas derivados de lípido catiónico

5 Ratones C57BL/6 (Charles River Labs, MA) reciben tanto solución salina como ARNip en formulaciones deseadas mediante inyección en la vena de la cola a un volumen de 0,01 ml/g. En diversos momentos de tiempo después de la administración, los animales se anestesian por inhalación de isoflurano y se recoge sangre en tubos separadores de suero por hemorragia retro-orbital. Se determinan niveles en suero de la proteína del factor VII en muestras usando un ensayo cromogénico (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, OH o Biophen FVII, Aniaara Corporation, OH) según los protocolos del fabricante. Se genera una curva patrón usando suero recogido de animales tratados con solución salina. En experimentos donde se evalúan niveles en hígado de ARNm, en diversos momentos de tiempo después de la administración, los animales se sacrifican y se recogen los hígados y se congelan criogénicamente en nitrógeno líquido. Se muele tejido de hígado congelado en polvo. Se preparan lisados de tejido y se determinan niveles en hígado de ARNm de factor VII y *apoB* usando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

15 Ejemplo 11: Determinación de la eficacia de formulaciones de partículas de lípido que contienen diversos lípidos catiónicos usando un modelo de silenciamiento de factor VII de roedor *in vivo*

20 El factor VII (FVII), una proteína importante en la cascada de la coagulación, se sintetiza en el hígado (hepatocitos) y se secreta en el plasma. Pueden determinarse niveles de FVII en plasma por un simple ensayo colorimétrico basado en placa. Como tal, FVII representa un modelo conveniente para determinar la regulación por disminución mediada por ARNip de proteínas derivadas de hepatocito, además de monitorizar concentraciones plasmáticas y distribución en tejido de las partículas de ácido nucleico-lípido y ARNip, tal como el ARNip mostrado en la Tabla 19.

TABLA 19

Dúplex	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO:	Diana
AD-1661	GGAfUfCafUfCfUfCAAGfUfCfUfUafCdTsdT		FVII
	GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT		

Minúsculas es modificación de 2'OME y Nf es una nucleobase modificada en 2'F, dT es desoxitimidina, s es fosfotioato

25 Los lípidos catiónicos descritos en el presente documento se usan para formular liposomas que contienen el dúplex AD-1661 usando un método de mezcla en línea, como se describe en la publicación internacional N.º WO 2010/088537, que se incorpora por referencia en su totalidad. Las partículas de lípido se formulan usando la

siguiente relación molar: 50 % de lípido catiónico / 10 % de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) / 38,5 % de colesterol / 1,5 % de PEG-DMG (1-(monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol, con un peso molecular de PEG promedio de 2000).

5 Ratones C57BL/6 (Charles River Labs, MA) reciben tanto solución salina como ARNip formulado mediante inyección en la vena de la cola. En diversos momentos de tiempo después de la administración, se recogen muestras de suero por hemorragia retro-orbital. Se determinan niveles en suero de la proteína factor VII en muestras usando un ensayo cromogénico (Biophen FVII, Aniera Corporation, OH). Para determinar niveles en hígado de ARNm de factor VII, los animales se sacrifican y se recogen los hígados y se congelan criogénicamente en nitrógeno líquido. Se preparan
10 lisados de tejido a partir de los tejidos congelados y se cuantifican niveles en hígado de ARNm de factor VII usando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

Se evalúa la actividad de FVII en animales tratados con ARNip de FVII 48 horas después de la inyección intravenosa (bolo) en ratones C57BL/6. Se mide FVII usando un kit comercialmente disponible para determinar los niveles de proteína en suero o tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante a una escala de microplaca. La reducción de FVII se determina contra ratones de control no tratados, y los resultados se expresan como el % de FVII residual. Se usan dos niveles de dosis (0,05 y 0,005 mg/kg de ARNip de FVII) en el cribado de cada composición de liposomas
15 novedosa.

Ejemplo 12: Formulación de ARNip usando vesículas preformadas

Se preparan partículas que contienen lípido catiónico usando el método de vesículas preformadas. Se solubilizan lípido catiónico, DSPC, colesterol y PEG-lípido en etanol a una relación molar de 40/10/40/10, respectivamente. La
20 mezcla de lípidos se añade a un tampón acuoso (citrate 50 mM, pH 4) con mezcla a una concentración de etanol y lípido final del 30 % (vol/vol) y 6,1 mg/ml, respectivamente, y se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 2 min antes de la extrusión. Los lípidos hidratados se extruyen a través de dos filtros de tamaño de poro 80 nm apilados (Nuclepore) a 22 °C usando una prensa extrusora Lipex (Northern Lipids, Vancouver, BC) hasta que se obtiene un diámetro de vesícula de 70-90 nm, como se ha determinado por análisis de Nicomp. Esto generalmente
25 requiere 1-3 pases. Para algunas mezclas de lípidos catiónicos que no forman vesículas pequeñas que hidratan la mezcla de lípidos con un tampón a pH más bajo (citrate 50 mM, pH 3) para protonar el grupo fosfato en la DSPC, el grupo de cabeza ayuda a formar vesículas de 70-90 nm estables.

Se añade el ARNip de FVII (solubilizado en un citrate 50 mM, disolución acuosa a pH 4 que contiene 30 % de etanol) a las vesículas, pre-equilibrado a 35 °C, a una tasa de ~5 ml/min con mezcla. Después de alcanzar una relación de
30 ARNip/lípido diana final de 0,06 (peso/peso), la mezcla se incuba durante otros 30 minutos a 35 °C para permitir la re-organización y encapsulación de vesículas del ARNip de FVII. Entonces se elimina el etanol y el tampón externo se sustituye con PBS (NaCl 155 mM, Na₂HPO₄ 3 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,5) por tanto diálisis como diafiltración por flujo tangencial. La relación de ARNip con respecto a lípido encapsulado final se determina después de la eliminación de ARNip no encapsulado usando columnas de centrifugación de exclusión por tamaño o columnas de
35 centrifugación de intercambio iónico.

Ejemplo 13: Determinación *in vivo* de la eficacia de formulaciones de lípido

Se evalúan inicialmente formulaciones de prueba para su inactivación de FVII en ratones C57B1/6 hembra de 7-9 semana de edad, 15-25 g, a 0,1, 0,3, 1,0 y 5,0 mg/kg con 3 ratones por grupo de tratamiento. Todos los estudios incluyen animales que recibieron tanto solución salina tamponada con fosfato (PBS, grupo de control) como una
40 formulación de referencia. Las formulaciones se diluyen a la concentración apropiada en PBS inmediatamente antes de la prueba. Se pesan los ratones y se calculan los volúmenes de dosis apropiados (10 µl/g de peso corporal). Se administran las formulaciones de prueba y de referencia, además de PBS (para animales de control) por vía intravenosa mediante la vena lateral de la cola. Los animales se anestesian 24 horas después con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina y se recogen 500-700 µl de sangre por punción cardíaca en tubos separadores
45 de suero (BD Microtainer). La sangre se centrifuga a 2.000 x g durante 10 minutos a 15 °C y se recoge suero y se guarda a -70 °C hasta el análisis. Se descongelan muestras de suero a 37 °C durante 30 minutos, se diluyen en PBS y se separan en alícuotas en placas de ensayo de 96 pocillos. Se evalúan los niveles de factor VII usando un ensayo cromogénico (kit de FVII de Biophen, Hyphen BioMed) según instrucciones del fabricante y la absorbancia se mide en un lector de microplacas equipado con un filtro de 405 nm de longitud de onda. Se cuantifican los niveles de FVII
50 en plasma y se calculan las DE₅₀ (dosis que producen una reducción del 50 % en los niveles de FVII en plasma en comparación con los animales de control) usando una curva patrón generada a partir de una muestra reunida de suero de animales de control. Aquellas formulaciones de interés que muestran altos niveles de inactivación de FVII (DE₅₀ << 0,1 mg/kg) se vuelven a probar en estudios independientes a un intervalo de dosis más bajo para confirmar la potencia y establecer niveles de DE₅₀.

55 Ejemplo 14: Estudio para determinar perfiles de lípidos y eliminación de tejido en ratones

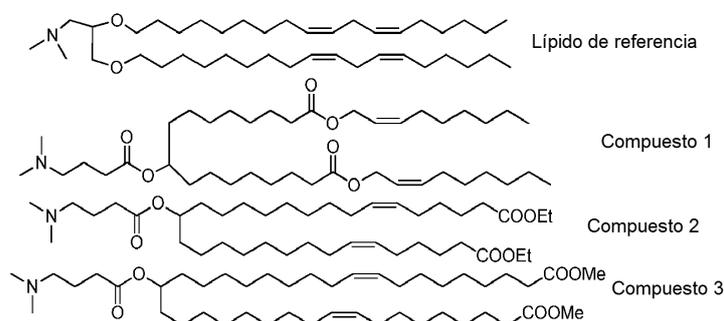
Se realizó un estudio para determinar el perfil de lípidos y la eliminación de tejido en ratones para lípidos catiónicos según la presente invención.

Se separaron ratones macho (C57BL, 20-30 g) en cuatro grupos y se administraron (por vía intravenosa) con tanto el compuesto 1, 2 o 3 de la presente invención, como un lípido de referencia, como se muestra a continuación en la Tabla 20.

TABLA 20

Grupo	Lípido	Dosis de lípido (mg/kg)	Concentración de lípido (mg/ml)	N.º de ratones macho
I	Lípido de referencia	0,3	0,03	12
II	Compuesto 1	0,3	0,03	12
III	Compuesto 2	0,3	0,03	12
IV	Compuesto 3	0,3	0,03	12

5



10 Los ratones no ayunaron. Se recogieron muestras de sangre, hígado y bazo (dos muestras por momento de tiempo por grupo) 0,17, 8, 24, 72, 168, 336 y 672 horas después de la dosis.

La Figura 1 muestra la concentración de lípido en hígado con el tiempo para los ratones en cada uno de los grupos I-IV. Los datos farmacocinéticos del hígado se presenta en la Tabla 21 a continuación.

TABLA 21

Lípido	C _{máx} (ng/ml)	ABC (h.ng/ml)	MRT _{0-t} (horas)
Lípido de referencia	22.400	6.954.787	221
Compuesto 1	1.136	4.594	NC
Compuesto 2	118	436	NC
Compuesto 3	208	NC	NC

MRT representa tiempo de residencia medio. NC representa no calculable.

15 La vía metabólica anticipada para los compuestos 1 y 3 se muestra en la Figura 2. La concentración de estos metabolitos se midió en el hígado. Los resultados se muestran en la Tabla 22 a continuación. Todas las mediciones después de 24 horas (incluyendo aquellas tomadas a 72, 168, 336 y 672 horas después de la administración) estuvieron por debajo del nivel de cuantificación (BLQ).

TABLA 22

Tiempo (h)	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 3	
	Mono-ácido	Di-ácido	Mono-ácido	Di-ácido	Mono-ácido	Di-ácido
0,17	126,00	125,50	10,62	14,75	20,15	23,95
8	1,25	1,31	0,40	0,56	BLQ	BLQ
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

20

La Figura 3 muestra la concentración de lípido en bazo con el tiempo para los ratones en cada uno de los grupos I-IV. Los datos farmacocinéticos del bazo se presenta en la Tabla 23 a continuación.

TABLA 23

Lípido	C _{máx} (ng/ml)	ABC (h.ng/ml)	MRT _{0-t} (horas)
Lípido de referencia	9.152	3.426.038	229,7
Compuesto 1	7.460	41.967	2,8
Compuesto 2	13.640	238.044	11,1
Compuesto 3	4368	18.686	0,7

- 5 Se midió la concentración de los metabolitos de los compuestos 1-3 en el bazo y los resultados se muestran en la Tabla 24 a continuación.

TABLA 24

Tiempo (h)	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 3	
	Mono-ácido	Di-ácido	Mono-ácido	Di-ácido	Mono-ácido	Di-ácido
0,17	208,1	37,5	624,8	95,1	1591,5	687,3
8	36,2	BLQ	792,0	127,2	182,6	121,9
24	BLQ	BLQ	62,1	BLQ	BLQ	Sin muestra
72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	99,7
168	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	33,6
336	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	52,0
672	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

- 10 La Figura 4 muestra la concentración de lípido en plasma con el tiempo para los ratones en cada uno de los grupos I-IV. Los datos farmacocinéticos en plasma se presentan en la Tabla 25 a continuación.

TABLA 25

Lípido	C _{máx} (ng/ml)	ABC (h.ng/ml)	MRT _{0-t} (horas)
Referencia Lípido	2.110	63.775	201
Compuesto 1	38.750	155.012	0,0006
Compuesto 2	28.800	115.612	0,0285
Compuesto 3	30.600	122.412	0,0008

- 15 Se midió la concentración de los metabolitos de los compuestos 1-3 en el plasma y los resultados se muestran en la Tabla 26 a continuación. Todas las mediciones después de 24 horas (incluyendo aquellas tomadas a las 72, 168, 336 y 672 horas después de la administración) estuvieron por debajo del nivel de cuantificación (BLQ).

TABLA 26

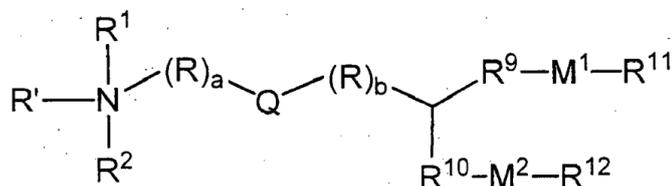
Tiempo (h)	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 3	
	Mono-ácido	Di-ácido	Mono-ácido	Di-ácido	Mono-ácido	Di-ácido
0,17	181,43	1186,40	1355,56	605,56	1037,63	871,64
8	BLQ	BLQ	2,66	3,53	BLQ	21,18
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2,45

Como puede apreciarse de las Figuras 1, 3 y 4 y las Tablas 22, 24 y 26, los compuestos 1, 2 y 3 de la presente invención presentan eliminación de tejido y actividad espectacularmente mejorada cuando se compara con el lípido de referencia.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula IB



Fórmula (IB)

en la que

- 5 R^1 y R^2 son cada uno, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, o heterociclo; o
- R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido;
- cada aparición de R es, independientemente, $-(CR^3R^4)-$;
- 10 cada aparición de R^3 y R^4 son, independientemente H, OH, alquilo, alcoxi, $-NH_2$, alquilamino o dialquilamino (en una realización preferida, cada aparición de R^3 y R^4 son, independientemente, H o alquilo C_1-C_4);
- o R^3 y R^4 , junto con el átomo de carbono al que están directamente unidos, forman un grupo cicloalquilo, en la que no más de tres grupos R en cada cadena unida al carbono C^* son cicloalquilo (por ejemplo, ciclopropilo);
- 15 Q está ausente o es $-O-$, $-NH-$, $-S-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^4)-$, $-N(R^5)C(O)-$, $-S-S-$, $-OC(O)O-$, $-O-N=C(R^5)-$, $-C(R^5)=N-O-$, $-OC(O)N(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)N(R^5)-$, $-N(R^5)C(O)O-$, $-C(O)S-$, $-C(S)O-$ o $-C(R^5)=N-O-C(O)-$;
- R^5 es H o metilo;
- 20 a es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;
- b es 0, 1, 2 o 3;
- R' está ausente, es hidrógeno o alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_4);
- M^1 y M^2 son cada uno, independientemente, un grupo biodegradable;
- cada uno de R^9 y R^{10} son, independientemente, alqueno, o alqueno; y
- 25 cada uno de R^{11} y R^{12} son independientemente alquilo o alqueno, opcionalmente terminado por $COOR^{13}$ donde cada R^{13} es independientemente alquilo;
- con la condición de que:
- R^9 , M^1 , y R^{11} sean juntos al menos 8 átomos de carbono de longitud; y
- R^{11} , M^2 , y R^{12} sean juntos al menos 8 átomos de carbono de longitud.
- 30 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^9 y R^{10} son cada uno independientemente alqueno C_4-C_{12} o alqueno C_4-C_{12} , M^1 y M^2 son $-C(O)O-$, y R^{11} y R^{12} son alqueno C_4-C_{12} o alqueno C_4-C_{12} .
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que R^9 , M^1 y R^{11} son juntos 12 a 24 átomos de carbono de longitud, o en el que R^{10} , M^2 y R^{12} son juntos 12 a 24 átomos de carbono de longitud.
- 35 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el grupo $R'R^1R^2N-(R)_a-Q-(R)_b-$ es $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(O)O-$, $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-NH-C(O)O-$, $(CH_3)_2N-(CH_2)_2-OC(O)-NH-$ o $(CH_3)_2N-(CH_2)_3-C(CH_3)=N-O-$.
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o en forma de un lípido catiónico.

6. Una partícula de lípido que comprende un lípido neutro, un lípido capaz de reducir la agregación y un lípido catiónico de la reivindicación 5.
7. La partícula de lípido de la reivindicación 6, en la que el lípido neutro está seleccionado de DSPC, DPPC, POPC, DOPE o SM; el lípido capaz de reducir la agregación es un lípido de PEG; y la partícula de lípido comprende además un esteroil.
8. La partícula de lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en la que el lípido catiónico está presente en un porcentaje en moles de 20 % al 60 %; el lípido neutro está presente en un porcentaje en moles de 5 % al 25 %; el esteroil está presente en un porcentaje en moles de 25 % al 55 %; y el lípido de PEG es PEG-DMA, PEG-DMG, o una combinación de los mismos, y está presente en un porcentaje en moles del 0,5 % al 15 %.
9. La partícula de lípido de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además un agente activo, seleccionado de un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulante, un ARNip, un oligonucleótido antisentido, un microARN, un antagomir, un aptámero y una ribozima.
10. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La partícula de lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para su uso en un método de modulación de la expresión de un gen diana en una célula.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión en exceso de un polipéptido en un sujeto, en la que el agente activo es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en un ARNip, un microARN y un oligonucleótido antisentido, y en la que el ARNip, microARN o oligonucleótido antisentido incluye un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la subexpresión de un polipéptido en un sujeto, en la que el agente activo es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, en la que el agente activo es un oligonucleótido inmunoestimulante.
15. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 14, en la que el gen diana está seleccionado del grupo que consiste en factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen de ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen de ciclina A, gen de ciclina E, gen WNT-1, gen de beta-catenina, gen c-MET, gen PKC, gen NFkB, gen STAT3, gen de survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen de la topoisomerasa I, gen de la topoisomerasa II alfa, gen p73, gen p21(WAF1/CIP1), gen p27 (KIP 1), gen PPM ID, gen RAS, gen de caveolina I, gen MIB I, gen MTAI, gen M68, genes supresores de tumor y genes supresores de tumor p53.

FIGURA 1

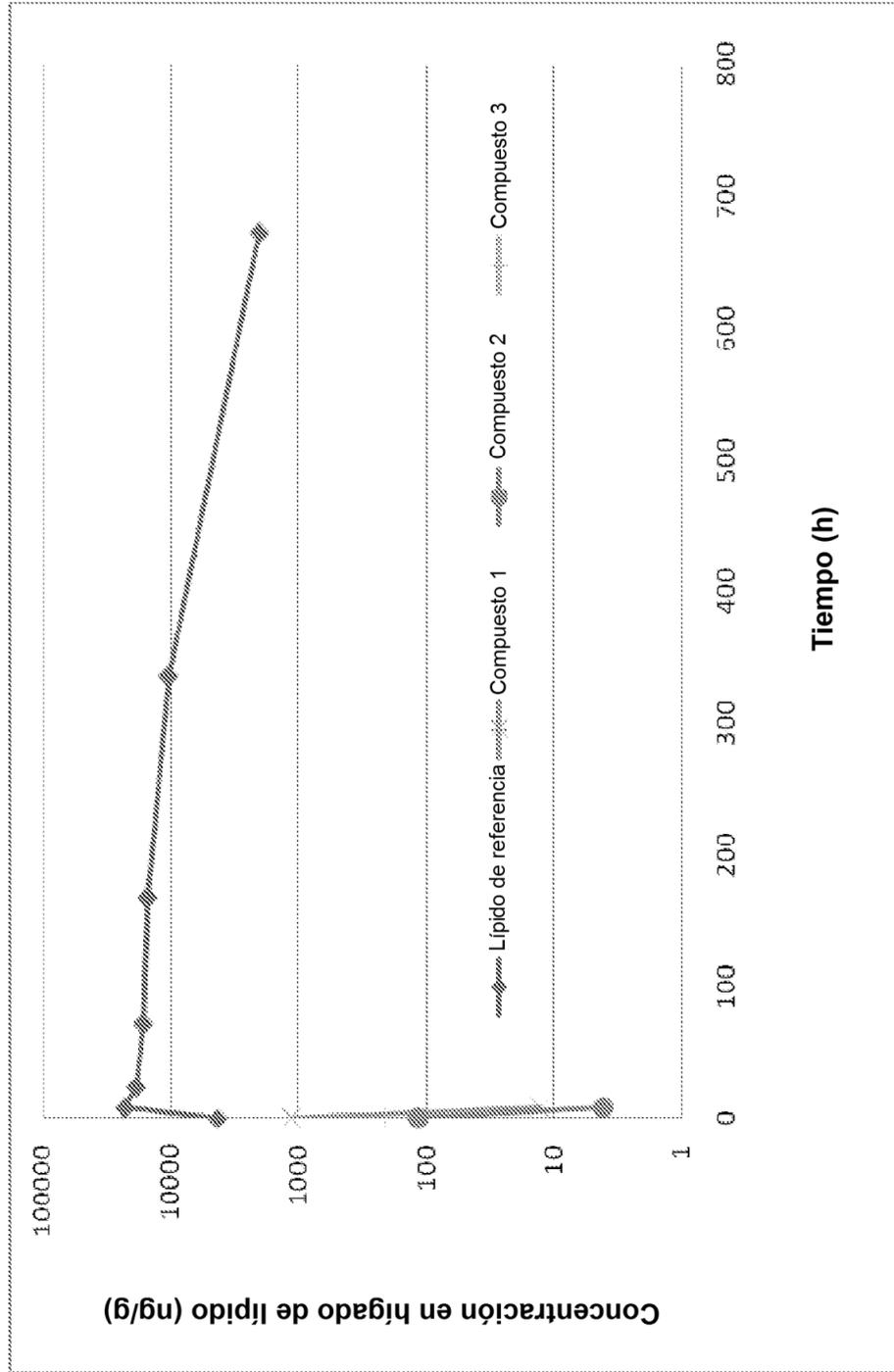


FIGURA 2

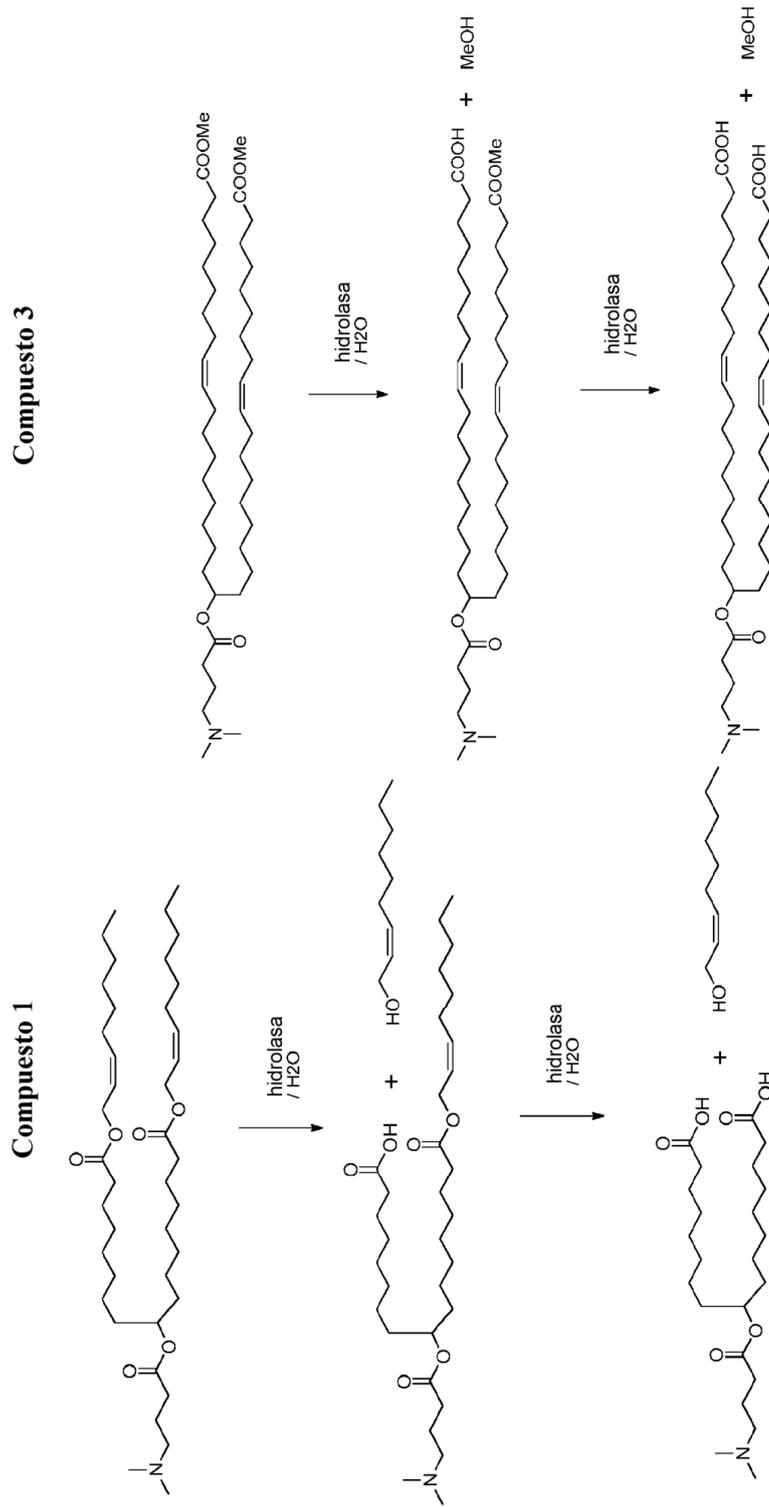


FIGURA 3

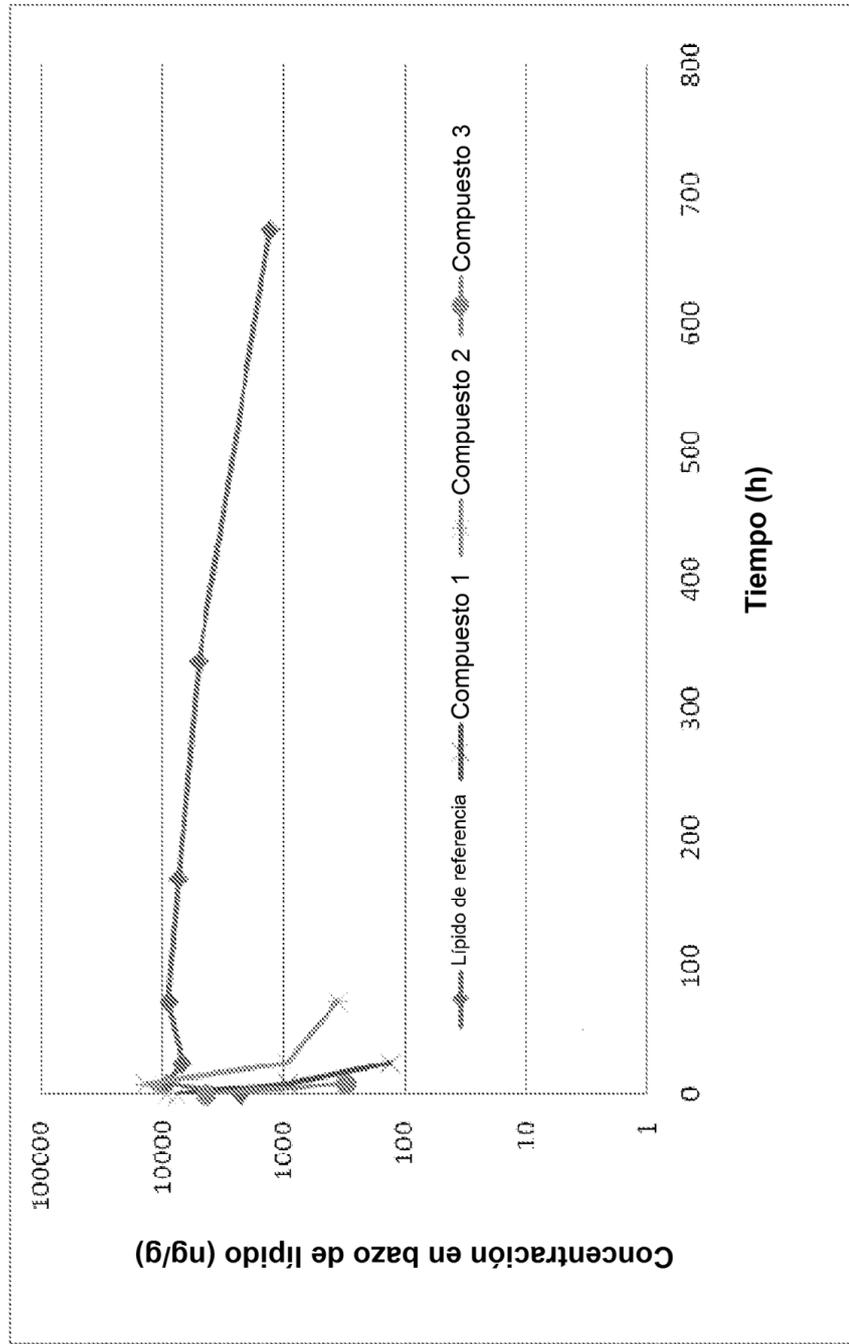


FIGURA 4

