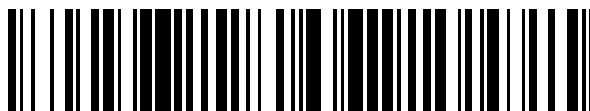


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 968**

51 Int. Cl.:

C07D 205/04	(2006.01)	C07D 211/62	(2006.01)
C07C 229/12	(2006.01)	C07D 295/15	(2006.01)
C07C 229/38	(2006.01)	A61K 31/40	(2006.01)
C07D 265/30	(2006.01)	A61K 31/44	(2006.01)
C07D 207/12	(2006.01)		
C07D 207/16	(2006.01)		
C07D 211/22	(2006.01)		
C07D 295/088	(2006.01)		
C07D 211/46	(2006.01)		
C07D 211/60	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/US2014/070882**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095340**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14835739 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3083556**

54 Título: **Lípidos y composiciones lipídicas para la administración de agentes activos**

30 Prioridad:

19.12.2013 US 201361918175 P
20.12.2013 US 201361918927 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2020

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

BRITO, LUIS;
CHEN, DELAI;
GAMBER, GABRIEL GRANT;
GEALL, ANDREW;
LOVE, KEVIN;
ZABAWA, THOMAS y
ZECRI, FREDERIC

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 774 968 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lípidos y composiciones lipídicas para la administración de agentes activos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos lipídicos catiónicos y a composiciones que comprenden dichos compuestos. La presente invención también se refiere a procesos para preparar dichos compuestos y composiciones, y a métodos y usos de dichos compuestos y composiciones, p. ej., para administrar agentes biológicamente activos, tales como agentes de ARN, a células y tejidos.

Antecedentes de la invención

La administración de agentes biológicamente activos (incluyendo compuestos terapéuticamente relevantes) a los sujetos es obstaculizada con frecuencia por dificultades en los compuestos que alcanzan la célula o el tejido diana. En particular, el transporte de muchos agentes biológicamente activos a células vivas está muy restringido por los sistemas de membrana complejos de las células. Estas restricciones pueden dar como resultado la necesidad de usar concentraciones mucho mayores de agentes biológicamente activos de lo que es deseable para lograr un resultado, lo que aumenta el riesgo de efectos tóxicos y efectos secundarios. Una solución a este problema es utilizar moléculas transportadoras específicas y composiciones transportadoras a las que se permite entrada selectiva en la célula. Se pueden usar vehículos lipídicos, polímeros biodegradables y diversos sistemas conjugados para mejorar la administración de agentes biológicamente activos a las células.

Una clase de agentes biológicamente activos que es particularmente difícil de administrar a las células es un producto bioterapéutico (incluyendo nucleósidos, nucleótidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos y derivados, tales como ARNm, iARN y agentes de ARN autorreplicantes). En general, los ácidos nucleicos son estables solo durante un tiempo limitado en las células o el plasma. El desarrollo de interferencia de ARN, terapia de iARN, terapia de ARNm, fármacos de ARN, terapia antisentido, terapia génica y vacunas de ácido nucleico (p. ej., vacunas de ARN), entre otros, ha aumentado la necesidad de un medio eficaz para introducir agentes activos de ácido nucleico en células. Por estas razones, las composiciones que pueden estabilizar y administrar agentes basados en ácido nucleico en las células son de particular interés.

Los enfoques mejor estudiados para mejorar el transporte de ácidos nucleicos extraños a células implican el uso de vectores víricos o formulaciones con lípidos catiónicos. Se pueden usar vectores víricos para transferir genes de manera eficaz a algunos tipos de células, pero en general no pueden usarse para introducir moléculas sintetizadas químicamente en células.

Un enfoque alternativo es usar composiciones de administración que incorporen lípidos catiónicos que interactúan con un agente biológicamente activo en una parte e interactúan con un sistema de membrana en otra parte. Se ha señalado que dichas composiciones proporcionan liposomas, micelas, lipoplejos o nanopartículas lipídicas, dependiendo de la composición y el método de preparación (para revisiones, véase Felgner, 1990, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5, 162-187; Felgner, 1993, *J. Liposome Res.*, 3, 3-16; Gallas, 2013, *Chem. Soc. Rev.*, 42, 7983-7997; Falsini, 2013, *J. Med. Chem.* dx.doi.org/10.1021/jm400791q; y referencias en los mismos).

Desde la primera descripción de liposomas en 1965 por Bangham (*J. Mol. Biol.* 13, 238-252), ha habido un interés y un esfuerzo continuados en el desarrollo de sistemas de soporte a base de lípidos para la administración de agentes biológicamente activos (Allen, 2013, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 36-48). El proceso de introducción de ácidos nucleicos funcionales en células cultivadas mediante el uso de liposomas con carga positiva se describió por primera vez en Philip Felgner *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 7413-7417 (1987). El proceso se demostró posteriormente *in vivo* en K. L. Brigham *et al.*, *Am. J. Med. Sci.*, 298, 278-281 (1989). Más recientemente, se han desarrollado formulaciones de nanopartículas lipídicas con eficacia demostrada *in vitro* e *in vivo*. (Falsini, 2013, *J. Med. Chem.* dx.doi.org/10.1021/jm400791q; Morrissey, 2005, *Nat. Biotech.*, 23, 1002-1007; Zimmerman, 2006, *Nature*, 441, 111-114; Jayaraman, 2012, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 8529-8533.)

Las formulaciones lipídicas son vehículos atractivos, ya que pueden proteger las moléculas biológicas de la degradación mejorando al mismo tiempo su captación celular. De las diversas clases de formulaciones lipídicas, las formulaciones que contienen lípidos catiónicos se usan habitualmente para administrar polianiones (p. ej., ácidos nucleicos). Dichas formulaciones pueden formarse usando solo lípidos catiónicos y opcionalmente incluyendo otros lípidos y anfífilos tales como fosfatidiletanolamina. Es bien sabido en la técnica que tanto la composición de la formulación lipídica como su método de preparación afectan a la estructura y el tamaño del agregado resultante (Leung, 2012, *J. Phys. Chem. C*, 116, 18440-18450).

La encapsulación de compuestos aniónicos usando lípidos catiónicos es esencialmente cuantitativa debido a la interacción electrostática. Además, se cree que los lípidos catiónicos interactúan con las membranas celulares con carga negativa iniciando el transporte de la membrana celular (Akhtar *et al.*, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; Xu *et al.*, 1996, *Biochemistry* 35, 5616). Además, se cree que la forma molecular, la conformación y las propiedades de los

lípidos catiónicos proporcionan eficacia de administración potenciada desde los compartimentos endosómicos al citosol (Semple, 2010, Nat. Biotech, 28, 172-176; Zhang, 2011, 27, 9473-9483).

5 Aunque se ha mostrado que el uso de lípidos catiónicos para la administración celular de agentes biológicamente activos tiene varias ventajas, sigue existiendo la necesidad de más lípidos catiónicos que faciliten la administración sistémica y local de agentes biológicamente activos tales como agentes de ARNm e iARN a células. También existe la necesidad de lípidos catiónicos que, en relación con los lípidos catiónicos que se conocen en la técnica, mejoren la administración sistémica y local de agentes biológicamente activos a células. Existe la necesidad adicional de formulaciones lipídicas que tengan características físicas optimizadas para administración local y sistémica mejorada de agentes biológicamente activos a órganos específicos y a tumores, especialmente tumores fuera del hígado.

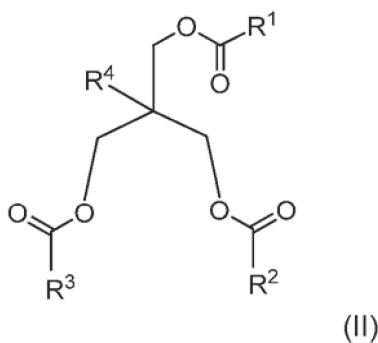
15 Además, existe la necesidad de más lípidos catiónicos que proporcionen toxicidad reducida (o índice terapéutico mejorado), en relación con los lípidos catiónicos que se conocen en la técnica. Se han empleado lípidos catiónicos tradicionales para la administración de ARN y ADN al hígado o los tumores, pero padecen eficacia de administración que no es óptima junto con toxicidad en tejidos y órganos a dosis mayores. Un método para reducir la exposición y aumentar la biocompatibilidad de los lípidos catiónicos es incorporar funcionalidades química o bioquímicamente degradables, (tales como éster, amida, acetal, imina, etc.), lo que puede conducir a mejora de la eliminación *in vivo* (Maier, 2013, 21, 1570-1578).

20 Se describen lípidos biodegradables para la administración de agentes activos en el documento WO 2013/086354. Se describen triglicéridos catiónicos simétricos en Obika, 2001, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 9, 245-254. Se describen lípidos, composiciones lipídicas y métodos para usarlos para administrar agentes biológicamente activos a células y/o tejidos en el documento WO 2011/076807. Se describen lípidos catiónicos, sistemas de administración basados en lípidos catiónicos, formas de prepararlos y métodos para tratar enfermedades usándolos en el documento WO 2009/129395. Se describen poliaminas multifuncionales para la administración de polinucleótidos biológicamente activos en el documento WO 03/102150. Una formulación que comprende un ARN mensajero sintético modificado y un agente de administración, en donde el ARN codifica una proteína leptina, no se replica y está listo para la traducción, se describe en el documento WO 2015/095351.

30 Sumario de la invención

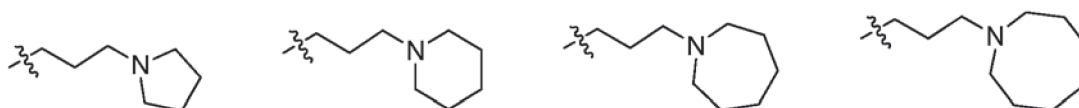
La presente invención proporciona un armazón de lípidos catiónicos que demuestra eficacia mejorada junto con menor toxicidad (índice terapéutico mejorado) como resultado de niveles lipídicos mantenidos menores en los tejidos relevantes y para aplicaciones de administración local (ojo, oído, piel, pulmón); administración a células musculares (i.m.), grasas o subcutáneas (dosificación s.c.).

35 En un aspecto, esta invención proporciona un compuesto de fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

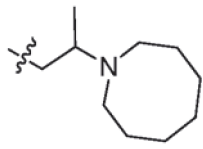


40

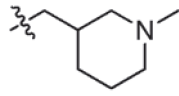
R¹ se selecciona del grupo que consiste en:



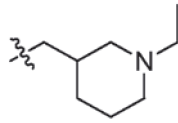
45



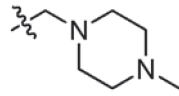
,



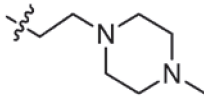
,



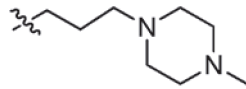
,



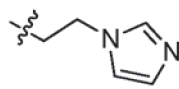
,



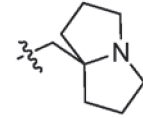
,



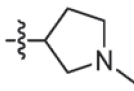
,



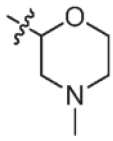
,



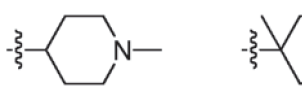
,



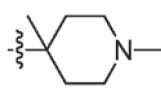
,



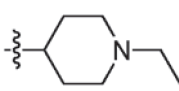
,



,

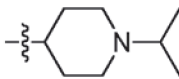


,

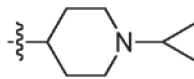


,

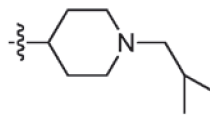
5



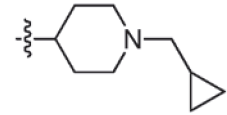
,



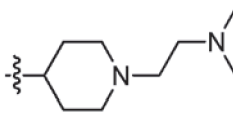
,



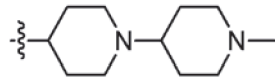
,



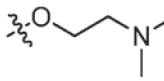
,



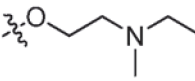
,



,

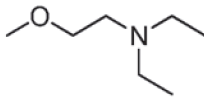


,

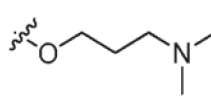


,

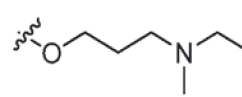
10



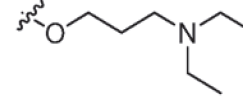
,



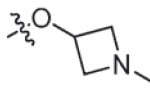
,



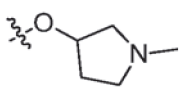
,



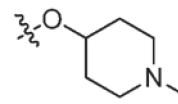
,



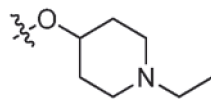
,



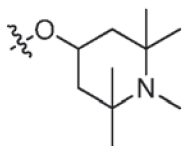
,



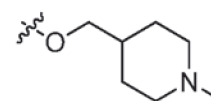
,



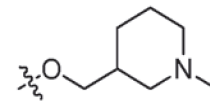
,



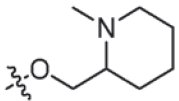
,



,



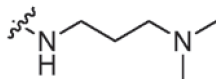
,



,

15

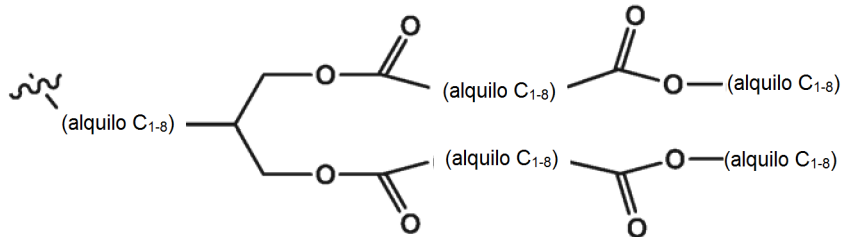
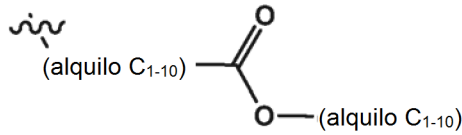
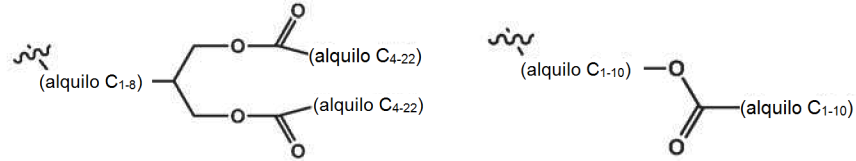
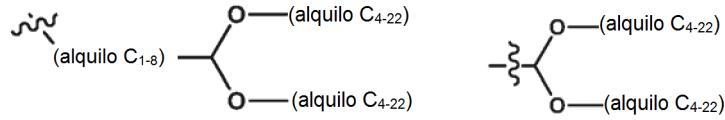
y



;

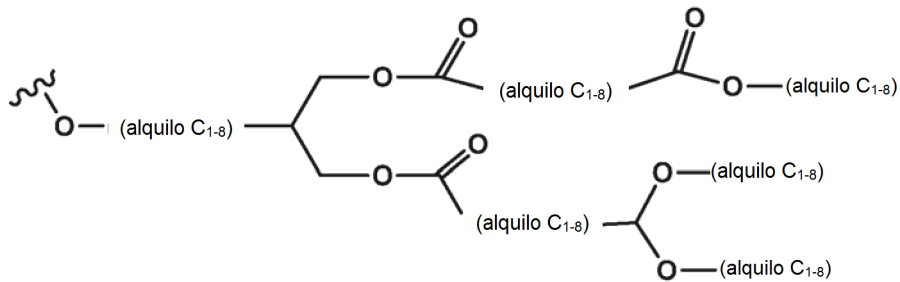
cada uno de R² y R³ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C₇₋₂₂, alqueno C₁₂₋₂₂, cicloalquilo C₃₋₈, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos alquilo;

5



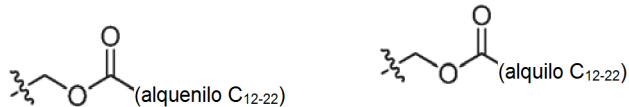
10

y



15

y
R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₁₄,



20

y

5

Los compuestos de fórmula (II) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos sin lípidos catiónicos útiles en la liberación de agentes biológicamente activos a células y tejidos.

En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 5 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(4-metilpiperazin-1-il)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- 10 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(pirrolidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(piperidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- 15 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
- 20 bis(2-heptilundecanoato) de 2-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo;
bis(2-heptilundecanoato) de 2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- 25 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
bis(3-octilundecanoato) de 2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- 30 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((7-hexiltridecanoil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((9-pentiltetradecanoil)oxi)metil)propilo;
- 35 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-heptildodecanoil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(2,2-bis(heptiloxi)acetoxi)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((6,6-bis(octiloxi)hexanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
- 40 dioctanoato de 2-(3-etil-11-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)-8,14-dioxo-7,9,13-trioxa-3-azaheptadecan-17-il)propano-1,3-diílo;
bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- 45 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
1-isopropilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
- 50 1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propano-1,3-diílo;
- 55 4-metilmorfolin-2-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
- 60 1-metilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
- 65 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilazetidín-3-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;

octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpiperidin-4-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 5 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1,2,2,6,6-pentametilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propil)carbamoil)oxi)metil)propilo;
 10 1,4-dimetil-piperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis((2-propilpentil)oxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 1,4-dimetil-piperidin-4-carboxilato de 3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato) de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(6,6-bis(octiloxi)hexanoato) de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 15 bis(6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoato) de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 dioctanoato de 2-(5-(3-(dodecanoiloxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo;
 dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-(palmitoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo;
 20 dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-(tetradecanoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo;
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(dodecanoiloxi)metil)propilo;
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(tetradecanoiloxi)metil)propilo;
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(palmitoiloxi)metil)propilo;
 25 8-metil octanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo);
 10-octil decanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo);
 decanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propil)
 10-octilo;
 8-metil octanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propilo); y
 30 dioctanodioato de 8-dimetil O'1,O1-(2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);

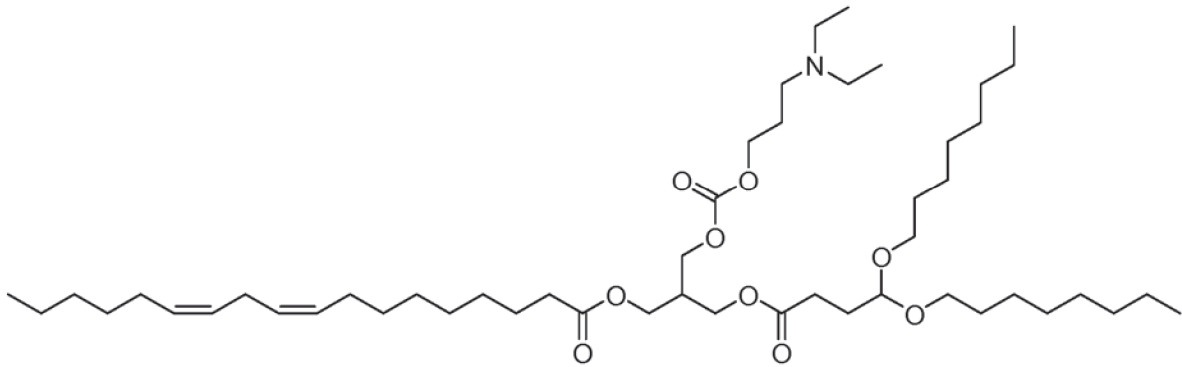
En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto según fórmula (II) (es decir, una composición lipídica de la invención) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la composición lipídica comprende además al menos otro componente lipídico. En otra realización, la composición lipídica comprende además un agente biológicamente activo, opcionalmente en combinación con uno o más componentes lipídicos adicionales. En otra realización, la composición lipídica está en forma de liposoma. En otra realización, la composición lipídica está en forma de nanopartícula lipídica (LNP). En otra realización, la composición lipídica es adecuada para su administración al hígado. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para su administración a un tumor. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para fines de inmunización. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para aplicaciones de administración local (ojo, oído, piel, pulmón); administración a células musculares (i.m.), grasas o subcutáneas (dosificación s.c.).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica (es decir, formulación) que comprende una composición lipídica de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos otro componente lipídico en la composición lipídica. En otra realización, la composición lipídica está en forma de liposoma. En otra realización, la composición lipídica está en forma de una nanopartícula lipídica. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para su administración al hígado. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para su administración a un tumor. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para aplicaciones de administración local (ojo, oído, piel, pulmón); administración a células musculares (i.m.), grasas o subcutáneas (dosificación s.c.). En otra realización, el agente biológicamente activo es un ARN o ADN. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para fines de inmunización y el agente biológicamente activo es un ARN o ADN que codifica un inmunógeno.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende liposomas y moléculas de ARN autorreplicantes codificantes de inmunógenos, en donde los liposomas comprenden el compuesto de la invención y en donde al menos la mitad del porcentaje molar de las moléculas de ARN están encapsuladas en los liposomas.

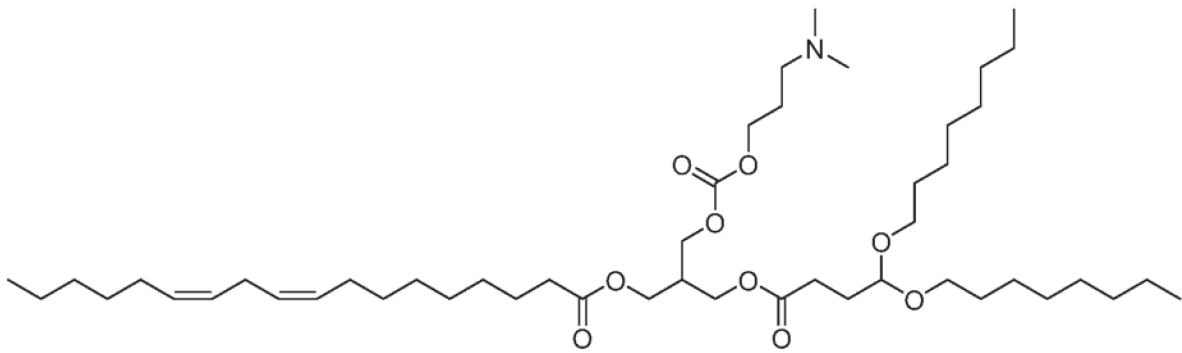
En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición lipídica de la invención para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria a un inmunógeno en un vertebrado.

En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto:



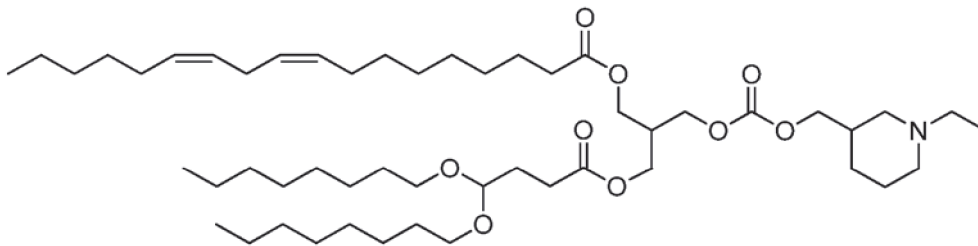
5 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(diethylamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto:



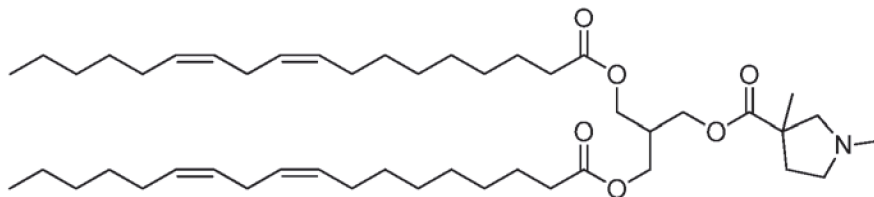
10 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto:



15 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En otro aspecto, esta invención proporciona un compuesto:

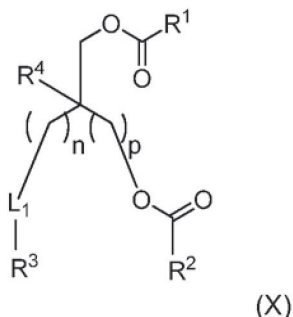


25 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describe un compuesto, o sal del mismo, de fórmula (X):

5

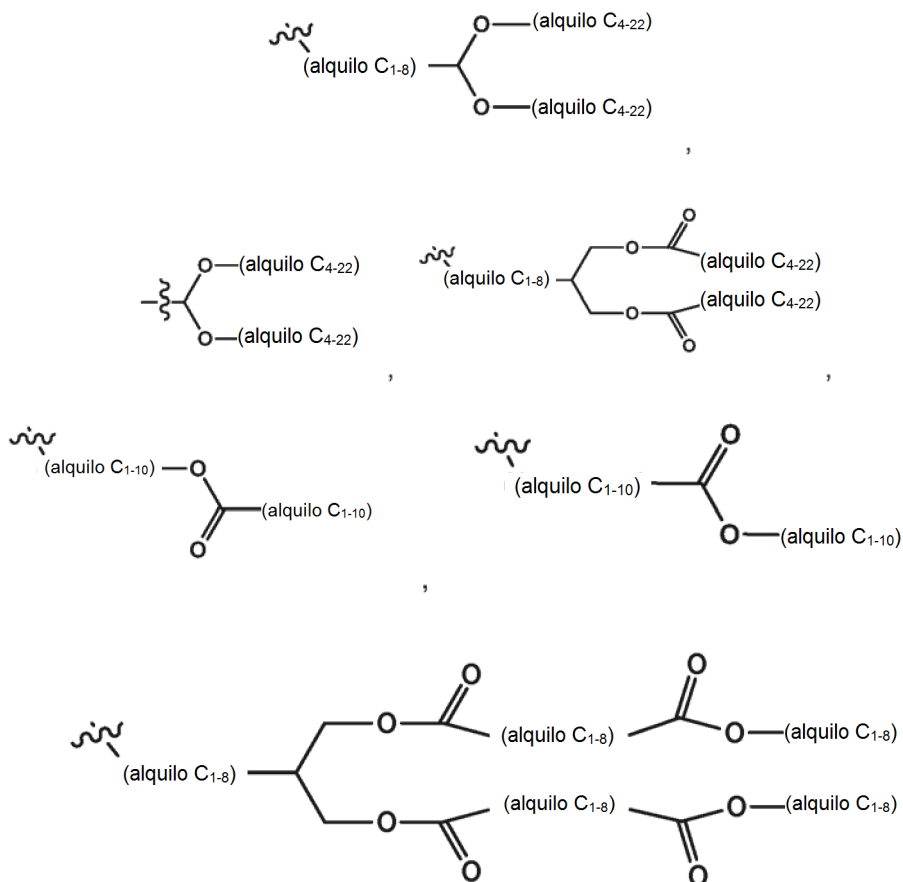


10

15

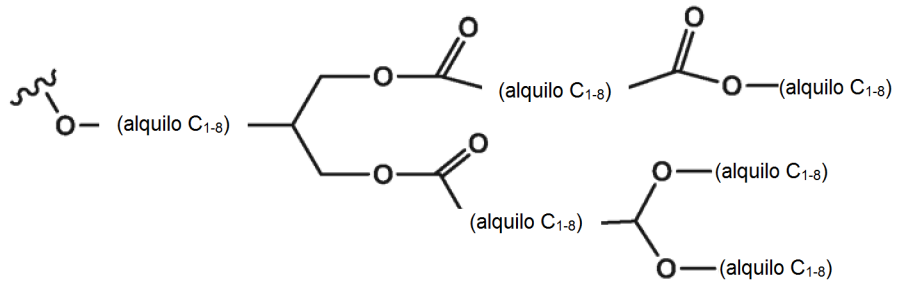
en la que n y p son cada uno, independientemente, 0, 1 o 2; L₁ es -OC(O)-, -C(O)O- o un enlace; R¹ es heterociclilo, heterocicliil-alquilo C₁₋₈ o heterocicliil-alcóxilo C₁₋₈, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 grupos, seleccionados independientemente entre halógeno, formidamidina, alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₈, heterociclilo, -[alquilen(C₁₋₄)]_v-N(R')R'', -O-[alquilen(C₁₋₄)]_v-N(R')R'' o -N(H)-[alquilen(C₁₋₄)]_v-N(R')R'', en el que dicho alquilen(C₁₋₄) está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R; v es 0, 1, 2, 3 o 4; R es hidrógeno o -alquilo C₁₋₈ o cuando v es 0, R está ausente; R' y R'', son cada uno, independientemente, hidrógeno, -alquilo C₁₋₈; o R' y R'' se combinan con el nitrógeno al que están enlazados, y que incluyen opcionalmente otro heteroátomo seleccionado entre N, O y S, para formar un heterociclo o heteroarilo de 5-8 miembros, opcionalmente sustituido con un -alquilo C₁₋₈, hidroxilo o cicloalquilo C₁₋₈; R² y R³ son cada uno, independientemente, alquilo C₇₋₂₂, alqueno C₁₂₋₂₂, cicloalquilo C₃₋₈ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos alquilo,

20

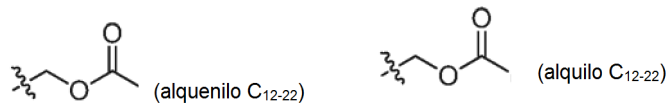


25

y



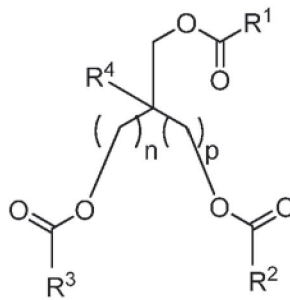
R⁴ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁₋₁₄,



5

y

En el presente documento se describe un compuesto, o sal del mismo, en el que el compuesto de fórmula (I):

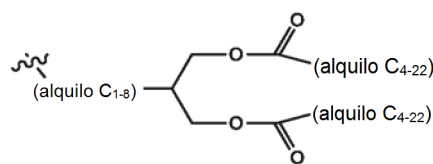
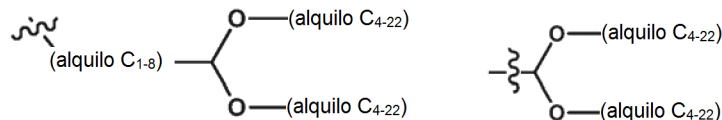


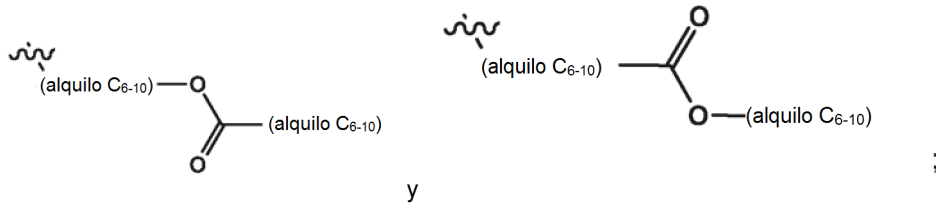
(I)

10

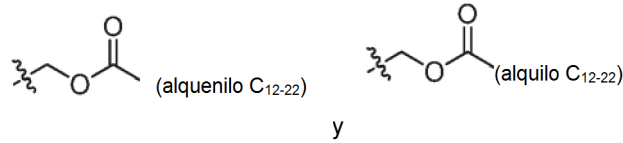
en la que n y p son cada uno, independientemente, 1 o 2; R¹ es heterociclilo, heterociclil-alquilo C₁₋₈ o heterociclil-alcoxilo C₁₋₈, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos, seleccionados independientemente entre alquilo C₁₋₈, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquil C₃₋₇-alquilo C₁₋₈, heterociclilo, -[alquilenos(C₁₋₄)]_v-N(R')R'', -O-[alquilenos(C₁₋₄)]_v-N(R')R'' o -N(H)-[alquilenos(C₁₋₄)]_v-N(R')R'', en el que dicho alquilenos(C₁₋₄) está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R; v es 0, 1, 2, 3 o 4; R es hidrógeno o -alquilo C₁₋₈ o cuando v es 0, R está ausente; R' y R'', son cada uno, independientemente, hidrógeno, -alquilo C₁₋₈; o R' y R'' se combinan con el nitrógeno al que están enlazados, y que incluyen opcionalmente otro heteroátomo seleccionado entre N, O y S, para formar un heterociclo o heteroarilo de 5-8 miembros, opcionalmente sustituido con un -alquilo C₁₋₈, hidroxilo o cicloalquilo C₁₋₈; R² y R³ son cada uno, independientemente, alquilo C₁₂₋₂₂, alqueno C₁₂₋₂₂,

20

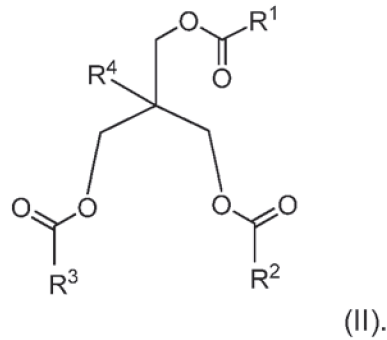




R⁴ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁₋₁₄,

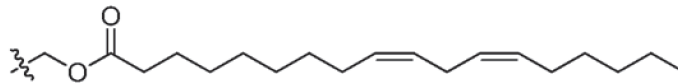


5 En un primer aspecto, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que el compuesto es de fórmula (II) ("un lípido proporcionado por la invención"):

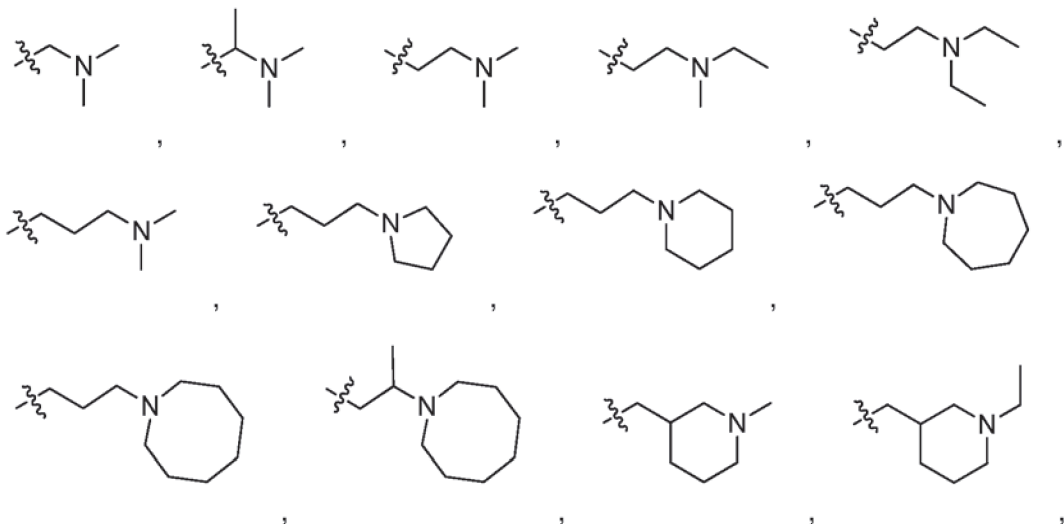


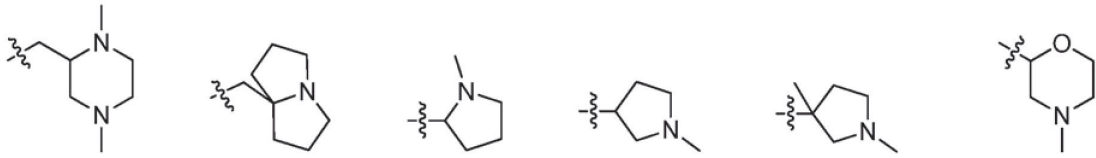
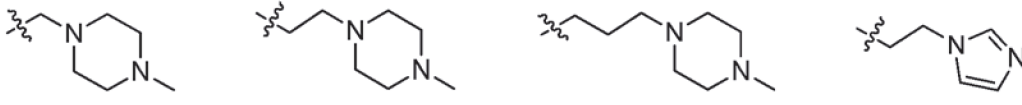
10 En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R⁴ es hidrógeno.

15 En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R⁴ es

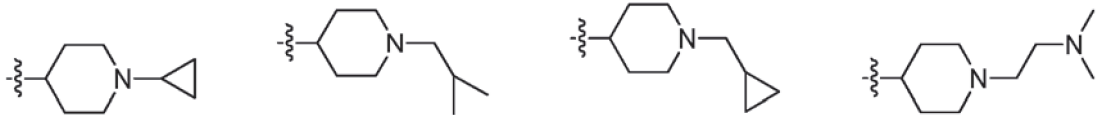


En el presente documento se describe el compuesto, o sal del mismo, en el que R¹ se selecciona entre:

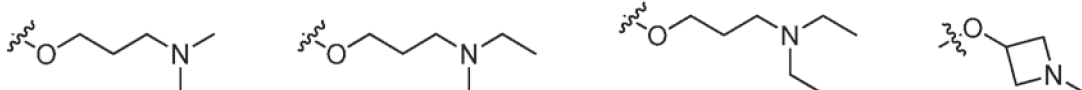
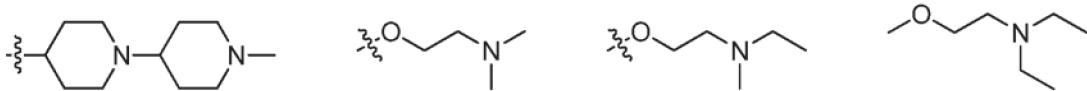




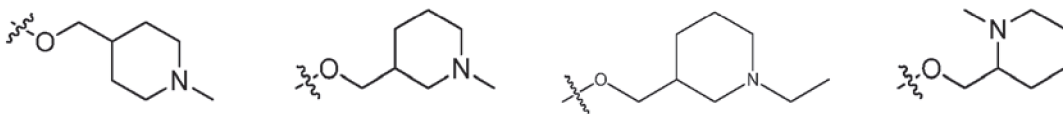
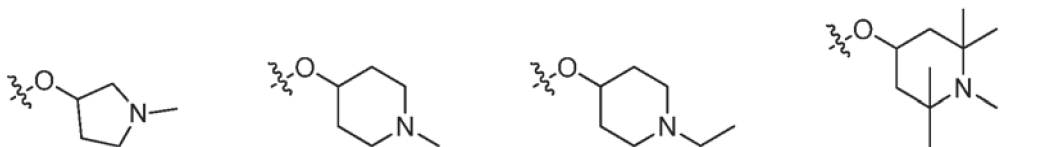
5



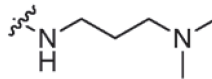
10



15



y

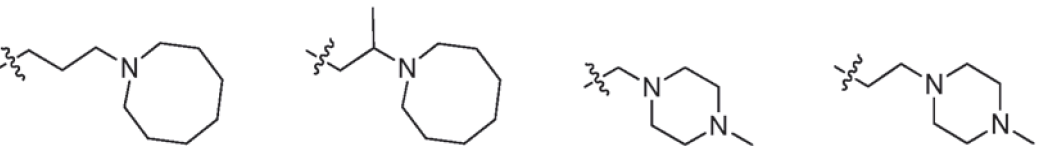
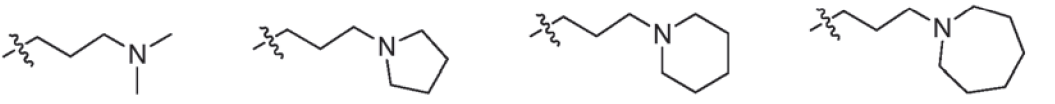


En el presente documento se describe el compuesto, o sal del mismo, en el que R¹ se selecciona entre:

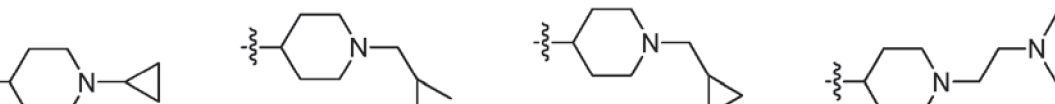
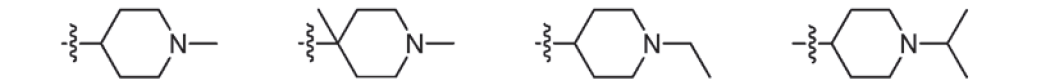
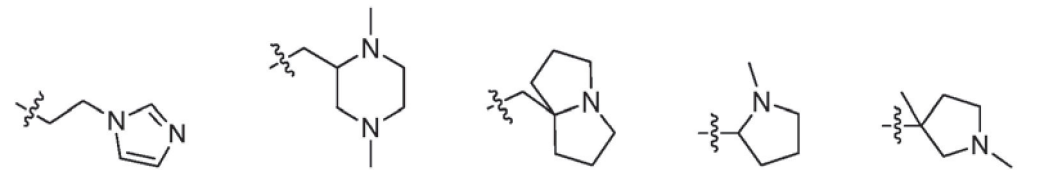
5



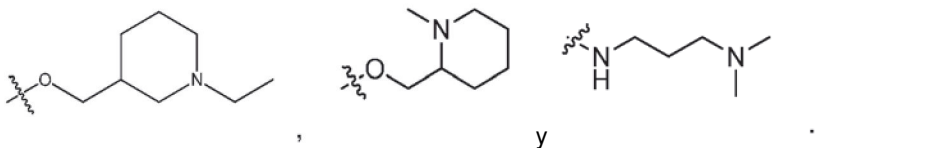
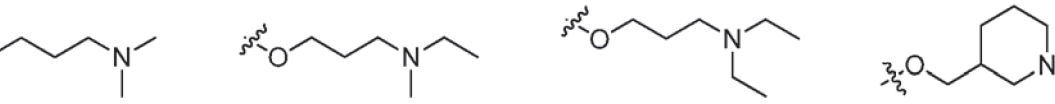
10



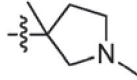
15



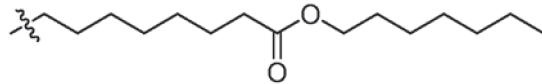
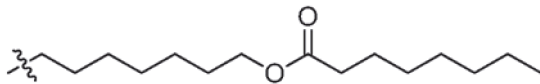
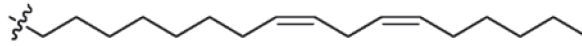
20



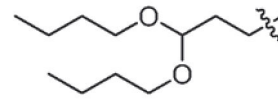
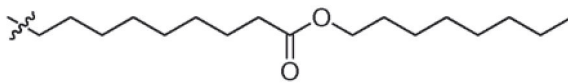
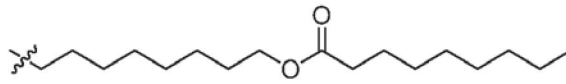
En el presente documento se describe el compuesto, o sal del mismo, en el que R¹ es



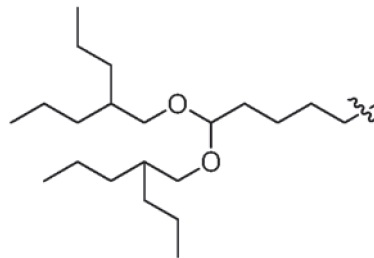
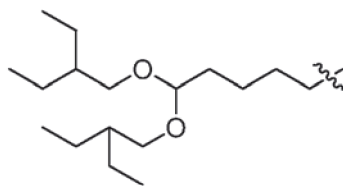
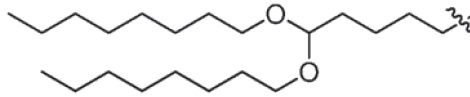
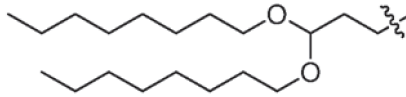
5 En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R² se selecciona entre:



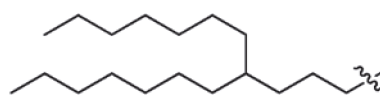
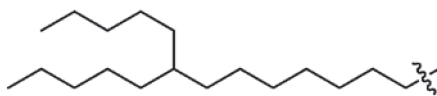
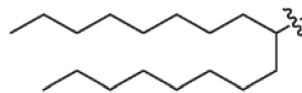
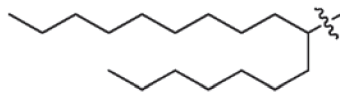
10

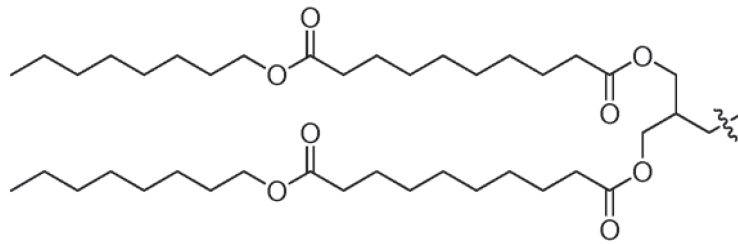
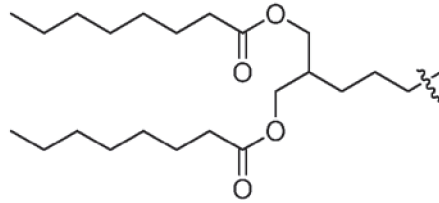
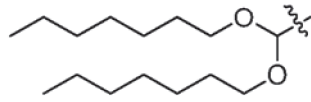


15



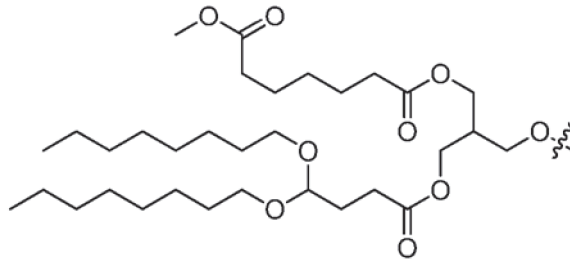
20





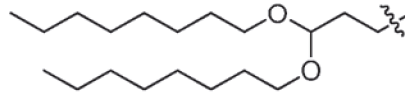
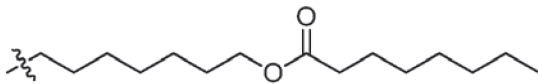
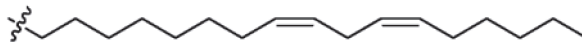
5

y

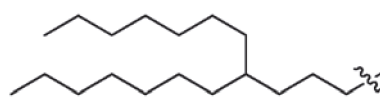
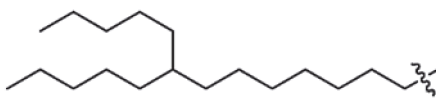
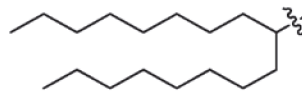
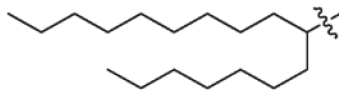


10

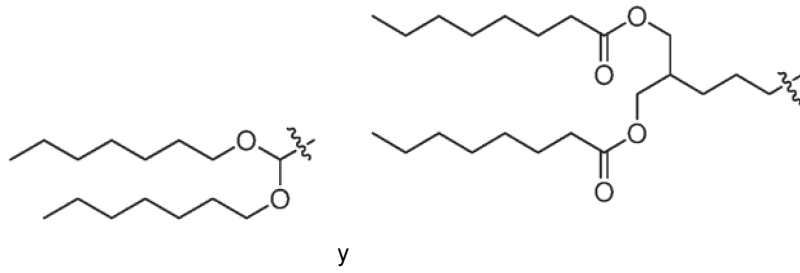
En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R² se selecciona entre:



15



20

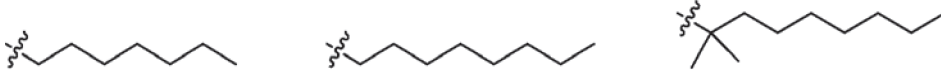


En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R² es

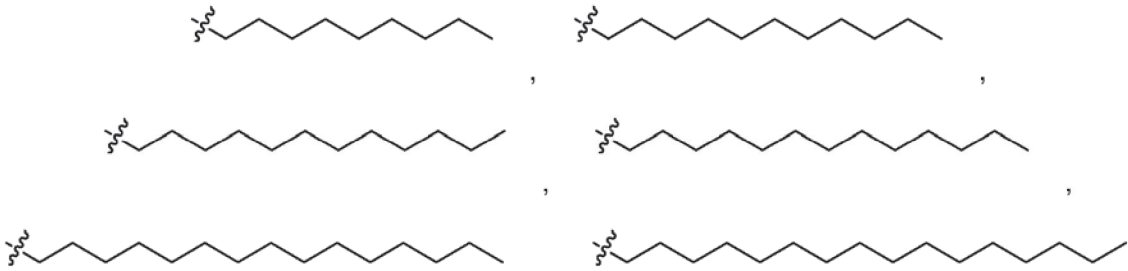


5

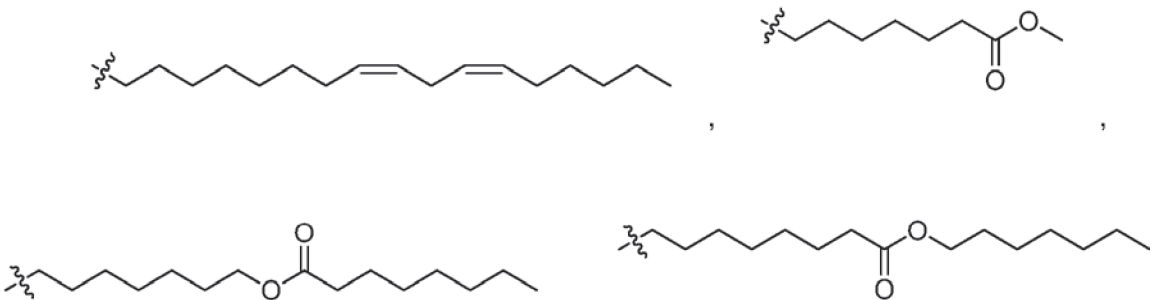
En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R³ se selecciona entre



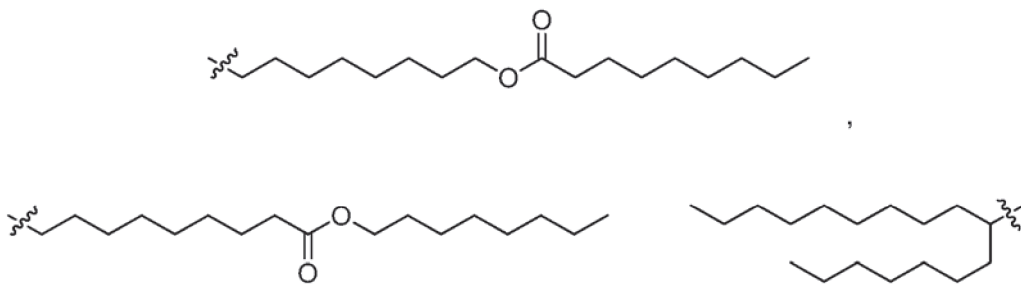
10

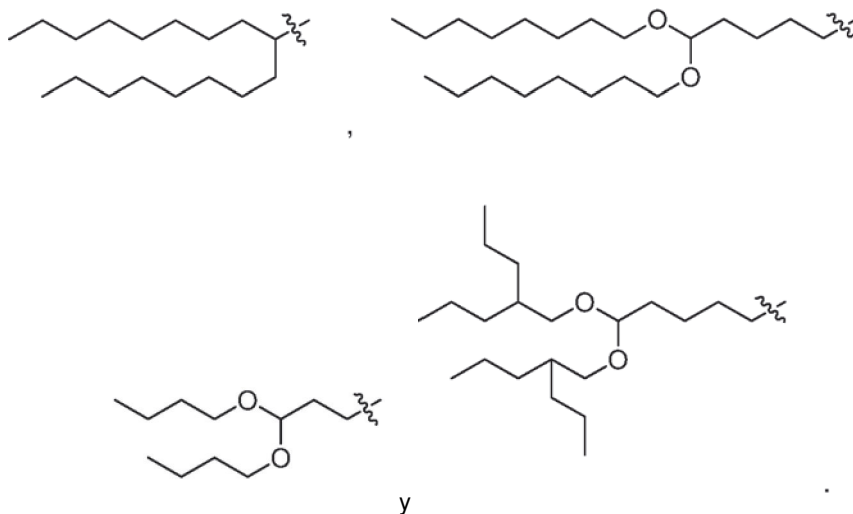


15

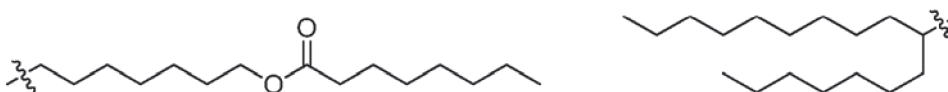
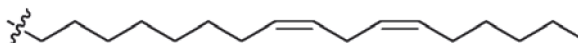


20

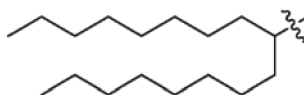




5 En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R³ se selecciona entre



10 y



15 En una realización, la invención es el compuesto, o sal del mismo, en el que R² y R³ son idénticos.

En el presente documento se describe el compuesto, o sal del mismo, en el que el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 20 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(4-metilpiperazin-1-il)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(pirrolidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(piperidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 25 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((2-(dimetilamino)acetoxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-
 30 1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-morfolinopropanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(8-(octanoiloxi)octanoato) de 2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-
 35 (dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-
 (dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-

- il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 bis(2-heptilundecanoato de 2-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 bis(2-heptilundecanoato de 2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 5 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 bis(3-octilundecanoato de 2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 10 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((9-pentiltetradecanoil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-heptildodecanoil)oxi)metil)propilo;
 15 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(2,2-bis(heptiloxi)acetoxi)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((6,6-bis(octiloxi)hexanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 20 dioctanoato de 2-(3-etil-11-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)-8,14-dioxo-7,9,13-trioxa-3-azaheptadecan-17-il)propano-1,3-diilo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 25 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propilo;
 1-isopropilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 30 1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 35 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propano-1,3-diilo;
 1-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 1-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2R)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 40 4-metilmorfolin-2-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 45 1-metilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 1-metilpiperidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 3-((dimetilamino)metil)benzoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 50 4-((dietilamino)metil)benzoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(pirrolidin-1-il)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 55 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 60 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilazetidid-3-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 65 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpiperidin-4-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1,2,2,6,6-pentametilpiperidin-4-

- il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propil)carbamoil)oxi)metil)propilo;
 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis((2-propilpentil)oxi)butanoil)oxi)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 10-octil decanodioato de 1-(3-((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo);
 bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato de 2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato de 2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(6,6-bis(octiloxi)hexanoato de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoato de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 dioctanoato de 2-(5-(3-(dodecanoiloxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo);
 dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-(palmitoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo);
 dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-(tetradecanoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo);
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((dodecanoiloxi)metil)propilo);
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((tetradecanoiloxi)metil)propilo);
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((palmitoiloxi)metil)propilo);
 8-metil octanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo);
 8-metil octanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo);
 8-metil octanodioato de 1-(16-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)metil)-9-dodecil-2-metil-7,13-dioxo-6,8,12,14-tetraoxa-2-azaheptadecan-17-ilo);
 decanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propil)10-octilo);
 8-metil octanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propilo);
 dioctanodioato de 8-dimetil O'1,O1-(2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 8-dimetil dioctanodioato de O'1,O1-(2-(7-dodecil-14-metil-3,9-dioxo-2,4,8,10-tetraoxa-14-azapentadecil)propano-1,3-diílo);
 10-dioctil bis(decanodioato) de O'1,O1-(2-(7-dodecil-14-metil-3,9-dioxo-2,4,8,10-tetraoxa-14-azapentadecil)propano-1,3-diílo);
 10-dioctil bis(decanodioato) de O'1,O1-(2-(14-metil-7-octil-3,9-dioxo-2,4,8,10-tetraoxa-14-azapentadecil)propano-1,3-diílo); y
 10-dioctil bis(decanodioato) de O'1,O1-(2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo).

En el presente documento se describe el compuesto, o sal del mismo, en el que el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en:

- bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(4-metilpiperazin-1-il)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(pirrolidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(piperidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diil bis(octadeca-9,12-dienoato);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-((2-(dimetilamino)acetoxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-morfolinopropanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(octadeca-9,12-dienoato de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 bis(2-(octanoiloxi)octanoato de 2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo);
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo);
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo);
 bis(2-heptilundecanoato de 2-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo);
 bis(2-heptilundecanoato de 2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo);

- octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo;
- octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
- 5 bis(3-octilundecanoato) de 2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
- octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((9-pentiltetradecanoil)oxi)metil)propilo;
- 10 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-heptildodecanoil)oxi)metil)propilo;
- octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(2,2-bis(heptiloxi)acetoxi)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
- 15 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((6,6-bis(octiloxi)hexanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
- dioctanoato de 2-(3-etil-11-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)-8,14-dioxo-7,9,13-trioxa-3-azaheptadecan-17-il)propano-1,3-diílo;
- bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- 20 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
- octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propilo;
- 25 1-isopropilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
- 1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
- 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo; y
- 30 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propano-1,3-diílo.

35 En una segunda realización de aspecto, la invención es una composición lipídica que comprende un compuesto según el primer aspecto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, la composición lipídica comprende además un agente biológicamente activo.

En una realización, el agente biológicamente activo es un ácido nucleico.

40 En una realización, el agente biológicamente activo es un ADN, ARNip o ARNm.

En una realización, el agente biológicamente activo es un ARNm.

45 En una realización, el agente biológicamente activo es un ARNip.

En una realización, la composición lipídica comprende además un lípido auxiliar.

En una realización, la composición lipídica comprende además un lípido neutro.

50 En una realización, la composición lipídica comprende además un lípido sigiloso.

En una realización, el lípido auxiliar es colesterol, el lípido neutro es DSPC y el lípido sigiloso es S010, S024, S027, S031 o S033.

55 En una realización, la composición lipídica está en forma de una nanopartícula lipídica.

Se describe en el presente documento la composición lipídica como se ha descrito anteriormente que tiene 30-60 % de un compuesto de fórmula (I), 5-10 % de colesterol/30-60 % de DSPC y 0,1-5 % de S010, S024, S027, S031 o S033.

60 En una realización, el pH de dicha composición lipídica es 4-6 en el momento de la encapsulación y/o formulación.

En una realización, el pH de dicha composición lipídica es 5-6 en el momento de la encapsulación y/o formulación.

En una realización, el pH de dicha composición lipídica es 5,6-6,0 en el momento de la encapsulación y/o formulación.

65 En un tercer aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende una composición lipídica según

la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se describe en el presente documento un método para el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de composición lipídica como se describe en el presente documento, a un paciente que necesite tratamiento del mismo.

Se describe en el presente documento un método para el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

En un cuarto aspecto, la invención es la composición o composición farmacéutica del segundo o tercer aspecto de la invención, en donde la composición comprende una molécula de ARN que codifica un inmunógeno.

En una realización, el lípido está en forma de una nanopartícula lipídica (LNP) y el ARN está asociado con la LNP.

En un quinto aspecto, la invención es la composición del cuarto aspecto en donde el lípido está en forma de una nanopartícula lipídica (LNP) y el ARN está asociado con la LNP, además en donde la LNP es un liposoma.

En una realización, el liposoma tiene un diámetro en el intervalo de aproximadamente: 60-180 nm, p. ej., aproximadamente: 80-160 nm.

En una realización, dicho liposoma comprende además un lípido que comprende un grupo de cabeza zwitteriónico.

En una realización, dicho liposoma comprende además DlinDMA (1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano), DSPC (1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfolina), un colesterol, un lípido PEGilado o una combinación de los mismos.

En una realización, la invención es una composición farmacéutica que comprende la composición del quinto aspecto y un excipiente farmacéutico.

En un sexto aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende liposomas y moléculas de ARN que codifican inmunógenos, en donde los liposomas comprenden el compuesto de la invención y en donde al menos la mitad del porcentaje molar de las moléculas de ARN están encapsuladas en los liposomas.

En una realización, la invención es la composición farmacéutica del sexto aspecto, en donde (i) al menos 80 % en número de los liposomas tienen diámetros en el intervalo de aproximadamente: 60-180 nm, (ii) el diámetro promedio de los liposomas está en el intervalo de aproximadamente: 60-180 nm o (iii) los diámetros de los liposomas tienen un índice de polidispersidad de <0,2.

En una realización, la invención es la composición del quinto o sexto aspecto, en donde el ARN es un ARN autorreplicante.

En una realización, el ARN autorreplicante codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN.

En una realización, el ARN autorreplicante comprende un primer marco abierto de lectura que codifica una replicasa de alfavirus y un segundo marco abierto de lectura que codifica el inmunógeno.

En una realización, el ARN autorreplicante es mayor de aproximadamente 2000 nucleótidos, tal como mayor de aproximadamente: 9000, 12000, 15000, 18000, 21000, 24000 o más nucleótidos de longitud.

En una realización, la invención es la composición de uno cualquiera del cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención, en donde el inmunógeno puede inducir una respuesta inmunitaria *in vivo* contra una bacteria, un virus, un hongo o un parásito.

En el séptimo aspecto, la invención es un método para inducir una respuesta inmunitaria a un inmunógeno en un vertebrado, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de uno cualquiera del cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención al vertebrado.

En un octavo aspecto, la invención es la composición farmacéutica de uno cualquiera del cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención para inducir una respuesta inmunitaria en un vertebrado a un inmunógeno.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo totalmente saturada, ramificada o no ramificada, que tiene el número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁₋₈ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₄₋₂₂ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 4 a 22 átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₆₋₁₀ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁₂₋₂₂ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 12 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-

butilo, sec-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo, *n*-undecanilo, *n*-dodecanilo, *n*-tridecanilo, 9-metilheptadecanilo, 1-heptildecilo, 2-octildecilo, 6-hexildodecilo, 4-heptilundecilo, y similares.

5 Como se usa en el presente documento, el término "alquileno" se refiere a un grupo alquilo divalente como se ha definido anteriormente en el presente documento. Los ejemplos representativos de alquileno incluyen, pero sin limitación, metileno, etileno, *n*-propileno, *iso*-propileno, *n*-butileno, *sec*-butileno, *iso*-butileno, *terc*-butileno, *n*-pentileno, isopentileno, neopentileno, *n*-hexileno, 3-metilhexileno, 2,2-dimetilpentileno, 2,3-dimetilpentileno, *n*-heptileno, *n*-octileno, *n*-nonileno, *n*-decileno, y similares.

10 Como se usa en el presente documento, el término "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo insaturado, ramificada o no ramificada, que tiene el número especificado de átomos de carbono y uno o más dobles enlaces carbono-carbono dentro de la cadena. Por ejemplo, alquenilo C₁₂₋₂₂ se refiere a un grupo alquenilo que tiene de 12 a 22 átomos de carbono con uno o más dobles enlaces carbono-carbono dentro de la cadena. En ciertas realizaciones, los grupos alquenilo tienen un doble enlace carbono-carbono dentro de la cadena. En otras realizaciones, los grupos alquenilo tienen más de un doble enlace carbono-carbono dentro de la cadena. Los grupos alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes como se definen en la fórmula (I). Los ejemplos representativos de alquenilo incluyen, pero sin limitación, etileno, propeno, buteno, penteno, hexeno y similares. Otros ejemplos de alquenilo incluyen, pero sin limitación: Z-octadec-9-enilo, Z-undec-7-enilo, Z-heptadeca-8-enilo, (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienilo, (8Z,11Z)-heptadeca-8,11-dienilo, (8Z,11Z,14Z)-heptadeca-8,11,14-trienilo, linolenilo, 2-octildeca-1-enilo, linoleilo y oleilo.

25 Como se usa en el presente documento, el término "alquenileno" se refiere a un grupo alquenilo divalente como se ha definido anteriormente en el presente documento. Los ejemplos representativos de alquenileno incluyen, pero sin limitación, etenileno, propenileno, butenileno, pentenileno, hexenileno y similares.

30 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere a se refiere a cualquier resto alquilo unido a través de un puente de oxígeno (es decir un grupo -O-alquilo C₁₋₃ en el que el alquilo C₁₋₃ es como se define en el presente documento). Los ejemplos de dichos grupos incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi y propoxi.

35 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un anillo hidrocarburo saturado, monocíclico, bicíclico o tricíclico que tiene el número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, cicloalquilo C₃₋₇ se refiere a un anillo cicloalquilo que tiene de 3 a 7 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes como se definen en la fórmula (I). Los ejemplos representativos de cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, biciclo[2.1.1]hexilo, biciclo[2.2.1]heptilo, adamantilo y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

40 Como se usa en el presente documento, el término "heterocíclico" se refiere a un anillo monocíclico o bicíclico, saturado o insaturado, de 4 a 12 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos. Los sistemas de anillos heterocíclicos no son aromáticos. Los grupos heterocíclicos que contienen más de un heteroátomo pueden contener heteroátomos diferentes. Los grupos heterocíclicos son sistemas de anillos monocíclicos, espiro o bicíclicos condensados o puenteados. Los ejemplos de grupos heterocíclicos monocíclicos incluyen tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, 1,4-dioxanilo, morfolinilo, 1,4-ditianilo, azetidino, piperazinilo, piperidinilo, 1,3-dioxolanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, oxatolanilo, ditiolanilo, 1,3-dioxanilo, 1,3-ditianilo, oxatianilo, tiomorfolinilo, 1,4,7-trioxa-10-azaciclododecanilo, azapanilo y similares. Los ejemplos de anillos espiro heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, 1,5-dioxa-9-azaespiro[5.5]undecanilo, 1,4-dioxa-8-azaespiro[4.5]decanilo, 2-oxa-7-azaespiro[3.5]nonanilo, y similares. Los sistemas de anillos heterocíclicos condensados tienen de 8 a 11 átomos en el anillo e incluyen grupos en los que un anillo heterocíclico está condensado con un anillo fenilo. Los ejemplos de anillos heterocíclicos condensados incluyen, pero sin limitación, decahidroquinilino, (4aS,8aR)-decahidroisoquinolinilo, (4aS,8aS)-decahidroisoquinolinilo, octahidrociclopenta[c]pirrolilo, isoinolinilo, (3aR,7aS)-hexahidro-[1,3]dioxolo[4.5-c]piridinilo, octahidro-1H-pirrolilo[3,4-b]piridinilo, tetrahidroisoquinolinilo y similares.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "heterociclilalquilo C₁₋₈" se refiere a un anillo heterocíclico como se ha definido anteriormente que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo o mediante un radical alquilo C₁₋₈ como se ha definido anteriormente.

60 Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un radical monocíclico aromático de 5 o 6 miembros que comprende 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados individualmente entre nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heteroarilo puede estar enlazado mediante un átomo de carbono o heteroátomo. Los ejemplos de heteroarilo incluyen, pero sin limitación, furilo, pirrolilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, pirazinilo, piridazinilo, pirimidilo o piridilo.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "heteroarilalquilo C₁₋₈" se refiere a un anillo heteroarilo como se

ha definido anteriormente que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo o por un radical alquilo C₁₋₈ como se ha definido anteriormente. Como se usa en el presente documento, la expresión "un isómero óptico" o "un estereoisómero" se refiere a cualquiera de las diversas configuraciones estereoisoméricas que pueden existir para un compuesto determinado de la presente invención e incluye isómeros geométricos. Se entiende que un sustituyente puede estar unido a un centro quiral de un átomo de carbono. El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse sobre su compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre su compañera de imagen especular. Por lo tanto, la invención incluye enantiómeros, diastereómeros o racematos del compuesto. "Enantiómeros" son un par de estereoisómeros que no son imágenes especulares superponibles entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término se usa para designar una mezcla racémica cuando sea apropiado. "Diaestereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema Cahn-Ingold-Prelog R-S. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada carbono quiral puede especificarse por *R* o *S*. Los compuestos resueltos cuya configuración absoluta es desconocida pueden designarse (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextro- o levógira) en la que giran el plano de luz polarizada a la longitud de onda de la línea D de sodio. Ciertos compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros o ejes asimétricos y por lo tanto pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (*R*)- o (*S*)-.

Dependiendo de la elección de los materiales de partida y los procedimientos, los nuevos compuestos pueden estar presentes en forma de uno de los isómeros posibles o como mezclas de los mismos, por ejemplo como isómeros ópticos puros, o como mezclas de isómeros, tal como racematos y mezclas de diastereoisómeros, dependiendo del número de átomos de carbono asimétricos. La presente invención pretende incluir todos estos isómeros posibles, incluyendo mezclas racémicas, mezclas diastereoméricas y formas ópticamente puras. Pueden prepararse isómeros (*R*) y (*S*) ópticamente activos usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un doble enlace, el sustituyente puede tener una configuración *E* o *Z*. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente cicloalquilo puede tener una configuración *cis* o *trans*. Se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas.

Cualquier átomo asimétrico (por ejemplo, carbono o similar) del compuesto o compuestos de la presente invención puede estar presente en forma racémica o enriquecida enantioméricamente, por ejemplo, la configuración (*R*), (*S*) o (*R,S*). En ciertas realizaciones, cada átomo asimétrico tiene al menos un 50 % de exceso enantiomérico, al menos un 60 % de exceso enantiomérico, al menos un 70 % de exceso enantiomérico, al menos un 80 % de exceso enantiomérico, al menos un 90 % de exceso enantiomérico, al menos un 95 % de exceso enantiomérico o al menos un 99 % de exceso enantiomérico en la configuración (*R*) o (*S*). Los sustituyentes en átomos con dobles enlaces insaturados pueden, si es posible, estar presentes en forma *cis* (*Z*) o *trans* (*E*).

En consecuencia, como se usa en el presente documento, un compuesto de la presente invención puede estar en forma de uno de los posibles isómeros, rotámeros, atropisómeros, tautómeros o mezclas de los mismos, por ejemplo, como isómeros geométricos sustancialmente puros (*cis* o *trans*), diastereómeros, isómeros ópticos (antípodos), racematos o mezclas de los mismos.

Cualquier mezcla de isómeros resultante puede separarse basándose en las diferencias fisicoquímicas de los constituyentes, en los isómeros geométricos u ópticos puros o sustancialmente puros, diastereómeros, racematos, por ejemplo, por cromatografía y/o cristalización fraccionada.

Cualquier racemato resultante de productos finales o intermedios puede resolverse en las antípodos ópticos por métodos conocidos, por ejemplo, por separación de las sales diastereoméricas de los mismos, obtenidas con un ácido o base ópticamente activo, y liberando el compuesto ácido o básico ópticamente activo. En particular, un resto básico puede emplearse de ese modo para resolver los compuestos de la presente invención en sus antípodos ópticos, por ejemplo, por cristalización fraccionada de una sal formada con un ácido ópticamente activo, por ejemplo, ácido tartárico, ácido dibenzoil tartárico, ácido diacetil tartárico, ácido di-*O,O'*-*p*-toluoil tartárico, ácido mandélico, ácido málico o ácido alcanfor-10-sulfónico. Los productos racémicos también pueden resolverse por cromatografía quiral, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) usando un adsorbente quiral.

Como se usa en el presente documento, los términos "sal" o "sales" se refieren a una adición de ácidos de un compuesto de la invención. Las "sales" incluyen en particular "sales farmacéuticamente aceptables". La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y, que típicamente no son biológicamente ni de otro modo indeseables. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, por ejemplo, acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, alcanforsulfonato, cloruro/clorhidrato, clorteofilonato, citrato, etandisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato,

malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrogenofosfato/dihidrogenofosfato, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y sales trifluoroacetato.

- 5 Los ácidos inorgánicos de los que pueden obtenerse sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

- 10 Los ácidos orgánicos de los que pueden obtenerse sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas.

- 15 Las bases inorgánicas de las que pueden obtenerse sales incluyen, por ejemplo, sales de amonio y metales de las columnas I a XII de la tabla periódica. En ciertas realizaciones, las sales se obtienen a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, cinc y cobre; las sales particularmente adecuadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

- 20 Las bases orgánicas de las que pueden obtenerse sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio iónico básicas, y similares. Determinadas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

- 25 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir de un resto básico o ácido, por métodos químicos convencionales. En general, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base adecuada (tal como, hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg o K, o similares), o haciendo reaccionar formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido adecuado. Dichas reacciones se realizan normalmente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En general, es deseable el uso de medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, cuando sea posible. Pueden encontrarse listas de sales adecuadas adicionales, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

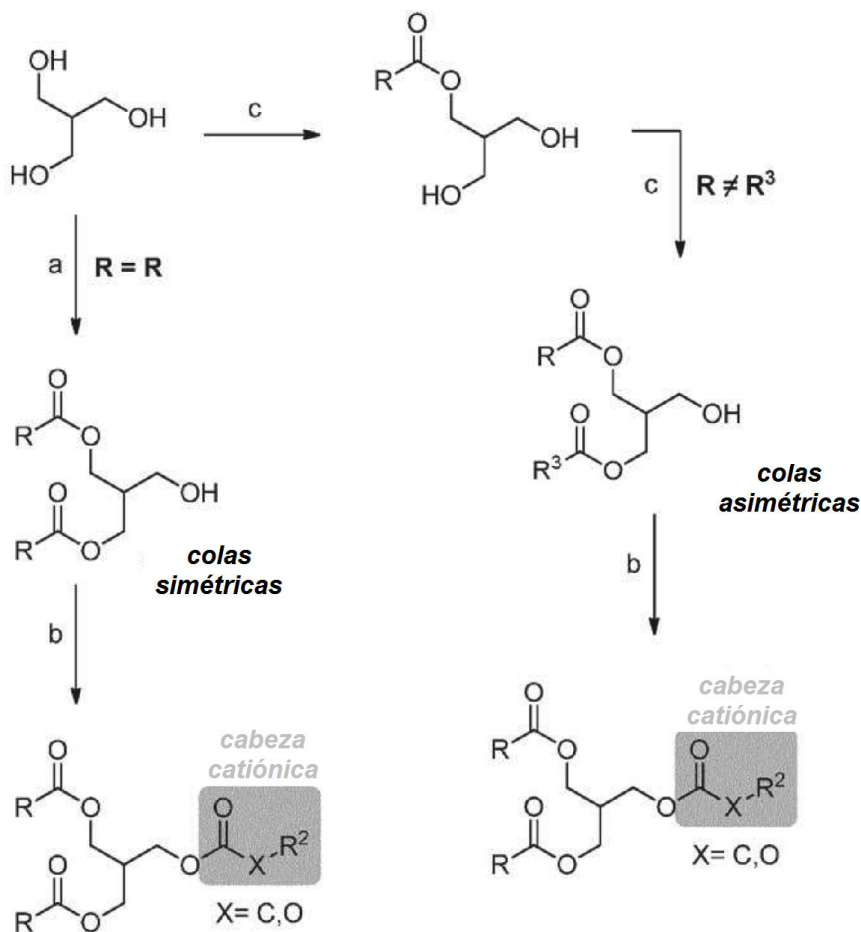
- 35 Métodos generales para sintetizar lípidos catiónicos

- En el presente documento se describen procesos para la preparación de compuestos de fórmula (I). En las reacciones descritas, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo hidroxilo, amino, iminio, tio o grupos carboxi, cuando estos se deseen en el producto final, para evitar su participación indeseada en las reacciones.

- 40 Los compuestos y procesos descritos en el presente documento se entenderán mejor en conexión con los siguientes esquemas sintéticos, que están destinados únicamente a ilustrar métodos mediante los cuales pueden prepararse generalmente los compuestos y no están destinados a limitar el alcance de la invención según se define en las reivindicaciones.

- 45 Pueden prepararse compuestos finales de fórmula (I) como se describe en el Esquema I.

ESQUEMA 1



a) bis-Acilación selectiva para instalación simétrica de cola, b) Acoplamiento de cabeza catiónica de éster o carbonato, c) mono-Acilación selectiva para instalación asimétrica de cola.

5

Composiciones lipídicas

La presente invención proporciona una composición lipídica que comprende al menos un compuesto de fórmula (II), es decir, una composición lipídica de la invención. En una realización, está presente al menos otro componente lipídico. Dichas composiciones también pueden contener un agente biológicamente activo, opcionalmente en combinación con uno o más componentes lipídicos adicionales.

Una realización de la presente invención proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y otro componente lipídico. Dichos otros componentes lipídicos incluyen, pero sin limitación, lípidos catiónicos, lípidos neutros, lípidos aniónicos, lípidos auxiliares y lípidos sigilosos.

Los lípidos catiónicos adecuados para su uso en una composición lipídica de la invención incluyen, pero sin limitación, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), 1,2-dioleoilcarbamil-3-dimetilamonio-propano (DOCDAP), 1,2-dilíneoil-3-dimetilamonio-propano (DLINDAP), propano de dilauril(C_{12:0})trimetilamonio (DLTAP), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), DC-Col, dioleoiloxi-N-[2-espermicarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietyl-amonio (DMRIE), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 2-[5'-(colest-5-en-3 [beta]-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimetil-1-(cis,cis-9',12'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA) y N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA) y 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP). En una realización, el lípido catiónico es DOTAP o DLTAP.

Los "lípidos neutros" adecuados para su uso en una composición lipídica de la invención incluyen, por ejemplo, una diversidad de lípidos neutros, sin carga o zwitteriónicos. Los ejemplos de fosfolípidos neutros adecuados para su uso

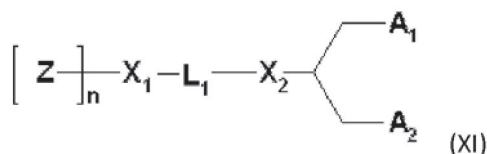
en la presente invención incluyen, pero sin limitación: 5-heptadecilbenceno-1,3-diol (resorcinol), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diarquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidilcolina, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina y combinaciones de los mismos. En una realización, el fosfolípido neutro se selecciona del grupo que consiste en diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE).

Los lípidos aniónicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfático, N-dodecanoilfosfatidiletanolamina, N-succinilfosfatidiletanolamina, hemisuccinato de colesterol de N-glutarilfosfatidiletanolamina (CHEMS) y lisilfosfatidilglicerol.

Los lípidos neutros y aniónicos adecuados también incluyen los descritos en el documento US 2009/0048197.

Los "lípidos auxiliares" son lípidos que mejoran la transfección (p. ej., transfección de la nanopartícula, que incluye el agente biológicamente activo) en cierta medida. El mecanismo por el que el lípido auxiliar mejora la transfección puede incluir, p. ej., mejora de la estabilidad de partículas y/o mejora de la fusogenicidad de la membrana. Los lípidos auxiliares incluyen esteroides y alquil resorcinol. Los lípidos auxiliares adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, colesterol, 5-heptadecilresorcinol y hemisuccinato de colesterol.

Los "lípidos sigilosos" son lípidos que aumentan el tiempo durante el que pueden existir las nanopartículas *in vivo* (p. ej. en la sangre). Los lípidos sigilosos adecuados para su uso en una composición lipídica de la invención incluyen, pero sin limitación, lípidos sigilosos que tienen un grupo de cabeza hidrófilo ligado a un resto lipídico. Los ejemplos de dichos lípidos sigilosos incluyen compuestos de fórmula (XI), como se describe en el documento WO2011/076807,



o un sal o derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

Z_n es un resto de polímero hidrófilo seleccionado entre PEG (poli(óxido de etileno)) o polímeros basados en poli(oxazolona), poli(alcohol de vinilo), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida], polisacáridos y poli(aminoácidos), o una combinación de los anteriores, en el que el polímero puede ser lineal o ramificado, y en el que cada Z es independientemente y opcionalmente puede estar opcionalmente sustituido;

en el que Z se polimeriza mediante n subunidades; n es un grado de polimerización promedio en número entre 10 y 200 unidades de Z, en el que n se optimiza para diferentes tipos de polímero;

L₁ es un engarce de alquileo C₁₋₁₀ o heteroalquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido que incluye cero, uno, dos o más de un éter (por ejemplo, -O-), éster (por ejemplo, -C(O)O-), succinato (por ejemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por ejemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por ejemplo, -OC(O)O-), cetona (por ejemplo, -C-C(O)-C-), carbonilo (por ejemplo, -C(O)-), urea (por ejemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por ejemplo, -NR'-), amida (por ejemplo, -C(O)NR'-), imina (por ejemplo, -C(NR')-), tioéter (por ejemplo, -S-), xantato (por ejemplo, -OC(S)S-), y fosfodiéster (por ejemplo, -OP(O)₂O-); cualquiera de los cuales puede estar sustituido con cero, uno o más grupos Z;

en el que R' se selecciona independientemente entre -H, -NH-, -NH₂, -O-, -S-, un fosfato un alquileo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido;

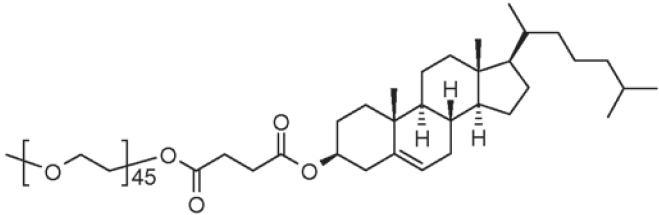
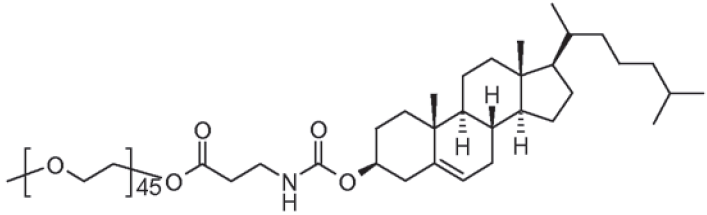
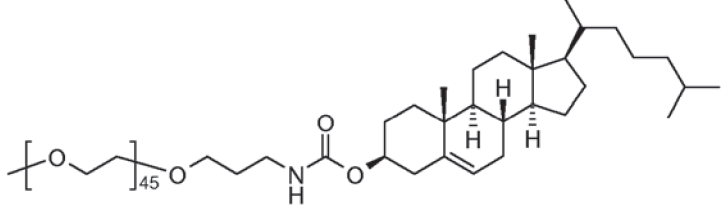
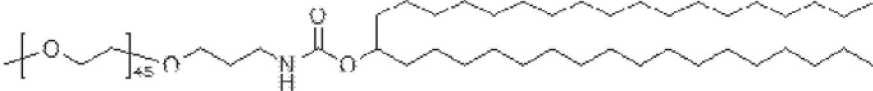
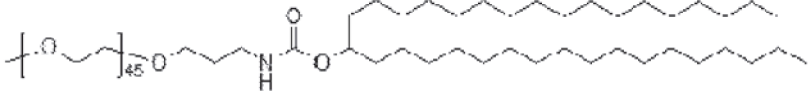
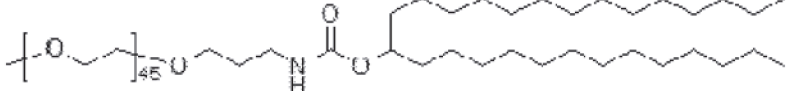
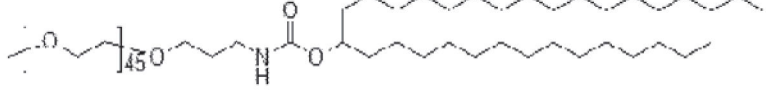
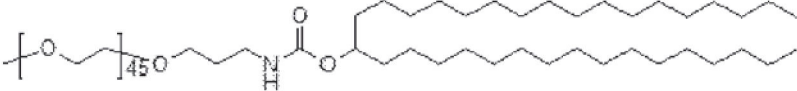
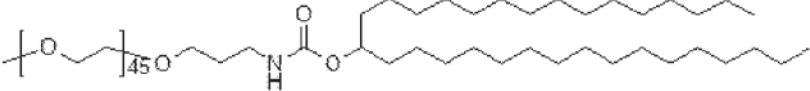
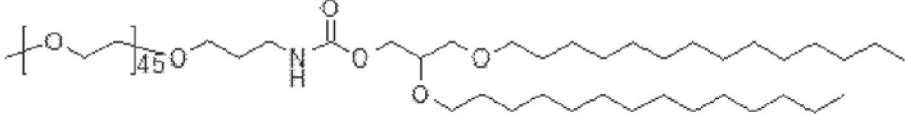
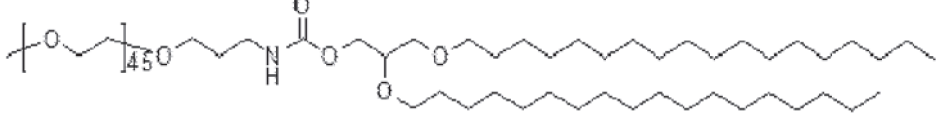
X₁ y X₂ se seleccionan independientemente entre un carbono o un heteroátomo seleccionado entre -NH-, -O-, -S- o un fosfato; A₁ y A₂ se seleccionan independientemente entre un alquilo C₆₋₃₀, alqueno C₆₋₃₀ y alquino C₆₋₃₀, en el que A₁ y A₂ pueden ser iguales o diferentes,

o en el que A₁ y A₂, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un esteroide opcionalmente sustituido.

Los lípidos sigilosos específicos incluyen, pero sin limitación, los listados en la Tabla 1.

Tabla 1. Lípidos sigilosos

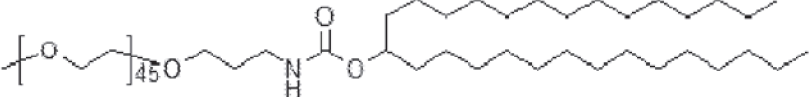
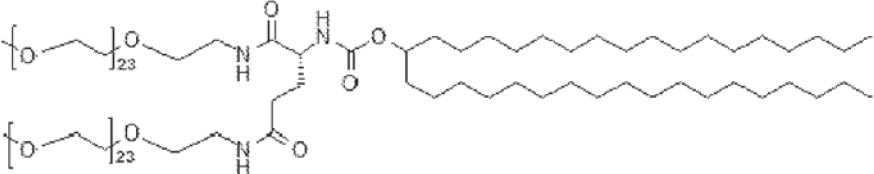
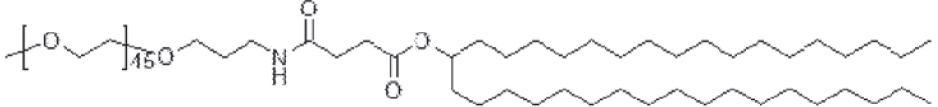
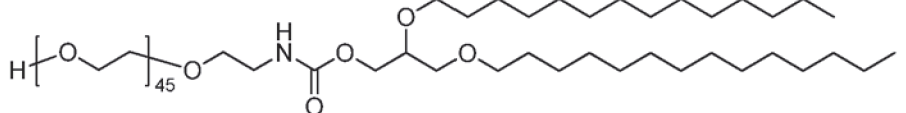
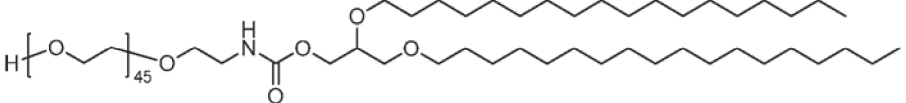
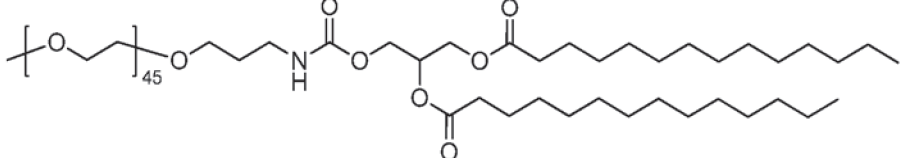
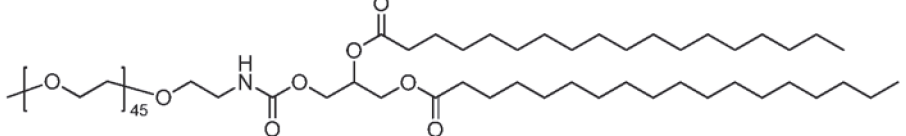
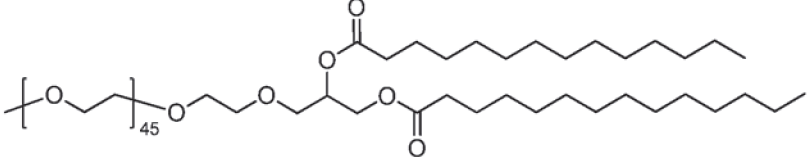
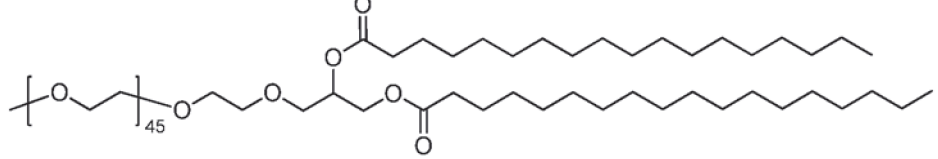
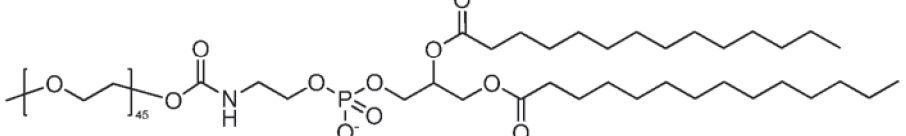
Lípido sigiloso	Lípido
-----------------	--------

S001	
S002	
S003	
S004	
S005	
S006	
S007	
S008	
S009	
S010	
S011	

(continuación)

Lípido sigiloso	Lípido
S012	
S013	
S014	
S015	
S016	
S017	
S018	
S019	
S020	
S021	
S022	
S023	

(continuación)

Lípido sigiloso	Lípido
S024	
S025	
S026	
S027	
S028	
S029	
S030	
S031	
S032	
S033	

Se pueden encontrar otros lípidos sigilosos adecuados para su uso en una composición lipídica de la presente invención e información acerca de la bioquímica de dichos lípidos en Romberg *et al.*, *Pharmaceutical Research*, Vol.

25, N.º 1, 2008, págs. 55-71 y Hoekstra *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52.

En una realización, el lípido sigiloso adecuado comprende un grupo seleccionado de PEG (denominado en ocasiones poli(óxido de etileno) y polímeros basados en poli(oxazolina), poli(alcohol vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos y poli[N-(2-hidroxiopropil)metacrilamida]. Se desvelan lípidos de PEG adecuados adicionales, p. ej., en el documento WO 2006/007712.

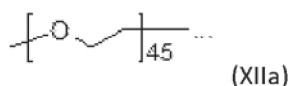
Los lípidos sigilosos específicos adecuados incluyen conjugados de polietilenglicol-diacilglicerol o polietilenglicol-diacilglicamida (PEG-DAG) incluyendo los que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglucamida que tiene una longitud de cadena de alquilo que comprende de manera independiente de aproximadamente C₄ a aproximadamente C₄₀ átomos de carbono saturados o insaturados. El grupo dialquilglicerol o dialquilglucamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el conjugado de PEG se puede seleccionar de PEG-dilaurilglicerol, PEG-dimiristilglicerol (PEG-DMG) (n.º de catálogo GM-020 de NOF, Tokio, Japón), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-diesterilglicerol, PEG-dilaurilglucamida, PEG-dimiristilglucamida, PEG-dipalmitoilglucamida y PEG-diesterilglucamida, PEG-colesterol (1- [8'-(colest-5-en-3[beta]-oxy)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicol), PEG-DMB (3,4-ditetradecoxilbencil-[omega]-metil-poli(etilenglicol)éter), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (n.º de catálogo 880150P de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, Estados Unidos).

En una realización, el lípido sigiloso es S010, S024, S027, S031 o S033.

En otra realización, el lípido sigiloso es S024.

A menos que se indique otra cosa, el término "PEG" como se usa en el presente documento significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de éter de polialquileno. En una realización, el PEG es un polímero lineal o ramificado opcionalmente sustituido de etilenglicol u óxido de etileno. En una realización, el PEG no está sustituido. En una realización, el PEG está sustituido, p. ej., por uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo, hidroxilo o arilo. En una realización, el término incluye copolímeros de PEG tales como PEG-poliuretano o PEG-polipropileno (véase, p. ej., J. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992)); en otra realización, el término no incluye copolímeros de PEG. En una realización, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 130 a aproximadamente 50.000, en una sub-realización, de aproximadamente 150 a aproximadamente 30.000, en una sub-realización, de aproximadamente 150 a aproximadamente 20.000, en una sub-realización, de aproximadamente 150 a aproximadamente 10.000, en una sub-realización, de aproximadamente 150 a aproximadamente 6000, en una sub-realización, de aproximadamente 150 a aproximadamente 5000, en una sub-realización, de aproximadamente 150 a aproximadamente 4000, en una sub-realización, de aproximadamente 150 a aproximadamente 3000, en una sub-realización, de aproximadamente 300 a aproximadamente 3000, en una sub-realización, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 3000 y en una sub-realización, de aproximadamente 1500 a aproximadamente 2500.

En determinadas realizaciones, el PEG (p. ej., conjugado con un lípido, tal como un lípido sigiloso) es un "PEG-2K", también denominado "PEG 2000", que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2000 dalton. PEG-2K se representa en el presente documento mediante la siguiente fórmula (XIIa), en donde n es 45, lo que significa que el grado de polimerización promediado en número comprende aproximadamente 45 subunidades. Sin embargo, se pueden usar otras realizaciones de PEG conocidas en la técnica, incluyendo, p. ej., en las que el grado de polimerización promediado en número comprende aproximadamente 23 subunidades (n = 23) y/o 68 subunidades (n = 68).



Las composiciones lipídicas de la invención también pueden incluir uno o más agentes biológicamente activos incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos (p. ej., monoclonales, quiméricos, humanizados, nanocuerpos y fragmentos de los mismos, etc.), colesterol, hormonas, péptidos, proteínas, productos quimioterapéuticos y otros tipos de agentes antineoplásicos, fármacos de bajo peso molecular, vitaminas, cofactores, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos formadores de triples cadenas, composiciones de ADN o ARN antisentido, composiciones quiméricas de ADN:ARN, aloenzimas, aptámeros, ribozima, señuelos y análogos de los mismos, plásmidos y otros tipos de vectores de expresión y moléculas de ácido nucleico pequeñas, agentes de iARN, ácido nucleico interferente corto (ANip), ácido ribonucleico mensajero (ARN mensajero, ARNm), ARN interferente corto (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), microARN (miARN) y moléculas de ARN en horquilla corto (ARNhp), ácido peptidonucleico (APN), un ribonucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA), nucleótido morfolino, ácido nucleico de treosa (TNA), ácido nucleico de glicol (GNA), ARNipsi (ARN interferente pequeño segmentado internamente), ARNia (ARN interferente asimétrico) y ARNip con 1, 2 o más emparejamientos erróneos entre la cadena con sentido y antisentido para células y/o tejidos relevantes, tal como en un cultivo celular, sujeto u organismo. Dichos compuestos pueden purificarse o purificarse parcialmente, y pueden ser de origen natural

o sintéticos, y pueden modificarse químicamente. En una realización, el agente biológicamente activo es un agente de iARN, ácido nucleico interferente corto (ANip), ARN interferente corto (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), microARN (miARN) o una molécula de ARN en horquilla corto (ARNhp). En una realización, el agente biológicamente activo es un agente de iARN útil para mediar en la interferencia de ARN (iARN). En otra realización, el agente biológicamente activo es un ARNm.

Diversos métodos para cargar agentes biológicamente activos en composiciones lipídicas, tales como liposomas y nanopartículas lipídicas, están disponibles en la técnica, incluyendo métodos de carga tanto pasivos como activos. El método exacto usado puede elegirse en función de múltiples factores que incluyen, pero sin limitación, p. ej., el agente biológicamente activo para cargar, el método de almacenamiento que se va a usar una vez cargado, el tamaño de la partícula resultante y el régimen de dosificación contemplado. Los métodos incluyen, p. ej., mezcla mecánica del fármaco y los lípidos en el momento en que se forman o reconstituyen los liposomas, disolviendo todos los componentes en un disolvente orgánico y concentrándolos en una película seca, formando un gradiente de iones o pH para atraer el agente activo al interior del liposoma, creando un potencial transmembrana y una carga mediada por ionóforos. Véase, p. ej., publicación de PCT n.º WO 95/08986, patente de los Estados Unidos n.º 5.837.282, patente de los Estados Unidos n.º 5.837.282 y patente de los Estados Unidos n.º 7.811.602.

Por "nanopartícula lipídica" se entiende una partícula que comprende una pluralidad de (es decir, más de una) moléculas lipídicas físicamente asociadas entre sí por fuerzas intermoleculares. Las nanopartículas lipídicas pueden ser, p. ej., microesferas (incluyendo vesículas unilamelares y multilamelares, p. ej., bicapas lipídicas en fase lamelar de "liposomas" que, en algunas realizaciones, son sustancialmente esféricas y, en realizaciones más particulares, pueden comprender un núcleo acuoso, p. ej., que comprende una parte sustancial de moléculas de ARN), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión.

Las nanopartículas lipídicas tienen un tamaño de aproximadamente 1 a aproximadamente 2.500 nm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.500 nm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 1.000 nm, en una sub-realización de aproximadamente 50 a aproximadamente 600 nm, en una sub-realización de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 nm, en una sub-realización de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 nm y en una sub-realización de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm. A menos que se indique otra cosa, todos los tamaños a los que se hace referencia en el presente documento son los tamaños promedio (diámetros) de la nanopartícula completamente formada, según lo medido por la dispersión dinámica de luz en un Zetasizer de Malvern. La muestra de nanopartículas se diluye en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de modo que la tasa de recuento sea de aproximadamente 200-400 kcts. Los datos se presentan como un promedio ponderado de la medida de intensidad.

Una realización de la presente invención proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y otro componente lipídico. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol y un lípido neutro, por ejemplo, DSPC. Otra realización de la presente invención proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, y un lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033. Otra realización de la presente invención proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, un lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033, y un agente biológicamente activo, por ejemplo, un ARN o ADN. Otra realización de la presente invención proporciona una nanopartícula lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, y un lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033, y un agente biológicamente activo, por ejemplo, un ARNm, ARNip o ADN.

Las realizaciones de la presente invención también proporcionan composiciones lipídicas descritas según las relaciones molares respectivas de los lípidos componentes en la formulación, en donde una barra ("/") indica los componentes respectivos, como se proporcionan en el presente documento.

Otra realización de la presente invención es una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, en una relación molar lipídica de 55-40 de compuesto de fórmula (II)/55-40 de lípido auxiliar. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol y un lípido neutro, por ejemplo, DPSC en una relación molar lipídica de 55-40 de compuesto de fórmula (II)/55-40 de lípido auxiliar/15-5 de lípido neutro. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, y un lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033 en una relación molar lipídica de 55-40 de compuesto de fórmula (II)/55-40 de lípido auxiliar/15-5 de lípido neutro/10-1 de lípido sigiloso.

Otra realización de la presente invención es una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, en una relación molar lipídica de 50-40 de compuesto de fórmula (II)/50-40 de lípido auxiliar. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol y un lípido neutro, por ejemplo, DPSC en una relación molar lipídica de 50-

40 de compuesto de fórmula (II)/50-40 de lípido auxiliar/15-5 de lípido neutro. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, un lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033 en una relación molar lipídica de 50-40 de compuesto de fórmula (II)/50-40 de lípido auxiliar/15-5 de lípido neutro/5-1 de lípido sigiloso.

5 Otra realización de la presente invención es una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, en una relación molar lipídica de 47-43 de compuesto de fórmula (II)/47-43 de lípido auxiliar. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol y un lípido neutro, por ejemplo, DPSC en una relación molar lipídica de 47-
10 43 de compuesto de fórmula (II)/47-43 de lípido auxiliar/12-7 de lípido neutro. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, un lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033 en una relación molar lipídica de 47-43 de compuesto de fórmula (II)/47-43 de lípido auxiliar/12-7 de lípido neutro/4-1 de lípido sigiloso.

15 Otra realización de la presente invención es una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II) y un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, en una relación molar lipídica de aproximadamente 45 de compuesto de fórmula (II)/aproximadamente 44 de lípido auxiliar. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol y un lípido neutro, por ejemplo DPSC en una relación molar lipídica de aproximadamente 45 de compuesto de fórmula (II)/aproximadamente 44 de
20 lípido auxiliar/aproximadamente 9 de lípido neutro. Otra realización proporciona una composición lipídica que comprende un compuesto de fórmula (II), un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, un lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033 en una relación molar lipídica de aproximadamente 45 de compuesto de fórmula (II)/aproximadamente 44 de lípido auxiliar/aproximadamente de 9 lípido neutro/aproximadamente 2 de lípido sigiloso, por ejemplo, S010, S024, S027, S031 o S033.

25 Los compuestos preferidos de fórmula (II) para su uso en las composiciones lipídicas anteriores se proporcionan en los ejemplos 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-31, 33-36. Se proporcionan compuestos preferidos en particular en los ejemplos 1, 13 y 15. Son agentes biológicamente activos preferidos ARN y ADN.

30 Las composiciones lipídicas de la presente invención pueden ser optimizadas adicionalmente por un experto en la materia combinando lípidos catiónicos con el intervalo de pKa deseado, lípidos sigilosos, lípidos auxiliares y lípidos neutros en formulaciones, incluyendo, p. ej., formulaciones liposómicas, formulaciones de nanopartículas lipídicas (LNP) y similares para la administración a células y tejidos específicos *in vivo*. En una realización, se obtiene optimización adicional ajustando la relación molar de lípidos entre estos diversos tipos de lípidos. En una realización,
35 se obtiene mayor optimización ajustando uno o más de: el tamaño de partícula deseado, la relación N/P, los métodos de formulación y/o el régimen de dosificación (p. ej., número de dosis administradas a lo largo del tiempo, dosis real en mg/kg, momento de las dosis, combinaciones con otras terapias, etc.). Las diversas técnicas de optimización conocidas por los expertos en la materia correspondientes a las realizaciones enumeradas anteriormente se consideran parte de la presente invención.

40 Métodos generales para preparar nanopartículas lipídicas

Los siguientes métodos pueden usarse para preparar nanopartículas lipídicas de la invención. Para lograr la reducción del tamaño y/o aumentar la homogeneidad del tamaño en las partículas, el experto puede usar las etapas del método
45 expuestas a continuación, experimentando con diferentes combinaciones. Además, el experto podría emplear sonicación, filtración u otras técnicas de selección por tamaño que se usan en formulaciones liposómicas.

El proceso para preparar una composición de la invención comprende normalmente proporcionar una solución acuosa, tal como tampón de citrato, que comprende un agente biológicamente activo en un primer depósito, proporcionar un
50 segundo depósito que comprende una solución orgánica, tal como un alcohol orgánico, por ejemplo, etanol, del lípido o los lípidos y después mezclar la solución acuosa con la solución de lípidos orgánicos. El primer depósito está opcionalmente en comunicación fluida con el segundo depósito. La etapa de mezcla está seguida opcionalmente de una etapa de incubación, una etapa de filtración o diálisis y una etapa de dilución y/o concentración. La etapa de incubación comprende permitir que la solución de la etapa de mezcla permanezca en un recipiente durante
55 aproximadamente 0 a aproximadamente 100 horas (preferentemente, de aproximadamente 0 a aproximadamente 24 horas) a aproximadamente temperatura ambiente y opcionalmente protegida de la luz. En determinadas realizaciones, la temperatura puede ser de aproximadamente 4 °C durante la incubación. En una realización, una etapa de dilución sigue a la etapa de incubación. La etapa de dilución puede implicar dilución con tampón acuoso (p. ej., tampón de citrato o agua pura), p. ej., usando un aparato de bombeo (p. ej., una bomba peristáltica). La etapa de filtración es ultrafiltración o diálisis. La ultrafiltración comprende la concentración de la solución diluida seguida de diafiltración, p.
60 ej., usando un sistema de bombeo adecuado (p. ej., un aparato de bombeo tal como una bomba peristáltica o equivalente) junto con una membrana de ultrafiltración adecuada (p. ej., cartuchos de fibra hueca GE o equivalentes). La diálisis comprende el intercambio de disolvente (tampón) a través de una membrana adecuada (p. ej., membrana snakeskin de 10.000 pcpm). Como alternativa, en algunas realizaciones, la diálisis se puede realizar usando columnas de intercambio de tampón (p. ej., columnas PD-10 de GE Healthcare).

65

En una realización, la etapa de mezcla proporciona una única fase transparente.

En una realización, después de la etapa de mezcla, el disolvente orgánico se elimina para proporcionar una suspensión de partículas, en donde el agente biológicamente activo está encapsulado por el lípido o los lípidos.

5 La selección de un disolvente orgánico implicará normalmente la consideración de la polaridad del disolvente y la facilidad con la que el disolvente puede eliminarse en los estadios posteriores de formación de partículas. El disolvente orgánico, que también se usa como agente solubilizante, está preferentemente en una cantidad suficiente para proporcionar una mezcla transparente de una sola fase de agentes biológicamente activos y lípidos. El disolvente
10 orgánico puede seleccionarse de uno o más (p. ej., dos) de cloroformo, diclorometano, dietiléter, ciclohexano, ciclopentano, benceno, tolueno, metanol y otros alcoholes alifáticos (p. ej., de C₁ a C₈) tales como etanol, propanol, isopropanol, butanol, *terc*-butanol, iso-butanol, pentanol y hexanol.

15 La etapa de mezcla puede producirse por cualquiera de varios métodos, p. ej., por medios mecánicos tales como un mezclador vórtex.

Los métodos usados para eliminar el disolvente orgánico normalmente implicarán diafiltración o diálisis o evaporación a presiones reducidas o impulsando una corriente de gas inerte (p. ej., nitrógeno o argón) a través de la mezcla.

20 En otras realizaciones, el método comprende además añadir policationes no lipídicas que son útiles para efectuar la transformación de células usando las presentes composiciones. Los ejemplos de policationes no lipídicas adecuados incluyen, pero con limitación, bromuro de hexadimetrina (comercializado con la marca POLYBRENE^(R), de Aldrich
25 Chemical Co., Milwaukee, Wis., Estados Unidos) u otras sales de hexadimetrina. Otras policationes adecuados incluyen, p. ej., sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina y polietilenimina. En determinadas realizaciones, la formación de las nanopartículas lipídicas se puede llevar a cabo en un sistema monofásico (p. ej., una monofase de Bligh y Dyer o una mezcla similar de disolventes acuosos y orgánicos) o en un sistema bifásico con mezcla adecuada.

30 La nanopartícula lipídica puede formarse en un sistema monofásico o bifásico. En un sistema monofásico, el lípido o los lípidos catiónicos y el agente biológicamente activo se disuelven cada uno en un volumen de la mezcla monofásica. La combinación de las dos soluciones proporciona una sola mezcla en la que se forman los complejos. En un sistema bifásico, los lípidos catiónicos se unen con el agente biológicamente activo (que está presente en la fase acuosa) y lo "atraen" hacia la fase orgánica. En una realización, las nanopartículas lipídicas se preparan mediante un método que
35 comprende: (a) poner en contacto el agente biológicamente activo con una solución que comprende lípidos no catiónicos y un detergente para formar una mezcla de compuesto-lípido; (b) poner en contacto lípidos catiónicos con la mezcla de compuesto-lípido para neutralizar una parte de la carga negativa del agente biológicamente activo y formar una mezcla de carga neutralizada de agente biológicamente activo y lípidos; y (c) eliminar el detergente de la mezcla de carga neutralizada.

40 En un grupo de realizaciones, la solución de lípidos neutros y detergente es una solución acuosa. El contacto del agente biológicamente activo con la solución de lípidos neutros y detergente se realiza normalmente mezclando una primera solución del agente biológicamente activo y una segunda solución de los lípidos y el detergente. Preferentemente, la solución de agente biológicamente activo es también una solución de detergente. La cantidad de lípido neutro que se usa en el presente método se determina normalmente en función de la cantidad de lípido catiónico
45 usado y es normalmente de aproximadamente 0,2 a 5 veces la cantidad de lípido catiónico, preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 veces la cantidad de lípido catiónico usado.

50 La mezcla de agente biológicamente activo-lípido formada de este modo se pone en contacto con lípidos catiónicos para neutralizar una parte de la carga negativa que está asociada con la molécula de interés (u otros materiales polianiónicos) presentes. La cantidad de lípidos catiónicos usados es normalmente 3-8 veces mayor que la relación molar calculada de carga negativa (fosfatos).

55 Los métodos usados para eliminar el detergente normalmente implican diálisis. Cuando están presentes disolventes orgánicos, la eliminación se realiza normalmente mediante diafiltración o evaporación a presiones reducidas o impulsando una corriente de gas inerte (p. ej., nitrógeno o argón) a través de la mezcla.

60 Se desvela en el presente documento un aparato para preparar una composición de la presente invención. El aparato incluye normalmente un primer depósito para contener una solución acuosa que comprende un agente biológicamente activo y un segundo depósito para contener una solución lipídica orgánica. El aparato también incluye normalmente un mecanismo de bomba configurado para bombear las soluciones acuosas y de lípidos orgánicos en una región de
65 mezcla o cámara de mezcla a caudales sustancialmente iguales. En una realización, la región de mezcla o cámara de mezcla comprende un acoplamiento de T o equivalente del mismo, lo que permite que las corrientes fluidas acuosas y orgánicas se combinen como aporte al conector en T y las soluciones acuosas y orgánicas combinadas resultantes salgan del conector en T hacia un depósito de recogida o equivalente del mismo. En otras realizaciones, un dispositivo microfluídico, tal como un NANOASSEMBLER TM, puede usarse para preparar una composición proporcionada por la invención.

Métodos para administrar agentes biológicamente activos y el tratamiento de enfermedades

5 Los lípidos catiónicos de fórmula (II) y composiciones lipídicas de los mismos son útiles en composiciones o formulaciones farmacéuticas usadas para la administración de agentes biológicamente activos. Las formulaciones que contienen lípidos catiónicos de fórmula (II) o composiciones lipídicas de los mismos pueden estar en diversas formas, incluyendo, pero sin limitación, agentes de administración formadores de partículas que incluyen micropartículas, nanopartículas y agentes de transfección que son útiles para administrar diversas moléculas a las células. Las formulaciones específicas son eficaces en la transfección o administración de agentes biológicamente activos, tales como anticuerpos (p. ej., monoclonales, quiméricos, humanizados, nanocuerpos y fragmentos de los mismos, etc.), colesterol, hormonas, péptidos, proteínas, productos quimioterapéuticos y otros tipos de agentes antineoplásicos, fármacos de bajo peso molecular, vitaminas, cofactores, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos formadores de triples cadenas, composiciones de ADN o ARN antisentido, composiciones químicas de ADN:ARN, aloenzimas, aptámeros, ribozimas, señuelos y análogos de los mismos, plásmidos y otros tipos de vectores de expresión y moléculas de ácido nucleico pequeñas, ARNm, agentes de iARN, ácido nucleico interferente corto (ANip), ARN interferente corto (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), microARN (miARN), ARN corto en horquilla (ARNhp) y moléculas de "ARN autorreplicante" (que codifica una actividad de enzima replicasa y capaz de dirigir su propia replicación o amplificación *in vivo*), ácido peptidonucleico (APN), un ribonucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA), nucleótido morfolino, ácido nucleico de treosa (TNA), ácido nucleico de glicol (GNA), ARNipsi (ARN interferente pequeño segmentado internamente), ARNia (ARN interferente asimétrico) y ARNip con 1, 2 o más emparejamientos erróneos entre la cadena con sentido y antisentido para células y/o tejidos relevantes, tal como en un cultivo celular, sujeto u organismo. La lista anterior de agentes biológicamente activos es solo ilustrativa y no se pretende que sea limitante. Dichos compuestos pueden purificarse o purificarse parcialmente, y pueden ser de origen natural o sintéticos, y pueden modificarse químicamente.

25 Dichas formulaciones que contienen agentes biológicamente activos son útiles, p. ej., para proporcionar composiciones para prevenir, inhibir o tratar enfermedades, afecciones o rasgos en una célula, sujeto u organismo. Las enfermedades, afecciones o rasgos incluyen, pero sin limitación, enfermedades proliferativas, incluyendo cáncer, enfermedad inflamatoria, trasplante y/o rechazo de tejidos, enfermedades o afecciones autoinmunitarias, enfermedad relacionada con la edad, enfermedad neurológica o neurodegenerativa, enfermedad respiratoria, enfermedad cardiovascular, enfermedad ocular, enfermedad metabólica, enfermedad dermatológica, enfermedad auditiva, una enfermedad hepática, una enfermedad de riñón o renal, etc.

35 La cantidad de agente activo administrado por dosis es una cantidad superior a la dosis terapéutica mínima pero inferior a una dosis tóxica. La cantidad real por dosis puede ser determinada por un médico dependiendo de varios factores, tales como el historial médico del paciente, el uso de otras terapias, el agente biológicamente activo que se va a proporcionar y la naturaleza de la enfermedad. La cantidad de agente biológicamente activo administrado puede ajustarse durante el tratamiento, dependiendo de la respuesta del paciente al tratamiento y la presencia o gravedad de cualquier efecto secundario asociado al tratamiento. Son conocidas dosis ilustrativas y tratamientos para compuestos que han sido aprobados por una agencia reguladora apropiada y están disponibles para los expertos en la materia. Véase, p. ej., Physician's Desk Reference, 64^a ed., Physician's Desk Reference Inc. (2010), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa. (1985) y Remington The Science and Practice of Pharmacy, 21^a ed., Lippincott Williams & Williams Publishers (2005).

45 En una realización, se administra una única dosis de un agente biológicamente activo a un paciente que lo necesite. En una realización, se administran múltiples dosis, en donde las múltiples dosis pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o alternando. En una realización, la misma formulación se administra en múltiples dosis. En una realización, las formulaciones difieren en múltiples dosis. En diversas realizaciones, las dosis pueden administrarse una vez al día, o durante uno, dos, tres, cuatro o más días consecutivos. En una realización, las dosis se administran una vez a la semana. En una realización, las dosis se administran una vez cada dos semanas. En una realización, los pacientes reciben al menos dos ciclos de un régimen de tratamiento, y potencialmente más, dependiendo de la respuesta del paciente al tratamiento. En regímenes de un único agente, los ciclos totales de tratamiento son determinados por el paciente y el médico en función de las respuestas y la toxicidad observadas. Los regímenes de dosificación anteriores se deben considerar ejemplos no limitantes. Se contemplan otros regímenes de dosificación dentro del alcance de la invención y dependen del efecto terapéutico deseado.

60 Se describe en el presente documento un método para el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición lipídica de la invención a un paciente que necesite tratamiento de la misma. Descritas en el presente documento, la enfermedad o afección es tratable mediante la administración de un agente de ARN.

65 La invención también proporciona el uso de una composición lipídica de la invención en el tratamiento de una enfermedad o afección, incluyendo elevar una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, en un paciente. En una realización, la enfermedad o afección es tratable mediante la administración de un agente de ARN.

La cantidad total de lípido proporcionado por la invención en la composición que se administra es, en una realización,

de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg de lípido por mg de agente biológicamente activo (p. ej., ARN), en otra realización de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg de lípido por mg de agente biológicamente activo (p. ej., ARN), en otra realización de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 mg de lípido por mg de agente biológicamente activo (p. ej., ARN) y en una realización de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 mg de lípido por mg de agente biológicamente activo (p. ej., ARN).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" incluye tratamiento de mejora, curativo y profiláctico. Como se usa en el presente documento, un "paciente" se refiere a un animal, preferentemente, un mamífero, preferentemente, un ser humano, que necesita el tratamiento.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto de la invención y el agente biológicamente activo (p. ej., el compuesto terapéutico) necesario para tratar o aliviar una enfermedad o afección diana.

La expresión "cantidad inmunológicamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto de la invención y de ARN que codifica un inmunógeno necesario para inducir una respuesta inmunitaria que reconoce el inmunógeno (p. ej., en el contexto de un patógeno). El término "inmunógeno" se refiere a cualquier sustancia u organismo que provoque una respuesta inmunitaria cuando se introduce en el cuerpo. La expresión "ARN que codifica un inmunógeno" se refiere a un polinucleótido, tal como un ARN mensajero o un replicón (p. ej., ARN autorreplicante), que cuando se administra a una célula u organismo puede traducirse en un polipéptido según la secuencia codónica de dicho ARN.

Por "enfermedad proliferativa" como se usa en el presente documento se entiende cualquier enfermedad, afección, rasgo, genotipo o fenotipo caracterizado por crecimiento o replicación celular desregulada como se conoce en la técnica. En una realización, la enfermedad proliferativa es cáncer. En una realización, la enfermedad proliferativa es un tumor. En una realización, la enfermedad proliferativa incluye, pero sin limitación, p. ej., tumores líquidos tales como, p. ej., leucemias, p. ej., leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), mieloma múltiple y leucemia linfocítica crónica; y tumores sólidos, p. ej., cánceres relacionados con el SIDA, tales como sarcoma de Kaposi; cánceres de mama; cánceres de hueso; cánceres de cerebro; cánceres de cabeza y cuello, linfoma no Hodgkin, adenoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma laríngeo, cáncer de vesícula biliar y conducto biliar, cánceres de retina, cáncer de esófago, cánceres gastrointestinales, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de pulmón no microcítico), cáncer de páncreas, sarcomas, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de piel, carcinoma nasofaríngeo, liposarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de vesícula biliar, sarcoma endometrial, cánceres resistentes a múltiples fármacos. En una realización, la enfermedad proliferativa incluye neovascularización asociada con angiogénesis tumoral, degeneración macular (p. ej., degeneración macular relacionada con la edad húmeda/seca), neovascularización de la córnea, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración miope. En una realización, la enfermedad proliferativa incluye reestenosis y enfermedad renal poliquística.

Por "enfermedad autoinmunitaria" como se usa en el presente documento se entiende cualquier enfermedad, afección, rasgo, genotipo o fenotipo caracterizado por autoinmunidad como se conoce en la técnica. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, p. ej., esclerosis múltiple, diabetes mellitus, lupus, esclerodermias, fibromialgia, rechazo de trasplante (p. ej., prevención del rechazo de aloinjerto), anemia perniciosa, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, miastenia grave, lupus eritematoso, esclerosis múltiple y enfermedad de Graves.

Por "enfermedad infecciosa" se entiende cualquier enfermedad, trastorno o afección asociado con un agente infeccioso, tal como un virus, bacteria, hongo, prion o parásito. La invención puede usarse para inmunizar contra patógenos que provocan enfermedades infecciosas. Se proporcionan a continuación ejemplos de dichos patógenos.

Por "enfermedad neurológica" se entiende cualquier enfermedad, trastorno o afección que afecte al sistema nervioso central o periférico. Las enfermedades neurológicas incluyen, pero sin limitación, enfermedades o trastornos del sistema nervioso periférico o central incluyendo, p. ej., enfermedad de Alzheimer, aneurisma, lesión cerebral, síndrome del túnel carpiano, aneurisma cerebral, dolor crónico, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, epilepsia, enfermedad de Huntington, meningitis, trastornos convulsivos y otras enfermedades neurológicas, trastornos y síndromes.

Por "enfermedad respiratoria" se entiende cualquier enfermedad o afección que afecte el tracto respiratorio. Las enfermedades respiratorias incluyen, pero sin limitación, p. ej., asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), rinitis alérgica, sinusitis, alergias, respiración impedida, síndrome de dificultad respiratoria, fibrosis quística, hipertensión pulmonar o vasoconstricción y enfisema.

Por "enfermedad cardiovascular" se entiende una enfermedad o afección que afecta al corazón y la vasculatura. Las enfermedades cardiovasculares incluyen, pero sin limitación, p. ej., cardiopatía coronaria (CPC), enfermedad cerebrovascular (ECV), estenosis aórtica, vasculopatía periférica, infarto de miocardio (ataque al corazón), arritmias, isquemia e insuficiencia cardíaca congestiva.

Por "enfermedad ocular" como se usa en el presente documento se entiende cualquier enfermedad, afección, rasgo, genotipo o fenotipo del ojo y estructuras relacionadas. Las enfermedades oculares incluyen, pero sin limitación, p. ej., edema macular cistoide, retinopatía diabética, degeneración reticular, oclusión de venas retinianas, oclusión de arterias retinianas, degeneración macular (p. ej., degeneración macular relacionada con la edad, tal como AMD húmeda o AMD seca), toxoplasmosis, retinitis pigmentosa, laceración conjuntival, laceración corneal, glaucoma y similares.

Por "enfermedad metabólica" se entiende cualquier enfermedad o afección que afecte a las rutas metabólicas. La enfermedad metabólica puede dar como resultado un proceso metabólico anómalo, ya sea congénito debido a una anomalía enzimática hereditaria (errores innatos del metabolismo) o adquirido debido a la enfermedad de un órgano endocrino o insuficiencia de un órgano metabólicamente importante tal como el hígado. En una realización, la enfermedad metabólica incluye obesidad, resistencia a la insulina y diabetes (p. ej. diabetes de tipo I y/o diabetes de tipo II).

Por "enfermedad dermatológica" se entiende cualquier enfermedad o afección de la piel, dermis o cualquier subestructura en la misma, tal como un cabello, un folículo, etc. Las enfermedades, trastornos, afecciones y rasgos dermatológicos pueden incluir psoriasis, dermatitis ectópica, cánceres de piel tales como melanoma y carcinoma de células basales, caída del cabello, eliminación del pelo y alteraciones en la pigmentación.

Por "enfermedad auditiva" se entiende cualquier enfermedad o afección del sistema auditivo, incluyendo el oído, tal como el oído interno, oído medio, oído externo, nervio auditivo y cualquier subestructura en los mismos. Las enfermedades, trastornos, afecciones y rasgos auditivos pueden incluir pérdida de audición, sordera, acúfenos, vértigo, trastornos del equilibrio y el movimiento.

Por "enfermedad regenerativa" se entiende cualquier enfermedad o afección donde la generación o regeneración insuficiente de células o tejidos *in vivo* o *in vitro* evita el establecimiento o la restauración de la función apropiada del órgano antes o después de una lesión, evita o ralentiza la cicatrización de heridas o la resolución de lesiones ulcerosas, acelera el envejecimiento o evita la terapia celular eficaz. La expresión se refiere "ácido ribonucleico mensajero" (ARN mensajero, ARNm) se refiere a una molécula de ácido ribonucleico (ARN) que media en la transferencia de información genética a los ribosomas en el citoplasma, donde actúa como molde para la síntesis de proteínas. Se sintetiza a partir de un molde de ADN durante el proceso de transcripción. Véase, The American Heritage® Dictionary of the English Language, cuarta edición (actualizada en 2009). Houghton Mifflin Company.

En eucariotas, el ARNm es transcrito *in vivo* en los cromosomas por la enzima celular ARN polimerasa. Durante o después de la transcripción *in vivo*, se añade una caperuza 5' (también denominada caperuza de ARN, caperuza de ARN7-metilguanosa o caperuza de ARN m7G) *in vivo* al extremo 5' del ARNm. La caperuza 5' es un resto de 7-metilguanosa terminal que se une a través de un enlace 5'-5'-trifosfato al primer nucleótido transcrito. Además, la mayoría de moléculas de ARNm eucariotas tienen un resto de poliadenililo ("cola de poli(A)") en el extremo 3' de la molécula de ARNm. *In vivo*, la célula eucariota añade la cola de poli(A) después de la transcripción, con frecuencia a una longitud de aproximadamente 250 restos de adenosina. Por tanto, un ARNm eucariota maduro normal tiene una estructura que comienza en el extremo 5' con un nucleótido de caperuza de ARNm seguido de una región no traducida 5' (5'UTR) de nucleótidos, después un marco abierto de lectura que comienza con un codón de inicio que es un triplete AUG de bases de nucleótidos, que es la secuencia codificante de una proteína, y que termina con un codón de parada que puede ser un triplete UAA, UAG o UGA de bases de nucleótidos, después una región 3' no traducida (3'UTR) de nucleótidos y que termina con una cola de poliadenosina. Aunque los elementos del ARNm eucariota maduro normal se realizan de manera natural en una célula eucariota *in vivo*, se pueden realizar las mismas características o características equivalentes estructural y funcionalmente *in vitro* usando los métodos de biología molecular. En consecuencia, cualquier ARN que tenga la estructura similar a un ARNm eucariota maduro normal puede actuar como un ARNm y está dentro del alcance de la expresión "ácido ribonucleico mensajero".

La molécula de ARNm tiene en general un tamaño que puede encapsularse en una nanopartícula lipídica de la invención. Aunque el tamaño de una molécula de ARNm varía en la naturaleza dependiendo de la identidad de la especie de ARNm que codifica una proteína particular, un tamaño promedio para una molécula de ARNm es de 500-10.000 bases.

El ADN puede existir en al menos dos formas, que tienen diferentes tamaños. La primera forma de ADN es un polímero de gran tamaño denominado cromosoma. Un cromosoma contiene la información genética para muchas o la mayoría de las proteínas en una célula y también contiene información mediante la cual la célula puede controlar la replicación de la molécula de ADN. Una célula bacteriana puede contener uno o más cromosomas. Una célula eucariota contiene habitualmente más de un cromosoma celular, cada cromosoma.

La segunda forma de ADN es una forma de tamaño más corto. Muchas moléculas de ADN de la segunda forma son de un tamaño que puede encapsularse en una nanopartícula lipídica de la invención. Algunas de estas formas más cortas de ADN pueden ser de un tamaño que codifica de manera útil proteínas. Los ejemplos de estas segundas formas útiles, más cortas, de ADN incluyen plásmidos y otros vectores. Para una descripción más completa, véase,

Alberts B *et al.* (2007) *Molecular Biology of the Cell*, quinta edición, Garland Science.

Un plásmido es una molécula de ADN pequeña que está físicamente separada de, y puede replicarse independientemente de, ADN cromosómico dentro de una célula. Los plásmidos existen habitualmente *in vivo* como moléculas de ADN bicatenarias pequeñas circulares. En la naturaleza, los plásmidos portan genes que se pueden transcribir y traducir a proteínas que pueden favorecer la supervivencia de un organismo (p. ej., resistencia a antibióticos). En la naturaleza, los plásmidos pueden transmitirse con frecuencia de un organismo a otro mediante transferencia horizontal de genes. Se usan ampliamente en biología molecular plásmidos artificiales o recombinantes, que actúan para permitir la replicación de secuencias de ADN recombinante y la expresión de proteínas útiles dentro de organismos hospedadores. Los tamaños de los plásmidos pueden variar de aproximadamente 1 a más de 25 pares de kilobases. Mediante recombinación, se puede hacer que un plásmido recombinante tenga un tamaño que se pueda encapsular en una nanopartícula lipídica de la invención.

En biología molecular, un vector es una molécula de ADN usada como vehículo para transportar artificialmente material genético de una célula o de una reacción bioquímica *in vitro* a otra célula, donde el ADN puede replicarse y/o expresarse. Un vector que contiene ADN extraño se denomina recombinante. Entre los tipos de vectores útiles están los plásmidos y los vectores víricos. La inserción de un vector en la célula diana se denomina habitualmente transformación para células bacterianas, transfección para células eucariotas, aunque la inserción de un vector vírico se denomina con frecuencia transducción.

Los vectores víricos son en general virus recombinantes que portan ADN o ARN vírico modificado que se ha hecho no infeccioso, pero que todavía contienen promotores víricos y también el transgén, permitiendo de este modo la traducción del transgén a través de un promotor vírico. Los vectores víricos, en algunas realizaciones, se diseñan para la incorporación permanente del inserto en el genoma del hospedador (integrar) y, por tanto, dejan marcadores genéticos distintivos en el genoma del hospedador después de incorporar el transgén. Mediante recombinación, se puede hacer que un vector vírico tenga un tamaño que se pueda encapsular en una nanopartícula lipídica de la invención.

La expresión "ácido nucleico interferente corto" (ANip), como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de inhibir o regular negativamente la expresión génica o la replicación vírica mediando en la interferencia de ARN (iARN) o el silenciamiento génico de una manera específica de secuencia. Incluye ARN interferente corto (ARNip), microARN (miARN), oligonucleótidos de interferencia corta y moléculas de ácido nucleico interferente corto modificado químicamente. Los ARNip son responsables de la interferencia de ARN, el proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de secuencia en animales y plantas. Se generan ARNip mediante escisión por ribonucleasa III a partir de ARN bicatenario (ARNbc) más largo que son homólogos o específicos de la diana génica silenciada.

La expresión "interferencia de ARN" (iARN) es una técnica de silenciamiento génico dirigido postranscripcional, que usa un agente de iARN para degradar ARN mensajero (ARNm) que contiene una secuencia que es igual o muy similar al agente de iARN. Véase: Zamore y Haley, 2005, *Science*, 309, 1519-1524; Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Elbashir *et al.*, 2001, *Nature*, 411, 494-498; y Kreutzer *et al.*, publicación de PCT WO 00/44895; Fire, publicación de PCT WO 99/32619; Mello y Fire, publicación de PCT WO 01/29058; y similares.

Como se usa en el presente documento, iARN es equivalente a otros términos usados para describir la interferencia de ARN específica de secuencia, tal como silenciamiento génico postranscripcional, inhibición de la traducción, inhibición de la transcripción o epigenética. Por ejemplo, las formulaciones que contienen lípidos de la invención se pueden usar junto con moléculas de ANip para silenciar epigenéticamente genes a nivel postranscripcional y/o a nivel pretranscripcional. En un ejemplo no limitante, la modulación de la expresión génica por moléculas de ANip puede resultar de la escisión de ARN mediada por ANip (ya sea ARN codificante o no codificante) a través de RISC o, como alternativa, inhibición de la traducción como se conoce en la técnica. En otra realización, la modulación de la expresión génica por ANip puede resultar de la inhibición de la transcripción, tal como se señala, p. ej., en Janowski *et al.*, 2005, *Nature Chemical Biology*, 1, 216-222.

La expresión "inhibidor de iARN" es cualquier molécula que pueda modular negativamente (p. ej., reducir o inhibir) la función o actividad de interferencia de ARN en una célula o paciente. Un inhibidor de iARN puede regular negativamente, reducir o inhibir iARN (p. ej., escisión mediada por iARN de un polinucleótido diana, inhibición de la traducción o silenciamiento de la transcripción) por interacción o interferencia con la función de cualquier componente de la ruta de iARN, incluyendo componentes proteicos tales como RISC o componentes de ácido nucleico tales como miARN o ARNip. Un inhibidor de iARN puede ser una molécula de ANip, una molécula antisentido, un aptámero o una molécula pequeña que interactúa o interfiere con la función de RISC, un miARN, o un ARNip o cualquier otro componente de la ruta de iARN en una célula o paciente. Inhibiendo la iARN (p. ej., escisión mediada por iARN de un polinucleótido diana, inhibición de la traducción o silenciamiento de la transcripción), se puede usar un inhibidor de iARN para modular (p. ej., regular positivamente o regular negativamente) la expresión de un gen diana. En una realización, un inhibidor de ARN se usa para regular positivamente la expresión génica al interferir con (p. ej., reducir o prevenir) la regulación negativa endógena o la inhibición de la expresión génica a través de inhibición de la traducción, silenciamiento de la transcripción o escisión mediada por RISC de un polinucleótido (p. ej., ARNm). Al

interferir con mecanismos de represión endógena, silenciamiento o inhibición de la expresión génica, los inhibidores de iARN de la invención se pueden usar por lo tanto para regular positivamente la expresión génica para el tratamiento de enfermedades o afecciones que resultan de una pérdida de función. La expresión "inhibidor de iARN" se usa indistintamente con el término "ANip" en diversas realizaciones en el presente documento.

5 La expresión "ácido nucleico enzimático", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene complementariedad en una región de unión a sustrato con una diana génica específica y también tiene una actividad enzimática que actúa para escindir específicamente un ARN diana, inactivando de este modo la molécula de ARN diana. Las regiones complementarias permiten hibridación suficiente de la molécula de ácido nucleico enzimática con el ARN diana y, por tanto, permiten la escisión. Se prefiere complementariedad del 100 %, pero también puede ser útil complementariedad tan baja como 50-75 % en la presente invención (véase, p. ej., Werner y Uhlenbeck, 1995, *Nucleic Acids Research*, 23, 2092-2096; Hammann *et al.*, 1999, *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.*, 9, 25-31). Los ácidos nucleicos pueden modificarse en los grupos de base, azúcar y/o fosfato. La expresión ácido nucleico enzimático se usa indistintamente con expresiones tales como ribozimas, ARN catalítico, ARN enzimático, ADN catalítico, aptazima o ribozima de unión a aptámero, ribozima regulable, oligonucleótidos catalíticos, nucleozima, ADNzima, enzima de ARN, endorribonucleasa, endonucleasa, minizima, enzima de plomo, oligozima o enzima de ADN. Todas estas terminologías describen moléculas de ácido nucleico con actividad enzimática. Las características clave de una molécula de ácido nucleico enzimática son que tiene un sitio de unión a sustrato específico que es complementario de una o más de las regiones de ácido nucleico diana y que tiene secuencias de nucleótidos dentro o alrededor de ese sitio de unión a sustrato que transmiten una actividad de escisión y/o ligamiento de ácido nucleico a la molécula (véase, p. ej., Cech *et al.*, patente de los Estados Unidos 4.987.071; Cech *et al.*, 1988, 260 JAMA 3030). Las ribozimas y moléculas de ácido nucleico enzimáticas de la invención pueden modificarse químicamente, p. ej., como se describe en la técnica y en otra parte en el presente documento.

25 La expresión "ácido nucleico antisentido", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico no enzimática que se une con ARN diana por medio de interacciones ARN-ARN o ARN-ADN o ARN-APN (ácido nucleico proteico; Egholm *et al.*, 1993 *Nature* 365, 566) y altera la actividad del ARN diana (para una revisión, véase Stein y Cheng, 1993 *Science* 261, 1004 y Woolf *et al.*, patente de los Estados Unidos 5.849.902). Puede sintetizarse ADN antisentido químicamente o expresarse mediante el uso de un vector de expresión de ADN monocatenario o equivalente del mismo. Las moléculas antisentido de la invención pueden modificarse químicamente, p. ej., como se describe en la técnica.

35 La expresión "región activadora de RNasa H" como se usa en el presente documento, se refiere a una región (en general de más de o igual a 4-25 nucleótidos de longitud, preferentemente de 5-11 nucleótidos de longitud) de una molécula de ácido nucleico capaz de unirse con un ARN diana para formar un complejo no covalente que es reconocido por la enzima RNasa H celular (véase, p. ej., Arrow *et al.*, patente de los Estados Unidos 5.849.902; Arrow *et al.*, patente de los Estados Unidos 5.989.912). La enzima RNasa H se une con el complejo de molécula de ácido nucleico-ARN diana y escinde la secuencia de ARN diana.

40 La expresión "quimera antisentido 2-5A" como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido antisentido que contiene un resto de adenilato ligado a 2'-5' 5'-fosforilado. Estas quimeras se unen con ARN diana de una manera específica de secuencia y activan una ribonucleasa dependiente de 2-5A celular que, a su vez, escinde el ARN diana (Torrence *et al.*, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1300; Silverman *et al.*, 2000, *Methods Enzymol.*, 313, 522-533; Player y Torrence, 1998, *Pharmacol. Ther.*, 78, 55-113). Las moléculas quiméricas antisentido 2-5A pueden modificarse químicamente, p. ej., como se describe en la técnica.

50 La expresión "oligonucleótidos formadores de cadena triple" como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que puede unirse con un ADN bicatenario de una manera específica de secuencia para formar una hélice tricatenaria. Se ha mostrado que la formación de dicha estructura de triple hélice inhibe la transcripción del gen diana (Duval-Valentin *et al.*, 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 504; Fox, 2000, *Curr. Med. Chem.*, 7, 17-37; Praseuth *et al.*, 2000, *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 181-206). Las moléculas oligonucleotídicas formadoras de triple cadena de la invención pueden modificarse químicamente, p. ej., como se describe en la técnica.

55 La expresión "ARN señuelo" como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ARN o un aptámero que está diseñado para unirse preferentemente con un ligando predeterminado. Dicha unión puede dar como resultado la inhibición o activación de una molécula diana. El ARN señuelo o aptámero puede competir con una diana de unión natural por la unión de un ligando específico. De manera similar, un ARN señuelo puede diseñarse para unirse con un receptor y bloquear la unión de una molécula efectora o puede diseñarse para unirse con el receptor de interés y evitar la interacción con el receptor. Las moléculas señuelo de la invención pueden modificarse químicamente, p. ej., como se describe en la técnica.

65 La expresión "ADN monocatenario" (ADNmc) como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido desoxirribonucleico de origen natural o sintético que comprende una cadena sencilla lineal, p. ej., un ADNmc puede ser una secuencia génica con sentido o antisentido o EST (marcador de secuencia expresada).

El término "aloenzima" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico enzimática

alostérica, incluyendo, p. ej., patentes de los Estados Unidos N.º 5.834.186; 5.741.679; 5.589.332; 5.871.914; y publicaciones PCT n.º WO 00/24931, WO 00/26226, WO 98/27104 y WO 99/29842.

El término "aptámero" como se usa en el presente documento significa una composición polinucleotídica que se une específicamente con una molécula diana, en donde el polinucleótido tiene una secuencia que difiere de una secuencia normalmente reconocida por la molécula diana en una célula. Como alternativa, un aptámero puede ser una molécula de ácido nucleico que se une con una molécula diana donde la molécula diana no se une de manera natural con un ácido nucleico. La molécula diana puede ser cualquier molécula de interés. Las moléculas de aptámero de la invención pueden modificarse químicamente, p. ej., como se describe en la técnica.

Formulación de composiciones lipídicas

Para uso farmacéutico, las composiciones lipídicas de la invención pueden administrarse por vías entéricas o parenterales, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, de las vías respiratorias (aerosol), oral, intranasal, rectal, vaginal, bucal, nasofaríngea, gastrointestinal o sublingual. La administración puede ser sistémica (p. ej., IV) o local (p. ej., IM, SC, TD, intranasal o tópica). La administración tópica puede implicar, p. ej., cateterismo, implante, bomba osmótica, inyección directa, aplicación dérmica/transdérmica, endoprótesis vascular, gotas para los oídos/ojos o administración por la vena porta. Los compuestos de fórmula (II) deben evaluarse para determinar sus propiedades biofarmacéuticas, tales como solubilidad y estabilidad de la solución (a través del pH), permeabilidad, etc., para seleccionar la forma farmacéutica y la vía de administración más adecuada para el tratamiento de la indicación propuesta.

Las composiciones de la invención en general, pero no necesariamente, se administrarán como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" incluye cualquier ingrediente distinto del compuesto o los compuestos de la invención, el otro componente o los otros componentes lipídicos y el agente biológicamente activo. Un excipiente puede transmitir una característica funcional (p. ej., control de la tasa de liberación del fármaco) y/o no funcional (p. ej. adyuvante de procesamiento o diluyente) a las formulaciones. La elección del excipiente dependerá en gran medida de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad y la naturaleza de la forma farmacéutica.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables habituales incluyen:

- diluyentes, p. ej., lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina;
- lubricantes, p. ej., sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol;
- aglutinantes, p. ej., silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona;
- disgregantes, p. ej., almidones, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; y/o
- absorbentes, colorantes, aromatizantes y/o edulcorantes.

El excipiente puede ser un vehículo de solución acuosa que puede contener opcionalmente un tampón (p. ej., un tampón de PBS) y/o un azúcar.

Está disponible un análisis exhaustivo de los excipientes farmacéuticamente aceptables en Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2000, 20ª edición (ISBN: 0683306472).

Las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral. La administración oral puede implicar deglución, de modo que el compuesto entre en el tracto gastrointestinal, y/o administración bucal, lingual o sublingual por la que el compuesto entra en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

Las composiciones de la invención se pueden administrar por vía parenteral. Los compuestos y las composiciones de la invención se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, en tejido subcutáneo, en músculo o en un órgano interno. Los medios adecuados para administración incluyen intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular, intrasinovial y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración incluyen inyectores de aguja (incluyendo microaguja), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

Las formulaciones parenterales son normalmente soluciones acuosas u oleosas. Cuando la solución sea acuosa, excipientes tales como azúcares (incluyendo, pero sin restricción, glucosa, manitol, sorbitol, etc.), sales, hidratos de carbono y agentes tamponantes (preferentemente, a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usar junto con un vehículo adecuado tal como agua sin pirógenos estéril (WFI).

Las formulaciones parenterales pueden incluir implantes procedentes de polímeros degradables tales como poliésteres (es decir, ácido poliláctico, polilactida, polilactida-co-glicólido, policaprolactona, polihidroxibutirato), polioctoésteres y polianhídridos. Estas formulaciones se pueden administrar mediante incisión quirúrgica en el tejido subcutáneo, tejido muscular o directamente en órganos específicos.

La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, p. ej., por liofilización, puede realizarse fácilmente usando técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por el experto.

- 5 La solubilidad de los compuestos y composiciones usados en la preparación de soluciones parenterales puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación adecuadas, tales como la incorporación de codisolventes y/o agentes potenciadores de la solubilidad tales como tensioactivos, estructuras de micelas y ciclodextrinas.

- 10 Las composiciones de la invención también se pueden administrar por vía intranasal o mediante inhalación, normalmente en forma de polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, p. ej., en una mezcla seca con lactosa, o como una partícula de componentes mixtos, p. ej., mezclado con fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina) desde un inhalador de polvo seco, como una pulverización de aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador (preferentemente, un atomizador que usa electrohidrodinámica para producir una niebla fina) o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, o como gotas nasales. Para uso intranasal, el polvo puede comprender un agente bioadhesivo, p. ej., quitosano o ciclodextrina.

- 15 El recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador contiene una solución o suspensión del compuesto o los compuestos de la invención que comprende, p. ej., etanol, etanol acuoso o un agente alternativo adecuado para dispersar, solubilizar o prolongar la liberación de las composiciones de la invención, un propulsor o propulsores como disolvente y un tensioactivo opcional, tal como trioleato de sorbitano, ácido oleico o un ácido oligoláctico.

- 20 Antes de su uso en una formulación de polvo seco o suspensión, la composición se microniza a un tamaño adecuado para la administración por inhalación (normalmente, menos de 5 micrómetros). Esto puede lograrse mediante cualquier método de trituración adecuado, tal como molienda de chorro en espiral, molienda de chorro de lecho fluido, procesamiento de fluidos supercríticos para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por pulverización.

- 25 Se pueden formular cápsulas (hechas, p. ej., de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), blísteres y cartuchos para su uso en un inhalador o insuflador para contener una mezcla en polvo del compuesto o la composición de la invención, una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón y un modificador del rendimiento tal como *-*leucina, manitol o estearato de magnesio. La lactosa puede ser anhidra o estar en forma de monohidrato, preferentemente lo segundo. Otros excipientes adecuados incluyen dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructosa, sacarosa y trehalosa.

- 30 Las formulaciones para administración inhalada/intranasal se pueden formular para ser de liberación inmediata y/o modificada usando, p. ej., PGLA. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, por pulsos, controlada, dirigida y programada.

- 35 Las formulaciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una composición de la invención con vehículo. Los vehículos ventajosos incluyen disolventes absorbibles farmacológicamente aceptables para facilitar el paso a través de la piel del hospedador. De manera característica, los dispositivos transdérmicos se encuentran en forma de un vendaje que comprende un elemento de refuerzo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera de control de la velocidad para administrar el compuesto a la piel del hospedador a una velocidad controlada y predeterminada durante un periodo prolongado y un medio para fijar el dispositivo a la piel.

- 40 Las composiciones lipídicas de la invención se administran de cualquiera de varias maneras, incluyendo parenteral, intravenosa, sistémica, local, oral, intratumoral, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, por inhalación o cualquier método similar de administración. En una realización, las composiciones se administran por vía parenteral, es decir, por vía intraarticular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea o por vía intramuscular. En una realización específica, las composiciones liposómicas se administran mediante infusión intravenosa o por vía intraperitoneal mediante una inyección de embolada.

- 45 Las composiciones lipídicas de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenderán con frecuencia además uno o más tampones (p. ej., solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), carbohidratos (p. ej., glucosa, manosa, sacarosa, dextrosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio), solutos que hacen que la formulación sea isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden formularse como un liofilizado.

- 50 Se pueden encontrar formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención, p. ej., en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17^a Ed. (1985). Con frecuencia, las composiciones comprenderán una solución de las nanopartículas lipídicas suspendidas en un vehículo aceptable, tal como un vehículo acuoso.

En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica (es decir, formulación) que comprende una composición lipídica de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, está presente al menos otro componente lipídico en la composición lipídica. En otra realización, la composición lipídica está en forma de liposoma. En otra realización, la composición lipídica está en forma de una nanopartícula lipídica. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para su administración al hígado. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para su administración a un tumor. En otra realización, la composición lipídica es adecuada para aplicaciones de administración local (ojo, oído, piel, pulmón); administración a células musculares (i.m.), grasas o subcutáneas (dosificación s.c.). En otra realización, el agente biológicamente activo es un ARN o ADN.

Para fines de inmunización, una composición se preparará en general como un inyectable y se administrará mediante inyección (p. ej., mediante inyección intramuscular).

Se describe en el presente documento un dispositivo de administración (p. ej., jeringa, nebulizador, pulverizador, inhalador, parche dérmico, etc.) que contiene una composición de la invención. Este dispositivo puede usarse para administrar una composición farmacéutica a un sujeto, p. ej., a un ser humano para inmunización.

Células y órganos diana de la invención

Los compuestos, las composiciones y los usos de la invención pueden usarse para administrar un agente biológicamente activo a uno o más de los siguientes en un paciente:

el hígado o células hepáticas (p. ej., hepatocitos);
 un riñón o células renales;
 un tumor o células tumorales;
 el SNC o células del SNC (sistema nervioso central, p. ej., cerebro y/o médula espinal);
 el SNP o células del SNP (sistema nervioso periférico);
 un pulmón o células pulmonares;
 la vasculatura o células vasculares;
 la piel o células cutáneas (p. ej., células de la dermis y/o células foliculares);
 un ojo o células oculares (p. ej., mácula, fovea, córnea, retina) y
 un oído o células del oído (p. ej., células del oído interno, oído medio y/u oído externo).

Los compuestos, las composiciones y los usos de la invención también se pueden usar para administrar un agente biológicamente activo (p. ej., ARN que codifica un inmunógeno) a células del sistema inmunitario.

En una realización, los compuestos, las composiciones y los usos de la invención son para administrar un agente biológicamente activo a células hepáticas (p. ej., hepatocitos). En una realización, los compuestos, las composiciones y los usos de la invención son para administrar un agente biológicamente activo a un tumor o a células tumorales (p. ej., un tumor primario o células cancerosas metastásicas). En otra realización, los compuestos, las composiciones y los usos son para administrar un agente biológicamente activo al tejido adiposo cutáneo, músculo y ganglios linfáticos (es decir, dosificación sc).

Para la administración de un agente biológicamente activo al hígado o células hepáticas, en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con el hígado o las células hepáticas del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., inyección directa, inyección en la vena porta, cateterismo, endoprótesis vascular), para facilitar la administración.

Para la administración de un agente biológicamente activo al riñón o células renales, en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con el riñón o las células renales del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., inyección directa, cateterismo, endoprótesis vascular), para facilitar la administración.

Para la administración de un agente biológicamente activo a un tumor o células tumorales, en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con el tumor o las células tumorales del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., inyección directa, cateterismo, endoprótesis vascular), para facilitar la administración.

Para la administración de un agente biológicamente activo al SNC o células del SNC (p. ej., células cerebrales y/o células de la médula espinal), en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con el SNC o las células del SNC (p. ej., células cerebrales y/o células de la médula espinal) del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa,

intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., inyección directa, cateterismo, endoprótesis vascular, administración de bomba osmótica (p. ej., intratecal o ventricular)), para facilitar la administración.

5 Para la administración de un agente biológicamente activo al SNP o células del SNP, en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con el SNP o las células del SNP del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., inyección directa), para facilitar la administración.

10 Para la administración de un agente biológicamente activo a un pulmón o células pulmonares, en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con el pulmón o las células pulmonares del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parental (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., administración pulmonar directamente a tejidos y células pulmonares), para facilitar la administración.

15 Para la administración de un agente biológicamente activo a la vasculatura o células vasculares, en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con la vasculatura o las células vasculares del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., pinzamiento, cateterismo, endoprótesis vascular), para facilitar la administración.

20 Para la administración de un agente biológicamente activo a la piel o células cutáneas (p. ej., células de la dermis y/o células foliculares), en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con la piel o las células cutáneas (p. ej., células de la dermis y/o células foliculares) del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., aplicación dérmica directa, iontoforesis), para facilitar la administración.

30 Para la administración de un agente biológicamente activo a un ojo o células oculares (p. ej., mácula, fovea, córnea, retina), en una realización, una composición de la invención se pone en contacto con el ojo o las células oculares (p. ej., mácula, fovea, córnea, retina) del paciente como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., inyección directa, inyección intraocular, inyección periocular, subretiniana, iontoforesis, uso de colirios, implantes), para facilitar la administración.

35 Para la administración de un agente biológicamente activo a un oído o células del oído (p. ej., células del oído interno, oído medio y/u oído externo), en una realización, la composición de la invención se pone en contacto con el oído o las células del oído (p. ej., células del oído interno, oído medio y/u oído externo) del paciente, como se conoce en general en la técnica, tal como a través de la administración parenteral (p. ej., administración intravenosa, intramuscular, subcutánea) o administración local (p. ej., inyección directa), para facilitar la administración.

40 Para el suministro de un agente biológicamente activo (p. ej., ARN que codifica un inmunógeno) a células del sistema inmunitario (p. ej., células presentadoras de antígenos, incluyendo células presentadoras de antígeno profesionales), en una realización, la composición de la invención se administra por vía intramuscular, después de lo cual las células inmunitarias pueden infiltrarse en el sitio de administración y procesar el ARN administrado y/o procesar el antígeno codificado producido por células no inmunitarias, tales como células musculares. Dichas células inmunitarias pueden incluir macrófagos (p. ej., macrófagos procedentes de la médula ósea), células dendríticas (p. ej., células dendríticas plasmacitoides procedentes de la médula ósea y/o células dendríticas mieloides procedentes de la médula ósea), monocitos (p. ej., monocitos de sangre periférica humana), etc. (p. ej., véase documento WO2012/006372).

50 Inmunización según la invención

Para fines de inmunización, en algunas realizaciones, la invención abarca el suministro de un ARN que codifica un inmunógeno. El inmunógeno induce una respuesta inmunitaria que reconoce el inmunógeno y, por lo tanto, puede usarse para proporcionar inmunidad contra un patógeno, contra un alérgeno o contra un antígeno tumoral. Se prefiere inmunizar contra la enfermedad y/o infección provocada por un patógeno.

55 El ARN se administra con una composición lipídica de la invención (p. ej., formulada como un liposoma o LNP). En algunas realizaciones, la invención utiliza liposomas dentro de los cuales se encapsula ARN codificante de inmunógeno. La encapsulación dentro de los liposomas puede proteger el ARN de la digestión con RNasa. La eficacia de encapsulación no tiene que ser del 100 %. La presencia de moléculas de ARN externas (p. ej., en la superficie exterior del liposoma) o moléculas de ARN "desnudas" (moléculas de ARN no asociadas con un liposoma) es aceptable. Preferentemente, para una composición que comprende liposomas y moléculas de ARN, al menos la mitad de las moléculas de ARN (p. ej., al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de las moléculas de ARN) están encapsuladas en liposomas.

65 Las moléculas de ARN también pueden formar complejos con LNP. Por ejemplo, no es necesario que el lípido forme

solo liposomas (con núcleo acuoso). Algunas nanopartículas lipídicas pueden comprender un núcleo lipídico (p. ej., la composición puede comprender una mezcla de liposomas y nanopartículas con un núcleo lipídico). En dichos casos, las moléculas de ARN pueden estar encapsuladas por LNP que tienen un núcleo acuoso y formar complejos con las LNP que tienen un núcleo lipídico por interacciones no covalentes (p. ej., interacciones iónicas entre ARN con carga negativa y lípido catiónico). La encapsulación y la formación de complejos con LNP (ya sea con un núcleo lipídico o acuoso) pueden proteger el ARN de la digestión con RNasa. La eficacia de encapsulación/formación de complejos no tiene que ser del 100 %. La presencia de moléculas de ARN "desnudas" (moléculas de ARN no asociadas con un liposoma) es aceptable. Preferentemente, para una composición que comprende una población de LNP y una población de moléculas de ARN, al menos la mitad de la población de moléculas de ARN (p. ej., al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de las moléculas de ARN) están encapsuladas en LNP o forman complejos con LNP.

Liposomas y LNP

Los liposomas se dividen habitualmente en tres grupos: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequeñas (SUV); y vesículas unilamelares grandes (LUV). Las MLV tienen múltiples bicapas en cada vesícula, formando varios compartimentos acuosos separados. Las SUV y LUV tienen una única bicapa que encapsula un núcleo acuoso; las SUV suelen tener un diámetro <50 nm y las LUV tienen un diámetro >50 nm. Para la administración de ARN codificante de inmunógeno, el intervalo preferido de diámetros está en el intervalo de 60-180 nm y más preferentemente en el intervalo de 80-160 nm.

La composición lipídica también puede ser LNP. La composición puede comprender una mezcla de nanopartículas que tienen un núcleo acuoso y nanopartículas que tienen un núcleo lipídico o, en otras realizaciones, puede consistir en sustancialmente solo partículas de núcleo acuoso o sustancialmente solo partículas completamente lipídicas. Para la administración de ARN codificante de inmunógeno, el intervalo preferido de diámetros está en el intervalo de 60-180 nm y, en realizaciones más particulares, en el intervalo de 80-160 nm.

Un liposoma o LNP puede ser parte de una composición que comprende una población de liposomas o LNP y los liposomas o LNP dentro de la población pueden tener un intervalo de diámetros. Para una composición que comprende una población de liposomas o LNP con diferentes diámetros, se prefiere que (i) al menos 80 % en número de los liposomas o LNP tengan diámetros en el intervalo de 60-180 nm, p. ej., en el intervalo de 80-160 nm, (ii) el diámetro promedio (por intensidad, p. ej., Z-promedio) de la población está idealmente en el rango de 60-180 nm, p. ej., en el intervalo de 80-160 nm; y/o (iii) los diámetros dentro de la pluralidad tienen un índice de polidispersidad <0,2.

Para obtener liposomas o LNP con el diámetro o los diámetros deseados, se puede realizar mezcla usando un proceso en el que dos corrientes de alimentación de solución acuosa de ARN se combinan en una sola zona de mezcla con una corriente de una solución lipídica etanólica, todas al mismo caudal, p. ej., en un canal microfluídico.

Las mezclas útiles de lípidos, para formar composiciones lipídicas (p. ej., liposomas o LNP) para usos de inmunización, comprenden: un lípido de fórmula (I); colesterol; y un lípido PEGilado, tal como PEG-DMG, es decir, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol) conjugado con PEG. Esta mezcla también puede incluir un lípido zwitteriónico neutro, tal como DSPC (1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) o DPyPE. Estas (y otras) mezclas se usan en los ejemplos.

En determinadas realizaciones, las composiciones lipídicas proporcionadas por la invención (tales como liposomas o LNP) tienen actividad adyuvante, es decir, en ausencia de un inmunógeno, tal como antígeno proteico o un ácido nucleico (ADN o ARN), tal como un ácido nucleico que codifica dicho antígeno. Por lo tanto, los lípidos y la composición lipídica proporcionada por la invención pueden formularse con cualquier tipo de inmunógeno, p. ej., polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña, etcétera. Por tanto, en algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas por la invención pueden usarse en métodos para generar una respuesta inmunitaria a un inmunógeno, p. ej., administrando una composición que comprende un lípido o una composición lipídica proporcionada por la invención junto con un inmunógeno.

Moléculas de ARN

Después de administración *in vivo* de una composición de inmunización, el ARN administrado se libera y se traduce dentro de una célula para proporcionar el inmunógeno *in situ*. En determinadas realizaciones, el ARN es de cadena más ("+"), por lo que puede ser traducido por células sin necesidad de ninguna etapa de replicación intermedia, tal como transcripción inversa. También puede unirse con receptores TLR7 expresados por células inmunitarias, iniciando de este modo un efecto adyuvante. Adicionalmente, o como alternativa, el ARN puede unirse a otros receptores tales como RIG I, MDA5, o RIG I y MDA5.

En determinadas realizaciones, el ARN es un ARN autorreplicante. Una molécula de ARN autorreplicante (replicón) puede, cuando se administra a una célula de vertebrado incluso sin ninguna proteína, conducir a la producción de múltiples ARN descendientes por transcripción de sí misma (a través de una copia antisentido que genera a partir de sí misma). Por tanto, una molécula de ARN autorreplicante es, en determinadas realizaciones, una molécula de cadena

(+) que se puede traducir directamente después de su administración a una célula y esta traducción proporciona una ARN polimerasa dependiente de ARN que después produce transcripciones tanto antisentido como con sentido a partir del ARN administrado. Por tanto, el ARN administrado conduce a la producción de múltiples ARN descendientes. Estos ARN descendientes, así como transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse ellos mismos para proporcionar expresión *in situ* de un inmunógeno codificado o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN administrado que se traducen para proporcionar la expresión *in situ* del inmunógeno. El resultado general de esta secuencia de transcripciones es una enorme amplificación del número de ARN de replicones introducidos y, por lo tanto, el inmunógeno codificado se convierte en un producto polipeptídico principal de las células hospedadoras.

Un sistema adecuado para lograr la autorreplicación es usar un replicón de ARN basado en alfavirus. Estos replicones de cadena (+) se traducen después de la administración a una célula para producir una replicasa (o replicasa-transcriptasa). La replicasa se traduce como una poliproteína que se autoescinde para proporcionar un complejo de replicación que crea copias genómicas de cadena (-) del ARN de cadena (+) administrado. Estos transcritos de cadena (-) en sí mismos se pueden transcribir para proporcionar copias adicionales del ARN parental de cadena (+) y también para proporcionar un transcrito subgenómico que codifica el inmunógeno. La traducción del transcrito subgenómico conduce por tanto a la expresión *in situ* del inmunógeno por la célula infectada. Los replicones de alfavirus adecuados pueden usar una replicasa de un virus sindbis, un virus del bosque de semliki, un virus de la encefalitis equina oriental, un virus de la encefalitis equina venezolana, etc. Se pueden usar secuencias de virus mutantes o de tipo silvestre, p. ej., el mutante TC83 atenuado de VEEV se ha usado en replicones.

Por tanto, una molécula de ARN autorreplicante preferida codifica (i) una ARN polimerasa dependiente de ARN que puede transcribir ARN de la molécula de ARN autorreplicante y (ii) un inmunógeno. La polimerasa puede ser una replicasa de alfavirus, p. ej., que comprende una o más de las proteínas de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4.

Mientras que los genomas de alfavirus naturales codifican proteínas de virión estructurales además de las realizaciones particulares de poliproteína de replicasa no estructural, una molécula de ARN autorreplicante de la invención no codifica proteínas estructurales de alfavirus. Por tanto, un ARN autorreplicante particular puede conducir a la producción de copias de ARN genómico de sí mismo en una célula, pero no a la producción de viriones que contienen ARN. La incapacidad de producir estos viriones significa que, a diferencia de un alfavirus de tipo silvestre, la molécula de ARN autorreplicante no puede perpetuarse en forma infecciosa. Las proteínas estructurales de alfavirus que son necesarias para la perpetuación en virus de tipo silvestre están ausentes de ARN autorreplicantes de la invención y su lugar lo ocupan un gen o genes que codifican el inmunógeno de interés, de modo que el transcrito subgenómico codifica el inmunógeno en lugar de las proteínas estructurales del virión de alfavirus.

Por tanto, una molécula de ARN autorreplicante útil con la invención puede tener dos marcos abiertos de lectura. Un marco abierto de lectura codifica una replicasa, p. ej., el primero, marco abierto de lectura (5'); el otro marco abierto de lectura codifica un inmunógeno, p. ej., el segundo, marco abierto de lectura (3'). En algunas realizaciones, el ARN puede tener marcos abiertos de lectura adicionales (p. ej., cadena abajo), p. ej., para codificar inmunógenos adicionales (véase a continuación) o para codificar polipéptidos accesorios.

Una molécula de ARN autorreplicante puede tener una secuencia 5' que es compatible con la replicasa codificada.

Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden tener diversas longitudes, pero normalmente tienen una longitud de aproximadamente 5000-25000 nucleótidos, p. ej., 8000-15000 nucleótidos o 9000-12000 nucleótidos. Por tanto, el ARN es más largo de lo que se ve en la administración de ARNip o ARNm convencional. En algunas realizaciones, el ARN autorreplicante es mayor de aproximadamente 2000 nucleótidos, tal como mayor de aproximadamente: 9000, 12000, 15000, 18000, 21000, 24000 o más nucleótidos de longitud.

Una molécula de ARN puede tener una caperuza 5' (p. ej., una 7-metilguanosina). Esta caperuza puede potenciar la traducción *in vivo* del ARN.

El nucleótido 5' de una molécula de ARN útil con la invención puede tener un grupo trifosfato 5'. En un ARN con caperuza, este puede estar unido a una 7-metilguanosina a través de un enlace de 5' a 5'. Un trifosfato 5' puede potenciar la unión de RIG-I y, por tanto, promover efectos adyuvantes.

Una molécula de ARN puede tener una cola poli A 3'. También puede incluir una secuencia de reconocimiento de polimerasa poli A (p. ej., AAUAAA) cerca de su extremo 3'.

Una molécula de ARN útil con la invención para fines de inmunización normalmente será monocatenaria. Los ARN monocatenarios pueden iniciar en general un efecto adyuvante al unirse con TLR7, TLR8, helicasas de ARN y/o PKR. El ARN administrado en forma bicatenaria (ARNbc) puede unirse con TLR3 y este receptor también puede ser activado por ARNbc que se forma durante la replicación de un ARN monocatenario o dentro de la estructura secundaria de un ARN monocatenario.

Pueden prepararse moléculas de ARN para fines de inmunización convenientemente mediante transcripción *in vitro*

(TIV). TIV puede usar un molde de (ADNc) creado y propagado en forma de plásmido en bacterias o creado de manera sintética (por ejemplo, mediante métodos de ingeniería de síntesis génica y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Por ejemplo, se puede usar una ARN polimerasa dependiente de ADN (tal como las ARN polimerasas de bacteriófago T7, T3 o SP6) para transcribir el ARN de un molde de ADN. Se pueden usar reacciones adecuadas de adición de caperuza y poli A según sea necesario (aunque el poliA del replicón está codificado habitualmente dentro del molde de ADN). Estas ARN polimerasas pueden tener requisitos rigurosos para el nucleótido o los nucleótidos transcritos 5' y, en algunas realizaciones, estos requisitos deben coincidir con los requisitos de la replicasa codificada, para garantizar que el ARN transcrito por TIV pueda actuar eficazmente como sustrato para su replicasa autocodificada.

Como se analiza en el documento WO2011/005799, el ARN autorreplicante puede incluir (además de cualquier estructura de caperuza 5') uno o más nucleótidos que tienen una base nitrogenada modificada. Por ejemplo, un ARN autorreplicante puede incluir una o más bases nitrogenadas de pirimidina modificadas, tales como pseudouridina y/o 5 restos de metilcitosina. En algunas realizaciones, sin embargo, el ARN no incluye ninguna base nitrogenada modificada y puede no incluir ningún nucleótido modificado, es decir, todos los nucleótidos en el ARN son ribonucleótidos A, C, G y U convencionales (excepto para cualquier estructura de caperuza 5', que puede incluir una metilguanosa 7'). En otras realizaciones, el ARN puede incluir una caperuza 5' que comprende una metilguanosa 7' y los primeros 1, 2 o 3 ribonucleótidos 5' pueden metilarse en la posición 2' de la ribosa.

Un ARN usado con la invención para fines de inmunización idealmente incluye solo enlaces fosfodiéster entre nucleósidos, pero en algunas realizaciones puede contener fosforamidoato, fosforotioato y/o enlaces de metilfosfonato.

La invención incluye realizaciones donde se formulan múltiples especies de ARN con una composición lipídica proporcionada por la invención, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más especies de ARN, incluyendo diferentes clases de ARN (tales como ARNm, ARNip, ARN autorreplicantes y combinaciones de los mismos).

Inmunógenos

Las moléculas de ARN usadas con la invención para fines de inmunización, en algunas realizaciones, codifican un inmunógeno polipeptídico. En estas realizaciones, después de la administración, el ARN se traduce *in vivo* y el inmunógeno puede inducir una respuesta inmunitaria en el receptor. El inmunógeno puede inducir una respuesta inmunitaria contra un patógeno (p. ej., una bacteria, un virus, un hongo o un parásito) pero, en algunas realizaciones, induce una respuesta inmunitaria contra un alérgeno o un antígeno tumoral. La respuesta inmunitaria puede comprender una respuesta de anticuerpos (que incluye habitualmente IgG) y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. El inmunógeno polipeptídico normalmente inducirá una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido patógeno (o alérgeno o tumoral) correspondiente, pero en algunas realizaciones, el polipéptido puede actuar como un mimótopo para inducir una respuesta inmunitaria que reconoce un sacárido. El inmunógeno será normalmente un polipéptido de superficie, p. ej., una adhesina, una hemaglutinina, una glucoproteína de envoltura, una glucoproteína de espina, etc.

La molécula de ARN puede codificar un único inmunógeno polipeptídico o múltiples polipéptidos. Pueden presentarse múltiples inmunógenos como un único inmunógeno polipeptídico (polipéptido de fusión) o como polipéptidos separados. Si los inmunógenos se expresan como polipéptidos separados de un replicón, entonces uno o más de estos pueden proporcionarse con un IRES cadena arriba o un elemento promotor vírico adicional. Como alternativa, se pueden expresar múltiples inmunógenos a partir de una poliproteína que codifica inmunógenos individuales fusionados con una proteasa autocatalítica corta (p. ej., proteína del virus de la glosopeda 2A) o como inteínas.

En determinadas realizaciones, se pueden usar inmunógenos polipeptídicos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más inmunógenos), ya sea solos o junto con una molécula de ARN, tal como un ARN autorreplicante, que codifican uno o más inmunógenos (ya sea iguales o diferentes que los inmunógenos polipeptídicos).

En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra una de estas bacterias:
Neisseria meningitidis: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, proteínas de membrana tales como adhesinas, autotransportadores, toxinas, proteínas de adquisición de hierro y proteína de unión a factor H. Se desvela una combinación de tres polipéptidos útiles en Giuliani *et al.* (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103 (29): 10834-9.

Streptococcus pneumoniae: se desvelan inmunógenos polipeptídicos útiles en el documento WO2009/016515. Estos incluyen, pero sin limitación, la subunidad de fimbria RrgB, el precursor de beta-N-acetil-hexosaminidasa (spr0057), spr0096, proteína de tensión general GSP-781 (spr2021, SP2216), serina/treonina quinasa StkP (SP1732) y adhesina de superficie neumocócica PsaA.

Streptococcus pyogenes: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en los documentos WO02/34771 y WO2005/032582.
Moraxella catarrhalis.

Bordetella pertussis: Los inmunógenos de tos ferina útiles incluyen, pero sin limitación, toxina o toxoide tosferínico

(PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina y aglutinógenos 2 y 3.

Staphylococcus aureus: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en el documento WO2010/119343, tal como una hemolisina, esxA, esxB, proteína de unión a ferricromo (sta006) y/o la lipoproteína sta011.

Clostridium tetani: el inmunógeno habitual es el toxoide tetánico.

Cornynebacterium diphtheriae: el inmunógeno habitual es el toxoide diftérico.

Haemophilus influenzae: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en los documentos WO2006/110413 y WO2005/111066.

Pseudomonas aeruginosa

Streptococcus agalactiae: los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en el documento WO02/34771.

Chlamydia trachomatis: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, PepA, LcrE, ArtJ, DnaK, CT398, tipo OmpH, L7/I12, OmcA, AtoS, CT547, Eno, HtrA y MurG (p. ej., como se desvela en el documento WO2005/002619). LcrE (WO2006/138004) y HtrA (WO2009/109860) son dos inmunógenos preferidos.

Chlamydia pneumoniae: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los polipéptidos desvelados en el documento WO02/02606.

Helicobacter pylori: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, CagA, VacA, NAP y/o ureasa (documento WO03/018054).

Escherichia coli: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, inmunógenos procedentes de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregante (EAggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y/o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Las cepas de ExPEC incluyen *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis/septicemia (MNEC). Se desvelan inmunógenos de UPEC útiles en los documentos WO2006/091517 y WO2008/020330. Se desvelan inmunógenos de MNEC útiles en el documento WO2006/089264. Un inmunógeno útil para varios tipos de *E. coli* es AcfD (documento WO2009/104092).

Bacillus anthracis

Yersinia pestis: Los inmunógenos útiles incluyen, pero sin limitación, los desvelados en los documentos WO2007/049155 y WO2009/031043.

Staphylococcus epidermis

Clostridium perfringens o *Clostridium botulinum*

Legionella pneumophila

Coxiella burnetii

Brucella, tal como *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomas*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. pinnipediae*.

Francisella, tal como *F. novicida*, *F. philomiragia*, *F. tularensis*.

Neisseria gonorrhoeae

Treponema pallidum

Haemophilus ducreyi

Enterococcus faecalis o *Enterococcus faecium*

Staphylococcus saprophyticus

Yersinia enterocolitica

Mycobacterium tuberculosis

Rickettsia

Listeria monocytogenes

Vibrio cholerae

Salmonella typhi

Borrelia burgdorferi

Porphyromonas gingivalis

Klebsiella

En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra uno de estos virus: Ortomixovirus: Los inmunógenos útiles pueden ser de un virus de gripe A, B o C, tal como las proteínas hemaglutinina, neuraminidasa o M2 de la matriz. Cuando el inmunógeno es una hemaglutinina del virus de gripe A, puede ser de cualquier subtipo, p. ej., H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

Virus Paramyxoviridae: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de neumovirus (p. ej., virus respiratorio sincitial, VRS), Rubulavirus (p. ej., virus de las paperas), Paramixovirus (p. ej., virus paragripal), Metapneumovirus y Morbillivirus (p. ej., virus del sarampión).

- 5 Poxviridae: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de orthopoxvirus tales como *Variola vera*, incluyendo, pero sin limitación, *Variola major* y *Variola minor*.

10 Picornavirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de picornavirus, tales como enterovirus, Rinovirus, Heparnavirus, Cardiovirus y Aphotavirus. En una realización, el enterovirus es un poliovirus, p. ej., un poliovirus de tipo 1, tipo 2 y/o tipo 3. En otra realización, el enterovirus es un enterovirus EV71. En otra realización, el enterovirus es un virus coxsackie A o B.

15 Bunyavirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Orthobunyavirus, tales como virus de la encefalitis de California, un Phlebovirus, tal como virus de la fiebre del valle del Rift o un Nairovirus, tal como virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.

Heparnavirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Heparnavirus, tal como virus de la hepatitis A (VHA).

- 20 Filovirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un filovirus, tales como un virus del Ébola (incluido un ebolavirus de Zaire, Costa de Marfil, Reston o Sudán) o un virus de Marburg.

25 Togavirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Togavirus, tal como un Rubivirus, un Alphavirus o un Arterivirus. Esto incluye el virus de la rubéola.

30 Flavivirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un flavivirus, tal como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus del bosque de Kyasanur, virus de la encefalitis del Nilo Occidental, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis rusa de primavera-verano, virus de la encefalitis de Powassan.

35 Pestivirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Pestivirus, tales como diarrea vírica bovina (BVDV), peste porcina clásica (CSFV) o enfermedad de la frontera (BDV).

- 35 Hepadnavirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Hepadnavirus, tales como virus de la hepatitis B. Una composición puede incluir el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

Otros virus de la hepatitis: Una composición puede incluir un inmunógeno de un virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis delta, virus de la hepatitis E o virus de la hepatitis G.

- 40 Rhabdovirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Rhabdovirus, tal como un Lyssavirus (p. ej., un virus de la rabia) y Vesiculovirus (VSV).

45 Caliciviridae: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de Caliciviridae, tales como virus Norwalk (Norovirus) y virus de tipo Norwalk, tales como virus de Hawaii y virus de Snow Mountain.

Coronavirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un coronavirus de SRAG, bronquitis infecciosa aviar (IBV), virus de la hepatitis de ratón (MHV) y virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV). El inmunógeno de coronavirus puede ser un polipéptido de espina.

- 50 Retrovirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Oncovirus, un Lentivirus (p. ej., VIH-1 o VIH-2) o un Spumavirus.

Reovirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un Orthoreovirus, un Rotavirus, un Orbivirus o un Coltivirus.

- 55 Parvovirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de Parvovirus B19.

60 Herpesvirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de un herpesvirus humano, tales como, únicamente a modo de ejemplo, virus del herpes simple (VHS) (p. ej., VHS de tipos 1 y 2), virus de la varicela zóster (VZV), virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (VHH6), herpesvirus humano 7 (VHH7) y herpesvirus humano 8 (VHH8).

65 Papovavirus: los inmunógenos incluyen, pero sin limitación, los derivados de papilomavirus y polioma virus. El papilomavirus (humano) puede ser de serotipo 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 o 65, p. ej., de uno o más de los serotipos 6, 11, 16 y/o 18.

Adenovirus: los inmunógenos incluyen los derivados del serotipo 36 (Ad-36).

En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra un virus que infecta a peces, tales como: virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), virus de la enfermedad pancreática del salmón (SPDV), virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), virus del bagre de canal (CCV), virus de la enfermedad linfocistis del pescado (FLDV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), herpesvirus de koi, virus de tipo picorna del salmón (también conocido como virus de tipo picorna del salmón atlántico), virus del salmón encerrado (LSV), rotavirus del salmón atlántico (ASR), virus de la enfermedad de la trucha (TSD), virus de tumor del salmón coho (CSTV) o virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV).

Los inmunógenos fúngicos pueden proceder de dermatofitos, incluyendo: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouini*, *Microsporium canis*, *Microsporium distortum*, *Microsporium equinum*, *Microsporium gypsum*, *Microsporium nanum*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton quinckeanum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *T. verrucosum* var. album, var. discoides, var. ochraceum, *Trichophyton violaceum* y/o *Trichophyton faviforme*; o de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolase*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *Cladosporium carrionii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, microsporidios, *Encephalitozoon* spp., *Septata intestinalis* y *Enterocytozoon bienewisi*; los menos comunes son *Brachiola* spp, *Microsporidium* spp., *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., *Trachipleistophora* spp., *Vittaforma* spp. *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigeli*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffeii*, *Malassezia* spp., *Fonsecaea* spp., *Wangiella* spp., *Sporothrix* spp., *Basidiobolus* spp., *Conidiobolus* spp., *Rhizopus* spp, *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Mortierella* spp, *Cunninghamella* spp, *Saksenaea* spp., *Alternaria* spp, *Curvularia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Monolinia* spp, *Rhizoctonia* spp, *Paecilomyces* spp, *Pithomyces* spp y *Cladosporium* spp.

En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra un parásito del género *Plasmodium*, tal como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Por tanto, la invención puede usarse para inmunizar contra la malaria. En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra un parásito de la familia *Caligidae*, en particular los de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligu*, p. ej., piojos de mar tales como *Lepeophtheirus salmonis* o *Caligu rogercresseyi*.

En algunas realizaciones, el inmunógeno induce una respuesta inmunitaria contra: alérgenos de polen (alérgenos de árbol, hierbas, maleza y gramíneas); alérgenos de insectos o arácnidos (alérgenos inhalantes, de saliva y veneno, p. ej., alérgenos de ácaros, alérgenos de cucarachas y mosquitos, alérgenos de veneno de himenópteros); alérgenos de pelo y caspa de animales (de, p. ej., perro, gato, caballo, rata, ratón, etc.); y alérgenos alimentarios (p. ej., una gliadina). Son alérgenos de polen importantes de árboles, gramíneas y hierbas los que se originan de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinales y platanaceae incluyendo, pero sin limitación, abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano de sombra (*Platanus*), el orden de Poales, incluyendo hierbas de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, los órdenes de *Asterales* y *Urticales*, incluyendo hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros alérgenos de inhalación importantes son los que proceden de ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaro de almacén, p. ej., *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, los de cucarachas, mosquitos y pulgas, p. ej., *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, y los de mamíferos, tales como de gato, de perro y de caballo, alérgenos de venenos, incluyendo los que se originan a partir de insectos que pican o muerden tales como los del orden taxonómico de himenópteros, incluyendo abejas (*Apidae*), avispas (*Vespidae*) y hormigas (*Formicoidae*).

En algunas realizaciones, el inmunógeno es un antígeno tumoral seleccionado de: (a) antígenos de cáncer de testículo tales como NY-ESO-1, SSX2, SCP1 así como RAGE, BAGE, polipéptidos de la familia GAGE y MAGE, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6 y MAGE-12 (que se pueden usar, por ejemplo, para abordar el melanoma, tumores de pulmón, de cabeza y cuello, CPNM, de mama, gástrico-intestinales y de vejiga); (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con diversos tumores sólidos, p. ej., cáncer colorrectal, de pulmón, de cabeza y cuello), p21/Ras (asociado con, p. ej., melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, p. ej., melanoma), MUM1 (asociado con, p. ej., melanoma), caspasa-8 (asociada con, p. ej., cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, p. ej., cáncer de vejiga), HLA-A2-R1701, beta catenina (asociada con, p. ej., melanoma), TCR (asociado con, p. ej., linfoma no Hodgkin de linfocitos T), BCR-abl (asociado con, p. ej., leucemia mielógena crónica), trifosfato isomerasa, KIA 0205, CDC-27 y LDLR-FUT; (c) antígenos sobreexpresados, por ejemplo, galectina 4 (asociada con, p. ej., cáncer colorrectal), galectina 9 (asociada con, p. ej., enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociada con, p. ej., leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociado con, p. ej., diversas leucemias), anhidrasa carbónica (asociada con, p. ej., cáncer renal), aldolasa A (asociada con, p. ej., cáncer

de pulmón), PRAME (asociado con, p. ej., melanoma), HER-2/neu (asociado con, p. ej., cáncer de mama, colon, pulmón y ovario), mammaglobin, alfa-fetoproteína (asociada con, p. ej., hepatoma), KSA (asociado con, p. ej., cáncer colorrectal), gastrina (asociada con, p. ej., cáncer pancreático y gástrico), proteína catalítica de telomerasa, MUC-1 (asociado con, p. ej., cáncer de mama y ovario), G-250 (asociado con, p. ej., carcinoma de células renales), p53 (asociado con, p. ej., cáncer de mama, colon) y antígeno carcinoembrionario (asociado con, p. ej., cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal tales como cáncer colorrectal); (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanoma-melanocitos tales como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína-1/TRP1 relacionada con tirosinasa y proteína-2/TRP2 relacionada con tirosinasa (asociada con, p. ej., melanoma); (e) antígenos asociados a próstata tales como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados con, p. ej., cáncer de próstata; (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados con mieloma y linfomas de linfocitos B, por ejemplo). En determinadas realizaciones, los inmunógenos tumorales incluyen, pero sin limitación, p15, Hom/Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos del papilomavirus humano (VPH), incluyendo E6 y E7, antígenos de virus de la hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de linfocitos T humano, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y similares.

20 Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica de la invención, en particularmente una útil para inmunización, puede incluir uno o más inmunopotenciadores de molécula pequeña. Por ejemplo, la composición puede incluir un agonista de TLR2 (p. ej., Pam3CSK4), un agonista de TLR4 (p. ej., un fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como E6020), un agonista de TLR7 (p. ej., imiquimod), un agonista de TLR8 (p. ej., resiquimod) y/o un agonista de TLR9 (p. ej., IC31). Cualquiera de dichos agonistas tiene idealmente un peso molecular de <2000 Da. Dicho agonista o agonistas pueden, en algunas realizaciones, encapsularse con el ARN dentro de liposomas o encapsularse o formar complejos con LNP, pero en otras realizaciones no están encapsulados o no están en complejos.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, p. ej., entre 240 y 360 mOsm/kg o entre 290 y 310 mOsm/kg.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2 fenoxietanol. Se pueden preparar composiciones sin mercurio y se pueden preparar vacunas sin conservantes.

35 Las composiciones comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de composiciones lipídicas descritas en el presente documento (p. ej., liposomas y LNP), así como cualquier otro componente, según sea necesario. La cantidad inmunológicamente eficaz se refiere a la cantidad administrada a un individuo, ya sea en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento (p. ej., respuesta inmunitaria profiláctica contra un patógeno). Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo para tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo para tratar (p. ej. primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación por parte del médico tratante de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad quede en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos rutinarios. Las composiciones de la invención se expresarán en general con respecto a la cantidad de ARN por dosis. Una dosis preferida tiene ≤ 100 mg de ARN (p. ej., de 10 a 45 100 mg, tal como aproximadamente 10 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg o 100 mg), pero la expresión se puede ver a niveles mucho menores, p. ej., ≤ 1 mg/dosis, ≤ 100 ng/dosis, ≤ 10 ng/dosis, ≤ 1 ng/dosis, etc.

50 Se describe en el presente documento un dispositivo de administración (p. ej., jeringa, nebulizador, pulverizador, inhalador, parche dérmico, etc.) que contiene una composición farmacéutica de la invención. Este dispositivo puede usarse para administrar la composición a un sujeto vertebrado.

Los liposomas o LNP de la invención no comprenden ribosomas.

55 Métodos de tratamiento y usos médicos

El ARN formulado con liposomas o formulado con LNP y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son para su uso *in vivo* para inducir una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno de interés.

60 En el presente documento se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria en un vertebrado que comprende administrar una cantidad eficaz del ARN formulado con liposomas o formulado con LNP o la composición farmacéutica, como se describe en el presente documento. La respuesta inmunitaria es preferentemente protectora y preferentemente implica anticuerpos y/o inmunidad mediada por células. Las composiciones pueden usarse para fines tanto de sensibilización como de refuerzo. Como alternativa, un programa de inmunización de sensibilización-refuerzo 65 puede ser una mezcla de ARN y el inmunógeno polipeptídico correspondiente (p. ej., sensibilización con ARN, refuerzo con proteína).

La invención también proporciona un liposoma, LNP o composición farmacéutica para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un vertebrado.

- 5 En el presente documento, se describe el uso de un liposoma, LNP o composición farmacéutica en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un vertebrado.

10 Al inducir una respuesta inmunitaria en el vertebrado mediante estos usos y métodos, el vertebrado puede protegerse contra diversas enfermedades y/o infecciones, p. ej., contra enfermedades bacterianas y/o víricas como se ha analizado anteriormente. Los liposomas, las LNP y las composiciones son inmunogénicos y son más preferentemente composiciones de vacuna. Las vacunas según la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir infecciones) o terapéuticas (es decir, para tratar infecciones), pero normalmente serán profilácticas.

15 El vertebrado es preferentemente un mamífero, tal como un ser humano o un mamífero veterinario grande (p. ej., caballos, vacas, ciervos, cabras, cerdos). Como se usa en el presente documento, "mamífero grande" se refiere a mamíferos que tienen un peso de adulto normal o promedio de al menos 5 kg, preferentemente al menos 7 kg. Dichos mamíferos grandes pueden incluir, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, perros, cerdos, vacas, ciervos, cabras y se entiende que excluye mamíferos pequeños, tales como ratones, ratas, cobayas y otros roedores.

20 Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (p. ej., un niño pequeño o un bebé) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada a niños también puede administrarse a adultos. p. ej., para evaluar la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

25 Las vacunas preparadas según la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Por tanto, un paciente humano puede tener menos de 1 año de edad, menos de 5 años de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad o al menos 55 años de edad. Los pacientes preferidos para recibir las vacunas son los ancianos (p. ej., ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad y preferentemente ≥ 65 años de edad), los jóvenes (p. ej., ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores de la salud, personal de servicio armado y militar, mujeres embarazadas, los pacientes con enfermedades crónicas o inmunodeficientes. Sin embargo, las vacunas no son adecuadas únicamente para estos grupos y puede usarse de manera más general en una población. Las composiciones de la invención se administrarán en general directamente a un paciente. Se puede realizar administración directa mediante inyección parenteral (p. ej., por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intradérmica o en el espacio intersticial de un tejido; no se usa normalmente inyección intraglosal para fines de inmunización. Las vías de administración alternativas incluyen administración rectal, oral (p. ej., comprimido, pulverización), bucal, sublingual, vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, ótica, pulmonar u otra mucosa. Dos vías preferidas son administración intradérmica e intramuscular. La inyección puede ser a través de una aguja (p. ej., una aguja hipodérmica), pero también puede usarse como alternativa inyección sin aguja. Una dosis intramuscular habitual es de 0,5 ml.

40 La invención puede usarse para inducir inmunidad sistémica y/o mucosa, preferentemente para provocar una inmunidad sistémica y/o mucosa mejorada.

45 La dosificación puede ser por un programa de una única dosis o un programa de múltiples dosis. Pueden usarse múltiples dosis en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de múltiples dosis, las diversas dosis pueden proporcionarse por las mismas o diferentes vías, p. ej., una sensibilización parenteral y refuerzo de la mucosa, una sensibilización de la mucosa y refuerzo parenteral, etc. Normalmente, se administrarán múltiples dosis con al menos 1 semana de diferencia (p. ej., aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.). En una realización, se pueden administrar múltiples dosis aproximadamente 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas después del nacimiento, p. ej., a una edad de 6 semanas, 10 semanas y 14 semanas, como se usa con frecuencia en el Programa Ampliado de Inmunización de la Organización Mundial de la Salud ("EPI"). En una realización alternativa, se administran dos dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, p. ej., con aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguido de una o más dosis de refuerzo de aproximadamente 6 meses a 1 año después de la segunda dosis primaria, p. ej., aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la segunda dosis primaria. En una realización adicional, se administran tres dosis primarias con aproximadamente dos meses de diferencia, p. ej., con aproximadamente 7, 8 o 9 semanas de diferencia, seguido de una o más dosis de refuerzo de aproximadamente 6 meses a 1 año después de la tercera dosis primaria, p. ej., aproximadamente 6, 8, 10 o 12 meses después de la tercera dosis primaria.

* indica un ejemplo que no está de acuerdo con la invención.

Ejemplos

65 Lípidos catiónicos de Fórmula (I)

- Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención y no deben interpretarse como que son limitaciones a la misma. Las temperaturas se dan en grados centígrados. Si no se menciona de otro modo, todas las concentraciones evaporativas se realizan a presión reducida, preferiblemente entre aproximadamente 15 mm de Hg y 100 mm de Hg (=20-133 mbar). La estructura de los productos finales, intermedios y materiales de partida se confirma por métodos analíticos convencionales, por ejemplo, microanálisis o características espectroscópicas, por ejemplo, EM, IR o RMN. Las abreviaturas usadas son las convencionales en la técnica, algunas de las cuales se definen más adelante.
- La purificación por columna ultrarrápida se realiza preferiblemente sobre gel de sílice usando un eluyente adecuado de composición isocrática o en gradiente.
- El análisis de HPLC se realiza en una columna Waters Atlantis dC18 (4,6 x 150 mm, 3 mm), con elusión en gradiente (acetonitrilo del 0 % al 95 % en agua modificado con 0,1 % v/v de ácido trifluoroacético durante 20 min y un caudal de 1,4 ml/min), a menos que se describa lo contrario.
- Los espectros de RMN 1H se registraron en un espectrómetro Bruker Avance II 400 MHz. Todos los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (δ) con respecto a tetrametilsilano. Las siguientes abreviaturas se usan para indicar patrones de señal: s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuádruplete, m = multiplete, a = ancho. Los datos de EN-EM se registraron usando un espectrómetro de masas Waters LTC Premier con una fuente de ionización por electronebulización dual en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100. Se usó sulfadimetoxina [Sigma, m/z = 311,0814 (M + 1)] como una referencia adquirida a través del canal LockSpray™ cada tercer barrido. Se ha encontrado que la precisión de masas del sistema es < 5 ppm.

Abreviaturas:

AcOH	ácido acético
Ac	acuoso
Ar	arilo
Atm	atmósfera
BOC	Carbonato de <i>tert</i> -butilo
s. a., sa	singlete ancho
°C	Celsius
CD ₂ Cl ₂	diclorometano deuterado
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂ , DCM	diclorometano
CH ₃ CN, MeCN	acetonitrilo
d	doblete
dd	doblete de dobletes
ddd	doblete de dobletes de dobletes
DIPEA	<i>N</i> -etil-diisopropilamina
DME	1,4-dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMAP	dimetilaminopiridina
DMSO	dimetilsulfóxido
dt	doblete de tripletes
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
FCC	cromatografía en columna ultrarrápida
h	hora
HBTU	hexafluorofosfato de (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HCl	ácido clorhídrico
HMPA	hexametilfosforamida
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HT	alto rendimiento
IBX	Ácido 2-yodoxibenzoico
<i>i</i> -PrOH	alcohol isopropílico
H ₂ O	agua
K	kelvin
KOH	hidróxido potásico
CL	cromatografía líquida
M	molar

m	multiplete
MeOH	metanol
MgSO ₄	sulfato de magnesio
MHz	megahertzio
ml	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
min.	minuto
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
EM	espectroscopía de masas
mmoo	microondas
NaH	hidruro sódico
NaHMDS	sodio hexametildisilazano
NaOEt	etóxido sódico
NaOH	hidróxido sódico
Na ₂ SO ₄	sulfato sódico
NEt ₃	trietilamina
ng	nanogramo
NH ₃	amoníaco
RMN	resonancia magnética nuclear
quint.	quintuplete
Pd/C	paladio sobre carbono
Fr	factor de retraso
ta	temperatura ambiente
Tr	Tiempo de retención
s	singlete
ARNip	ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SM	Material de partida
t	triplete
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía de capa fina
UPLC	cromatografía líquida de ultra rendimiento
p	peso
mg	microgramo
ml	microlitro
PMA	ácido fosfomolibdico
MFR	matraz de fondo redondo
TBS	<i>terc</i> -butil sililo

Todos los compuestos se nombran usando AutoNom.

Especificidad de CL:

5

Método de CL 1: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 0,1/99,9 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico) / CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,4 min, después se mantuvo durante 0,6 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

10

Método de CL 2: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 0,1/99,9 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico) / CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 3,4 min, después se mantuvo durante 1,6 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

15

Método de CL 3: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Agilent 110 con una columna inertsil C8, 3,0 mm, 3,0 x 30 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 5/95 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,0 min, después se mantuvo durante 1,0 min (2,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 18 °C.

20

Método de CL 4: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 45/55 a 0/100 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico) / CH₃CN

ES 2 774 968 T3

(+0,1 % de ácido fórmico) durante 2,0 min, después se mantuvo durante 3,0 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

5 Método de CL 5: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 45/55 a 0/100 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico) / CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,0 min, después se mantuvo durante 1,0 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

10 Método de CL 6: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Agilent 110 con una columna inertsil C8, 3,0 mm, 3,0 x 30 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 5/95 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,0 min, después se mantuvo durante 1,0 min (2,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 18 °C.

15 Método de CL 7: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Agilent 110 con una columna inertsil C8, 3,0 mm, 3,0 x 30 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 5/95 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,0 min, después se mantuvo durante 1,0 min (2,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 18 °C.

20 Método de CL 8: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Agilent 110 con una columna inertsil C8, 3,0 mm, 3,0 x 30 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 5/95 de H₂O (+ formiato amónico 5 mM, MeCN al 2 %)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,0 min, después se mantuvo durante 1,0 min (2,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 18 °C.

25 Método de CL 9: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 2/98 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 3,4 min, después se mantuvo durante 1,7 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

30 Método de CL 10: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 45/55 a 1/99 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 0,7 min, después se mantuvo durante 1,3 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

35 Método de CL 11: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH C18, 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 1/99 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 3,4 min, después se mantuvo durante 1,7 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

40 Método de CL 12: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH C18, 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 45/55 a 1/99 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,4 min, después se aplicó un gradiente de 1/99 a 0/100 durante 3,7 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura de horno de 50 °C.

45 Método de CL 13: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Agilent 1100 con una columna XBridge C18, 3,5 mm, 2,1 x 50 mm. Se aplicó un gradiente de 95/5 a 5/95 de H₂O (+ 0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN durante 1,7 min, después se mantuvo durante 0,2 min (2,0 ml/min como flujo de disolvente), después cambió a 95/5 durante 0,1 min a una temperatura de horno de 40 °C.

50 Método de CL 14: Los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Waters Acquity SDS con una columna Acquity BEH 1,7 mm 2,1x50 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 0,1/99,9 de H₂O (+0,1 % de ácido fórmico)/CH₃CN (+0,1 % de ácido fórmico) durante 1,4 min, después se mantuvo durante 0,6 min (1,0 ml/min como flujo de disolvente) a una temperatura del horno de 50 °C.

55 Método de CL 15: los tiempos de retención (Tr) se obtuvieron en un sistema Agilent 1100 con una columna Atlantis C18, 3,5 mm, 3,0 x 30 mm. Se aplicó un gradiente de 60/40 a 2/98 de H₂O (+ 0,05 % de ácido trifluoroacético)/CH₃CN durante 1,7 min, después se mantuvo durante 0,3 min (2,0 ml/min como flujo de disolvente), después cambió a 60/40 durante 0,1 min a una temperatura de horno de 40 °C.

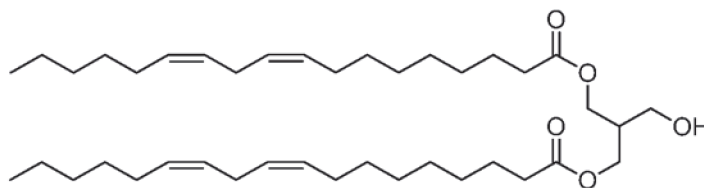
60 En la medida en que la producción de los materiales de partida no se describe particularmente, los compuestos son conocidos o pueden prepararse de manera análoga a métodos conocidos en la técnica o como se describe aquí más adelante.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención sin ninguna limitación.

Síntesis del Ejemplo 1

65

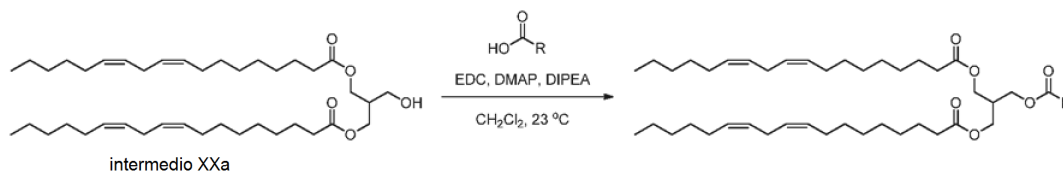
Preparación del intermedio 1a: Bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diólo



5 En un matraz de fondo redondo, se recogieron ácido linoleico (95,0 g, 339 mmol), DMAP (4,14 g, 33,90 mmol), DIPEA (74,1 ml, 424 mmol) y 2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (18,0 g, 170 mmol) en diclorometano (435 ml). Se añadió en una porción EDC (81,0 g, 424 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 24 h, la reacción se concentró a presión reducida con polvo de gel de sílice para carga en seco y el residuo se purificó sobre gel de sílice (Biotage) usando acetato de etilo/heptano (del 0 % al 40 %) como eluyente, para proporcionar 47 g del producto deseado en forma de un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,19-5,50 (m, 8H), 4,19 (tt, *J* = 11,83, 5,87 Hz, 4H), 3,51-3,69 (m, 2H), 2,78 (t, *J* = 6,53 Hz, 4H), 2,33 (t, *J* = 7,53 Hz, 4H), 2,20 (quint, *J* = 5,83 Hz, 2H), 2,06 (c, *J* = 6,78 Hz, 8H), 1,49-1,72 (m, 5H), 1,20-1,46 (m, 26H), 0,79-0,98 (m, 6H) ppm.

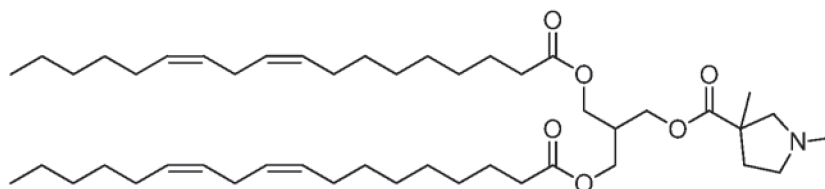
Preparación de compuestos finales

Esquema 1



15

Ejemplo 1: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-díilo



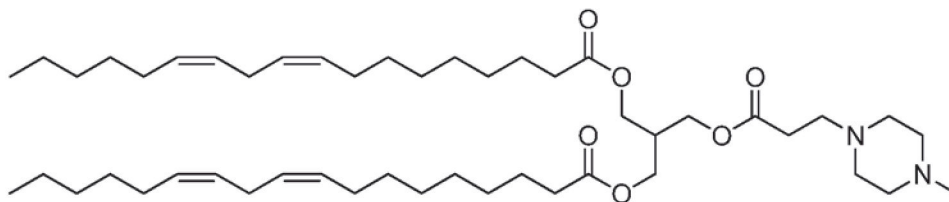
20

25 En un matraz de fondo redondo, se recogieron el Intermedio 1a (15,0 g, 23,77 mmol), DMAP (0,581 g, 4,75 mmol), DIPEA (8,30 ml, 47,5 mmol) y ácido 1,3-dimetilpirrolidin-3-carboxílico (5,11 g, 35,7 mmol) en diclorometano (78 ml). Se añadió en una porción EDC (9,11 mg, 47,5 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 24 h, la reacción se concentró a presión reducida con gel de sílice seco para carga en seco y el residuo se purificó sobre gel de sílice (Biotage) usando acetato de etilo/heptano (del 0 % al 80 %) como eluyente para proporcionar 15 g (rendimiento del 82 %) del producto deseado en forma de un aceite incoloro.

30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,26-5,47 (m, 8H), 4,08-4,21 (m, 6H), 2,97 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 2,78 (t, *J* = 6,53 Hz, 4H), 2,56-2,69 (m, 2H), 2,24-2,49 (m, 10H), 2,05 (c, *J* = 6,78 Hz, 8H), 1,54-1,76 (m, 5H), 1,22-1,42 (m, 31H), 0,89 (t, *J* = 6,78 Hz, 6H) ppm. MS (*M* + 1) = 756,7, *R*_t = 1,31 min (Método de CL 1).

Los siguientes ejemplos pueden prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 1.

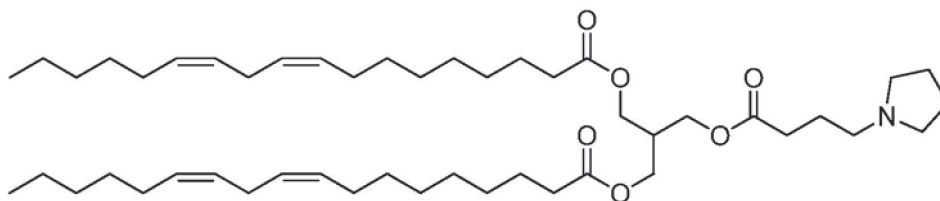
35 Ejemplo 2: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(4-metilpiperazin-1-il)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-díilo



5

^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2): δ = 5,42 (m, 8H), 4,12 (m, 6H), 2,82 (c, 4H), 2,68 (m, 2H), 2,60-2,22 (m, 13H), 2,25 (s, 3H), 2,05 (m, 8H), 1,62 (m, 6H), 1,40-1,22 (m, 28H), 0,92 (t, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 786,0, R_t = 2,65 min (Método de CL 2).

Ejemplo 3: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(pirrolidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-díilo

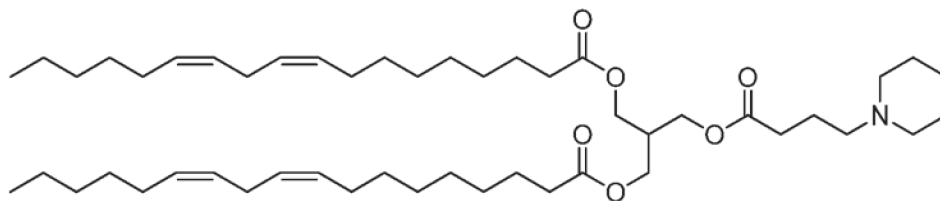


10

^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2): δ = 5,40 (m, 8H), 4,15 (d, 6H), 2,82 (c, 4H), 2,68-2,30 (m, 9H), 2,06 (m, 8H), 1,85 (m, 6H), 1,62 (m, 6H), 1,40-1,22 (m, 30H), 0,92 (t, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 771,0, R_t = 2,72 min (Método de CL 2).

Ejemplo 4: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(piperidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-díilo

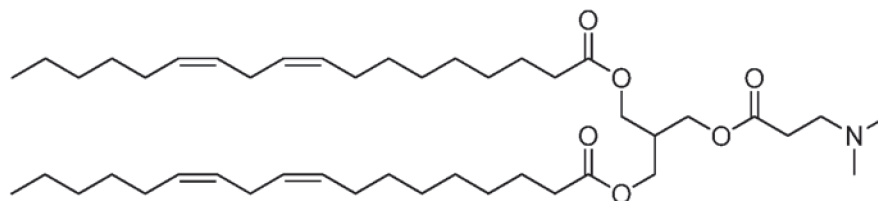
15



20

^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2): δ = 5,42 (m, 8H), 4,17 (d, 6H), 2,86 (c, 4H), 2,48-2,22 (m, 13H), 2,02 (m, 8H), 1,82-1,42 (m, 10H), 1,35 (m, 30H), 0,90 (t, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 786,0, R_t = 2,75 min (Método de CL 2).

* Ejemplo 5: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-díilo

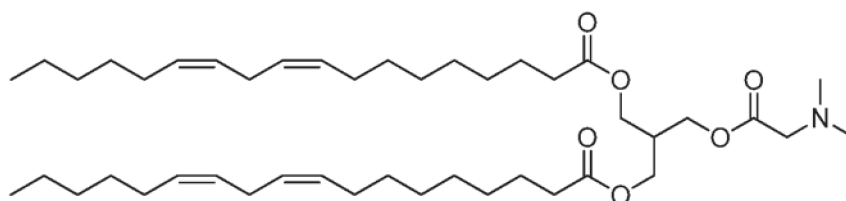


25

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,45-5,25 (m, 8H), 4,20-4,10 (m, 6H), 2,78 (t, $J = 8,0$ Hz, 4H), 2,60 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,49 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,44-2,38 (m, 1H), 2,31 (t, $J = 8,0$ Hz, 4H), 2,24 (s, 6H), 2,11-1,97 (m, 8H), 1,69-1,58 (m, 6H), 1,40-1,24 (m, 26H), 0,91-0,87 (m, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 731,5, R_t = 1,22 min (Método de CL 3).

30

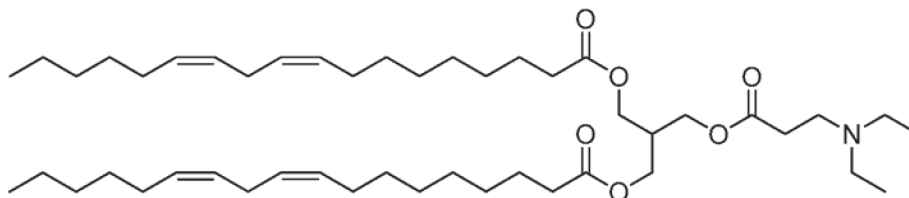
* Ejemplo 6: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((2-(dimetilamino)acetoxi)metil)propano-1,3-díilo



ES 2 774 968 T3

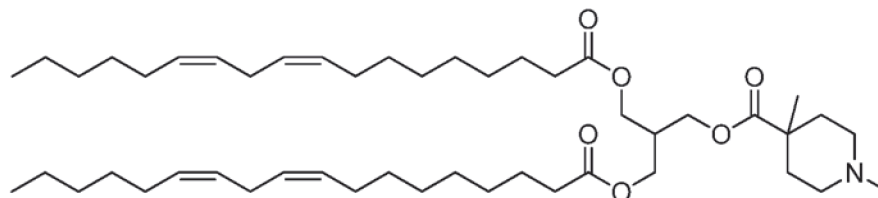
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,44-5,29 (m, 8H), 4,20 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 4,14 (d, *J* = 4,0 Hz, 4H), 3,19 (s, 2H), 2,77 (t, *J* = 8,0 Hz, 4H), 2,45-2,39 (m, 1H), 2,36 (s, 6H), 2,31 (t, *J* = 8,0 Hz, 4H), 2,11-1,99 (m, 8H), 1,68-1,56 (m, 6H), 1,40-1,24 (m, 26H), 0,91-0,87 (m, 6H) ppm. MS (*M* + 1) = 717,4, Rt = 1,95 min (Método de CL 3).

5 * Ejemplo 7: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9*Z*,9'*Z*,12*Z*,12'*Z*)-2-(((3-(dietilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



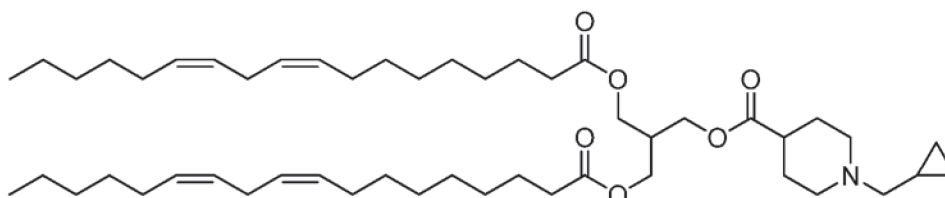
10 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,43-5,30 (m, 8H), 4,18-4,10 (m, 6H), 2,81-2,76 (m, 6H), 2,55-2,37 (m, 7H), 2,31 (t, *J* = 8,0 Hz, 4H), 2,11-1,97 (m, 8H), 1,69-1,58 (m, 6H), 1,40-1,24 (m, 28H), 1,02 (t, *J* = 8,0 Hz, 4H), 0,91-0,87 (m, 6H) ppm. MS (*M* + 1) = 759,6, Rt = 1,35 min (Método de CL 3).

15 Ejemplo 8: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9*Z*,9'*Z*,12*Z*,12'*Z*)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



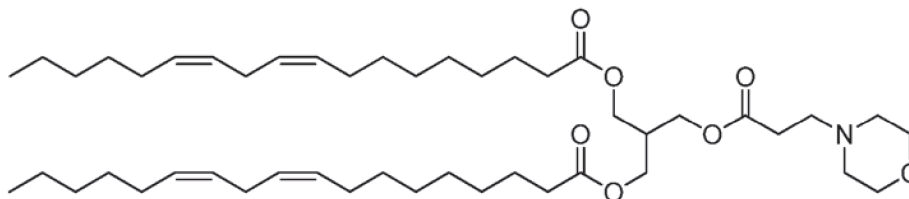
20 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,28-5,45 (m, 8H), 4,10-4,19 (m, 6H), 2,77 (t, *J* = 6,53 Hz, 4H), 2,62 (s a., 2H), 2,42 (dt, *J* = 12,05, 6,02 Hz, 1H), 2,23-2,36 (m, 8H), 1,99-2,17 (m, 12H), 1,47-1,68 (m, 6H), 1,25-1,42 (m, 27H), 1,20 (s, 3H), 0,89 (t, *J* = 6,78 Hz, 6H) ppm. MS (*M* + 1) = 770,6, Rt = 1,55 min (Método de CL 7).

25 Ejemplo 9: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9*Z*,9'*Z*,12*Z*,12'*Z*)-2-(((1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,27-5,46 (m, 8H), 4,08-4,19 (m, 6H), 3,03 (d, *J* = 11,04 Hz, 2H), 2,77 (t, *J* = 6,53 Hz, 4H), 2,40 (dt, *J* = 12,05, 6,02 Hz, 1H), 2,31 (t, *J* = 7,65 Hz, 5H), 2,25 (d, *J* = 6,27 Hz, 2H), 2,05 (c, *J* = 6,61 Hz, 10H), 1,93 (d, *J* = 11,54 Hz, 2H), 1,74-1,86 (m, 2H), 1,61 (t, *J* = 6,90 Hz, 5H), 1,23-1,42 (m, 27H), 0,89 (m, *J* = 6,90 Hz, 7H), 0,48-0,57 (m, 2H), 0,10 (c, *J* = 4,94 Hz, 2H) ppm. MS (*M* + 1) = 796,7, Rt = 1,62 min (Método de CL 7).

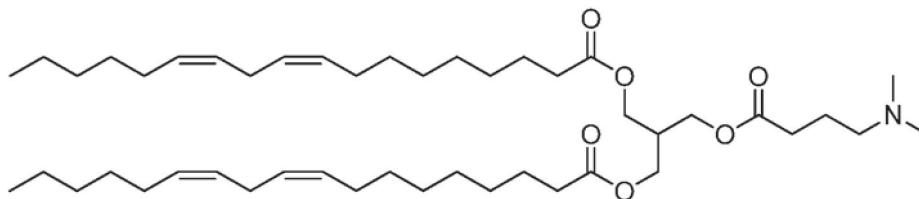
* Ejemplo 10: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9*Z*,9'*Z*,12*Z*,12'*Z*)-2-(((3-morfolinopropanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



35 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,40 (m, 8H), 4,18 (m, 8H), 3,62 (s a., 4H), 2,78 (t, 3H), 2,68 (m, 2H), 2,60-2,32 (m, 6H), 2,28 (m, 4H), 2,05 (m, 7H), 1,68-1,52 (m, 3H), 1,38-1,18 (m, 30H), 0,90 (t, 6H) ppm. MS (*M* + 1) = 773,0, Rt = 2,89 min (Método de CL 2).

40 * Ejemplo 11: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9*Z*,9'*Z*,12*Z*,12'*Z*)-2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo

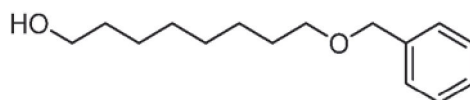
diílo



5 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,40 (m, 8H), 4,16 (m, 6H), 2,82 (m, 3H), 2,48-2,20 (m, 13H), 2,01 (m, 7H), 1,82 (m, 3H), 1,68 (m, 5H), 1,42-1,22 (m, 30H), 0,91 (t, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 745,0, R_t = 2,61 min (Método de CL 2).

* Preparación del Ejemplo 12:

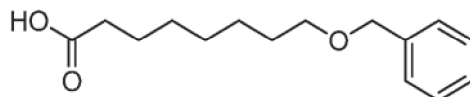
10 Intermedio 12a: 8-(benciloxi)octan-1-ol



15 En un matraz de fondo redondo, se disolvió 1,8-octanodiol (10 g, 68,4 mmol) en DMF anhidra (300 ml) y THF anhidro (100 ml). La solución se enfrió en un baño de hielo-agua y se añadió en porciones NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral) (2,462 g, 61,5 mmol). Después, se añadió bromuro de bencilo (12,87 g, 75 mmol). La reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de 6 h, la reacción se diluyó con 150 ml de H_2O y después se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 , se secó sobre MgSO_4 y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó sobre gel de sílice usando acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 5,9 g del producto esperado.

20 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,42 - 7,19 (m, 5H), 4,51 (s, 2H), 3,70 - 3,57 (m, 2H), 3,47 (t, $J=6,7$ Hz, 2H), 1,73 - 1,43 (m, 4H), 1,43-1,30 (m, 8H).

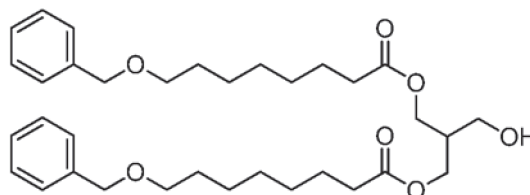
25 Intermedio 12b: ácido 8-(benciloxi)octanoico



30 En un matraz de fondo redondo, El Intermedio 12a (5,9 g, 24,96 mmol) se disolvió en acetona (200 ml) y se enfrió en un baño de hielo-agua. Se añadió gota a gota reactivo de Jones (2 M, 14,98 ml, 30,0 mmol). La reacción se agitó durante 1 h y después se añadieron 20 ml de MeOH. La reacción se agitó durante 30 min. La reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El concentrado se diluyó con EtOAc y se lavó dos veces con NaHCO_3 acuoso saturado. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar 5,2 g del producto esperado, que se usó sin purificación adicional.

35 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 7,44 - 7,20 (m, 5H), 4,51 (s, 2H), 3,58 - 3,36 (m, 2H), 2,47 - 2,26 (m, 2H), 1,77 - 1,54 (m, 4H), 1,48-1,28 (m, 6H).

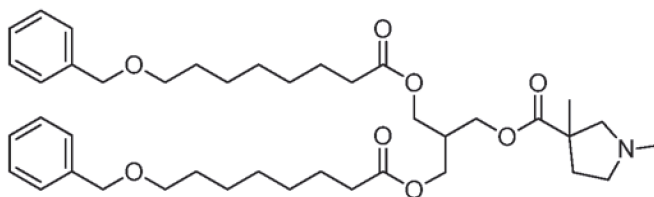
Intermedio 12c: bis(8-(benciloxi)octanoato) de 2-(hidroximetil)propano-1,3-diílo



40 En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (500 mg, 4,71 mmol), DTSP (N,N-dimetilpiridin-4-amina, sal 4-metilbencenosulfonato) (1382 mg, 4,71 mmol) y el Intermedio 12b (2595 mg, 10,37 mmol) en DCM anhidro (25 ml). Se añadieron DIPEA (3,29 ml, 18,85 mmol) y EDC (2077 mg, 10,84 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 72 h. La mezcla de reacción se puso sobre gel de sílice usando un eluyente de acetato de etilo/heptano para proporcionar 790 mg del producto esperado.

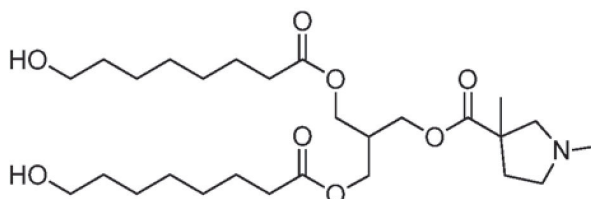
45 EM ($M + \text{NH}_4^+$) = 588,5, T_r = 1,52 min (método de LC 8).

Intermedio 12d: bis(8-(benciloxi)octanoato) de 2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



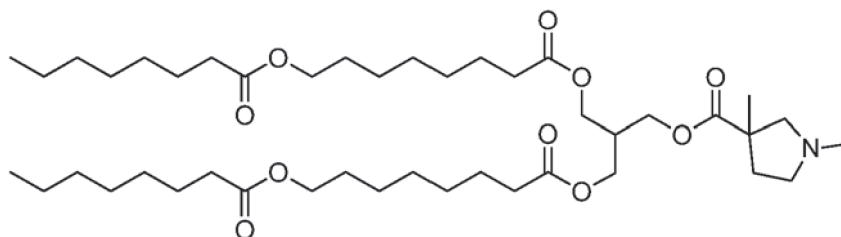
5 En un vial de seguridad de microondas de alta presión, se disolvieron el Intermedio 12c (790 mg, 1,38 mmol), DTSPS (406 mg, 1,38 mmol), ácido 1,3-dimetilpirrolidin-3-carboxílico (218 mg, 1,52 mmol) y EDC (318 mg, 1,66 mmol) en 10 ml de DCM. Se añadió DIPEA (0,967 ml, 5,54 mmol) y el vial se cerró herméticamente. La mezcla de reacción se calentó con irradiación de microondas a 80 °C durante 40 min. Se añadieron 200 mg más de ácido 1,3-dimetilpirrolidin-3-carboxílico y 300 mg de EDC, y la reacción se calentó con irradiación de microondas a 80 °C durante 40 min más.
10 560 mg del producto esperado.
EM (M + 1) = 696,5, Tr = 1,15 min (método de LC 8).

Intermedio 12e: bis(8-hidroxiocetanoato) de 2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonyl)oxi)metil)propano-1,3-diílo



15 En un matraz de fondo redondo, el Intermedio 12d (460 mg, 0,759 mmol) se disolvió en THF anhidro (10 ml). Se añadieron AcOH (0,022 ml, 0,380 mmol) y Pd al 10 %/C (húmedo, tipo Degussa) (170 mg, 0,152 mmol). El matraz se evacuó y se purgó con gas de nitrógeno, después se administró un globo de hidrógeno a 1 atm y la reacción se calentó con agitación a 40 °C. Después de 24 h, se añadieron 10 gotas de AcOH y otro equivalente de Pd al 10 %/C. La reacción se evacuó y se purgó con gas de nitrógeno y se administró un globo de hidrógeno (1 atm). La reacción se calentó a 45 °C. Después de 5 h, la reacción se filtró sobre celite con MeOH y los disolventes se retiraron a presión reducida para proporcionar 450 mg del producto esperado.
20 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,26-4,05 (m, 6H), 3,64 (t, J = 6,5 Hz, 4H), 3,41-3,23 (m, 2H), 3,12 (d, J = 11,0 Hz, 1H), 2,96-2,76 (m, 1H), 2,71-2,56 (m, 3H), 2,55-2,39 (m, 2H), 2,32 (t, J = 7,4 Hz, 4H), 1,96 (ddd, J = 7,8, 9,2, 13,4 Hz, 1H), 1,70-1,50 (m, 8H), 1,43 (s, 3H), 1,41-1,30 (m, 12H) ppm.
25

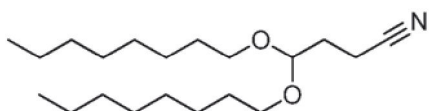
* Ejemplo 12: bis(8-(octanoiloxi)octanoato) de 2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonyl)oxi)metil)propano-1,3-diílo



30 En un matraz de fondo redondo, el Intermedio 12e (450 mg, 0,873 mmol) y TEA (6,93 ml, 49,7 mmol) se disolvieron en DCM anhidro (15 ml) y se enfriaron en un baño de hielo-agua. Se añadió cloruro de octanoílo (0,374 ml, 2,182 mmol). Después de 1 h, la mezcla de reacción se purificó sobre gel de sílice usando diclorometano/ metanol como eluyente para proporcionar un producto impuro. El producto se purificó adicionalmente por HPLC FI utilizando agua/acetonitrilo/iPrOH (modificador de 0,1 % de TFA) como eluyente para proporcionar el producto en forma de la sal TFA. El material se desaló a través de una columna de BE-NH₂ para proporcionar 120 mg del producto esperado.
35 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,21-4,10 (m, 6H), 4,05 (t, J = 6,7 Hz, 4H), 2,94 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 2,59 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 2,50-2,22 (m, 14H), 1,78-1,52 (m, 13H), 1,49-1,21 (m, 31H), 0,96-0,77 (m, 6H) ppm. MS (M + 1) = 769,7, Rt = 1,28 min (Método de CL 4).
40

Preparación del Ejemplo 13:

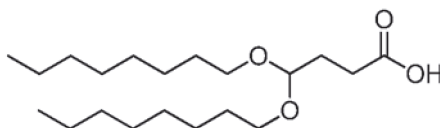
45 Intermedio 13a: 4,4-bis(octiloxi)butanonitrilo



A una mezcla de 4,4-dietoxibutanonitrilo (15 g, 95 mmol) y octanol (37,3 g, 286 mmol) se añadió p-toluenosulfonato de piridinio (1,2 g, 4,77 mmol) y la mezcla se calentó a 105 °C. Después de 72 h, la mezcla de reacción se enfrió y se purificó sobre gel de sílice usando acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 9,34 g del producto esperado.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,56 (t, *J* = 5,40 Hz, 1H), 3,61 (dt, *J* = 9,16, 6,59 Hz, 2H), 3,44 (dt, *J* = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 2,43 (t, *J* = 7,28 Hz, 2H), 1,95(td, *J* = 7,34, 5,40 Hz, 2H), 1,50-1,66(m, 4H), 1,17-1,44 (m, 20H), 0,80-0,95(m, 6H) ppm.

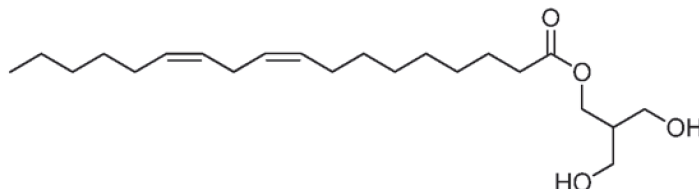
Intermedio 13b: ácido 4,4-bis(octiloxi)butanoico



En un recipiente de reacción de alta presión, el Intermedio 13a (9,34 g, 28,7 mmol) se disolvió en 30 ml de EtOH. Se disolvió KOH (4,83 g) en 30 ml de agua y la solución de KOH se añadió a la solución de EtOH. El tubo se cerró herméticamente y se calentó a 110 °C durante una noche. La mezcla se enfrió y se diluyó con EtOAc. Se añadió HCl 1 N para ajustar el pH a 5, y la fase acuosa se extrajo dos veces con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar 10,9 g del producto esperado.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,46 (t, *J* = 5,52 Hz, 1H), 3,46-3,59 (m, 2H), 3,08-3,46 (m, 3H), 2,18 (t, *J* = 7,28 Hz, 2H), 1,72-1,89 (m, 2H), 1,46-1,63 (m, 4H), 1,28 (d, *J* = 3,76 Hz, 20H), 0,79-0,96 (m, 6H) ppm.

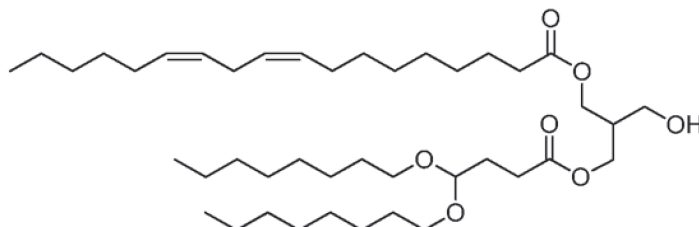
Intermedio 13c: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propilo



En un matraz de fondo redondo, se recogieron ácido linoleico (23,78 g, 85 mmol), DMAP (2,072 g, 16,96 mmol), DIPEA (22,22 ml, 127 mmol) y 2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (9 g, 85 mmol) en diclorometano (200 ml). Se añadió en una porción EDC (24,39 g, 127 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 24 h, la reacción se concentró a presión reducida y el concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 12,4 g del producto esperado. También se aislaron 9,5 g del Intermedio 1a.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,27 (d, *J* = 6,27 Hz, 2H), 3,77 (qd, *J* = 11,25, 5,14 Hz, 4H), 2,78 (t, *J* = 6,40 Hz, 2H), 2,23-2,48 (m, 4H), 1,90-2,15 (m, 6H), 1,53-1,76 (m, 3H), 1,15-1,45 (m, 14H), 0,77-0,98 (m, 3H) ppm.

Intermedio 13d: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo



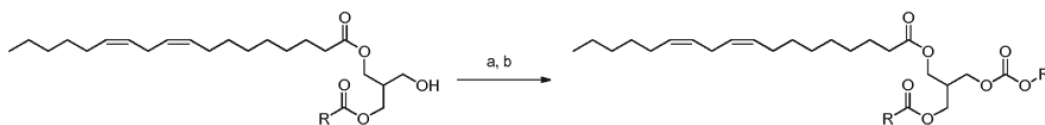
En un matraz de fondo redondo, el Intermedio 13b (10,9 g, 31,6 mmol), DMAP (773 mg, 6,33 mmol), DIPEA(11,05 ml, 63,3 mmol) y el Intermedio 13c (13,99 g, 38 mmol) se recogieron en diclorometano (100 ml). Se añadió en una porción EDC (12,13 g, 63,3 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 24 h, la reacción se concentró a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con EtOAc al 0-20 %/heptano como eluyente para proporcionar 11,2 g del producto esperado.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,27-5,45 (m, 4H), 4,50 (t, *J* = 5,52 Hz, 1H), 4,08-4,25 (m, 4H), 3,50-3,69 (m, 4H), 3,41 (dt, *J* = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 2,78 (t, *J* = 6,53 Hz, 2H), 2,42 (t, *J* = 7,53 Hz, 2H), 2,33 (t, *J* = 7,53 Hz, 2H), 2,13-2,29 (m,

2H), 2,00-2,13 (m, 4H), 1,88-2,00 (m, 2H), 1,49-1,69 (m, 7H), 1,20-1,44 (m, 32H), 0,83-0,95 (m, 9H) ppm.

Preparación de compuestos finales

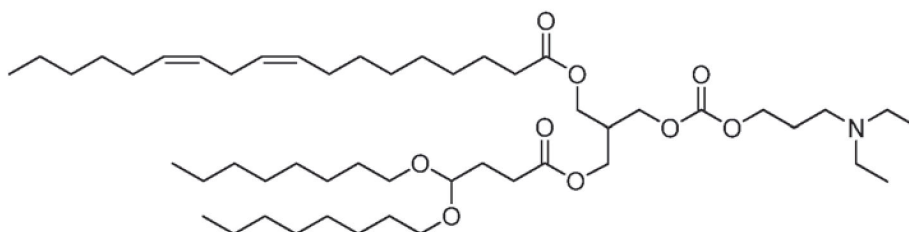
Esquema 2



a) cloroformiato de 4-nitrofenilo, piridina, DMAP, CH₂Cl₂, 23 °C, b) ROH, 23 °C

5

Ejemplo 13: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo



10

En un matraz de fondo redondo, se disolvió cloroformiato de 4-nitrofenilo (6,5 g, 32,2 mmol) en DCM (100 ml). Se añadieron piridina (2,61 ml, 32,2 mmol) y DMAP (591 mg, 4,83 mmol), seguido del Intermedio 13d (11,2 g, 16,11 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió 3-dietilamino-1-propanol (12,69 g, 97 mmol) y la reacción se continuó durante una noche. La reacción se concentró a presión reducida y el concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 12,15 g del compuesto esperado.

15

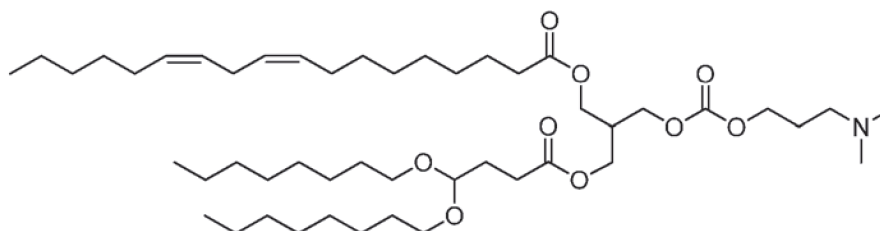
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,16-5,51 (m, 4H), 4,49 (t, *J* = 5,52 Hz, 1H), 3,99-4,33 (m, 8H), 3,56 (dt, *J* = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 3,40 (dt, *J* = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 2,77 (t, *J* = 6,65 Hz, 2H), 2,53 (c, *J* = 6,94 Hz, 6H), 2,36-2,47 (m, 3H), 2,31 (t, *J* = 7,53 Hz, 2H), 2,05 (c, *J* = 6,61 Hz, 4H), 1,88-1,99 (m, 2H), 1,76-1,88 (m, 2H), 1,51-1,66 (m, 6H), 1,20-1,41 (m, 34H), 1,02 (t, *J* = 7,15 Hz, 6H), 0,83-0,95 (m, 9H) ppm. MS (*M* + 1) = 852,8, *R*_t = 2,64 min (Método de CL 4).

20

Los siguientes ejemplos pueden prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13:

25

Ejemplo 14: octadeca-9,12-dienoato de (9Z, 12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo

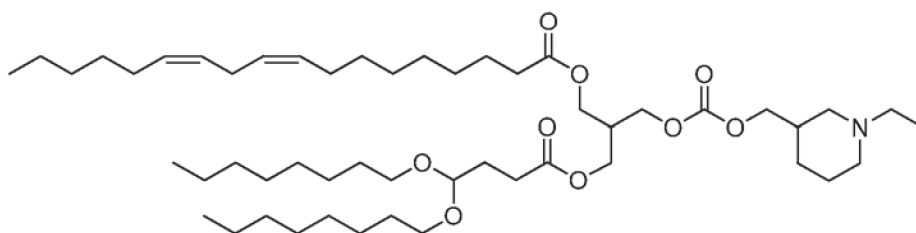


30

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,29-5,45 (m, 4H), 4,50 (t, *J* = 5,65 Hz, 1H), 4,19-4,25 (m, 4H), 4,16 (dd, *J* = 5,90, 1,38 Hz, 4H), 3,58 (dt, *J* = 9,29, 6,78 Hz, 2H), 3,42 (dt, *J* = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 2,79 (t, *J* = 6,53 Hz, 2H), 2,35-2,49 (m, 5H), 2,33 (t, *J* = 7,65 Hz, 2H), 2,26 (s, 6H), 2,07 (c, *J* = 6,78 Hz, 4H), 1,91-1,99 (m, 2H), 1,87 (quint., *J* = 6,96 Hz, 2H), 1,52-1,68 (m, 6H), 1,22-1,43 (m, 34H), 0,85-0,96 (m, 9H) ppm. MS (*M* + 1) = 824,8, *R*_t = 1,32 min (Método de CL 3).

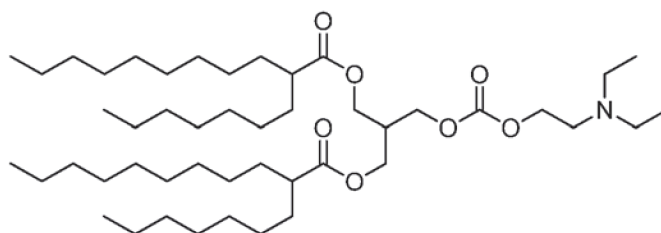
35

Ejemplo 15: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo



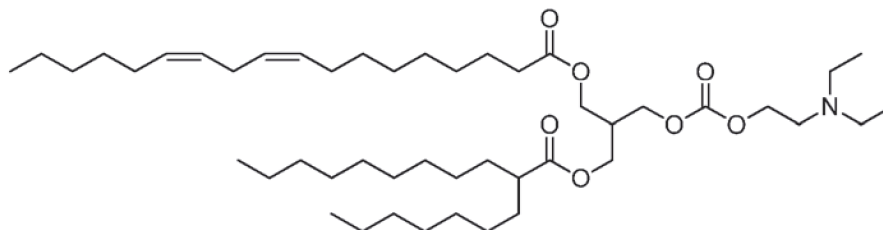
5 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,25-5,46$ (m, 4H), 4,49 (t, $J = 5,52$ Hz, 1H), 4,17 (dd, $J = 19,32, 5,77$ Hz, 6H), 4,02-4,09 (m, 1H), 3,91-4,00 (m, 1H), 3,57 (dt, $J = 9,22, 6,68$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,22, 6,68$ Hz, 2H), 2,82-2,99 (m, 2H), 2,77 (t, $J = 6,40$ Hz, 2H), 2,36-2,48 (m, 5H), 2,31 (t, $J = 7,53$ Hz, 2H), 2,05 (c, $J = 6,78$ Hz, 5H), 1,84-1,97 (m, 3H), 1,50-1,81 (m, 12 H), 1,21-1,41 (m, 31H), 0,94-1,14 (m, 5H), 0,80-0,94 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 865,1, $R_t = 2,64$ min (Método de CL 4).

10 Ejemplo 16: bis(2-heptilundecanoato) de 2-(((2-(diethylamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo

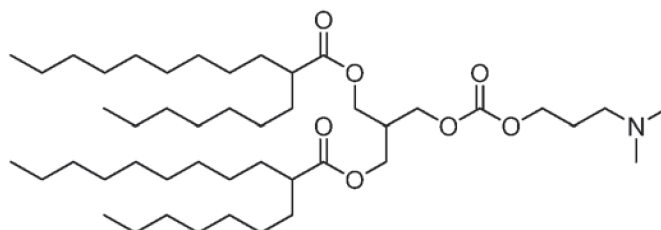


15 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 4,24-4,11$ (m, 8H), 2,73 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,58 (c, $J = 7,0$ Hz, 4H), 2,49-2,39 (m, 1H), 2,39-2,27 (m, 2H), 1,67-1,51 (m, 5H), 1,51-1,37 (m, 5H), 1,36-1,16 (m, 46H), 1,03 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H), 0,93-0,84 (m, 12H) ppm. ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 176,18$ (2C), 155,0, 66,26, 65,11, 61,13 (2C), 50,96, 47,63 (2C), 45,65 (2C), 37,54, 32,32 (2C), 31,88 (2C), 31,81 (2C), 27,44 (4C), 29,57 (2C), 29,56 (2C), 29,50 (2C), 29,46 (2C), 29,30 (2C), 29,12 (2C), 27,44 (2C), 22,67 (2C), 22,63 (2C), 14,12 (2C), 14,09 (2C), 11,82 (2C) ppm.

20 Ejemplo 17: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(diethylamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo

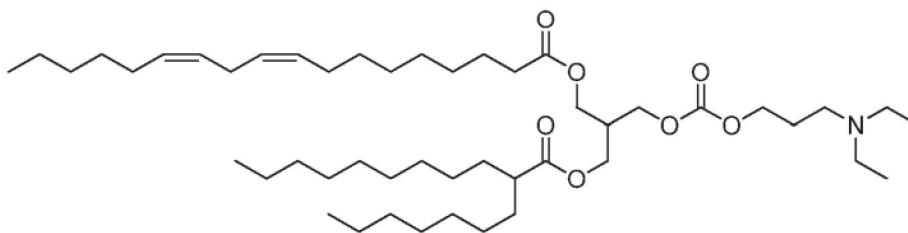


25 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,45-5,28$ (m, 4H), 4,25-4,10 (m, 8H), 2,78 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,73 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,58 (c, $J = 7,3$ Hz, 4H), 2,48-2,39 (m, 1H), 2,38-2,27 (m, 3H), 2,05 (c, $J = 6,7$ Hz, 4H), 1,68-1,52 (m, 6H), 1,50-1,18 (m, 38H), 1,03 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H), 0,93-0,84 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 779,8, $R_t = 1,73$ min (Método de CL 5). Ejemplo 18: bis(2-heptilundecanoato) de 2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo



30 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,23-4,11$ (m, 8H), 2,48-2,28 (m, 5H), 2,23 (s, 6H), 1,90-1,78 (m, 2H), 1,66-1,51 (m, 4H), 1,51-1,37 (m, 4H), 1,36-1,16 (m, 48H), 0,92-0,83 (m, 12H) ppm. MS ($M + 1$) = 769,7, $R_t = 1,82$ min (Método de CL 5).

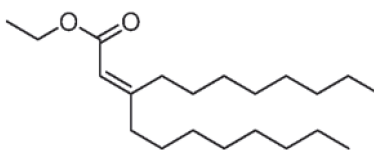
35 Ejemplo 19: octadeca-9,12-dienoato de (9Z, 12Z)-3-(((3-(diethylamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo



^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,46-5,27 (m, 4H), 4,25-4,10 (m, 8H), 2,78 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,51 (c, J = 7,1 Hz, 6H), 2,47-2,39 (m, 1H), 2,38-2,28 (m, 3H), 2,05 (c, J = 6,8 Hz, 4H), 1,87-1,76 (m, 2H), 1,72-1,51 (m, 5H), 1,51-1,17 (m, 39H), 1,05-0,98 (m, 6H), 0,93-0,84 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 793,7, R_t = 1,25 min (Método de CL 6).

Síntesis del Ejemplo 20:

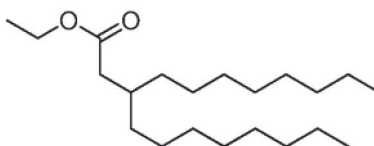
Intermedio 20a: 3-octilundec-2-enoato de etilo



Una solución de 9-heptadecanona (15 g, 59 mmol) y fosfonoacetato de trietilo (13,2 g, 59 mmol) se agitó en THF (100 ml). A esta reacción se añadió NaOEt (26,4 ml, 21 % en EtOH, 70,7 mmol) y la solución resultante se calentó a reflujo durante 48 h. La reacción se acidificó con HCl 1 M y después se diluyó con EtOAc. La capa orgánica se recogió y se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado. El material orgánico resultante se secó sobre sulfato sódico y los materiales volátiles se retiraron a presión reducida para producir un material en bruto, que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando heptanos/EtOAc como eluyente, proporcionando 11,7 g del producto deseado.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,62 (s, 1H), 4,01-4,26 (m, 2H), 2,49-2,68 (m, 2H), 2,13 (m, 2H), 1,44 (dd, J = 7,33, 4,80 Hz, 4H), 1,17-1,35 (m, 23H), 0,83-0,98 (m, 6H) ppm.

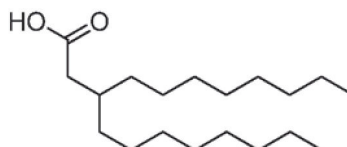
Intermedio 20b: 3-octilundecanoato de etilo



El Intermedio 20a (11,75 g, 36,2 mmol) en DCM (16,5 ml) y MeOH (165 ml). Se añadió Pd/C (3,85 g, Pd al 10 %/C) y el matraz de reacción se equipó con un globo cargado con hidrógeno. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se desgasificó con nitrógeno y se filtró a través de celite con un lavado de DCM y MeOH. El filtrado se recogió y los volátiles se retiraron a presión reducida para proporcionar 10,6 g del producto deseado.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ = (c, J = 7,16 Hz, 2H), 2,39 (t, J = 7,45 Hz, 2H), 2,22 (d, J = 6,82 Hz, 2H), 1,84 (s a., 1H), 1,56 (t, J = 7,20 Hz, 2H), 1,19-1,36 (m, 27H), 0,81-0,95 (m, 6H) ppm.

Intermedio 20c: ácido 3-octilundecanoico

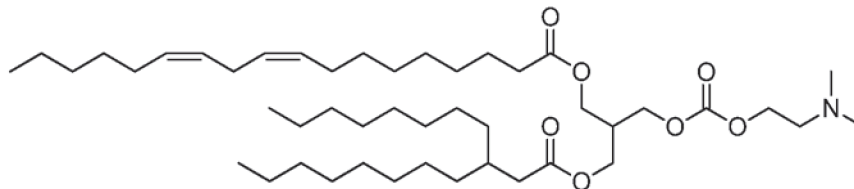


El Intermedio 20b (10,6 g, 32,5 mmol) se agitó con NaOH (9,74 ml, 10 M, 97,4 mmol) en MeOH (100 ml) y DCM (10 ml). La reacción se calentó a reflujo durante una noche. Se añadió HCl acuoso para neutralizar la solución, los volátiles se retiraron a presión reducida y el material resultante se recogió de nuevo en DCM. Los extractos orgánicos se lavaron con bicarbonato sódico acuoso saturado y la capa acuosa resultante se extrajo con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El material se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando heptanos/EtOAc como eluyente. El material resultante se recogió en DCM y se cargó en una columna funcionalizada con NH_2 . La columna se lavó con DCM y después DCM/MeOH. El producto se eluyó con metanol ácido y el eluyente se concentró a presión reducida. El residuo se recogió en DCM y se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 6,5 g del producto deseado.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,28 (d, J = 7,07 Hz, 2 H) 1,86 (s a, 1 H) 1,15 -1,44 (m, 28 H) 0,82 - 0,97 (m, 6 H) ppm.

Ejemplo 20: octadeca-9,12-dienoato de (9Z, 12Z)-3-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo

5



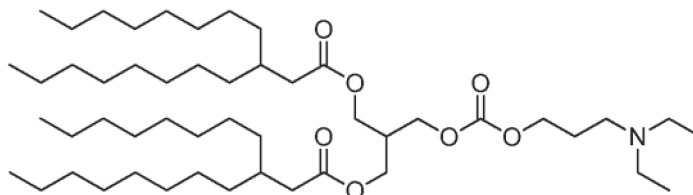
El Ejemplo 20 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13.

10 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,45-5,25 (m, 4H), 4,26-4,17 (m, 4H), 4,13 (dd, J = 1,9, 5,9 Hz, 4H), 2,81-2,72 (m, 2H), 2,58 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 2,46-2,35 (m, 1H), 2,34-2,18 (m, 10H), 2,10-1,97 (m, 4H), 1,89-1,74 (m, 1H), 1,69-1,47 (m, 4H), 1,45-0,98 (m, 40H), 0,91-0,82 (m, 9H) ppm. MS (M + 1) = 765,5, Rt = 1,27 min (Método de CL 6).

Los siguientes ejemplos pueden prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 20 y el Ejemplo 13:

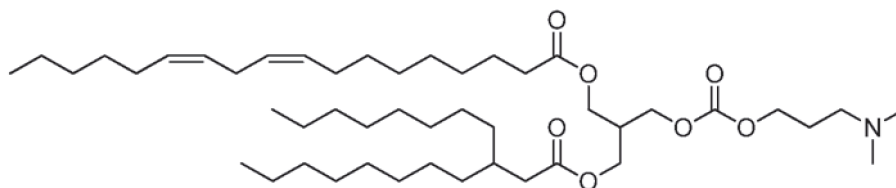
15

Ejemplo 21: bis(3-octilundecanoato) de 2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo



20 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,25-4,11 (m, 6H), 4,07 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 3,65 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 3,70-3,60 (m, 1H), 2,52 (c, J = 7,0 Hz, 4H), 2,47-2,37 (m, 1H), 2,34-2,20 (m, 4H), 1,88-1,75 (m, 2H), 1,73-1,52 (m, 4H), 1,42-1,17 (m, 59H), 1,01 (t, J = 7,0 Hz, 4H), 0,95 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 8H) ppm. MS (M + 1) = 825,7, Rt = 1,33 min (Método de CL 6).

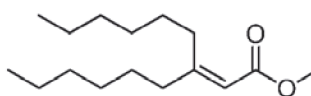
25 Ejemplo 22: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo



30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,45-5,27 (m, 4H), 4,24-4,10 (m, 8H), 2,78 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,51 (c, J = 7,1 Hz, 6H), 2,47-2,37 (m, 1H), 2,31 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 2,25 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 2,05 (c, J = 6,8 Hz, 4H), 1,89-1,75 (m, 3H), 1,72-1,53 (m, 3H), 1,42-1,17 (m, 41H), 1,01 (t, J = 7,2 Hz, 6H), 0,95-0,83 (m, 9H) ppm. MS (M + 1) = 807,4, Rt = 1,29 min (Método de CL 3).

35 Síntesis del Ejemplo 23:

Intermedio 23a: 3-hexilnon-2-enoato de metilo



40

A una suspensión de hidruro sódico (60 % en aceite de parafina, 14,16 g, 335 mmol) en THF (500 ml), enfriada en un baño de agua y hielo, se añadió lentamente fosfonoacetato de trimetilo (50,74 g, 278,8 mmol). Después de 2 h, se añadió lentamente tridecan-7-ona (6,5 g, 32,8 mmol) y la reacción se calentó a temperatura ambiente. Después de 1 h, la reacción se calentó a reflujo. Después de 4 días, la reacción se enfrió y se añadió HCl 1 N (ac.) para interrumpir la reacción. La reacción se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice,

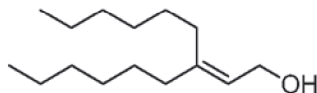
45

ES 2 774 968 T3

usando acetato de etilo/hexanos como eluyente para proporcionar 8,0 g del producto deseado. TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 10 % en hexanos): $F_r = 0,72$.

Intermedio 23b: 3-hexilnon-2-en-1-ol

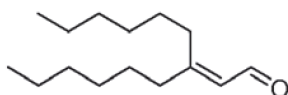
5



10 A una solución del Intermedio 23a (8,1 g, 31,9 mmol) en THF (100 ml), enfiada en un baño de hielo-agua, se añadió hidruro de diisobutilaluminio (25 % en tolueno, 54,4 ml, 95,6 mmol). Después de 30 min, la reacción se llevó a temperatura ambiente. Después de 6 h, la reacción se enfió en un baño de hielo-agua y se interrumpió con agua enfiada con hielo (50 ml) y HCl 1 N (ac., 15 ml). La reacción se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 x 60 ml) y salmuera (60 ml). El extracto orgánico se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida. El concentrado se purificó en gel de sílice, usando acetato de etilo/hexanos como eluyente para proporcionar 6,8 g del producto deseado. TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 20 % en hexanos): $F_r = 0,29$.

Intermedio 23c: 3-hexilnon-2-enal

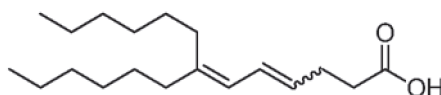
20



25 A una suspensión agitada de IBX (21,0 g, 75,12 mmol) en DMSO (30 ml), calentada a 30 °C, se añadió el Intermedio 23b en THF (100 ml). La reacción se mantuvo a 25-30 °C durante 2 h. La reacción se diluyó con éter dietílico y se filtró a través de celite con lavados de éter dietílico. El filtrado se lavó con agua (2 x 200 ml) y salmuera (200 ml). El extracto orgánico se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 6,0 g del producto deseado, que se usó sin purificación adicional. TLC (gel de sílice, acetato de etilo al 10 % en hexanos): $F_r = 0,50$.

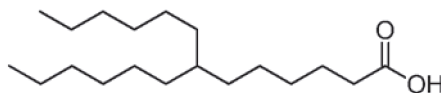
Intermedio 23d: ácido 7-hexiltrideca-4,6-dienoico

30



35 A una suspensión de bromuro de (3-carboxipropil)trifenilfosfonio (19,09 g, 44,6 mmol) en THF (80 ml) y HMPA (5 ml), enfiada en un baño de hielo-agua, se añadió NaHMDS (1,0 M en THF, 111 ml, 111 mmol). Se añadió lentamente el Intermedio 23c (5,0 g, 22,3 mmol) en THF (20 ml) y la reacción se calentó a 30 °C. Después de 16 h, la reacción se diluyó con 200 ml de agua y se acidificó con HCl 2 N (ac.). La reacción se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/hexanos como eluyente para proporcionar 4,0 g del producto deseado. TLC (gel de sílice, EtOAc al 30 % en n-hexano): $F_r = 0,21$.

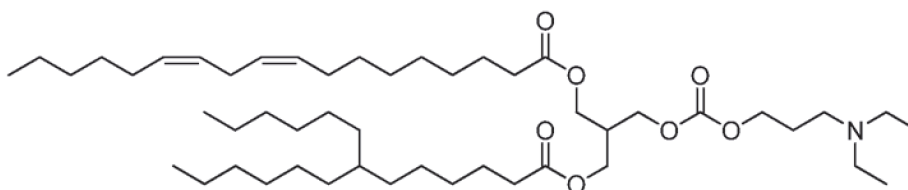
40 Intermedio 23e: ácido 7-hexiltridecanoico



45 A una suspensión del Intermedio 23d (4,0 g, 13,6 mmol) en metanol (100 ml) en un recipiente Paar-shaker se añadió Pd/C (Pd al 10 %/C, 2,0 g). La reacción se puso en el aparato agitador y se presurizó a 0,41 MPa (60 psi) de gas de hidrógeno. Después de 2 h, la mezcla de reacción se filtró a través de celite con lavados de metanol (2 x 50 ml). El filtrado se concentró a presión reducida y el concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/n-hexano como eluyente para proporcionar 3,9 g del producto deseado. TLC (gel de sílice, EtOAc al 30 % en n-hexano): $F_r = 0,21$.

50

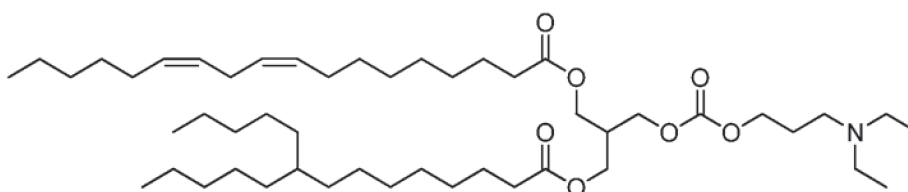
Ejemplo 23: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((7-hexiltridecanoil)oxi)metil)propilo



El Ejemplo 23 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13.

- 5 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,27-5,46 (m, 4H), 4,08-4,26 (m, 8H), 2,78 (t, J = 6,40 Hz, 2H), 2,52 (c, J = 6,86 Hz, 6H), 2,43 (dt, J = 11,98, 5,93 Hz, 1H), 2,31 (t, J = 7,53 Hz, 4H), 2,05 (c, J = 6,61 Hz, 4H), 1,77-1,89 (m, 2H), 1,55-1,70 (m, 6H), 1,14-1,47 (m, 39H), 1,02 (t, J = 7,15 Hz, 6H), 0,83-0,95 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 806,3, R_t = 1,91 min (Método de CL 7).

- 10 Ejemplo 24: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((9-pentiltetradecanoil)oxi)metil)propilo

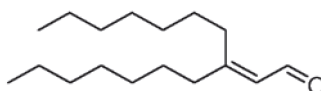


El Ejemplo 24 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13.

- 15 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,28-5,45 (m, 4H), 4,11-4,24 (m, 8H), 2,78 (t, J = 6,53 Hz, 2H), 2,53 (c, J = 6,69 Hz, 6H), 2,43 (dt, J = 11,86, 5,99 Hz, 1H), 2,31 (t, J = 7,65 Hz, 4H), 2,05 (c, J = 6,78 Hz, 4H), 1,83 (c, J = 6,84 Hz, 2H), 1,57-1,67 (m, 4H), 1,14-1,43 (m, 41H), 1,03 (t, J = 7,15 Hz, 6H), 0,84-0,96 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 806,6, R_t = 1,67 min (Método de CL 6).

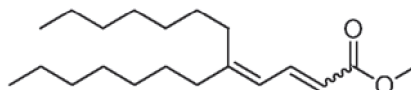
20 Síntesis del Ejemplo 25:

Intermedio 25a: 3-heptildec-2-enal



- 25 El Intermedio 25a puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la preparación del Intermedio 23c en la síntesis del Ejemplo 23.
TLC (gel de sílice, EtOAc al 10 % en hexanos): F_r = 0,63.

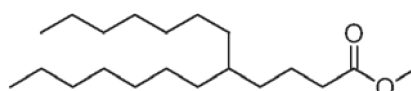
- 30 Intermedio 25b: 5-heptildodeca-2,4-dienoato de metilo



- 35 A una suspensión de hidruro sódico (55 % en aceite de parafina, 3,5 g, 74,3 mmol) en THF (70 ml), enfriada en un baño de agua y hielo, se añadió fosfonoacetato de trimetilo (9,6 ml, 59,5 mmol). Después de 10 min, se añadió el Intermedio 25a (7,5 g, 29,7 mmol) en THF (10 ml) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 2 h, la reacción se interrumpió mediante la adición lenta de agua enfriada con hielo (20 ml). La reacción se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml), los extractos orgánicos se lavaron con agua y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar 8,0 g del producto deseado.

- 40 TLC (gel de sílice, EtOAc al 10 % en hexanos): F_r = 0,75.

Intermedio 25c: 5-heptildodecanoato de metilo



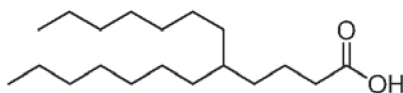
- 45 A una solución del Intermedio 25b (8,0 g, 25,95 mmol) en metanol (350 ml) se añadió paladio sobre carbono (Pd al

10 %/C, 1,0 g). La reacción se realizó en 1 atm de hidrógeno proporcionado mediante un globo. Después de 14 h, la reacción se filtró a través de celite con lavados de metanol. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar 7,7 g del producto deseado.

TLC (gel de sílice, metanol al 5 % en diclorometano): $F_r = 0,63$.

5

Intermedio 25d: ácido 5-heptildodecanoico



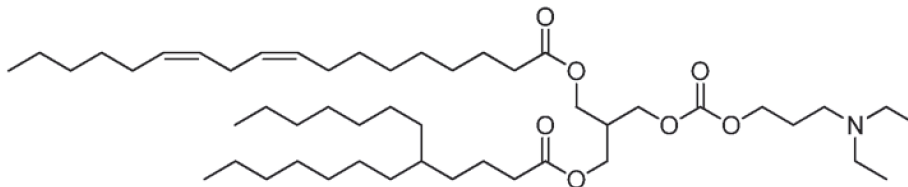
10 A una mezcla de hidróxido sodico 5 N (ac., 125 ml) y metanol (350 ml) se añadió el Intermedio 25c (7,7 g, 24,7 mmol) y la reacción se calentó a reflujo. Después de 16 h, la reacción se enfrió en un baño de hielo-agua y se interrumpió mediante la adición de HCl acuoso concentrado hasta que fue ácida. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 250 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sodico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto deseado.

15

TLC (gel de sílice, EtOAc al 50 %/heptano): $F_r = 0,82$.

Ejemplo 25: octadeca-9,12-dienoato de (9Z, 12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-heptildodecanoil)oxi)metil)propilo

20



El Ejemplo 25 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13.

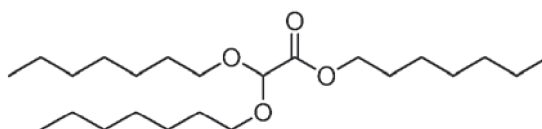
25 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,30-5,45$ (m, 4H), 4,14-4,25 (m, 8H), 2,79 (t, $J = 6,65$ Hz, 2H), 2,55 (c, $J = 6,78$ Hz, 6H), 2,45 (dt, $J = 11,98, 5,93$ Hz, 1H), 2,32 (c, $J = 7,53$ Hz, 4H), 2,07 (c, $J = 6,61$ Hz, 4H), 1,84 (dt, $J = 13,93, 6,84$ Hz, 2H), 1,55-1,68 (m, 4H), 1,22-1,41 (m, 41H), 1,04 (t, $J = 7,15$ Hz, 6H), 0,86-0,97 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 806,6, $R_t = 1,76$ min (Método de CL 6).

30

Síntesis del Ejemplo 26:

30

Intermedio 26a: 2,2-bis(heptiloxi)acetato de heptilo

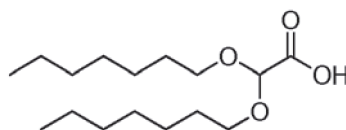


35 A una solución de 2,2-dimetoxiacetato de metilo (5,0 g, 37,3 mmol) en heptanol (26,3 ml, 186 mmol) se añadió ácido alcanforsulfónico (0,43 g, 1,86 mmol) y la reacción se calentó a 100 °C, durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con diclorometano/heptano como eluyente para proporcionar 4,0 g del compuesto deseado.

40 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,86$ (s, 1H), 4,21 (t, $J = 6,78$ Hz, 2H), 3,52-3,69 (m, 4H), 1,55-1,77 (m, 6H), 1,20-1,45 (m, 24H), 0,82-0,98 (m, 9H) ppm.

40

Intermedio 26b: ácido 2,2-bis(heptiloxi)acético



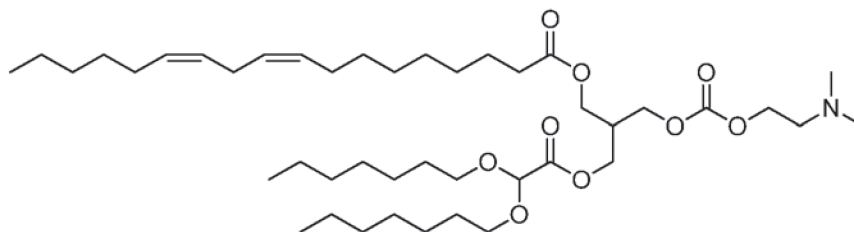
45

A una solución del Intermedio 26a (4,06 g, 10,5 mmol) en metanol (50 ml) se añadió hidróxido sodico (ac. 2 N, 7,88 ml, 15,8 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se diluyó con acetato de etilo y salmuera. La capa acuosa se tituló a pH neutro con HCl ac. 1 N y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sodico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice (equilibrado con amoniaco 0,4 N y metanol al 2 % en diclorometano) con metanol/diclorometano como eluyente para proporcionar 2,3 g del compuesto deseado.

50

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,88 (s, 1H), 3,53-3,71 (m, 4H), 1,63 (quin, *J* = 6,84 Hz, 4H), 1,18-1,43 (m, 16H), 0,84-0,97 (m, 6 H) ppm.

5 Ejemplo 26: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(2,2-bis(heptiloxi)acetoxi)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propilo

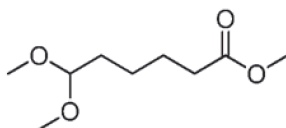


El Ejemplo 26 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13.

10 ¹H RMN (CDCl₃): δ = 5,21-5,51 (m, 4H), 4,89 (s, 1H), 4,20-4,34 (m, 6H), 4,16 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,49-3,67 (m, 4H), 2,78 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,59 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,41-2,55 (m, 1H), 2,24-2,37 (m, 8H), 2,06 (c, *J* = 6,8 Hz, 4H), 1,62 (quin, *J* = 6,9 Hz, 6H), 1,20-1,44 (m, 30H), 0,89 (dc, *J* = 6,8, 3,5 Hz, 9H) ppm. MS (*M* + 1) = 754,5, *Rt* = 1,17 min (Método de CL 6).

15 Síntesis del Ejemplo 27

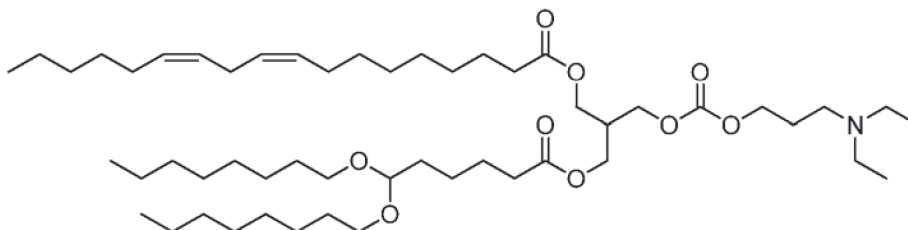
Intermedio 27a: 6,6-dimetoxihexanoato de metilo



20 Se recogió 6-oxohexanoato de metilo (11 g, 76 mmol) en metanol (60 ml) y se añadió ácido sulfúrico conc. (244 ul, 4,58 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua. La mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 12,1 g del compuesto deseado.

25 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,37 (t, *J* = 5,77 Hz, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,33 (s, 6H), 2,34 (t, *J* = 7,53 Hz, 2H), 1,57-1,73 (m, 4H), 1,34-1,46 (m, 2H) ppm.

30 Ejemplo 27: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((6,6-bis(octiloxi)hexanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo

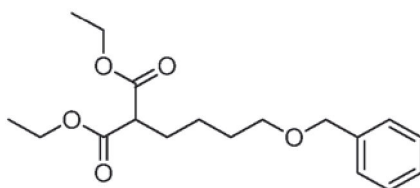


35 El Ejemplo 27 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 26 y el Ejemplo 13.

40 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,25-5,47 (m, 4H), 4,45 (t, *J* = 5,65 Hz, 1H), 4,08-4,27 (m, 8H), 3,55 (dt, *J* = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 3,34-3,45 (m, 2H), 2,77 (t, *J* = 6,27 Hz, 2H), 2,52 (c, *J* = 7,03 Hz, 6H), 2,42 (dt, *J* = 11,86, 5,99 Hz, 1H), 2,25-2,37 (m, 4H), 2,05 (c, *J* = 6,78 Hz, 4H), 1,76-1,88 (m, 2H), 1,50-1,75 (m, 12H), 1,20-1,47 (m, 34H), 1,02 (t, *J* = 7,15 Hz, 6H), 0,81-0,95 (m, 9H) ppm. MS (*M* + 1) = 881,1, *Rt* = 2,73 min (Método de CL 4).

Síntesis del Ejemplo 28:

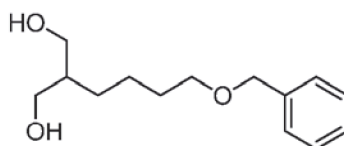
Intermedio 28a: 2-(4-(benciloxi)butil)malonato de dietilo



5 A una suspensión de hidruro sódico (dispersión al 60 % en aceite mineral, 4,93 g, 123 mmol) en THF (100 ml), se añadió lentamente malonato de dietilo (31,2 ml, 206 mmol). Una vez cesó el desprendimiento de gas, se añadió (4-bromobutoxi)metilbenceno (25 g, 103 mmol) y la reacción se calentó a 90 °C. Después de 6 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con éter dietílico (100 ml) y agua (100 ml). La capa acuosa se extrajo adicionalmente con éter dietílico (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar el producto deseado contaminado con malonato de dietilo. La destilación fraccionada a 60 °C y a presión reducida retiró malonato de dietilo para proporcionar 24,3 g del producto deseado.

10 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,28-7,39 (m, 5H), 4,51 (s, 2H), 4,16-4,25 (m, 4H), 3,49 (t, *J* = 6,53 Hz, 2H), 3,34 (t, *J* = 7,53 Hz, 1H), 1,89-1,98 (m, 2H), 1,61-1,72 (m, 2H), 1,39-1,49 (m, 2H), 1,28 (t, *J* = 7,00 Hz, 6H) ppm.

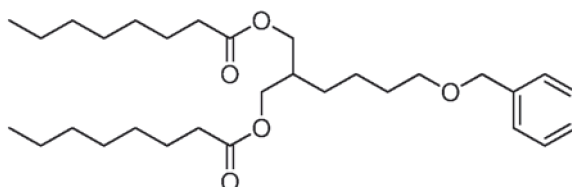
15 Intermedio 28b: 2-(4-(benciloxi)butil)propano-1,3-diol



20 A una mezcla del Intermedio 28a (20,0 g, 62,0 mmol) en THF (100 ml) se añadió hidruro de litio y aluminio (5,18 g, 136 mmol). Después de 48 h, la reacción se interrumpió mediante la adición lenta de agua enfriada con hielo. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml) y los extractos orgánicos se concentraron a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con metanol/heptano como eluyente para proporcionar 6,6 g del producto deseado.

25 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,29-7,40 (m, 5H), 4,52 (s, 2H), 3,82 (dd, *J* = 10,54, 3,51 Hz, 2H), 3,67 (dd, *J* = 10,42, 7,65 Hz, 2H), 3,49 (t, *J* = 6,53 Hz, 2H), 2,38 (s a., 2H), 1,72-1,84 (m, 1H), 1,58-1,68 (m, 2H), 1,38-1,49 (m, 2H), 1,24-1,33 (m, 2H) ppm.

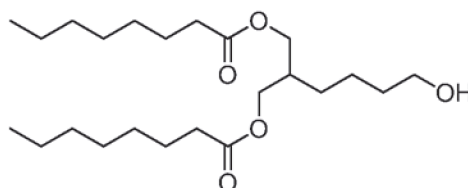
Intermedio 28c: dioctanoato de 2-(4-(benciloxi)butil)propano-1,3-diilo



30 El Intermedio 28b (2,0 g, 8,39 mmol), piridina (1,49 ml, 18,5 mmol) y DMAP (0,051 g, 0,42 mmol) se mezclaron en diclorometano (30 ml). A esta mezcla se añadió lentamente cloruro de octanoilo (3,18 ml, 18,5 mmol). Después de 1 h, la mezcla se vertió en HCl 6 M (ac., 20 ml) y se extrajo con éter dietílico (2 x 40 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con un eluyente de acetato de etilo/heptano para proporcionar 3,2 g del producto deseado.

35 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,30-7,40 (m, 5H), 4,52 (s, 2H), 4,07 (qd, *J* = 11,04, 5,77 Hz, 4H), 3,49 (t, *J* = 6,40 Hz, 2H), 2,31 (t, *J* = 7,53 Hz, 4H), 2,01 (spt, *J* = 6,00 Hz, 1H), 1,53-1,72 (m, 6H), 1,35-1,50 (m, 4H), 1,22-1,35 (m, 16H), 0,83-0,95 (m, 6H) ppm.

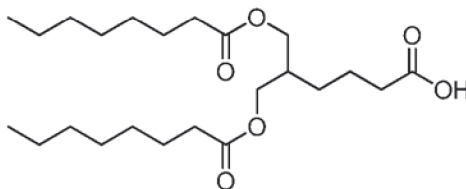
40 Intermedio 28d: dioctanoato de 2-(4-hidroxibutil)propano-1,3-diilo



Se recogieron paladio sobre carbono (Pd al 10 %/C, 20 mg) y el Intermedio 28c (3,2 g, 6,52 mmol) en metanol (10 ml)

en un recipiente de reacción con agitador Parr. La reacción se presurizó a 0,37 MPa (54 psi) con gas de hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 2,06 g del compuesto deseado. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 3,99-4,17 (m, 4H), 3,67 (t, J = 6,40 Hz, 2H), 2,32 (t, J = 7,53 Hz, 4H), 2,02 (spt, J = 5,80 Hz, 1H), 1,54-1,71 (m, 7H), 1,37-1,52 (m, 4H), 1,20-1,37 (m, 16H), 0,83-0,95 (m, 6H) ppm.

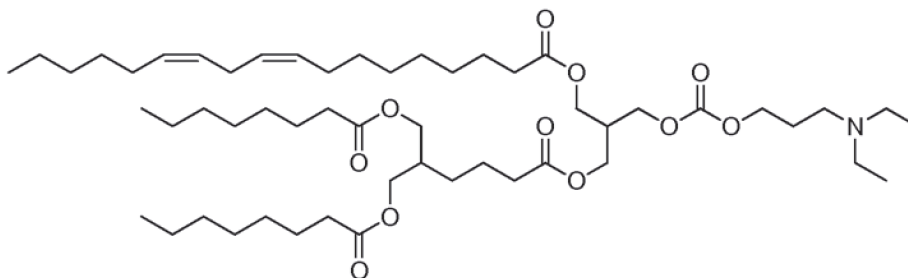
Intermedio 28e: ácido 6-(octanoiloxi)-5-((octanoiloxi)metil)hexanoico



A una solución del Intermedio 28d (3,35 g, 8,37 mmol) en acetona (30 ml), enfriada en un baño de hielo-agua, se añadió reactivo de Jones (ac. 2 M, 6,7 ml, 13,4 mmol). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 2 h, se añadió metanol (1 ml) y se dejó reaccionar durante 5 min. La reacción se concentró a presión reducida y el concentrado se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y agua (540 ml). El extracto orgánico se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 2,78 g del compuesto deseado.

MS ($M + 1$) = 415,4, R_t = 1,32 min (Método de CL 3).

Ejemplo 28: dioctanoato de 2-(3-etil-11-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)-8,14-dioxo-7,9,13-trioxa-3-azaheptadecan-17-il)propano-1,3-diilo

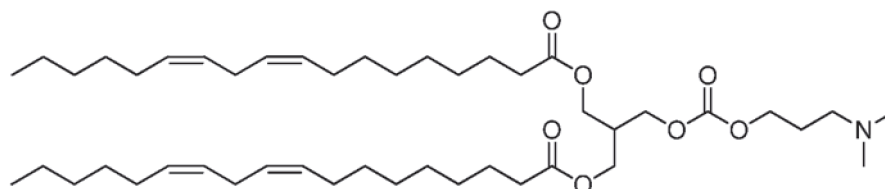


El Ejemplo 28 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,27-5,45 (m, 4H), 4,17-4,24 (m, 4H), 4,15 (d, J = 6,02 Hz, 4H), 4,06 (qd, J = 11,00, 5,65 Hz, 4H), 2,77 (t, J = 6,65 Hz, 2H), 2,37-2,71 (m, 7H), 2,26-2,37 (m, 8H), 1,95-2,10 (m, 5H), 1,85 (s a., 2H), 1,54-1,74 (m, 8H), 1,20-1,45 (m, 32H), 1,04 (s a., 6H), 0,83-0,95 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 922,8, R_t = 1,71 min (Método de CL 4).

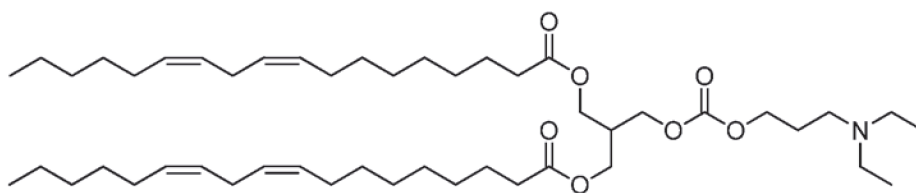
Los siguientes ejemplos pueden prepararse a partir del Intermedio 1a usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13:

Ejemplo 29: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo



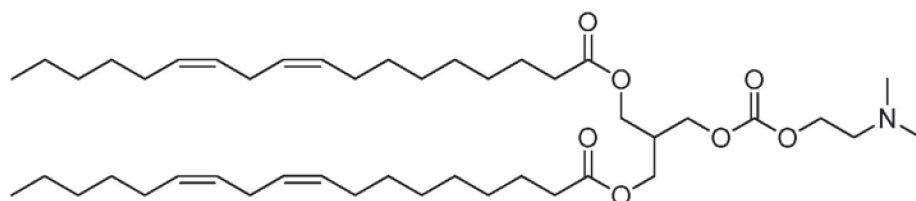
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,43-5,30 (m, 8H), 4,22-4,10 (m, 8H), 2,78 (t, J = 8,0 Hz, 4H), 2,47-2,29 (m, 7H), 2,24 (s, 6H), 2,09-2,02 (m, 8H), 1,90-1,80 (m, 2H), 1,55-1,62 (m, 4H), 1,39-1,26 (m, 28H), 0,91-0,88 (m, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 761,7, R_t = 1,21 min (Método de CL 4).

Ejemplo 30: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo



5 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,42-5,30 (m, 8H), 4,21-4,14 (m, 8H), 2,78 (m, 4H), 2,51 (c, J = 7,1 Hz, 6H), 2,46-2,38 (m, 1H), 2,31 (t, J = 7,7 Hz, 4H), 2,05 (c, J = 6,7 Hz, 8H), 1,81 (quin, J = 7,0 Hz, 2H), 1,65-1,58 (m, 4H), 1,39-1,24 (m, 28H), 1,01 (t, J = 7,2 Hz, 6H), 0,91-0,88 (m, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 790,5, Rt = 1,23 min (Método de CL 5).

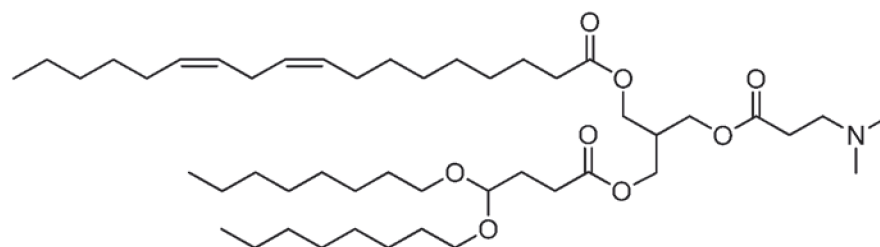
Ejemplo 31: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo



10 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,45-5,27 (m, 8H), 4,27-4,18 (m, 4H), 4,14 (d, J = 6,0 Hz, 4H), 2,81-2,73 (m, 4H), 2,59 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 2,48-2,36 (m, 1H), 2,36-2,24 (m, 10H), 2,05 (c, J = 6,8 Hz, 8H), 1,70-1,53 (m, 5H), 1,43-1,19 (m, 27H), 0,96-0,83 (m, 6H) ppm. MS ($M + 1$) = 748,5, Rt = 1,23 min (Método de CL 5).

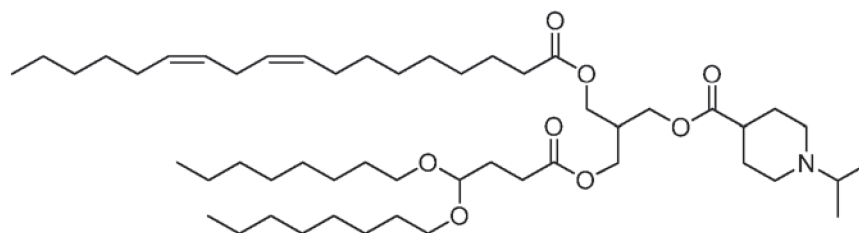
15 Los siguientes ejemplos pueden prepararse a partir del Intermedio 13d usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 1:

20 * Ejemplo 32: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propilo



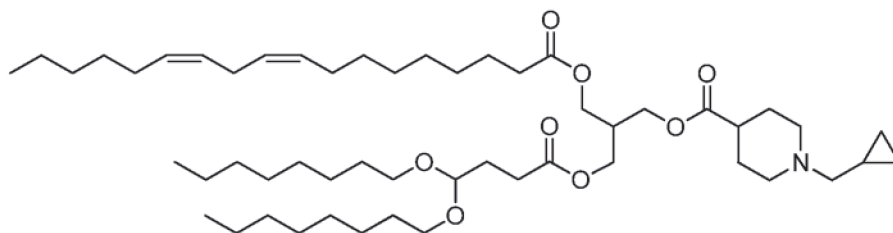
25 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,26-5,45 (m, 4H), 4,49 (t, J = 5,52 Hz, 1H), 4,04-4,22 (m, 6H), 3,57 (dt, J = 9,29, 6,78 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,29, 6,78 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,40 Hz, 2H), 2,56-2,65 (m, 2H), 2,45-2,53 (m, 2H), 2,35-2,45 (m, 3H), 2,31 (t, J = 7,65 Hz, 2H), 2,24 (s, 6H), 2,05 (c, J = 6,78 Hz, 4H), 1,88-1,97 (m, 2H), 1,70 (s a., 2H), 1,49-1,66 (m, 6H), 1,17-1,47 (m, 32H), 0,81-0,96 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 795,0, Rt = 2,61 min (Método de CL 4).

30 Ejemplo 33: 1-isopropilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propilo



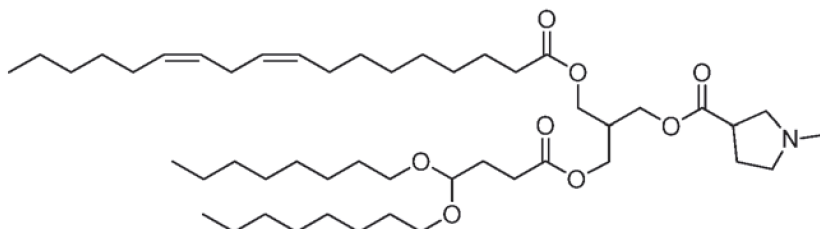
35 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,27-5,46 (m, 4H), 4,49 (t, J = 5,65 Hz, 1H), 4,05-4,20 (m, 6H), 3,57 (dt, J = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,29, 6,78 Hz, 2H), 2,86 (d, J = 11,54 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,40 Hz, 2H), 2,71 (dt, J = 13,05, 6,53 Hz, 1H), 2,35-2,46 (m, 3H), 2,23-2,34 (m, 3H), 2,17 (t, J = 10,79 Hz, 2H), 2,05 (c, J = 6,78 Hz, 4H), 1,85-1,98 (m, 4H), 1,48-1,80 (m, 10H), 1,20-1,43 (m, 32H), 1,03 (d, J = 6,53 Hz, 6H), 0,81-0,95 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$) = 849,1, Rt = 2,62 min (Método de CL 4).

Ejemplo 34: 1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



5
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 5,27-5,45 (m, 4H), 4,49 (t, *J* = 5,52 Hz, 1H), 4,07-4,18 (m, 6H), 3,57 (dt, *J* = 9,29, 6,65 Hz, 2H), 3,40 (dt, *J* = 9,22, 6,68 Hz, 2H), 3,02 (d, *J* = 11,29 Hz, 2H), 2,77 (t, *J* = 6,65 Hz, 2H), 2,35-2,45 (m, 3H), 2,27-2,35 (m, 3H), 2,24 (d, *J* = 6,53 Hz, 2H), 1,97-2,11 (m, 6H), 1,86-1,97 (m, 4H), 1,72-1,85 (m, 2H), 1,49-1,72 (m, 8H), 1,20-1,42 (m, 32H), 0,80-0,95 (m, 10H), 0,47-0,56 (m, 2H), 0,10 (c, *J* = 4,77 Hz, 2H) ppm. MS (*M* + 1) = 861,1, Rt = 2,65 min (Método de CL 4).

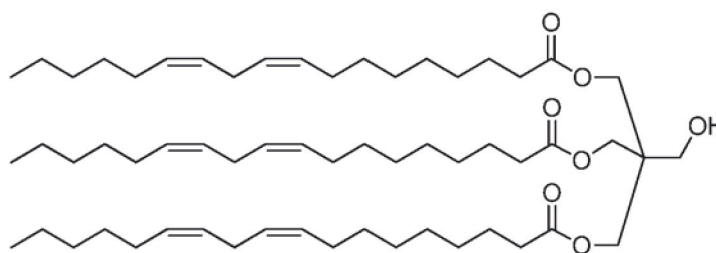
Ejemplo 35: 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



15
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,25-5,47 (m, 4H), 4,49 (t, *J* = 5,52 Hz, 1H), 4,06-4,20 (m, 6H), 3,57 (dt, *J* = 9,03, 6,78 Hz, 2H), 3,40 (dt, *J* = 9,16, 6,71 Hz, 2H), 2,98-3,11 (m, 1H), 2,73-2,86 (m, 3H), 2,48-2,71 (m, 3H), 2,34-2,47 (m, 6H), 2,31 (t, *J* = 7,53 Hz, 2H), 2,00-2,16 (m, 6H), 1,87-1,98 (m, 2H), 1,70 (s a., 2H), 1,50-1,66 (m, 6H), 1,18-1,42 (m, 32H), 0,82-0,95 (m, 9H) ppm. MS (*M* + 1) = 807,0, Rt = 2,60 min (Método de CL 4).

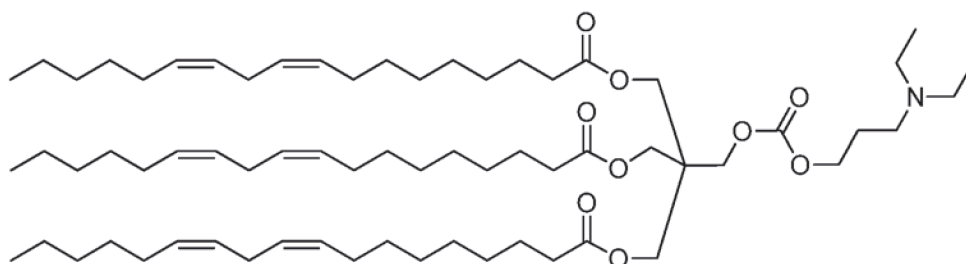
Síntesis del Ejemplo 36:

Intermedio 36a: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(hidroximetil)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propano-1,3-diílo



30
 A una mezcla de ácido linoleico (6,18 g, 22,04 mmol) y EDC (4,51 g, 23,50 mmol) en DCM (100 ml) se añadieron DIPEA (5,13 ml, 29,4 mmol) y DMAP (0,538 g, 4,41 mmol). Después de 1 h, se añadió pentaeritritol (1 g, 7,35 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La reacción se concentró a presión reducida y el concentraron se purificó sobre gel de sílice con acetato de etilo/heptano como eluyente para proporcionar 770 mg del producto deseado. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,26-5,48 (m, 12H), 4,13 (s, 6H), 3,50 (d, *J* = 7,03 Hz, 2H), 2,79 (t, *J* = 6,53 Hz, 6H), 2,35 (t, *J* = 7,65 Hz, 6H), 1,99-2,14 (m, 12H), 1,57-1,71 (m, 7H) 1,20-1,44 (m, 42H), 0,90 (m, 9H) ppm.

Ejemplo 36: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propano-1,3-diílo

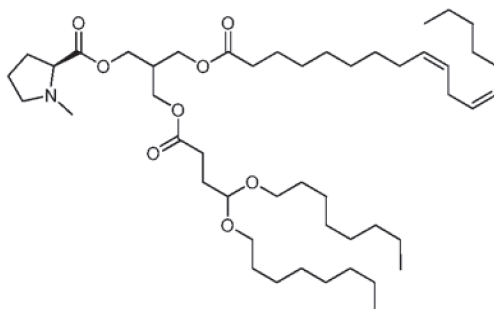


El Ejemplo 36 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13.

5 ^1H RMN (CDCl_3): δ = 5,25-5,51 (m, 12H), 4,16-4,26 (m, 4H), 4,13 (s, 6H), 2,78 (t, J = 6,5 Hz, 6H), 2,46-2,58 (m, 6H), 2,32 (t, J = 7,7Hz, 6H), 2,06 (c, J = 6,6Hz, 12H), 1,76-1,88 (m, 2H), 1,61 (t, J = 7,0 Hz, 6H), 1,23-1,44 (m, 42H), 1,02 (t, J = 7,2 Hz, 6H), 0,85-0,96 (m, 9H) ppm.
MS ($M + 1$) = 1080,6, R_t = 1,39 min (Método de CL 6).

10 Los siguientes ejemplos pueden prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 1.

* Ejemplo 37: 1-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2S)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo

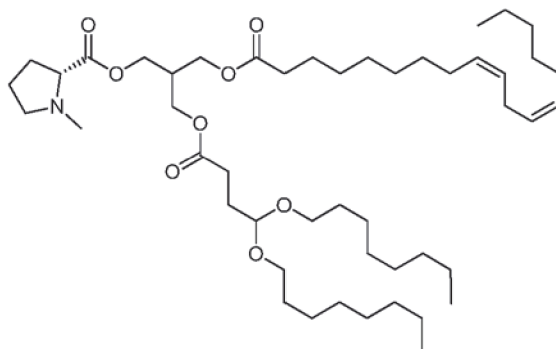


15

A una solución del Intermedio 13d (300 mg, 0,431 mmol) en DMF (15 ml) se añadió ácido (S)-1-metilpirrolidin-2-carboxílico (168 mg, 1,29 mmol), HATU (660 mg, 1,72 mmol), DIPEA (0,46 ml, 2,59 mmol) y DMAP (106 mg, 0,86 mmol) secuencialmente. La mezcla resultante se agitó durante 24 h a ta. La mezcla de reacción se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida para obtener un líquido de color pardo. El concentrado se purificó sobre gel de sílice con EtOAc al 15 %/hexano como eluyente para proporcionar 190 mg del compuesto deseado.

20 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,38 (m, 4H), 4,48 (t, J = 8 Hz, 1H), 4,20 (d, J = 8 Hz, 2H), 4,16 (d, J = 8 Hz, 4H), 3,58 (c, J = 8 Hz, 2H), 3,40 (c, J = 8 Hz, 2H), 3,15 (m, 1H), 2,98 (m, 1H), 2,78 (t, J = 6 Hz, 2H), 2,44-2,38 (m, 6H), 2,30 (m, 2H), 2,18-2,02 (m, 5H), 1,92 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,42 (m, 4H), 1,38-1,20 (m, 36H), 0,84 (m, 9H) ppm.
MS ($M + 1$) = 807,1, R_t = 2,85 min (Método de CL 9).

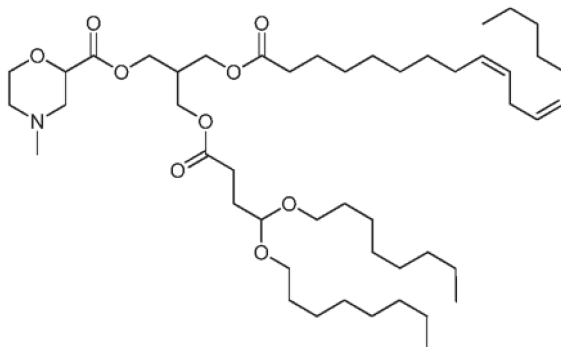
30 * Ejemplo 38: 1-metilpirrolidin-2-carboxilato de (2R)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



35 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,38 (m, 4H), 4,48 (t, J = 8 Hz, 1H), 4,20 (d, J = 8 Hz, 2H), 4,16 (d, J = 8 Hz, 4H), 3,58 (c, J = 8 Hz, 2H), 3,40 (c, J = 8 Hz, 2H), 3,15 (m, 1H), 2,98 (t, J = 6 Hz, 1H), 2,78 (t, J = 6 Hz, 2H), 2,44-2,38 (m, 6H),

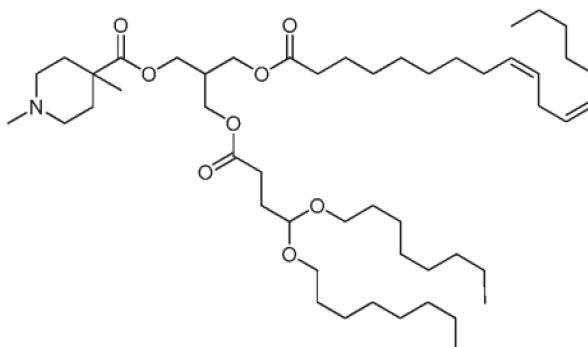
2,30 (m, 2H), 2,18-2,02 (m, 5H), 1,92 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,42 (m, 4H), 1,38-1,20 (m, 36H), 0,84 (m, 9H) ppm. MS (M + 1) = 807, Rt = 2,77 min (Método de CL 9).

5 Ejemplo 39: 4-metilmorfolin-2-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



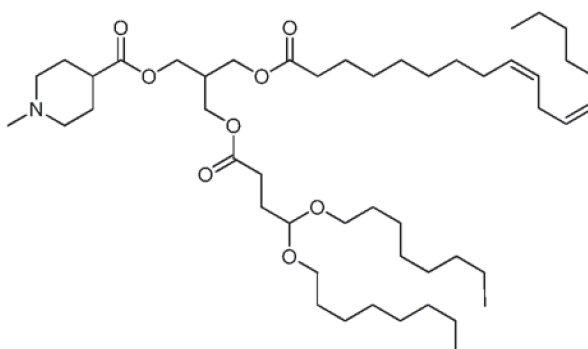
10 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,38 (m, 4H), 4,44 (t, J = 8 Hz, 1H), 4,25 (m, 3H), 4,18 (m, 4H), 4,0 (m, 1H), 3,70 (m, 1H), 3,48 (c, J = 8 Hz, 2H), 3,40 (c, J = 8 Hz, 2H), 2,86 (d, J = 12 Hz, 1H), 2,68 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 2,52 (m, 1H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (m, 7H), 2,02 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,62-1,52 (m, 6H), 1,40-1,22 (m, 34H), 0,82 (m, 9H) ppm. MS (M + 1) = 823,1, Rt = 1,28 min (Método de CL 10).

15 Ejemplo 40: 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



20 ^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2) δ = 5,28 - 5,43 (m, 4H), 4,45 (t, J = 5,50 Hz, 1H), 4,12 (dt, J = 6,05, 1,31 Hz, 6H), 3,54 (dt, J = 9,29, 6,72 Hz, 2H), 3,38 (dt, J = 9,26, 6,62 Hz, 2H), 2,73 - 2,82 (m, 2H), 2,53 (s a., 2H), 2,25 - 2,44 (m, 5H), 2,19 (s, 3H), 2,05 (c, J = 6,89 Hz, 8H), 1,87 (td, J = 7,58, 5,62 Hz, 2H), 1,42 - 1,64 (m, 8H), 1,22 - 1,38 (m, 34H), 1,17 (s, 3H), 0,83 - 0,93 (m, 9H) ppm.
MS (M + 1) = 835,5, Rt = 2,69 min (Método de CL 9).

25 Ejemplo 41: 1-metilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo

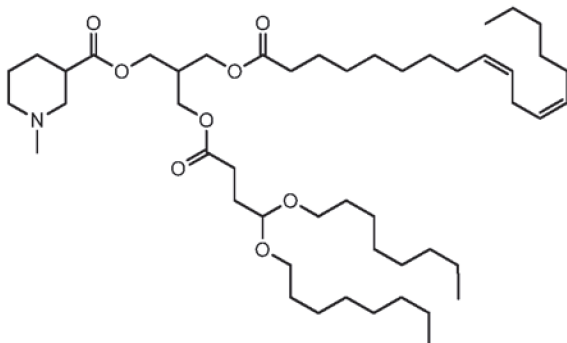


30 ^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2) δ = 5,28 - 5,43 (m, 4H), 4,45 (t, J = 5,50 Hz, 1H), 4,12 (dt, J = 6,02, 1,45 Hz, 6H), 3,54 (dt, J = 9,29, 6,66 Hz, 2H), 3,39 (dt, J = 9,29, 6,66 Hz, 2H), 2,71 - 2,85 (m, 4H), 2,19-2,43 (m, 9H), 1,93 - 2,11 (m, 6H), 1,87

(m, 4H), 1,66 - 1,78 (m, 2H), 1,48 - 1,63 (m, 6H), 1,25 - 1,38 (m, 34H), 0,83 - 0,92 (m, 9H) ppm.

MS (M + 1) = 821,4, Rt = 2,68 min (Método de CL 9).

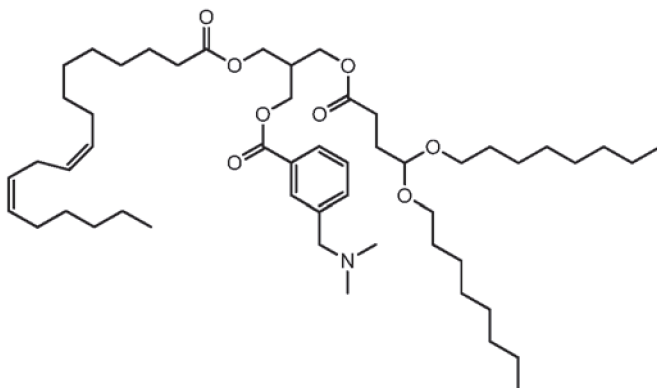
- 5 * Ejemplo 42: 1-metilpiperidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



- 10 RMN ¹H (400 MHz, ACETONITRILLO-d₃) δ = 5,43 - 5,28 (m, 4H), 4,45 (t, J = 5,50 Hz, 1 H), 4,10 (d, J = 5,99 Hz, 5H), 3,54 (dt, J = 9,38, 6,56 Hz, 2H), 3,38 (dt, J = 9,41, 6,54 Hz, 2H), 2,74 - 2,82 (m, 3H), 2,50 - 2,60 (m, 2H), 2,25 - 2,39 (m, 5H), 2,19 (s, 5H), 2,06 (c, J = 6,68 Hz, 5H), 1,86 - 1,75 (m, 3H), 1,72 - 1,62 (m, 1H), 1,62-1,45 (m, 7H), 1,39 - 1,21 (m, 35H), 0,94 - 0,83 (m, 9H) ppm.

MS (M + 1) = 821, Rt = 2,72 min (Método de CL 9).

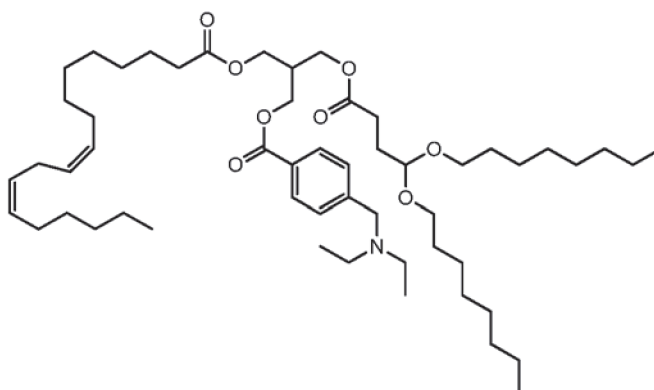
- 15 * Ejemplo 43: 3-((dimetilamino)metil)benzoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



- 20 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,96 - 7,89 (m, 2H), 7,56 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,41 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 5,43 - 5,29 (m, 4H), 4,49 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,40 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 4,24 (dd, J = 6,0, 1,7 Hz, 4H), 3,57 (dt, J = 9,2, 6,7 Hz, 2H), 3,47 (s, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,78 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,61 - 2,51 (m, 1H), 2,42 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,32 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,25 (s, 6H), 2,10-2,00 (m, 4H), 1,98-1,88 (m, 2H), 1,67-1,50 (m, 6H), 1,41 - 1,20 (m, 34H), 0,93-0,84 (m, 9H) ppm.

MS (M + 1) = 856,1, Rt = 2,65 min (Método de CL 11).

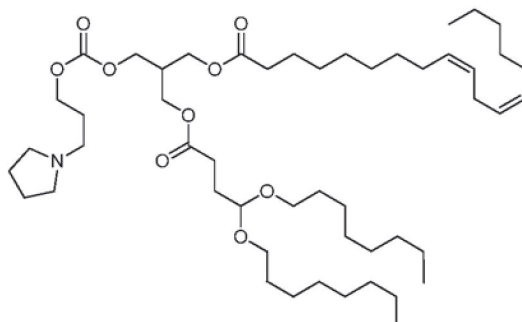
- 30 * Ejemplo 44: 4-((dietilamino)metil)benzoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo



5 ^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2) δ = 7,95 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 5,43 - 5,26 (m, 4H), 4,44 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,37 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 4,21 (dd, J = 6,0, 1,7 Hz, 4H), 3,60 (s, 2H), 3,54 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,38 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,81 - 2,73 (m, 2H), 2,59 - 2,43 (m, 5H), 2,38 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,30 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,05 (c, J = 6,9 Hz, 4H), 1,92 - 1,82 (m, 2H), 1,65 - 1,47 (m, 6H), 1,41 - 1,19 (m, 34H), 1,02 (t, J = 6,8 Hz, 6H), 0,92 - 0,81 (m, 9H) ppm.
MS ($M + 2$) = 885,2, R_t = 2,74 min (Método de CL 9).

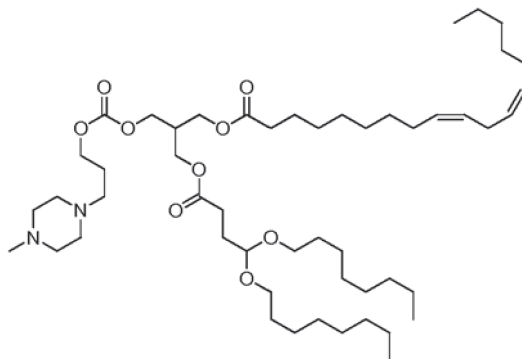
10 Los siguientes ejemplos pueden prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 13:

15 Ejemplo 45: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(pirrolidin-1-il)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo



20 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,38 (m, 4H), 4,44 (t, J = 6 Hz, 1H), 4,18 (m, 8H), 3,58 (c, J = 6 Hz, 2H), 3,38 (c, J = 6 Hz, 2H), 2,78 (t, J = 6 Hz, 2H), 2,58 (m, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (t, J = 8 Hz, 2H), 2,18 (m, 4H), 1,90 (m, 4H), 1,78 (m, 4H), 1,70-1,50 (m, 9H), 1,40-1,22 (m, 31H), 0,82 (m, 9H) ppm.
MS ($M + 1$) = 851,1, R_t = 1,14 min (Método de CL 10).

25 Ejemplo 46: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo

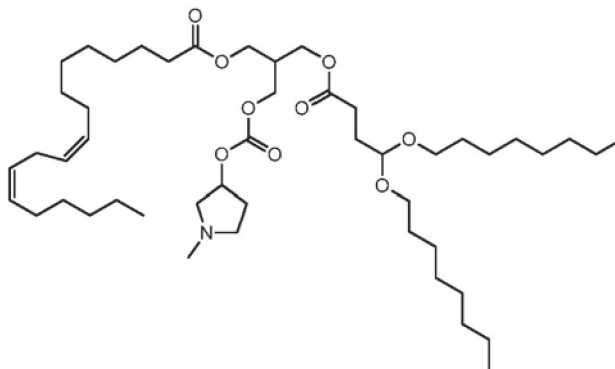


30 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 5,44-5,28 (m, 4H), 4,49 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,23-4,10 (m, 8H), 3,57 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,41 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,78 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,62 - 2,35 (m, 12H), 2,34 - 2,26 (m, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,06 (c, J = 6,6 Hz, 4H), 1,97 - 1,81 (m, 4H), 1,69 - 1,50 (m, 6H), 1,42 - 1,20 (m, 34H), 0,95 - 0,83 (m, 9H) ppm. MS ($M + 1$)

= 880,0, Rt = 1,12 min (Método de CL 12).

Ejemplo 47: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpirrolidin-3-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo

5



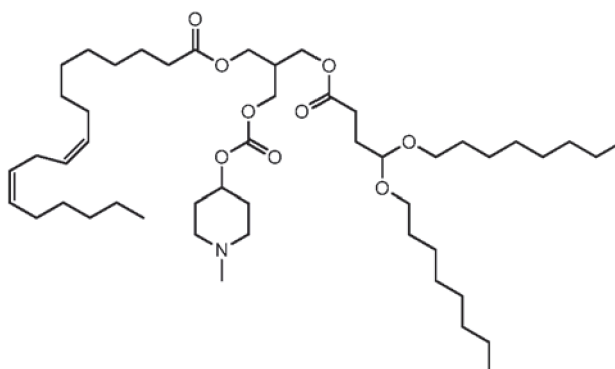
^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2) δ = 5,26 - 5,44 (m, 4H), 5,04-5,13 (m, 1H), 4,45 (t, J = 5,56 Hz, 1H), 4,08-4,21 (m, 6H), 3,54 (dt, J = 9,26, 6,68 Hz, 2H), 3,38 (dt, J = 9,29, 6,66 Hz, 2H), 2,78 (m, J = 6,40, 6,40 Hz, 4H), 2,22 - 2,48 (m, 9H), 2,05 (c, J = 6,85 Hz, 4H), 1,87 (m, J = 7,60, 7,60, 5,50 Hz, 3H), 1,48-1,65 (m, 8H), 1,21 - 1,42 (m, 34H), 0,82 - 0,93 (m, 9H) ppm.

10

MS ($M + 1$) = 823,2, Rt = 2,65 min (Método de CL 9).

Ejemplo 48: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo

15



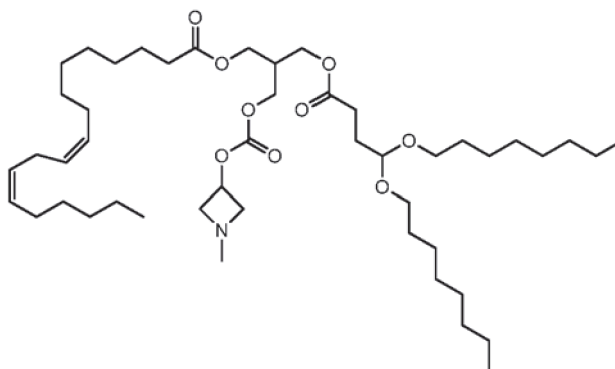
^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2) δ = 5,26 - 5,43 (m, 4H), 4,52 - 4,76 (m, 1H), 4,45 (t, J = 5,50 Hz, 1H), 4,17 (d, J = 5,99 Hz, 2H), 4,12 (dd, J = 5,93, 1,65 Hz, 4H), 3,54 (dt, J = 9,29, 6,66 Hz, 2H), 3,38 (dt, J = 9,29, 6,66 Hz, 2H), 2,77 (s a, 4H), 2,14-2,44 (m, 9H), 2,05 (c, J = 6,85 Hz, 4H), 1,67-2,00 (m, 5H), 1,44-1,64 (m, 8H), 1,23-1,40 (m, 34H), 0,83 - 0,93 (m, 9H) ppm.

20

MS ($M + 1$) = 837,3, Rt = 2,75 min (Método de CL 9).

Ejemplo 49: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilazetidín-3-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo

25

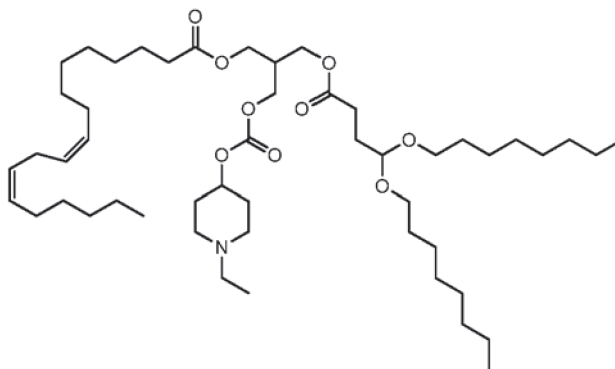


ES 2 774 968 T3

¹H RMN (400 MHz, CD₂Cl₂) δ = 5,28 - 5,44 (m, 4H), 4,95 - 5,03 (m, 1H), 4,45 (t, *J* = 5,50 Hz, 1H), 4,07 - 4,23 (m, 6H), 3,76 - 3,92 (m, 2H), 3,55 (dt, *J* = 9,29, 6,72 Hz, 2H), 3,39 (dt, *J* = 9,26, 6,68 Hz, 2H), 3,15 - 3,30 (m, 2H), 2,78 (t, *J* = 6,36 Hz, 2H), 2,25-2,50 (m, 8H), 2,06 (c, *J* = 6,85 Hz, 4H), 1,87 (td, *J* = 7,55, 5,56 Hz, 2H), 1,46-1,64 (m, 6H), 1,20 - 1,41 (m, 34H), 0,84 - 0,94 (m, 9H), ppm.

5 MS (M + 1) = 809,2, Rt = 2,72 min (Método de CL 9).

Ejemplo 50: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo



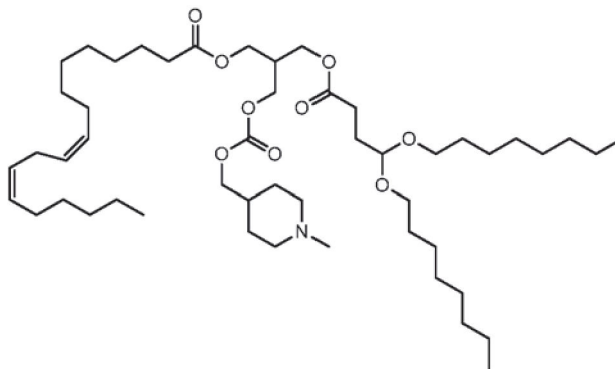
10

¹H RMN (400 MHz, CD₂Cl₂) δ = 5,43 - 5,28 (m, 4H), 4,66-4,54 (m, 1H), 4,45 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,17 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 4,12 (dd, *J* = 6,0, 1,7 Hz, 4H), 3,54 (dt, *J* = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,38 (dt, *J* = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,81 -2,75 (m, 2H), 2,75 - 2,64 (m, 2H), 2,45 - 2,33 (m, 5H), 2,30 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,25 - 2,11 (m, 2H), 2,05 (c, *J* = 6,8 Hz, 4H), 1,99 -1,82(m,4H), 1,78-1,64(m,2H), 1,64-1,47(m, 6H), 1,41 - 1,19(m, 34H), 1,04(t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 0,93-0,82(m, 9H) ppm. MS (M + 1) = 850,8, Rt = 2,65 min (Método de CL 9).

15

Ejemplo 51: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpiperidin-4-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo

20



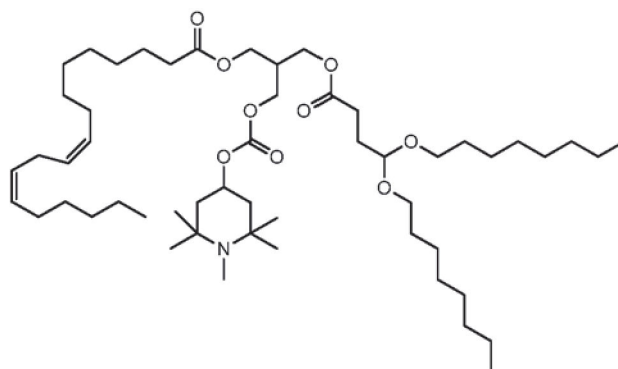
¹H RMN (400 MHz, CD₂Cl₂) δ: 5,43-5,26 (m, 4H), 4,45 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,18 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 4,12 (dd, *J* = 6,1, 1,4 Hz, 4H), 3,97 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,56 (dt, *J* = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,38 (dt, *J* = 9,2, 6,6 Hz, 2H), 2,88 - 2,74 (m, 4H), 2,46-2,33 (m, 3H), 2,30 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,05 (c, *J* = 6,8 Hz, 4H), 1,97 - 1,82 (m, 4H), 1,741,47 (m, 9H), 1,41 - 1,20 (m, 36H), 0,93 - 0,83 (m, 9H) ppm.

25

MS (M + 1) = 851,1, Rt = 2,67 min (Método de CL 9).

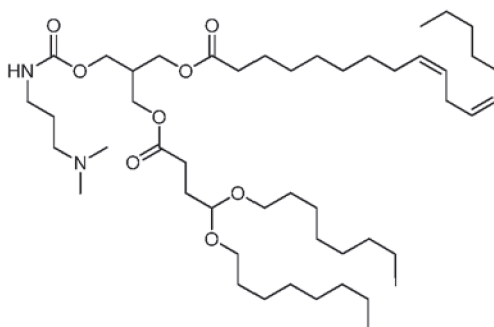
Ejemplo 52: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1,2,2,6,6-pentametilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo

30



5 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ = 5,36 (m, J = 7,50, 1,80 Hz, 4H), 4,83-4,94 (m, 1H), 4,49 (t, J = 5,50 Hz, 1H), 4,18 (dd, J = 16,02, 5,87 Hz, 6H), 3,57 (m, J = 9,30, 6,70, 6,70 Hz, 2H), 3,41 (m, J = 9,29 Hz, 2H), 2,78 (t, J = 6,48 Hz, 2H), 2,41 (m, J = 7,70, 7,70 Hz, 3H), 2,31 (t, J = 7,58 Hz, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,06 (c, J = 6,77 Hz, 4H), 1,89 - 1,97 (m, 4H), 1,48 - 1,67 (m, 8H), 1,21 - 1,42 (m, 34H), 1,18 (s, 6H), 1,08 (s, 6H), 0,85 - 0,93 (m, 9H) ppm.
MS (M + 1) = 893,3, Rt = 2,74 min (Método de CL 9).

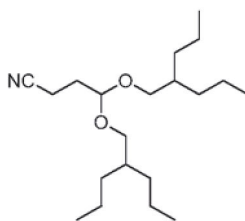
10 Ejemplo 53: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propil)carbamoil)oxi)metil)propilo



15 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,64 (s a, 1H), 5,40-5,24 (m, 4H), 4,44 (t, J = 6 Hz, 1H), 4,10 (s a, 5H), 3,58 (c, J = 6 Hz, 2H), 3,40 (c, J = 6 Hz, 2H), 3,20 (m, 2H), 2,78 (t, J = 6 Hz, 2H), 2,41-2,24 (m, 5H), 2,20 (s, 6H), 2,08 (c, J = 6 Hz, 4H), 1,92 (c, J = 8 Hz, 2H), 1,70-1,44 (m, 17H), 1,38-1,20 (m, 28H), 0,82 (m, 9H) ppm.
MS (M + 1) = 824, Rt = 2,63 min (Método de CL 9).

20 Síntesis del Ejemplo 54:

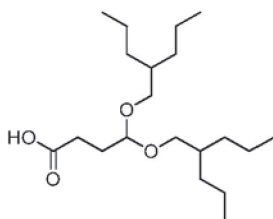
Intermedio 54a: 4,4-bis((2-propilpentil)oxi)butanonitrilo



25 A una mezcla de 3-cianopropionaldehídodimetilacetal (2,0 g, 15,48 mmol) y propilpentan-1-ol (8,0 g, 61,94 mmol) se añadió p-toluenosulfonato de piridinio (194 mg, 0,774 mmol) y la reacción se calentó a 105 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se purificó directamente por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 10 %/hexano para proporcionar a 4,0 g del compuesto deseado en forma de un líquido de color amarillo pálido. TLC: Fr = 0,9 (EtOAc: Hexano, 1:9); PMA activo.

30 Intermedio 54b: ácido 4,4-bis((2-propilpentil)oxi)butanoico

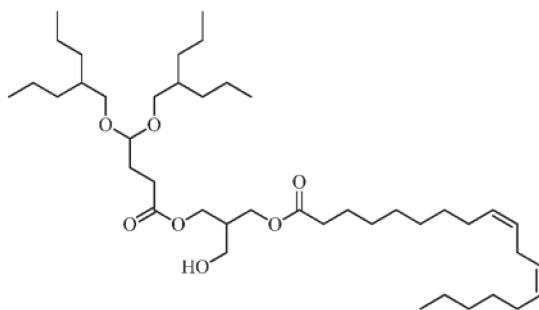
ES 2 774 968 T3



Una solución del intermedio 54a (4 g, 12,26 mmol) en 30 ml de etanol y 30 ml de agua se añadió KOH (2,5 g, 36,88 mmol). La mezcla de reacción se cerró herméticamente y se calentó con agitación a 110 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico y se evaporó a sequedad para proporcionar un líquido viscoso de color pardo, el Intermedio 2b, en 4 g.

TLC: Fr = 0,1 (EtOAc: Hexano, 1:9), PMA activo.

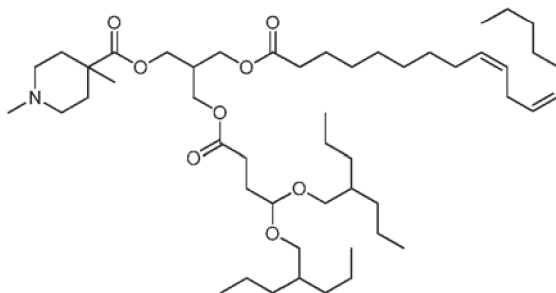
10 Intermedio 54c: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis((2-propilpentil)oxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo



En un matraz de fondo redondo, el intermedio 13c (1,1 g, 2,98 mmol), DMAP (73 mg, 0,596 mmol), DIPEA (1,0 ml, 5,96 mmol) y el intermedio 54b (1,02 g, 2,98 mmol) se recogieron en DMF (10 ml). Se añadió en una porción HATU (1,36 g, 3,58 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Tras completarse, la reacción se interrumpió con 50 ml de agua y se extrajo con (3 x 50 ml) de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a sequedad para proporcionar un material en bruto líquido de color amarillo pálido. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (Gel de Sílice malla 230-400) eluyendo con EtOAc al 20 %/hexano para proporcionar 700 mg del producto deseado en forma de un aceite de color amarillo.

TLC: Fr = 0,8 (EtOAc: Hexano, 3:7), PMA activo.

25 Ejemplo 54: 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis((2-propilpentil)oxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propilo



El Ejemplo 54 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

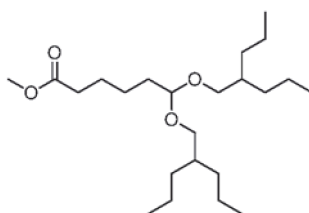
30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 5,43 - 5,29 (m, 4H), 4,45 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 4,15 (dt, J = 6,0, 2,9 Hz, 6H), 3,47 (dd, J = 9,2, 5,7 Hz, 2H), 3,28 (dd, J = 9,2, 5,7 Hz, 2H), 2,78 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,67 - 2,52 (m, 2H), 2,47 - 2,37 (m, 3H), 2,32 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,17-1,99 (m, 8H), 1,97-1,87 (m, 2H), 1,67-1,47 (m, 6H), 1,41 -1,21 (m, 30H), 1,20 (s, 3H), 0,90 (t, J = 6,9 Hz, 15H) ppm.

MS (M + 1) = 834,9, Rt = 1,11 min (Método de CL 12).

35

Síntesis del Ejemplo 55:

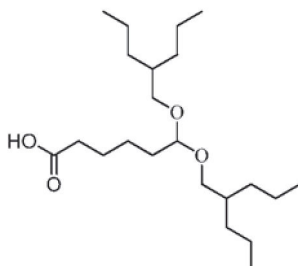
Intermedio 55a: 6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoato de metilo



El Intermedio 55a puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la preparación de Intermedio 54a en la síntesis del Ejemplo 54.

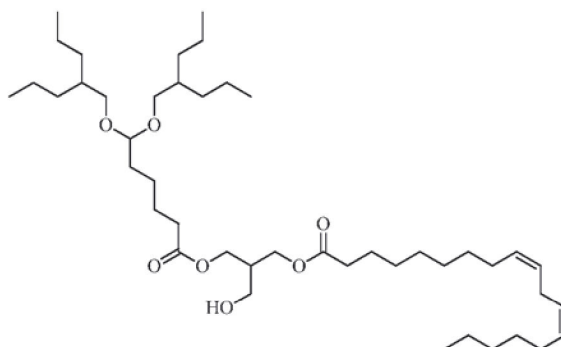
5 TLC: Fr = 0,6 (EtOAc: Hexano, 1:9), PMA activo.

Intermedio 55b: ácido 6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoico



10 El Intermedio 55b puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la preparación de Intermedio 54b en la síntesis del Ejemplo 54.
TLC (gel de sílice, EtOAc al 20 % en hexanos): Fr = 0,2, PMA activo.

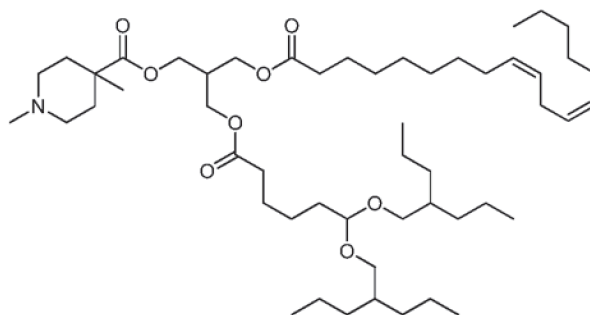
15 Intermedio 55c: octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo



20 El Intermedio 55c puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la preparación de Intermedio 54c en la síntesis del Ejemplo 54.
TLC (gel de sílice, EtOAc al 30 % en hexanos): Fr = 0,8, PMA activo.

Ejemplo 55: 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propilo

25

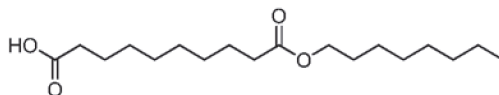


El Ejemplo 55 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 5,43 - 5,29 (m, 4H), 4,41 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,18-4,09 (m, 6H), 3,46 (dd, J = 9,2, 5,7 Hz,

2H), 3,27 (dd, $J = 9,2, 5,8$ Hz, 2H), 2,78 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,67 - 2,54 (m, 2H), 2,47 - 2,37 (m, 1H), 2,36 - 2,28 (m, 4H), 2,25 (s, 3H), 2,17-1,99 (m, 8H), 1,71 - 1,46 (m, 10H), 1,41 - 1,21 (m, 32H), 1,20 (s, 3H), 0,90 (t, $J = 6,9$ Hz, 15H) ppm. MS ($M + 1$) = 862,9, $R_t = 1,16$ min (Método de CL 12).

5 * Síntesis del Ejemplo 56:

Intermedio 56a: ácido 10-(octiloxi)-10-oxodecanoico

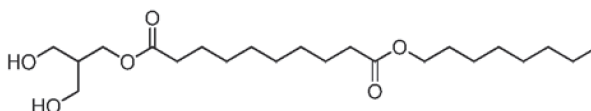


10 A una solución de ácido sebáico (20 g, 98,88 mmol) en 200 ml de DMF se añadió HATU (49 g, 128,55 mmol) y DIPEA (35 ml, 197,77 mmol). Después, se añadió 1-octanol (15,6 ml, 98,88 mmol), seguido de DMAP (6 g, 49,44 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se inactivó con 200 ml de agua y se extrajo con (3 x 100 ml) de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con (2 x 200 ml) de una solución de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a sequedad para proporcionar un líquido viscoso e incoloro en una forma en bruto. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (Gel de Sílice malla 230-400) eluyendo con MeOH al 2 % en DCM para proporcionar 12 g del Intermedio 3a esperado en forma de un sólido de color blanco de baja fusión.

15 TLC: $R_f = 0,6$ (MeOH: DCM, 1:9), PMA activo.

20

Intermedio 56b: 10-octil decanodioato de 1-(3-hidroxi-2-(hidroximetil)propilo)

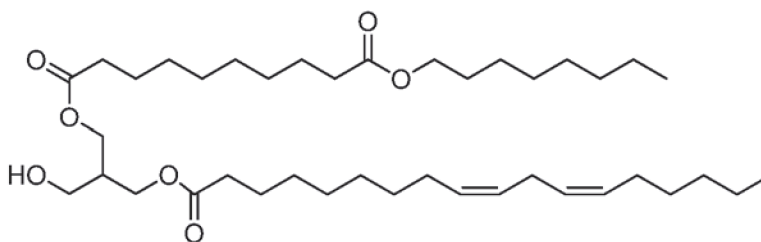


25 A una solución de 2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (2,0 g, 18,84 mmol) y el intermedio 56a (5,9 g, 18,84 mmol) en 50 ml de DMF se añadió HATU (7,1 g, 18,84 mmol) y DIPEA (6,5 ml, 37,69 mmol), seguido de DMAP (230 mg, 1,88 mmol). La reacción se agitó a 30 °C durante 16 h en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se inactivó con 50 ml de agua y se extrajo con (3 x 50 ml) de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a sequedad para proporcionar un material en bruto líquido. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (Gel de Sílice: malla 230-400) eluyendo con EtOAc al 60 %/hexano para proporcionar 1,6 g del producto deseado en forma de un líquido viscoso e incoloro.

30

TLC: $R_f = 0,3$ (EtOAc: Hexano, 1:1), PMA activo.

35 Intermedio 56c: 10-octil decanodioato de 1-(3-hidroxi-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo)

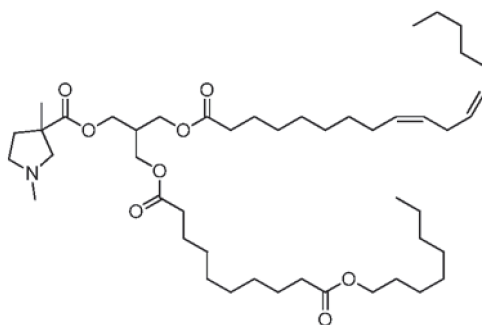


40 A una solución del intermedio 56b (800 mg, 1,99 mmol) y ácido linoleico (560 mg, 1,99 mmol) en 10 ml de DCM se añadió EDC.HCl (570 mg, 2,98 mmol), DIPEA (0,7 ml, 3,96 mmol), después DMAP (24 mg, 0,19 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 h en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se inactivó con 50 ml de agua y se extrajo con (3 x 50 ml) de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a sequedad para proporcionar un material en bruto líquido. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (Gel de Sílice: malla 230-400) eluyendo con EtOAc al 30 %/hexano para proporcionar 500 mg del compuesto deseado, en forma de un líquido viscoso e incoloro.

45

TLC: $R_f = 0,5$ (EtOAc: Hexano, 3:7), PMA activo.

* Ejemplo 56: 10-octil decanodioato de 1-(3-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo)

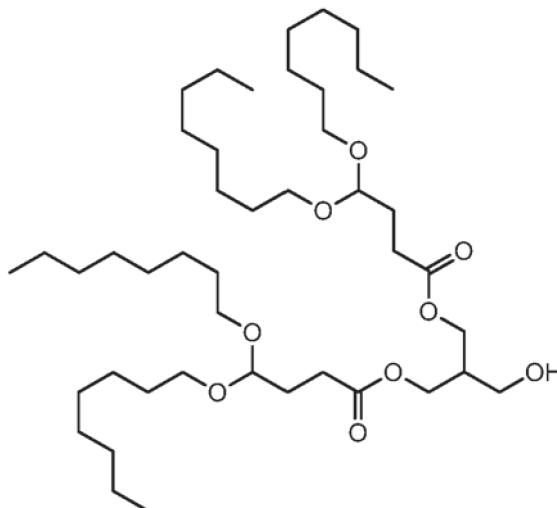


El Ejemplo 56 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

- 5 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,44 - 5,28 (m, 4H), 4,18-4,11 (m, 6H), 4,06 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,94 (d, J = 9,3 Hz, 1H), 2,78 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,63 - 2,54 (m, 2H), 2,50 - 2,35 (m, 3H), 2,35 - 2,25 (m, 9H), 2,06 (c, J = 6,7 Hz, 4H), 1,72 - 1,54 (m, 9H), 1,42 - 1,22 (m, 35H), 0,94 - 0,84 (m, 6H) ppm.
MS ($M + 1$) = 790,7, R_t = 0,99 min (Método de CL 12).

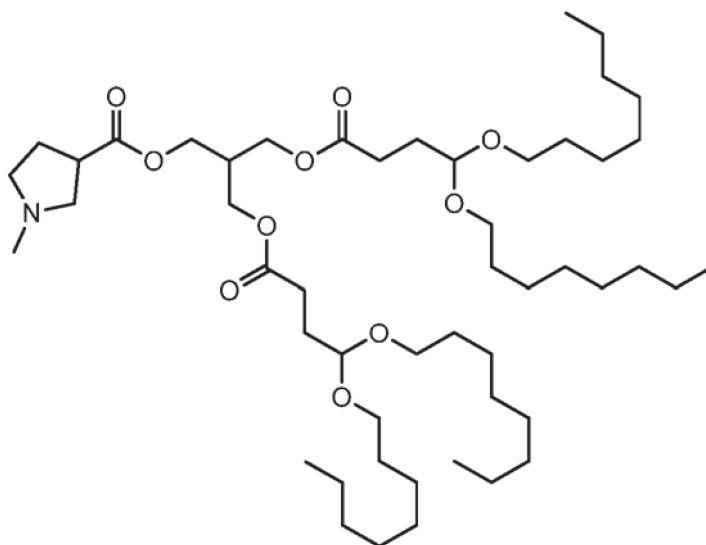
10 Síntesis del Ejemplo 57:

Intermedio 57a: bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato) de 2-(hidroximetil)propano-1,3-diílo



- 15 A una solución de 2(hidroximetil)propano-1,3,diol (0,20 g, 1,88 mmol) y el Intermedio 13b (1,30 g, 3,76 mmol) en 10 ml de DMF se añadió HATU (1,45 g, 3,76 mmol) y DIPEA (1,30 ml, 7,54 mmol), seguido de DMAP (0,046 g, 0,37 mmol) y la mezcla se agitó a 30 °C durante 16 h en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se inactivó con 50 ml de agua y se extrajo con 3 x 50 ml de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a sequedad para proporcionar un aceite en bruto. La mezcla se purificó sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 30 %/heptano para proporcionar 0,50 g del producto deseado.
20 TLC (gel de sílice, EtOAc al 30 %/heptano, tinte de PMA): F_r = 0,46.

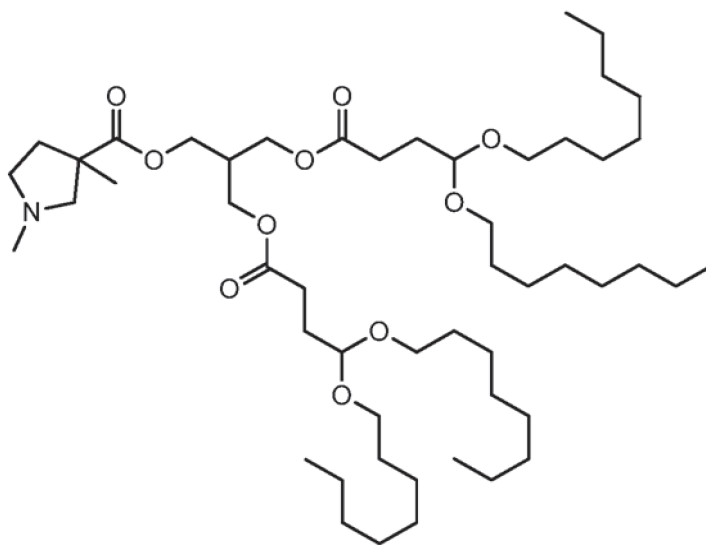
Ejemplo 57: bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato) de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



Los siguientes ejemplos pueden prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1, con el intermedio 57a.

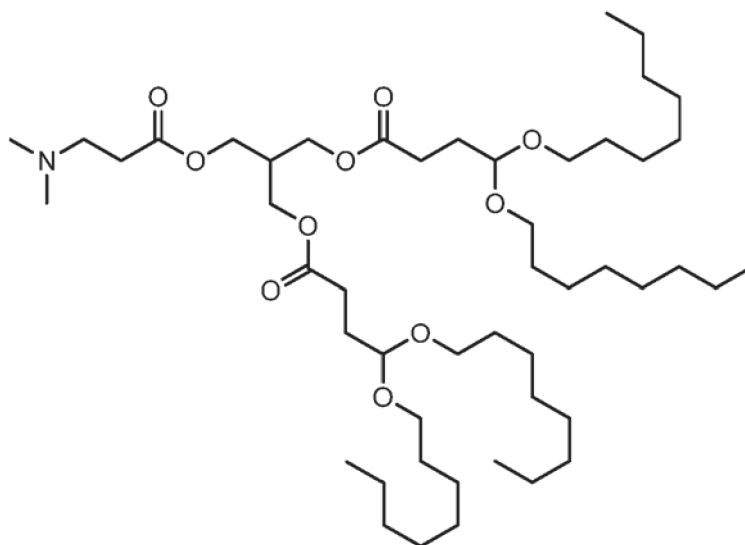
- 5 ^1H RMN (CDCl_3): δ = 4,48 (t, J = 6 Hz, 2H), 4,16 (m, 6H), 3,46 (c, J = 6 Hz, 4H), 3,38 (c, J = 6 Hz, 4H), 3,05 (m, 1H), 2,80 (t, J = 8 Hz, 1H), 2,68-2,42 (m, 4H), 2,38 (t, J = 8 Hz, 5H), 2,32 (s, 3H), 2,10 (c, J = 8 Hz, 2H), 1,90 (c, J = 8 Hz, 4H), 1,48 (m, 7H), 1,30 (m, 40H), 0,82 (m, 12H) ppm.
MS ($M + 1$) = 871,1, R_t = 1,19 min (Método de CL 12).

- 10 * Ejemplo 58: bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato) de 2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



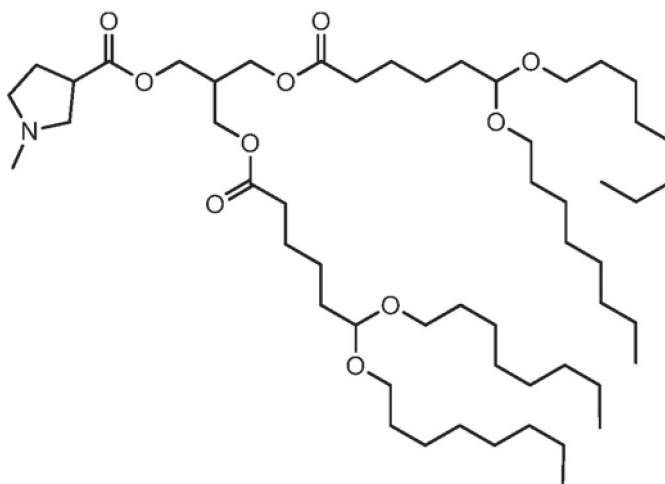
- 15 ^1H RMN (CDCl_3): δ = 4,50 (t, J = 6 Hz, 2H), 4,18 (m, 6H), 3,58 (c, J = 6 Hz, 4H), 3,40 (c, J = 6 Hz, 4H), 2,90 (bm, 1H), 2,58 (bm, 3H), 2,42-2,28 (m, 10H), 1,90 (m, 4H), 1,68 (bm, 2H), 1,58 (m, 6H), 1,38 (s, 3H), 1,22 (m, 40H), 0,82 (m, 12H) ppm.
MS ($M + 1$) = 885,2, R_t = 1,24 min (Método de CL 12).

- 20 * Ejemplo 59: bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato) de 2-(((3-(dimetilamino)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo



5 ^1H RMN (CDCl_3): $\delta = 4,50$ (t, $J = 6$ Hz, 2H), 4,18 (m, 6H), 3,58 (c, $J = 6$ Hz, 4H), 3,38 (c, $J = 6$ Hz, 4H), 2,60 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 2,50 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 2,38 (m, 5H), 2,02 (s, 6H), 1,90 (m, 4H), 1,78 (m, 8H), 1,40-1,20 (m, 40H), 0,82 (m, 12H) ppm.
MS ($M + 1$) = 859,1, $R_t = 1,22$ min (Método de CL 12).

Ejemplo 60: bis(6,6-bis(octiloxi)hexanoato) de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo



10

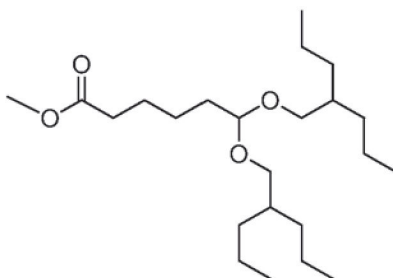
El Ejemplo 60 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del Ejemplo 57 partiendo del intermedio 27a.

15 ^1H RMN (400 MHz, ACETONITRIL- d_3): $\delta = 4,41$ (t, $J = 5,62$ Hz, 2H), 4,15 - 4,06 (m, 6H), 3,52 (dt, $J = 9,35, 6,57$ Hz, 4H), 3,37 (dt, $J = 9,38, 6,50$ Hz, 4H), 3,07 - 2,98 (m, 1H), 2,76 - 2,65 (m, 2H), 2,52 (td, $J = 6,94, 3,48$ Hz, 2H), 2,39 - 2,26 (m, 7H), 2,08 - 1,99 (m, 3H), 1,64 - 1,44 (m, 16H), 1,39 - 1,21 (m, 44H), 0,94 - 0,83 (m, 12H) ppm.
MS ($M + 1$) = 927 $R_t = 2,97$ min (Método de CL 9).

Síntesis del Ejemplo 61:

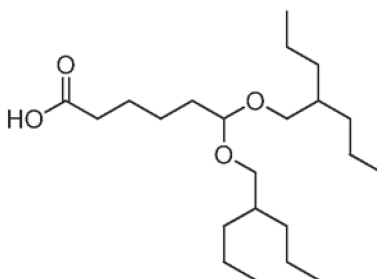
20

Intermedio 61a: 6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoato de metilo



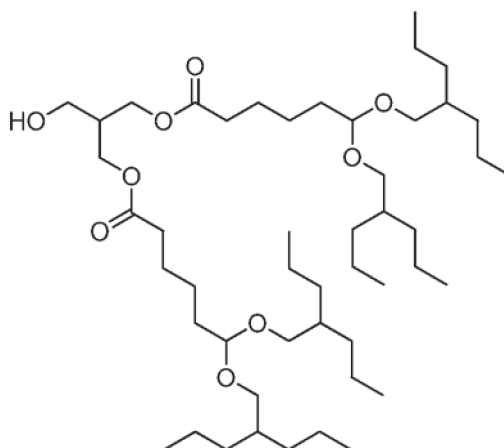
- 5 Una mezcla neta del intermedio 27a (2,50 g, 13,14 mmol), 2-propil pentanol (8,24 ml, 52,57 mmol) y KHSO_4 (0,050 g) se calentó a 70 °C durante 3 h. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 80 ml de agua, después se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con 100 ml de salmuera, después se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron para obtener un aceite incoloro. La mezcla en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 3 %/heptano para proporcionar 2,20 g del producto deseado.
- 10 TLC (gel de sílice, EtOAc al 10 %/heptano, tinte de PMA): $F_r = 0,88$.

Intermedio 61b: ácido 6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoico



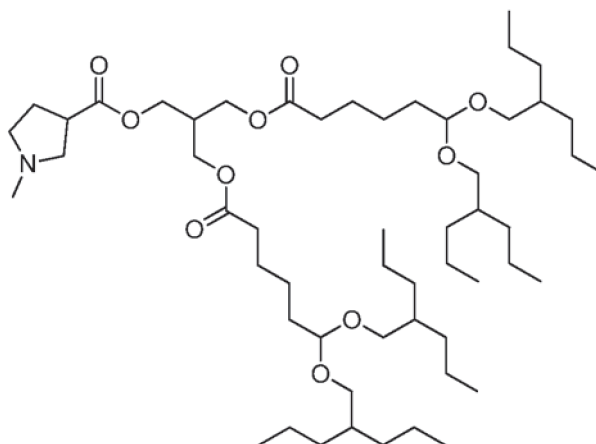
- 15 Una solución del intermedio 61a (2,20 g, 5,69 mmol) en 100 ml de agua/metanol/THF (1:1:1) se trató con NaOH sólido (1,13 g, 28,42 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. Después, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se neutralizó con HCl 1 N. La mezcla acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 100 ml) y las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron para dar un líquido incoloro (2,0 g). El producto en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación.
- 20 TLC (gel de sílice, EtOAc al 10 %/heptano, tinte de PMA): $F_r = 0,14$.

Intermedio 61c: bis(6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoato) de 2-(hidroximetil)propano-1,3-díolo



- 25 A una solución de 2(hidroximetil)propano-1,3,diol (0,40 g, 3,77 mmol) y el Intermedio 61b (1,41 g, 3,77 mmol) en DCM (40 ml) se añadió EDC.HCl (1,08 g, 5,65 mmol) y TEA (1,60 ml, 11,30 mmol), seguido de DMAP (0,46 g, 3,77 mmol). La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con DCM (2 x 150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (100 ml), se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron para obtener un líquido de color verde pálido. La mezcla en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 20-30 %/heptano para proporcionar 0,51 g del producto deseado.
- 30 TLC (gel de sílice, EtOAc al 30 %/heptano, tinte de PMA): $F_r = 0,83$.

Ejemplo 61: bis(6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoato) de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo



5

El Ejemplo 61 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

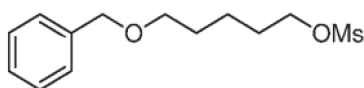
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 4,41 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 4,19 - 4,09 (m, 6H), 3,46 (dd, J = 9,2, 5,7 Hz, 4H), 3,27 (dd, J = 9,3, 5,9 Hz, 4H), 3,10 - 2,99 (m, 1H), 2,85 - 2,77 (m, 1H), 2,71 - 2,48 (m, 3H), 2,45 - 2,38 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,33 (t, J = 7,7 Hz, 4H), 2,15 - 2,06 (m, 2H), 1,71 - 1,50 (m, 12H), 1,45-1,16 (m, 36H), 0,93 - 0,85 (m, 24H).

10 MS ($M + 1$) = 927,1, Rt = 1,18 min (Método de CL 12).

Síntesis del Ejemplo 62

Intermedio 62a: metanosulfonato de 5-(benciloxi)pentilo

15



Se añadió en una porción Et_3N (10,79 ml, 78 mmol) mediante una jeringa a una solución de 5-benciloxi-1-pentanol (10,08 g, 51,9 mmol) en DCM (75 ml) en un matraz de fondo redondo cargado con una barra de agitación magnética a 0 °C en una atmósfera de N_2 . A continuación, se añadió gota a gota MsCl (4,85 ml, 62,3 mmol) mediante una jeringa en 4 porciones separadas a una velocidad tal que la temperatura interna no excedió 15 °C. Se dejó que la reacción continuara en agitación durante 1 hora, después de lo cual se diluyó con H_2O (200 ml) y DCM (150 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se lavó con DCM (225 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron con Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite de color naranja en bruto (14,46 g).

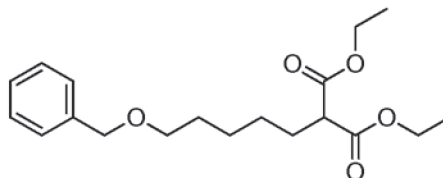
20

25

MS ($M + 1$) = 272,9, Rt = 1,33 min (Método de CL 13).

Intermedio 62b: 2-(5-(benciloxi)pentil)malonato de dietilo

30

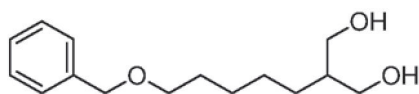


35

A una solución fría, 0 °C, de malonato de dietilo (7,5 g, 46,8 mmol) en DMF seca (100 ml) en una atmósfera de N_2 se añadió en porciones NaH al 60 % (2,23 g, 56,2 mmol) durante 10 min. Se observó desprendimiento de gas. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min, después se añadió gota a gota el Intermedio 62a (14,46 g, 51,5 mmol) en DMF seca (41 ml) durante 10 min, seguido de yoduro de tetrabutamonio (1,73 g, 4,68 mmol). Después, la mezcla se calentó a 100 °C durante 1,5 h. La mezcla se enfrió a ta y se dejó durante una noche. Después, la mezcla se inactivó con NH_4Cl sat. (50 ml) y se diluyó con H_2O (100 ml). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H_2O (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc al 0-30 %/heptano para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite (11,7 g). MS ($M + 1$) = 336,6, Rt = 1,64 min (Método de CL 13).

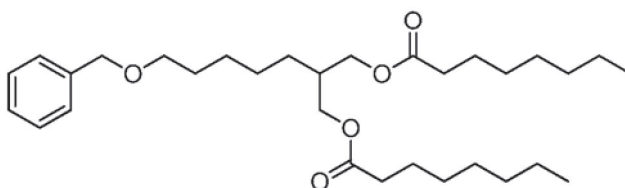
40

Intermedio 62c: 2-(5-(benciloxi)pentil)propano-1,3-diol



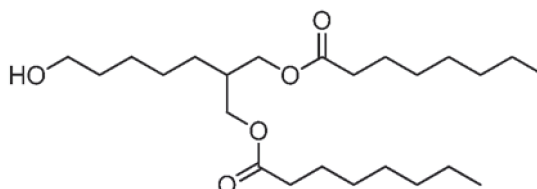
5 A una solución fría, 0 °C, del Intermedio 62b (5,5 g, 16,35 mmol) en THF seco (20 ml) en una atmósfera de N₂ se añadió gota a gota LiAlH₄ 2,0 M en THF (24,52 ml, 49,0 mmol), durante 15 min. La mezcla se dejó calentar a ta y se agitó durante una noche. La mezcla se enfrió a 0 °C, se trató de nuevo con LiAlH₄ 2,0 M en THF (16,35 ml, 32,7 mmol), se dejó calentar a ta y se agitó durante el fin de semana. La reacción se enfrió gota a gota a 0 °C y se interrumpió con EtOAc (9,30 ml) durante 10 min. Después, la mezcla se trató gota a gota con H₂O (3,10 ml), gota a gota con una solución al 15 % de NaOH (3,10 ml) y después gota a gota más cantidad de H₂O (9,30 ml). La mezcla se agitó durante 10
10 30 min a ta. La mezcla se filtró a través de una capa de Celite. El Celite se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido semi ceroso (1,52 g). MS (M + 1) = 253,0, Rt = 1,37 min (Método de CL 13).

15 Intermedio 62d: dioctanoato de 2-(5-(benziloxi)pentil)propano-1,3-diilo



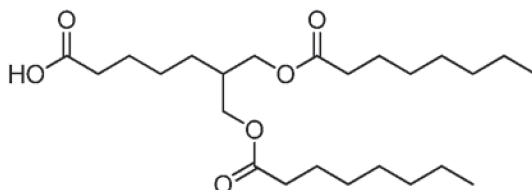
20 Se añadió gota a gota piridina (1,21 ml, 14,96 mmol) mediante una jeringa durante 30 segundos a una solución del Intermedio 62c (1,51 g, 5,98 mmol) en DCM (20 ml) en un matraz de fondo redondo cargado con una barra de agitación magnética a 0 °C en una atmósfera de N₂. A continuación, se añadió gota a gota cloruro de octanoilo (2,145 ml, 12,57 mmol) mediante una jeringa durante varios minutos y la reacción se dejó calentar a ta y se agitó durante una noche. La mezcla se diluyó con NH₄Cl sat. (100 ml) y CH₂Cl₂ (100 ml). La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (100 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc al 0-10 %/heptano para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (2,88 g). MS (M + 1) = 505,6, Rt = 1,77 min (Método de CL 14).

25 Intermedio 62e: dioctanoato de 2-(5-hidroxipentil)propano-1,3-diilo



30 A una solución del Intermedio 62d (2,5 g, 4,95 mmol) en MeOH (25 ml) a ta se añadió Pd al 10 %/C, tipo degusa húmedo (264 mg). La mezcla se agitó en una atmósfera de globo de H₂ durante una noche. La mezcla de reacción en bruto se filtró a través de una capa de celite y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (2,0 g). ¹H RMN (400 MHz, CD₂Cl₂) δ = 4,11 - 3,96 (m, 4H), 3,59 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,28 (t, J = 7,5 Hz, 4H), 2,04 - 1,91 (m, 1H), 1,66-1,48 (m, 7H), 1,41 - 1,34 (m, 6H), 1,34 - 1,20 (m, 16H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 6H).

40 Intermedio 62f: ácido 7-(octanoiloxi)-6-((octanoiloxi)metil)heptanoico

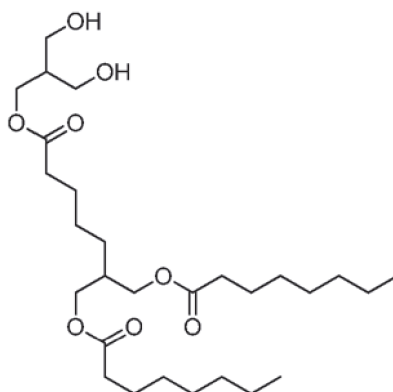


45 Se añadió en una porción TEMPO (0,151 g, 0,965 mmol) al Intermedio 62e (2,0 g, 4,82 mmol) en MeCN:H₂O (46,84 ml, proporción 1:1) en un vial cargado con una barra de agitación magnética a ta. A continuación, se añadió en una porción diacetato de yodobenceno (3,42 g, 10,61 mmol) y la reacción se dejó continuar en agitación a ta durante una noche, después de lo cual la reacción se interrumpió con tiosulfato sódico acuoso al 15 % (50 ml). La reacción se

diluyó con H₂O y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo pálido. El aceite se disolvió en tolueno (15 ml) y se concentró a presión reducida (x 6) para proporcionar un aceite de color amarillo pálido, que se disolvió en DCM y se concentró a presión reducida (x 3) para proporcionar el compuesto del título (más impurezas aromáticas menores que podrían corresponder a tolueno residual o yodobenceno) en forma de un aceite de color amarillo pálido (2,0 g).

MS (M - 1) = 427,2, Rt = 1,73 min (Método de CL 15).

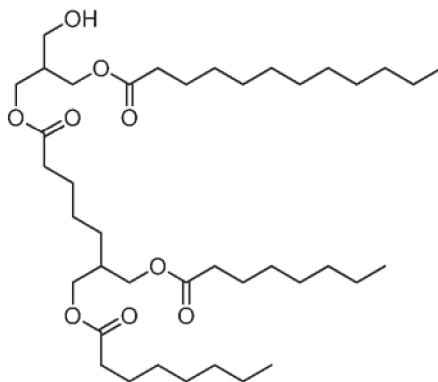
Intermedio 62g: dioctanoato de 2-(5-(3-hidroxi-2-(hidroximetil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diilo



En un matraz de fondo redondo de 250 ml, el intermedio 62f (5,0 g, 11,67 mmol), DMAP (0,285 g, 2,333 mmol), DIPEA (3,06 ml, 17,50 mmol) y 2-(hidroximetil)propano-1,3-diilo (1,238 g, 11,67 mmol) se recogieron en diclorometano (35 ml) y DMF (17,5 ml). Se añadió en una porción EDC.HCl (3,35 g, 17,50 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se concentró a presión reducida a 40 °C, calentando para retirar la DMF. La mezcla en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 2,35 g del producto deseado en forma de un aceite incoloro.

MS (M + 1) = 517,6, Rt = 0,72 min (Método de CL 10).

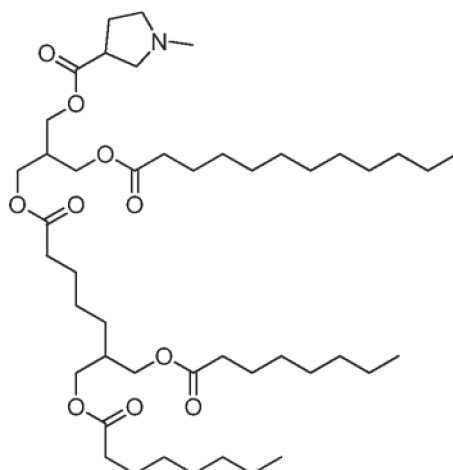
Intermedio 62h: dioctanoato de 2-(5-(3-(dodecanoiloxi)-2-(hidroximetil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diilo



En un matraz de fondo redondo, el intermedio 62g (326 mg, 0,631 mmol), DMAP (14,03 mg, 0,115 mmol), DIPEA (0,150 ml, 0,861 mmol) y ácido dodecanoico (115 mg, 0,617 mmol) se recogieron en diclorometano (3 ml). Se añadió en una porción EDC.HCl (165 mg, 0,861 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de 18 h, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 201 mg del producto deseado.

EM (M + Na) = 721,8, Rt = 1,14 min (Método de CL 10).

Ejemplo 62: dioctanoato de 2-(5-(3-(dodecanoiloxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diilo

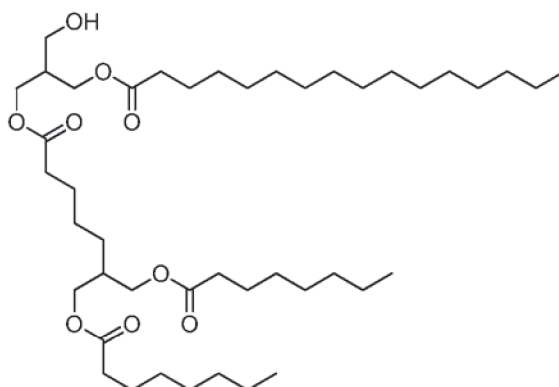


El Ejemplo 62 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

- 5 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 4,19-4,02 (m, 10H), 3,38 (m, 2H), 3,16 (m, 1H), 2,69 (m, 4H), 2,44-2,30 (m, 10H), 2,0 (m, 1H), 1,63 (m, 8H), 1,40-1,28 (m, 38H), 0,9 (m, 9H) ppm.
MS (M + 1) = 810,9, Rt = 0,93 min (Método de CL 10).

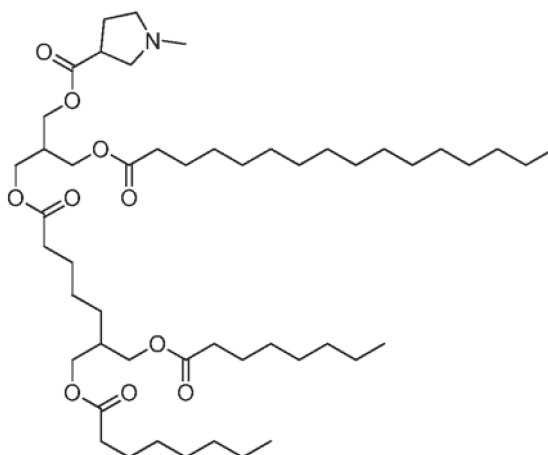
Síntesis del Ejemplo 63

- 10 Intermedio 63a: dioctanoato de 2-(5-(3-hidroxi-2-((palmitoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo



- 15 En un matraz de fondo redondo, el intermedio 62g (363 mg, 0,702 mmol), DMAP (14,29 mg, 0,117 mmol), DIPEA (0,153 ml, 0,877 mmol) y ácido palmítico (150 mg, 0,585 mmol) se recogieron en diclorometano (3 ml). Se añadió en una porción EDC.HCl (168 mg, 0,877 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se purificó directamente por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 265 mg del producto deseado en forma de un aceite incoloro.
EM (M + Na) = 777,9, Rt = 1,44 min (Método de CL 10).

- 20 Ejemplo 63: dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-((palmitoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo



El Ejemplo 63 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

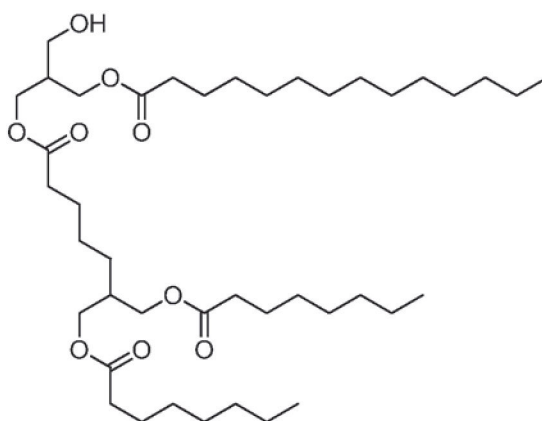
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 4,20-4,02 (m, 10H), 3,81 (m, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,25 (m, 1H), 2,95 (m, 4H), 2,65 (m, 1H),

5 2,36-2,30 (m, 12H), 1,40-1,28 (m, 52H), 0,90 (m, 9H) ppm.

MS ($M + 1$) = 867, R_t = 0,80 min (Método de CL 10).

Síntesis del Ejemplo 64

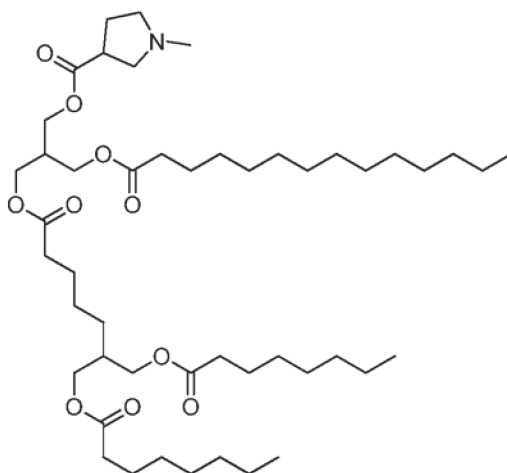
10 Intermedio 64a: dioctanoato de 2-(5-(3-hidroxi-2-((tetradecanoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo



En un matraz de fondo redondo, el Intermedio 62g (311 mg, 0,602 mmol), DMAP (13,37 mg, 0,109 mmol), DIPEA (0,143 ml, 0,821 mmol) y ácido tetradecanoico (125 mg, 0,547 mmol) se recogieron en diclorometano (3 ml). Se añadió en una porción EDC.HCl (157 mg, 0,821 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se purificó directamente por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 200 mg del producto deseado.

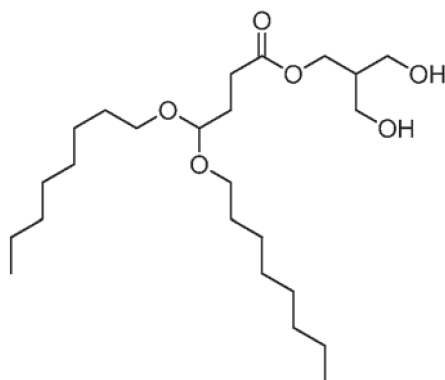
EM ($M + \text{Na}$) = 749,8, R_t = 1,28 min (Método de CL 10).

20 Ejemplo 64: dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-((tetradecanoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-diílo



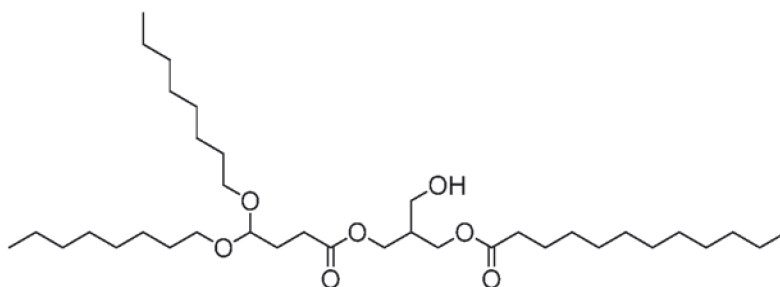
5 El Ejemplo 64 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.
 ^1H RMN(400 MHz, CDCl_3): δ = 4,16 (m, 6H), 4,06 (m, 4H), 3,38 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 2,79 (m, 3H), 2,36 (m, 11H), 2,0 (m, 1H), 1,62 (m, 9H), 1,40-1,28 (m, 42H), 0,9 (m, 9H) ppm. MS (M + 1) = 838,9, Rt = 0,75 min (Método de CL 10).

Síntesis de Ejemplo 65, Intermedio 65a: 4,4-bis(octiloxi)butanoato de 3-hidroxi-2-(hidroximetil)propilo



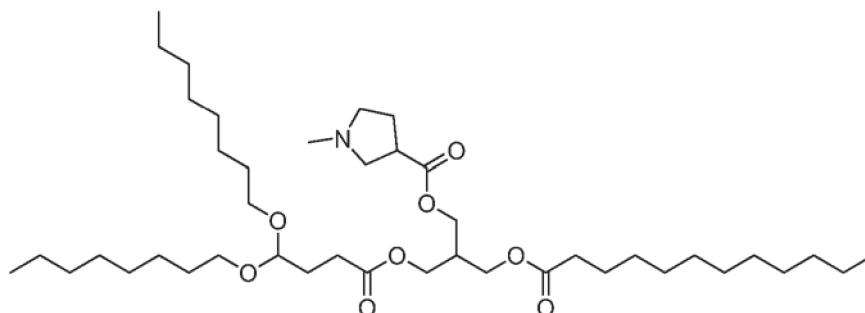
10 El Intermedio 13b, (7,6 g, 22,06 mmol), DMAP (0,539 g, 4,41 mmol), DIPEA (7,71 ml, 44,1 mmol) y 2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (4,68 g, 44,1 mmol) se recogieron en diclorometano (100 ml) y DMF (50 ml) en un matraz de fondo redondo. Se añadió en una porción EDC.HCl (8,46 g, 44,1 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La reacción se concentró al vacío para retirar la DMF. El producto en bruto se diluyó y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 3,72 g del producto deseado en forma de un aceite incoloro. EM (M + Na) = 455,5, Rt = 0,81 min (Método de CL 10).

Intermedio 65b: dodecanoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo



20 El Intermedio 65a (321 mg, 0,741 mmol), DMAP (16,47 mg, 0,135 mmol), DIPEA (0,177 ml, 1,011 mmol) y ácido dodecanoico (135 mg, 0,674 mmol) se recogieron en diclorometano (3 ml) en un matraz de fondo redondo. Se añadió en una porción EDC.HCl (194 mg, 1,011 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla en bruto se purificó directamente por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 195 mg del producto deseado en forma de un aceite incoloro. EM (M + Na) = 637,7, Rt = 1,35 min (Método de CL 10).

Ejemplo 65: 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((dodecanoiloxi)metil)propilo



5

El Ejemplo 65 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

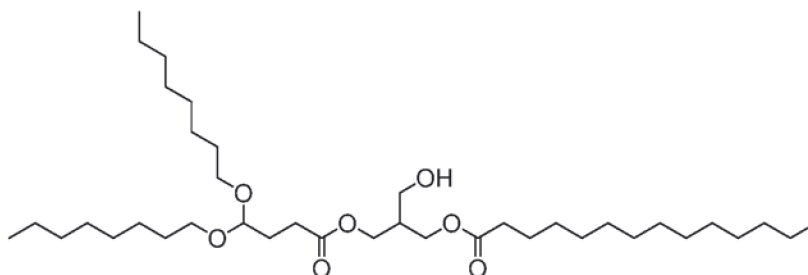
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 4,50 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,16 (m, 6H), 3,57 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,42 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,95 (bm, 1H), 2,71 (bm, 2H), 2,42 (m, 4H), 2,33 (m, J = 7,6 Hz, 3H), 1,93 (td, J = 7,5, 5,6 Hz, 2H), 1,57 (m, 7H), 1,28 (m, 40H), 0,92 (m, 9H) ppm.

10 MS ($M + 1$) = 726,8, R_t = 0,99 min (Método de CL 10).

Síntesis del Ejemplo 66

Intermedio 66a: tetradecanoato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo

15

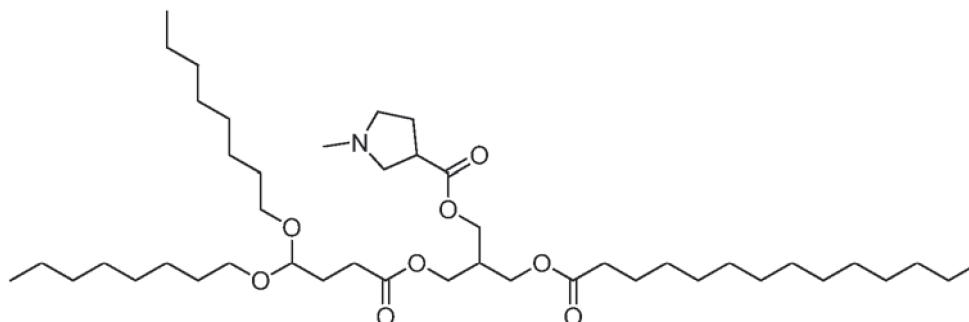


El Intermedio 65a (313 mg, 0,723 mmol), DMAP (16,05 mg, 0,131 mmol), DIPEA (0,172 ml, 0,985 mmol) y ácido tetradecanoico (150 mg, 0,657 mmol) se recogieron en diclorometano (30 ml) en un matraz de fondo redondo. Se añadió en una porción EDC.HCl (189 mg, 0,985 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El producto en bruto se purificó directamente por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 200 mg del producto deseado en forma de un aceite incoloro.

20

MS ($M + 23$) = 665,8, R_t = 1,51 min (Método de CL 10).

25 Ejemplo 66: 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((tetradecanoiloxi)metil)propilo



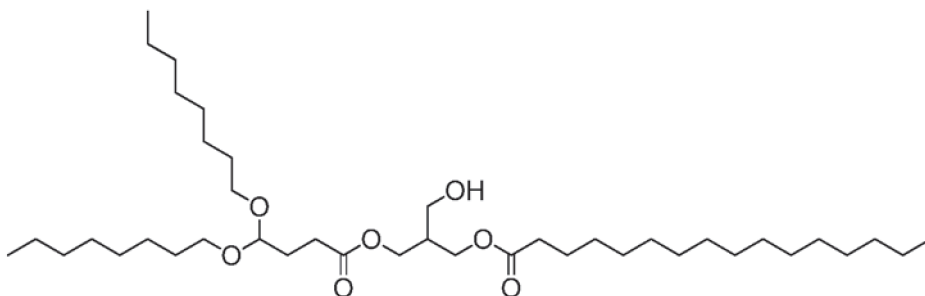
El Ejemplo 66 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

30 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 4,52 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 4,16 (m, 6H), 3,58 (dt, J = 9,2, 6,7 Hz, 2H), 3,42 (m, 1H), 2,92 (bm, 4H), 2,56 (bm, 1H), 2,52 (bm, 1H), 2,42 (m, 4H), 2,33 (m, 2H), 1,93 (m, 2H), 1,57 (m, 7H), 1,30 (m, 43H), 0,92 (m, 9H) ppm.

MS ($M + 1$) = 754,9, R_t = 0,79 min (Método de CL 10).

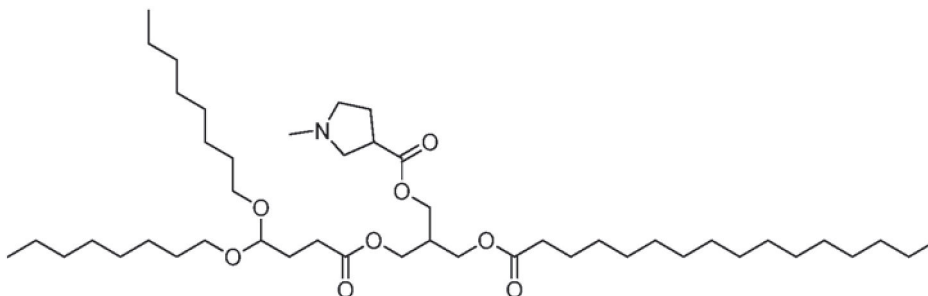
35 Síntesis del Ejemplo 67

Intermedio 67a: palmitato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo



- 5 El Intermedio 65a (306 mg, 0,708 mmol), DMAP (15,72 mg, 0,129 mmol), DIPEA (0,169 ml, 0,965 mmol) y ácido palmítico (165 mg, 0,643 mmol) se recogieron en diclorometano (30 ml) en un matraz de fondo redondo. Se añadió en una porción EDC.HCl (185 mg, 0,965 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El producto en bruto se purificó directamente por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con EtOAc al 0-50 %/heptano para proporcionar 194 mg del producto deseado en forma de un aceite incoloro.
- 10 EM (M + Na) = 693,8, Tr = 2,32 min (método de LC 12).

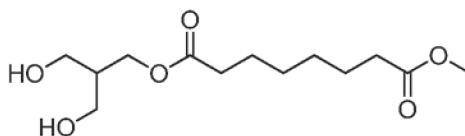
Ejemplo 67: 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((palmitoiloxi)metil)propilo



- 15 El Ejemplo 67 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.
- ^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2): δ = 4,48 (t, J = 8 Hz, 1H), 4,16 (m, 6H), 3,57 (m, 2H), 3,42 (m, 2H), 3,20 (bm, 1H), 2,56 (bm, 1H), 2,52 (bm, 1H), 2,39 (m, 8H), 2,22 (bm, 2H), 1,91 (m, 2H), 1,57 (m, 7H), 1,30 (m, 45H), 0,92 (m, 9H) ppm.
- 20 MS (M + 1) = 782,9, Rt = 0,83 min (Método de CL 10).

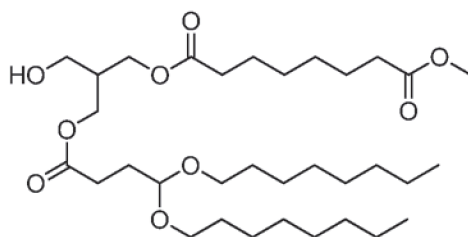
Síntesis del Ejemplo 68:

Intermedio 68a: 8-metil octanodioato de 1-(3-hidroxi-2-(hidroximetil)propilo)



- 25 A una solución de 2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (1,0 g, 9,423 mmol) y monometil éster del ácido subérico (1,77 g, 9,423 mmol) en DMF (20 ml) en un MFR de 50 ml cargado con una barra de agitación magnética se añadió HATU (3,9 g, 10,365 mmol), después DIPEA (3,3 ml, 18,846 mmol), seguido de DMAP (115 mg, 0,942 mmol). La reacción se agitó a 30 °C en una atmósfera de N_2 durante 16 horas, después de lo cual se interrumpió con H_2O (50 ml). La capa orgánica se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron a sequedad para proporcionar un líquido en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con MeOH:DCM (producto eluido a MeOH al 4 %:DCM) para proporcionar el producto deseado en forma de un líquido viscoso e incoloro (1,0 g).
- 30
- 35 TLC: Fr = 0,1 (EtOAc: Hexano, 1:1), PMA activo.

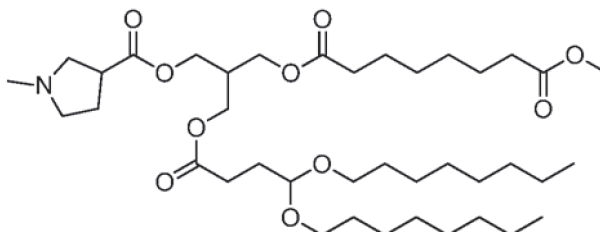
Intermedio 68b: 8-metil octanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo)



A una solución del Intermedio 68a (1,0 g, 3,623 mmol) y el intermedio 13b en DMF (30 ml) en un MFR de 50 ml cargado con una barra de agitación magnética se añadió HATU (1,4 g, 3,623 mmol), después DIPEA (1,3 ml, 7,246 mmol), seguido de DMAP (44 mg, 0,362 mmol). La reacción se agitó a 30 °C durante 16 horas en una atmósfera de N₂, después de lo cual se interrumpió con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad para proporcionar un líquido en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc:hexano (producto eluido a EtOAc al 30 %:hexano) para proporcionar el producto deseado en forma de un líquido de color amarillo pálido (550 mg).

TLC: Fr = 0,8 (EtOAc: Hexano, 1:1), PMA activo.

Ejemplo 68: 8-metil octanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo)



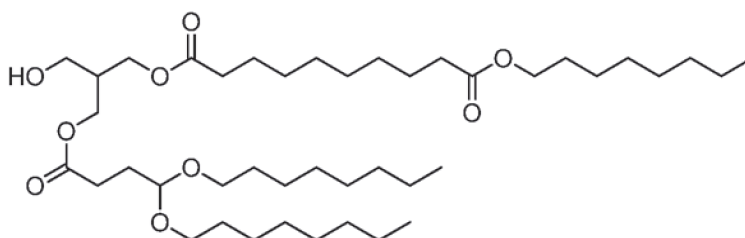
El Ejemplo 68 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,48 (t, J = 4 Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 3,65 (s, 3H), 3,48 (m, 2H), 3,28 (m, 2H), 3,10 (m, 1H), 2,82 (m, 1H), 2,70-2,52 (m, 3H), 2,40 (m, 6H), 2,30 (t, J = 7,2 Hz, 4H), 2,10 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,60 (m, 6H), 1,30 (m, 26H), 0,82 (m, 6H) ppm.

MS (M + 1) = 714,7, Rt = 0,65 min (Método de CL 10).

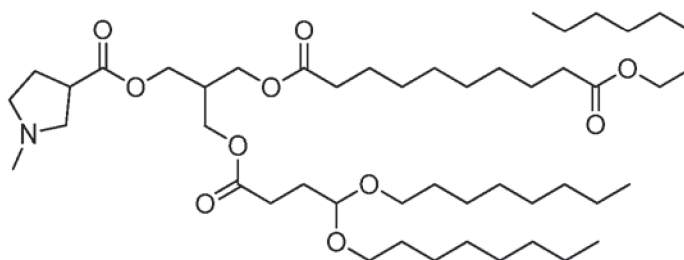
Síntesis del Ejemplo 69:

Intermedio 69a: 10-octil decanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo)



A una solución del intermedio 56a (1,0 g, 2,485 mmol) y el intermedio 13b (855 mg, 2,485 mmol) en DMF (30 ml) en un MFR cargado con una barra de agitación magnética se añadió HATU (944 mg, 2,485 mmol) y DIPEA (0,9 ml, 4,970 mmol), seguido de DMAP (60 mg, 0,497 mmol). La reacción se agitó a 30 °C en una atmósfera de N₂ durante 16 horas, después de lo cual se interrumpió con H₂O (50 ml). La capa orgánica se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad para proporcionar un líquido en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc:hexano (producto eluido a EtOAc al 30 %:hexano) para proporcionar el producto deseado en forma de un líquido viscoso e incoloro (500 mg). TLC: Fr = 0,5 (EtOAc: Hexano, 3:7), PMA activo.

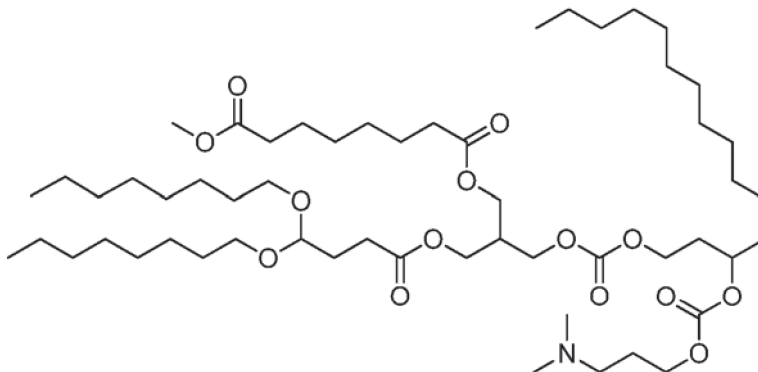
Ejemplo 69: 8-metil octanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo)



El Ejemplo 69 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 4,48 (m, 1H), 4,18-4,02 (m, 8H), 3,48 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,02 (m, 1H), 2,80 (t, J = 8,4 Hz, 1H), 2,64-2,44 (m, 3H), 2,38 (m, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,24 (m, 4H), 2,08 (m, 2H), 1,86 (m, 2H), 1,60 (m, 10H), 1,25 (m, 38H), 0,82 (m, 9H) ppm.
MS (M + 1) = 840,8 Rt = 0,77 min (Método de CL 10).

* Ejemplo 70: 8-metil octanodioato de 1-(16-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)metil)-9-dodecil-2-metil-7,13-dioxo-6,8,12,14-tetraoxa-2-azaheptadecan-17-ilo)

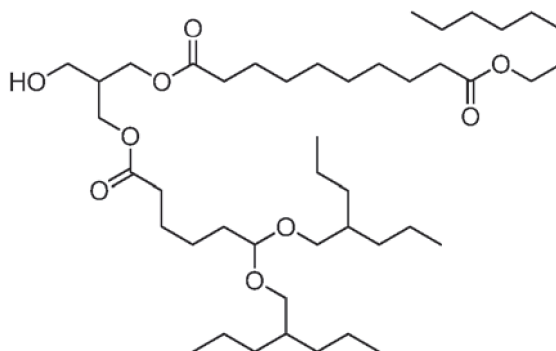


A una solución del intermedio 74e (descrito posteriormente, 372 mg, 0,995 mmol) en DCM (10 ml) en un MFR cargado con una barra de agitación magnética se añadió Et₃N (0,42 ml, 2,985 mmol) seguido de adición lenta de cloroformiato de 4-nitrofenilo (346 mg, 1,716 mmol) y DMAP (243 mg, 1,990 mmol). La solución de color rojo resultante se agitó durante 1 hora, después de lo cual el intermedio 68b (600 mg, 0,995 mmol) se añadió en forma de una solución en DCM (5 ml). La reacción se agitó durante 17 horas, después de lo cual se interrumpió con H₂O (50 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad para proporcionar un material en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice eluyendo con MeOH:DCM (producto eluido a MeOH al 4 %:DCM) para proporcionar el producto deseado en forma de un líquido viscoso e incoloro (400 mg).

¹H RMN(400 MHz, CDCl₃): δ = 4,80 (m, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,20-4,10 (m, 10H), 3,66 (s, 3H), 3,58 (m, 2H), 3,38 (m, 2H), 2,42-2,18 (m, 9H), 2,22 (s, 6H), 1,98-1,80 (m, 6H), 1,60 (m, 12H), 1,38-1,20 (m, 42H), 0,82 (m, 9H) ppm.
MS (M + 1) = 1003,3, Rt = .83 min (Método de CL 10).

Síntesis del Ejemplo 71:

Intermedio 71a: 10-octil decanodioato de 1-(3-(((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo)



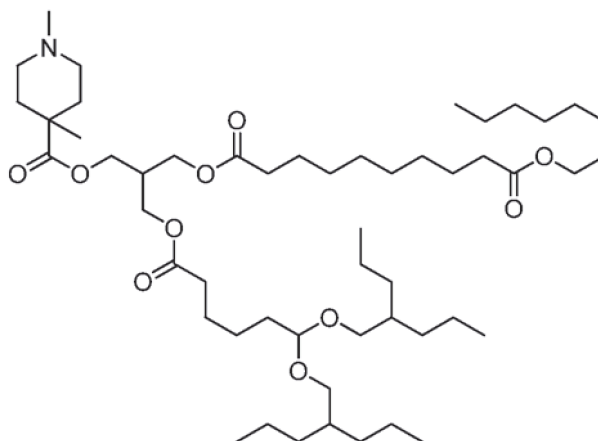
A una solución del intermedio 56b (700 mg, 1,739 mmol) y el intermedio 61b (650 mg, 1,739 mmol) en DMF (15 ml)

en un MFR cargado con una barra de agitación magnética se añadió HATU (794 mg, 2,086 mmol) y DMAP (43 mg, 0,347 mmol), seguido de DIPEA (0,4 ml, 2,086 mmol). La reacción se agitó a 30 °C en una atmósfera de N₂ durante 16 horas, después de lo cual se interrumpió con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad para proporcionar un líquido en bruto de color amarillo pálido. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc:hexano (producto eluido a EtOAc al 20 %:hexano) para proporcionar el producto deseado en forma de un líquido incoloro (700 mg). TLC: Fr = 0,6 (EtOAc: Hexano, 3:7), PMA activo.

5

10

Ejemplo 71: 10-octil decanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propilo)



A una solución de ácido 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxílico (218 mg, 1,387 mmol) y Et₃N (0,52 ml, 3,7 mmol) en DCM (10 ml) en un MFR cargado con una barra de agitación magnética se añadió lentamente gota a gota cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (340 mg, 1,387 mmol) a 30 °C. La reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 4 horas, después de lo cual se añadió el intermedio 71a (700 mg, 0,925 mmol) en forma de una solución en DCM (5 ml). A continuación, se añadió DMAP (226 mg, 1,850 mmol) y la reacción se agitó durante 20 horas, después de lo cual se interrumpió con H₂O (20 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad para proporcionar un sólido en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida de gel de sílice eluyendo con MeOH:DCM (producto eluido a MeOH al 4 %:DCM) para proporcionar el producto deseado en forma de un líquido viscoso de color amarillo pálido (650 mg).

15

20

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,41 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,18 - 4,11 (m, 6H), 4,06 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,45 (dd, J = 9,2, 5,7 Hz, 2H), 3,26 (dd, J = 9,2, 5,8 Hz, 2H), 2,69-2,51 (s a, 2H), 2,47 - 2,37 (m, 1H), 2,36-2,20 (m, 9H), 2,18-1,99 (m, 4H), 1,71 - 1,45 (m, 14H), 1,44 - 1,17 (m, 36H), 1,20 (s, 3H), 0,95 - 0,83 (m, 15H) ppm.

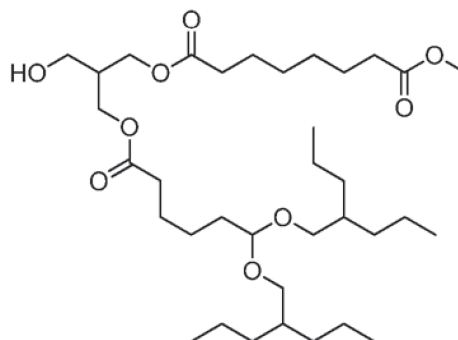
25

MS (M + 1) = 896,7, Rt = 2,61 min (Método de CL 9).

Síntesis del Ejemplo 72:

30

Intermedio 72a: 8-metil octanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propilo)



A una solución del intermedio 68a (1,0 g, 3,623 mmol) y el intermedio 61b (1,34 g, 3,623 mmol) en DMF (15 ml) en un MFR cargado con una barra de agitación magnética se añadió HATU (1,65 mg, 4,347 mmol) y DIPEA (1,3 ml, 7,246 mmol), seguido de DMAP (44 mg, 0,362 mmol). La reacción se agitó a 30 °C en una atmósfera de N₂ durante 16 horas, después de lo cual se interrumpió con H₂O (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad para proporcionar un líquido en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc:hexano (producto eluido a EtOAc al 30 %:hexano) para proporcionar el producto deseado en forma de un líquido incoloro

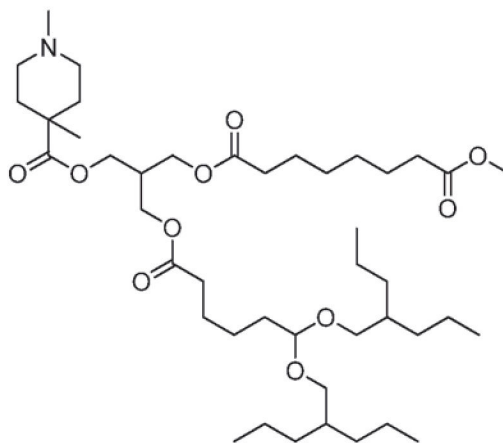
35

40

(830 mg).

TLC: Fr = 0,4 (EtOAc: Hexano, 3:7), PMA activo.

5 Ejemplo 72: 8-metil octanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propilo)

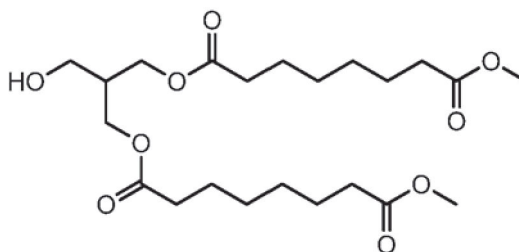


10 A una solución de ácido 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxílico (310 mg, 1,974 mmol) y Et₃N (0,75 ml, 5,264 mmol) en DCM (10 ml) en un MFR cargado con una barra de agitación magnética se añadió lentamente gota a gota cloruro de 2,4,6-triclorobenzoílo (480 mg, 1,974 mmol) a 30 °C. La reacción se agitó en una atmósfera de N₂ durante 4 horas, después de lo cual se añadió el intermedio 72a (830 mg, 1,316 mmol) en forma de una solución en DCM (5 ml). A continuación, se añadió DMAP (320 mg, 2,632 mmol) y la reacción se agitó durante 20 horas, después de lo cual se interrumpió con H₂O (20 ml) y se extrajo con DCM (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad para proporcionar un sólido en bruto. El producto en bruto se purificó por gel de sílice cromatografía ultrarrápida eluyendo con MeOH:DCM (producto eluido a MeOH al 4 %:DCM) para proporcionar el

15 producto deseado en forma de un líquido viscoso de color amarillo pálido (670 mg).
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,41 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,19-4,08 (m, 6H), 3,67 (s, 3H), 3,46 (dd, J = 9,3, 5,7 Hz, 2H), 3,27 (dd, J = 9,2, 5,8 Hz, 2H), 2,70-2,51 (s a, 2H), 2,47-2,37 (m, 1H), 2,37-2,19 (m, 9H), 2,18-1,98 (m, 4H), 1,72 - 1,45 (m, 12H), 1,44 - 1,174 (m, 22H), 1,20 (s, 3H), 0,93 - 0,86 (m, 12H) ppm.
 20 MS (M + 1) = 770,4, Rt = 1,82 min (Método de CL 9).

Síntesis del Ejemplo 73:

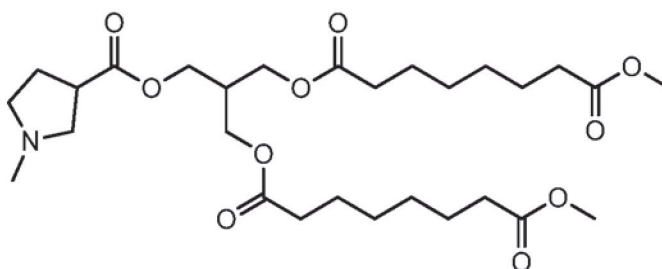
25 Intermedio 73a: 8-dimetil dioctanodioato de O'1,O1-(2-(hidroximetil)propano-1,3-diílo)



30 A una solución de ácido octanodioico, 1-metil éster (2,0 g, 18,18 mmol) y 2(hidroximetil)propano-1,3,diol (3,50 g, 18,18 mmol) en DMF (20 ml) se añadió HATU (7,6 g, 20,00 mmol) y DIPEA(6,30 ml, 36,37 mmol), seguido de DMAP (0,22 g, 1,81 mmol) y la mezcla se agitó a 30 °C durante 16 h en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se inactivó con 50 ml de agua y se extrajo con 3 x 50 ml de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a sequedad para proporcionar un aceite en bruto. La mezcla se purificó sobre gel de sílice, eluyendo con MeOH al 0-5 %/DCM para proporcionar 1,80 g del

35 producto deseado.
 TLC (gel de sílice, MeOH al 10 %/DCM, tinte de PMA): Fr = 0,46.

Ejemplo 73: O'1,O1-(2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diil) dioctanodioato de 8-dimetilo



El Ejemplo 73 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 1.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 4,18 (m, 6H), 3,62 (s, 6H), 3,40-3,02 (m, 4H), 2,80 (m, 1H), 2,62 (s, 3H), 2,30 (m, 11H), 1,62 (m,

5 8H), 1,30 (m, 8H) ppm.

MS ($M + 1$) = 558,2, R_t = 0,17 min (Método de CL 10).

* Síntesis del Ejemplo 74

10 Intermedio 74a: 3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)propanal

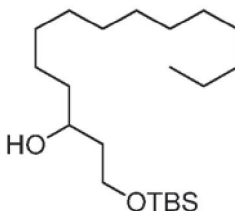


15 En un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación, Se disolvió *tert*-butildimetilsililoxipropanol (20 g, 105 mmol) en DCM (500 ml). Se añadió Et_3N (43,9 ml, 315 mmol). En un segundo matraz equipado con una barra de agitación, $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ (25,1 g, 158 mmol) se disolvió en DMSO (100 ml, 1409 mmol). La solución resultante se añadió gota a gota a la solución de alcohol a 0 °C (en un baño de hielo-agua). La reacción se agitó mientras se agitaba a ta durante el fin de semana. Se añadieron agua y DCM a la mezcla en un embudo de decantación. Después, los extractos orgánicos se lavaron con agua, se extrajeron en DCM, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron (frío)

20 a presión reducida para dar una mezcla del producto en bruto. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM al 100 %) proporcionó el compuesto del título (17,7 g).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 9,81 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 3,99 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,61 (td, J = 6,0, 2,3 Hz, 2H), 0,88 (s, 9H), 0,07 (s, 6H) ppm.

25 Intermedio 74b: 1-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)pentadecan-3-ol



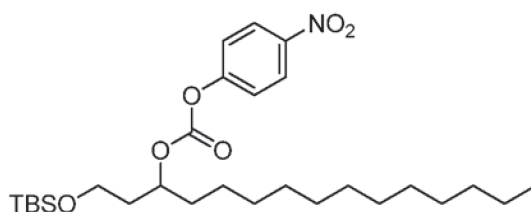
30 En un matraz de fondo redondo, el Intermedio 74a (17,7 g, 94 mmol) se disolvió en THF (100 ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo-agua. Después, se añadió gota a gota bromuro de dodecilmagnesio 1 M en éter dietílico (132 ml, 132 mmol) al aldehído durante 10 min mediante una pipeta, el baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a ta durante 30 min. El matraz de reacción se enfrió de nuevo a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió lentamente una solución de sat. de NH_4Cl para ajustar a pH ~7 (600 ml) y la mezcla se vertió en un embudo de decantación de 1 l. Después, los extractos orgánicos se lavaron con una solución sat. de cloruro de amonio, se extrajeron en EtOAc, se secaron sobre

35 MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar una mezcla del producto en bruto. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (heptanos al 100 % a lo largo de 2 volúmenes de columna, EtOAc del 0 % al 2 %/heptano a lo largo de un 1 volumen de columna, EtOAc al 2 %/Heptano a lo largo de 3 volúmenes de columna, EtOAc del 2 % al 5 %/heptano a lo largo de 1 volumen de columna, después EtOAc al 5 %/heptano a lo largo

40 de 10 volúmenes de columna) proporcionó el compuesto del título (24,9 g).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 3,97-3,87 (m, 1H), 3,87-3,77 (m, 2H), 1,69-1,60 (m, 2H), 1,57-1,36 (m, 3H), 1,361,19

Intermedio 74c: (4-nitrofenil)carbonato de 1-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)pentadecan-3-ilo

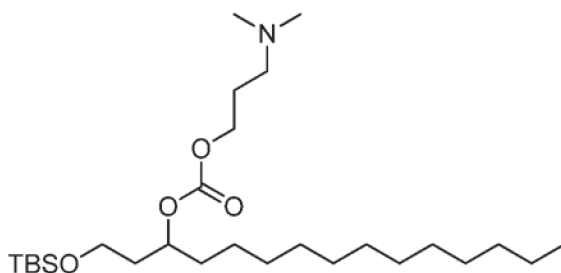


5 Se añadió en una porción carbonocloridato de 4-nitrofenilo (2,08 g, 9,92 mmol) a una solución del Intermedio 74b (2,96 g, 8,27 mmol) en DCM (28 ml) en un matraz de fondo redondo cargado con una barra de agitación magnética a ta. La reacción se equipó con un septo y se puso en una atmósfera de N₂, después de lo cual se añadió gota a gota piridina (1,00 ml, 12,4 mmol) mediante una jeringa durante varios minutos. La reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. Después de 24 horas de tiempo de reacción, la reacción se diluyó con H₂O (100 ml) y DCM (125 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se lavó con DCM (125 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un residuo de color blanquecino. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (columna de 80 g, carga líquida, EtOAc al 0-2,5 %:heptano) para proporcionar 3,14 g del compuesto del título (más picos de impureza menores no identificados) en forma de un aceite incoloro.

10 ¹H RMN (400 MHz, CD₂Cl₂) δ = 8,29 - 8,24 (m, 2H), 7,41 - 7,35 (m, 2H), 5,03 - 4,95 (m, 1H), 3,73 (dd, J = 6,6, 5,7 Hz, 2H), 1,95 - 1,80 (m, 2H), 1,80 - 1,63 (m, 2H), 1,45 - 1,19 (m, 20H), 0,92 - 0,83 (m, 12H), 0,06 (s, 6H) ppm.

15

Intermedio 74d: carbonato de 1-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)pentadecan-3-il (3-(dietilamino)propilo)

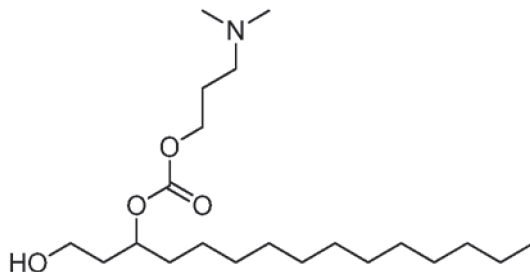


20 A una solución agitada del intermedio 74c (8,00 g, 15,3 mmol) en 50 ml de DCM se añadió 2(dimetilamino)propanol (7,1 ml, 61,1 mmol) y piridina (7,5 ml, 91,7 mmol). Después, se añadió DMAP (3,70 g, 30,5 mmol) y la solución transparente de color amarillo claro se agitó a temperatura ambiente durante 24 h en una atmósfera de nitrógeno. Después, la mezcla se inactivó con 100 ml de agua, se extrajo con DCM (2 x 200 ml) y las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron para proporcionar un aceite de color amarillo. La mezcla en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (eluyendo con MeOH al 4 %/DCM) para proporcionar 4,6 g del producto deseado en forma de un aceite de color amarillo. TLC: Fr = 0,36 (MeOH/DCM, 5:95), PMA activo.

25

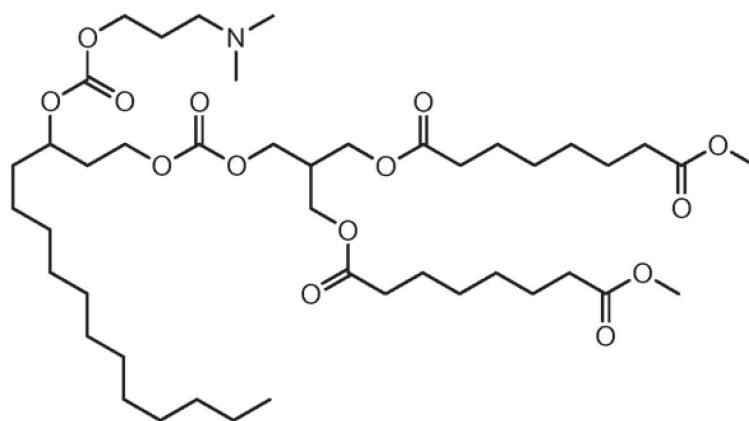
Intermedio 74e: (1-hidroxipentadecan-3-il) carbonato de 3-(dietilamino)propilo

30



35 A una solución del Intermedio 74d (450 mg, 0,923 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C se añadió gota a gota HF piridina (70 %, 1,6 ml, 55,4 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h, después se inactivó lentamente con 50 ml de una solución saturada de bicarbonato sódico. La mezcla en bruto se extrajo con 50 ml de EtOAc y la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se evaporó a presión reducida para proporcionar un aceite de color verde pálido. Esta mezcla se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. TLC: Fr = 0,17 (MeOH/DCM, 5:95), PMA activo.

40 * Ejemplo 74: 8-dimetil dioctanodioato de O'1,O1-(2-(7-dodecil-14-metil-3,9-dioxo-2,4,8,10-tetraoxa-14-azapentadecil)propano-1,3-diilo)



El Ejemplo 74 puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 13.

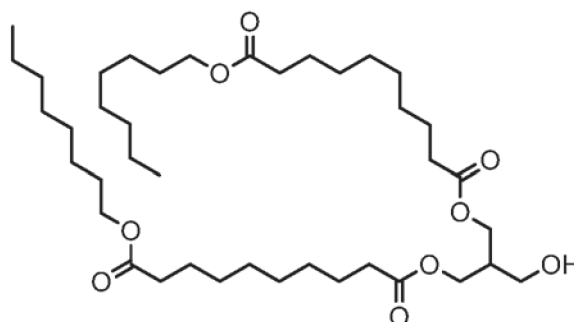
¹H RMN (CDCl₃): δ = 4,80 (m, 1H), 4,18 (m, 10H), 3,62 (s, 6H), 2,42-2,15(m, 11H), 2,20 (s, 6H), 1,98(m, 2H), 1,82(m, 2H), 1,60 (m, 8H), 1,38-1,20 (m, 30H), 0,82 (t, *J* = 8 Hz, 3H) ppm.

5

MS (*M* + 1) = 847,1, *R*_t = 0,52 min (Método de CL 10).

* Síntesis del Ejemplo 75:

10 Intermedio 75a: 10-dioctil bis(decanodioato) de O'1,O1-(2-(hidroximetil)propano-1,3-diilo)

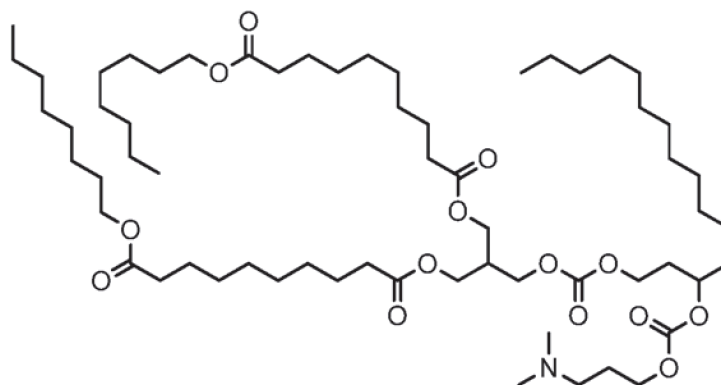


15 El Intermedio 56a (5,9 g, 18,85 mmol) y 2(hidroximetil)propano-1,3,diol (1,0 g, 9,42 mmol) se disolvieron en DMF (50 ml). Se añadió HATU (7,1 g, 18,85 mmol), seguido de DIPEA (3,3 ml, 18,85 mmol) y finalmente DMAP (0,23 g, 1,88 mmol) y la mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con 50 ml de agua y se extrajo con 3 x 50 ml de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera (2 x 50 ml), se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron a sequedad para proporcionar un aceite en bruto. La mezcla se purificó sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 30 %/heptano para proporcionar 1,40 g del producto deseado.

20 TLC (gel de sílice, EtOAc al 30 %/heptano, tinte de PMA): *F*_r = 0,51.

Los siguientes ejemplos pueden prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis de ejemplo 13, con intermedios similares a 74e.

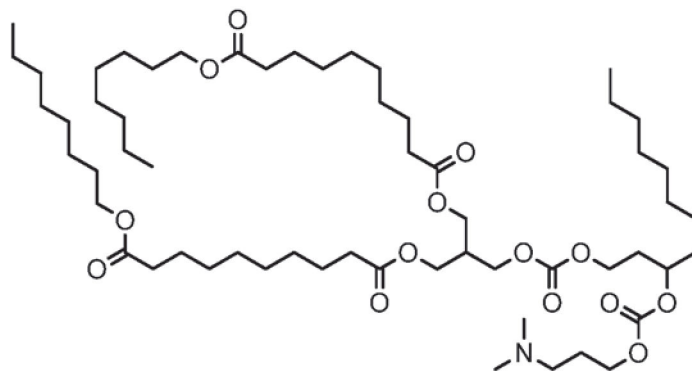
25 * Ejemplo 75: 10-dioctil bis(decanodioato) de O'1,O1-(2-(7-dodecil-14-metil-3,9-dioxa-2,4,8,10-tetraoxa-14-azapentadecil)propano-1,3-diilo)



¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,87 - 4,76 (m, 1H), 4,25-4,11 (m, 10H), 4,06 (t, J = 6,8 Hz, 4H), 2,48-2,40 (m, 1H), 2,37 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,30 (c, J = 7,4 Hz, 8H), 2,24 (s, 6H), 2,01 - 1,92 (m, 2H), 1,90 - 1,80 (m, 2H), 1,70 - 1,52 (m, 14H), 1,40 - 1,20 (m, 56H), 0,93 - 0,83 (m, 9H) ppm.

5 MS (M + 1) = 1099,2, Rt = 1,29 min (Método de CL 12).

*Ejemplo 76: 10-dioctil bis(decanoedioato) de O'1,O1-(2-(14-metil-7-octil-3,9-dioxo-2,4,8,10-tetraoxa-14-azapentadecil)propano-1,3-diilo)



10

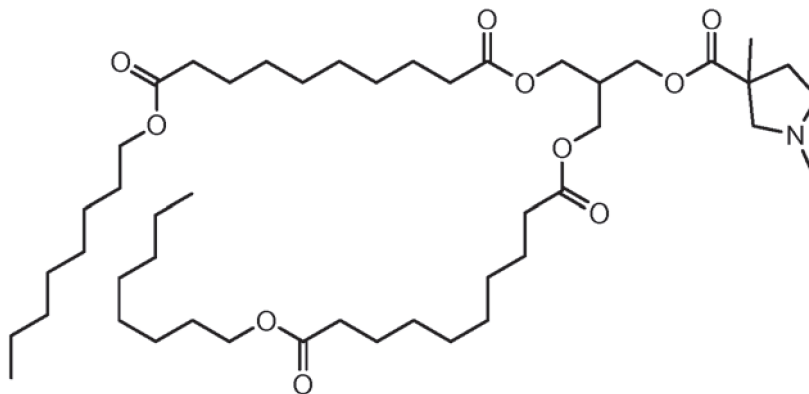
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,86 - 4,77 (m, 1H), 4,27 - 4,10 (m, 10H), 4,06 (t, J = 6,7 Hz, 4H), 2,48 - 2,39 (m, 1H), 2,39 - 2,25 (m, 10H), 2,23 (s, 6H), 2,01 - 1,93 (m, 2H), 1,89 - 1,79 (m, 2H), 1,71 - 1,52 (m, 14H), 1,42 - 1,17 (m, 48H), 0,95 - 0,82 (m, 9H) ppm.

15 MS (M + 1) = 1043,3, Rt = 2,69 min (Método de CL 9).

El siguiente ejemplo puede prepararse usando métodos similares a los empleados para la síntesis del ejemplo 1.

* Ejemplo 77: 10-dioctil bis(decanoedioato) de O'1,O1-(2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo)

20



¹H RMN (400 MHz, ACETONITRILLO-d₃): δ = 4,10 (d, J = 5,87 Hz, 6H), 4,01 (t, J = 6,60 Hz, 4H), 2,86 (d, J = 9,17 Hz, 1H), 2,54-2,47 (m, 2H), 2,40-2,32 (m, 2H), 2,32-2,21 (m, 12H), 1,63-1,51 (m, 12H), 1,37 - 1,25 (m, 40H), 0,92-0,85 (m, 6H) ppm.

25 MS (M+1) = 825, Rt = 2,32 min (Método de CL 9).

Formulaciones lipídicas de ARNip

30 Las nanopartículas lipídicas (LNP) se formaron mezclando volúmenes iguales de lípidos disueltos en alcohol con ARNip disuelto en un tampón de citrato mediante un proceso de chorro de impacto. La solución lipídica contiene un compuesto lipídico catiónico de la invención, un lípido auxiliar (colesterol), un lípido neutro opcional (DSPC) y un lípido PEG (PEG) a una concentración de 8-16 mg/ml con una objetivo de 12 mg/ml en un alcohol. La relación de ARNip con respecto a lípidos totales es de aproximadamente 0,05 (p/p). Cuando una formulación de LNP contiene cuatro

35 componentes lipídicos, las relaciones molares de los lípidos varían de 20 a 70 por ciento molar para el lípido catiónico con un objetivo de 40-60, el porcentaje molar de lípidos auxiliares varía de 20 a 70 con un objetivo de 30 a 50, el porcentaje molar de lípidos neutros varía de 0 a 30, el porcentaje molar de lípido PEG tiene un intervalo de 1 a 6 con un objetivo de 2 a 5. La concentración de la solución de ARNip varía de 0,7 a 1,0 mg/ml con un objetivo de 0,8 a 0,9 mg/ml en un tampón de citrato de sodio: cloruro de sodio pH 4-6, con un objetivo de 4,5 -5,5. Los LNP se forman

40 mezclando volúmenes iguales de solución de lípidos en etanol con ARNip disuelto en un tampón de citrato mediante

un proceso de chorro de impacto a través de un dispositivo de mezcla con ID que varía de 0,25 a 2,0 mm a un caudal de 10 a 640 ml/min. La solución de LNP mixta se mantiene a temperatura ambiente durante 0-24 h antes de una etapa de dilución. Después, la solución se concentra y se diafiltra con tampón adecuado mediante ultrafiltración o proceso de diálisis usando membranas con un punto de corte de PM de 30 a 500 KD. El producto final se esteriliza por filtración y se almacena a 4 °C.

ARNip

El ARNip usado en las nanopartículas lipídicas descritas estaba compuesto por secuencias de ARNip bicatenarias específicas de una secuencia de ARNm diana.

1. Secuencia de doble cadena de ARNip de FVII

5' UUu AAU UGA AAC cAA GAc Auu 3' (SEQ ID NO: 1)
5' uGu cuu GGu uuc AAu uAA Auu 3' (SEQ ID NO: 2)

2. Secuencia de doble cadena de ARNip de PLK1-424

5' UAU UUA AgG AGG GUG AuC Uuu 3' (SEQ ID NO: 3)
5' AGA Uca cCC Ucc uuA AAU auu 3' (SEQ ID NO: 4)

Se usan las siguientes abreviaturas en estas secuencias:

A = adenosina
U = uridina
G = guanosina
C = citosina
a = 2'-O-metil-adenosina
u = 2'-O-metil-uridina
g = 2'-O-metil-guanosina
c = 2'-O-metil-citosina

Plásmidos

pcDNA3.1(-)Neo de LifeTechnologies Cat n.º V795-20 (SEQ ID NO: 5)

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG
CCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCG
CGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGC
TTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATT
GATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATG
GAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC
CCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC
ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
ATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
CGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA
CTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCA

AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG
TAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGC
GTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCC
ACCACACTGGACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGATCAG
CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC
ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG
GAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGA
GGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCA
TTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCT
AGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCGCCG
TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
CCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGTTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
TTTTCGCCCTTTCGCTTTCCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCGCCG
TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
CCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGTTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
TTTTCGCCCTTTCGCTTTCCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCGCCG
ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGG
CTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGT
GTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCA
TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGA
AGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCC
ATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTT
TTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA
GGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCG
GATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACG
CAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACA
ATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTT
TGTCAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTAT
CGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTTCTTGCAGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCG
GGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCT
TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGA
TCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATC
GGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCG
CCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCCG
TGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGG
TATCGCCGCTCCCGATTGCGCAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTACGAGTTCTTCTG

AGCGGGACTCTGGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGA
TTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGC
CGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCAACT
TGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAA
GCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT
CTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
GCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT
TTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG
AGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
TCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAA
CCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
ACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
GCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGG
ATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAG
GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCG
TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGAC
ACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTA
TTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT
CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCA
GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA
ACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGAT
CCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGA
CAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCC
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATA
AACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT
CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTGGTATGGCTTCA
TTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAA
GCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCA
CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT
CTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGC
TCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGAT

ES 2 774 968 T3

CCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAG
CGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGA
CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGT
TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCC
GCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

Secuencia pGEM-T7o-TEV-hLeptina-GAopt-2xBG-120A (SEQ ID NO: 6)

GATCCGGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGACGCGTGTTAAATAACA
AATCTCAACACAACATATACAAAACAAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTCTATT
GCAGCAATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCAAAGCAATTTTCTGAAAATTTTACCATTACG
AACGATAGCCGCCACCATGCACTGGGGAACCCTGTGCGGATTCCTGTGGCTGTGGCCCT
ACCTGTTCTATGTGCAAGCCGTGCCCATCCAGAAGGTGCAGGACGACACCAAGACCCTG
ATCAAGACCATCGTGACCCGGATCAACGACATCAGCCACACCCAGAGCGTGTCCAGCAA
GCAGAAAGTGACCGGCCTGGACTTCATCCCCGGCCTGCACCCTATCCTGACCCTGTCCA
AGATGGACCAGACCCTGGCCGTGTACCAGCAGATCCTGACCAGCATGCCAGCCGGAAC
GTGATCCAGATCAGCAACGACCTGGAAAACCTGCGGGACCTGCTGCACGTGCTGGCCTT
CAGCAAGAGCTGCCATCTGCCTTGGGCCAGCGGCCTGGAAACCCTGGATTCTCTGGGCG
GAGTGCTGGAAGCCAGCGGCTACTCTACAGAGGTGGTGGCCCTGAGCAGACTGCAGGG
CAGCCTGCAGGATATGCTGTGGCAGCTGGATCTGAGCCCCGGCTGCTAATAGCGGACCG
GCGATAGATGAAGCTCGTTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAA
GTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAAT
AAAAAACATTTATTTTCATTGCAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCT
TGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATT
CTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCGGCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AAAGAAAGCAAGCTTTCGATAGCGCTGTT
GTAGAAAAAAAAAGAAGTAAATAATTACTACTTGCCATATAGACTAAATAGCTGCGCNTAATA
CATCTACACTTTCTANNATTGACAAGTGATACGTTGCAAAGGAGCAACACCCACAGACT
CGATGACTGCGCAGTCATACAGTGAAATTGCCCTAATGTCTTACCTCTGAAAGGGCTAAA
CGAAAGTAGAGCACTATTCCGCGTAGCTATTTAGTGCGATCTTTTAGAAATATCAGCCCAG
AGAGCTGGGCTGATAAATATTTTATCCGACAAGACGAATTTTGCTCAAATGAGTTAAACG
ATGCTACCACTATCTGCTGCTTTTACGAGATCAGCCCACCATTGCATCATCGGACGACGTT
GCTCAAGATAATCACTGCGGTTATAAGCGCGACGCACCTCATTTTTGTCTACATGAGCAA
GCGCTGCTTCAATGACATCAGGTGGAAATCCTTCCTCATTGAGTGCCGTAAGTGGCGATAG
AACGCAAGCCGTGTGAAACAAGTACACCTCCTAAGCCAGCACGCTTGAGTGCTGCATTCA
CTGTTTGGCTATTCATTGGTTGGTTGGGCTTGATACGGCTAGGAAAGATAAATTCTCGGC
CACCCTGAGAGGCTTCATCATTTCCAGAATAGCAAGAGCCCCATCAGATAGTGGAAACCG

TATGGTCCCGGTTTCATCTTCATTGAGCTGCAGGAATTTTCCATTGCTAGCATTGAAATC
 GATCTCATCCCATCGAGCCTCAGCAGCTTCGGCAGGGCGGGTATGGTTAGAAGTTGCC
 ACATGAACAGGCATCTTGTGGACATGCTGATACTTGCCGTACGCATGGTGTGCATTAGCT
 GCGGAAGTTGATCCGGCCGGATGCTTGGCATGTTTTTCTTTTGGGTTTCTCGAAAGCTT
 GAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
 TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAG
 CCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT
 TCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGA
 GGCGGTTTGCATATTGGGCGCTATTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT
 CGTTCGGCTGCGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
 AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAAC
 CGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCGATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCA
 CAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG
 CGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGAT
 ACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT
 ATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTT
 CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC
 GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
 CGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
 TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC
 CGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCG
 CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
 GAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAG
 ATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCT
 GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCAT
 CCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTG
 GCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
 ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTC
 CATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG
 CGCAACGTTGTTGGCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCT
 TCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAA
 AAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA
 TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCT
 TTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGA
 GTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAG
 TGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGA
 GATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTAC

CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGG
 CGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAG
 GGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGG
 TTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGAC
 ATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
 CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGG
 ATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCTGGG
 GCTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATAAATTCGAGC
 TCGGTACCCGGG

ARNm

5 Breve descripción del protocolo de transcripción de ARNm

Se construye un molde de ADN plasmídico circular que contiene un casete de transcripción de ARNm que consta de los siguientes elementos: un promotor consenso de ARN polimerasa dependiente de ADN de bacteriófago T7, una región 5' no traducida (UTR), una secuencia de Kozak y un marco abierto de lectura, una UTR 3' y una cola de poliadenosina de 120 nucleótidos de longitud (poliA120). El molde de ADN plasmídico se propaga en *E. coli*, se aísla y se linealiza mediante digestión con enzimas de restricción inmediatamente 3' de la cola de poli120. El ADN plasmídico se combina con ARN polimerasa T7, ribonucleótido trifosfatos, inhibidor de la RNasa, enzima pirofosfatasa, ditioneitol, espermidina y tampón de reacción enzimática y se incuba durante 1 hora a 37 °C. Se añade enzima DNasa I para digerir el molde de ADN plasmídico y se incuba durante 0,5 horas a 37 °C. Se aísla ARNm mediante precipitación secuencial con cloruro de litio, lavado del sedimento en etanol al 70 %, resuspensión del sedimento de ARNm en agua, nueva precipitación con isopropanol y acetato de sodio y lavado del sedimento de nuevo en etanol al 70 %. El sedimento de ARNm final se resuspende en agua.

Reactivo	Concentración	Notas
Agua sin nucleasas	Volumen restante	
Tris-HCl pH 8,0 (mM)	40	
MgCl ₂ (mM)	20	
ATP, CTP, GTP, UTP (mM)	4	
	4	Para preparar ARNm de PsU al 100 %, no incluir UTP en la reacción.
Pseudouridina (mM)		Para preparar ARNm no modificado al 100 %, no incluir PsU en la reacción
DTT (mM)	10	
Espermidina (mM)	2	
ADN plasmídico linealizado (ug/ul)	0,05	
Pirofosfatasa (U/ul)	0,004	
Inhibidor de RNasa (U/ul)	1	
ARN polimerasa T7 (U/ul)	5	
DNasa I (U/ul)	0,04	

20 TEV-hLeptina-GAopt-2xhBG-120A (SEQ ID NO: 7)
 Elementos de secuencia:

5' UTR del virus del grabado del tabaco (TEV): 14-154
 Secuencia óptima de Kozak: 155-163
 25 Leptina humana que codifica los aminoácidos 1-167 de la proteína n.º de referencia NP_000221, codón de secuencia optimizado por GeneArt: 164-664
 2 codones de parada: 665-670
 2 copias de 3' UTR de beta-globina humana: 689-954
 30 Cola de poliA de 120 nucleótidos: 961-1080

ES 2 774 968 T3

GGGAGACGCGUGUUAAAUAACAAAUCUCAACACAACAUUAUACAAAACAAACGAAUCUCA
AGCAAUCAAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUUAAAAGCAAAG
CAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCCGCCACCAUGCACUGGGGAA
CCCUGUGCGGAUUCUGUGGCUGUGGCCCUACCGUUCUAUGUGCAAGCCGUGCCCA
UCCAGAAGGUGCAGGACGACACCAAGACCCUGAUCAAGACCAUCGUGACCCGGAUCAA
CGACAUCAGCCACACCCAGAGCGUGUCCAGCAAGCAGAAAGUGACCCGCCUGGACUUC
AUCCCCGGCCUGCACCCUAUCCUGACCCUGUCCAAGAUGGACCAGACCCUGGCCGUG
UACCAGCAGAUCUGACCAGCAUGCCCAGCCGGAACGUGAUCCAGAUCAAGCAACGACC
UGGAAAACCUUGCGGGACCUUGCUGCAGCUGCUGGCCUUCAGCAAGAGCUGCCAUCUGC
CUUGGGCCAGCGGCCUGGAAACCCUGGAUUCUCUGGGCGGAGUGCUGGAAGCCAGCG
GCUACUCUACAGAGGUGGUGGCCCUAGCAGACUGCAGGGCAGCCUGCAGGAUAUGC
UGUGGCAGCUGGAUCUGAGCCCCGGCUGCUAAUAGCGGACCCGGCGAUAGAUGAAGCU
CGCUUUCUUGCUGUCCAUUUCUAUUAAAGGUUCCUUUGUUCUUAGUCCAACUACU

AAACUGGGGGAUUAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACA
UUUUUUUCAUUGCAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAUUUUCUAUUAAAGGUUCCUUUGUU
CCCUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGAUUAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUC
UGCCUAAUAAAAACAUUUAUUUCAUUGC GGCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AA
AA

TEV-mEpo(NcoI)-2xhBG-120A (SEQ ID NO: 8)
Elementos de secuencia:

- 5 5' UTR del virus del grabado del tabaco (TEV): 14-154
- Secuencia óptima de Kozak: 155-163
- Eritropoyetina de ratón que codifica los aminoácidos 1-191 de la proteína n.º de referencia NP_031968, codón de secuencia optimizado por GeneArt: 164-739
- 10 Codones de parada: 740-742
- 2 copias de 3' UTR de beta-globina humana: 743-1008
- Cola de poliA de 120 nucleótidos: 1009-1128

ES 2 774 968 T3

GGGAGACGCGUGUUAAAUAACAAAUCUCAACACAACAUAUACAAAACAAACGAAUCUCA
AGCAAUCAAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAG
CAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCCGCCACCAUGGGCGUGCCCG
AAAGACCUACACUCCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGAUCUCCUCUGGGCCUGCCUG
UGCUGUGUGCCCCCCUAGACUGAUCUGCGACAGCAGAGUGCUGGAACGGUACAUC
UGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACGUGACGAUGGGAUGUGCCGAGGGCCCCAGACUGA
GCGAGAACAUCACCGUGCCCGACACCAAAGUGAACUUCUACGCCUGGAAGCGGAUGGA
AGUGGAAGAACAGGCCAUCGAAGUGUGGCAGGGCCUGAGCCUGCUGAGCGAGGCCUAU
UCUGCAGGCACAGGCUCUGCUGGGCCAACAGCAGCCAGCCUCCUGAGACACUGCAGCU
GCACAUCGACAAGGCCAUCAGCGGCCUGAGAAGCCUGACCUCUCCUGCUGAGGGUGCU
GGGAGCCCAGAAAGAACUGAUGAGCCCCCUGACACCACCCCCCUGCUCUCCUCUGAGA
ACUCUGACCGUGGACACCUUCUGCAAGCUGUUCGGGUGUACGCCAACUUCUGCGG
GGCAAGCUGAAGCUGUACACCGGCGAAGUGUGCAGACGGGGCGACAGAUGAAGCUCG
CUUUCUUGCUGUCCAUUUUCUAUUAAAAGGUUCCUUUGUUCUUAAGUCCAACUACUAA
ACUGGGGGGAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUU
AUUUUCAUUGCAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAUUUCUAUUAAAAGGUUCCUUUGUUC
CUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGGAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUG
CCUAAUAAAAACAUUUAUUUUCUAUUGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

TEV-hFIX-GAopt-2xBG-120A (SEQ ID NO: 9)
Elementos de secuencia:

- 5 5' UTR del virus del grabado del tabaco (TEV): 14-154
- Secuencia óptima de Kozak: 155-163
- Factor IX humano que codifica los aminoácidos 1-461 de la proteína n.º de referencia NP_000124, codón de
- 10 secuencia optimizado por GeneArt: 164-1962
- 2 codones de parada: 1547-1552
- 2 copias de 3' UTR de beta-globina humana: 1571-1836
- Cola de poliA de 120 nucleótidos: 1843-1962

GGGAGACGCGUGUAAAUAACAAAUCUCAACACAACAUUAUACAAAACAAACGAAUCUCA
AGCAAUCAAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUAAAUCAUUUCUUUAAAAGCAAAG
CAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCCGCCACCAUGCAGCGCGUGA
ACAUGAUUAUGGCCGAGAGCCCUGGCCUGAUCACCAUCUGCCUGCUGGGCUACCUGC
UGAGCGCCGAGUGCACCGUGUUUCUGGACCACGAGAACGCCAACAAGAUCUGAACC
GCCAAGCGGUACAACAGCGGCAAGCUGGAAGAGUUCGUGCAGGGCAACCUUGGAACG
CGAGUGCAUGGAAGAGAAGUGCAGCUUCGAAGAGGCCAGAGAGGUGUUCGAGAACAC
CGAGCGGACCACCGAGUUCUGGAAGCAGUACGUGGACGGCGACCAGUGCGAGAGCAA
CCCCUGUCUGAAUGGCCGCGCAGCUGCAAGGACGACAUCAACAGCUACGAGUGCUGGUG
CCCCUUCGGCUUCGAGGGCAAGAACUGCGAGCUGGACGUGACCUGCAACAUCAAGAAC
GGCAGAUGCGAGCAGUUCUGCAAGAACAGCGCCGACAACAAGGUCGUGUGCUCUCCUGC
ACCGAGGGCUACAGACUGGCCGAGAACCAGAAGUCCUGCGAGCCCGCCGUGCCUUUC
CCAUGUGGAAGAGUGUCCGUGUCCAGACCAGCAAGCUGACCAGAGCCGAGACAGUG
UUCCCCGACGUGGACUACGUGAACAGCACCGAGGCCGAGACAAUCCUGGACAACAUCA
CCCAGAGCACCCAGUCCUUAACGACUUCACCAGAGUCGUGGGCGGCGAGGAUGCCAA
GCCUGGACAGUUCGGUGGCAGGUGGUGCUGAACGGAAAGGUGGACGCCUUUUGCGG
CGGCAGCAUCGUGAACGAGAAGUGGAUCGUGACAGCCGCCACUGCGUGGAAACCGG
CGUGAAGAUUACAGUGGUGGCCGCGGAGCACAACAUCGAGGAAACCGAGCACACAGAG
CAGAAACGGAACGUGAUCAGAAUCAUCCCCACCACAACUACAACGCCGCCAUCAACAA
GUACAACCACGAUAUCGCCUGCUGGAACUGGACGAGCCCUUGGUGCUGAAUAGCUAC
GUGACCCCAUCUGUAUCGCCGACAAAGAGUACACCAACAUCUUUCUGAAGUUCGGCA
GCGGCUACGUGUCCGGCUGGGGCAGAGUGUUUCACAAGGGCAGAUCCGCUCUGGUGC
UGCAGUACCUAGAGUGCCUCUGGUGGACCGGGCCACCUGUCUGAGAAGCACCAAGU
UCACCAUCUACAACAACAUGUUCUGCGCCGGCUUCACGAGGGCGGCAGAGAUAGCUG
UCAGGGCGAUUCUGGCCGGCCUCACGUGACAGAGGUGGAAGGCACCAGCUUUCUGAC
CGGCAUCAUCAGCUGGGGGCAGGAAUGCGCCAUGAAGGGGAAGUACGGCAUCUACAC

CAAGGUGUCCAGAUACGUGAACUGGAUCAAGAAAAGACCAAGCUGACAUAUAGACGG
ACCGGCGAUAGAUGAAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAUUUCUAUUAAAGGUUCCUUUG
UUCCCUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGAUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAU
UCUGCCUAAUAAAAACAUUUAUUUUAUUGCAGCUCGCUUUCUUGCUGUCCAUUUC
UAUUAAAGGUUCCUUUGUCCCUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGAUUAUGAAGG
GCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUAUUUUAUUGCGGCCGCAAA
AA
AA

TEV-Fluc(sapl)-2xhBG-120A (SEQ ID NO: 10)
Elementos de secuencia:

- 5 5' UTR del virus del grabado del tabaco (TEV): 14-154
- Secuencia óptima de Kozak: 155-163

ES 2 774 968 T3

Secuencia que codifica el polipéptido 99 % idéntico (545/550 aa) a luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) de la proteína n.º de referencia P08659: 164-1813

1 codón de parada: 1814-1816

2 copias de 3' UTR de beta-globina humana: 1835-2100

Cola de poliA de 120 nucleótidos: 2107-2226

5

```
GGGAGACGCGUGUUAAAUAACAAAUCUCAACACAACAUAUACAAAACAAACGAAUCUCA
AGCAAUCAAGCAUUCUACUUCUAUUGCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUUAAAAGCAAAG
CAAUUUUCUGAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGCCGCCACCAUGGAAGACGCCAA
AAACAUAAAGAAAGGCCCGGCCCAUUCUAUCCGCUGGAAGAUGGAACCGCUGGAGAG
CAACUGCAUAAGGCUAUGAAGAGAUACGCCUGGUUCCUGGAACAAUUGCUIUUUACAG
AUGCACAUAUUCGAGGUGGACAUCACUACGCUGAGUACUUCGAAAUGUCCGUUCGGUU
GGCAGAAGCUAUGAAACGAUAUGGGCUGAAUACAAAUCACAGAAUCGUCGUAUGCAGU
GAAAACUCUCUCAAUUCUUUAUGCCGGUGUUGGGCGCGUUUUUAUCGGAGUUGCA
GUUGCGCCCGCGAACGACAUUUAUAAUGAACGUGAAUUGCUCAACAGUAUGGGCAUUU
CGCAGCCUACCGUGGUGUUCGUUUCCA AAAAGGGGUUGCAAAAAUUUUGAACGUGCA
AAAAAGCUCCCAUAUCAUCCAAAAAUUAUUAUCAUGGAUUCUAAAACGGAUUACCAGG
GAUUUCAGUCGAUGUACACGUUCGUCACAUCUCAUCUACCUC CGUUUUAAUGAAUA
CGAUUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAGACAAUUGCACUGAUCAUGAACUCC
UCUGGAUCUACUGGUCUGCCUAAAGGUGUCGCUCUGCCUCAUAGAACUGCCUGCGUG
AGAUUCUCGCAUGCCAGAGAUCCU AUUUUUGGCAAUCAAAUCAUUCGGAUACUGCGA
UUUUAAAGUGUUGUCCAUAUCCAUCACGGUUUUGGAAUGUUUACUACACUCGGAUUUU
GAUAUGUGGAUUUCGAGUCGUCUUAUGUAUAGAUUUGAAGAGGAGCUGUUUCUGAG
GAGCCUUCAGGAUUACAAGAUUCAAGUGCGCUGCUGGUGCCAACCCUAUUCUCCUUC
```

UUCGCCAAAAGCACUCUGAUUGACAAAUACGAUUUAUCUAAUUUACACGAAAUUGCUUC
UGGUGGCGCUCUCCUUCUAAGGAAGUCGGGGAAGCGGUUGCCAAGAGGUUCCAUCU
GCCAGGUAUCAGGCAAGGAUAUGGGCUCACUGAGACUACAUCAGCUAUUCUGAUUACA
CCCGAGGGGGGAUGAUAAACCGGGCGCGGUCGGUAAAGUUGUCCAUUUUUGAAGCG
AAGGUUGUGGAUCUGGAUACCGGGAAAACGCUGGGCGUUAUCAAAGAGGCGAACUG
UGUGUGAGAGGUCCUAUGAUUAUGUCCGGUUAUGUAAACAUCCGGAAGCGACCAACG
CCUUGAUUGACAAGGAUGGAUUGGCUACAUCUGGAGACAUAGCUUACUGGGACGAAGA
CGAACACUUCUUCUUCGUUGACCGCCUGAAGUCUCUGAUUAAGUACAAAGGCUAUCAG
GUGGCUCUCCGCUGAAUUGGAAUCCAUCUUGCUCCAACACCCCAACAUCUUCGACGCAG
GUGUCGCAGGUCUCCCGACGAUGACGCCGGUGAACUCCCGCCGCCGUUGUUGUUU
UGGAGCACGGAAAGACGAUGACGGAAAAAGAGAUUCGUGGAUUACGUCGCCAGUCAAGU
AACACC CGGAAAAGUUGCGCGGAGGAGUUGUGUUUGUGGACGAAGUACCGAAAGGU
CUUACCGGAAAACUCGACGCAAGAAAAUCAGAGAGAUCCUCAUAAAGGCCAAGAAGGG
CGGAAAGAUCCGUGUGACGGACCGGCGAUAGAUGAAGCUCGCUUUCUUGCUGUCC
AAUUUCUAUUAAAGGUUCCUUUGUUCUUAAGUCCAACUACUAAACUGGGGGAUUUA
UGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUUAUUUUCAUUGCAGC
UCGCUUUCUUGCUGUCCAUUUCUAUUAAAGGUUCCUUUGUUCUUAAGUCCAACUAC
UAAACUGGGGGAUUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACA
UUUUAUUUUCAUUGCGGCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Gtx7-Gluc-2xSinV-120A (SEQ ID NO: 11)
Elementos de secuencia:

- 5 5' UTR: 14-127
- Secuencia de Kozak: 128-133
- Secuencia que codifica el polipéptido idéntico a la luciferasa de *Gaussia princeps* de la proteína n.º de referencia AAG54095: 134-688
- 10 1 codón de parada: 689-691
- 2 copias de 3' UTR de virus Sindbis: 699-882
- Cola de poliA de 120 nucleótidos: 891-1010

GGGAGACGCGUGUUUCUGACAUCGGCGGAAUUCUGACAUCGGCGGAAUUCUGACA
UCCGGCGGAAUUCUGACAUCGGCGGAAUUCUGACAUCGGCGGAAAGACUCACAACCC
CAGAAACAGACAGCCACCAUGGGAGUCAAGUUCUGUUUGCCCUGAUCUGCAUCGCUG
UGGCCGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACUUAACAUCGUGGCCGUGGCCAG
CAACUUCGCGACCACGAUCUCGAUGCUGACCGCGGGAAGUUGCCC GGCAAGAAGCU

15

GCCGCUGGAGGUGCUCAAAGAGAUGGAAGCCAAUGCCCGGAAAGCUGGCUGCACCAG
 GGGCUGUCUGAUCUGCCUGUCCACAUCAAGUGCACGCCCAAGAUGAAGAAGUUUCAUC
 CCAGGACGCUGCCACACCCUACGAAGGCGACAAAGAGUCCGCACAGGGCGGCAUAGGC
 GAGGCGAUCGUCGACAUUCCUGAGAUUCCUGGGUUCAAGGACUUGGAGCCAAUGGAG
 CAGUUCAUCGCACAGGUCGAUCUGUGUGUGGACUGCACAACUGGCUGCCUCAAGGG
 CUUGCCAACGUGCAGUGUUCUGACCUGCUCAGAAGUGGCUGCCGCAACGCUGUGCG
 ACCUUUGCCAGCAAGAUCAGGGCCAGGUGGACAAGAUCAAGGGGGCCGGUGGUGAC
 UAACGGACCGAAAACUCAAUUUUAUUUUUCUUUUUAUUUUUAUUCACAUAUUAUUUUU
 GUCUACAUAUAUCAAUUUAUUUUUCUUUUUAUUUUUAUUCACAUAUUAUUUUU
 UCUGAGGAAGCGUGGUGCAUAAUGCCACGCAGUGUCUACAUAUCAAUUUAUUUUU
 CUUUUAUUUUUAUUCACAUAAGCGGCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Evaluación biológica

5 Empaquetado de ARNm

Todos los equipos y suministros desechables están certificados como exentos de actividad RNasa por el fabricante o se elimina su RNasa mediante el uso del reactivo RNaseZap (LifeTechnologies). El ARNm se encapsula a una relación molar de amina de lípido catiónico con respecto a fosfato de ARNm (N:P) de 4:1. Los lípidos (lípido catiónico, DSPC, colesterol y PEG lipídado o lípido sigiloso) se disuelven en etanol. Las relaciones molares son 40:10:38:2, respectivamente. La mezcla se sonica brevemente, después se agita suavemente durante 5 minutos y después se mantiene a 37 °C hasta su uso. El ARNm se intercambia en tampón de citrato pH 5,8 - 6,0 mediante el uso de concentradores centrífugos Amicon Ultra-15 y la concentración final se ajusta a 0,5 mg/ml y se mantiene a 37 °C hasta su uso. Un volumen igual de lípidos en etanol, ARNm en tampón de citrato y tampón de citrato solo se introducen en jeringas desechables. Los tubos que salen de jeringas que contienen lípidos y ARNm están unidos a la unión en T y el tubo que sale de la jeringa que solo contiene tampón de citrato se combina con el tubo que sale de la unión en T sobre un recipiente de recogida que contiene una barra de agitación en una placa de agitación activa. Las jeringas se colocan en un conjunto de bomba de jeringa para expulsar el contenido a un caudal de 1 ml por minuto.

20 La bomba se activa y el ARNm recogido en nanopartículas lipídicas se transfiere a tubo de diálisis SnakeSkin (PCPM 10.000, Thermo Scientific). El material se dializa frente a solución salina tamponada con fosfato 1x sin RNasa ni pirógenos durante una noche a 4 °C.

Empaquetado de ARNip

25 Las nanopartículas lipídicas (LNP) se formaron mezclando volúmenes iguales de lípidos disueltos en alcohol con ARNip disuelto en un tampón de citrato mediante un proceso de chorro de impacto. La solución lipídica contiene un compuesto lipídico catiónico de la invención, un lípido auxiliar (colesterol), un lípido neutro opcional (DSPC) y un lípido sigiloso (S010, S024, S027 o S031) a una concentración de 8-16 mg/ml con un objetivo de 12 mg/ml en un alcohol. La relación de ARNip con respecto a lípidos totales es de aproximadamente 0,05 (p/p). Cuando una formulación de LNP contiene cuatro componentes lipídicos, las relaciones molares de los lípidos varían de 20 a 70 por ciento molar para el lípido catiónico con un objetivo de 40-60, el porcentaje molar de lípidos auxiliares varía de 20 a 70 con un objetivo de 30 a 50, el porcentaje molar de lípidos neutros varía de 0 a 30, el porcentaje molar de lípido PEG tiene un intervalo de 1 a 6 con un objetivo de 2 a 5. La concentración de la solución de ARNip varía de 0,7 a 1,0 mg/ml con un objetivo de 0,8 a 0,9 mg/ml en un tampón de citrato de sodio: cloruro de sodio pH 4-6, con un objetivo de 4,5 -5,5. Los LNP se forman mezclando volúmenes iguales de solución de lípidos en etanol con ARNip disuelto en un tampón de citrato mediante un proceso de chorro de impacto a través de un dispositivo de mezcla con ID que varía de 0,25 a 2,0 mm a un caudal de 10 a 640 ml/min. La solución de LNP mixta se mantiene a temperatura ambiente durante 0-24 h antes de una etapa de dilución. Después, la solución se concentra y se dializa con tampón adecuado mediante proceso de ultrafiltración usando membranas con un punto de corte de PM de 30 a 500 KD. El producto final se esteriliza por filtración y se almacena a 4 °C.

Medida de encapsulación de ARNm

El porcentaje de encapsulación de ARNm en nanopartículas lipídicas se determina usando el kit de ensayo de ARN Ribogreen Quant-iT (Life Technologies). La suspensión de LNP-ARNm se ensaya en tampón (ARNm fuera de la partícula) y tampón más detergente Triton X-100 (ARNm total). La diferencia calculada es el ARNm dentro de la partícula. Preparar una reserva de 1000 ng/ml a partir del ARN proporcionado en el kit y usar esta para generar una curva patrón (0 ng/ml, 15,63-1000 ng/ml) en TE y TE + Triton X-100 al 0,75 %. Preparar muestras de LNP-ARNm en tampón TE y tampón TE + Triton X-100 al 0,75 % con dilución adecuada para que la lectura esté en el intervalo de la curva patrón (400-2.000 veces). En una placa de 384 pocillos (Costar no tratada n.º 3573) añadir 0,04 ml de patrón (por duplicado) o muestra (por triplicado) por pocillo. Diluir reactivo Ribogreen 240 veces en tampón de TE y añadir 0,06 ml por pocillo. Mezclar el contenido de los pocillos y medir la fluorescencia (excitación = 480 nm, emisión = 520 nm). Restar los valores de fondo (sin ARN) de los valores de muestra patrón y de prueba y determinar las concentraciones de ARN en las muestras usando las curvas patrón. Determinar el porcentaje de encapsulación de la muestra dividiendo la diferencia en las concentraciones entre muestra + triton y muestra en tampón solo por la concentración de muestra + triton.

5

10

15 **Medición de encapsulación de ARNip**

Se usa reactivo de fluorescencia SYBR Gold para la determinación de la encapsulación de ARNip en los DLP. Los DLP con y sin triton x-100 se usan para determinar las cantidades de ARNip libre y ARNip total. Las muestras de DLP con y sin triton X-100 se excitaron a 485 nm y la emisión de fluorescencia se midió a 530 nm. La eficacia de encapsulación se calcula según la siguiente fórmula:

20

Eficacia de encapsulación: [(concentración de ARNip libre - concentración de ARNip total) / (concentración de ARNip total)] × 100 %

25 **Datos de encapsulación**

Tabla 2: Datos de encapsulación *in vitro* para ARNm y ARNip

Ejemplo	% de encapsulación	
	ARNm leptina	ARNip FVII
1	96,7	85,1
2	70,5	ND
3*	32,5	ND
4	83,7	ND
7*	ND	88,9
9	ND	86,7
10*	1,9	ND
11*	45,4	ND
12*	27,3	ND
13	90,7	88,1
15	97,3	ND
18	84,8	ND
19	98,1	ND
22	ND	86,1
23	82,0	ND
24	86,6	89,1
25	95,3	88,7
26	96,9	80,0
27	80,8	ND
32*	97,1	ND
33	97,4	ND
34	97,1	ND
35	97,3	ND
36	36,4	79,8
37*	14,3	ND
38*	9,6	ND
39	10,0	ND
40	97,2	ND
41	97,5	ND
4*	90,3	ND
43*	24,2	ND
44*	22,4	ND
45	84,4	ND
46	63,5	ND
47	90,4	ND

(continuación)

Ejemplo	% de encapsulación	
48	92,8	ND
49	82,8	ND
50	83,9	ND
51	82,3	ND
52	32,2	ND
53	93,5	ND
56*	83,3	ND
57	95,2	ND
58*	86,0	ND
59*	76,6	ND
60	89,1	ND
63	18,8	ND
64	87,9	ND
66	70,5	ND
67	62,8	ND
68	5,9	ND
69	79,3	ND
70	92,1	ND
71	96,5	ND
72	31,2	ND
73	9,3	ND
74*	23,0	ND

Empaquetado de ADN plasmídico

- 5 Todos los equipos y suministros desechables están certificados como exentos de actividad RNasa por el fabricante o se elimina su RNasa mediante el uso del reactivo RNaseZap (Life Technologies). El plásmido se encapsula en una relación molar de amina de lípido catiónico con respecto a fosfato de ADN (N:P) de 4:1. Los lípidos (lípido catiónico, DSPC, colesterol y PEG lipidado) se disuelven en etanol. Las relaciones molares son 40:10:38:2, respectivamente. La mezcla se sonica brevemente, después se agita suavemente durante 5 minutos y después se mantiene a 37 °C hasta su uso. El plásmido se cambia a tampón de citrato pH 6,0 mediante el uso de concentradores centrífugos Amicon Ultra-15 y la concentración final se ajusta a 0,053 mg/ml y se mantiene a 37 °C hasta su uso. Un volumen igual de lípidos en etanol, plásmido en tampón de citrato y tampón de citrato solo se introducen en jeringas desechables. Los tubos que salen de jeringas que contienen lípidos y ADN están unidos a la unión en T y el tubo que sale de la jeringa que solo contiene tampón de citrato se combina con el tubo que sale de la unión en T sobre un recipiente de recogida que contiene una barra de agitación en una placa de agitación activa. Las jeringas se colocan en un conjunto de bomba de jeringa para expulsar el contenido a un caudal de 1 ml por minuto. La bomba se activa y el ADN recogido en nanopartículas lipídicas se transfiere a tubo de diálisis SnakeSkin (PCPM 10.000, Thermo Scientific). El material se dializa frente a solución salina tamponada con fosfato 1x sin RNasa ni pirógenos durante una noche a 4 °C.

20 Medición de encapsulación de ADN plasmídico

- El porcentaje de encapsulación de ADN plasmídico en nanopartículas lipídicas se determina usando el kit de ensayo de ARN Ribogreen Quant-iT (Life Technologies). La suspensión de LNP-ADN se ensaya en tampón (ADN fuera de la partícula) y tampón más detergente Triton X-100 (ADN total). La diferencia calculada es el ADN dentro de la partícula. Preparar una reserva de 1000 ng/ml usando plásmido sin empaquetar y usar esta para generar una curva patrón (0 ng/ml, 15,63-1000 ng/ml) en TE y TE + Triton X-100 al 0,75 %. Preparar muestras de LNP-plásmido en tampón TE y tampón TE + Triton X-100 al 0,75 % con dilución adecuada para que la lectura esté en el intervalo de la curva patrón (25 veces). En una placa de 384 pocillos (Costar no tratada n.º 3573) añadir 0,04 ml de patrón (por duplicado) o muestra (por triplicado) por pocillo. Diluir reactivo Ribogreen 240 veces en tampón de TE y añadir 0,06 ml por pocillo. Mezclar el contenido de los pocillos y medir la fluorescencia (excitación = 480 nm, emisión = 520 nm). Restar los valores de fondo (sin ADN) de los valores de muestra patrón y de prueba y determinar las concentraciones de ADN en las muestras usando las curvas patrón. Determinar el porcentaje de encapsulación de la muestra dividiendo la diferencia en las concentraciones entre muestra + triton y muestra en tampón solo por la concentración de muestra + triton.

35 Mediciones del índice de polidispersidad (IPD)

- A menos que se indique otra cosa, todos los IPD a los que se hace referencia en el presente documento son los IPD de la nanopartícula completamente formada, según lo medido por la dispersión dinámica de luz en un Zetasizer de Malvern. La muestra de nanopartículas se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de modo que la tasa de recuento fuera de aproximadamente 200 - 400 kcts. Los datos se presentan en la tabla 3 como un promedio ponderado de la medida de intensidad.

El tamaño de partícula de la nanopartícula lipídica

5 A menos que se indique otra cosa, todas las mediciones del tamaño de partícula mencionadas en la tabla 3 son el tamaño de partícula promedio Z de la nanopartícula completamente formada, según lo medido por la dispersión dinámica de luz en un Zetasizer de Malvern. La muestra de nanopartículas se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de modo que la tasa de recuento es de aproximadamente 200 - 400 kcts.

10 Datos de caracterización de nanopartículas lipídicas

Tabla 3: Datos *in vitro* sobre ejemplos seleccionados

Ácido nucleico	Ejemplo 1			Ejemplo 15			Ejemplo 13		
	% de encaps.	Tamaño (nM)	IPD	% de encaps.	Tamaño (nM)	IPD	% de encaps.	Tamaño (nM)	IPD
ARNm de hLeptina	96,7	100,0	0,105	97,3	119,8	0,125	95,4	127,6	0,093
ARNm de hFIX	89,5	126,9	0,090	98,4	96,8	0,182	96,4	122,4	0,154
ARNm de FLuc	86,8	119,0	0,152	98,1	100,7	0,132	98,3	121,9	0,140
ARNm de Glue	92,3	95,7	0,136	98,1	84,7	0,133	97,2	90,8	0,099
ARNm de mEPO	94,7	107,2	0,145	98,3	90,1	0,125	98,5	113,7	0,129
Plásmido hLep	93,0	105,1	0,182	93,6	94,5	0,149	95,9	121,5	0,158
ADNp	94,7	100,7	0,100	93,2	86,9	0,110	98,2	95,12	0,160
ARNip de FVII	85,1	102,3	0,049				88,1	101,5	0,037

Datos *in vivo*

15 Dosificación del factor VII de ratón

Se recibieron ratones CD-1 hembras de Harlan Labs y se mantuvieron con pienso convencional de laboratorio y agua a voluntad. Los animales pesaron aproximadamente 25 g en el momento de la dosificación. El ARNip de factor VII formulado se administró como una única dosis por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. 20 Aproximadamente 48 horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ seguido de desangrado a través de la vena cava. La sangre se recogió en tubos que contenían anticoagulante de citrato de sodio 0,105 M para análisis de la actividad del factor VII en plasma.

25 Ensayo de actividad del factor VII

Se ensayó plasma recogido de ratones inyectados para determinar la actividad enzimática del factor VII usando el kit Biophen FVII de Hyphen Biomedical (número de catálogo 221304). Se preparó una curva patrón de ensayo usando alícuotas de plasma agrupadas de los animales de control de vehículo. Todas las muestras se diluyeron para que quedaran dentro del intervalo lineal de la curva patrón y se señaló la actividad del factor VII en relación con el plasma de control. 30

Se probaron nanopartículas lipídicas que comprendían compuestos lipídicos de fórmula (I) y la secuencia de doble cadena de ARNip de FVII enumerada anteriormente en el ensayo de actividad del factor VII. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la tabla 3 4 a continuación como un porcentaje de atenuación de la actividad enzimática del factor VII en plasma a una dosis de 0,3 mg/kg y 0,03 mg/kg. 35

ELISA de EPO de ratón

40 Un anticuerpo de rata anti-eritropoyetina de ratón se aplica sobre placas de microtitulación blancas de 384 pocillos durante una noche, y después se bloquea para ensayo. Después, se diluyen muestras de plasma en un diluyente de muestra a base de caseína y se incuban en la placa con controles de tampón y patrones de EPO de ratón. Después se lava la placa para eliminar el material no unido. Después se añade a la placa un anticuerpo biotinilado de rata anti-eritropoyetina de ratón para detectar la EPO de ratón unida con el anticuerpo de captura. La placa se lava de nuevo y se incuba un reactivo de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante en la placa. Se realiza una tercera 45 etapa de lavado y se añade un reactivo quimioluminiscente a la placa y un lector de placas capacitado lo lee inmediatamente usando todas las longitudes de onda y un tiempo de integración de 50 milisegundos. Las muestras desconocidas se interpolan con respecto a la curva patrón de EPO de ratón.

ELISA de factor IX humano

50 Un anticuerpo de oveja anti-factor IX humano (Cat n.º FIX-EIA-C) de Enzyme Research Laboratories se aplica sobre

- placas de microtitulación blancas de 384 pocillos durante una noche a una concentración de 5 µg/ml, y después se bloquea para ensayo usando el bloqueador KPL (Cat n.º 50-82-00). Después, las muestras de plasma se diluyen en un diluyente de muestra a base de caseína y se incuban en la placa con controles biológicos y una curva patrón creada a partir de proteína recombinante (Cat n.º HCIX-0040). Después se lava la placa para eliminar el material no unido.
- 5 Después se añade a la placa un anticuerpo biotinilado de oveja anti-factor IX humano (Cat n.º FIX-EIA-D) de Enzyme Research Laboratories a 0,6 µg/ml para detectar la proteína del factor IX humano unida con el anticuerpo de captura. La placa se lava de nuevo y un reactivo de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (Cat n.º 21140), diluido 1:1250, se incuba en la placa. Se realiza una tercera etapa de lavado y se combinan y añaden a la placa reactivos quimioluminiscentes (Cat n.º 1859678 y Cat n.º 18596789) y un lector de placas capacitado los lee
- 10 inmediatamente usando todas las longitudes de onda y un tiempo de integración de 50 milisegundos. Las muestras desconocidas se interpolan a partir de la curva patrón del factor IX recombinante humano.

Diluyente de muestra de caseína, pH 7,20

- 15 El diluyente de muestra contiene caseína al 0,7 %, fosfato de sodio monobásico 1,7 mM, fosfato de sodio dibásico heptahidrato 8,1 mM, cloruro de sodio 0,15 M, Triton X-100 al 0,7 % y azida de sodio al 0,1 %

Diluyente de caseína de anticuerpos biotinilados, pH 7,15

- 20 El diluyente contiene caseína al 0,4 %, fosfato de sodio monobásico 1,7 mM, fosfato de sodio dibásico heptahidrato 8,1 mM, de cloruro de sodio 0,15 M y azida de sodio al 0,1 %

Diluyente de caseína HRP, pH 7,15

- 25 El diluyente contiene caseína al 0,4 %, fosfato de sodio monobásico 1,7 mM, fosfato de sodio dibásico heptahidrato 8,1 mM, cloruro de sodio 0,15 M y cloroacetamida al 0,1 %. Leptina

hLEPTINA

- 30 La leptina humana en plasma de ratón se midió mediante ELISA. Se reconstituyeron anticuerpos adquiridos del duoset de R&D Systems (Cat n.º DY398E, parte n.º 840279 para anticuerpo de captura y parte n.º 840280 para anticuerpo de detección) usando PBS y se valoraron, usando de nuevo PBS. El anticuerpo de captura se aplicó a 4 µg/ml en 30 µl/pocillo en una placa blanca Nunc® Maxisorp de 384 pocillos (Cat n.º 460372). Después de una incubación durante una noche a temperatura ambiente, el anticuerpo de captura se aspiró y la placa se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente con 90 µl/pocillo de bloqueador de leche KPL (Cat n.º 50-82-00). Una vez que se completó la incubación, se aspiró la placa y se añadieron patrones recombinantes y muestras a la placa a 30 µl/pocillo durante 2 horas a 37 °C con agitación a 600 rpm. Se prepararon diluciones de muestras/patrones usando diluyente de muestra de caseína. Se continuó con lavado/aspiración 3 veces con 100 µl/pocillo, usando solución de lavado de placas Teknova (Cat n.º P1192). A continuación, se diluyó anticuerpo de detección usando diluyente de anticuerpo de detección de caseína a 12,5 ng/ml y se añadió a 30 µl/pocillo durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de esta incubación, la placa se lavó de nuevo y se añadió una solución de poli-estreptavidina-HRP (Cat n.º 21140) a una dilución 1:1250 en tampón de dilución de HRP a cada pocillo (30 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Un lavado/aspiración final eliminó la solución de HRP y se añadió un sustrato quimioluminiscente a 30 µl/pocillo (Cat n.º 1859678 y 1859679). La placa se leyó rápidamente usando un lector de placas SpectramaxM5 con un tiempo de integración de 50 ms. El intervalo dinámico del ELISA es de 100-2.000 pg/ml (6,25-125 pM) de leptina humana. El ensayo es aplicable a plasma de ratones, ratas y monos cynomolgus.
- 35
- 40
- 45

Inyección intravenosa en la vena de la cola de ratón de ARNm de leptina sintética modificada

- 50 Antes de la inyección en la vena de la cola, se registraron los pesos corporales de los ratones y se ponderaron con respecto a la dieta, agrupando los ratones según su peso corporal. Los ratones se prepararon calentándolos bajo una lámpara de calentamiento durante ~2 minutos, con los ratones a aproximadamente 30,48 cm (12 pulgadas) de la lámpara de calor.
- 55 Para el procedimiento de inyección en la vena de la cola, los ratones se colocaron en un dispositivo de retención y sus colas se limpiaron con alcohol al 70 %. Se insertó una aguja de calibre 27 (Becton Dickinson, n.º de catálogo 305109) conectada con una jeringa de 1 ml (Becton Dickinson, n.º de catálogo 309659) en la vena de la cola, con el bisel hacia arriba y se tiró del émbolo de la jeringa hacia atrás para garantizar que la sangre se introdujera en la jeringa. El volumen deseado de ARNm de leptina sintética modificada se inyectó a mano con presión y velocidad moderadas. Después se extrajo la aguja y se detuvo la hemorragia aplicando presión al sitio de inyección con una gasa.
- 60

- Se usaron ratones macho, alojados solos, de 8-9 semanas de edad, C57BL/6 para el estudio *in vivo*. Se empaquetó ARNm de leptina sintética modificada purificada por FPLC (SEQ ID NO: 6) en el que las uridinas se sustituyeron con pseudouridina en un lípido catiónico (relación molar de N:P = 8:1) y después se diluyeron en solución salina inyectable a una dosis de 10 mg por peso corporal grupal promedio.
- 65

El día 0, los animales se pesaron y clasificaron según su peso corporal promedio. Se proporcionaron dosis a los ratones y se registró el consumo de alimento (CA), en cada uno de los días 1-7 y los días 9, 11 y 16. Inyección subcutánea de ARNm de leptina sintética modificada en ratón

5 Antes de la inyección subcutánea, se registraron los pesos corporales de los ratones y se ponderaron con respecto a la dieta, agrupando los ratones según su peso corporal. Los ratones se sujetaron manualmente y se colocaron sobre una superficie de trabajo. Se sujetó la piel del pescuezo y se separó del músculo subyacente, el espacio en el que se insertó una aguja de calibre 25 conectada con una jeringa de 1 ml. Se tiró hacia atrás del émbolo de la jeringa de manera que se garantizara que no se introducía fluido en la jeringa y después se inyectó manualmente el volumen deseado de ARNm de leptina con presión y velocidad moderadas. Después se retiró la aguja y los ratones se devolvieron a sus jaulas.

15 Se usaron ratones macho, de 8-9 semanas de edad, C57BL/6 para el estudio *in vivo*. Se diluyó ARNm de leptina sintética modificada purificada por FPLC (SEQ ID NO: 6) en el que las uridinas se sustituyeron con pseudouridina (relación molar de N:P = 8:1) en múltiples lípidos catiónicos en solución salina inyectable a una dosis de 10 mg por peso corporal grupal promedio.

20 El día 0, los animales se pesaron y clasificaron según su peso corporal promedio, se dosificó hielo a las 09:00 y se extrajo sangre a las 09:00 el día 0. También se extrajo sangre a las 09:00 en cada uno de los días 1 y 2 y se evaluó para determinar los niveles de proteína leptina. También se registraron el peso corporal y el consumo de alimento.

Tabla 4: Datos *in vivo*

Expresión de proteína (ng/ml) después de inyección IV de ARNm encapsulado en ratones C57B6 (a las 24 h)			
Ácido nucleico	Ejemplo 1	Ejemplo 15	Ejemplo 13
hLeptina	12,3 ng/ml (0,4 mpk, C57)		3,8 ng/ml (0,4 mpk, C57)
mEPO	22,5 ng/ml (0,2 mpk, ob/ob)		
hFIX	147,7 ng/ml (0,12 mpk, C57)		292,7 ng/ml (0,12 mpk, C57)
Expresión de proteína (ng/ml) después de inyección SC de ARNm encapsulado en ratones C57B6			
hLeptina	2,5 ng/ml (0,4 mpk, C57)	6,2 ng/ml (0,6 mpk, C57)	
Atenuación de FVII (%) después de la inyección IV de ARNip encapsulado en ratones CD-1			
FVII	69 %/0,03 mpk		97 %/0,03 mpk

Estudios de inmunogenicidad

25 ADN plasmídico que codificaba replicones de alfavirus que codificaban la proteína F del RSV como un transgén actuó como molde para la síntesis de ARN *in vitro*. Los replicones contienen los elementos genéticos de alfavirus necesarios para replicación de ARN, pero carecen de los que codifican productos génicos necesarios para ensamblaje de partículas; en cambio, las proteínas estructurales se reemplazan por una proteína de interés (p. ej., un inmunógeno, tal como proteína F de RSV de longitud completa) y, por lo tanto, los replicones son incapaces de inducir la generación de partículas infecciosas. Un promotor de bacteriófago T7 cadena arriba del ADNc de alfavirus facilita la síntesis del ARN de replicón *in vitro*. Otros promotores, tales como SP6, podrían usarse como alternativas.

35 Se realizaron transcripciones durante 2 horas a 37 °C en presencia de 7,5 mM (ARN polimerasa de T7) o 5 mM (ARN polimerasa de SP6) de cada uno de los nucleósido trifosfatos (ATP, CTP, GTP y UTP) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Ambion). Después de la transcripción, el ADN molde se digirió con DNasa TURBO (Ambion). El ARN de replicón se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua sin nucleasa. El ARN sin caperuza se cubrió después de la transcripción con enzima de caperuza de Vaccinia (VCE) usando el sistema de caperuza ScriptCap m7G (Epicenter Biotechnologies) como se perfila en el manual del usuario; a los replicones con esta caperuza se les asigna el prefijo "v", p. ej., vA317 es el replicón A317 con caperuza por VCE. El ARN con caperuza después de la transcripción se precipitó con LiCl y se reconstituyó en agua sin nucleasa. La concentración de las muestras de ARN se determinó midiendo DO_{260nm}. La integridad de los transcritos *in vitro* se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante.

45 Encapsulación en liposomas basados en DlinDMA

50 El ARN se encapsuló en liposomas realizados esencialmente por el método de Geall *et al.* (2012) PNAS vol. 109 (36): 14604-14609, Jeffs *et al.* (2005) Pharmaceutical Research 22 (3): 362-372 y Maurer *et al.* (2001) Biophysical Journal, 80: 2310-2326. Los liposomas estaban compuestos de 10 % de DSPC (zwitteriónico), 40 % de lípido catiónico, 48 % de colesterol y 2 % de DMG conjugado con PEG (PEG de 2 kDa). Estas proporciones se refieren al % de moles en el liposoma total.

DSPC (1,2-diastearoil-sn-glicero-3-fosfolina) se adquirió de Genzyme. Se obtuvo colesterol de Sigma-Aldrich. DMG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)], sal de amonio) conjugado con PEG, DOTAP

(clorhidrato de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano, sal de cloruro) y DC-col (3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol) fueron de Avanti Polar Lipids.

5 En resumen, los lípidos se disolvieron en etanol (2 ml), se disolvió un replicón de ARN en tampón (2 ml, citrato de sodio 100 mM, pH 6) y estos se mezclaron con 2 ml de tampón seguido de 1 hora de equilibrio. Después se dializó la mezcla toda la noche frente a PBS 1x. El producto resultante contenía liposomas, con ~70-95 % de eficacia de encapsulación. Para experimentos *in vitro* e *in vivo*, las formulaciones se diluyeron a la concentración de ARN necesaria con PBS 1X.

10 El porcentaje de ARN encapsulado y la concentración de ARN se determinaron mediante el kit de reactivos de ARN RiboGreen Quant-iT (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El patrón de ARN ribosómico proporcionado en el kit se usó para generar una curva patrón. Los liposomas se diluyeron 10x o 100x en tampón TE 1X (del kit) antes de la adición del colorante. Por separado, los liposomas se diluyeron 10x o 100x en tampón TE 1X que contenía Triton X al 0,5 % antes de la adición del colorante (para romper los liposomas y, por tanto, para ensayar ARN total). Posteriormente, se añadió una cantidad igual de colorante a cada solución y después se cargaron ~180 ml de cada solución después de la adición de colorante por duplicado en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. La fluorescencia (Ex 485 nm, Em 528 nm) se leyó en un lector de microplacas. Todas las formulaciones de liposomas se dosificaron *in vivo* en función de la cantidad encapsulada de ARN.

20 Inmunogenicidad de RSV

Se administró un replicón autorreplicante que codificaba la proteína F de RSV a ratones BALB/c, 8 animales por grupo, mediante vacunas intramusculares bilaterales (50 ml por pierna) los días 0 y 21 con el replicón (0,1 y 1 ng) formulado como liposomas con los lípidos descritos a continuación. Todos los liposomas probados estaban compuestos de 40 % de lípido catiónico, 10 % de DSPC, 48 % de colesterol y 2 % de PEG-DMG con cantidades similares de ARN. Todos los liposomas se prepararon usando la misma técnica que la descrita anteriormente.

25 Las formulaciones de liposomas probadas generaron respuestas inmunitarias con tan poco como 0,1 ng de ARN autorreplicante, según lo determinado por el aumento de títulos de IgG específica de F.

30 % de inmovilización (% I), concentración de ARN (conc), tamaño de partícula medido por DLS y polidispersidad señalada por DLS de LNP preparados con diferentes lípidos catiónicos

Ejemplo	% I		Conc (ug/ml)		Tamaño (nm)		IPD	
	1 ^{er} IM	2 ^o IM	1 ^{er} IM	2 ^o IM	1 ^{er} IM	2 ^o IM	1 ^{er} IM	2 ^o IM
1	96,21	91,99	10,352	11,279	139,1	133,5	0,122	0,11
15	94,26	96,64	10,203	10,091	144,7	139,4	0,121	0,097
35	93,46	93,9	10,059	9,937	135,2	137,5	0,119	0,108
40	71,1	78,05	9,461	9,65	141	137,3	0,122	0,118
34	75,5	79,19	9,24	11,495	136,2	135,4	0,116	0,11
32	92,6	94,72	8,81	9,653	136,2	135	0,147	0,088
48	86,169	85,6	9,841	9,665	137,9	134,2	0,091	0,075

35 Los datos de inmunogenicidad fueron dos semanas después de dos inmunizaciones de ARN que expresa RSV-F de LNP preparadas con diferentes lípidos catiónicos. Se prepararon LNP nuevas para cada inmunización.

Ejemplo	Inmunogenicidad (2wp2; log10 títulos de IgG)	
	1 ng	0,1 ng
1	4,08	3,99
15	4,63	4,45
35	4,86	4,53
40	4,74	4,31
34	4,36	3,73
32*	4,92	4,77
48	5,02	4,58

40 Debe entenderse que para todos los límites numéricos que describen algún parámetro en la presente solicitud, tales como "aproximadamente", "al menos", "menos de", y "más de", la descripción también abarca necesariamente cualquier intervalo delimitado por los valores enumerados. En consecuencia, por ejemplo, la descripción "al menos 1, 2, 3, 4 o 5" también describe, entre otras cosas, los intervalos 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 2-3, 2-4, 2-5, 3-4, 3-5 y 4-5, etcétera.

45 Los encabezados usados en la presente solicitud son solo por conveniencia y no afectan a la interpretación de la presente solicitud.

Las características preferidas de cada uno de los aspectos proporcionados por la invención son aplicables a todos los

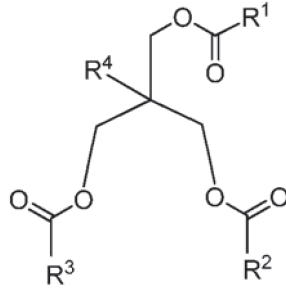
5 otros aspectos de la invención haciendo los cambios necesarios y, sin limitación, se ilustran por las reivindicaciones dependientes y también abarcan combinaciones y permutaciones de características individuales (p. ej., elementos, incluyendo intervalos numéricos y realizaciones ejemplares) de realizaciones y aspectos particulares de la invención, incluyendo los ejemplos de trabajo. Por ejemplo, los parámetros experimentales particulares ilustrados en los ejemplos
10 de trabajo pueden adaptarse para su uso en la invención reivindicada por partes sin alejarse de la invención. Por ejemplo, para materiales que se desvelan, aunque puede que no se desvele de manera explícita una referencia específica de cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos, cada uno se contempla específicamente y se describe en el presente documento. Por tanto, si se desvela una clase de elementos A, B y C, así como una clase de elementos D, E y F y se desvela un ejemplo de una combinación de
15 elementos A-D, entonces, incluso si cada uno no se enumera individualmente, cada uno se contempla individual y colectivamente. Por tanto, en este ejemplo, cada una de las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F se contemplan específicamente y deben considerarse divulgadas a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y la combinación ilustrativa A-D. De forma análoga, cualquier subconjunto o combinación de estos también se contempla y se divulga específicamente. Por tanto, por ejemplo, los subgrupos de A-E, B-F y C-E se contemplan específicamente y deben considerarse desvelados a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y la combinación ilustrativa A-D. Este concepto se aplica a todos los aspectos de la presente solicitud, incluyendo elementos de una composición de materia y etapas del método para preparar o usar las composiciones.

20 Los aspectos anteriores de la invención, según lo reconocido por la persona que tiene experiencia habitual en la materia siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, pueden reivindicarse en cualquier combinación o permutación en la medida en que sean novedosos y no evidentes con respecto a la técnica anterior, por tanto, en la medida en que un elemento se describe en una o más referencias conocidas por la persona que tiene experiencia habitual en la materia, pueden ser excluidos de la invención reivindicada mediante, entre otras cosas, una condición o nota negativa de la característica o combinación de características.

25

REIVINDICACIONES

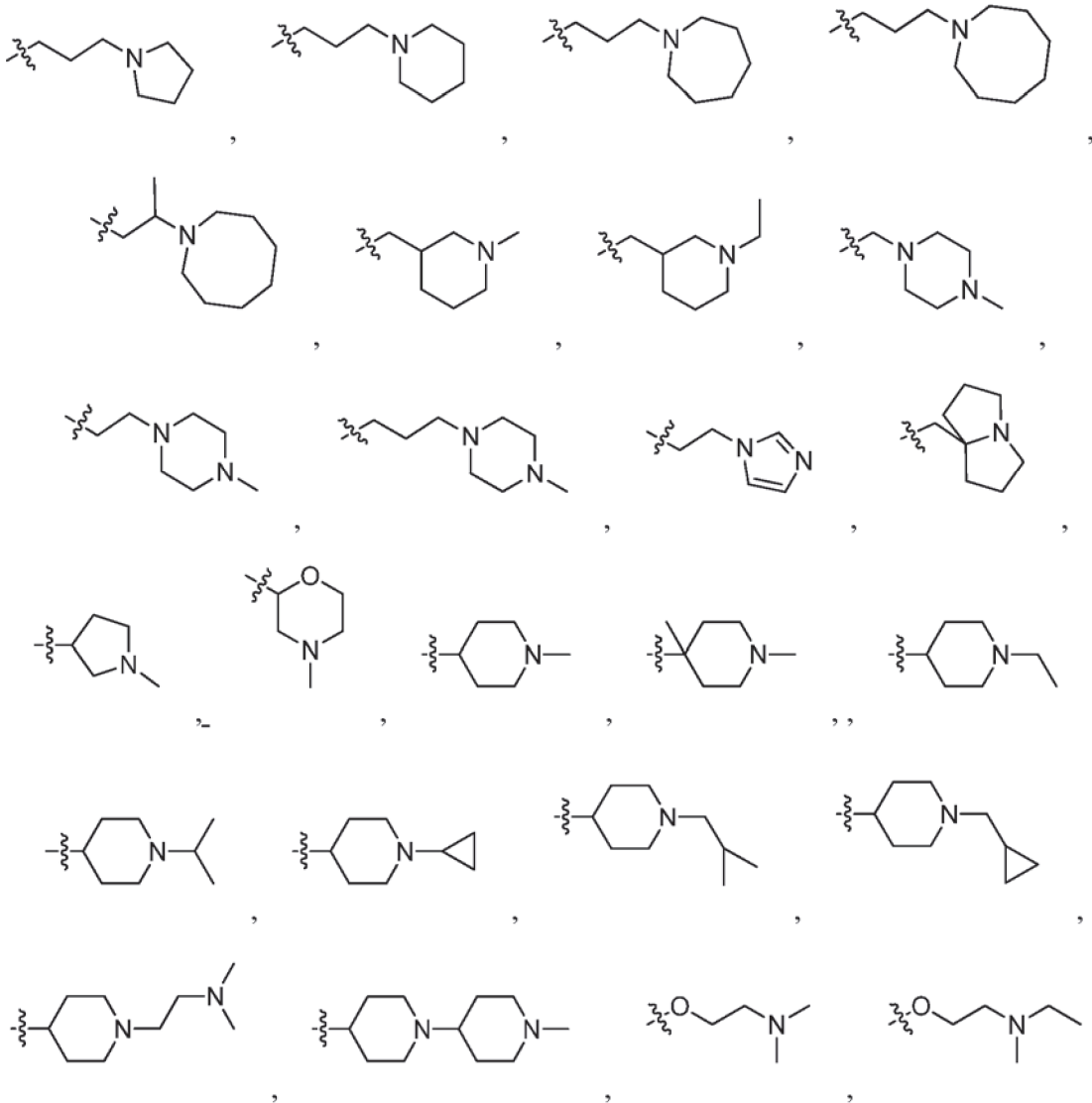
1. Un compuesto de fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:



(II)

5

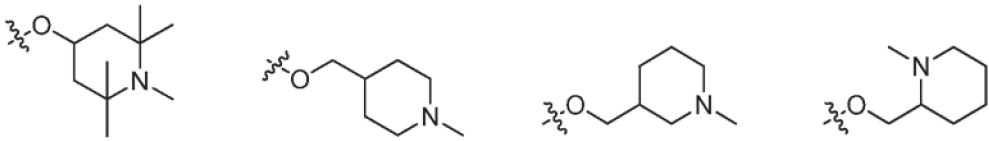
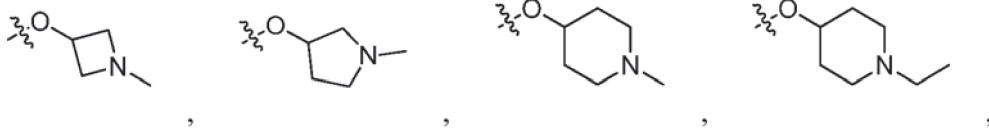
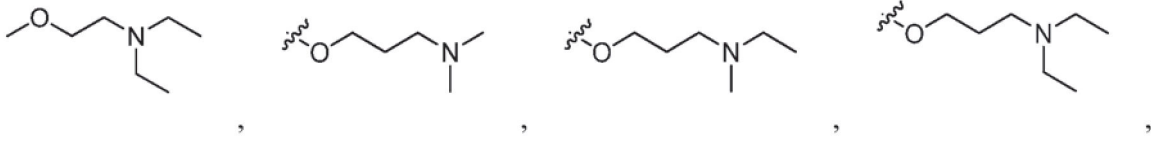
R¹ se selecciona del grupo que consiste en:



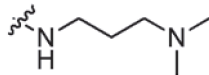
10

15

20

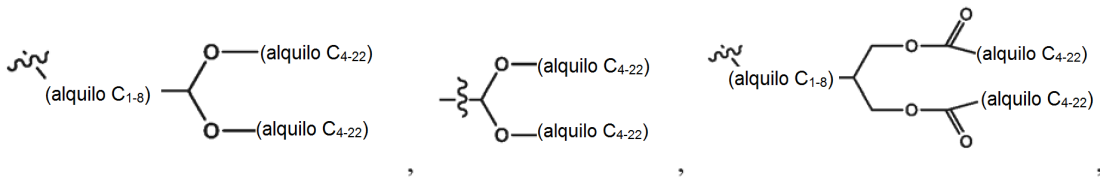


5 y

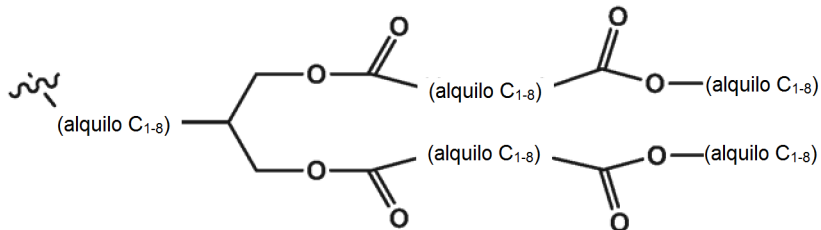
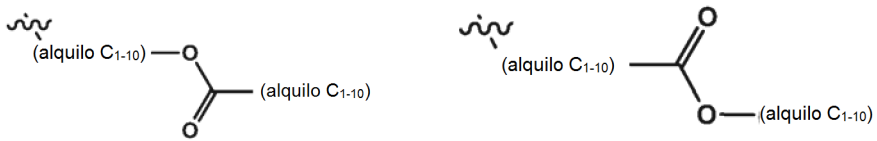


10

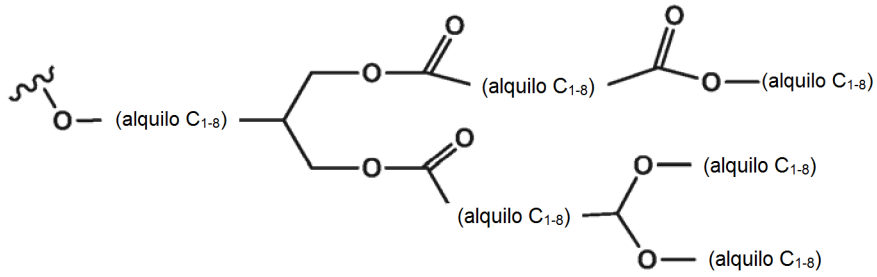
cada uno de R² y R³ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C₇₋₂₂, alqueno C₁₂₋₂₂, cicloalquilo C₃₋₈, cada uno opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 grupos alquilo;



15



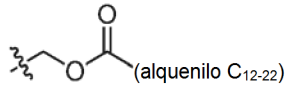
20 y



;

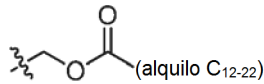
y

5 R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₁₄,



y

10



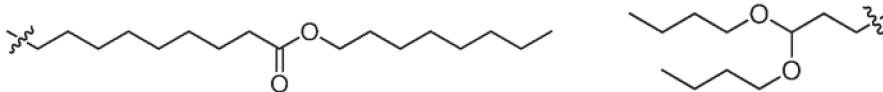
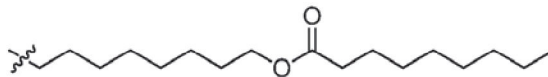
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R⁴ es hidrógeno.

15

3. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R² se selecciona entre el grupo que consiste en:

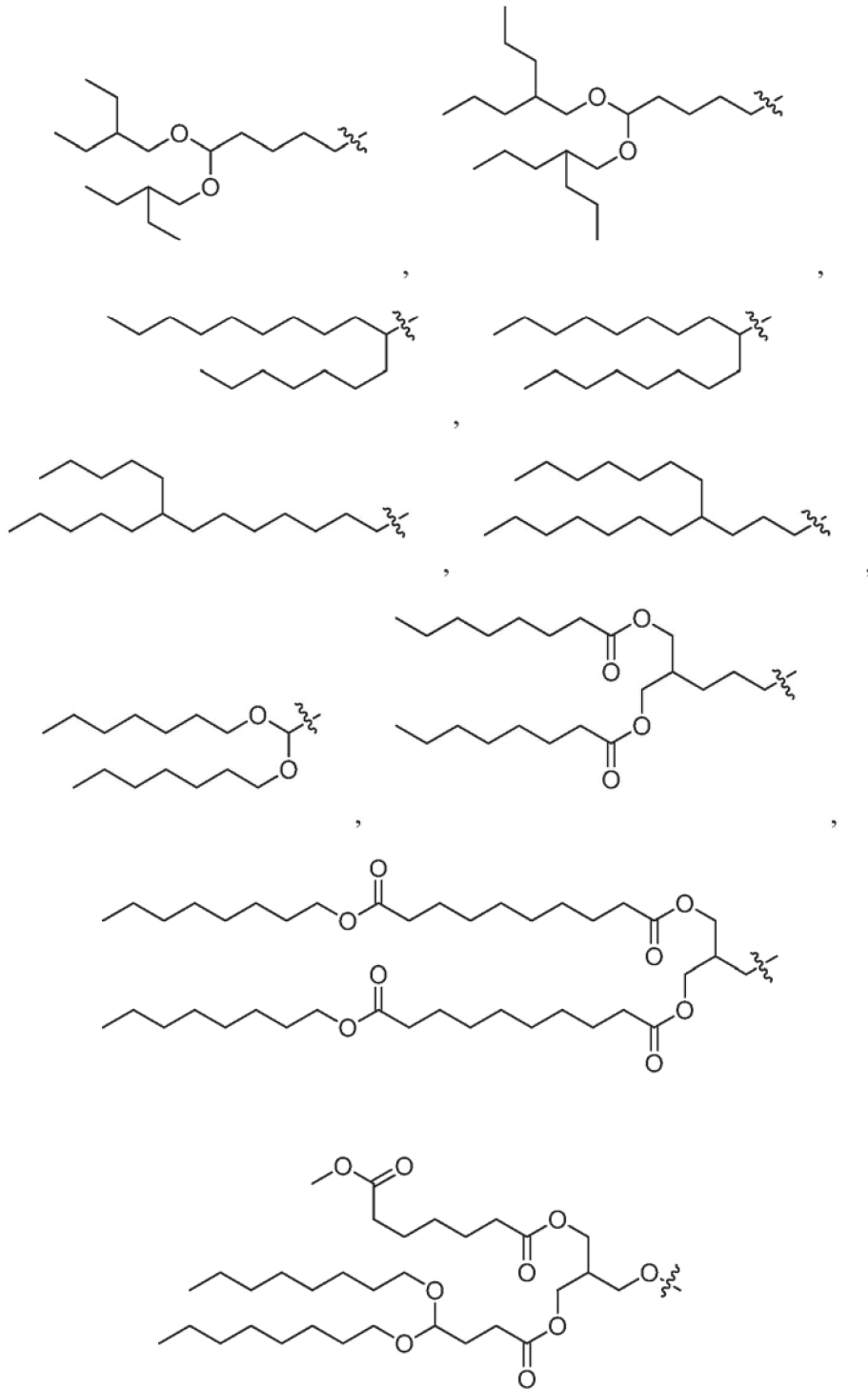


20

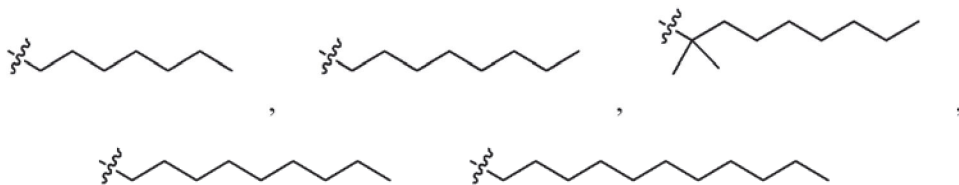


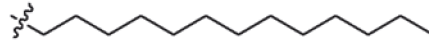
25





4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R³ se selecciona entre el grupo que consiste en:



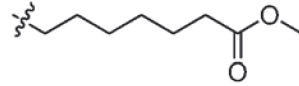


,

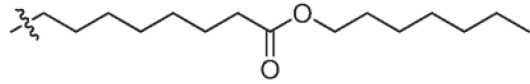
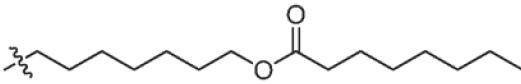


,

5

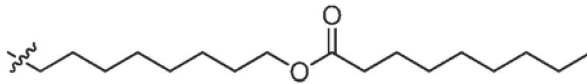


,

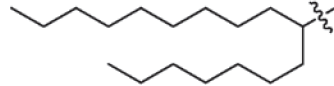
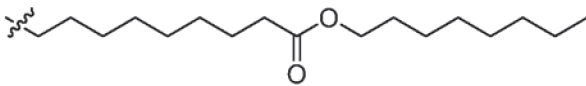


,

10

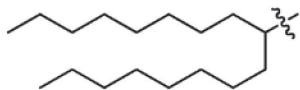


,

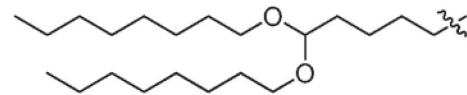


,

15

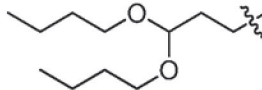


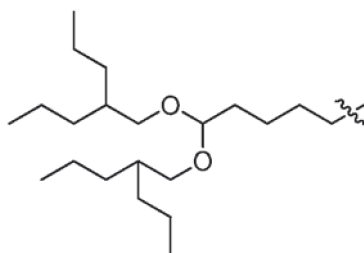
,



,

y

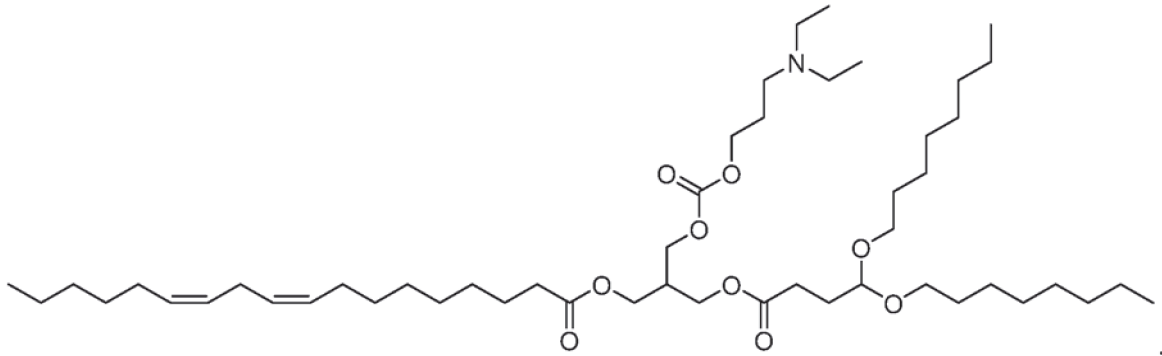




5. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en:

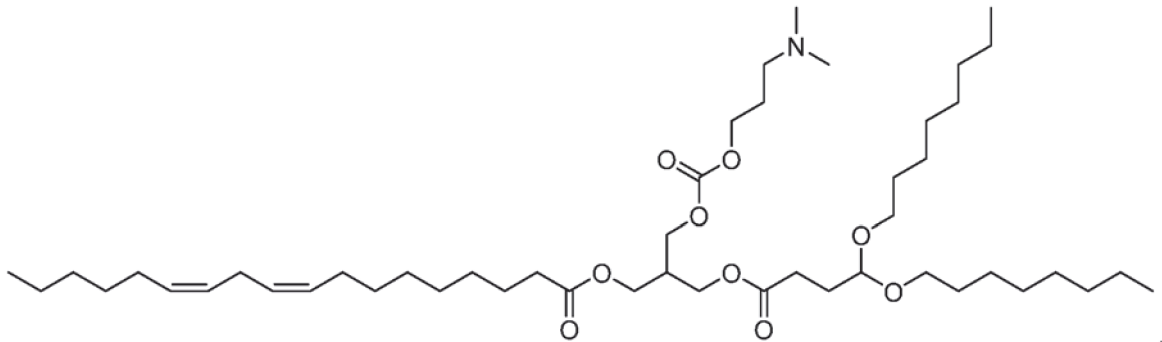
- 5 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(4-metilpiperazin-1-il)propanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(pirrolidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 10 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((4-(piperidin-1-il)butanoil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 15 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 20 bis(2-heptilundecanoato) de 2-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 bis(2-heptilundecanoato) de 2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-heptilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 25 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 bis(3-octilundecanoato) de 2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propilo;
 30 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((7-hexiltridecanoil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((9-pentiltetradecanoil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-heptildodecanoil)oxi)metil)propilo;
 35 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((2,2-bis(heptiloxi)acetoxi)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((6,6-bis(octiloxi)hexanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 40 dioctanoato de 2-(3-etil-11-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)-8,14-dioxo-7,9,13-trioxa-3-azaheptadecan-17-il)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 45 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo;
 1-isopropilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 1-(ciclopropilmetil)piperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 50 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propilo;
 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)metil)propano-1,3-diílo;
 4-metilmorfolin-2-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-

- dienoiloxi)metil)propilo;
 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-
 dienoiloxi)metil)propilo;
 5 1-metilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-
 dienoiloxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpirrolidin-3-
 il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpiperidin-4-
 il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 10 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilazetidín-3-
 il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpiperidin-4-
 il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 15 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpiperidin-4-
 il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1,2,2,6,6-pentametilpiperidin-4-
 il)oxi)carbonil)oxi)metil)propilo;
 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-
 (dimetilamino)propil)carbamoil)oxi)metil)propilo;
 20 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((4,4-bis((2-propilpentil)oxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-
 dienoiloxi)metil)propilo;
 1,4-dimetilpiperidin-4-carboxilato de 3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-
 dienoiloxi)metil)propilo;
 25 bis(4,4-bis(octiloxi)butanoato de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 bis(6,6-bis(octiloxi)hexanoato de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 bis(6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoato de 2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo;
 dioctanoato de 2-(5-(3-(dodecanoiloxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-
 diilo;
 30 dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-((palmitoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-1,3-
 diilo;
 dioctanoato de 2-(5-(3-((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)-2-((tetradecanoiloxi)metil)propoxi)-5-oxopentil)propano-
 1,3-diilo;
 35 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((dodecanoiloxi)metil)propilo;
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((tetradecanoiloxi)metil)propilo;
 1-metilpirrolidin-3-carboxilato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((palmitoiloxi)metil)propilo;
 8-metil octanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo);
 10-octil decanodioato de 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propilo);
 decanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-carbonil)oxi)metil)propil)
 40 10-octilo;
 8-metil octanodioato de 1-(3-((6,6-bis((2-propilpentil)oxi)hexanoil)oxi)-2-(((1,4-dimetilpiperidin-4-
 carbonil)oxi)metil)propilo); y
 dioctanodioato de 8-dimetil O'1,O1-(2-(((1-metilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diilo);
- 45 6. Una composición lipídica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una
 sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende además opcionalmente un agente biológicamente activo.
7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 6 y un vehículo o excipiente
 farmacéuticamente aceptable.
- 50 8. La composición de la reivindicación 7, que comprende una molécula de ARN que codifica un inmunógeno,
 opcionalmente en donde el ARN es un ARN autorreplicante.
9. Una composición farmacéutica que comprende liposomas y moléculas de ARN autorreplicantes codificantes de
 55 inmunógenos, en donde los liposomas comprenden el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y en
 donde al menos la mitad del porcentaje molar de las moléculas de ARN están encapsuladas en los liposomas.
10. Una composición según la reivindicación 8 o la reivindicación 9 para su uso en un método para inducir una
 60 respuesta inmunitaria a un inmunógeno en un vertebrado.
11. Un compuesto:



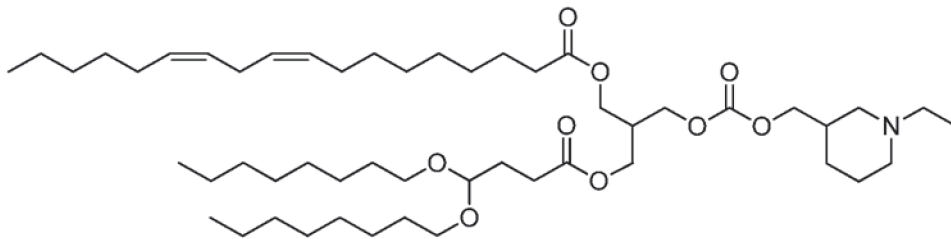
5 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un compuesto:



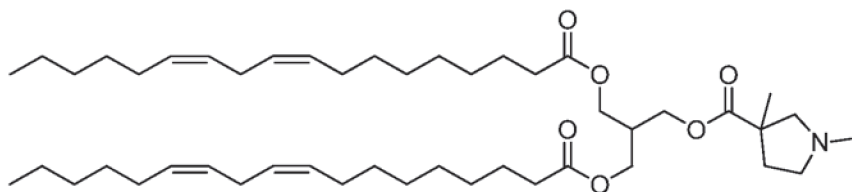
10 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. Un compuesto:



15 octadeca-9,12-dienoato de (9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 14. Un compuesto:



25 bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-2-(((1,3-dimetilpirrolidin-3-carbonil)oxi)metil)propano-1,3-diílo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R² es

