



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 449**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/41 (2006.01)

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07734913 .2**

96 Fecha de presentación : **05.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2004156**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54

Título: **Composición para la transfección de oligonucleótidos activos para la inactivación de genes y sus aplicaciones biológicas y terapéuticas.**

30

Prioridad: **06.04.2006 EP 06290563**
06.04.2006 US 789575 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2011

73

Titular/es: **POLYPLUS-TRANSFECTION S.A.**
Boulevard Sébastien Brandt Bioparc
BP 90018
67401 Illkirch Cédex, FR

72

Inventor/es: **Neuberg, Patrick;**
Bolcato Bellemin, Anne-Laure;
Behr, Jean-Paul y
Erbacher, Patrick

74

Agente: **Ruo Null, Alessandro**

ES 2 360 449 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

Composiciones para la transfección de oligonucleótidos activos para la inactivación de genes y sus aplicaciones biológicas y terapéuticas

5 [0001] La invención se refiere a medios, composiciones y métodos *in vitro*, para el suministro de oligonucleótidos, particularmente ARN interferente pequeño (designado como ARNip en lo sucesivo) que conduce a interferencia por ARN (iARN), a células eucariotas en cultivo, *ex vivo* o *in vivo*.

10 [0002] La interferencia por ARN (iARN) es una potente tecnología para inactivar genes a nivel del ARNm (Fire, 1999) (Tuschl et al., 1999), que proporciona degradación de ARNm específica de secuencia e inhibición de la producción de proteínas (Yang et al., 2000) (Zamore et al., 2000) (Hammond et al., 2000) (Parrish et al., 2000). La iARN es un proceso bioquímico altamente eficaz debido a un diseño predecible de secuencias activas de ARNbc corto y a la fijación como objetivo de ARNm específico. Cuando se introduce en el citoplasma de células mediante transfección con un vector de suministro, el ARNip ha demostrado inactivar eficazmente genes exógenos o endógenos en diversas células de mamífero (Elbashir et al., 2001).

15 [0003] Los ARN interferentes pequeños son ARN bicatenarios cortos (ARNbc) que tienen una longitud que varía preferiblemente entre 19 y 29 nucleótidos (véase las patentes WO 0244321, WO 01/075164 A3, EP20010985833, y referencias (Siolas et al., 2005) (Kim et al., 2005)), particularmente 19-23 nucleótidos, y tienen actividad de iARN en sistemas de cultivo celular de mamíferos (Parrish et al., 2000) (Elbashir et al., 2001) (Tuschl, 2001). Los ARNbc cortos, cuando emparejan sus bases, con extremos salientes 3' no emparejados, actúan como guía para la degradación de ARNm específica de secuencia. Los ARNbc cortos más eficaces estaban compuestos por dos cadenas de 21 nucleótidos de longitud que se emparejaron de modo que salientes 3' de 1-3, particularmente de 2, nucleótidos están presentes en ambos extremos del ARNbc (Elbashir et al., 2001).

20 [0004] El éxito de la iARN depende tanto de la longitud, secuencia y estructura química del ARNbc como del sistema de suministro a las células. En comparación con tecnología antisentido o de ribozimas, la estructura secundaria del ARNm objetivo no es un potente factor limitante para la inhibición de la expresión génica con ARNip. Muchas secuencias de ARNip pueden ser eficaces para un ARNm objetivo dado. Por lo tanto, la estabilidad y biodisponibilidad de ARNip bicatenarios así como la cantidad de ARNbc suministrado a las células, y particularmente en el citoplasma, siguen siendo los factores limitantes para una inactivación eficaz, en lugar de la accesibilidad al objetivo por parte del ARNip.

25 [0005] Muchos sistemas de suministro son útiles para introducir oligonucleótidos en células. Actualmente, vectores no virales basados en transfección mediada por lípidos catiónicos, tales como Oligofectamin, TRANSIT-TKO, LipofectAmine2000, SiGuide, RNAiFect, HiperFect, o jetSi, se comercializan para el suministro de ARNip. Al contrario que los sistemas a base de polímeros catiónicos, los lípidos catiónicos demostraron liberar el ácido nucleico en el citoplasma después de la rotura endosómica temprana y la formación de complejo con fosfatidilserina (Zelphati y Szoka, 1996).

30 [0006] El sistema de vector no viral comprende ventajosamente reactivos de suministro a base de lípidos o polímeros o péptidos catiónicos. El sistema de vector no viral es una formulación que comprende al menos un reactivo de suministro y componentes adicionales para estabilizar la formulación, fijar como objetivo células, tejidos u órganos, o aumentar la eficacia de transfección.

35 [0007] La presente invención describe una nueva clase de agentes de transfección no virales, que pertenecen al grupo de los lípidos catiónicos, que están particularmente adaptados para la transfección de oligonucleótidos de pequeño tamaño. Especialmente la interacción específica de pequeñas moléculas con oligonucleótidos impulsó a los inventores a diseñar una nueva clase de agentes de transfección.

40 [0008] Muchas moléculas se unen a oligonucleótidos bicatenarios (ONbc). Éstas pueden dividirse en tres clases con respecto a sus modos de unión:

- 45
- 55 1) intercalación entre pares de bases apilados como se ejemplifica mediante quinacrina o bromuro de etidio;
 - 2) interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógeno con heteroátomos de la cadena principal del oligonucleótido según se observó para las poliaminas espermina o espermidina,
 - 60 3) Compuestos de unión al Surco Menor (MGB): estructuras heterocíclicas extendidas que llenan el profundo surco menor del ADN e interactúan principalmente mediante interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Dichas moléculas oligo-heterocíclicas se ejemplifican mejor mediante el antibiótico netropsina (oligopéptido que contiene N-metilpirrol) y su análogo distamicina A (Cho y Rando, 2000).

65 [0009] Las hélices de ribonucleótidos muestran algunas características distintas: aunque la intercalación sigue siendo posible, los modos de unión por interacciones de Van der Waals y electrostáticas se producen

preferentemente en el profundo y algunas veces poco profundo surco mayor.

5 **[0010]** En particular, los compuestos de unión de tri-imidazol tales como AR-1-144, diseñados como análogos de netropsina que contienen imidazol (Yang et al., 1999), atrajeron la atención de los inventores. En este caso, el grupo amino N2 de guanina forma un puente de hidrógeno bifurcado con un par Im/Im lado a lado (Yang et al., 1999). El resto de la molécula parece tener más interacciones hidrófobas en el surco menor, como se muestra mediante la molécula parental distamicina A (Yang et al., 1999).

10 **[0011]** El colorante de bisbencimidazol Hoechst33258 es un compuesto de unión al surco menor igualmente conocido y muestra selectividad por secuencias de ADN ricas en AT. También se une a ARN en regiones "hinchadas", donde encaja en un bolsillo formado por pares de bases sucesivos, como en ARN TAR (Dassonneville et al., 1997).

15 **[0012]** Los inventores han descubierto que la eficacia de transfección podía obtenerse combinando un oligonucleótido de interés con moléculas catiónicas anfífilas específicas formuladas de forma estable como liposomas de pequeño tamaño con co-lípidos neutros.

20 **[0013]** Es, entonces, un objeto de la invención proporcionar nuevas moléculas útiles como agentes de transfección.

[0014] Es otro objeto de la invención proporcionar composiciones de estas moléculas útiles para transfección.

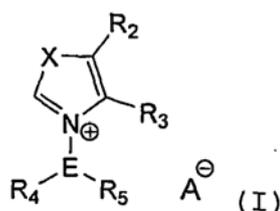
25 **[0015]** Es otro objeto proporcionar una ruta sintética y un método de purificación eficaz para dichas moléculas anfífilas.

[0016] De acuerdo con otro objeto más, la invención se refiere a un método para transfectar células en cultivo.

30 **[0017]** La invención también se refiere a composiciones para su uso como composiciones farmacéuticas para inducir un efecto regulador sobre la expresión de una o más proteínas objetivo responsables de o implicadas en enfermedades genéticas.

35 **[0018]** De acuerdo con la invención, las nuevas moléculas útiles como agentes para composiciones de transfección de oligonucleótidos, más particularmente, para interferencia por ARN, comprenden un resto catiónico capaz de unirse a oligonucleótidos unidos a un resto lipófilo que permite a la molécula atravesar la bicapa lipídica de las membranas celulares.

[0019] La invención se refiere, por lo tanto, a una molécula catiónica anfífila de fórmula (I)



en la que:

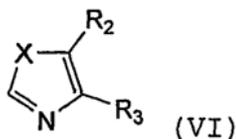
- 40
- X es N-R₁, S u O, siendo R₁ un radical alquilo C1-C4 o un radical alquilo C3-C6 hidroxilado,
 - R₂ y R₃, iguales o diferentes, representan H o un radical alquilo C1-C4, o R₂ y R₃ están enlazados conjuntamente para formar un anillo saturado o insaturado o un heterociclo que tiene 5 ó 6 elementos,
 - 45 - E es un espaciador alquilo C1-C5,
 - R₄ y R₅, iguales o diferentes, representan cadenas hidrocarbonadas o fluorocarbonadas de C10-C36, lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas, comprendiendo opcionalmente dichas cadenas cicloalquilo C3-C6,
 - 50 - A⁻ es un anión biocompatible.

55 **[0020]** Los heterociclos formados cuando R₂ y R₃ están enlazados conjuntamente son insaturados o saturados y tienen 5 ó 6 elementos y comprenden heteroátomos de C y N, S u O.

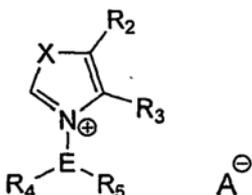
[0021] De acuerdo con una realización preferida de la invención, R₄ y R₅ en la fórmula (I) son radicales hidrocarburo de C14-C36 y E es un espaciador alquilo C1-C4.

- 5 [0022] En un grupo preferido, R₄ y R₅ son iguales.
- [0023] En moléculas ventajosas, R₄ y R₅ son radical alquilo C18 y E es alquilo C1.
- [0024] En otras moléculas ventajosas, R₄ y R₅ son radicales alquilo C16 y E es alquilo C4.
- [0025] En otro grupo preferido, R₄ y R₅ son diferentes.
- 10 [0026] En moléculas de interés, R₄ y R₅ son radicales alquilo C18 y C17, respectivamente y E es alquilo C2.
- [0027] En otras moléculas de interés, R₄ y R₅ son radicales alquilo C32 y C18, respectivamente, y E es alquilo C1.
- 15 [0028] Preferiblemente, en los grupos anteriores, R₂ y R₃ son H o forman juntos un anillo aromático, particularmente un grupo benzo, o un heterociclo tal como un grupo piridilo o pirazinilo.
- [0029] En particular, X es N-R₁, siendo R₁, por ejemplo, un radical metilo.
- [0030] Como alternativa, X es S u O.
- 20 [0031] Ventajosamente, el contraión A⁻ es Cl u OH⁻.
- [0032] La invención también se refiere a composiciones para la transfección de oligonucleótidos activos para la inactivación de genes. De acuerdo con una realización, la invención se refiere a composiciones en las que las moléculas anfífilas definidas anteriormente se formulan con co-lípidos neutros que son estables después de un almacenamiento prolongado.
- 25 [0033] Los co-lípidos adecuados son fosfatidiletanolaminas, tales como dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), conjugado de lípido-PEG o colesterol.
- [0034] En otra realización, la invención se refiere a moléculas anfífilas activas sin adición de co-lípidos, en particular aquellas con R₄ o R₅ ramificadas.
- 30 [0035] La invención se refiere más particularmente a composiciones de transfección que comprenden, además de una parte anfífila formulada con un lípido neutro, al menos un oligonucleótido responsable del efecto biológico deseado.
- 35 [0036] La invención proporciona, por lo tanto, un sistema de suministro no viral adecuado para introducir ONbc (ON= oligonucleótido; bc = bicatenario) en células vivas, especialmente ARNip.
- 40 [0037] Dichos oligonucleótidos o ARNip, respectivamente, pueden estabilizarse contra la degradación con grupos adecuados, seleccionados entre el grupo constituido por nucleótidos de purina, nucleótidos de pirimidina sustituidos con análogos modificados tales como desoxinucleótidos, y/o análogos de nucleótidos modificados tales como ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados en el azúcar o en la cadena principal. Las secuencias de oligonucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de nucleótidos (Verma y Eckstein, 1998), tales como metilfosfonato (Miller, 1991), morfolinofósforodiamidato, fósforotioato (Zon y Geiser, 1991), APN [ácido péptidonucleico] (Jepsen y Wengel, 2004), ANB [ácido nucleico bloqueado], análogos de 2'alquil nucleótidos (Kurreck, 2003).
- 45 [0038] La invención también se refiere a un método para obtener las moléculas de la fórmula (I), que comprende una etapa de purificación y una de conversión en derivados salinos de las moléculas anfífilas de fórmula (I) en una forma neutra, mediante precipitación selectiva en metanol/agua/ácido a partir del medio de reacción.
- 50 [0039] Ventajosamente, el método de síntesis de las moléculas de fórmula (I) comprende:
- 55 - Elaboración de una cadena larga ramificada, cuya parte hidrocarbonada se obtiene mediante métodos de acoplamiento C-C convencionales tal como se ilustra mediante la reacción de acoplamiento de Grignard a ésteres o aldehídos. La parte hidrófoba sintetizada contiene un alcohol primario o secundario, como se ilustra en la fórmula IV:
- 60
$$\text{HO-E-R}_4(\text{R}_5) \quad (\text{IV})$$
- Activación de la función alcohol mediante conversión en un derivado de metanosulfonilo, de fórmula (V) MsO-E-R₄(R₅) y/o otros derivados activados convencionales tales como derivados de halógeno;
- 65

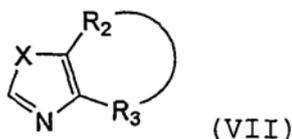
- hacer reaccionar a dichos derivados activados, en particular derivados de metanosulfonilo, con un heterociclo de fórmula (VI)



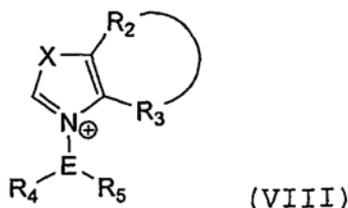
en la que X es N-R1, S u O en condiciones especificadas para obtener (I)



- 5 o hacer reaccionar a dicho derivado de metanosulfonilo (V) con un heterociclo ilustrado en la fórmula (VII)



en condiciones especificadas para obtener el heterociclo de fórmula (VIII)



10 **[0040]** En dichas fórmulas, los sustituyentes son como se han definido anteriormente con respecto a la fórmula (I).

15 **[0041]** Cuando X representa -N-R₁, dicho método comprende además una etapa de alquilación para X, por ejemplo la metilación de N con yoduro de metilo.

[0042] El alcohol HO-E-R₄(R₅) (IV) se activa mediante conversión en su éster de metanosulfonilo. Una suspensión del alcohol en un disolvente como piridina se prepara ventajosamente, usándose una alta concentración para la reacción con cloruro de metanosulfonilo.

20 **[0043]** La adición del heterociclo al derivado de sulfonato Ms-O-E-R₄(R₅) se realiza preferiblemente calentando la mezcla de reacción a una temperatura de aproximadamente 50-100°C, ventajosamente aproximadamente 80°C.

25 **[0044]** La purificación de las moléculas anfífilas descritas a partir de la mezcla de reacción, y la conversión en una forma de sal biocompatible, se realizan ventajosamente mediante un método de precipitación específico. Dicha precipitación consiste en una dilución en una mezcla de metanol más agua seguida de acidificación controlada mediante HA ácido generando un precipitado de la sal de A (I) correspondiente.

30 **[0045]** La precipitación también puede realizarse con otras mezclas de alcohol/agua, tales como mezclas de isopropanol/agua, que se acidifican con ácidos acuosos, para obtener las sales correspondientes, tales como sales de clorhidrato mediante acidificación con ácido clorhídrico.

[0046] Los liposomas se preparan disolviendo en un disolvente orgánico el co-lípido y el derivado de fórmula (I) y la inyección de esta solución en agua.

35 **[0047]** Un disolvente orgánico apropiado es el etanol. Las formulaciones liposomales resultantes en agua tienen ventajosamente un tamaño de aproximadamente 110 nm con una distribución de tamaño estrecha.

[0048] A continuación se compleja ARNip o un oligonucleótido apropiado con dicha formulación de liposomas.

[0049] Como se muestra en los ejemplos, las moléculas de la invención son sistemas particularmente eficaces para suministrar oligonucleótidos, especialmente ARNip, a células eucariotas en cultivo.

5 **[0050]** La invención también se refiere, por lo tanto, a un método para la transfección de células mediante oligonucleótidos que median la inactivación de genes, particularmente ARNip que induce iARN, que comprende la introducción de una composición tal como se ha definido anteriormente en las células.

10 **[0051]** Dichas composiciones proporcionan una eficacia selectiva y alta de inactivación de genes endógenos durante muchos días a una concentración de ARNip muy baja, particularmente a concentraciones nanomolares y hasta picomolares de ARNip. La alta inactivación de genes obtenida de este modo es ejemplificada por muchos objetivos, tales como genes de luciferasa, GAPDH humana, lamina A/C humana, o de vimentina murina, sin efectos secundarios o efectos que no afectan al objetivo, o toxicidad celular.

15 **[0052]** Dicho método puede usarse con células eucariotas en cultivo (células tanto adherentes como no adherentes), para aplicaciones genómicas funcionales, validación de objetivos o aplicaciones terapéuticas *in vivo* o *ex vivo*.

[0053] El método de la invención puede realizarse en presencia de suero usando los protocolos de transfección.

20 **[0054]** El método de la invención es particularmente útil para mediar aplicaciones de inactivación génica o HTS [cribado de alto rendimiento] de ARNip u oligonucleótido cuando se realiza un procedimiento de transfección inversa.

[0055] Ventajosamente, las composiciones definidas anteriormente son capaces de inducir un efecto regulador sobre la expresión de una o más proteínas objetivo responsables de o implicadas en enfermedades genéticas.

25 **[0056]** La invención también se refiere, por lo tanto, a composiciones de transfección tales como se han definido anteriormente para su uso como fármacos.

30 **[0057]** Dichas composiciones están ventajosamente en una forma adecuada para una administración por vía oral, sistémica, o tópica y pueden estar asociadas a un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable.

[0058] Dichas composiciones son particularmente útiles para el tratamiento de cáncer, infecciones víricas o infecciones parasitarias.

35 **[0059]** Otras características y ventajas de la invención se proporcionarán en los siguientes ejemplos, en referencia a las figuras 1 a 10, que representan, respectivamente:

40 **Figura 1:** Interferencia por ARN eficaz y selectiva del gen de luciferasa (pGL3) expresado de forma estable por células A549-GL3Luc mediante ARNip de GL3Luc transfectado con la formulación de MONI/DOPE (1 mM/1 mM en etanol). Células A549-GL3Luc, que expresan de forma estable el gen de luciferasa, se transfectaron (en formato de placa de cultivo tisular de 24 pocillos) con ARNip de GL3Luc, variando la concentración entre 100 y 2000 pM, complejado con 2 μ l de formulación equimolar compuesta por MONI/DOPE (1 mM/1 mM en Etanol). Como control de ARNip inespecífico, se transfectaron ARNip que coincidían con la secuencia de luciferasa de GL2 en las mismas condiciones. La expresión del gen de luciferasa se midió después de un periodo de incubación de 48 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y la actividad de luciferasa se expresó como Unidades Relativas de Luz (URL) normalizada mediante el contenido de proteína en los lisados celulares (mg de proteína).

50 **Figura 2:** Interferencia por ARN selectiva y eficaz del gen de luciferasa (pGL3) expresado de forma estable por células A549-GL3Luc mediante ARNip de GL3Luc transfectado con la formulación de MONBI/DOPE (1 mM/2 mM en etanol). Células A549-GL3Luc, que expresan de forma estable el gen de luciferasa, se transfectaron (en formato de placa de cultivo tisular de 24 pocillos) con ARNip de GL3Luc, variando la concentración entre 250 y 5000 pM, complejado con 2 μ l de formulación compuesta por MONBI/DOPE (1 mM/2 mM en Etanol). Como control de ARNip inespecífico, se transfectaron ARNip que coincidían con la secuencia de luciferasa de GL2 en las mismas condiciones. La expresión del gen de luciferasa se midió después de un periodo de incubación de 48 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y la actividad de luciferasa se expresaba con Unidades Relativas de Luz (URL) normalizada mediante el contenido de proteína en los lisados celulares (mg de proteína).

60 **Figura 3:** Inactivación del gen de luciferasa (pGL3) mediante ARNip de GL3Luc transfectado con la formulación de MONI/DOPE (1 mM/ 1 mM en etanol), eficaz incluso en el intervalo picomolar de ARNip. Células A549-GL3Luc, que expresan de forma estable el gen de luciferasa, se transfectaron (placa de 24 pocillos) con ARNip de GL3Luc complejado con la formulación equimolar compuesta por MONI/DOPE (1 mM/1 mM en etanol) con una concentración de ARNip que variaba entre 10 y 5000 pM. La expresión del gen de luciferasa se midió después de un periodo de incubación de 48 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y la eficacia de inactivación del gen de luciferasa de GL3 se calculó a partir del nivel de luciferasa endógena de

células A549-GL3Luc no transfectadas normalizado mediante el contenido de proteína en los lisados celulares.

Figura 4: mediciones mediante DLS del tamaño de partícula que muestra una población relativamente monodispersa de liposomas con tamaños de 100 ± 10 nm.

Se prepararon preparaciones liposomales a 1 mmol de molécula anfífila con concentraciones variables de DOPE en agua milliQ, como se ha descrito anteriormente. El tamaño de partícula de estas preparaciones liposomales se determinó mediante dispersión de luz usando un aparato *Zetamaster* (Malvern Instrument, Orsay, Francia) con las siguientes especificaciones: tiempo de muestreo, 30 s; 3 mediciones por muestra; viscosidad del medio, 1,0 cP; índice de refracción (IR) del medio, 1,335; IR de la partícula, 1,47; temperatura: 25°C, a una longitud de onda del láser de 633 nm. La determinación del tamaño de partículas presentada en la figura se obtuvo a partir de la preparación liposomal con MONI 1 mM y DOPE 1,5 mM en agua (estabilidad de liposomas después de 1 mes de almacenamiento a 5°C). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Figura 5: Eficacia de inactivación comparativa del gen de luciferasa (pGL3) mediante ARNip de GL3Luc transfectado con la formulación de MONI/DOPE (1 mM/2 mM) en agua y muchos reactivos de transfección de ARNip disponibles en el mercado.

Células A549-GL3Luc, que expresan de forma estable el gen de luciferasa, se transfectaron (placa de 24 pocillos) con ARNip de GL3Luc complejo con 2 μ l de formulación liposomal compuesta de MONI/DOPE en Etanol (1 mM/2 mM) en agua y muchos reactivos de transfección disponibles en el mercado con una concentración de ARNip que variaba entre 1 y 10.000 pM. Los reactivos de transfección comerciales se usaron en sus condiciones óptimas siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (véase Materiales y Métodos). La expresión del gen de luciferasa se midió después de un periodo de incubación de 48 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y la eficacia de inactivación del gen de luciferasa GL3 se calculó a partir del nivel de luciferasa endógena de células A549-GL3Luc no transfectadas normalizado mediante el contenido de proteína en los lisados celulares.

Figura 6: inactivación del gen de GAPDH eficaz en diferentes líneas celulares después de la transfección de ARNip con la formulación de MONI/DOPE en agua (1 mM/2 mM).

Células HeLa, Caski y SiHA adherentes y células K562 y THP-1 no adherentes se transfectaron con ARNip de GAPDH complejo con la formulación de MONI/DOPE (1 mM/2 mM) en agua. El nivel de ARNm de GAPDH se midió mediante un ensayo con ADN ramificado después de un periodo de incubación de 48 h. Como control inespecífico, ARNip que coincidía con una secuencia no relacionada (lamina A/C) se transfectó en las mismas condiciones. Los experimentos se realizaron por triplicado y la eficacia de inactivación de GAPDH se calculó a partir del nivel GAPDH de forma endógena de células no transfectadas.

Figura 7: La formulación de MONI/DOPE media en la inactivación eficaz del gen de Vimentina en células 3T3.

Se transfectaron células 3T3 con ARNip de vimentina complejo con la formulación de MONI/DOPE con una concentración de ARNip que variaba entre 20 nM y 1 nM. El nivel de proteína vimentina se determinó mediante transferencia de Western después de un periodo de incubación de 48 h. Como control del nivel de proteína en los lisados celulares, también se detectó la proteína GAPDH.

Figura 8: La formulación de MONI/DOPE liposomal media la inactivación eficaz de genes de Lamina A/C en células HeLa.

Se transfectaron células HeLa en medio que contenía suero (en placa de 24 pocillos) con ARNip de Lamina A/C (5 nM) complejo con 2 μ l de la formulación liposomal compuesta por MONI/DOPE en Etanol (1 mM/2 mM) en agua. La proteína lamina A/C se detectó mediante tinción por inmunofluorescencia 48 h después de la transfección y se observó mediante microscopía (C y D) y se comparó con células no transfectadas (A y B).

Figura 9: La transfección inversa de ARNip complejo con la formulación de MONI/DOPE en agua (1 mM/2 mM) induce inactivación de genes selectiva y altamente eficaz.

ARNip de GL3Luc diluido en 50 μ l de medio libre de suero se complejaron (en formato de placa de cultivo tisular de 96 pocillos, n = 6) durante 5 minutos con 1 μ l de formulación compuesta por MONI/DOPE en agua (1 mM/2 mM). A continuación, se añadieron 10.000 células A549-GL3Luc, que expresaban de forma estable el gen de luciferasa, en 125 μ l de medio que contenía suero, por pocillo. La expresión del gen de luciferasa se midió después de un periodo de incubación de 48 h. Como control de ARNip inespecífico, se transfectaron ARNip que coincidían con la secuencia de luciferasa de GL2, en las mismas condiciones. La expresión del gen de luciferasa se midió después de un periodo de incubación de 48 h y la actividad de luciferasa se expresó como Unidades Relativas de Luz (URL) normalizada mediante el contenido de proteína en los lisados celulares (mg de proteína). La eficacia de inactivación de luciferasa de GL3 (Figura 3B) se calculó a partir del nivel de luciferasa endógena de células A549-GL3Luc no transfectadas normalizado mediante el contenido de proteína en los lisados celulares.

Figura 10: La transfección inversa de ARNip complejo con la formulación de MONI/DOPE en agua (1 mM/2 mM) era eficaz para inactivar la GAPDH endógena de células MCF-7.

El procedimiento inverso optimizado de transfección de ARNip se aplicó para inactivar el gen de GAPDH de

5 células MCF-7 usando un intervalo de concentración de ARNip de 100 pM a 10 nM y 1 µl de la formulación liposomal de MONI/DOPE. El nivel de ARNm de GAPDH se midió mediante el ensayo QuantiGene® de ADN ramificado 48 h después de la transfección. Como control inespecífico, se transfectó ARNip que coincidía con una secuencia no relacionada (lamina A/C) en las mismas condiciones. La eficacia de inactivación de GAPDH se calculó a partir del nivel de GAPDH de forma endógena de células no transfectadas (n = 6 por condición).

Materiales y métodos:

Productos químicos y oligonucleótidos

10 **[0060]** Los oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente y purificados mediante PAGE por Eurogentec (Bélgica). Los oligonucleótidos se hibridaron en tampón de hibridación 1x (Acetato de K 50 mM, Acetato de Mg 50 mM) (Eurogentec) durante 2 minutos a 95°C, seguido de 2-4 horas de incubación a temperatura ambiente. Los reactivos HiperFect y SilentFect eran de Qiagen y BioRad, respectivamente (Estados Unidos). Los reactivos TransIT-TKO y Saint-Red eran de Mirus Corporation y Synvolux, respectivamente. El reactivo GAPDH SMART pool® era de Dharmacon.

[0061] Los ARNip bicatenarios usados:

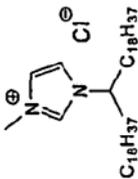
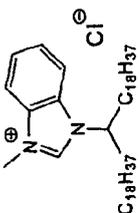
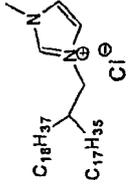
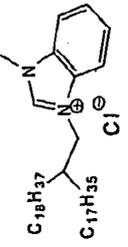
ARNip de GL3Luc bicatenario (SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2)	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGA(dT) ₂ -3' 3'-(dT) ₂ GAAUGCGACUCAUGAAGCU-5'
ARNip de GL2Luc bicatenario (SEC ID N° 3 y SEC ID N° 4)	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA(dT) ₂ -3' 3'-(dT) ₂ GCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5'
ARNip de Vimentina bicatenario (SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6)	5'-GAAUGGUACAAAUCCAAGdTdT-3' 3'-dTdTTCUUACCAUGUUUAGGUUC-5'
ARNip de Lamina A/C bicatenario (SEC ID N° 7 y SEC ID N° 8)	5'-CUGGACUUCAGAAAGAACAdTdT-3' 3'-dTdTGACCUGAAGGUCUUCUUGU-5'

5 **[0062]** Todos los reactivos para los procesos químicos y material de partida se adquirieron de Sigma-Aldrich (Francia) y se usaron sin purificación previa. Los disolventes se pidieron a SDS-Carlo Erba (Francia). El éter dietílico se secó y se destiló sobre benzofenona sódica. Las virutas de magnesio especiales para el reactivo de Grignard se adquirieron de Fisher Scientific (Francia). La dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) es de Fluka (Sigma-Aldrich).

10 **Los ejemplos 1 a 7 a continuación se refieren a la síntesis de moléculas anfífilas como se identifican en la Tabla 1.**

[0063]

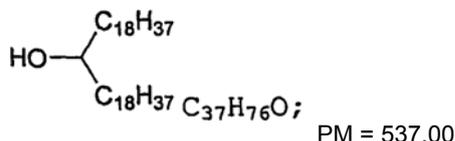
Tabla 1

Abreviatura	Estructura química de la molécula anfífila	Nombre químico	Parte aromática	Grupo Espaciador E	Cadenas Laterales R4 /R5	R4	R5
MONI		Cloruro de 1-Metil-3-(1-Octadecil-Nonadecil)-3H-Imidazol-1-io	Metil-3H-Imidazol-1-io	C1	iguales	C18 (lineal)	C18 (lineal)
MONBI		Cloruro de 1-Metil-3-(1-Octadecil-Nonadecil)-3H-benzo-Imidazol-1-io	Metil-3H-benzimidazol-1-io	C1	iguales	C18 (lineal)	C18 (lineal)
HEIC		Cloruro de 1-(2-Heptadecil-Eicosil)3-metil-3H-Imidazol-1-io	Metil-3H-Imidazol-1-io	C2	diferentes	C18 (lineal)	C17 (lineal)
HEMB		Cloruro de 3-(2-Heptadecil-Eicosil)-1-Metil-3H-Benzoimidazol-1-io	Metil-3H-benzimidazol-1-io	C2	diferentes	C18 (lineal)	C17 (lineal)
HET		Cloruro de 3-(2-Heptadecil-Eicosil)-Tiazol-3-io	Tiazol-3-io	C2	diferentes	C18 (lineal)	C17 (lineal)
HEMI		Cloruro de 1-(4-Hexadecil-Eicosil)-3-etil-3H-Imidazol-1-io	Metil-3H-imidazol-1-io	C4	iguales	C16 (lineal)	C16 (lineal)

Abreviatura	Estructura química de la molécula anfífila	Nombre químico	Parte aromática	Grupo Espaciador	Cadenas Laterales R4 /R5	R4	R5
BIA		"Imidazolio Anfífilo Ramificado" cloruro de 1-metil-3-(1-octadecil)-5-etradecil-nonadecil)-3H-imidazol-1-ilo	Metil-3H-imidazolio	C1	diferente	C32 (ramificada)	C18 (lineal)

Síntesis de MONI:**Síntesis del alcohol de cadena larga secundario 19-hidroxieptatriacontano S3:**

5 [0064]



10 [0065] Virutas de magnesio (583 mg, 24 mmoles, PM =24,31) se introducen en un recipiente de reacción de dos
 15 cuellos secado en un horno, equipado con una columna de refrigeración. **1-Yodooctadecano** (7,608 mg, 20
 mmoles, PM = 380,39), previamente disuelto en éter dietílico seco (20 ml, destilado sobre benzofenona sódica), se
 añade gota a gota a las virutas de metal con una jeringa. Durante la adición, la reacción se calienta ligeramente con
 un ventilador (secador de pelo), para mantener un reflujo constante de éter. La formación del reactivo de
 organomagnesio (reactivo de Grignard) ha comenzado cuando la mezcla de reacción vira a grisáceo. Después de la
 adición completa de la solución de yodoalcano, la mezcla de reacción se calienta para mantener el reflujo de éter
 durante una hora colocando el recipiente de reacción en un baño de aceite para impulsar la conversión del
 yodoalcano en el reactivo de Grignard correspondiente.

20 [0066] La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente; formiato de etilo (444,5 mg, 6 mmoles, PM =
 74,04), disuelto en éter dietílico destilado seco (25 ml), se añade gota a gota al reactivo de Grignard a 20°C. La
 25 reacción se calienta sólo ligeramente después de la adición. La mezcla de reacción se agita durante 18 horas a
 temperatura ambiente para completar la reacción de acoplamiento de este reactivo de Grignard de cadena larga
 sobre el éster. La reacción se vierte sobre hielo-metanol (200 g + 100 ml) y se acidifica con ácido clorhídrico
 concentrado a pH ácido. El sólido resultante se retira por filtración, se lava con metanol y acetona, y se seca al
 vacío. El sólido formará un aglomerado que se lava con diclorometano, a continuación se disuelve y se recrystaliza
 en tetrahidrofurano (THF): 1,5 g del alcohol en bruto se disuelven en 250 ml de THF a 60°C. Esta solución, mientras
 aún está caliente, se filtra a través de un disco de papel de filtro al vacío. Se añade acetona (200 ml) a la solución
 filtrada para precipitar el alcohol secundario final, que se retira por filtración y se lava con acetona. Este método de
 purificación mediante precipitación en THF/acetona se aplica a la cantidad total de alcohol en bruto.

30 [0067] En total, se han preparado y purificado 3,18 g de alcohol, que corresponden a 5,9 mmoles (PM = 537,00).
 El rendimiento de la reacción es del 60% en base al yodoalcano consumido (el 98% en base al formiato de etilo).

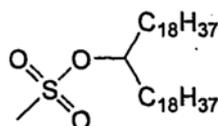
[0068] El **19-hidroxieptatriacontano** final se caracteriza por sus espectros de ¹H RMN que confirman su pureza.

35 **Análisis de 19-hidroxieptatriacontano S3:**

[0069] **1H-RMN (resonancia magnética nuclear de protón) en CDCl₃:** 0,90 ppm (tripleto, J = 7,0 Hz, 6H, metilos
 40 terminales de ambas cadenas); 1,27 ppm (multiplete ancho, 64H, CH₂ de cadenas alquilo grasas); 1,45 ppm
 (multiplete ancho, 4H, CH₂ posición beta del alcohol); 1,58 ppm (señal ancha de hidroxilo y de trazas de agua); 3,60
 ppm (multiplete, 1H, CH posición alfa del alcohol).

**Síntesis de metanosulfonato de 9-octadecil-nonadecilo S4 (= activación del alcohol secundario mediante
 mesilación):** C₃₈H₇₈O₃S; PM = 615,09

45 [0070]



50 [0071] Una suspensión del alcohol secundario (2,42 g, 4,5 mmoles) se prepara en 45 ml de piridina seca en un
 recipiente de reacción de 100 ml (siendo la alta concentración crítica para la correcta conversión). 3,5 ml de cloruro
 de metanosulfonilo (5,15 g, 45 mmoles) se añaden con una jeringa en el recipiente de reacción en pequeñas
 porciones. La mezcla de reacción no se calienta notablemente, de modo que la adición puede realizarse a
 temperatura ambiente. La suspensión blanca después del contacto con el cloruro de metanosulfonilo vira
 ligeramente al amarillo. Después de una hora la reacción se ha vuelto más homogénea, y vira a color beige.
 55 Después de 24 horas la reacción se ha vuelto de color marrón oscuro.

[0072] La mezcla de reacción se vierte en 250 ml de metanol donde los productos, pero también el alcohol sin reaccionar, precipitarán.

5 [0073] Este precipitado se aísla mediante filtración, se lava con metanol y se seca al vacío. El sólido se disuelve en 500 ml de diclorometano, donde solamente el producto mesilado es soluble; el alcohol sin reaccionar restante puede retirarse por filtración a través de papel.

10 [0074] El **metanosulfonato de 9-(octadecil)nonadecilo** final se obtiene después de la completa evaporación del diclorometano con un 69% de rendimiento (1,63 g; 2,65 mmoles: PM = 615,09).

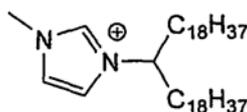
[0075] Se caracteriza mediante sus espectros de ^1H RMN.

Análisis del metanosulfonato de 9-(octadecil)nonadecilo:

15 [0076] **^1H -RMN (resonancia magnética nuclear de protón) en CDCl_3 :** 0,90 ppm (triplete, $J=7,0\text{Hz}$, 6H, metilos terminales de ambas cadenas); 1,27 ppm (multiplete ancho, 60H, CH_2 de cadenas alquilo grasas); 1,40 ppm (multiplete ancho dentro de la señal anterior, 4H, CH_2 en la posición gamma del mesilato); 1,69 ppm (multiplete ancho, 4H, CH_2 en la posición beta del mesilato); 3,01 ppm (singlete, 3H, CH_3 del mesilato); 4,72 ppm (quintuplete, $J=6,1\text{Hz}$, 1H, CH posición alfa del mesilato).

20 **Síntesis de cloruro de 1-Metil-3-(1-Octadecil-Nonadecil)-3H-Imidazol-1-io (= MONI):**

[0077]



25 Cl^- ; $\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{ClN}_2$; PM = 637,55

30 [0078] La reacción es una sustitución directa del mesilato con la base aromática en el átomo de carbono secundario. Dado que la reacción es lenta, el metilimidazol se usó en gran exceso como disolvente. El metanosulfonato de 9-(octadecil) nonadecilo (1,63 g, 2,65 mmoles; PM = 615,09) se introduce en un recipiente de reacción de 100 ml coronado por una columna refrigerante. Se añaden 80 ml de metilimidazol y el metanosulfonato forma una suspensión. La reacción se calienta a 80°C durante 6 días. La mezcla de reacción vira a continuación a color naranja y se vuelve homogénea.

35 [0079] Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vierte en un matraz más grande y se completa con 150 ml de metanol. Esta mezcla se filtra a través de papel. El filtro se lava con 80 ml de metanol. La pequeña parte insoluble es, en su mayoría, mesilato sin reaccionar, lo que puede verse mediante análisis de RMN. Este filtrado se divide en tres partes iguales antes de la purificación para facilitar el manejo.

40 [0080] Cien ml de la mezcla se completan con 600 ml de metanol y se filtran de nuevo a través de papel. A continuación, se añadieron 300 ml de agua. La mezcla sigue siendo homogénea, a continuación se acidificó progresivamente añadiendo pequeñas cantidades de ácido clorhídrico concentrado, mientras se controlaba el pH. La adición continuada se realizó hasta que el pH cae a 2-3. Esta mezcla, después de reposar a temperatura ambiente, forma un precipitado gelatinoso. Para impulsar la precipitación, la mezcla se mantiene a 5°C durante 18 horas. La suspensión final se vierte sobre un filtro de papel y el sólido obtenido se lava con una mezcla de alcohol (700 ml de metanol, 300 ml de agua estéril que contiene 1 ml de ácido clorhídrico concentrado) y se retira por filtración de nuevo. El mismo procedimiento se aplica a las fases metanólicas restantes.

50 [0081] De esta manera se obtienen 517 mg de cloruro de 3-[9-(octadecil)nonadecil]-1-metil-3H-imidazolium en bruto.

[0082] Un control mediante espectros de RMN muestra una débil contaminación de este sólido con metilimidazol. Se aplica una segunda etapa de purificación.

55 [0083] El sólido se disuelve en 70 ml de metanol mientras se agita a 60°C y la solución metanólica se decanta a partir del sólido restante. Este residuo sólido se lava una segunda vez con metanol caliente. La parte insoluble es diferente del producto según se revela mediante espectros de RMN. Las soluciones metanólicas se completan con 60 ml de agua estéril que se había acidificado previamente con 0,2 ml de ácido clorhídrico concentrado. Esta

solución gelifica a temperatura ambiente, y se deja 18 h a 5°C para que se complete la precipitación. La solución similar a un gel se filtra a través de papel. El sólido seco se re-disuelve en una mezcla a partes iguales de metanol y diclorometano (250 ml) y después con diclorometano puro (250 ml). Después de la evaporación de los disolventes, se obtienen 481 mg de un sólido blanco. Este procedimiento se repite dos veces en la mezcla de reacción restante (2,26 mmoles; 85% de rendimiento; PM = 637,55).

[0084] El análisis de RMN muestra ausencia de las impurezas previas y un microanálisis elemental en este producto final confirma su pureza.

10 **Análisis:**

1H-RMN (resonancia magnética nuclear de protón) de MONI en CDCl₃:

15 **[0085]** 0,90 ppm (tripleto, J = 6,9Hz, 6H, metilos terminales de ambas cadenas); 1,09 ppm (multiplete; 2H en gamma del anillo imidazolio); 1,27 ppm (multiplete ancho, 62H, CH₂ de cadenas alquilo grasas); 1,85 ppm (multiplete, 4H, CH₂ en la posición beta de imidazolio); 4,18 ppm (singlete, 3H, metilo en el anillo imidazolio); 7,02 ppm (singlete, 1H, C4_H o C5_H de imidazolio); 7,13 ppm (singlete, 1H, C5_H o C4_H de imidazolio); 11,17 ppm (singlete, 1H, C2_H de imidazolio).

20 **¹³C-RMN indirecto (DEPT135; DEPT90) en CDCl₃:**

[0086]

CH y CH₃ son (-): CH₂ son (+)

25 123,1 ppm(-) (C2 de imidazolio); 119,2 ppm(-) (C4 y 5 de imidazolio); 62,8 ppm(-) (metilo en N3 de imidazolio); 36,9 ppm(-) (CH en N1 de imidazolio); 35,5 ppm (+) (C de cadenas grasas); 31,9 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,72 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,67 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,65 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,60 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,53 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,38 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,35 ppm(+) (C de cadenas grasas); 29,15 ppm(+) (C de cadenas grasas); 25,94 ppm(+) (C de cadenas grasas); 22,71 (+) (C de cadenas grasas); 14,15 ppm(-) (grupos del extremo CH₃ de cadenas grasas).

Espectroscopía de absorción en el infrarrojo (IR) de MONI:

35 **[0087]** Los picos de absorción se caracterizan por sus números de longitud de onda (cm⁻¹) y su absorción respectiva, considerada como fuerte (s), media (m) o débil (w):

40 3130(m); 3035(s); 2955(s); 2920(s); 2850(s); 1570(s); 1560(m); 1470(s); 1430(w); 1375(w); 1160 (s); 750(w); 725(m).

[0088] Este perfil de absorción IR es comparable con el espectro descrito de cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio, y es coherente con su estructura química.

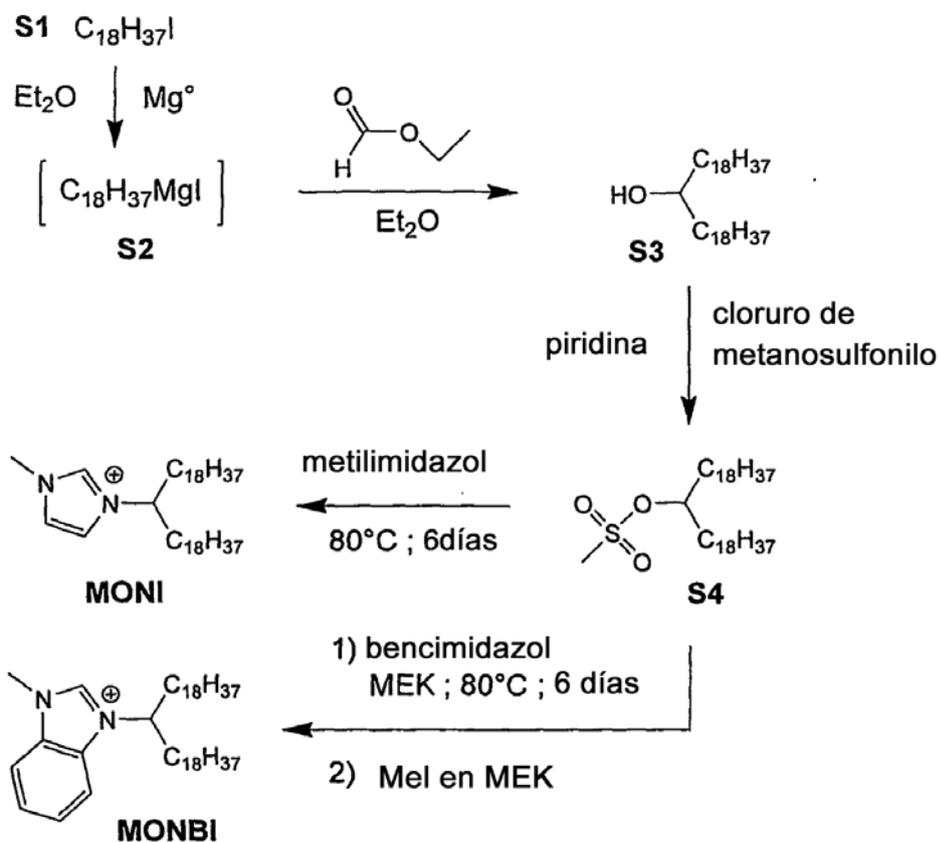
Ejemplo 2: Síntesis de cloruro de 1-metil-3-(1-Octadecil-Nonadecil)-3H-Benzo-imidazol-1-io (MONBI):

45 **[0089]** Metanosulfonato de 9-(octadecil)nonadecilo (0,1 mmoles) disuelto en 7 ml de metil-etilcetona (MEK) se calienta durante 3 días en presencia de 0,6 mmoles de bencimidazol. Después de la evaporación de los disolventes, el producto en bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice aplicando un gradiente de metanol/diclorometano. Se aíslan 0,015 mmoles de producto de bencimidazol neutro sustituido en N1, que se metila con un gran exceso de yoduro de metilo en MEK mientras se calienta durante 1 día. La reacción de metilación es cuantitativa, y después de la purificación mediante cromatografía en gel de sílice en un gradiente de metanol/diclorometano, se obtienen 10 mg de MONBI.

55 **1H-RMN (resonancia magnética nuclear de protón) de MONBI en CDCl₃:**

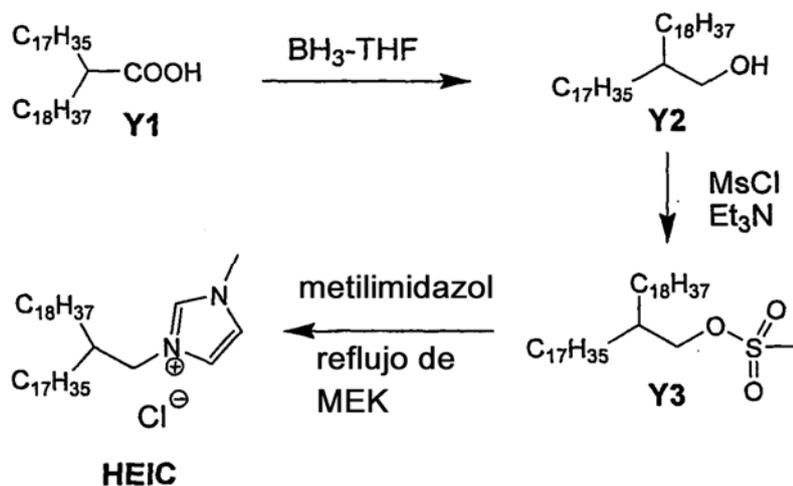
60 **[0090]** 0,89 ppm (tripleto, J = 6,9Hz, 6H, metilos terminales de ambas cadenas); 1,27 ppm (multiplete ancho, 64H, CH₂ de cadenas alquilo grasas); 2,1 ppm (multiplete ancho, 4H, CH₂ en la posición beta del nitrógeno de bencimidazolio); 4,39 ppm (singlete, 3H, metilo en N3 del anillo bencimidazolio); 4,65 ppm (CH conectado a N1 de bencimidazolio); 7,72 ppm (multiplete, 4H, protones del anillo benzo); 11,37 ppm (singlete, 1H, C2_H de bencimidazolio).

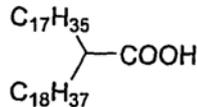
[0091] El esquema de reacción se proporciona en este documento:



5 Ejemplo 3: Síntesis de HEIC:

[0092]



Síntesis de ácido 2-Heptadecil-eicosanoico (Y1):**[0093]**

5

 $C_{37}H_{74}O_2$; PM = 550,98

10 **[0094]** Se introduce diisopropilamina (2,56 ml; 1,85 g; 18,26 mmoles; PM = 101,19) en un recipiente de reacción de 100 ml secado en un horno que contiene 15 ml de THF (destilado sobre benzofenona sódica) y se enfría a $-78^{\circ}C$ en una atmósfera de argón. Se añaden 11,4 ml de butyllitio (1,6 M en THF; 18,26 mmoles) gota a gota, se agita durante 10 minutos a $-78^{\circ}C$ y se calienta a $0^{\circ}C$, para completar la formación del reactivo LDA.

15 **[0095]** Se introduce ácido nonadecanoico (2,5 g; 8,37 mmoles; PM = 298,51), disuelto en 20 ml de THF, gota a gota en la mezcla de reacción a $0^{\circ}C$. Se añaden 1,2 ml de DMPU seco (1,246 g; 9,72 mmoles; PM = 128,18) y se calientan a temperatura ambiente para permitir la formación del intermedio dianión.

20 **[0096]** Se consigue una C-alkilación selectiva mediante la adición de 1-yodooctodecano (3,15 g; 8,28 mmoles; PM = 380,4) a $-5^{\circ}C$. La reacción continúa a temperatura ambiente durante 18 horas.

25 **[0097]** *Tratamiento final:* La mezcla de reacción se vierte sobre 100 ml de agua enfriada con hielo y se acidifica mediante la adición de 4 ml de ácido clorhídrico concentrado. El disolvente de THF se evapora a presión reducida; la mezcla se extrae con acetato de etilo y se seca sobre Na_2SO_4 (anhidro). La fase orgánica se condensa a presión reducida, siendo el sólido resultante recristalizado en acetona para dar un polvo blanco (4,271 g; 7,75 mmoles, usado sin purificación adicional en la siguiente etapa).

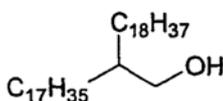
Análisis de ácido carboxílico Y1:

30 **[0098]** **Análisis por TLC:** $R_f = 0,5$; disolvente: acetato de etilo al 20% en heptano; detección: vanilina/ácido sulfúrico (placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

35 **[0099]** 1H -RMN ($CDCl_3$) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH_3 terminal de las cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 62H, CH_2 en cadenas hidrocarbonadas); 1,50 (multiplete ancho, 2H, CH_2 en la posición beta del ácido); 1,63 (multiplete ancho, 2H, CH_2 en la posición beta del ácido); 2,38 (multiplete, 1H, CH en la posición alfa del ácido).

Síntesis de 2-Heptadecil-eicosan-1-ol (Y2):**[0100]**

40

 $C_{37}H_{76}O$; PM = 537,00

45 El ácido Y1 (847 mg; 1,537 mmoles; PM = 550,98) se disuelve en 20 ml de THF seco (destilado sobre benzofenona sódica). Una solución de BH_3 en THF se añade gota a gota a $0^{\circ}C$ (1 M en THF; 10 ml; 10 mmoles). La reacción se criba mediante análisis por TLC (disolvente: acetato de etilo al 10% en heptano). La reacción continúa suavemente durante 2 días. La mezcla de reacción se vierte en 100 ml de metanol para precipitar el alcohol (1,135 g en bruto). La cromatografía en gel de sílice (gradiente: acetato de etilo en heptano: del 6% al 10%) produce 518 g de Y2 puro (62%).

50

Análisis del alcohol Y2:

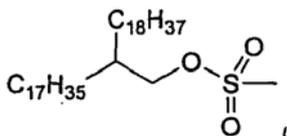
55 **[0101]** **TLC:** $R_f = 0,4$; disolvente: acetato de etilo al 10% en heptano; detección mediante vanilina/ácido sulfúrico (color azul) (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0102] $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz triplete, 6H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 66H, CH_2 de cadenas hidrocarbonadas); 1,46 (multiplete ancho, 1H, CH posición beta del alcohol); 3,56 (J = 5,5 Hz, doblete, 2H, CH_2 en posición alfa del alcohol).

5

Síntesis de éster 2-heptadecílico del ácido metanosulfónico (Y3):

[0103]



10

$\text{C}_{38}\text{H}_{78}\text{O}_3\text{S}$; PM = 615,09

[0104] El alcohol Y2 (600 mg; 1,11 mmoles; PM = 537,0), disuelto en 10 ml de CH_2Cl_2 (destilado sobre CaH_2), se enfría a 0°C . Cloruro de mesilo (0,5 ml; 740 mg; 6,46 mmoles; PM = 114,55) se introduce en la mezcla de reacción y 1 ml de trietilamina (728 mg; 7,19 mmoles; PM = 101,19) se añade gota a gota a 0°C y se agita a temperatura ambiente. La reacción se completa después de 2 horas mediante análisis por TLC. La mezcla de reacción se condensa a presión reducida, y el sólido se lava con metanol para retirar el exceso de reactivo. El sólido obtenido por filtración es puro mediante análisis de RMN y corresponde a 570,6 mg de Y3 (0,928 mmoles; rendimiento del 82,9%).

20

Análisis del mesilato Y3:

[0105] TLC: Rf = 0,6; disolvente: diclorometano al 50% en heptano; detección mediante vanilina/ácido sulfúrico (mancha azul oscuro) (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

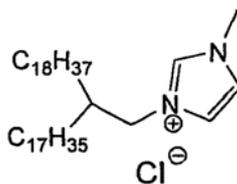
25

[0106] RMN $^1\text{H}(\text{CDCl}_3)$ δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 66H, CH_2 en cadenas hidrocarbonadas); 1,72 (multiplete, 1H, CH en la posición beta del mesilato); 3,01 (singlete, 3H, CH_3 de mesilato); 4,10 (J = 5,5 Hz, doblete, 2H, CH_2 en la posición alfa del mesilato).

30

Síntesis de cloruro de 1-(2-Heptadecil-eicosil)-3-metil-3H-imidazol-1-io (HEIC):

[0107]



35

$\text{C}_{41}\text{H}_{81}\text{ClN}_2$; PM = 637,55

[0108] El mesilato Y3 (150 mg; 0,243 mmoles; PM = 615,09) y N-metilimidazol (200 mg; 2,43 mmoles; PM = 82,10) se calientan en 2-butanona (10 ml) durante 5 días a 80°C . El análisis por TLC permite cribar la conversión de mesilato.

40

[0109] *Tratamiento final:* Los disolventes de la mezcla de reacción se retiran a presión reducida. El producto en bruto resultante se disuelve en 12 ml de isopropanol, se filtra a través de papel para retirar el mesilato sin reaccionar y se diluye con 8 ml de agua pura. La mezcla se acidifica con ácido clorhídrico a pH = 2. La molécula anfífila precipita a 5°C como sal de clorhidrato. La precipitación de la molécula HEIC se facilita ampliamente mediante el uso de mezclas de isopropanol-agua, acidificándose a continuación usando mezclas de metanol-agua como se ha descrito para las otras moléculas anfífilas de interés. El producto se obtiene mediante centrifugado a 14.000 rpm (15 minutos a 0°C). El precipitado resultante se purifica mediante cromatografía en columna en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano), y se obtienen 66 mg de HEIC puro, que corresponden a 0,103 mmoles (rendimiento: 42%).

50

Análisis de la molécula anfífila HEIC:

5 [0110] **TLC:** Rf = 0,25; disolvente: metanol al 10% en diclorometano; detección mediante vapor de yodo (placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

10 [0111] **¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm):** 0,89 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 66H, CH₂ en cadenas hidrocarbonadas); 1,88 (multiplete, 1H, CH en la posición beta del imidazolio); 4,16 (singlete, 3H, CH₃ de metilimidazolio); 4,20 (J = 7,2Hz, doblete, 2H, CH₂ en la posición alfa del metilimidazolio); 7,14 (singlete, 1H, CH en metilimidazolio); 7,34 (singlete, 1H, CH en metilimidazolio); 10,74 (singlete, 1H, CH en metilimidazolio).

¹³C-RMN: dept 135 (CDCl₃) δ (ppm):

15 [0112] CH y CH₃ dan picos negativos (-)

CH₂ detectado como picos positivos (+)

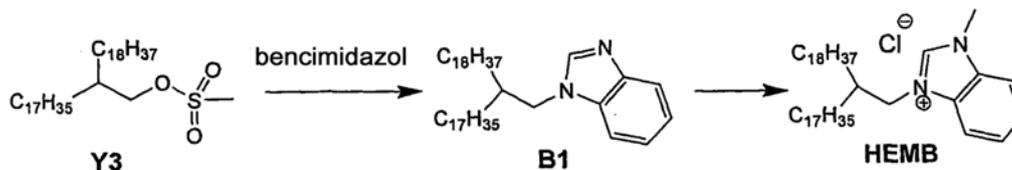
Los carbonos cuaternarios no se detectan mediante dept135

20 139,2 ((-), C de metilimidazolio); 122,9 ((-), C de metilimidazolio); 121,5 ((-), C de metilimidazolio); 54,04 ((+), C en la posición alfa del imidazolio); 38,8 ((-), metilo-C de metilimidazolio); 36,8 ((-), C en la posición beta del imidazolio); 31,9 (+); 30,8 (+); 29,7 (+); 29,2 (+); 26,2 (+); 22,7 (+) (diferentes C en la cadena hidrocarbonada); 14,1 (-) metilos C terminales de cadenas hidrocarbonadas.

25

Ejemplo 4: Síntesis de HEMB:

[0113]

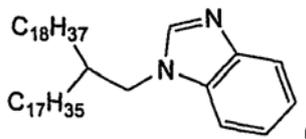


30

Síntesis de 1-(2-(Heptadecil-eicosil)-1H-benzoimidazol (B1):

[0114]

35



C₄₄H₈₀ClN₂; PM = 637,12

40 [0115] El mesilato Y3 (150 mg; 0,243 mmoles; PM = 615,09), disuelto en 10 ml de 2-butanona, se calienta en presencia de 287 mg de bencimidazol (2,43 mmoles; PM = 118,14) a 80°C durante 23 días. La reacción de acoplamiento se criba mediante análisis por TLC, detectando la conversión lenta de mesilato Y3.

45 [0116] El sólido en bruto, obtenido después de la evaporación de los disolventes a presión reducida, se purifica mediante cromatografía en columna en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano: del 1 al 4%). Las fracciones positivas para UV dieron el compuesto puro B1 en una cantidad de 31 mg (0,048 mmoles; 20% de rendimiento).

Análisis del compuesto B1 bencimidazol

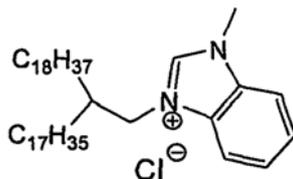
50

[0117] **TLC:** Rf = 0,65; disolvente: metanol al 5% en diclorometano; detección UV y/o vapores de yodo (placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0118] $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH_3 terminal de ambas cadenas hidrocarbonadas); 1,25 (multiplete ancho, 66H, CH_2 en cadenas hidrocarbonadas); 1,89 (multiplete, 1H, CH en la posición beta del bencimidazol); 4,1 (J = 7,2 Hz, doblete, 2H, CH_2 en la posición alfa del bencimidazol); 7,32 (multiplete, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$ en el sistema de anillo aromático) 7,41 (multiplete, 1H, CH en el sistema de anillo aromático); 7,84 (multiplete, 1H, CH en el sistema de anillo aromático); 7,93 (singlete, 1H, CH en el anillo de bencimidazol).

Síntesis de cloruro de 3-(2-Heptadecil-eicosil)-1-metil-3H-benzoimidazol-1-io (HEMB):

[0119]



$\text{C}_{45}\text{H}_{83}\text{ClN}_2$; PM = 687,61

[0120] Yodometano (0,5 ml; 7,85 mmoles; PM = 141,94) se añade a **B1** (19,1 mg; 0,0299 mmoles, PM = 637,12), se disuelve en 15 ml de 2-butanona, y se calienta a 60°C durante 24 horas. Después de la evaporación de los disolventes a presión reducida, se obtienen 24,1 mg de producto en bruto. Para la conversión en la sal de cloro el sólido se disuelve en 2,8 ml de metanol y se acidifica con 1,2 ml de HCl (18%). La sal de cloro forma precipitados a 5°C , y se aísla mediante centrifugado (14.000 rpm, 20 minutos). El residuo se purifica adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice mediante un gradiente de metanol en diclorometano, produciendo 17,7 mg de producto puro **HEMB** (0,0257 mmoles; 86% de rendimiento).

Análisis de la molécula anfífila HEMB:

[0121] TLC: $R_f = 0,2$; disolvente: metanol al 10% en CH_2Cl_2 ; detección UV y/o vapores de yodo (placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0122] $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,26 (multiplete ancho, 66H, CH_2 en cadenas hidrocarbonadas); 2,14 (multiplete, 1H, CH en la posición beta de metil-bencimidazol); 4,35 (singlete, 3H, CH_3 grupo metilo de metil-bencimidazol); 4,49 (J= 7,2 Hz, doblete, 2H, CH_2 en la posición alfa de metil-bencimidazol); 7,73 (multipletes, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$ de la parte bencilo); 11,43 (singlete, 1H, CH en la parte de imidazol).

$^{13}\text{C-RMN}$: dept 135 (CDCl_3) δ (ppm):

[0123] CH y CH_3 se muestran como picos negativos (-).

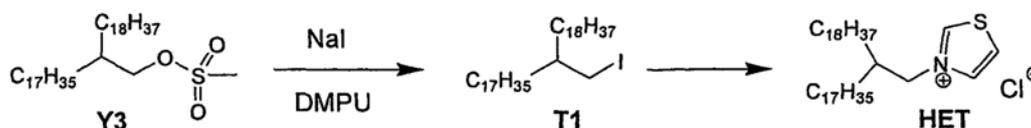
[0124] CH_2 da picos positivos (+).

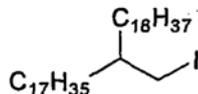
Dept 135 no muestra átomos cuaternarios.

127,1 ((-), 2C en la parte benzo); 112,8 ((-), C en la parte benzo); 113,0 ((-), C en la parte benzo); 51,9 ((+), C en la posición alfa de la parte metilimidazol); 38,1 ((-), CH_3 en la parte metilimidazol); 33,7 ((-), C en la posición beta del metilimidazol); 31,9 (+); 31,2 (+); 29,7 (+); 26,3 (+); 22,7 (+): C de cadenas hidrocarbonadas; 14,1 ((-), metilo terminal de cadenas hidrocarbonadas

Ejemplo 5: Síntesis de HET:

[0125]



Síntesis de 18-yodometil-hexatriacontano (T1):**[0126]**

5

C₃₇H₇₅I; PM = 646,90

[0127] El mesilato **Y3** (560,6 mg; 0,911 mmoles; PM = 615,09), disuelto en 15 ml de DMPU seco, se calienta junto con 682,5 mg de yoduro sódico (4,55 mmoles, PM = 149,85) a 70°C durante 20 horas.

10

[0128] La mezcla de reacción se diluye con 10 ml de agua y se extrae 3 veces con éter dietílico. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, se retira por filtración, y los disolventes se retiran a presión reducida. El sólido resultante se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con heptano para dar 360,5 mg de **T1** puro (0,557 mmoles; 61,1% de rendimiento).

15

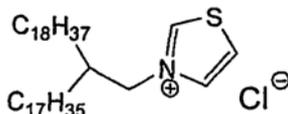
Análisis de yodoalcano T1:

[0129] **TLC:** R_f = 0,95; disolvente: heptano; detección mediante vanilina/ácido sulfúrico (manchas azules) (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

20

[0130] ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de ambas cadenas); 1,28 (multiplete ancho, 66H, CH₂ en cadenas hidrocarbonadas); 2,01 (multiplete, 1H, CH en la posición beta del yodo); 3,28 (J = 4,5 Hz, doblete, 2H, CH₂ en la posición alfa del yodo).

25

Síntesis de cloruro de 3-(2-Heptadecil-eicosil)-tiazol-3-io (HET):**[0131]**

30

C₄₀H₇₈ClNS; PM = 640,57

[0132] Tiazol (180 mg; 2,11 mmoles; PM = 85,13) se añade a una solución de **T1** (136,9 mg; 0,211 mmoles, PM = 646,9) en 10 ml de 2-butanona, y la mezcla de reacción se calienta a 80°C durante 27 días. Los disolventes se evaporan a presión reducida, y el sólido en bruto se disuelve en metanol; el yodoalcano sin reaccionar se retira por filtración. Se añade ácido clorhídrico diluido a la solución metanólica (5 ml de HCl al 4% a 10 ml de solución de MeOH) y se colocan a 5°C para precipitar la molécula anfífila, se recoge mediante centrifugado a 14.000 rpm (30 minutos). El producto en bruto se purifica adicionalmente mediante cromatografía en columna en gel de sílice con un gradiente de metanol en diclorometano. Las fracciones positivas dan 21 mg de **HET** puro (0,033 mmoles; 15% de rendimiento).

35

40

Análisis de la molécula anfífila HET:

[0133] **TLC:** R_f = 0,4; disolvente: metanol al 10% en diclorometano; detección mediante vapores de yodo (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

45

[0134] ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 0,89 (J = 6,7 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 66H, CH₂ en cadenas hidrocarbonadas); 2,03 (multiplete, 1H, CH en la posición beta del tiazolio); 4,67 (J = 7,4 Hz, doblete, 2H, CH₂ en la posición alfa del tiazolio); 8,22 (J = 1,2 Hz, J' = 3,7 Hz, doblete de dobletes, 1H, CH en el anillo tiazolio); 8,40 (J' = 3,7 Hz, J'' = 2,5 Hz, doblete de dobletes, 1H, CH_c en el anillo tiazolio); 10,82 (pequeño doblete de dobletes, 1H, CH en el anillo tiazolio).

50

¹³C-RMN: dept 135 (CDCl₃) δ (ppm):

55

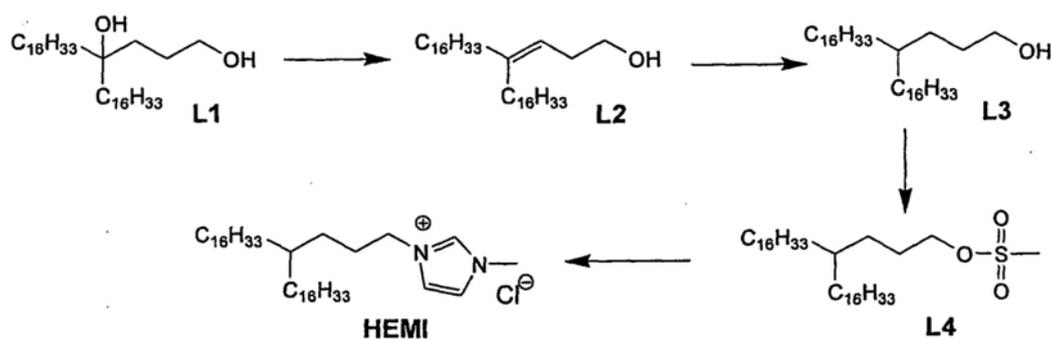
[0135] CH y CH₃ se muestran como picos negativos (-).

CH₂ da picos positivos (+).

- 5 160((-), C en el anillo tiazolio); 136,7 ((-), C en tiazolio); 127,3 ((-), C en tiazolio); 60,7 ((+), C en la posición alfa del tiazolio); 39,4 ((-), C en la posición beta del tiazolio); 32,2 (+), 30,7 (+), 29,8 (+), 29,7 (+), 29,7 (+), 29,6 (+), 29,5 (+), 29,4 (+), 26,1 (+), 22,7 (+), C en la cadena hidrocarbonada; 14,1 ((-), metilo C terminal en cadenas hidrocarbonadas).

10 **Ejemplo 6: Síntesis de HEMI:**

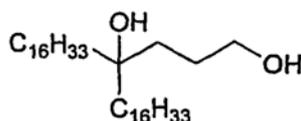
[0136]



15

Síntesis de 4-hexadecil-eicosano-1,4-diol (L1):

[0137]



20

C₃₆H₇₄O₂; PM = 538,97

- 25 [0138] Virutas metálicas de magnesio (1,618 g; 66,6 mmoles; PM = 24,31) se introducen en un recipiente de reacción de dos cuellos secado en un horno coronado con una columna de refrigeración y colocado en una atmósfera de argón. Yodohexadecano (19,55 g; 55,48 mmoles; PM = 352,34) disuelto en 10 ml de éter dietílico seco se añade gota a gota a las virutas de magnesio mientras se calienta a la temperatura de reflujo durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calienta durante 60 minutos adicionales, y vira a un color grisáceo mostrando formación del reactivo de Grignard.

30

[0139] Butirolactona (800 mg; 9,29 mmoles; PM = 86,09), disuelta en 5 ml de éter dietílico seco, se añade gota a gota a 0°C al reactivo de organomagnesio. La reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 18 horas

- 35 [0140] *Tratamiento final:* La mezcla de reacción se vierte sobre 200 g de hielo partido, y la fase acuosa se acidifica añadiendo ácido clorhídrico concentrado. La mezcla resultante se extrae con CH₂Cl₂, y la fase orgánica se lava de nuevo con agua pura. La capa orgánica se condensa a presión reducida y se seca. El sólido resultante se disuelve en THF caliente. Un sub-producto insoluble precipita cuando se enfría la mezcla concentrada. Después de la evaporación de THF, el sólido resultante se recristaliza en acetona caliente. El diol precipita selectivamente. Se obtienen 4,357 g de diol L1 puro correspondientes a un 87% de rendimiento en base a butirolactona.

40

Análisis del diol L1:

- 45 [141] TLC: R_f = 0,35; disolvente: acetato de etilo al 30% en heptano; detección con vainilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

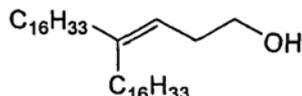
[0142] ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27

(multiplete ancho, 56H, CH₂ en cadenas hidrocarbonadas); 1,45 (multiplete ancho, 4H, CH₂ en la posición beta

[0143] del alcohol terciario); 1,55 (multiplete, 2H, CH₂ en la posición gamma de alcohol primario); 1,66 (multiplete, 2H, CH₂ en la posición beta de alcohol primario); 3,68 (J = 6 Hz, triplete, 2H, CH₂ en la posición alfa de alcohol primario).

Síntesis de 4-hexadecil-eicos-3-en-1-ol (L2):

[0144]



C₃₆H₇₂O; PM = 520,96

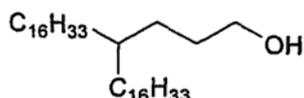
[0145] El alcohol L1 (1,5 g; 2,78 mmoles; PM = 538,97), disuelto en 100 ml de xileno, se calienta en presencia de 50 mg de ácido para-toluenosulfónico (0,29 mmoles; PM = 172) a 130°C durante 50 minutos. La purificación de alquenoles mediante cromatografía en gel de sílice con una mezcla al 10% de acetato de etilo en heptano da 202,4 mg de alquenoles L2, correspondientes a 0,389 mmoles (14% de rendimiento) de isómeros. El principal subproducto es éter cíclico de 5 miembros (1,177 g, 2,2 mmoles, 79%).

Análisis de alquenoles L2:

[0146] TLC: R_f = 0,52 y 0,54 (2 manchas para diferentes isómeros); disolvente: acetato de etilo al 20% en heptano; detección con vanilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

Síntesis de 4-hexadecil-eicosan-1-ol (L3):

[0147]



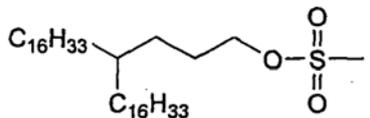
C₃₆H₇₄O; PM = 522,97

[0148] Los alquenoles L2 (202,4 mg, 0,389 mmoles, PM = 520,96), disueltos en 5 ml de acetato de etilo, se hidrogenan con 60 mg de paladio sobre carbono (Pd/C al 10%) en 1 atmósfera de presión de hidrógeno durante 3 días. La conversión se criba mediante análisis por TLC. El catalizador se retira por filtración, y se obtiene el alcohol L3 puro mediante la evaporación de disolventes en rendimiento cuantitativo.

Análisis del alcohol L3:

[0149] TLC: R_f = 0,52; disolvente: acetato de etilo al 20% en heptano; detección con vanilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0150] ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 63H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,56 (multiplete, 2H, CH₂ en la posición beta del alcohol); 3,68 (J = 6,7 Hz, triplete, 2H, CH₂ en la posición alfa de la función alcohol).

Síntesis de éster 4-hexadecil-eicosílico del ácido metanosulfónico (L4):**[0151]**

5

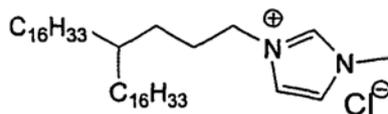
C₃₇H₇₆O₃S; PM = 601,06

10 **[0152]** El alcohol **L3** (165,2 mg; 0,316 mmoles; PM = 522), disuelto en 10 ml de diclorometano (destilado sobre hidruro de calcio) y enfriado a 0°C, se mesila mediante adiciones sucesivas de 0,24 ml de cloruro de mesilo (355 mg; 3,1 mmoles; PM = 114,55) y 0,48 ml de trietilamina (346 mg; 3,42 mmoles; PM = 101,19). Después de 4 horas a temperatura ambiente, los disolventes se evaporan, y el sólido se lava con metanol para extraer el exceso de reactivo y sales de trietilamina para dar 119 mg de **L4** (0,198 mmoles; rendimiento del 63,6%).

15 **Análisis del mesilato L4:**

[0153] TLC: R_f = 0,6; disolvente: CH₂Cl₂ al 50% en heptano; detección con vainilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

20 **[0154]** ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 63H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,73 (multiplete, 2H, CH₂ en la posición beta del mesilato); 3,02 (singlete, 3H, CH₃ de mesilato); 4,22 (J = 6,6 Hz, triplete, 2H, CH₂ en la posición alfa del mesilato).

25 **Síntesis de cloruro de 1-(4-hexadecil-eicosil)-3-metil-3H-imidazol-1-io (HEMI):****[0155]**30 C₄₀H₇₉N₂Cl; PM = 623,52

35 **[0156]** El mesilato **L4** (119 mg; 0,197 mmoles; PM = 601,06), disuelto en 10 ml de 2-butanona, se calienta en presencia de 162,5 mg de metilimidazol (1,98 mmoles; PM = 82,10) a 80°C durante 6 días. La reacción se criba mediante análisis por TLC (desaparición del mesilato).

40 **[0157]** *Tratamiento final:* Evaporación de disolventes a presión reducida. El producto se disuelve en metanol, y se separa del mesilato sin reaccionar mediante filtración. La parte soluble se disuelve en 17 ml de metanol, y se añaden 8 ml de ácido clorhídrico al 3,7%. La molécula anfífila precipita durante el almacenamiento a 5°C. El sólido se aísla mediante centrifugado a 14.000 rpm a 0°C, lo que precipita 170,6 mg de producto en bruto. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano: del 1% al 15%) da el producto puro con un 43% de rendimiento (53 mg; 0,085 mmoles).

Análisis de la molécula anfífila HEMI:

45 **[0158]** TLC: R_f = 0,28; disolvente: metanol al 10% en CH₂Cl₂; detección con vapores de yodo (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

50 **[0159]** ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 0,87 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,23 (multiplete ancho, 63H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,85 (multiplete, 2H, CH₂ en la posición beta del metilimidazolio); 4,12 (singlete, 3H, CH₃ de metilimidazolio); 4,27 (J = 7,4 Hz, triplete, 2H, CH₂ en la posición alfa del metilimidazolio); 7,28 (singlete, 1H, CH en el anillo de metilimidazolio); 7,49 (singlete, 1H, CH en el anillo de metilimidazolio); 10,65 (singlete, 1H, CH en el anillo de metilimidazolio).

¹³C-RMN: dept 135 (MeOD-4d) δ (ppm):

[0160] CH y CH₃ dan picos negativos (-).

CH₂ detectado como picos positivos (+).

5

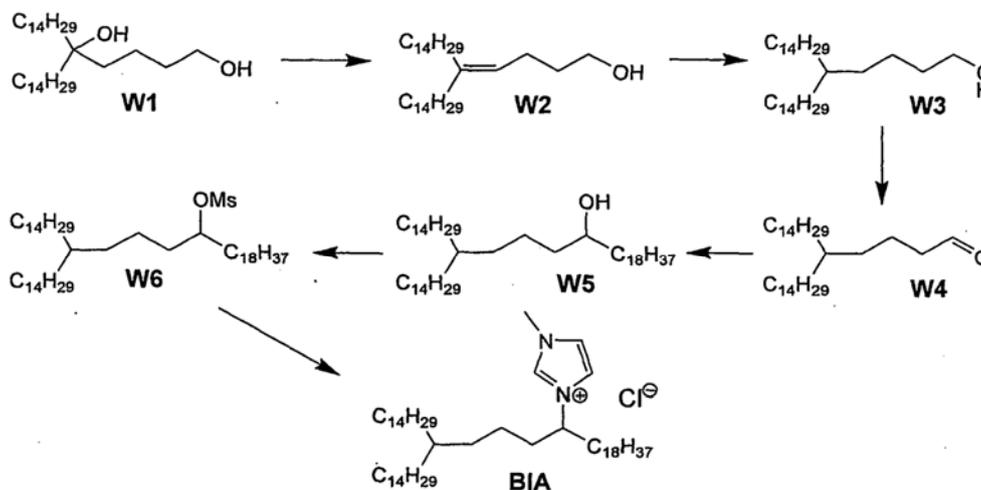
Los carbonos cuaternarios no se detectan mediante dept135.

10

136,5 ((-), C de metilimidazolio); 123,6 ((-), C de metilimidazolio); 122,3 ((-), C de metilimidazolio); 49,8 ((+), C en la posición alfa del imidazolio); 36,9 ((-), metil-C de metilimidazolio); 35,1 ((-), C en el punto de ramificación de la cadena lateral); 33,0 (+); 31,7 (+); 30,0 (+); 29,7 (+); 29,4 (+); 29,35 (+); 29,3 (+); 29,1 (+); 27,2 (+); 26,2 (+); 22,4 (+) (diferentes C en la cadena hidrocarbonada); 13,2 (-), metilo C terminal de cadenas hidrocarbonadas.

Ejemplo 7: Síntesis de BIA:

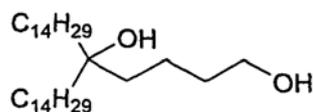
15 [0161]



Síntesis de 5-tetradecil-nonadecil-1,5-diol (W1):

20

[0162]

25 C₃₃H₆₈O₂; PM = 496,89

1-Bromotetradecano (44,58 g; 160,8 mmoles; PM = 277,28), disuelto en 120 ml de éter dietílico (destilado sobre benzofenona sódica), se añade gota a gota a 4,7 g de virutas de magnesio (193,3 mmoles; PM = 24,31) durante 30 minutos, mientras se calienta a la temperatura de reflujo. La temperatura de reflujo se mantiene durante 1 hora, a continuación la temperatura se rebaja a 5°C, y se añade valerolactona (4,024 g; 40,2 mmoles; PM = 100,12), disuelta en 20 ml de éter dietílico, gota a gota. Para completar la reacción, la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas.

30

[0163] *Tratamiento final:* La mezcla de reacción se vierte sobre 500 ml de hielo partido, se acidifica con ácido clorhídrico concentrado y se extrae con diclorometano. El sólido obtenido después de la evaporación de la capa orgánica se disuelve en THF caliente, lo que permite la separación de un sub-producto insoluble. El componente soluble, después de la evaporación de THF, se recristaliza en acetona caliente, produciendo 17,6 g del diol **W1** puro (35,4 mmoles; 88,1% en base a valerolactona).

40 **Análisis de los dioles W1:**

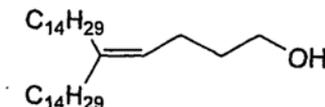
[0164] **TLC:** R_f = 0,27; disolvente: acetato de etilo al 30% en heptano; detección con vainilina/ácido sulfúrico

(Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0165] $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,27 (multiplete ancho, 50H, CH_2 en cadenas hidrocarbonadas); 1,42 (multiplete ancho, 6H, CH_2 en la posición beta del alcohol terciario); 1,59 (multiplete, 2H, CH_2 en la posición beta del alcohol primario); 3,68 (J = 6,4 Hz, J' = 5,3 Hz, doblete de tripletes, 2H, CH_2 en la posición alfa del alcohol primario).

Formación de 5-tetradecil-nonadec-4-en-1-ol (W2):

[0166]



$\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{O}$; PM = 478,88

[0167] El diol **W1** (5 g; 10,1 mmoles; PM = 497), disuelto en 200 ml de tolueno, se calienta a la temperatura de reflujo con 137,6 mg de ácido paratoluenosulfónico durante 2,5 horas. El sólido en bruto, obtenido después de la evaporación de los disolventes a presión reducida, se purifica mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo en heptano (del 5% al 10%).

[0168] 2,25 g de alquenoles **W2** (mezcla de isómeros) se obtienen en forma pura (47,1 mmoles; 46,5% de rendimiento).

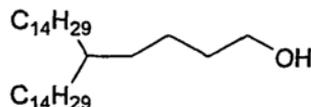
Análisis de los alquenoles W2:

[0169] **TLC:** $R_f = 0,44$; $R_f = 0,48$; disolvente: acetato de etilo al 20% en heptano; detección con vainilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0170] $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,28 (multiplete ancho, 48H, CH_2 en cadenas hidrocarbonadas); 1,4 - 1,6 (multiplete ancho, 2H, CH_2 en posiciones beta del alcohol); 2,00 (multiplete, 6H, CH_2 en posiciones alílicas); 3,66 (J = 6,4 Hz, triplete, 2H, CH_2 en la posición alfa del alcohol primario); 5,13 (J = 7,0 Hz, triplete, 1H, CH en posición vinílica).

Formación de 5-tetradecil-nonadecan-1-ol (W3):

[0171]



$\text{C}_{33}\text{H}_{68}\text{O}$; PM = 480,89

[0172] La mezcla de isómeros de alquenoil **W2** (2,207g, 4,6 mmoles), disueltos en 12 ml de acetato de etilo, se hidrogena con paladio sobre carbono (Pd/C al 10%, 400 mg) durante 24 horas a una presión de 1 atmósfera de hidrógeno.

[0173] El alcohol puro se obtiene después de la filtración sobre papel y la evaporación de los disolventes a presión reducida en rendimiento cuantitativo (2,045 g, 4,25 mmoles, rendimiento del 92,4%).

Análisis del alcohol W3:

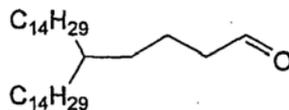
[0174] **TLC:** $R_f = 0,38$; disolvente: acetato de etilo al 20% en heptano; detección con vainilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,28 (multiplete ancho, 57H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,56 (multiplete, 2H, CH_2 en la posición beta del alcohol); 3,67 (J = 6,6

Hz, triplete, 2H, CH₂ en la posición alfa de la función alcohol).

Formación de 5-tetradecil-nonadecanal (W4):

5 [0175]



C₃₃H₆₆O; PM = 478,88

10 [0176] El reactivo de Swern se prepara mediante adición sucesiva de 284 mg de cloruro de oxalilo y 265 ml de DMSO en 20 ml de diclorometano seco enfriado previamente a -78°C. El alcohol **W3** (900 mg; 1,869 mmoles; PM = 480,88) se añade después de 5 minutos y se mantiene a -78°C durante 30 minutos; Se añade 1 ml de trietilamina seca (destilada sobre hidruro de calcio). Se deja calentar a la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 30 minutos.

[0177] *Tratamiento final:* la mezcla de reacción se enfría rápidamente con 30 ml de agua y se extrae 3 veces con diclorometano. La fase orgánica se lava con ácido clorhídrico al 1% y con una solución acuosa al 5% de carbonato sódico. La capa orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y se filtra. El aldehído en bruto, obtenido después de la evaporación de los disolventes, se purifica adicionalmente mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo en heptano (del 3% al 5%) para producir 658 mg de aldehído puro (1,375 mmoles, 73,5% de rendimiento).

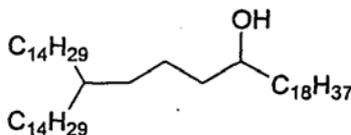
25 **Análisis del aldehído (W4):**

[0178] **TLC:** R_f = 0,32; disolvente: acetato de etilo al 5% en heptano; detección con KMnO₄ al 0,5% en agua en forma de pulverizado (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

30 [0179] **¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm):** 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 6H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,28 (multiplete ancho, 57H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,62 (multiplete, 2H, CH₂ en la posición beta de aldehído); 2,42 (J = 7,3 Hz, triplete, 2H, CH₂ en la posición alfa de la función aldehído); 9,79 (singlete, CHO de aldehído).

Formación de 15-tetradecil-heptatriacontan-19-ol (W5):

35 [0180]



C₅₁H₁₀₄O; PM = 733,37

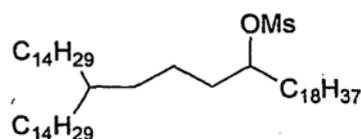
40 [0181] 1-yodooctadecano (2,044 g, 5,37 mmoles, PM = 380,40), disuelto en 10 ml de éter dietílico (destilado sobre benzofenona sódica), se añade gota a gota a 196 mg de virutas de magnesio (8,064 mmoles, PM = 24,31) durante 20 minutos, mientras se calienta a la temperatura de reflujo. La temperatura de reflujo se mantiene durante 1 hora, y a continuación la temperatura se rebaja a 5°C, y el aldehído **W4** (426 mg; 0,89 mmoles; PM = 478,88), disuelto en 20 ml de éter dietílico, se añade gota a gota. Para completar la reacción, la agitación continúa a temperatura ambiente durante 18 horas.

50 [0182] *Tratamiento final:* la mezcla de reacción se vierte sobre 100 ml de hielo partido, se acidifica con ácido clorhídrico y se extrae 3 veces con diclorometano. El sólido obtenido después de la evaporación de la capa orgánica se disuelve en THF caliente; la cristalización permite la separación de un sub-producto que se retira por filtración. Después de la evaporación del THF, el sólido en bruto se recristaliza en acetona caliente, y se purifica mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de acetato de etilo en heptano (del 1% al 5%) para dar 293 mg (0,4 mmoles; 45% de rendimiento en base al aldehído).

Análisis del alcohol (W5):

[0183] TLC: Rf = 0,37; disolvente: acetato de etilo al 10% en heptano; detección con vainilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0184] $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 9H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,28 (multiplete ancho, 89H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,43 (multiplete ancho, 4H, CH_2 en la posición beta del alcohol secundario); 3,61 (multiplete, 1H, CH_2 en la posición alfa del alcohol primario).

Síntesis de éster 1-octadecil-5-tetradecil-nonadecílico del ácido metanosulfónico (W6):**[0185]**

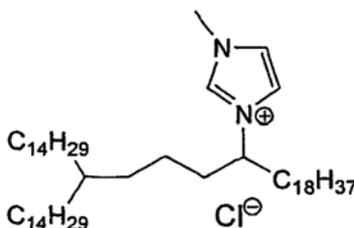
$\text{C}_{52}\text{H}_{106}\text{O}_3\text{S}$; PM = 811,46

[0186] El alcohol **W5** (435,8 mg; 0,594 mmoles; PM = 733,37), disuelto en 20 ml de CH_2Cl_2 (destilado sobre CaH_2), se enfría a 0°C . Cloruro de mesilo (0,46 ml; 680,7 mg; 6,43 mmoles; PM = 114,55) se introduce en la mezcla de reacción y se añaden 0,9 ml de trietilamina (661 mg; 6,53 mmoles; PM = 101,19) gota a gota a 0°C ; la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 20 horas adicionales. Después de la evaporación de los disolventes, el residuo se lava con metanol, y se separa mediante filtración para dar mesilato puro (450,5 mg; 0,515 mmoles; 93% de rendimiento).

Análisis del mesilato W6:

[0187] TLC: Rf = 0,59; disolvente: diclorometano al 50% en heptano; detección con vainilina/ácido sulfúrico (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

[0188] $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 0,90 (J = 5,6 Hz, triplete, 9H, CH_3 terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,28 (multiplete ancho, 89H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,69 (multiplete ancho, 4H, CH_2 en la posición beta del mesilato); 3,01 (singlete, 3H, CH_3 de mesilato); 4,72 (multiplete, 1H, CH en la posición alfa del mesilato).

Síntesis de "Imidazolio Anfífilo Ramificado" (BIA) (cloruro de 1-metil-3-(1-octadecil-5-tetradecil-nonadecil)-3H-imidazol-1-io):**[0189]**

$\text{C}_{55}\text{H}_{109}\text{ClN}_2$; PM = 833,92

[0190] El mesilato **W6** (224 mg; 0,27 mmoles; PM = 811,46), disuelto en 10 ml 2-butanona, se calienta en presencia de 221,6 mg de metilimidazol (2,7 mmoles; PM = 82,10) a 80°C durante 6 días. La reacción se criba mediante análisis por TLC (desaparición de mesilato).

[0191] *Tratamiento final:* Evaporación de disolventes a presión reducida. El producto se disuelve en metanol, y se separa del mesilato sin reaccionar mediante filtración. La parte soluble se disuelve en 17 ml de metanol, y se añaden 8 ml de agua. La solución metanólica se acidifica con ácido clorhídrico concentrado a pH = 2. La molécula anfífila precipita durante el almacenamiento a -20°C . El sólido se aísla mediante centrifugado a 14.000 rpm a 0°C , lo que

precipita 220 mg de producto en bruto. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de metanol en diclorometano: del 1% al 12%) da el producto puro con un rendimiento del 43% (198,7 mg; 0,238 mmoles).

Análisis del BIA:

5 **[0192] TLC:** Rf = 0,33; disolvente: metanol al 10% en diclorometano; detección con vapor de yodo (Placas de TLC de gel de sílice 60 F254 de Merck).

10 **[0193] ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm):** 0,90 (J = 6,8 Hz, triplete, 9H, CH₃ terminal de cadenas hidrocarbonadas); 1,28 (multiplete ancho, 89H, en cadenas hidrocarbonadas); 1,84 (multiplete ancho, 4H, CH₂ en la posición beta de imidazolio); 4,18 (singlete, 3H, CH₃ de imidazolio); 4,44 (quintuplete, J = 5,6 Hz, 1H, CH en la posición alfa de imidazolio); 7,15 (singlete, 1H, CH en el anillo imidazolio); 7,33 (singlete, 1H, CH en el anillo imidazolio); 11,19 (singlete, 1H, CH en el anillo imidazolio).

15 **¹³C-RMN: dept 135 (CDCl₃) δ (ppm):**

[0194] CH y CH₃ dan picos negativos (-).

CH₂ detectado como picos positivos (+).

20 Los carbonos cuaternarios no se detectan mediante dept135.

25 138,7 ((-), C de metilimidazolio); 123,0 ((-), C de metilimidazolio); 119,3 ((-), C de metilimidazolio); 62,8 ((-), C en la posición alfa del imidazolio); 37,2 ((-), CH en cadenas hidrocarbonadas), 36,7 ((-), C-metilo de metilimidazolio); 35,9 (+); 35,4 (+); 33,5 (+); 33,4 (+); 33,3 (+); 31,9 (+); 30,1 (+); 29,7 (+); 29,65 (+); 29,6 (+); 29,5 (+); 29,4 (+); 29,1 (+); 26,65 (+); 26,6 (+); 25,9 (+); 23,2 (+); 22,7 (+): (diferentes C en la cadena hidrocarbonada); 14,1 ((-), metilo C terminal de cadenas hidrocarbonadas)

Análisis de masas de moléculas anfífilas:

30 **[0195]**

	Peso molecular (Da)	Masa exacta calculada de la parte catiónica (Da)	Especies iónicas detectadas mediante ESI+ (Da)
MONI	637,55	601,64	601,7
MONBI	687,61	651,66	651,7
HEIC	637,55	601,64	601,7
HEMB	687,61	651,66	651,7
HET	640,57	604,58	604,6
HEMI	623,52	587,62	587,7
BIA	833,92	797,86	797,9

35 **[0196]** Las moléculas se disolvieron en metanol (0,1 mg/ml); inyección directa; detección mediante Análisis de Masas por Electropulverización ESI+ en un aparato Bruker HCTUltra.

Preparación de liposomas a partir de cloruro de 1-metil-3-(1-octadecil-nonadecil)-3H-imidazol-1-io (MONI) y DOPE:

40 **[0197]** Los Liposomas se forman tomando DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) como co-lípido. 6,3 mg de MONI se disuelven junto con diferentes cantidades de DOPE en 1 ml de etanol en sonicación suave en un baño de

sonicación. Esta solución alcohólica concentrada se inyecta en 9 ml de agua estéril. La solución resultante es transparente y ligeramente azulada. Esta solución se sonica con un procesador ultrasónico (Bioblock Scientific) con pulsos de 2 segundos de 11 W durante 5 minutos.

5 **[0198]** Los liposomas resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 110 nm con una estrecha distribución de su tamaño. Permanecen estables durante el almacenamiento a 5°C, sin aumento del tamaño ni precipitación.

[0199] En las siguientes formulaciones de MONI la molécula anfífila se selecciona a una concentración constante de 1 mM tomada junto con cantidades milimolares variables de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE).

10

[0200] Por claridad se simplifican como MONI (1 + n), siendo n la concentración milimolar de DOPE.

[0201] La molécula anfífila MONI, pero también las otras moléculas anfífilas de la invención, particularmente las de los ejemplos 2 a 7 se disuelven fácilmente en etanol junto con el co-lípido DOPE. Como con las formulaciones liposomales, las concentraciones de 1 mM de molécula anfífila en presencia de diferentes proporciones molares de DOPE eran las más convenientes para comparar su respectiva actividad biológica. Estas soluciones alcohólicas presentaban el mismo rendimiento que las formulaciones liposomales en experimentos de transfección *in vitro*.

15

Medición del tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica:

20

[0202] Se prepararon preparaciones liposomales a 1 mmol de molécula anfífila con concentraciones variables de DOPE en agua milliQ, como se ha descrito anteriormente. El tamaño de partícula de estas preparaciones liposomales se determinó mediante dispersión de la luz usando un Zetamaster (Malvern Instrument, Orsay, Francia) con las siguientes especificaciones: tiempo de muestreo, 30 s; 3 mediciones por muestra; viscosidad del medio, 1,0 cP; índice de refracción (IR) del medio, 1,335; IR de la partícula, 1,47; temperatura: 25°C, a 633 nm de longitud de onda del láser.

25

Experimentos de RMN:

30

[0203] Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker de 400 MHz en Carex SA (Illkirch, Francia).

Análisis elemental (C, H, N) y espectroscopía de infrarrojos:

35

[0204] El análisis elemental y la espectroscopía de infrarrojos (Vertex 70 en KBr) se realizaron sobre productos finales en el "Institut Charles Sadron UPR22" en Estrasburgo.

Análisis de masas:

40

[0205] El análisis de masas se realizó mediante el método de ionización por electropulverización (ESI+), en un instrumento HCTultra (Bruker, Francia) en la Facultad de Farmacia en Illkirch (IFR85, ULP, Universidad Louis Pasteur, Estrasburgo).

Cultivo celular

45

[0206] Se cultivaron células K562 (leucemia crónica mielógena humana, CCL-243) y THP-1 (leucemia monocítica de sangre periférica humana, TIB-202) en RPMI-1640 (Eurobio) y se suplementaron con suero fetal bovino al 10% (FBS, Perbio), glutamax 2 mM (Eurobio), 100 unidades/ml de penicilina (Eurobio), 100 µg/ml de estreptomina (Eurobio). Se cultivaron células HeLa (adenocarcinoma epitelial del cuello del útero humano, CCI-2), Caski (carcinoma del cuello del útero humano), SiHa (carcinoma escamoso del cuello del útero humano, HTB-35), MCF-7 (adenocarcinoma epitelial de mama humano, HTB-22) en MEM (Eurobio) suplementado con glutamax 2 mM, BSS de Earle, 1,5 g/l de bicarbonato sódico, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1,0 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, y el 10% de FBS. Se cultivaron células NIH-3T3 (fibroblasto embrionario de ratón, CRL-1658) en DMEM (Eurobio) suplementado con L-glutamina 4 mM, 1,5 g/l de bicarbonato sódico, 4,5 g/l de glucosa, y antibióticos (Peni/Estrepto) y el 10% de FBS.

55

[0207] Células A549 (carcinoma de pulmón humano, ATCC N° CCL-185) que expresaban de forma estable la luciferasa de GL3 (luciferasa de *Photinus pyralis* bajo el control de elementos del SV40) se obtuvieron después de la transfección estable del plásmido pGL3Luc (Clontech). Se cultivaron células A549-GL3Luc en RPMI-1640 y se suplementaron con suero fetal bovino al 10%, glutamax 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,8 µg/ml de G418 (Promega). Todas las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%.

60

Experimentos de transfecciónTransfección en placa de cultivo tisular de 24 pocillos

- 5 **[0208]** Un día antes de la transfección, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos en 1 ml de medio completo recién preparado que contenía FBS al 10%. Antes de la transfección, se prepararon complejos de ARNip/reactivo de transfección. La cantidad deseada de ARNip se diluyó en 100 μ l del medio libre de suero. La solución se mezcló con agitación en vórtice durante 10 segundos. A continuación, se añadieron de 0,5 μ l a 3 μ l de formulaciones a base de moléculas anfífilas a la solución de ARNip. La mezcla final se mezcló con agitación en vórtice durante 10 segundos, y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 100 μ l de solución de complejos por pocillo y las placas se incubaron a 37°C.

Transfección en placa de cultivo tisular de 96 pocillos

- 15 **[0209]** Un día antes de la transfección, se sembraron 1×10^4 células en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos en 0,15 ml de medio completo recién preparado que contenía FBS al 10%. Antes de la transfección, se prepararon complejos ARNip/reactivo de transfección. La cantidad deseada de ARNip se diluyó en 20 μ l de medio libre de suero. La solución se mezcló con agitación en vórtice durante 10 segundos. A continuación, se añadieron de 0,5 μ l a 3 μ l de formulaciones a base de moléculas anfífilas a la solución de ARNip. La mezcla final se mezcló con agitación en vórtice durante 10 segundos, y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 μ l de solución de complejos por pocillo y las placas se incubaron a 37°C.

Transfección inversa en placa de cultivo tisular de 96 pocillos

- 25 **[0210]** Se prepararon en primer lugar complejos de ARNip/reactivo de transfección. La cantidad deseada de ARNip se diluyó en 50 μ l de medio libre de suero y se añadió por pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. A continuación, se añadieron de 0,5 μ l a 3 μ l de formulaciones a base de moléculas anfífilas a la solución de ARNip. La placa se colocó en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 1×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos en 125 μ l de medio completo recién preparado que contenía FBS al 10% y la placa se incubó adicionalmente a 37°C.

Comparación de reactivos de transfección (en formato de placa de cultivo tisular de 24 pocillos)

- 35 **[0211]** Para el reactivo HiperFect, la cantidad deseada de ARNip se diluyó en 300 μ l de medio libre de suero (para un experimento por triplicado). A continuación, se añadieron 9 μ l de reactivo de transfección a la mezcla de ARNip. La solución se mezcló con agitación en vórtice, 10 segundos y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Antes de la transfección, el medio de cultivo completo se retiró y se sustituyó por 0,5 ml de medio completo que contenía FBS 10% por pocillo. Se añadieron cien microlitos de solución de transfección por pocillo.

- 40 **[0212]** Para el reactivo SilentFect, la cantidad deseada de ARNip se diluyó en 75 μ l de medio libre de suero (para un experimento por triplicado). El reactivo SilentFect (2,25 μ l) se diluyó en 75 μ l de medio libre de suero y la solución se añadió a la solución diluida de ARNip, a continuación se mezcló, y se dejó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Antes de la transfección, el medio de cultivo completo se retiró y se sustituyó por 0,5 ml de medio completo que contenía suero al 10% por pocillo. Se añadieron cincuenta microlitros de solución de transfección por pocillo. Dado que se observó toxicidad, el medio de transfección se retiró y se sustituyó por 1 ml de medio completo que contenía suero al 10% por pocillo.

- 50 **[0213]** Para el reactivo Saint-Red, la cantidad deseada de ARNip se diluyó en 75 μ l de HBS (para un experimento por triplicado). El reactivo Saint-Red (0,42 μ l para 1 nM de ARNip) se diluyó en 75 μ l de HBS y la solución se añadió a la solución diluida de ARNip, a continuación se mezcló, y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 600 μ l de medio libre de suero a la solución de transfección. Antes de añadirlo a las células, el medio de cultivo completo se retiró y se sustituyó por 0,5 ml de medio completo que contenía suero al 10% por pocillo, a continuación se añadieron 250 μ l de solución de transfección por pocillo.

- 55 **[0214]** Para TransIT-TKO, el reactivo (6 μ l) se diluyó en 150 μ l de medio libre de suero y la solución se mezcló y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La cantidad deseada de ARNip se añadió a la solución diluida de reactivo de transfección. La solución se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Antes de añadirlo a las células, el medio de cultivo completo se retiró y se sustituyó por 0,25 ml de medio completo que contenía suero al 10% por pocillo. Se añadieron cincuenta microlitros de solución de transfección por pocillo. Después de 24 h de incubación, el medio se retiró y se sustituyó por 0,5 ml de medio completo que contenía FBS al 10%.

- 60 **[0215]** Para todos los protocolos de transfección, las placas se incubaron adicionalmente a 37°C durante 48 h.

Ensayo de luciferasa y proteína

[0216] La expresión del gen de luciferasa se midió usando un kit comercial (Promega, Francia). Después de retirar el medio completo, se realizaron tres lavados con 1 ml de solución de PBS. A continuación, se añadieron 100 μ l de tampón de lisis 1x por pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los lisados se recogieron y se centrifugaron a 14.000 g durante 5 minutos. El ensayo de luciferasa se evaluó con 5 μ l de lisado después de la inyección de 100 μ l de solución de luciferina. La luminiscencia (URL) se supervisó con una integración durante 10 segundos con un luminómetro (LB960, Berthold, Francia). Los resultados se expresan como unidades de luz integradas durante 10 segundos (URL), por mg de proteína celular usando el ensayo de BCA (Pierce, Francia).

Medición del nivel de ARNm

[0217] El nivel de ARN mensajero se determinó mediante el ensayo de ADN ramificado QuantiGene® (GenoSpectra) que se realiza con lisados de células completas y sin amplificación del objetivo.

[0218] Después de 48 h de transfección, las células se lavaron con 1 ml de PBS 1x (Cambrex) y se lisaron en 0,6 ml de tampón de lisis Genospectra 1x durante 30 minutos a 50°C. A continuación, la placa se almacenó a -80°C durante al menos 30 minutos. Los lisados se descongelaron y se añadieron de 2 a 20 μ l de lisado a la placa de captura. Diez μ l de reactivo de trabajo de lisis (para 48 reacciones, el reactivo de trabajo de lisis se prepara añadiendo 25 μ l de CE (extensor de captura), 25 μ l de LE (extensor de marcador) y 25 μ l de BL (sonda de bloqueo) y 425 μ l de mezcla de lisis 3x, todos los compuestos son de Genospectra) se añadieron a la placa y el volumen se completó a 100 μ l con mezcla de lisis 1x. La placa se cubrió con una tapa y se incubó durante 16 h a 50°C. La placa se lavó 3 veces con 300 μ l de tampón de lavado 1x (Genospectra), y 100 μ l de solución de trabajo amplificadora (0,116 μ l de amplificador diluido en 116 μ l de diluyente de amplificador, todos de Genospectra) se añadieron a cada pocillo. La placa se incubó durante 1 hora a 50°C. Después de 3 veces de lavado con tampón de lavado 1x, se añadieron 100 μ l de reactivo de trabajo de sonda de marcador (0,116 μ l de sonda de marcador diluidos en 116 μ l de diluyente de amplificador, todos de Genospectra) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a 50°C. La placa se lavó a continuación 3 veces con tampón de lavado 1x y se añadieron 100 μ l de reactivo de trabajo de sustrato (0,348 μ l de lauril sulfato de litio al 10% en 116 μ l de Sustrato, todos de Genospectra) a cada pocillo. Después de 30 minutos de incubación, la luminiscencia se midió en cada pocillo con un espectrofotómetro (Berthold).

Análisis por SDS-PAGE y transferencia de Western

[0219] Después de la transfección, las células se lavaron con 1 ml de PBS 1x (Cambrex) y cada pocillo se tripsinizó con 100 μ l de tripsina/EDTA (Euromedex). Se añadieron 0,5 ml de medio completo con suero al 10% para detener a la tripsina. Los pocillos por triplicado se reunieron, se centrifugaron y el sedimento se lavó con PBS 1x. Después del centrifugado, el sedimento se lisó en 100 μ l de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton x-100 al 1%, desoxicolato sódico al 1%, SDS al 0,1%) durante 20 minutos a 4°C. El lisado se homogeneizó con agitación en vórtice y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm. El contenido de proteína se evaluó mediante el kit de BCA (Pierce). 5 μ g de proteína se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida/bis acrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de bifluoruro de polivinilideno (Millipore). La expresión de vimentina se detectó con un anticuerpo policlonal anti-vimentina de conejillo de indias (RDI) diluido a 1/3000. La GAPDH, detectada con un anticuerpo monoclonal anti-GAPDH de ratón (Ambion), se usó para normalizar el nivel de proteína. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron usando anticuerpos anti-conejillo de indias o anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano rusticano y el kit *Amplified Opti-4CN Substrate Kit* de BioRad usando las instrucciones del fabricante.

Tinción por inmunofluorescencia

[0220] El medio de cultivo se retiró de 48 a 72 horas después de la transfección. Las células se lavaron con solución de PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1%. Las células se permeabilizaron y se fijaron con una solución metanólica (metanol/acetona: 1/1, enfriada a -20°C) durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron de nuevo dos veces con 1 ml de PBS-BSA al 1%, a continuación las células se incubaron a 4°C con 1 ml de PBS que contenía el 1% de suero de cabra durante 15 minutos para bloquear sitios de unión inespecíficos. Las células se lavaron de nuevo con 1 ml de PBS-BSA al 1%.

[0221] Las células se incubaron durante 1 hora a 4°C en presencia de 50 μ l de PBS y 50 μ l de anticuerpo anti-lamina A/C de ratón (clase de IgG 1, Research Diagnostic Inc, Flanders, NJ). Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS-BSA al 1%.

[0222] Las células se incubaron 1 hora a 4°C en PBS que contenía 50 μ l de anticuerpo de carba anti-IgG de ratón acoplado a fluoresceína (Calbiochem, La Jolla, CA). Las células se lavaron de nuevo con 1 ml de PBS-BSA al 1% y finalmente se añadió 1 ml de PBS-BSA al 1% por pocillo. La inmunotinción se observó mediante microscopía de fluorescencia (ECLIPSE TE2000-S, Nikon).

Resultados

[0223] Como modelo objetivo de gen informador endógeno, se usaron células A549 que expresaban de forma estable la luciferasa de GL3 (luciferasa de *Photinus pyralis* bajo el control de elementos de SV40). Un ARNip bien definido y convencional, producido químicamente, y específico de secuencia, ARNip de GL3Luc de SEC ID N° 1 y 2 compuesto por un corto ARNbc de 19 nucleótidos que coincide con el ARNm de GL3Luc y que comprende salientes 3' de 2 desoxirribonucleótidos (dT) se usó para los experimentos de transfección. Se preparó una formulación de MONI anfífilo catiónico a 1 mM y combinado con el fosfolípido neutro DOPE a 1 mM en etanol. A continuación el ARNip diluido en medio libre de suero (100 μ l) se complejó con 2 μ l de la formulación de MONI/DOPE (1 mM/ 1mM en etanol). La solución resultante de complejos de transfección se añadió a las células cultivadas en medio que contenía suero y las células se expusieron finalmente a un intervalo de concentración de ARNip de 100 a 2000 pM (**Figura 1**). La eficacia de inactivación se determinó 48 h después de la transfección midiendo la actividad de luciferasa con un ensayo de luminescencia convencional normalizada mediante el contenido de proteína de los lisados celulares. La actividad de luciferasa (expresada como URL/mg de proteína) se inhibía hasta el 90% cuando la transfección se realizó con 2000 pM de ARNip. La ausencia de efecto sobre la actividad de luciferasa cuando las células se transfectaron con la secuencia no relacionada, el ARNip de GL2Luc, en las mismas condiciones, confirmó una interferencia por ARN específica de secuencia. El ARNip de GL3Luc añadido en solitario a las células y con el mismo intervalo de concentración (de 100 a 2000 pM) tampoco mostraba inhibición de la actividad de luciferasa (no se muestra).

[0224] Una segunda formulación de molécula anfífila catiónica basada en la molécula MONBI a 1 mM y combinada con DOPE a 2 mM se preparó en etanol. 2 μ l de esta formulación se usaron para formar complejos con ARNip de GL3Luc (intervalo de concentración de 250 pM a 5 nM) en medio libre de suero y la solución resultante se añadió a células A549-GL3Luc. La eficacia de inactivación se evaluó 48 h después de la transfección midiendo la actividad de luciferasa. Una significativa inhibición de luciferasa (70%) ya se observaba con 250 pM de ARNip y alcanzaba el 90% con 5 nM de ARNip transfectado (**Figura 2**). Cuando se usaba el ARNip de GL2Luc, como secuencia no relacionada y con las mismas condiciones de transfección, el nivel de luciferasa no resultó afectado, confirmando la inactivación selectiva obtenida con el ARNip de GL3Luc.

[0225] La inactivación de genes era eficaz en el intervalo picomolar de ARNip cuando la transfección se conseguía con la formulación de MONI/DOPE como se muestra en la Figura 2. La inactivación del gen de luciferasa era del 95% y el 80% a 1000 y 100 pM, respectivamente. El 50 y el 20% de inactivación seguían observándose cuando se transfectaban 25 y 10 pM de ARNip, respectivamente (**Figura 3**). Formulaciones basadas en derivados anfífilos de imidazolio, tales como MONI o MONBI, se prepararon mezclando moléculas catiónicas anfífilas con el fosfolípido neutro DOPE en etanol o en agua. Para las preparaciones liposomales, las moléculas anfífilas se disolvieron en primer lugar con DOPE en etanol proporcionando una solución concentrada 10X. A continuación, esta solución se inyectó en 10 volúmenes de agua y se mezcló inmediatamente. La solución resultante se sonicó con un procesador ultrasónico. El tamaño de partículas de los liposomas formados se determinó mediante dispersión de luz dinámica y mostraba un tamaño medio de 100 nm con una baja polidispersidad (**Figura 4**). Esta formulación liposomal se almacenó a 4°C y se descubrió que era estable a lo largo del tiempo (de varias semanas a meses) sin formación de agregados (1 mes como se muestra mediante la **Figura 4**). Muchas formulaciones liposomales se prepararon y mostraron un tamaño medio de partículas de 100 \pm 10 nm, resaltando la robustez del método de preparación liposomal de los inventores.

[0226] La formulación liposomal de MONI/DOPE se comparó con la última generación de muchos reactivos de transfección disponibles en el mercado específicamente propuestos para el suministro de ARNip a las células (**Figura 5**). Las condiciones de transfección se aplicaron de acuerdo con los protocolos del fabricante y se describen en "Materiales y Métodos". Se usó una concentración de ARNip que variaba entre 1 pM y 10 nM. Los reactivos Saint-Red y TransIT-TKO mostraban las eficacias de inactivación más bajas (inferior al 50% a 1 nM). Los reactivos HiperFect y SilentFect mostraban buenas eficacias de inactivación en el intervalo de 100 pM a 10 nM de ARNip pero son totalmente ineficaces para las concentraciones más bajas de ARNip (de 10 pM a 1 pM). El sistema de transfección de MONI/DOPE se comparaba favorablemente con todos los demás reactivos de transfección ensayados y con todas las concentraciones de ARNip ensayadas. Una inactivación de genes significativa, de aproximadamente el 50%, se sigue observando a 10 pM.

[0227] Para confirmar la potencia de las formulaciones de MONI/DOPE para mediar en una inactivación de genes endógena eficaz se fijó como objetivo el gen de GAPDH en diversas líneas celulares, incluyendo células adherentes y no adherentes. Se seleccionaron ARNip de GAPDH a partir de las tecnologías SMARTpool® (Dharmacon) proporcionando una serie de cuatro sitios múltiples de fijación como objetivo de ARNip en el mismo ARNm y se garantizó una inactivación eficaz. La inactivación génica se evaluó a nivel del ARNm usando la tecnología de ADNr QuantiGene® (Genospectra) 48 h después de la transfección. Los reactivos GAPDH SMART pool® añadidos en solitario a todas las células ensayadas (HeLa, Caski, SiHa, MCF-7, K562 y THP-1) fueron incapaces de proporcionar una inactivación eficaz a nivel del ARNm a una concentración que variaba entre 250 pM y 10 nM. Cuando se transfectaban con la formulación liposomal de MONI/DOPE (1/2 mM), los reactivos GAPDH SMART pool® mostraban una inactivación de ARNm de GAPDH altamente eficaz, superior al 80% para células adherentes (HeLa, Caski, SiHa y MCF-7) y concentración de ARNip de 250 pM a 10 nM (**Figura 6**). Como control de selectividad, se

añadió ARNip de Lamina A/C y no mostró ningún efecto sobre el nivel de ARNm de GAPDH. Además, se obtuvo inactivación de GAPDH selectiva y eficaz para células no adherentes (**Figura 6**), células K562 y THP-1, cuando la transfección se realizaba con la formulación liposomal de MONI/DOPE y a una baja concentración de ARNip (de 5 a 20 nM). Otros genes endógenos fueron fijados como objetivo para interferencia por ARN, incluyendo genes de vimentina y lamina A/C. La eficacia de inactivación se determinó a nivel de proteínas mediante transferencia de Western para el gen de vimentina de células fibroblastos 3T3 murinos (**Figura 7**) y mediante tinción por inmunofluorescencia para el gen de lamina A/C de células HeLa humanas (**Figura 8**). Ambos experimentos mostraban alta eficacia de inactivación de ARNip 48 h después de la transfección con la formulación liposomal de MONI/DOPE (1/2 mM) para estas dos abundantes proteínas a baja concentración de ARNip (1-5 nM). El experimento con lamina A/C confirmaba también que todas las células transfectadas contenían ARNip bioactivo que suprimía totalmente la expresión del gen fijada como objetivo (**Figura 8**).

[0228] Los protocolos de transfección se desarrollaron inicialmente para el suministro de ARNip eficaz en células adherentes y no adherentes cultivadas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en presencia de medio que contiene suero. Se ensayaron otros soportes de cultivo celular, tales como placa de 6 pocillos, matraces de cultivo T25 y T75, y mostraban una eficacia de inactivación de genes >80% para concentraciones de ARNip que variaban entre 100 pM y 10 nM y transfectadas con la formulación liposomal de MONI/DOPE (1/2 mM). La potencia del suministro de ARNip adaptada a condiciones de HTS se abordó usando un procedimiento de transfección inversa aplicado en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos. Después del procedimiento de optimización, se propuso un protocolo eficaz de forma rutinaria. ARNip, diluido en 25 µl de medio libre de suero, se añadió en primer lugar al pocillo. A continuación, 1 µl de formulación liposomal de MONI/DOPE (1/2 mM) se añadió por pocillo. Después de la homogeneización, la placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la formación de complejos de transfección. Las células diluidas en 125 µl de medio que contenía suero se añadieron a continuación al pocillo (10.000 células/pocillo) y la placa se incubó adicionalmente durante 48 h a 37°C. La inactivación del gen de luciferasa de células A549GL3Luc era superior al 80% para una concentración de ARNip \geq 1nM y selectiva como se muestra mediante la ausencia de inhibición de luciferasa cuando se transfectaba el ARNip de GL2Luc no relacionado (**Figura 9**). La inactivación a nivel picomolar de ARNip también se obtenía de forma significativa (>50%, **Figura 9**). La inactivación de GAPDH selectiva en células MCF-7 después del procedimiento inverso optimizado de la transfección de ARNip se obtuvo con eficacias del 70 al 90% para concentraciones de ARNip de 100 pM y 5 nM, respectivamente (**Figura 10**).

[0229] En la Tabla 2 a continuación, se proporcionan resultados relativos a la inactivación del gen de luciferasa (pGL3) mediante ARNip de GL3Luc transfectado usando formulaciones basadas en moléculas catiónicas anfífilas de acuerdo con la fórmula (I).

[0230] Las formulaciones compuestas por molécula catiónica anfífila/DOPE (1 mM/2 mM en etanol al 10% y agua) se usaron para complejar ARNip y transfectar células A549-GL3Luc. La expresión del gen de luciferasa se midió después de un periodo de incubación de 48 h. Los experimentos se realizaron por triplicado y la eficacia de inactivación de luciferasa de GL3 se calculó a partir del nivel de luciferasa de células transfectadas con un ARNip de GL2-Luc de control y se normalizó mediante el contenido de proteína en los lisados celulares.

Molécula anfífila	Concentración de ARNip (nM)	Inactivación (%) +/- SD
MONI	10	95 ± 3
	1	92 ± 4
MONBI	10	94 ± 10
	1	93 ± 11
HEIC	10	83 ± 2
	1	73 ± 6
HEMB	10	88 ± 4
	1	76 ± 9
HET	10	23 ± 2
	1	22 ± 1
HEMI	10	67 ± 19
	1	57 ± 8
BIA	10	75 ± 14
	1	59 ± 6
BIA (sin DOPE)	10	87 ± 4
	1	68 ± 5

Referencias bibliográficas**[0231]**

- 5 Cho, J. y R.R. Rando. 2000. Specific binding of Hoechst 33258 to site 1 thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res.* 28: 2158-63.
- Dassonneville, L., F. Hamy, P. Colson, C. Houssier y C. Bailly. 1997. Binding of Hoechst 33258 to the TAR RNA of HIV-1. Recognition of a pyrimidine bulge-dependent structure. *Nucleic Acids Res.* 25: 4487-92.
- 10 Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber y T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494-8.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel y T. Tuschl. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.
- Fire, A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15: 358-63.
- 15 Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach y G.J. Hannon. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404: 293-6.
- Jepsen, J.S. y J. Wengel. 2004. LNA-antisense rivals siRNA for gene silencing. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 7: 188-94.
- Kim, D.H., M.A. Behlke, S.D. Rose, M.S. Chang, S. Choi y J.J. Rossi. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol.* 23: 222-6.
- 20 Kurreck, J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem.* 270: 1628-44.
- Miller, P.S. 1991. Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents. *Biotechnology (N Y).* 9: 358-62.
- Parrish, S., J. Fleenor, S. Xu, C. Mello y A. Fire. 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell.* 6: 1077-87.
- 25 Siolas, D., C. Lerner, J. Burchard, W. Ge, P.S. Linsley, P.J. Paddison, G.J. Hannon y M.A. Cleary. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol.* 23: 227-31.
- Tuschl, T. 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem.* 2: 239-45.
- Tuschl, T., P.D. Zamore, R. Lehmann, D.P. Bartel y P.A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13: 3191-7.
- 30 Verma, S. y F. Eckstein. 1998. Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu Rev Biochem.* 67: 99-134.
- Yang, D., H. Lu y J.W. Erickson. 2000. Evidence that processed small dsRNA may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol.* 10: 1191-200.
- 35 Yang, X.L., R.B. Hubbard, M. Lee, Z.F. Tao, H. Sugiyama y A.H. Wang. 1999. Imidazole-imidazole pair as a minor groove recognition motif for T:G mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res.* 27: 4183-90.
- Yang, X.L., C. Kaenzig, M. Lee y A.H. Wang. 1999. Binding of AR-1-144, a tri-imidazole DNA minor groove binder, to CCGG sequence analyzed by RMN spectroscopy. *Eur J Biochem.* 263: 646-55.
- Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp y D.P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 101: 25-33.
- 40 Zelphati, O. y F.C. Szoka, Jr. 1996. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 11493-8.
- Zon, G. y T.G. Geiser. 1991. Phosphorothioate oligonucleotides: chemistry, purification, analysis, scale-up and future directions. *Anticancer Drug Des.* 6: 539-68.

45 LISTA DE SECUENCIAS

[0232]

- 50 <110> POLYPLUS-TRANSFECTION SA
- <120> COMPOSICIONES PARA LA TRANSFECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS ACTIVOS PARA INACTIVACIÓN DE GENES Y SUS APLICACIONES BIOLÓGICAS Y TERAPÉUTICAS
- 55 <130> CP/SF 61838-2752
- <150> EP 06 290 563.3
- <151> 06-04-2006
- 60 <150> US 60/789.575
- <151> 06-04-2006
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.3
- 65 <210> 1

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (20)..(21)
 <223> Desoxitimidina

<400> 1

cuuacgcuga guacuucgat t
21

15 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (1)..(2)
 <223> Desoxitimidina

<400> 2

ttgaaugcga cucaugaagc u
21

30 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(21)
 <223> Desoxitimidina

45 <400> 3

cguacgcgga auacuucgat t
21

<210> 4
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

55

<220>
<221> base_modificada

5 <222> (1)..(2)
<223> Desoxitimidina

<400> 4

ttgcaugcgc cuuauagaagc u
21

10 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> oligonucleótido

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (19)..(20)
<223> Desoxitimidina

<400> 5

gaaugguaca aaucgaagt
20

25 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido

35 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(2)
<223> Desoxitimidina

<400> 6

ttcuuaccu guuuagguuc
20

40 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido

50 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(21)
<223> Desoxitimidina

55 <400> 7

cuggacuucc agaagaacat t
21

5 <210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

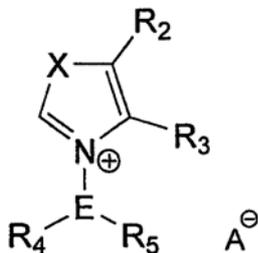
10 <220>
<223> oligonucleótido
<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(2)
<223> Desoxitimidina

15 <400> 8

ttgaccugaa ggucuucuug u
21

REIVINDICACIONES

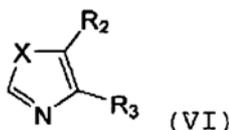
1. Composiciones de transfección que comprenden un oligonucleótido activo para la inactivación de genes y una molécula catiónica anfífila de fórmula (I)



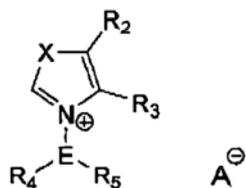
(I)

- 5 en la que
- X es N-R₁, S u O, siendo R₁ un radical alquilo C₁-C₄ o un radical alquilo C₃-C₆ hidroxilado,
 - 10 - R₂ y R₃, iguales o diferentes, representan H o un radical alquilo C₁-C₄, o R₂ y R₃ están enlazados juntos para formar un anillo saturado o insaturado o un heterociclo que tiene 5 ó 6 elementos,
 - E es un espaciador alquilo C₁-C₅,
 - 15 - R₄ y R₅, iguales o diferentes, representan cadenas hidrocarbonadas o fluorocarbonadas de C₁₀-C₃₆ lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas, que comprenden opcionalmente cicloalquilo C₃-C₆,
 - A⁻ es un anión biocompatible.
- 20 2. Las composiciones de la reivindicación 1, en las que dicho heterociclo formado cuando R₂ y R₃ se enlazan juntos, es insaturado o saturado y tiene 5 ó 6 elementos y comprende C y N, S u O como heteroátomos.
3. Las composiciones de la reivindicación 1 ó 2, en las que R₄ y R₅ son cadenas hidrocarbonadas de C₁₄-C₃₆ y E es un espaciador alquilo C₁-C₄.
- 25 4. Las composiciones de la reivindicación 3, en las que R₄ y R₅ son iguales.
5. Las composiciones de la reivindicación 3, en las que R₄ y R₅ son radicales alquilo C₁₈ y E es alquilo C₁.
- 30 6. Las composiciones de la reivindicación 3, en las que R₄ y R₅ son radicales alquilo C₁₆ y E es alquilo C₄.
7. Las composiciones de la reivindicación 3, en las que R₄ y R₅ son diferentes.
8. Las composiciones de la reivindicación 7, en las que R₄ y R₅ con cadenas alquilo C₁₈ y C₁₇, y E es un alquilo C₂.
- 35 9. Las composiciones de la reivindicación 7, en las que R₄ y R₅ son radicales alquilo C₃₂ y C₁₈, respectivamente, y E es alquilo C₁.
- 40 10. Las composiciones de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en las que R₂ y R₃ son H o están enlazados juntos para formar un anillo aromático.
11. Las composiciones de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en las que X es N-R₁, siendo R₁ CH₃.
- 45 12. Las composiciones de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en las que X es S u O.
13. Las composiciones de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en las que A⁻ es Cl⁻ u OH⁻.
- 50 14. Las composiciones de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, formuladas con un co-lípido neutro.
15. Las composiciones de la reivindicación 14, en las que el co-lípido es un derivado de fosfatidiletanolamina tal como dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), o colesterol.

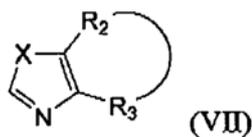
16. Las composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en las que dicho oligonucleótido es activo para interferencia por ARN.
- 5 17. Las composiciones de la reivindicación 16, en las que dicho oligonucleótido es un ARNip.
18. Las composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en las que dicho oligonucleótido o ARNip, respectivamente, comprende grupos para su estabilización contra la degradación, seleccionándose dicho grupo entre el grupo que comprende nucleótidos de purina, nucleótidos de pirimidina sustituidos con análogos modificados tales como desoxinucleótidos, y/o análogos de nucleótidos modificados tales como ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados en el azúcar o en la cadena principal.
- 10 19. Las composiciones de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, en las que dicho oligonucleótido o ARNip, respectivamente, contiene desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de nucleótidos, tales como metilfosfonato, morfolinofosfordiamidato, fósforotioato, APN, ANB, análogos de nucleótidos 2' alquilo.
- 15 20. Un método para transfección *in vitro* o *ex vivo* de células vivas que comprende introducir en las células una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
- 20 21. El método de la reivindicación 20, que comprende usar concentraciones nanomolares y hasta picomolares de ARNip o de oligonucleótidos para mediar en la inactivación de genes.
22. El método de la reivindicación 20 ó 21, para cultivo celular, para células tanto adherentes como no adherentes, para genómica funcional, validación de objetivos y aplicaciones terapéuticas.
- 25 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, que usa protocolos de transfección aplicados en presencia de suero.
24. El método de la reivindicación 20 ó 21, para mediar en aplicaciones de HTS cuando se realiza un procedimiento de transfección inversa.
- 30 25. Las composiciones de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para su uso como fármacos.
26. Las composiciones de acuerdo con la reivindicación 25, en una forma adecuada para una administración por vía oral, sistémica o tópica, en las que dichas composiciones están asociadas a un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable.
- 35 27. Las composiciones de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, para inducir un efecto regulador sobre la expresión de una o más proteínas objetivo responsables de o implicadas en enfermedades genéticas hereditarias o enfermedades genéticas complejas.
- 40 28. Las composiciones de la reivindicación 27, para el tratamiento de cáncer, infecciones víricas o infecciones parasitarias.
- 45 29. Un método para la síntesis de una molécula catiónica anfífila de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que comprende
- 50 - elaborar una cadena larga ramificada, cuya parte hidrocarbonada se obtiene mediante métodos de acoplamiento C-C convencionales, tal como se ilustra mediante la reacción de acoplamiento de Grignard a ésteres o aldehídos. La parte hidrófoba sintetizada contiene un alcohol primario o secundario como se ilustra en la fórmula IV:
- HO-E-R4(R5) (IV)
- 55 - activar la función alcohol mediante conversión en un derivado de metanosulfonilo, de fórmula (V) MsO-E-R4 (R5) y/o otros derivados activados convencionales tales como derivados de halógeno
- hacer reaccionar a dichos derivados activados, en particular derivados de metanosulfonilo, con un heterociclo de fórmula (VI)



en la que X es N-R1, S u O
 en condiciones especificadas para obtener (I)

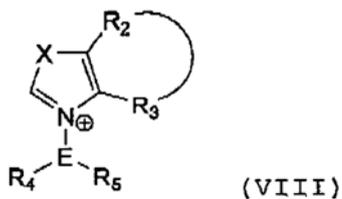


o hacer reaccionar a dicho derivado de metanosulfonilo (V) con un heterociclo ilustrado en la fórmula (VII)



5

en condiciones especificadas para obtener el heterociclo de fórmula (VIII)



10

30. El método de la reivindicación 29, que comprende además la purificación y conversión en derivados salinos de moléculas anfífilas de fórmula (I) en una forma neutra, mediante precipitación selectiva en metanol/agua/ácido a partir del medio de reacción.

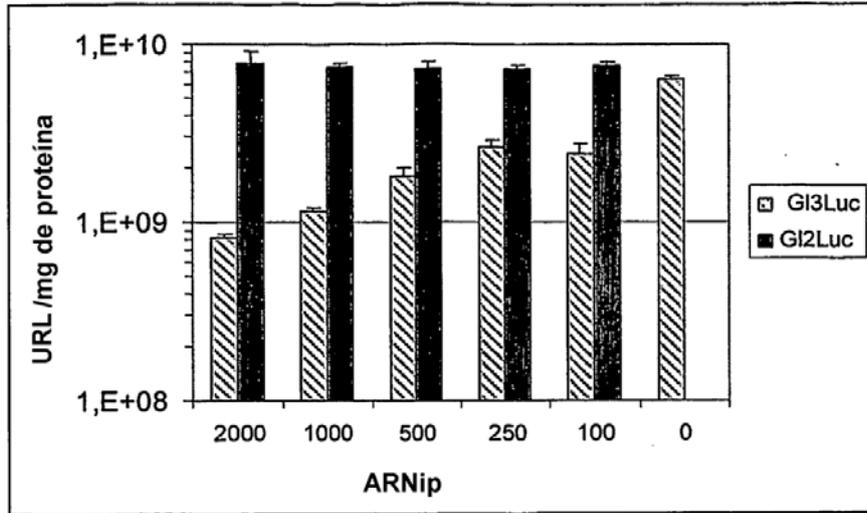


Figura 1

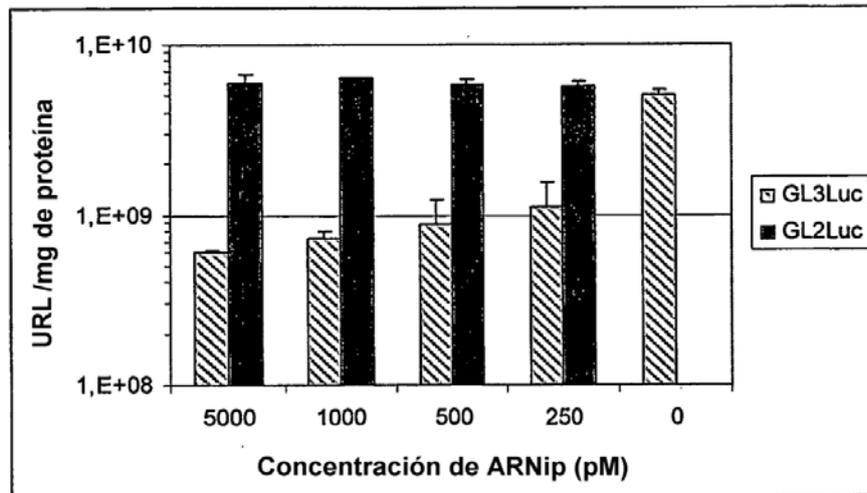


Figura 2

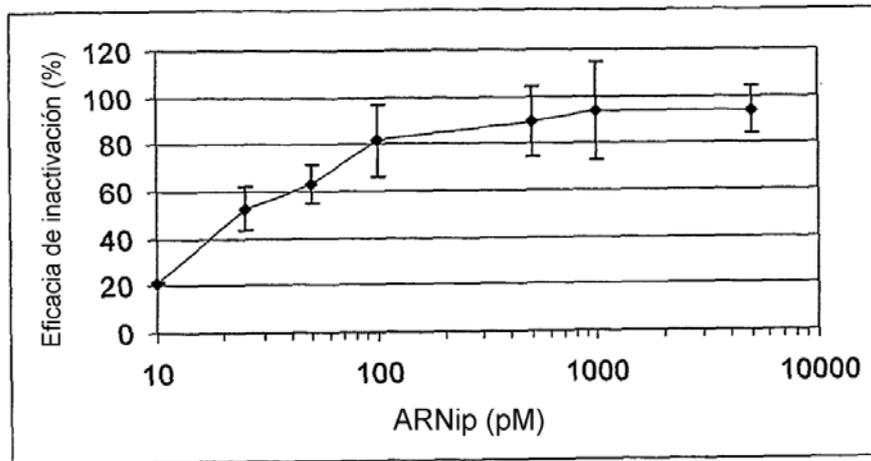


Figura 3

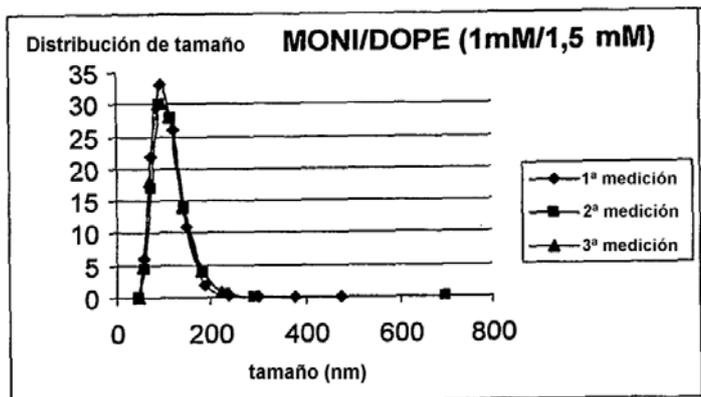


Figura 4

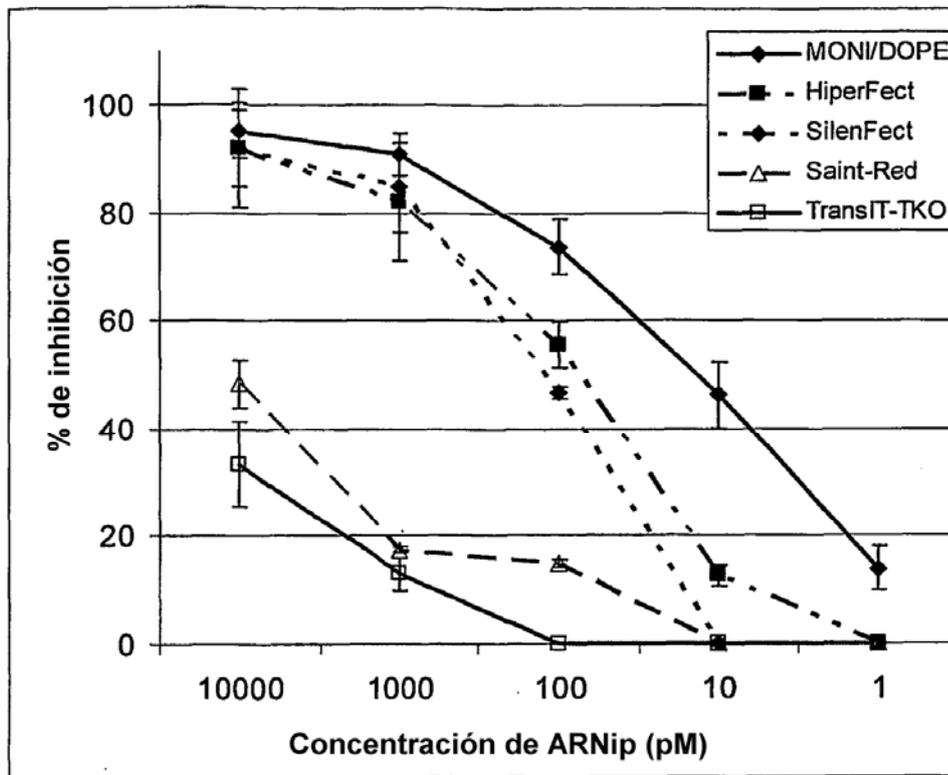


Figura 5

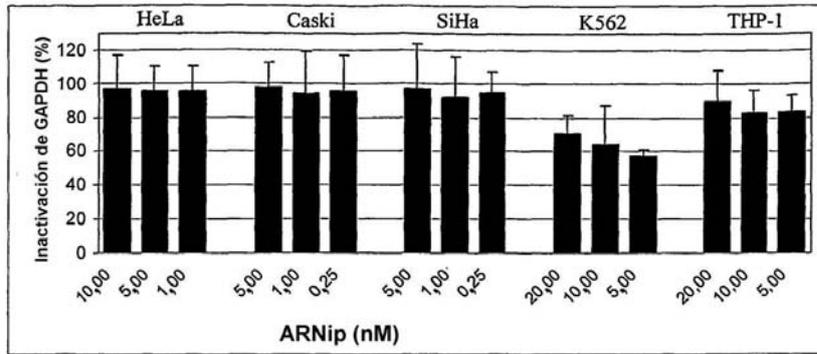


Figura 6

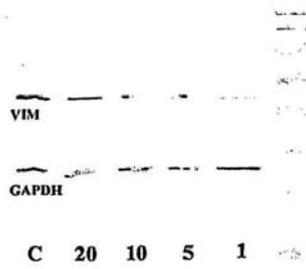


Figura 7

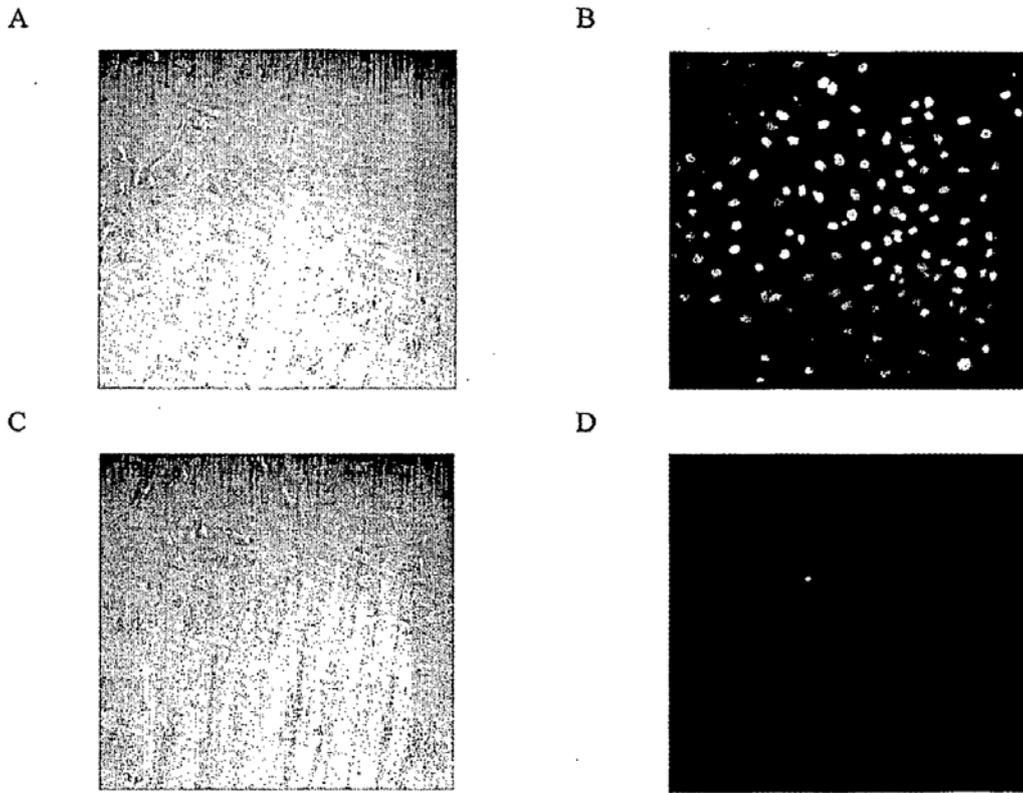


Figura 8

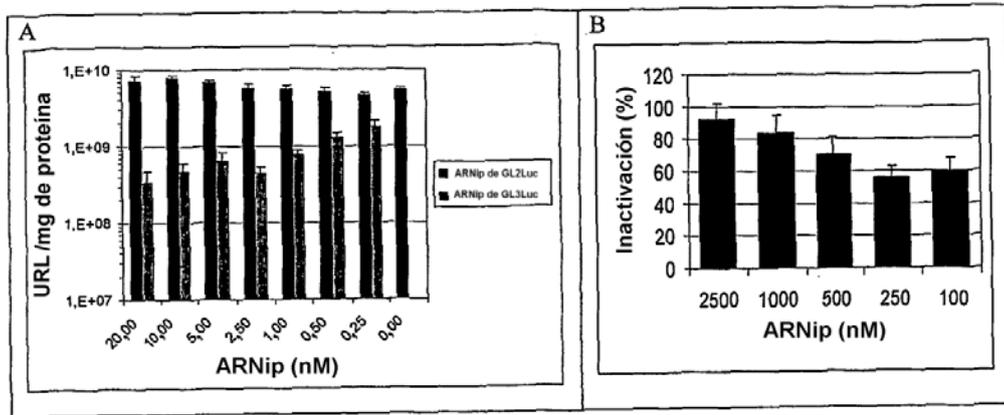


Figura 9

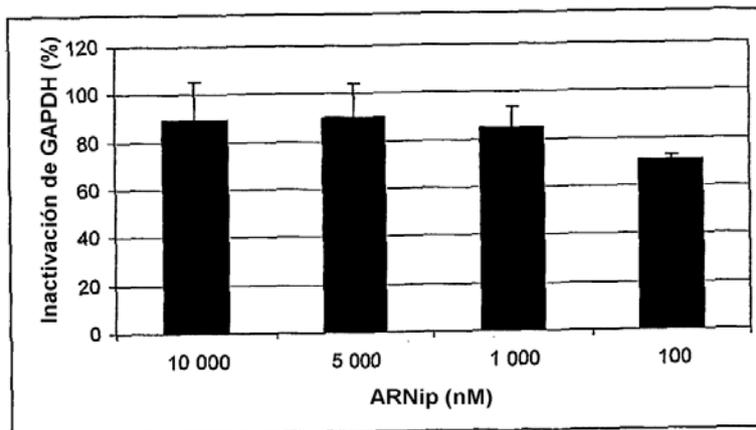


Figura 10

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0244321 A [0003]
- WO 01075164 A3 [0003]
- EP 20010985833 A [0003]
- EP 06290563 A [0232]
- US 60789575 B [0232]

15 Documentos no de patentes citados en la descripción

- **Cho, J.; R.R. Rando.** Specific binding of Hoechst 33258 to site 1 thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, 2158-63 [0231]
- **Dassonneville, L.; F. Hamy; P. Colson; C. Houssier; C. Bailly.** Binding of Hoechst 33258 to the TAR RNA of HIV-1. Recognition of a pyrimidine bulge-dependent structure. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 4487-92 [0231]
- **Elbashir, S.M.; J. Harborth; W. Lendeckel; A. Yalcin; K. Weber; T. Tuschl.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.*, vol. 411, 494-8 [0231]
- **Elbashir, S.M.; W. Lendeckel; T. Tuschl.** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, 188-200 [0231]
- **Fire, A.** RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.*, 1999, vol. 15, 358-63 [0231]
- **Hammond, S.M.; E. Bernstein; D. Beach; G.J. Hannon.** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, vol. 404, 293-6 [0231]
- **Jepsen, J.S.; J. Wengel.** LNA-antisense rivals siRNA for gene silencing. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 2004, vol. 7, 188-94 [0231]
- **Kim, D.H.; M.A. Behlke; S.D. Rose; M.S. Chang; S. Choi; J.J. Rossi.** Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol.*, 2005, vol. 23, 222-6 [0231]
- **Kurreck, J.** Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem.*, 2003, vol. 270, 1628-44 [0231]
- **Miller, P.S.** Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents. *Biotechnology (N Y)*, 1991, vol. 9, 358-62 [0231]
- **Parrish, S.; J. Fleenor; S. Xu; C. Mello; A. Fire.** Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell*, 2000, vol. 6, 1077-87 [0231]
- **Siolas, D.; C. Lerner; J. Burchard; W. Ge; P.S. Linsley; P.J. Paddison; G.J. Hannon; M.A. Cleary.** Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol.*, 2005, vol. 23, 227-31 [0231]
- **Tuschl, T.** RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem.*, 2001, vol. 2, 239-45 [0231]
- **Tuschl, T.; P.D. Zamore; R. Lehmann; D.P. Bartel; P.A. Sharp.** Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.*, 1999, vol. 13, 3191-7 [0231]
- **Verma, S.; F. Eckstein.** Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users. *Annu Rev Biochem.*, 1998, vol. 67, 99-134 [0231]
- **Yang, D.; H. Lu; J.W. Erickson.** Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol.*, vol. 10, 1191-200 [0231]
- **Yang, X.L.; R.B. Hubbard; M. Lee; Z.F. Tao; H. Sugiyama; A.H. Wang.** Imidazole-imidazole pair as a minor groove recognition motif for T:G mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res.*, 1999, vol. 27, 4183-90 [0231]
- **Yang, X.L.; C. Kaenzig; M. Lee; A.H. Wang.** Binding of AR-1-144, a tri-imidazole DNA minor groove binder, to CCGG sequence analyzed by NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.*, 1999, vol. 263, 646-55 [0231]
- **Zamore, P.D.; T. Tuschl; P.A. Sharp; D.P. Bartel.** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, vol. 101, 25-33 [0231]
- **Zelphati, O.; F.C. Szoka, Jr.** Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996, vol. 93, 11493-8 [0231]
- **Zon, G.; T.G. Geiser.** Phosphorothioate oligonucleotides: chemistry, purification, analysis, scale-up and future directions. *Anticancer Drug Des.*, 1991, vol. 6, 539-68 [0231]