

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 206**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**C08G 65/331** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2007** **E 07853756 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013** **EP 2068886**

54 Título: **Formulación que contiene lípidos**

30 Prioridad:

**03.10.2006 US 828022 P**

**18.12.2006 US 870457 P**

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

**19.11.2013**

73 Titular/es:

**TEKMIRA PHARMACEUTICALS CORPORATION  
(100.0%)**

**100-8900 Glenlyon Parkway  
Burnaby, BC V5J 5J8, CA**

72 Inventor/es:

**MANOHARAN, MUTHIAH;  
RAJEEV, KALLANTHOTTAHIL G.;  
AKINC, AKIN;  
NARAYANANNAIR, JAYAPRAKASH K.;  
JAYRAMAN, MUTHUSAMY y  
MAIER, MARTIN A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 430 206 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

Formulación que contiene lípidos

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles en la administración de terapias a base de ácido nucleico, por ejemplo complejos de asociación tales como liposomas y lipoplexos.

5 La oportunidad de usar terapias basadas en ácido nucleico es bastante alentadora, ofreciendo soluciones a problemas médicos a los que no podría hacerse frente con las medicinas tradicionales actuales. Se están identificando la ubicación y las secuencias de un número cada vez mayor de genes relacionados con enfermedades, y los ensayos clínicos de compuestos terapéuticos a base de ácido nucleico para una diversidad de enfermedades están ahora en curso.

10 Un método para introducir ácidos nucleicos en una célula es usar mecánicamente microinyección directa. No obstante, este método en general no es eficaz para administración sistémica a un sujeto.

La administración sistémica de compuestos terapéuticos de ácido nucleico requiere distribuir ácido nucleico a las células diana y luego transferir el ácido nucleico a través de una membrana de células diana intacta y en un modo que pueda funcionar terapéuticamente.

15 Los vectores víricos, en algunos casos, se han utilizado clínicamente con éxito para administrar terapias basadas en ácido nucleico. Sin embargo, si bien los vectores víricos tienen la capacidad inherente de transportar ácidos nucleicos por las membranas celulares, pueden conllevar riesgos. Uno de dichos riesgos implica la integración aleatoria de secuencias genéticas víricas en los cromosomas del paciente, dañando potencialmente el genoma y posiblemente induciendo una transformación maligna. Otro riesgo es que el vector vírico puede revertirse a un genotipo patogénico o bien a través de mutación o intercambio genético con un virus de tipo salvaje.

20 Los vectores basados en lípidos también se han usado en terapias de ácido nucleico y se han formulado en una de dos maneras. En un método, el ácido nucleico se introduce en liposomas o lipoplexos preformados hechos de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. Los complejos así formados tienen estructuras indefinidas y complicadas, y la eficiencia de la transfección se reduce intensamente por la presencia de suero. El segundo método implica la formación de complejos de DNA con lípidos mono o poli-catiónicos sin la presencia de un lípido neutro. Estos complejos se preparan en presencia de etanol y no son estables en agua. Además, estos complejos se ven afectados adversamente por el suero (véase, Behr, Acc. Chem. Res. 26:274-78 (1993)).

25 En este contexto, el documento US 2005/0064595 A1 describe composiciones y métodos para silenciar la expresión génica administrando partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden una molécula de siRNA a una célula. A su vez, el documento US 2006/0211642 A1 describe compuestos, composiciones y métodos para modular la expresión del gen del Virus de Hepatitis C usando moléculas de siRNA. Finalmente, el documento WO 2005/026372 A1 describe lípidos que contienen nitrógeno preparados a partir de la adición de conjugado de aminas a acrilatos, acrilamidas u otros dobles enlaces carbono-carbono conjugados a grupos aceptores de electrones, como también métodos para prepararlos.

35 La invención describe nuevos compuestos, complejos de asociación y métodos según lo caracterizado en las reivindicaciones.

## Definiciones

El término "halo" o "halógeno" se refiere a cualquier radical de flúor, cloro, bromo o yodo.

40 El término "alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que puede ser de cadena lineal o ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C1-C36 indica que el grupo puede tener entre 1 y 136 (inclusive) átomos de carbono. El término "haloalquilo" se refiere a un alquilo en el que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan por halo, e incluye restos alquilo en los que todos los hidrógenos han sido reemplazados por halo (p. ej., perfluoroalquilo). Los términos "arilalquilo" o "aralquilo" se refieren a un resto alquilo en el que un átomo de alquilo e hidrógeno se reemplaza por un grupo arilo. Aralquilo incluye grupos en los que más de un átomo de hidrógeno ha sido reemplazado con un grupo arilo. Los ejemplos de "arilalquilo" o "aralquilo" incluyen grupos bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo, 9-fluorenilo, benzhidrido y tritilo.

45 El término "alquilenilo" se refiere a un alquilo divalente, p. ej.,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ .

50 El término "alquenilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene 2-36 átomos de carbono y que tiene uno o más dobles enlaces. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, aunque sin limitarse a ello, grupos alilo, propenilo, 2-butenilo, 3-hexenilo y 3-octenilo. Uno de los carbonos de doble enlace puede opcionalmente ser el punto de sujeción del sustituyente de alquenilo. El término "alquinilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene 2-36 átomos de carbono y se caracteriza por tener uno o más triples

enlaces. Los ejemplos de grupos alquínico incluyen, aunque sin limitarse a ello, etínico, propargilo y 3-hexínico. Uno de los carbonos de triple enlace puede ser opcionalmente el punto de sujeción del sustituyente de alquínico.

5 El término "sustituyentes" se refiere a un grupo "sustituido" en un grupo alquilo, cicloalquilo, alquénico, alquínico, heterocíclico, heterocicloalquénico, cicloalquénico, arilo o heteroarilo en cualquier átomo de ese grupo. Cualquier  
 10 átomo puede sustituirse. Los sustituyentes adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, alquilo (p. ej., alquilo de cadena lineal o ramificada C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12), cicloalquilo, haloalquilo (p. ej., perfluoroalquilo tal como CF<sub>3</sub>), arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, heterocíclico, alquénico, alquínico cicloalquénico, heterocicloalquénico, alcoxi, haloalcoxi (p. ej., perfluoroalcoxi tal como OCF<sub>3</sub>), halo, hidroxilo, carboxilo, carboxilato, ciano, nitro, amino, alquilo, amino, SO<sub>3</sub>H, sulfato, fosfato, metilendioxi (-O-CH<sub>2</sub>-O- en donde los  
 15 oxígenos están unidos a los mismos átomos de carbono (sustitución germinal)), etilendioxi, oxo, tioxi (p. ej., C=S), imino (alquilo, arilo, aralquilo), S(O)<sub>n</sub>alquilo (en donde n es 0-2), S(O)<sub>n</sub> arilo (en donde n es 0-2), S(O)<sub>n</sub> heteroarilo (en donde n es 0-2), S(O)<sub>n</sub> heterocíclico (en donde n es 0-2), amina (mono-, di-, alquilo, cicloalquilo, aralquilo heteroaralquilo, arilo, heteroarilo y sus combinaciones), éster (alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, arilo, heteroarilo), amida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo, arilo, heteroarilo y sus combinaciones), sulfonamida (mono-, di-,  
 20 alquilo, aralquilo, heteroaralquilo y sus combinaciones). En un aspecto, los sustituyentes en un grupo son independientemente cualquiera de los sustituyentes individuales o cualquier subconjunto de los sustituyentes mencionados anteriormente. En otro aspecto, un sustituyente puede por sí mismo sustituirse con uno cualquiera de los sustituyentes antes mencionados.

20 La expresión "isómero estructural", tal como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquiera de dos o más compuestos químicos, tales como alcohol propílico y alcohol isopropílico, que tienen la misma fórmula molecular pero distintas fórmulas estructurales.

25 La expresión "isómero geométrico" o "estereoisómero", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a dos o más compuestos que contienen el mismo número y tipos de átomos, y enlaces (es decir, la conectividad entre átomos es la misma), pero que tienen disposiciones espaciales de los átomos distintas, por ejemplo isómeros cis y trans de un doble enlace, enantiómeros y diastereómeros.

Para comodidad, a continuación se indica el significado de ciertos términos y frases utilizados en la memoria, los ejemplos y las reivindicaciones anejas. Si existe una discrepancia obvia entre el uso de un término en otras partes de la presente memoria y su definición provista en esta sección, prevalecerá la definición de esta sección.

30 "G", "C", "A" y "U" equivalen cada uno a un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. No obstante, se ha de entender que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" puede también referirse a un nucleótido modificado, como se detalla a continuación, o a un resto de reemplazo. El experto en la técnica sabe bien que guanina, citosina, adenina y uracilo pueden reemplazarse con otros restos sin alterar en gran medida las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta dicho resto de reemplazo. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina en su base puede  
 35 aparearse con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. En consecuencia, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina pueden reemplazarse en las secuencias nucleotídicas de la invención con un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden dichos restos de reemplazo son realizaciones de la invención.

40 Tal como se emplea en la presente memoria, "secuencia diana" se refiere a una porción contigua de la secuencia nucleotídica de una molécula de mRNA. formada durante la transcripción del correspondiente gen, incluyendo mRNA que es un producto de procesamiento de RNA de un producto de transcripción primaria. Una región diana es un segmento en un gen diana que es complementario a una porción del agente de RNAi.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "hebra que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que es descrita por la secuencia a la que se hace referencia, usando la nomenclatura de nucleótidos estándar.

50 Tal como se emplea en la presente memoria, y a menos que se indique lo contrario, el término "complementario", cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos de hibridarse y formar una doble estructura bajo determinadas condiciones sin un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto en la técnica. Dichas condiciones pueden, por ejemplo, ser condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50° C o 70° C durante 12-16 horas seguidas de lavado. Pueden aplicarse otras condiciones, tales como las condiciones fisiológicamente relevantes que pueden encontrarse dentro de un organismo. El experto en la técnica podrá determinar el conjunto de condiciones

55 más adecuadas para un ensayo de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la más reciente aplicación de los nucleótidos hibridados.

5 Esto incluye apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos al oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de la primera y la segunda secuencia de nucleótidos. Dichas secuencias pueden denominarse "totalmente complementarias" con respecto unas de las otras en esta memoria. No obstante, si una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia de la presente memoria, las dos secuencias pueden ser totalmente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 o 2 pares de bases incorrectos tras la hibridación, mientras se retiene la capacidad de hibridar bajo las condiciones más relevantes a su aplicación más reciente. No obstante, si dos oligonucleótidos están diseñados para formar, tras la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, dichos salientes no se considerarán apareamientos incorrectos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un agente de oligonucleótidos que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es totalmente complementaria al oligonucleótido más corto, puede incluso denominarse "totalmente complementaria" para los propósitos de la invención.

15 Secuencias "complementarias", tal como se emplean en esta memoria, pueden también incluir, o formarse completamente a partir de pares de bases no Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y modificados, siempre que los requerimientos anteriores con respecto a su capacidad de hibridación se cumplan.

20 Los términos y expresiones "complementario", "totalmente complementario" y "sustancialmente complementario" en la presente memoria se pueden emplear con respecto al apareamiento correcto de bases entre la cadena sentido y la cadena antisentido de un agente de oligonucleótidos, o entre la hebra antisentido de un agente de oligonucleótidos y una secuencia diana, como se entenderá a partir del contexto de su uso.

25 Tal como se emplea en la presente memoria, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a por lo menos parte de" un RNA mensajero (mRNA) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del mRNA de interés. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a por lo menos una parte de un ApoB mRNA si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un mRNA que codifica ApoB.

30 Tal como se emplea en la presente memoria, un "agente de oligonucleótidos" se refiere a un oligómero o polímero monocatenario de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) o ambos o sus modificaciones, que es antisentido con respecto a su diana. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases naturales, azúcares y enlaces de internucleósidos covalentes (cadena principal) como también oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de modo similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos por lo general se prefieren a las formas nativas, debido a sus propiedades convenientes, como por ejemplo mejor absorción celular, mejor afinidad hacia la diana de ácido nucleico y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

35 Los agentes de oligonucleótidos incluyen tanto agentes de oligonucleótidos dirigidos a ácido nucleico (NAT) como agentes de oligonucleótidos dirigidos a proteína (PT). Los agentes de oligonucleótidos NAT y PT se refieren a oligómeros o polímeros monocatenarios de ácido nucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) o ambos, o sus modificaciones. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases naturales, azúcares y enlaces de internucleósidos covalentes (cadena principal) como también oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos por lo general se prefieren a las formas nativas debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo mejor absorción celular, mejor afinidad hacia la diana de ácido nucleico y/o mayor estabilidad en presencia de nucleasas. Los NAT diseñados para unirse a dianas de RNA o DNA específicas tienen complementariedad sustancial, p. ej., por lo menos 70, 80, 90 o 100% de complementariedad, con por lo menos 10, 20 o 30 o más bases de un ácido nucleico diana, e incluyen los RNA antisentido, microRNA, antagomiRs y otras estructuras no dobles que pueden modular expresión. Otros agentes de oligonucleótidos NAT incluyen oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS) (oligozimas), DNazimas y ribozimas. Los agentes de oligonucleótido de NAT pueden dirigir cualquier ácido nucleico, p. ej., un miRNA, un pre-miRNA, un pre-mRNA, un mRNA o un DNA. Estos agentes de oligonucleótido de NAT pueden o no unirse mediante complementariedad de Watson-Crick a sus dianas. Los agentes de oligonucleótido PT se unen a dianas de proteínas, preferiblemente en virtud de interacciones tridimensionales, y modulan la actividad de las proteínas. Incluyen ARN señuelo, aptámeros y similares.

55 Sin desear estar influenciados por la teoría, un agente de oligonucleótido puede actuar mediante una o más de una serie de mecanismos, incluyendo un mecanismo dependiente de escisión o independiente de escisión. Un mecanismo basado en escisión puede ser dependiente de RNase H y/o puede incluir la función del complejo RISC. Los mecanismos independientes de escisión incluyen detención de la traducción en base a la ocupación, tal como aquella mediada por los miRNA, o unión del agente de oligonucleótidos a una proteína, como los aptámeros. Los agentes de oligonucleótido también se pueden utilizar para alterar la expresión de genes cambiando la elección del sitio de empalme en un pre-mRNA. La inhibición del empalme también puede resultar en degradación del mensaje incorrectamente procesado, reduciendo de este modo la expresión génica.

La expresión "RNA" o "dsRNA" bicatenario, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tienen una doble estructura que comprende dos cadenas de ácido nucleico anti-paralelas y sustancialmente complementarias como se definió anteriormente. Las dos cadenas que forman la doble estructura pueden ser porciones distintas de una molécula de RNA más grande, o pueden ser moléculas de RNA separadas. Si son moléculas de RNA separadas, dichos dsRNA por lo general se denominan en la bibliografía siRNA ("RNA de interferencia corta"). Si las dos cadenas son parte de una molécula más grande, y por ende están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma la doble estructura, la cadena de RNA conectora se denomina "horquilla", "RNA de horquilla corta" o "shRNA". Si las dos cadenas están conectadas covalentemente de un modo que no sea una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma la doble estructura, la estructura conectora se denomina "enlazador". Las cadenas de RNA pueden tener el mismo número de nucleótidos o un número distinto. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la cadena más corta del dsRNA menos cualquier saliente presente en la doble estructura. Además de la doble estructura, un dsRNA puede comprender uno o más salientes de nucleótidos. A su vez, como se usa en esta memoria, "dsRNA" puede incluir modificaciones químicas a ribonucleótidos, incluyendo modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos e incluyendo todos los tipos de modificaciones descritos en este documento o conocidos en la técnica. Cualquiera de dichas modificaciones, tal como se usa en una molécula de tipo siRNA, están abarcadas dentro de "dsRNA" para los fines de la presente memoria y las reivindicaciones.

Tal como se emplea en la presente memoria, un "saliente de nucleótido" se refiere al nucleótido o nucleótidos no apareados que sobresalen de la doble estructura de un dsRNA cuando un extremo 3' de una cadena del dsRNA se extiende más allá del extremo 5'-de la otra cadena, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos no apareados al final del dsRNA, es decir, no hay ningún saliente de nucleótidos. Un dsRNA de "extremo romo" es un dsRNA de cadena doble en toda su longitud, es decir, no hay salientes de nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. Por motivos de claridad, los restos químicos no nucleotídicos conjugados al extremo 3' o 5' de un siRNA no se consideran al determinar si un siRNA posee un saliente o un extremo romo.

La expresión "cadena antisentido" se refiere a la cadena de un dsRNA que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "región de complementariedad" se refiere a la región en la cadena antisentido sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, como se define en la presente memoria. Si la región de complementariedad no es totalmente complementaria a la secuencia diana, los apareamientos incorrectos se toleran más en las regiones terminales y, si están presentes, en general están en una región o regiones terminales, p. ej., dentro de 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del término 5' y/o 3'.

La expresión "cadena sentido", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la cadena de un dsRNA que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la cadena antisentido.

El término "silenciar" y la expresión "inhibir la expresión de", siempre que se refieran a un gen diana, se refieren en este documento a la supresión por lo menos parcial de la expresión del gen, según lo manifestado por una reducción de la cantidad de mRNA transcrito desde el gen libre que puede aislarse de una primera célula o grupo de células en donde se transcribe el gen y que ha sido o han sido tratadas tal como se inhibe la expresión del gen, según lo comparado con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células que ha sido o han sido tratadas pero que no ha sido o no han sido así tratadas (células control).

El grado de inhibición usualmente se expresa en términos de

$$\frac{(\text{mRNA en células control}) - (\text{mRNA en células tratadas})}{(\text{mRNA en células control})} \cdot 100\%$$

Alternativamente, el grado de inhibición puede darse en términos de una reducción de un parámetro funcionalmente unido a la transcripción de genes, p. ej., cantidad de proteína codificada por el gen que es segregada por una célula, o número de células que exhiben un cierto fenotipo, p. ej., apoptosis. En principio, el silenciamiento de genes puede determinarse en cualquier célula que exprese la diana, o bien constitutivamente o por ingeniería genómica, y por cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia para determinar si un determinado dsRNA inhibe la expresión del gen por un cierto grado y en consecuencia está abarcado por la presente invención, el ensayo provisto en los Ejemplos a continuación sirve como dicha referencia.

Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión del gen se suprime en por lo menos aproximadamente 20%, 25%, 35% o 50% por administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En alguna realización, el gen se suprime en por lo menos aproximadamente 60%, 70% u 80% por administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En algunas realizaciones, el gen se suprime en por lo menos aproximadamente 85%, 90% o 95% por administración del oligonucleótido de doble cadena de la invención.

Tal como se emplean en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y similares, se refieren al alivio de procesos patológicos que pueden ser mediados por la reducción de un gen particular. En el contexto de la presente

invención en la medida que se haga referencia a cualquiera de las afecciones mencionadas a continuación (que no sean procesos patológicos que puedan estar mediados por la reducción del gen), los términos "tratar", "tratamiento" y similares significan aliviar o mejorar por lo menos un síntoma asociado con dicha afección, o demorar o revertir el avance de dicha afección.

5 Tal como se emplean en la presente memoria, las frases "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz" se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, la prevención o el manejo de procesos patológicos que pueden ser mediados por la reducción del gen, o síntomas manifiestos de procesos patológicos que pueden ser mediados por una reducción del gen. La cantidad específica terapéuticamente eficaz puede determinarla fácilmente un médico con experiencia ordinaria, y puede variar  
10 dependiendo de factores conocidos en la técnica, como por ejemplo el tipo de procesos patológicos que pueden ser mediados por una reducción del gen, los antecedentes y la edad del paciente, el estado de los procesos patológicos que pueden ser mediados por la reducción de la expresión del gen, y la administración de otros procesos anti-patológicos que pueden estar mediados por la reducción de la expresión del gen. Una cantidad eficaz, en el contexto de tratar a un sujeto, es suficiente para producir un beneficio terapéutico. La expresión

15 "beneficio terapéutico", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier cosa que promueve o potencia el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de la enfermedad de proliferación celular del sujeto. Una lista de ejemplos no exhaustivos de esto incluye la extensión de la vida de los pacientes por cualquier periodo de tiempo, disminución o demora en el desarrollo neoplásico de la enfermedad; reducción de hiperproliferación; reducción del crecimiento del tumor; demora de metástasis; reducción de la velocidad de  
20 proliferación de una célula cancerosa, célula tumoral o cualquier otra célula hiperproliferativa; inducción de apoptosis en cualquier célula tratada o en cualquier célula afectada por una célula tratada y/o una disminución del dolor en el sujeto que puede atribuirse a la afección del paciente.

Tal como se emplea en esta memoria, una "composición farmacéutica" comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un agente de oligonucleótidos y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como  
25 se emplea en la presente memoria, "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de un RNA eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo que se tiene como fin. Por ejemplo, si un tratamiento clínico determinado se considera eficaz cuando hay por lo menos una reducción del 25% en un parámetro mensurable asociado con la enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar una reducción de por lo menos 25% en ese parámetro.  
30

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para administración de un agente terapéutico. Dichos vehículos incluyen, aunque sin limitarse a ello, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y sus combinaciones, y se describen en más detalle a continuación. El término excluye específicamente medio de cultivo celular.

35 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, rasgos y ventajas de la invención serán obvias a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Las figuras muestran:

La Fig 1 representa un gráfico de barras que compara la eficacia de diversas composiciones de ND98.

40 La Fig. 2 representa un gráfico de barras que compara la eficacia de diversas composiciones de ND98.

La Fig. 3 representa un gráfico de barras que demuestra la eficacia de un isómero de 6 extremos de ND98.

La Fig. 4 representa un gráfico de barras que compara la eficacia de complejos de asociación preparados usando dos procedimientos diferentes.

45 La Fig. 5 representa diversos restos de lípidos de PEG, incluyendo aquellos que tienen diversas longitudes de cadena.

La Fig. 6 representa un gráfico de barras que compara la eficacia de los complejos de asociación.

La Fig. 7 representa un gráfico de barras que compara la tolerabilidad de diversos complejos a medida que se reduce la relación de lípido a siRNA.

La Fig. 8 es un diagrama de un proceso para elaborar un complejo de asociación cargado con ácido nucleico.

50 La Fig. 9 son gráficos de barras que representan la eficacia de los siRNA con dos dianas, FVII y ApoB.

La Fig. 10 es un diagrama de un proceso para elaborar un complejo de asociación con ácido nucleico.

La Fig. 11 es un gráfico de barras que representa el efecto del tamaño de partícula de complejos de asociación sobre la eficacia de un ácido nucleico en un ensayo de silenciamiento.

Las Fig. 12a y 12b son gráficos de barras que comparan la semivida en suero de compuestos terapéuticos de ácido nucleico en formas no formuladas y formuladas.

- 5 La Fig. 13 es un gráfico de barras que compara la eficacia de complejos de asociación que tienen lípidos de PEG con variadas longitudes de cadena.

Las preparaciones de lípidos y los sistemas de administración útiles para administrar terapias a base de ácido nucleico tales como siRNA se describen en esta memoria.

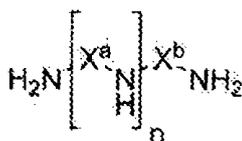
Compuestos de lípidos catiónicos y preparaciones de lípidos

- 10 Preparaciones de lípidos de poliamina

Los solicitantes han descubierto que ciertos restos de lípidos de poliamina proporcionan propiedades deseables para administración de ácidos nucleicos, tales como siRNA. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de lípido forma complejo con un siRNA que dirige el Factor VII y se administra a un animal tal como un ratón. El nivel de Factor VII segregado en el suero se cuantifica luego (24 h después de la administración), en donde el grado de silenciamiento del Factor VII indica el grado de administración de siRNA *in vivo*. Por consiguiente, se prefieren los lípidos que proveen mejor administración *in vivo* de un ácido nucleico tal como siRNA. En particular, los solicitantes han descubierto que las poliaminas que tienen las sustituciones descritas en este documento pueden tener propiedades convenientes para administrar siRNA, como biodisponibilidad, biodegradabilidad y tolerabilidad.

En una realización, una preparación de lípidos incluye un resto de poliamina que tiene una pluralidad de sustituyentes, tal como sustituyentes de acrilamida o acrilato unidos.

Por ejemplo, un resto de lípidos puede incluir un resto de poliamina como se da a conocer a continuación,

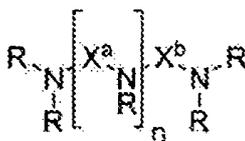


en donde uno o más de los átomos de hidrógeno están sustituidos, por ejemplo con un sustituyente incluyendo en la cadena un resto alquilo, alquenilo o alquinilo, que en algunas realizaciones está además sustituido.  $X^a$  y  $X^b$  son restos alquilenos. En algunas realizaciones,  $X^a$  y  $X^b$  tienen la misma longitud de cadena, por ejemplo  $X^a$  y  $X^b$  son ambos restos etileno. En otras realizaciones  $X^a$  y  $X^b$  tienen diferentes longitudes de cadena. En algunas realizaciones, si la poliamina incluye una pluralidad de restos  $X^a$ ,  $X^a$  puede variar con uno o más casos. Por ejemplo, si la poliamina es espermina,  $X^a$  en un caso es propileno,  $X^a$  en otro caso es butileno y  $X^b$  es propileno.

Los solicitantes han descubierto que en algunos casos es conveniente tener un grado relativamente alto de sustitución en la poliamina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los solicitantes han descubierto que las preparaciones de poliamina en las que por lo menos 80% (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99%, o sustancialmente todas) de las poliaminas en la preparación tienen por lo menos  $n + 2$  de los hidrógenos sustituidos con un sustituyente, proporcionan propiedades deseables, por ejemplo para uso en la administración de un ácido nucleico tal como siRNA.

En algunos casos, es conveniente (preferiblemente) tener uno o más heteroátomos presentes en el sustituyente en el nitrógeno de poliamina.

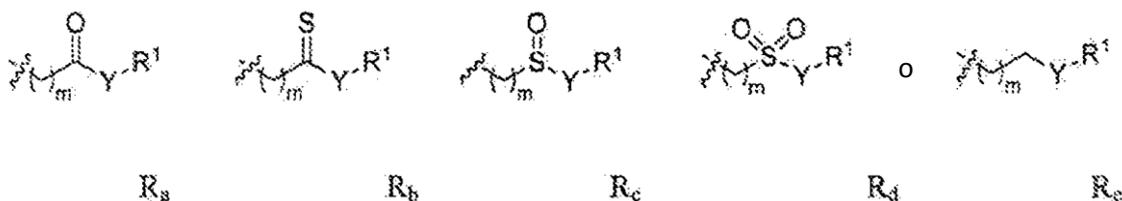
En algunas realizaciones, una preparación comprende un compuesto de fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable.



40

fórmula (I)

cada  $X^a$  y  $X^b$ , en cada caso, es independientemente alquilenos  $C_{1-6}$ ;  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; cada R es independientemente H,

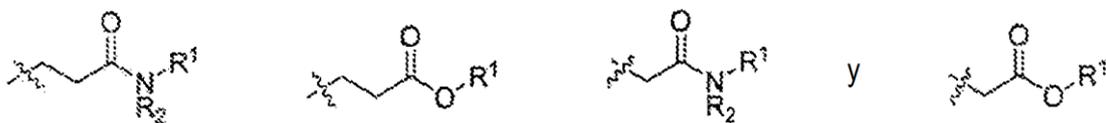


5 en donde por lo menos  $n + 2$  de los restos R en por lo menos aproximadamente 80% de las moléculas del compuesto de fórmula (I) en la preparación no son H; m es 1, 2, 3 o 4; Y es O,  $\text{NR}^2$ , o S;  $\text{R}^1$  es alquilo, alquenilo o alquinilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; y  $\text{R}^2$  es H, alquilo, alquenilo o alquinilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido; siempre que si  $n = 0$ , entonces por lo menos  $n + 3$  de los restos R no son H.

10 Como se observó anteriormente, la preparación incluye moléculas que contiene derivados de poliamina tanto asimétricos como simétricos. Por consiguiente;  $\text{X}^a$  es independiente en cada caso y  $\text{X}^b$  es independiente de  $\text{X}^a$ . Por ejemplo, si n es 2,  $\text{X}^a$  puede o bien ser igual en cada caso o puede ser distinto en cada caso o puede ser igual en algunos casos y distinto en otros casos.  $\text{X}^b$  es independiente de  $\text{X}^a$  más allá del número de casos de  $\text{X}^a$  en cada derivado de poliamina.  $\text{X}^a$ , en cada caso es independiente de  $\text{X}^b$ , puede ser metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno o hexileno. Los derivados de poliamina ilustrativos incluyen aquellas poliaminas derivadas de  $\text{N}^1, \text{N}^{1'}$ -  
 15 (etano-1,2-diil)dietano-1,2-diamina, etano-1,2-diamina, propano-1,3-diamina, espermina, espermidina, putrecina y  $\text{N}^1$ -(2-Aminoetil)-propano-1,3-diamina. Los derivados de poliamina preferidos incluyen propano-1,3-diamina y  $\text{N}^1, \text{N}^{1'}$ -  
 (etano-i,2-diil)dietano-1,2-diamina.

20 La poliamina de fórmula (I) está sustituida con por lo menos  $n+2$  restos R que no son H. En general, cada resto R no hidrógeno incluye un resto alquilo, alquenilo o alquinilo, que está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, unidos a un nitrógeno del derivado de poliamina mediante un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen amidas, ésteres, tioésteres, sulfonas, sulfóxidos, éteres, aminas y tioéteres. En muchos casos, el resto enlazador está unido al nitrógeno de la poliamina mediante un resto alquileno (p. ej., metileno, etileno, propileno o butileno). Por ejemplo, un enlazador de amida o éster está unido al nitrógeno de la poliamina a través de un resto metileno o etileno.

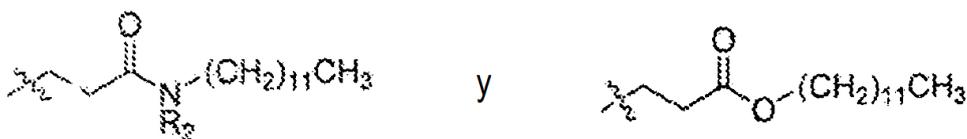
Los ejemplos de sustituyentes de amina preferidos se dan a conocer a continuación:



25 En casos en los que la amina está unida a la porción  $\text{R}^1$  mediante un grupo etileno, se puede someter a reacción un acrilato o una acrilamida precursora conjugada a 1,4 con la poliamina para proporcionar la poliamina sustituida. En casos en los que la amina está unida a la porción  $\text{R}^1$  mediante un grupo etileno, se puede someter a reacción una amina o éster, incluyendo un sustituyente alfa-halo, tal como un resto alfa-cloro, con la poliamina para proporcionar la poliamina sustituida. En realizaciones preferidas,  $\text{R}^2$  es H.

30 Los restos R que no son H requieren todos un resto  $\text{R}^1$  como se dio a conocer más arriba. En general, el resto  $\text{R}^1$  es un resto de cadena larga, tal como alquilo  $\text{C}_6\text{-C}_{32}$ , alquenilo  $\text{C}_6\text{-C}_{32}$  o alquinilo  $\text{C}_6\text{-C}_{32}$ .

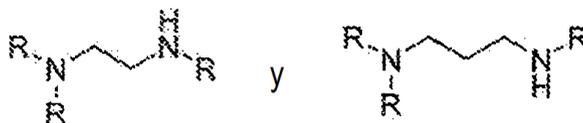
En algunas realizaciones preferidas,  $\text{R}^1$  es un resto alquilo. Por ejemplo  $\text{R}^1$  es alquilo  $\text{C}_{10}\text{-C}_{18}$ , tal como alquilo  $\text{C}_{12}$ . Los ejemplos de restos R especialmente preferidos se dan a conocer a continuación.



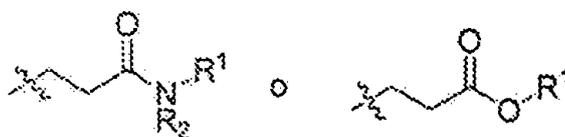
35 Las preparaciones que incluyen un compuesto de fórmula (I) pueden ser mezclas de una pluralidad de compuestos de fórmula (I). Por ejemplo, la preparación puede incluir una mezcla de compuestos de fórmula (I) que tienen grados variables de sustitución en el resto de poliamina; no obstante, las preparaciones descritas en este documento se seleccionan de modo tal que por lo menos  $n + 2$  de los restos R en por lo menos aproximadamente 80% (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo

menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99%, o sustancialmente todas) de las moléculas del compuesto de fórmula (I) en la preparación no son H.

5 En algunas realizaciones, una preparación incluye un resto de poliamina que tiene dos grupos amino en los que en por lo menos 80% (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% o sustancialmente todas) de las moléculas de fórmula (I) en la mezcla están sustituidas con tres restos R que no son H. Los compuestos ilustrativos de Fórmula (I) se dan a conocer a continuación.



En algunas realizaciones preferidas R es

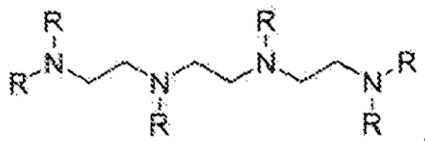


10

En algunas realizaciones preferidas, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> o alqueno C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>.

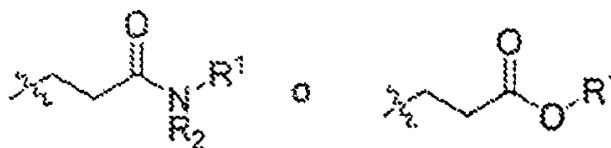
15 En algunas realizaciones, una preparación incluye un resto de poliamina que tiene tres o cuatro (p. ej., cuatro) grupos amino en los que por lo menos n + 2 de los restos R en por lo menos aproximadamente 80% (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%; por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 91%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% o sustancialmente todas) de las moléculas de fórmula (I) no son H. Los compuestos ilustrativos de fórmula (I) que tienen 4 restos de amino se dan a conocer a continuación.

Los ejemplos de restos de poliamina en los que todos los restos R (es decir, n+4) no son H se dan a conocer a continuación;



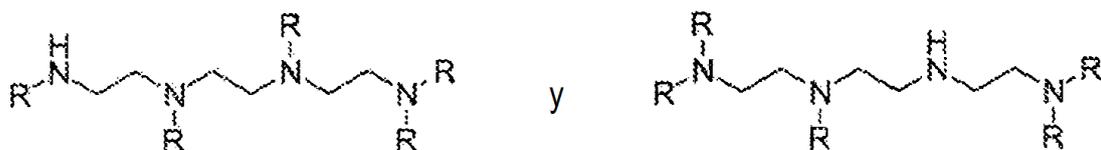
20

En algunas realizaciones R es

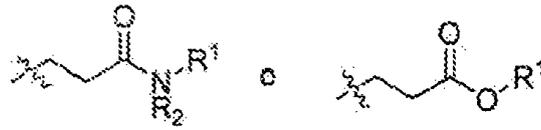


En algunas realizaciones preferidas, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> (p. ej., alquilo C<sub>12</sub>), o alqueno C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>.

25 Los ejemplos de restos de poliamina en los que cinco restos R (es decir, n+3) no son H se dan a conocer a continuación;

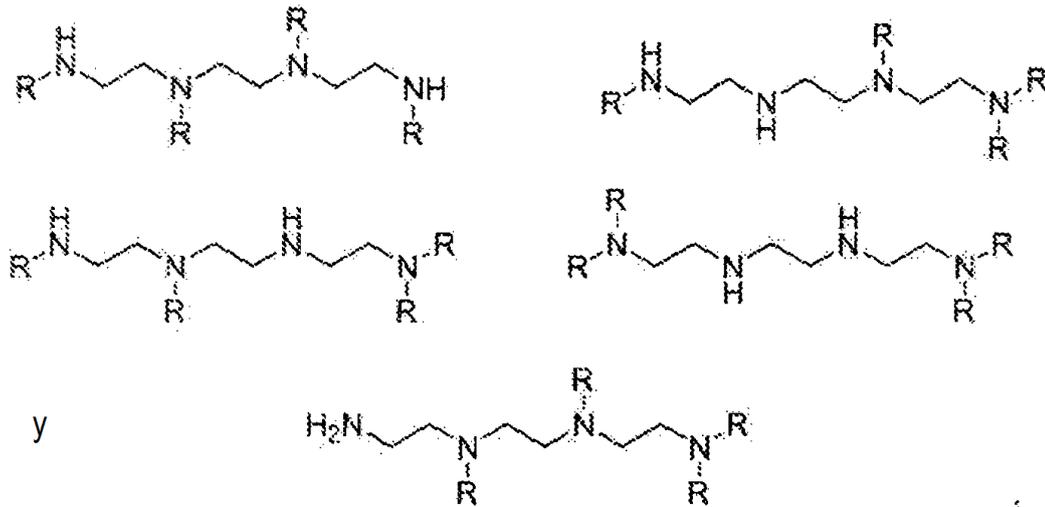


En algunas realizaciones preferidas, R es



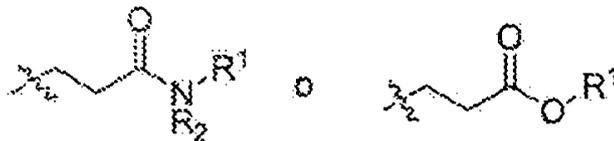
En algunas realizaciones preferidas, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> (p. ej., alquilo C<sub>12</sub>), o alqueniilo C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>.

Los ejemplos de restos de poliamina en los que cuatro restos R (es decir, n + 2) no son H se dan a conocer a continuación:



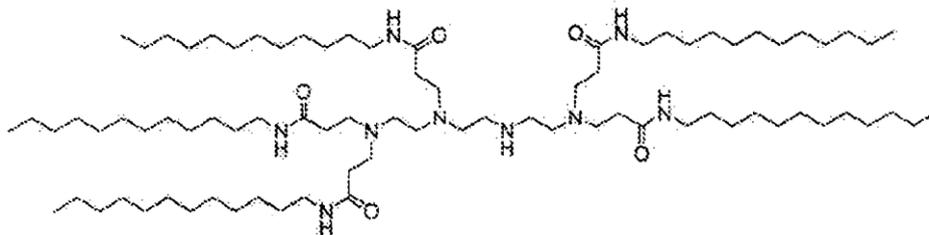
5

En algunas realizaciones preferidas R es

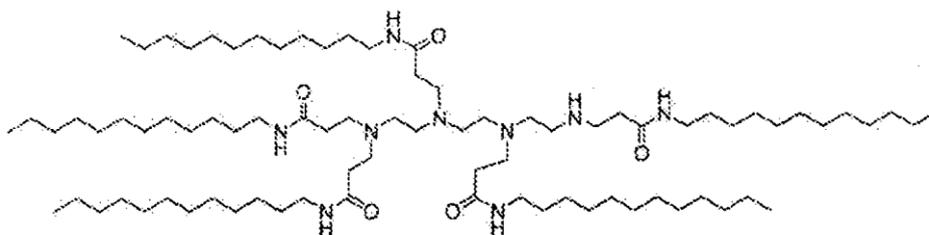


En algunas realizaciones preferidas, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> (p. ej., alquilo C<sub>12</sub>), o alqueniilo C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>.

10 En algunas realizaciones preferidas, la poliamina es un compuesto del isómero (1) o (2) a continuación, preferiblemente un compuesto del isómero (1)



isómero (1)



isómero (2)

En algunas realizaciones, la preparación que incluye un compuesto de fórmula (I) incluye una mezcla de moléculas que tienen la fórmula (I). Por ejemplo, la mezcla puede incluir moléculas que tienen el mismo núcleo de poliamina pero diferentes sustituyentes de R, tal como diferentes grados de sustituyentes de R que no son H.

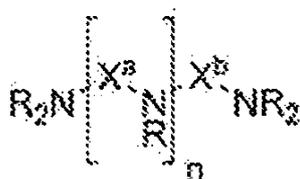
5 En algunas realizaciones, una preparación descrita en esta memoria incluye un compuesto de fórmula (I) que tiene un único núcleo de poliamina en el que cada R del núcleo de poliamina es o bien R o un resto individual tal como



10 La preparación incluye por lo tanto una mezcla de moléculas que tienen la fórmula (I), en donde la mezcla está comprendida o bien por compuestos de poliamina de fórmula (I) que tienen un número variado de R, restos que son H y/o compuestos de poliamina de fórmula (I) que tienen un solo número determinado de restos R que no son H en donde los compuestos de fórmula (I) son isómeros estructurales de la poliamina tales como los isómeros estructurales provistos anteriormente.

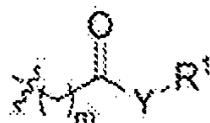
15 En algunas realizaciones preferidas, la preparación incluye moléculas de fórmula (I) tales como por lo menos 80% (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% o sustancialmente todas) de las moléculas consisten en un isómero estructural sencillo.

20 En algunas realizaciones, la preparación incluye una mezcla de dos o más compuestos de fórmula (I). En algunas realizaciones, la preparación es una mezcla de isómeros estructurales de la misma fórmula química. En algunas realizaciones, la preparación es una mezcla de compuestos de fórmula (I) en donde los compuestos varían en su naturaleza química de los sustituyentes de R. Por ejemplo, la preparación puede incluir una mezcla de los siguientes compuestos:

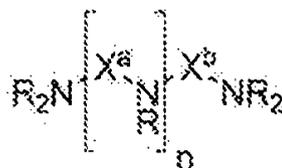


fórmula (I)

en donde n es 0 y cada R es independientemente H o

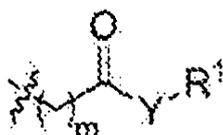


25 y



fórmula (I)

en donde n es 2 y cada R es independientemente H o



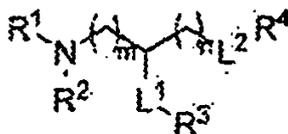
En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) está en la forma de una sal, tal como una sal farmacéuticamente aceptable. Una sal, por ejemplo, puede formarse entre un anión y un sustituyente positivamente cargado (p. ej., amino) en un compuesto descrito en este documento. Los aniones adecuados incluyen flúor, cloro, bromo, yodo, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, citrato, metanosulfonato, trifluoroacetato, acetato, fumarato, oleato, valerato, maleato, oxalato, isonicotinato, lactato, salicilato, tartrato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, gentsinato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluensulfonato y pamoato. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto de fórmula (I) es una sal de hidroháluro, tal como una sal de hidrocloreuro.

Los compuestos de fórmula (I) pueden también estar presentes en la forma de hidratos (p. ej., (H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>) y solvatos, que se incluyen en esta descripción.

#### Lípidos catiónicos bioescindibles

Los solicitantes han descubierto que ciertos lípidos catiónicos que incluyen uno o más restos bioescindibles pueden usarse como componentes en un complejo de asociación, tal como un liposoma, para la administración de terapias de ácido nucleico (p. ej., dsRNA). Por ejemplo, se describen en la presente invención lípidos catiónicos que se someten a escisión *in vivo*, por ejemplo, mediante una enzima tal como una esterasa, una amidasa o una enzima de escisión de disulfuro. En algunos casos, el lípido se escinde químicamente, por ejemplo mediante hidrólisis de un resto lábil tal como un acetal o cetal. En algunas realizaciones, el lípido incluye un resto que se hidroliza *in vitro* y luego se somete a escisión enzimática a través de una o más de una esterasa, amidasa o enzima de escisión de disulfuro. Esto puede ocurrir en compartimientos vesiculares de la célula tales como endosomas. Otro enlace de escisión sensible a ácidos es el enlace β-tiopropionato que se escinde en el entorno ácido de endosomas (Jeong et al. Bioconjugate chem. 2003, 4, 1426).

Un compuesto ilustrativo puede ser un compuesto de fórmula (X) o su sal farmacéuticamente aceptable, en donde



fórmula (X)

en donde

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con 1-4 R<sup>5</sup>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con 1-4 R<sup>5</sup> o C(NR<sup>6</sup>)(NR<sup>6</sup>)<sub>2</sub>;

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno independientemente alquilo, alquenilo, alquínilo, cada uno opcionalmente sustituido con fluoro, cloro, bromo o yodo;

L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son cada uno independientemente -NR<sup>6</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>6</sup>-, -OC(O)-, -C(O)O-, -S-S-, -N(R<sup>6</sup>)C(O)N(R<sup>6</sup>)-, OC(O)N(R<sup>6</sup>)-, -N(R<sup>6</sup>)C(O)O-, -O-N=O-, OR-OC(O)NH; o L<sup>1</sup>-R<sup>3</sup> y L<sup>2</sup>-R<sup>4</sup> pueden tomarse juntos para formar un acetal o un cetal;

R<sup>5</sup> es fluoro, cloro, bromo, yodo, -OR<sup>7</sup>, -N(R<sup>8</sup>)(R<sup>9</sup>), -CN, SR<sup>10</sup>, S(O)R<sup>10</sup>, S(O)<sub>2</sub>R<sup>10</sup>

R<sup>5</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

R<sup>7</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

cada R<sup>5</sup> y R<sup>9</sup> son independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sup>10</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

n es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es H, un alquilo inferior tal como metilo, etilo, propilo o isopropilo, o un alquilo sustituido tal como 2-hidroxietilo.

En algunas realizaciones, R<sup>2</sup> es H o un alquilo inferior, tal como metilo, etilo, propilo o isopropilo.

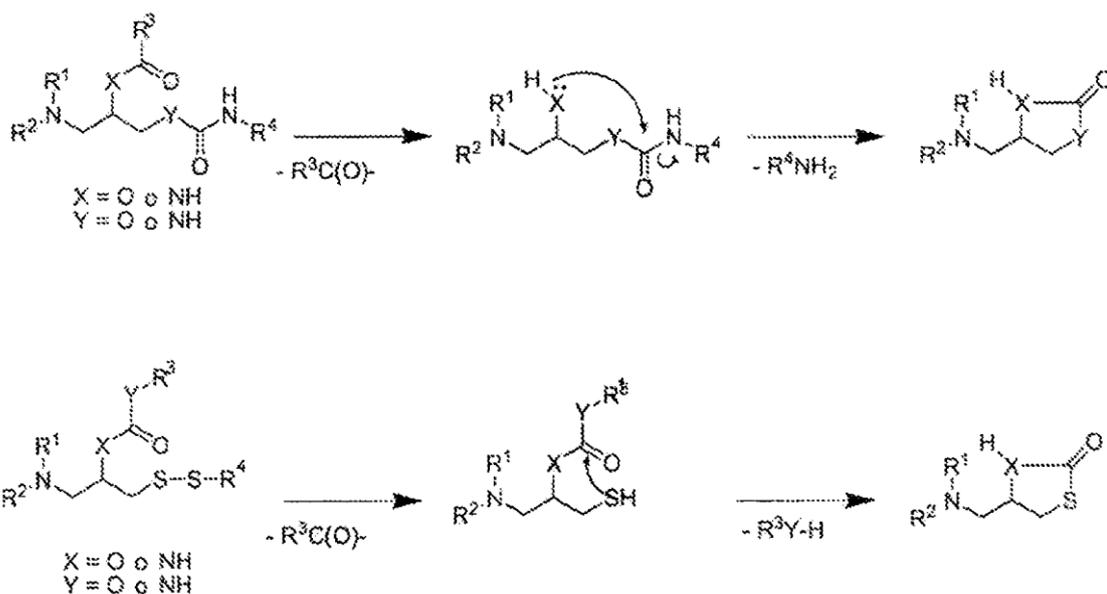
En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> forman un resto guanadina con el nitrógeno de fórmula (X).

5  $L^1-R^3$  y  $L^2-R^4$ , o la combinación de ambos, proporcionan por lo menos un resto que se escinde *in vivo*. En algunas realizaciones, tanto  $L^1-R^3$  como  $L^2-R^4$  son bioescindibles. Por ejemplo, tanto  $L^1-R^3$  como  $L^2-R^4$  se someten independientemente a escisión enzimática (p. ej., mediante una esterasa, amidasa o enzima de escisión de disulfuro). En algunas realizaciones, tanto  $L^1$  como  $L^2$  son el mismo resto químico, tal como un éster, amida o disulfuro. En otros casos,  $L^1$  y  $L^2$  son diferentes, por ejemplo, uno de  $L^1$  o  $L^2$  es un éster, y el otro de  $L^1$  o  $L^2$  es un disulfuro.

En algunas realizaciones,  $L^1-R^3$  y  $L^2-R^4$  juntos forman un resto acetal o cetal, que se hidroliza *in vivo*.

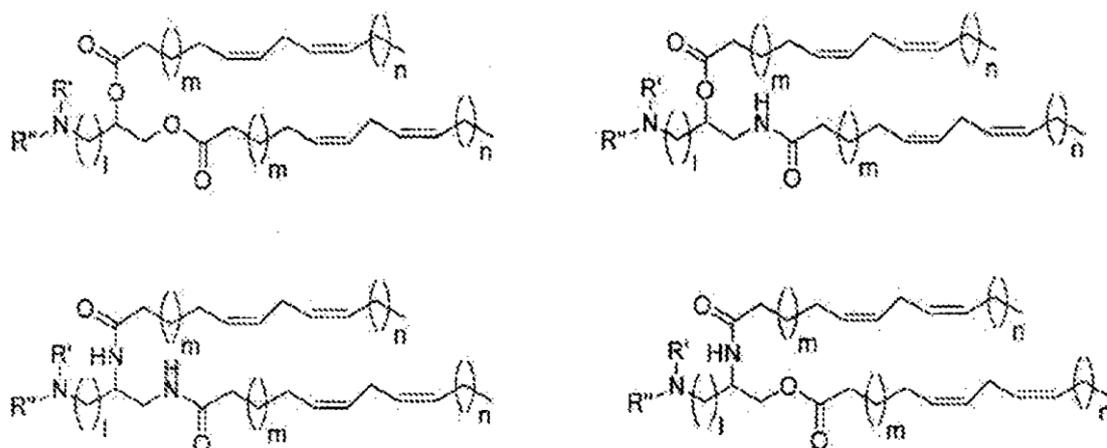
En algunas realizaciones, uno de  $L^1-R^3$  o  $L^2-R^4$  se somete a escisión enzimática.

10 Por ejemplo, uno de  $L^1-R^3$  o  $L^2-R^4$  se escinde *in vivo*, proporcionando un resto hidroxilo libre o la amina libre en el lípido, que se torna disponible para reaccionar químicamente con el resto  $L^1-R^3$  o  $L^2-R^4$  remanente. Las realizaciones ilustrativas se dan a conocer a continuación:



15 En algunas realizaciones, se incluye un resto carbamato o urea en combinación con un resto amida, éter o disulfuro. Por ejemplo, el lípido 3 incluye un resto éster, que tras la escisión (p. ej., escisión enzimática) se torna disponible para reaccionar químicamente con el resto carbamato o urea. Algunas combinaciones preferidas de  $L^1$  y  $L^2$  incluyen dos amidas, dos ésteres, una amida y un éster, dos disulfuros, una amida y un disulfuro, un éster y un disulfuro, un carbamato y un disulfuro, y una urea y un disulfuro. A continuación se dan a conocer compuestos ilustrativos:

Enlaces de amida y éster con configuración Z (dos dobles enlaces)



20  $R^1 = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R^2 = H$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

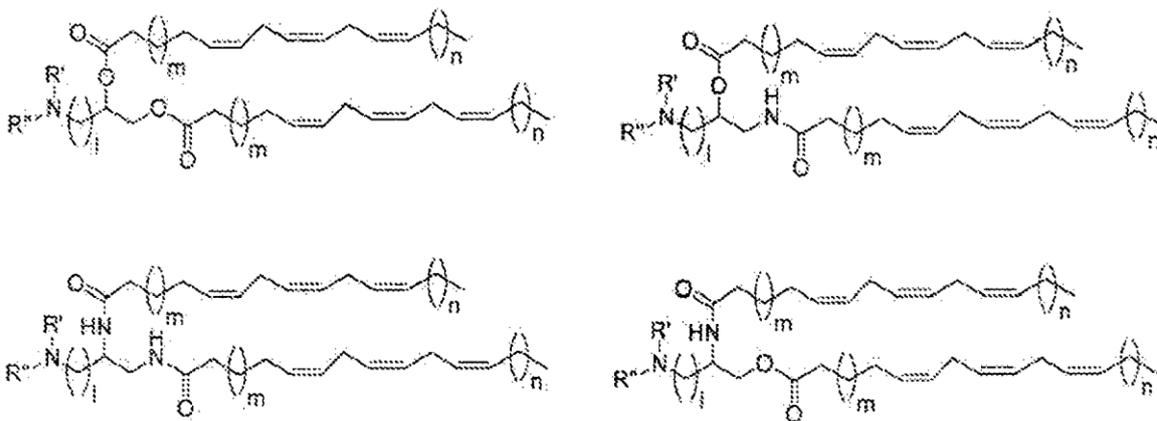
$R^1 = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R^2 = Me$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

Enlace éster de amida con configuración Z (tres dobles enlaces)



5

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R<sup>0</sup> = H; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

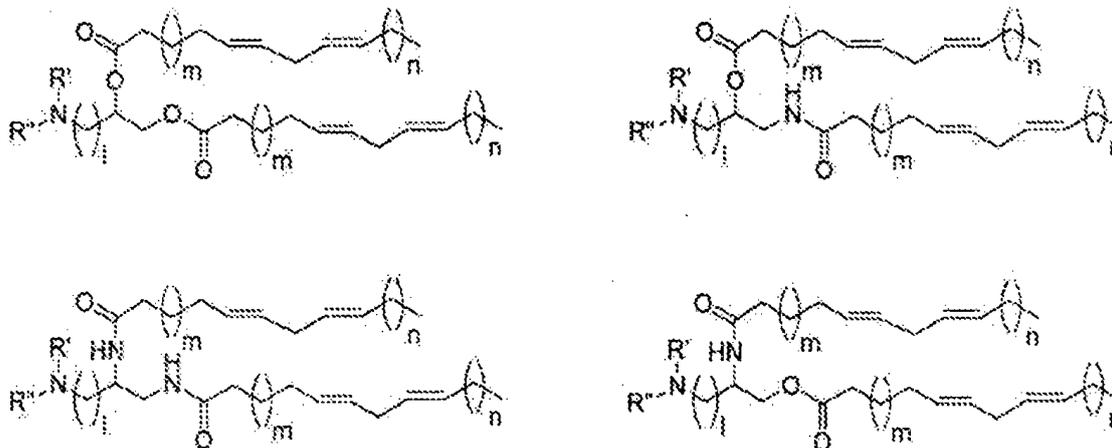
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R<sup>0</sup> = Me; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R<sup>0</sup> = Et; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R<sup>0</sup> = propilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

10 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R<sup>0</sup> = isopropilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

Amidas y enlaces de éster con configuración E (dos dobles enlaces)



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

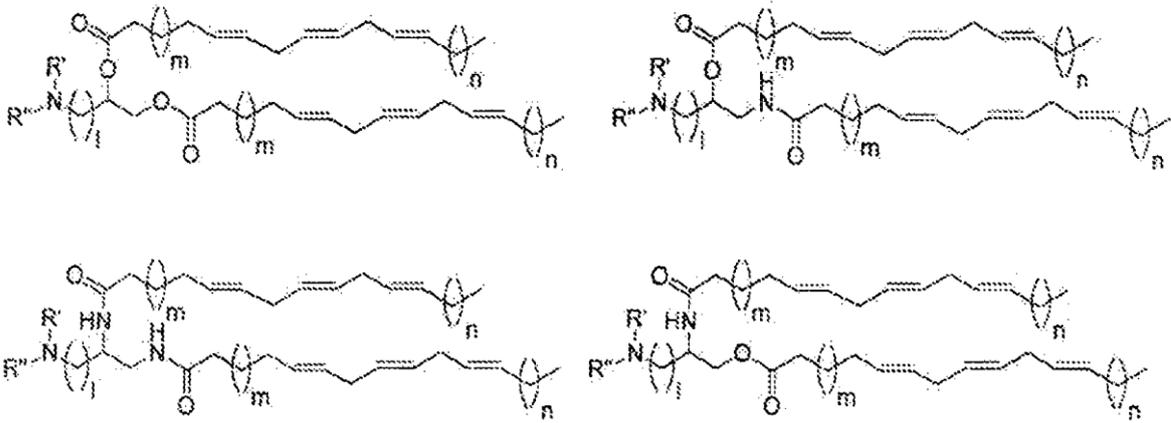
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

15 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

Amidas y enlaces de éster con configuración E (tres dobles enlaces)



$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = H$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

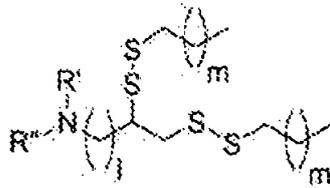
$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = Me$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = Et$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

5  $R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = \text{propilo}$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = \text{isopropilo}$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 1\text{-}8, n = 1\text{-}10$

Enlaces disulfuro



$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = H$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 6\text{-}28$

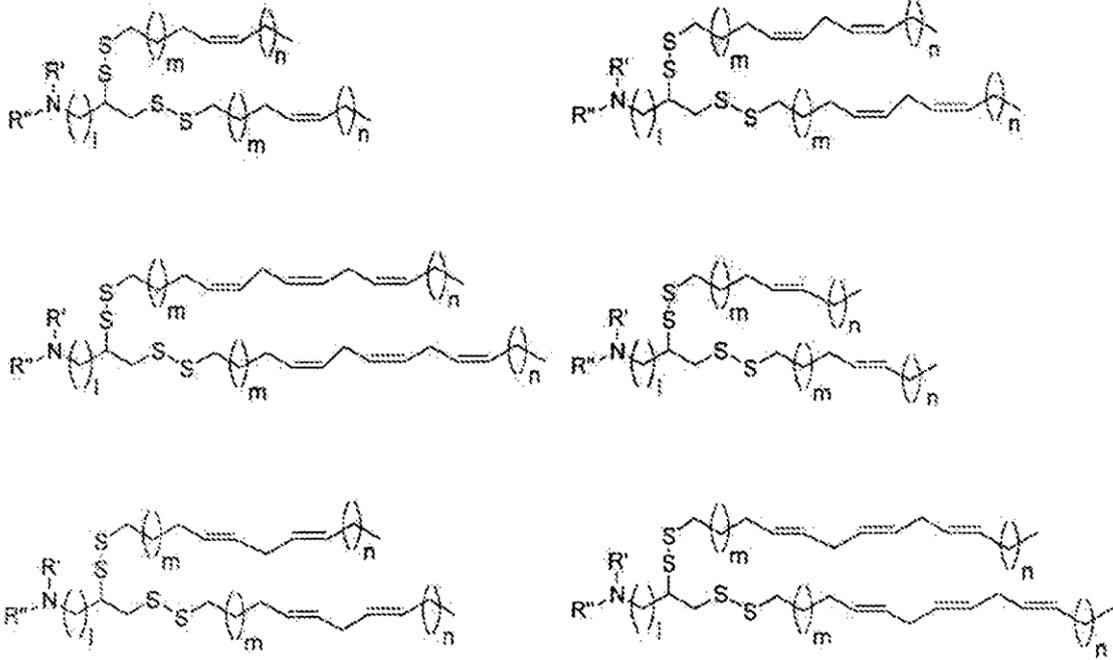
10  $R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = Me$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 6\text{-}28$

$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = Et$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 6\text{-}28$

$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = \text{propilo}$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 6\text{-}28$

$R' = H, Me, Et, \text{propilo, isopropilo o } 2\text{-hidroxietilo}$  y  $R'' = \text{isopropilo}$ ;  $l = 1 \text{ a } 6, m = 6\text{-}28$

Enlaces disulfuro con cadenas de alquilo insaturadas, configuraciones E y Z



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

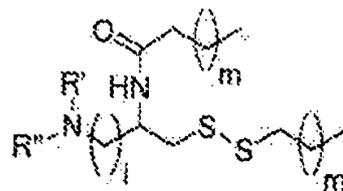
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

5 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

Enlaces de amida y disulfuro con cadenas de alquilo saturadas e insaturadas



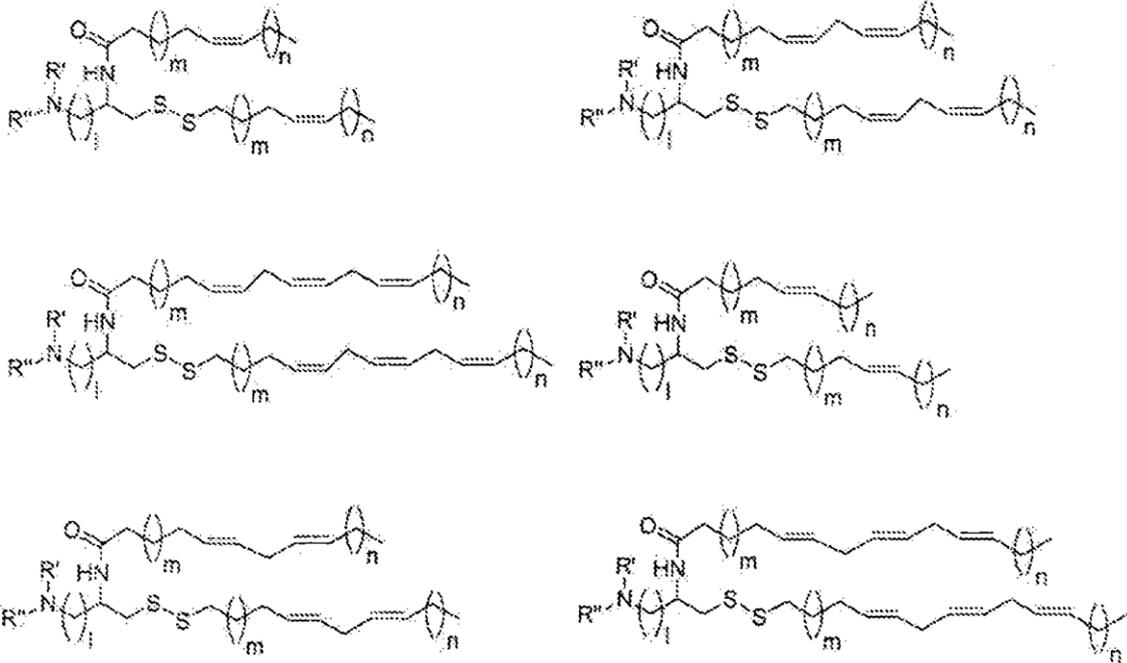
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 6-28

10 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 6-28



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

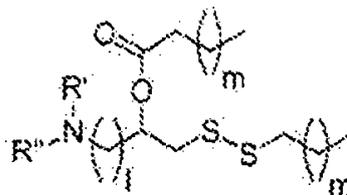
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

5 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

Enlaces de éster y disulfuro con cadenas de alquilo saturadas e insaturadas



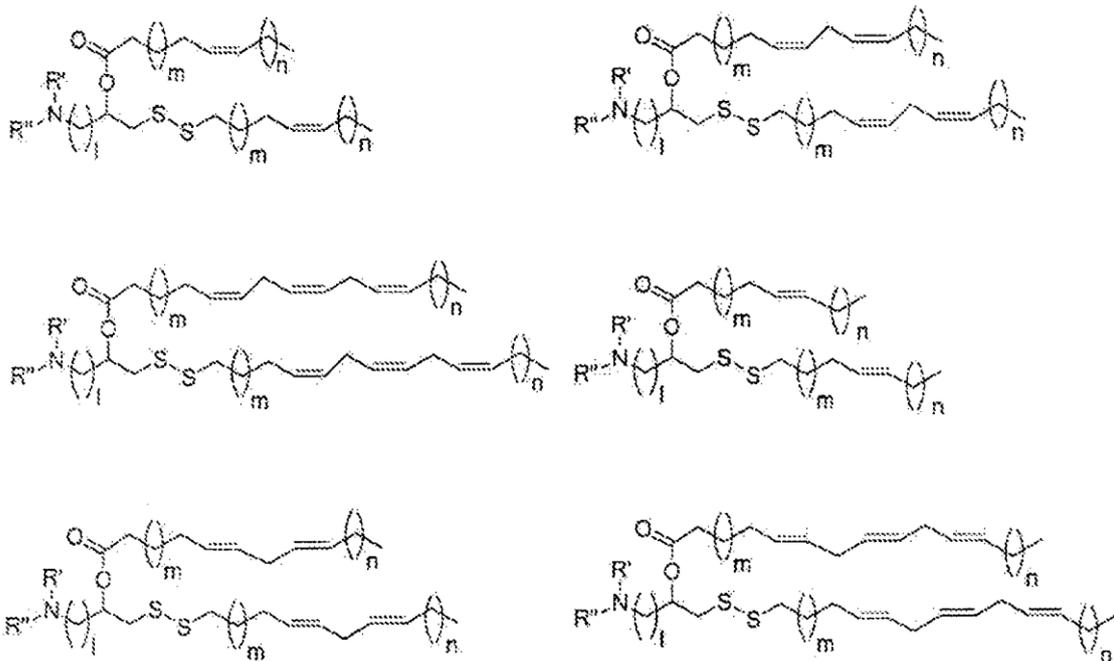
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 6-28

10 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 6-28



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

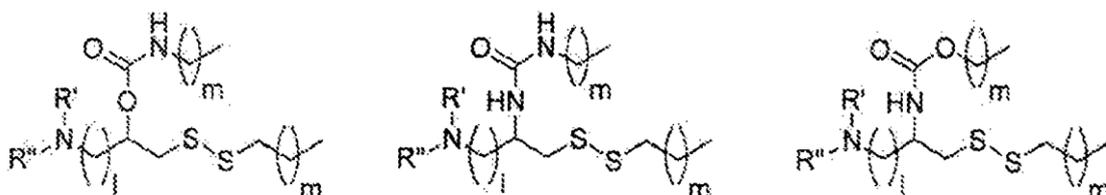
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

5 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

Carbamato o urea y enlaces disulfuro con cadenas de alquilo



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 6-28

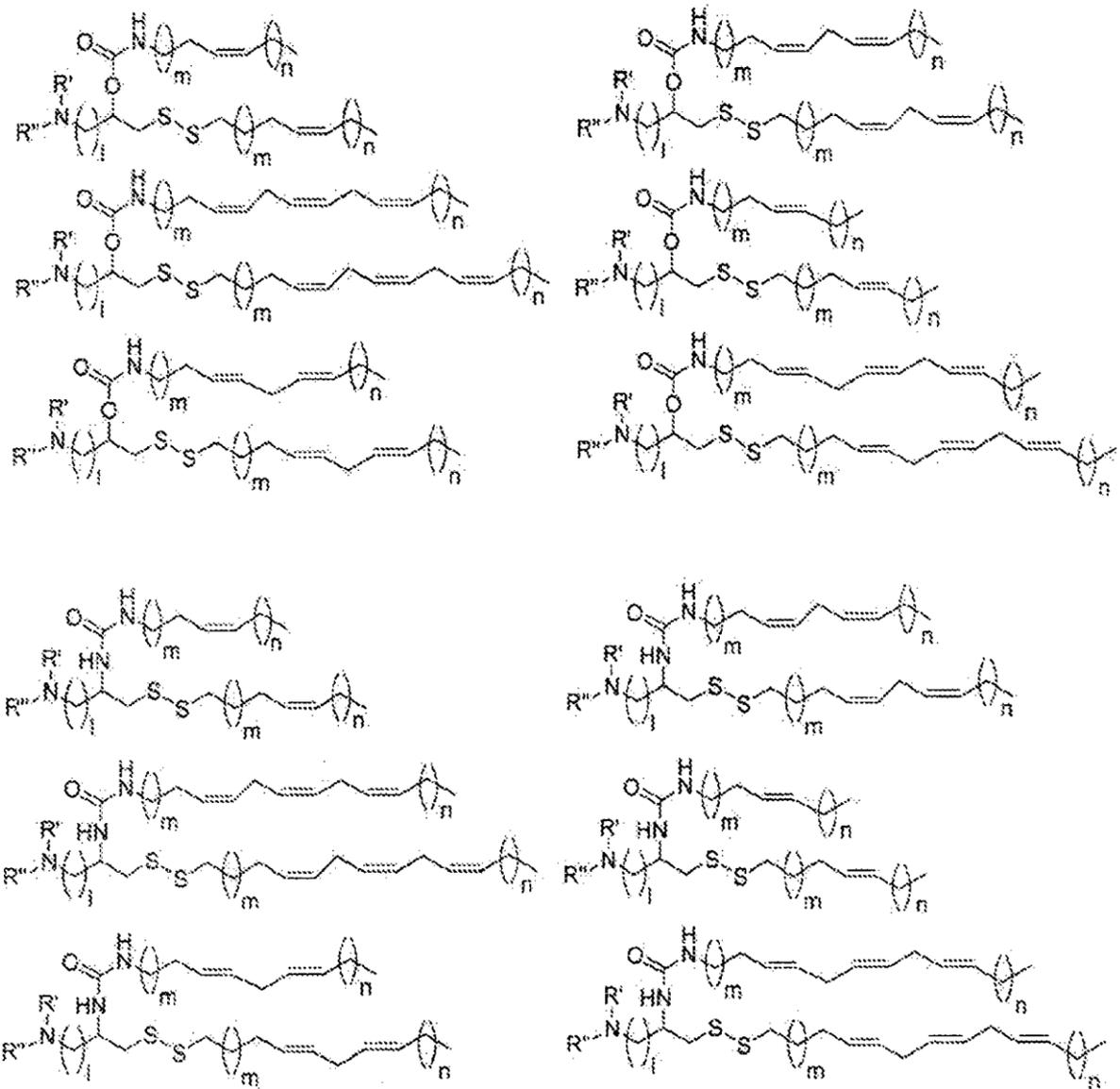
10 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 6-28

Carbamato o urea y enlaces disulfuro con cadenas de alquilo no saturadas



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 6-28

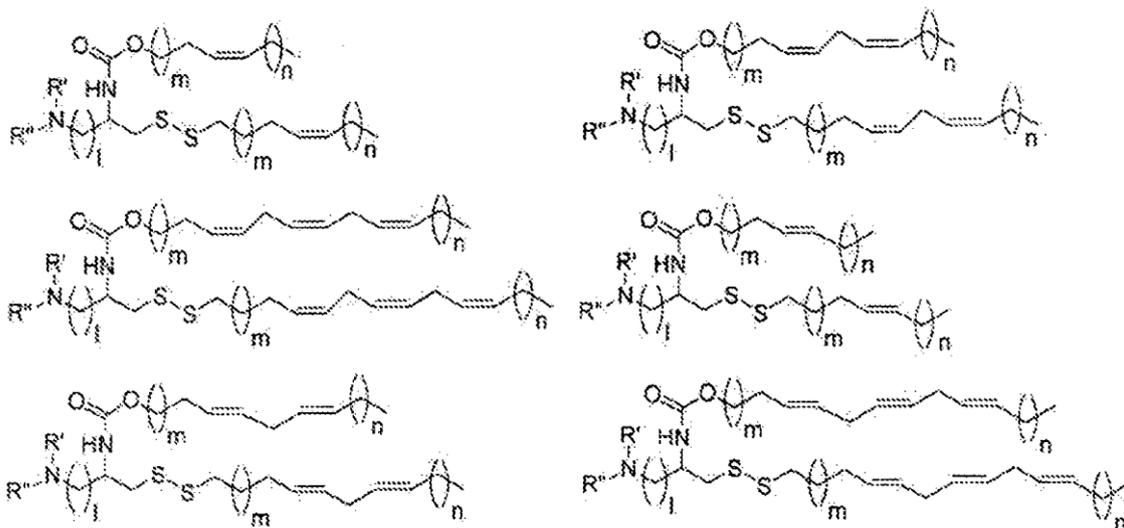
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 6-28

5 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 6-28

Carbamato o urea y enlaces disulfuro con cadenas de alquilo insaturadas



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 6-28

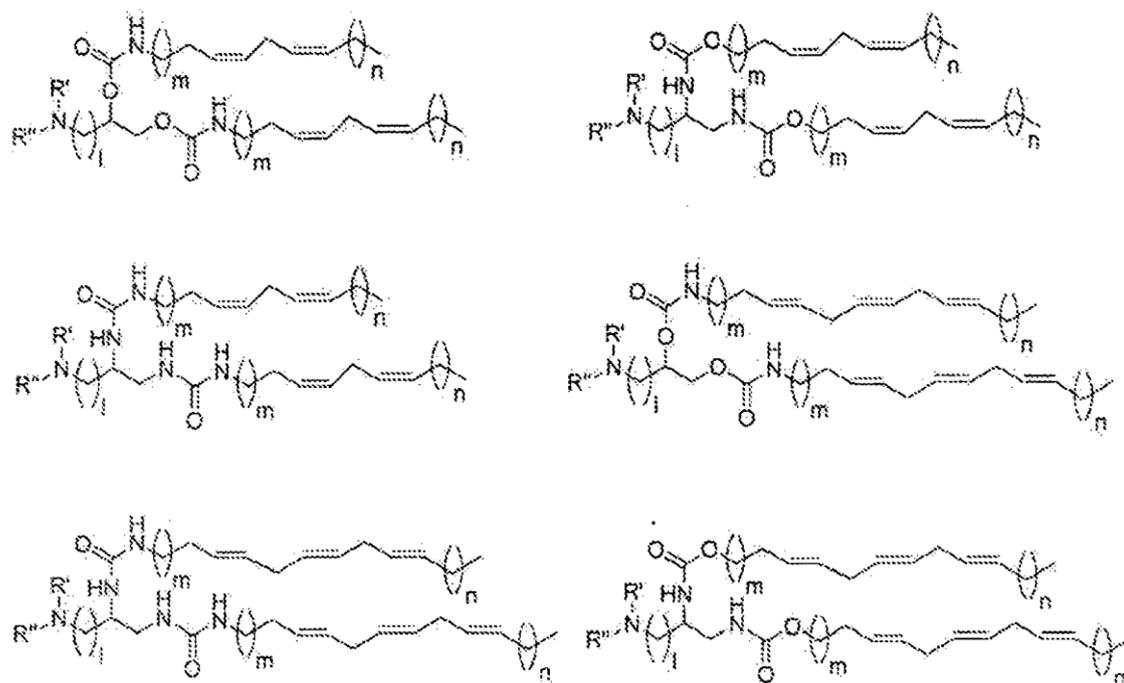
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 6-28

5 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 6-28

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 6-28

Enlaces carbamato y urea con cadenas de alquilo no saturadas



R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = H; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

10 R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Me; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = Et; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = propilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

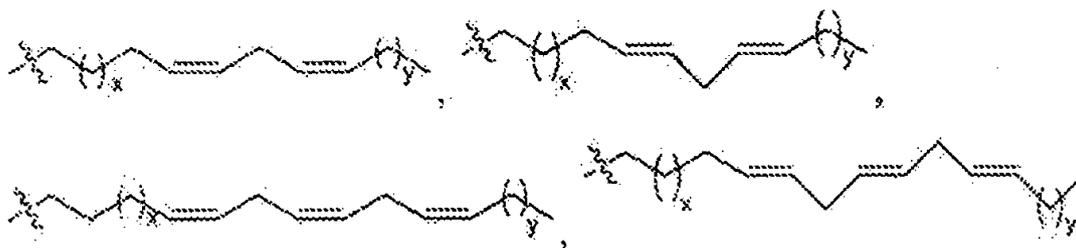
R' = H, Me, Et, propilo, isopropilo o 2-hidroxietilo y R'' = isopropilo; l = 1 a 6, m = 1-8, n = 1-10

En algunas realizaciones, el lípido incluye una oxima o hidrazona, que puede someterse a escisión ácida.

5  $R^3$  y  $R^4$  son en general restos hidrófobos de cadena larga, tales como alquilo, alqueno o alquino. En algunas realizaciones,  $R^3$  o  $R^4$  están sustituidos con un resto halo, por ejemplo, para proveer un resto perfluoroalquilo o perfluoroalqueno. Cada uno de  $R^3$  y  $R^4$  son independientes uno del otro, en algunas realizaciones, tanto  $R^3$  como  $R^4$  son iguales. En algunas realizaciones,  $R^3$  y  $R^4$  son diferentes.

En algunas realizaciones  $R^3$  y/o  $R^4$  son alquilo. Por ejemplo, uno de ambos de  $R^3$  y/o  $R^4$  es alquilo  $C_6$  a  $C_{30}$ , p. ej., alquilo  $C_{10}$  a  $C_{26}$ , alquilo  $C_{12}$  a  $C_{20}$  o alquilo  $C_{12}$ .

10 En algunas realizaciones,  $R^3$  y/o  $R^4$  son alqueno. En algunas realizaciones preferidas,  $R^3$  y/o  $R^4$  incluyen 2 o 3 dobles enlaces. Por ejemplo  $R^3$  y/o  $R^4$  incluyen 2 dobles enlaces o  $R^3$  y/o  $R^4$  incluyen 3 dobles enlaces. Los dobles enlaces pueden tener cada uno independientemente una configuración Z o E. Los restos alqueno ilustrativos se dan a conocer a continuación:



15 en donde x es un entero entre 1 y 8; y es un entero entre 1 y 10. En algunas realizaciones preferidas,  $R^3$  y/o  $R^4$  son alqueno  $C_6$  a  $C_{30}$ , p. ej., alqueno  $C_{10}$  a  $C_{26}$ , alqueno  $C_{12}$  a  $C_{20}$  o alqueno  $C_{17}$ , por ejemplo que tiene dos dobles enlaces, tal como dos dobles enlaces con configuración Z.  $R^3$  y/o  $R^4$  pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones,  $R^3$  y  $R^4$  son iguales.

En algunas realizaciones,  $R^3$  y/o  $R^4$  son alquino. Por ejemplo, alquino  $C_6$  a  $C_{30}$ , p. ej., alquino  $C_{10}$  a  $C_{26}$ , alquino  $C_{12}$  a  $C_{20}$ .  $R^3$  y/o  $R^4$  pueden tener entre 1 y 3 triples enlaces, por ejemplo uno, dos o tres triples enlaces.

20 En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (X) está en la forma de una sal, tal como una sal farmacéuticamente aceptable. Una sal, por ejemplo, puede formarse entre un anión y un sustituyente positivamente cargado (p. ej., amino) en un compuesto descrito en esta memoria. Los aniones adecuados incluyen flúor, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato bisulfato, nitrato, fosfato, citrato, metanosulfonato, trifluoroacetato, acetato, fumarato, oleato, valerato, maleato, oxalato, isonicotinato, lactato, salicilato, tartrato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, genticinato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluensulfonato y pamoato. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto de fórmula (X) es una sal de hidroháluro tal como sal de hidrócloro.

25

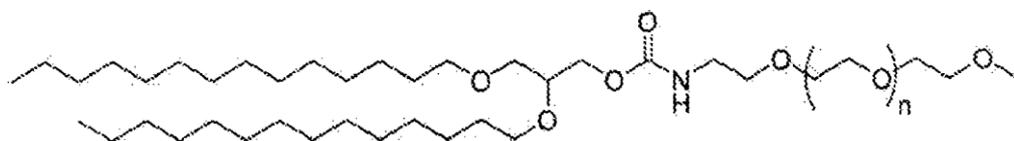
Los compuestos de fórmula (X) también pueden estar presentes en la forma de hidratos (p. ej.,  $(H_2O)_n$ ) y solvatos, que se incluyen en la descripción.

#### Compuestos de lípidos de PEG

30 Los solicitantes han descubierto que ciertos restos de lípidos que contienen PEG proporcionan propiedades deseables para la administración de un agente de ácido nucleico tal como ácido nucleico monocatenario o bicatenario, por ejemplo siRNA. Por ejemplo, cuando un lípido que contiene PEG, tal como un lípido descrito en la presente memoria, se formula en un complejo de asociación con un resto de ácido nucleico, tal como siRNA, y se administra a un sujeto, el lípido proporciona mejor administración del resto de ácido nucleico. Esta mejor administración puede determinarse, por ejemplo, por evaluación en un ensayo de silenciamiento de genes tal como silenciamiento de FVII. En particular, los solicitantes han descubierto que los lípidos de PEG de fórmula (XV) pueden tener propiedades deseables para la administración de siRNA, incluyendo mejor biodisponibilidad, biodegradabilidad y tolerabilidad.

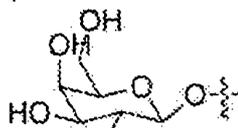
35

40 En alguna realización, el PEG se une mediante un resto enlazador a una estructura que incluye dos restos hidrófobos, tal como un resto alquilo de cadena larga. Los lípidos de PEG ilustrativos se dieron a conocer anteriormente en la presente, por ejemplo, aquellos abarcados por las fórmulas (XV), (XV) y (XVI). En algunas realizaciones preferidas, el lípido de PEG tiene la siguiente estructura:



, en donde la estereoquímica preferida del centro quiral es 'R' y el resto PEG de repetición tiene un peso molecular promedio total de aproximadamente 2000 daltons.

En algunas realizaciones, un líquido de PEG descrito en esta memoria se conjuga a un resto de direccionamiento, p.

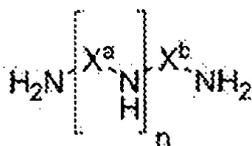


- 5 ej., un resto glicosilo tal como ACHIN. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une al lípido de PEG a través de un enlazador, por ejemplo un enlazador descrito en este documento. Los compuestos de lípidos de PEG dirigidos ilustrativos son compuestos de las fórmulas (XXI), (XXI'), (XXII) y (XXII') descritos en la presente memoria. Los métodos para elaborar dichos lípidos se describen, por ejemplo, en los Ejemplos 42 y 43,

Métodos para elaborar compuestos de lípidos catiónicos y preparaciones que contienen lípidos catiónicos

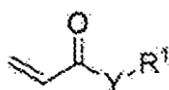
- 10 Los compuestos descritos en el presente documento pueden obtenerse de fuentes comerciales (p. ej., Asinex, Moscú, Rusia; Bionet, Camelford, Inglaterra; ChemDiv, San Diego, CA; Comgenex, Budapest, Hungría, Enamine, Kiev, Ucrania; IF Lab, Ucrania; Interbioscreen, Moscú, Rusia; Maybridge, Xintagel, Reino Unido; Specs, Países Bajos; Timtec, Newark, DE; Vitas-M Lab, Moscú, Rusia) o sintetizarse por métodos convencionales como se muestra a continuación, usando materiales de partida y reactivos disponibles.
- 15 Métodos para elaborar lípidos de poliamina

En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula (I) puede prepararse sometiendo a reacción una poliamina de fórmula (III) como se da a conocer a continuación



fórmula (III)

- 20 en donde  $X^a$ ,  $X^b$  y  $n$  son como se definió anteriormente con un sistema conjugado 1,4 de fórmula (IV)



fórmula (IV)

en donde Y y  $R^1$  son como se definió anteriormente

- 25 para proveer un compuesto de fórmula (I).

En algunas realizaciones, los compuestos de las fórmulas (III) y (IV) se someten a reacción juntos en forma pura (es decir, libres de disolvente). Por ejemplo, los compuestos de las fórmulas (III) y (IV) se hacen reaccionar juntos en forma pura a temperatura elevada (p. ej., por lo menos aproximadamente 60° C, por lo menos aproximadamente 65° C, por lo menos aproximadamente 70° C, por lo menos aproximadamente 75° C, por lo menos aproximadamente 80° C, por lo menos aproximadamente 85° C o por lo menos aproximadamente 90° C), preferiblemente a aproximadamente 90° C.

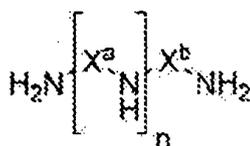
- 30 En algunas realizaciones, los compuestos de las fórmulas (III) y (IV) se someten a reacción junto con un disolvente (p. ej., un disolvente aprótico polar tal como acetonitrilo o DMF). Por ejemplo, los compuestos de fórmula (III) y (IV) se hacen reaccionar juntos en disolvente a temperatura elevada entre aproximadamente 50° C y aproximadamente 120° C.
- 35

- 5 En algunas realizaciones, los compuestos de fórmula (III) y (IV) se someten a reacción juntos en presencia de un extinguidor o depurador de radicales (p. ej., hidroquinona). Las condiciones de reacción que incluyen un extinguidor de radicales pueden ser puras o en un disolvente, p. ej., un disolvente aprótico polar tal como acetonitrilo o DMF. La reacción puede tener lugar a una temperatura elevada (p. ej., pura a una temperatura elevada tal como 90° C con disolvente a una temperatura elevada tal como entre aproximadamente 50° C y aproximadamente 120° C). El término "extinguidor de radicales" o "depurador de radicales" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un resto químico que puede absorber radicales libres en una mezcla de reacción. Los ejemplos de extinguidores/depuradores de radicales incluyen hidroquinona, ácido ascórbico, cresoles, tiamina, 3,5-Di-terc-butil-4-hidroxitolueno, terc-Butil-4-hidroxianisol y restos que contienen tiol.
- 10 En algunas realizaciones, los compuestos de las fórmulas (III) y (IV) se hacen reaccionar juntos en presencia de un promotor de reacción (p. ej., agua o un promotor de adición de Michael tal como ácido acético, ácido bórico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido tósico, pentafluorofenol, ácido pícrico, ácidos aromáticos, sales tales como bicarbonato, bisulfato, mono y di-hidrógeno fosfatos, fenoles, perhalofenoles, nitrofenoles, ácidos sulfónicos, PPTS, etc.), preferiblemente ácido bórico tal como un ácido bórico acuoso saturado. Las condiciones de reacción que incluyen un promotor de reacción pueden ser puras o en un disolvente, p. ej., un disolvente aprótico polar tal como acetonitrilo o DMF, La reacción puede estar a una temperatura elevada (p. ej., pura a una temperatura elevada tal como 90° C o con disolvente a una temperatura elevada tal como entre aproximadamente 50° C y aproximadamente 120° C). La expresión "promotor de reacción", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a un resto químico que, cuando se usa en una mezcla de reacción, acelera/potencia la velocidad de reacción.
- 15
- 20 La relación de compuestos de fórmula (III) a fórmula (IV) puede variarse, proporcionando variabilidad en la sustitución en la poliamina de fórmula (III). En general, se prefieren las poliaminas que tienen por lo menos aproximadamente 50% de los restos hidrógeno sustituidos con un resto no hidrógeno. Por consiguiente, las relaciones de los compuestos de fórmula (III)/fórmula (IV) se seleccionan para proporcionar productos que tienen un grado relativamente alto de sustitución de la amina libre (p. ej., por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 55%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 65%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99% o sustancialmente toda). En algunas realizaciones preferidas, n es 0 en la poliamina de fórmula (III), y la relación de los compuestos de fórmula (III) a los compuestos de fórmula (IV) oscila entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 1:5, preferiblemente aproximadamente 1:4. En algunas realizaciones preferidas, n es 2 en la poliamina de fórmula (III), y la relación del compuesto de fórmula (III) a los compuestos de fórmula (IV) oscila entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 1:6, preferiblemente aproximadamente 1:5.
- 25
- 30 En algunas realizaciones, los compuestos de fórmula (III) y fórmula (IV) se hacen reaccionar en un proceso de dos etapas. Por ejemplo, la primera etapa del proceso incluye una mezcla de reacción que tiene entre aproximadamente 0,8 y aproximadamente 1,2 equivalentes molares de un compuesto de fórmula (III), con entre aproximadamente 3,8 y aproximadamente 4,2 equivalentes molares de un compuesto de fórmula (IV), y la segunda etapa del proceso incluye la adición de aproximadamente 0,8 a 1,2 equivalentes molares del compuesto de fórmula (IV) a la mezcla de reacción.
- 35
- 40 Tras completar la reacción, uno o más productos que tienen la fórmula (I) pueden aislarse de la mezcla de reacción. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) puede aislarse como un producto individual (p. ej., un isómero estructural individual) o como una mezcla de producto (p. ej., una pluralidad de isómeros estructurales y/o una pluralidad de compuestos de fórmula (I)).
- 45 En algunas realizaciones, uno o más productos de reacción pueden aislarse y/o purificarse usando cromatografía, como cromatografía ultrarrápida, cromatografía de gravedad (p. ej., separación de isómeros por gravedad usando gel de sílice), cromatografía en columna (p. ej., HPLC de fase normal o RPHPLC), o cromatografía de lecho móvil. En algunas realizaciones, un producto de reacción se purifica para proveer una preparación que contiene por lo menos aproximadamente 80%: de un compuesto individual, tal como un isómero estructural individual (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%).
- 50
- 55 En algunas realizaciones, un producto de amina libre se trata con un ácido tal como HCl para proveer una sal de amina del producto (p. ej., una sal de hidrocioruro). En algunas realizaciones, un producto de sal provee mejores propiedades, p. ej., para manipular y/o conservar en relación al correspondiente producto de amina libre. En algunas realizaciones, un producto de sal puede prevenir o reducir el índice de formación de producto de descomposición, tal como formación de N-óxido o N-carbonato en relación con la amina libre correspondiente. En algunas realizaciones, un producto de sal puede tener mejores propiedades para uso en una formulación terapéutica en relación con la correspondiente amina libre.
- 60 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción se trata además, por ejemplo, para pureza de uno o más productos o para eliminar impurezas tales como materiales de partida sin reaccionar. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción se trata con un resto tiol inmovilizado (p. ej., unido a polímero), que puede atrapar acrilamida sin

reaccionar. En algunas realizaciones, un producto aislado puede tratarse para eliminar más impurezas, p. ej., un producto aislado puede tratarse con un resto tiol inmovilizado, atrapando compuestos de acrilamida sin reaccionar.

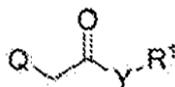
5 En algunas realizaciones un producto de reacción puede tratarse con un isotiocianato inmovilizado (p. ej., unido a un polímero). Por ejemplo, un producto de reacción que incluye aminas terciarias puede tratarse con un isotiocianato inmovilizado para eliminar aminas primarias y/o secundarias del producto.

En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula (I) puede prepararse sometiendo a reacción una poliamina de fórmula (II) como se indica a continuación



fórmula (III)

10 en donde  $X^a$ ,  $X^b$  y  $n$  son como se definió anteriormente con un compuesto de fórmula (VI),



fórmula (VI)

en donde Q es Cl, Br o I, y Y y  $R^1$  son como se definió anteriormente.

15 En algunas realizaciones, los compuestos de la fórmula (III) y de la fórmula (VI) se hacen reaccionar juntos en forma pura. En algunas realizaciones, los compuestos de la fórmula (III) y de la fórmula (VI) se hacen reaccionar juntos en presencia de uno o más disolventes, por ejemplo, un disolvente aprótico polar tal como acetonitrilo o DMF. En algunas realizaciones, los reaccionantes (fórmula (III) y fórmula (VI)) se hacen reaccionar juntos a temperatura elevada (p. ej., por lo menos aproximadamente 50° C, por lo menos aproximadamente 60° C, por lo menos aproximadamente 70° C, por lo menos aproximadamente 80° C, por lo menos aproximadamente 90° C, por lo menos aproximadamente 100° C).

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción también incluye una base, por ejemplo, un carbonato tal como  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción también incluye un catalizador.

25 En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (VI) se prepara sometiendo a reacción un resto amina con un ácido activado tal como un anhídrido de ácido o un haluro de ácido (p. ej., cloruro de ácido) para proporcionar un compuesto de fórmula (VI).

30 La relación de los compuestos de fórmula (III) a fórmula (VI) puede variar, proporcionando variabilidad en la sustitución de la poliamina de fórmula (III). En general, se prefieren las poliaminas que tienen por lo menos aproximadamente 50% de los restos hidrógeno sustituidos con un resto no hidrógeno. Por consiguiente, las relaciones de los compuestos de fórmula (III)/fórmula (VI) se seleccionan para proporcionar productos que tienen un grado relativamente alto de sustitución de la amina libre (p. ej., por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 55%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 65%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99% o sustancialmente toda). En algunas realizaciones preferidas,  $n$  es 0 en la poliamina de fórmula (III), y la relación de compuestos de fórmula (III) a compuestos de fórmula (VI) oscila entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 1:5, preferiblemente aproximadamente 1:4. En algunas realizaciones preferidas,  $n$  es 2 en la poliamina de fórmula (III), y la relación del compuesto de fórmula (III) a los compuestos de fórmula (VI) oscila entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 1:6, preferiblemente aproximadamente 1:5.

45 En algunas realizaciones, los compuestos de la fórmula (III) y de la fórmula (VI) se someten a reacción en un procedimiento de dos etapas. Por ejemplo, la primera etapa del procedimiento incluye una mezcla de reacción que tiene entre aproximadamente 0,8 y aproximadamente 1,2 equivalentes molares de un compuesto de fórmula (III), con entre aproximadamente 3,8 y aproximadamente 4,2 equivalentes molares de un compuesto de fórmula (VI), y la

segunda etapa del procedimiento incluye la adición de aproximadamente 0,8 a 1,2 equivalentes molares del compuesto de fórmula (VI) a la mezcla de reacción.

5 En algunas realizaciones, uno o más de los restos amina de fórmula (III) se protegen selectivamente usando un grupo protector antes de someter a reacción la poliamina de fórmula (III) con un compuesto de las fórmulas (IV) o (VI), proporcionando de este modo mejor selectividad en la síntesis del producto final. Por ejemplo, una o más aminas primarias de la poliamina de fórmula (III) pueden protegerse antes de la reacción con un compuesto de fórmula (IV) o (VI), proporcionando selectividad para el compuesto de fórmula (IV) o (VI) para que reaccione con aminas secundarias. Pueden emplearse otras estrategias de grupos protectores para proporcionar selectividad hacia las aminas primarias, por ejemplo, el uso de grupos protectores ortogonales que puede eliminarse selectivamente.

10 Tras completar la reacción, uno o más productos que tienen la fórmula (I) pueden aislarse de la mezcla de reacción. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) puede aislarse como producto individual (p. ej., un isómero estructural individual) o como una mezcla de producto (p. ej., una pluralidad de isómeros estructurales y/o una pluralidad de compuestos de fórmula (I)).

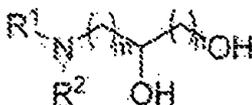
15 En algunas realizaciones, pueden aislarse uno o más productos de reacción y/o purificarse usando cromatografía, como cromatografía ultrarrápida, cromatografía de gravedad (p. ej., separación de isómeros por gravedad, usando gel de sílice), cromatografía en columna (p. ej., HPLC o RPHPLC de fase normal), o proveer cromatografía de lecho. En algunas realizaciones, un producto de reacción se purifica para dar una preparación que contiene por lo menos aproximadamente 80% de un compuesto individual, tal como un isómero estructural individual (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 91%, por lo menos aproximadamente 99%).

20 En algunas realizaciones, un producto de amina libre se trata con un ácido tal como HCl para proveer una sal de amina del producto (p. ej., sal de hidrocioruro). En algunas realizaciones, un producto de sal ofrece mejores propiedades, p. ej., para manipuleo y/o conservación en relación con el correspondiente producto de amina libre. En algunas realizaciones, un producto de sal puede prevenir o reducir el índice de formación de producto de descomposición tal como formación de N-óxido o N-carbonato en relación con la correspondiente amina libre. En algunas realizaciones, un producto de sal puede tener mejores propiedades para uso en una formulación terapéutica en relación con la correspondiente amina libre.

25 En algunas realizaciones, un lípido catiónico de poliamina puede prepararse usando un planteamiento de síntesis regioselectiva. El planteamiento de síntesis regioselectiva proporciona un modo conveniente de efectuar alquilación específica del sitio en nitrógeno(s) de la cadena principal de poliamina que conduce a la síntesis de derivados alquilados específicos de interés. En general, un compuesto de fórmula (I) se somete a reacción inicialmente con un reactivo que reacciona selectivamente con aminas primarias o aminas terminales para bloquear que reaccionen o interfieran con otras reacciones, y estos bloques podrían eliminarse selectivamente en las etapas apropiadas durante la síntesis de un compuesto diana. Después de bloquear las aminas terminales de un compuesto de fórmula (I), una o más de las aminas secundarias podrían bloquearse selectivamente con grupos protectores de aminas ortogonales usando relaciones molares apropiadas del reactivo y las condiciones de reacción. Las alquilaciones selectivas, seguidas de desprotección selectiva de las aminas bloqueadas y posterior alquilación de las aminas regeneradas y repetición apropiada de la secuencia de reacciones descrita proporciona un compuesto de interés específico. Por ejemplo, las aminas terminales de trietilentetramina (I) se bloquean selectivamente con grupos protectores específicos de amina primaria (p. ej., trifluoroacetamida) bajo condiciones de reacción apropiadas y posteriormente se hacen reaccionar con exceso de reactivo protector de amina ortogonal [(Boc)<sub>2</sub>O, para, por ejemplo.] en presencia de una base (para, p. ej., diisopropiletilamina) para bloquear todas las aminas internas (p. ej., Boc). La eliminación selectiva del grupo protector terminal y la posterior alquilación de las aminas terminales, por ejemplo con una acrilamida, provee un derivado alquilado de amina totalmente terminal del compuesto 1. El desbloqueo de la protección de la amina interna y la posterior alquilación con una cantidad calculada de acrilamida, por ejemplo, produce un producto parcialmente alquilado 7. Otro planteamiento para preparar el compuesto 7 consiste en someter a reacción el compuesto terminalmente protegido 1 con una cantidad calculada de un reactivo protector de amina ortogonal [(Boc)<sub>2</sub>O, p. ej.] para obtener un derivado parcialmente protegido del compuesto 1. La eliminación de los grupos protectores de amina terminales de 1 parcial y selectivamente protegido y la posterior alquilación de todas las aminas no protegidas con una acrilamida, por ejemplo, produce el compuesto 7 de interés.

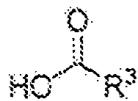
Métodos para preparar lípidos que tienen un resto escindible

En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula (X) puede prepararse sometiendo a reacción un compuesto de fórmula



fórmula (XI)

con un compuesto de fórmula (XII)



fórmula (XII)

en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son como se definió anteriormente.

- 5 En algunas realizaciones, los compuestos de las fórmulas (XI) y (XII) se hacen reaccionar en presencia de un agente de acoplamiento tal como una carbodiimida (p. ej., una carbodiimida soluble en agua tal como EDCI).

Pueden emplearse otras reacciones químicas y materiales de partida para producir un compuesto de fórmula (X) que tiene dos grupos de enlace L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup>. Por ejemplo, los restos hidroxilo de fórmula (XI) podrían reemplazarse con restos amina para proveer un precursor a la amida de grupos de enlace de urea.

- 10 Tras completar la reacción, uno o más productos que tienen la fórmula (X) pueden aislarse de la mezcla de reacción. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (X) puede aislarse como producto individual (p. ej., como un isómero estructural individual) o como una mezcla de producto (p. ej., una pluralidad de isómeros estructurales y/o una pluralidad de compuestos de fórmula (X)). En algunas realizaciones, pueden aislarse uno o más productos y/o purificarse usando cromatografía, tal como cromatografía ultrarrápida, cromatografía de gravedad (p. ej., separación de isómeros por gravedad usando gel de sílice), cromatografía en columna (p. ej., HPLC o RPHPLC en fase normal),
- 15 o cromatografía de lecho móvil. En algunas realizaciones, se purifica un producto de reacción para proveer una preparación que contiene por lo menos aproximadamente 80% de un compuesto individual, tal como un isómero estructural individual (p. ej., por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 99%).
- 20 En algunas realizaciones, un producto de amina libre se trata con un ácido tal como HCl para proveer una sal de amina del producto (p. ej., una sal de hidrocloreuro). En algunas realizaciones, una sal del producto provee mejores propiedades, p. ej., para manipuleo y/o conservación, en relación con el correspondiente producto de amina libre. En algunas realizaciones, un producto de sal puede prevenir o reducir el índice de formación de producto de descomposición, tal como formación de N-óxido o N-carbonato en relación con la correspondiente amina libre.
- 25 En algunas realizaciones, un producto de sal puede tener mejores propiedades para uso en una formulación terapéutica en relación con la correspondiente amina libre.

#### Métodos para elaborar lípidos de PEG

- Los compuestos de lípidos de PEG pueden prepararse, por ejemplo, sometiendo a reacción un resto glicérido (p. ej., un glicérido de dimiristilo, glicérido de dipalmitilo o glicérido de diestearilo) con un resto activador bajo condiciones apropiadas, por ejemplo para proporcionar un intermedio activado que podría hacerse reaccionar posteriormente con un componente de PEG que tiene un resto reactivo tal como una amina o un grupo hidroxilo para obtener un lípido de PEG. Por ejemplo, un dialquiliglicérido (p. ej., glicérido de dimiristilo) se somete inicialmente a reacción con N,N'-disuccinimidil carbonato en presencia de una base (p. ej., trietilamina), y la posterior reacción del intermedio formado con una amina de PEG (p. ej., mPEG2000-NH<sub>2</sub>) en presencia de una base, tal como piridina, proporciona un lípido de PEG de interés. Bajo estas condiciones, el componente de PEG se une al resto de lípido mediante un enlace carbamato. En otro caso, un lípido de PEG puede prepararse, por ejemplo, sometiendo a reacción un resto de glicérido (p. ej., glicérido de dimiristilo, glicérido de dipalmitato, glicérido de diestearilo, glicérido de dimiristoílo, glicérido de dipalmitoílo o glicérido de distearoílo) con anhídrido succínico y posterior activación del carboxilo generado seguido de reacción del intermedio activado con un componente de PEG con una amina o un grupo hidroxilo, por ejemplo, para obtener un lípido de PEG. En un ejemplo, el glicérido de dimiristilo se somete a reacción con anhídrido succínico en presencia de una base tal como DMAP para obtener un hemi-succinato. El resto carboxilo libre del hemi-succinato así obtenido se activa usando agentes de activación de carboxilo convencionales tales como HBTU y diisopropiletilamina, y la posterior reacción del carboxilo activado con mPEH-2000-NH<sub>2</sub>, por ejemplo, proporciona un lípido de PEG. En este planteamiento, el componente de PEG se une al componente de lípido mediante un puente succinato.
- 30
- 35
- 40
- 45

#### Complejos de asociación

- Los compuestos de lípidos y las preparaciones de lípidos descritos en esta memoria pueden emplearse como un componente en un complejo de asociación, por ejemplo un liposoma o un lipoplexo. Dichos complejos de asociación se pueden utilizar para administrar una terapia a base de ácido nucleico tal como RNA, por ejemplo un RNA monocatenario o bicatenario tal como dsRNA.
- 50

Los complejos de asociación descritos en esta memoria pueden ser útiles para incorporar un agente de oligonucleótidos capaz de modificar la expresión de genes, direccionándose y uniéndose a un ácido nucleico. Un agente de oligonucleótidos puede ser monocatenario o bicatenario, y puede incluir, p. ej., un dsRNA, un pre-mRNA,

un mRNA, un microRNA (miRNA), un precursor de mi-RNA (pre-miRNA), plásmido o DMA, a una proteína. Un agente de oligonucleótidos caracterizado por la invención puede ser, p. ej., un dsRNA, un microRNA, RNA antisentido, antagomir, RNA señuelo, DNA, plásmido y aptámero,

5 Los complejos de asociación pueden incluir una pluralidad de componentes. En algunas realizaciones, un complejo de asociación tal como un liposoma puede incluir un ingrediente activo tal como un compuesto terapéutico de ácido nucleico (tal como un agente de oligonucleótidos, p. ej., dsRNA), un lípido catiónico tal como un lípido descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el complejo de asociación puede incluir una pluralidad de agentes terapéuticos, por ejemplo dos o tres restos de ácido nucleico monocatenario o bicatenario que se dirigen a más de un gen o a regiones distintas del mismo gen. Otros componentes pueden también incluirse en un complejo de asociación, incluyendo un lípido de PEG tal como un lípido de PEG descrito en este documento, o un componente estructural tal como colesterol. En algunas realizaciones, el complejo de asociación también incluye un lípido o componente fusogénico y/o una molécula diana. En algunas realizaciones preferidas, el complejo de asociación es un liposoma que incluye un agente oligonucleótido tal como dsRNA, un lípido descrito en esta memoria tal como el compuesto de fórmula (I) o (X), un lípido de PEG tal como un lípido de PEG descrito en este documento (p. ej., un lípido de PEG de fórmula (XV) y un componente estructural tal como colesterol.

15 Los agentes de oligonucleótidos incluyen microRNA (miRNA). Los microRNA son pequeñas moléculas de RNA no codificantes capaces de causar el silenciamiento post-traducción de genes específicos en las células, tal como por inhibición de traducción o a través de la degradación del mRNA dirigido. Un miRNA puede ser completamente complementario o puede tener una región de no complementariedad con un ácido nucleico diana, en consecuencia dando como resultado un "bulto" en la región de no complementariedad. La región de no complementariedad (el bulto) puede estar flanqueada por regiones de suficiente complementariedad, preferiblemente de complementariedad total para permitir la doble formación. Preferiblemente, las regiones de complementariedad tienen por lo menos 8 a 10 nucleótidos de longitud (p. ej., 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud). Un miRNA puede inhibir la expresión de genes reprimiendo la traducción, tal como cuando el microRNA no es completamente complementario al ácido nucleico diana, o causando la degradación del RNA diana, que se cree que tiene lugar solamente cuando el miRNA se une a su diana con perfecta complementariedad. La invención puede también incluir precursores de doble cadena de los miRN que puede o no formar un bulto cuando se une a sus dianas.

20 En una realización preferida, el agente de oligonucleótidos caracterizado por la invención puede dirigirse a un miRNA o pre-miRNA endógeno. El agente de oligonucleótidos caracterizado por la invención puede incluir nucleobases naturales, azúcares y enlaces de internucleósidos covalentes (cadena principal), como también oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de forma similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos por lo general se prefieren a las formas nativas debido a sus propiedades deseables tales como, por ejemplo, mejor absorción celular, mejor afinidad hacia la diana de miRNA endógeno y/o mayor estabilidad en presencia de nucleasas. Un agente de oligonucleótidos diseñado para unirse a un miRNA endógeno específico tiene complementariedad sustancial, p. ej., por lo menos 70, 80, 90 o 100% de complementariedad con por lo menos 10, 20, o 25 o más bases el miRNA diana.

30 Un miRNA o pre-miRNA puede tener 18-100 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente entre 18 y 80 nucleótidos de longitud. Los miRNA maduros pueden tener una longitud de 19-30 nucleótidos, preferiblemente 21-25 nucleótidos, particularmente 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. Los precursores de microRNA pueden tener una longitud de 70-100 nucleótidos y tener una conformación de horquilla. Los microRNA pueden generarse *in vivo* a partir de los pre-miRNA por enzimas llamadas Dicer y Drosha que procesan específicamente pre-miRNA largos en miRNA funcionales. Los microRNA o mi-RNA precursores caracterizados en la invención se pueden sintetizar *in vivo* mediante un sistema basado en células o se pueden sintetizar químicamente. Los microRNA pueden sintetizarse para incluir una modificación que imparta una característica deseada. Por ejemplo, la modificación puede mejorar la estabilidad, la termodinámica de hibridación con un ácido nucleico diana, dirigiéndose a un tejido o tipo de células particular, o por permeabilidad celular, p. ej., por un mecanismo dependiente o independiente de endocitosis. Las modificaciones también puede aumentar la especificidad y en consecuencia reducir el direccionamiento hacia fuera del sitio. Los métodos de síntesis y modificaciones químicas se describen en más detalle en lo sucesivo.

40 Dada una secuencia de cadena sentido (p. ej., la secuencia de una cadena sentido de una molécula de cDNA), se puede diseñar un miRNA de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. El miRNA puede ser complementario a una porción de un RNA, p. ej., un miRNA, un pre-miRNA, un pre-mRNA o un mRNA. Por ejemplo, el miRNA puede ser complementario a la región codificante o no codificante de un mRNA o pre-mRNA, p. ej., la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de un pre-mRNA o mRNA, tal como 5' UTR. Un oligonucleótido de miRNA puede tener, por ejemplo, entre aproximadamente 12 y 30 nucleótidos de longitud, preferiblemente aproximadamente 15 a 28 nucleótidos de longitud (p. ej., 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud).

45 En particular, un miRNA o un pre-miRNA caracterizado en la invención puede tener una modificación química en un nucleótido en una región interna. Por ejemplo, un nucleótido modificado puede incorporarse a la región de un miRNA que forma un bulto. La modificación puede incluir un ligando conectado al miRNA, p. ej., mediante un enlazador (p. ej., véanse los diagramas OT-I a OT-IV a continuación). La modificación puede, por ejemplo, mejorar la farmacocinética o la estabilidad de un miRNA terapéutico, o mejorar las propiedades de hibridación (p. ej., la

termodinámica de hibridación) del miRNA a un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, se prefiere que la orientación de una modificación o ligando incorporado o ligado a la región de bulto de un miRNA está orientada para ocupar el espacio en la región de bulto. Por ejemplo, la modificación puede incluir una base o un azúcar modificado en la cadena de ácido nucleico o un ligando que funcione como un intercalador. Éstos están preferiblemente localizados en el bulto. El intercalador puede ser un compuesto aromático, p. ej., aromático policíclico o aromático heterocíclico. Un intercalador policíclico puede tener capacidad de apilamiento, y puede incluir sistemas con 2, 3 o 4 anillos condensados. Las bases universales descritas a continuación pueden incorporarse a los miRNA. En algunas realizaciones, se prefiere que la orientación de una modificación o ligando incorporado o ligado a la región de bulto de un miRNA se oriente para ocupar el espacio en la región de bulto. Esta orientación facilita la mejora de las propiedades de hibridación o cualquier otra característica no deseada del miRNA.

En una realización, un miRNA o un pre-miRNA puede incluir un ligando de aminoglucósido, que puede causar que el miRNA tenga mejores propiedades de hibridación o mejor especificidad de secuencia. Los aminoglucósidos ilustrativos incluyen conjugados de aminoglucósidos de polilisina glucosilada; polilisina galactosilada; neomicina B; tobramicina; kanamicina A; y acridina tales como Neo-N-acridina, Neo-S-acridina, Neo-C-acridina, Tobra-N-acridina y KanaA-N-acridina. El uso de un análogo de acridina puede incrementar la especificidad de secuencia. Por ejemplo, la neomicina B tiene gran afinidad hacia RNA en comparación con DNA, pero baja especificidad de secuencia. Un análogo de acridina, neo-S-acridina, tiene mayor afinidad hacia el elemento de respuesta Rev del VIH (RRE). En algunas realizaciones, el análogo de guanidina (el guanidinoglucósido) de un ligando de aminoglucósido se liga a un agente de oligonucleótidos. En un guanidinoglucósido, el grupo amina en el aminoácido se intercambia con un grupo guanidina. La unión de un análogo de guanidina puede potenciar la permeabilidad celular de un agente de oligonucleótidos.

En una realización, el ligando puede incluir un grupo de escisión que contribuye a la inhibición de un gen diana por escisión del ácido nucleico diana. Preferiblemente, el grupo de escisión se liga al miRNA en un modo tal que se posiciona en la región de bulto, donde puede acceder y escindir el RNA diana. El grupo de escisión puede ser, por ejemplo, una bleomicina (p. ej., bleomicina-A<sub>5</sub>, bleomicina-A<sub>2</sub>, o bleomicina-B<sub>2</sub>), pireno, fenantrolina (p. ej., O-fenantrolina), una poliamina, un tripéptido (p. ej., tripéptido lys-tyr-lys), o un grupo quelante de iones de metal. El grupo quelante de iones de metal puede incluir, p. ej., un complejo macrocíclico Lu(III) o EU(III), un derivado de 2,9-dimetilfenantrolina Zn(II), una terpiridina Cu(II) o acridina, que puede promover la escisión selectiva de un RNA diana en el sitio del bulto mediante iones de metal libres, tales como Lu(III). En algunas realizaciones, un ligando de péptido puede ligarse a un miRNA o a un pre-miRNA para promover la escisión del RNA diana, p. ej., en la región de bulto. Por ejemplo, 1,8-dimetil-1,3,6,8,10,13-hexaazociclotetradecano (cyclam) puede conjugarse a un péptido (p. ej., mediante un derivado de aminoácido) para promover la escisión del RNA diana. Los métodos y composiciones descritos en la invención incluyen los miRNA que inhiben la expresión del gen diana por un mecanismo dependiente o no dependiente de escisión.

Un miRNA o un pre-miRNA puede diseñarse y sintetizarse para incluir una región de no complementariedad (p. ej., una región que tenga 3, 4, 5 o 6 nucleótidos de longitud) flanqueada por regiones de suficiente complementariedad para formar una doble estructura (p. ej., regiones que tienen 7, 8, 9, 10 u 11 nucleótidos de longitud).

Para mayor resistencia de nucleasas y/o afinidad de unión a la diana, las secuencias de miRNA pueden incluir enlaces 2'-O-metilo, 2'-flúor, 2'-O-metoxietilo, 2'-O-aminopropilo, 2'-amino y/o fosforotioato. La inclusión de ácidos nucleicos bloqueados (LNA), 2-tiopirimidinas (p. ej., 2-tio-U), 2-amino-A, modificaciones en abrazadera G y ácidos nucleicos de etileno (ENA), p. ej., ácidos nucleicos unidos por puentes a 2'-4'-etileno, puede también aumentar la afinidad de unión a la diana. La inclusión de azúcares de furanosa en la cadena principal de oligonucleótidos puede también reducir la escisión endonucleolítica. Un miRNA o un pre-miRNA puede además modificarse incluyendo un grupo catiónico 3' o invirtiendo el nucleósido en el término 3 con un enlace 3'-3'. En otra alternativa, el término 3' puede bloquearse con un grupo aminoalquilo, p. ej., un 3' aminoalquilo C5 dT. Otros conjugados de 3' pueden inhibir la escisión exonucleolítica de 3'-5'. Si bien no se desean influencias de la teoría, un conjugado de 3', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica bloqueando de manera estérica la exonucleasa de la unión al extremo 3' del oligonucleótido. Incluso las cadenas de alquilo pequeñas, los grupos arilo o los conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc.) pueden bloquear las 3'-5'-exonucleasas.

El término 5' puede bloquearse con un grupo aminoalquilo, p. ej., un sustituyente de 5'-O-alquilamino. Otros conjugados de 5' pueden inhibir la escisión exonucleolítica de 5'-3'. Si bien no se desean influencias de la teoría, un conjugado de 5', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica bloqueando de manera estérica la exonucleasa de la unión al extremo 5' del oligonucleótido. Incluso las pequeñas cadenas de alquilo, grupos arilo o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc.) pueden bloquear las 3'-5'-exonucleasas.

En una realización, un miRNA o un pre-miRNA incluye una modificación que mejora el direccionamiento, es decir, una modificación de direccionamiento descrita en esta memoria. Los ejemplos de modificaciones que dirigen las moléculas de miRNA a tipos de células particulares incluyen azúcares de carbohidratos tales como galactosa, N-acetilgalactosamina, manosa; vitaminas tales como folatos; otros ligandos tales como RGD y miméticos de RGP; y pequeñas moléculas incluyendo naproxeno, ibuprofeno u otras moléculas de unión a proteínas conocidas.

Un miRNA o un pre-miRNA puede construirse usando síntesis química y/o reacciones de ligadura enzimáticas que usan procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un miRNA o un pre-miRNA puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de varias formas diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física de la doble estructura formada entre el miRNA de un pre-miRNA y los ácidos nucleicos diana, p. ej., pueden emplearse derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos de acridina. Otras modificaciones de ácidos nucleicos apropiadas se describen en esta memoria. Alternativamente, el ácido nucleico de miRNA o pre-miRNA puede producirse biológicamente usando un vector de expresión en el cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el RNA transcrito desde el ácido nucleico insertado tendrá una orientación antisentido a un ácido nucleico diana de interés).

#### 10 Agentes de oligonucleótidos de tipo antisentido

Los agentes de oligonucleótidos monocatenarios descritos en la invención incluyen ácidos nucleicos antisentido. Un ácido nucleico "antisentido" incluye una secuencia nucleotídica que es complementaria a un ácido nucleico "sentido" que codifica un producto de expresión génica, complementario a la cadena codificante de una molécula de cDNA bicatenaria, p. ej., un pre-mRNA, mRNA, miRNA o pre-miRNA. Por consiguiente, un ácido nucleico antisentido puede formar enlaces hidrógeno con una diana de ácido nucleico sentido.

Dada una secuencia de cadena codificante (p. ej., la secuencia de una cadena sentido de una molécula de cDNA), los ácidos nucleicos antisentido pueden diseñarse de acuerdo con las normas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a una porción de la región codificante o no codificante de un RNA, p. ej., un pre-mRNA o mRNA. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de un pre-mRNA o mRNA, p. ej., 5' UTR. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 10 a 25 nucleótidos de longitud, preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud). Un oligonucleótido antisentido puede ser también complementario a un miRNA o pre-miRNA.

Un ácido nucleico antisentido puede construirse usando síntesis química y/o reacciones de ligadura enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (p. ej., oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos naturales o diversos nucleótidos modificados diseñados para incrementar la estabilidad de las moléculas o para incrementar la estabilidad física la doble estructura cercada entre los ácidos nucleicos sentido y diana, p. ej., se pueden emplear nucleótidos sustituidos con derivados de fosforotioato y nuclacridina. Otras modificaciones de ácido nucleico apropiadas se describen en la presente memoria. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente usando un vector de expresión en el cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido. El RNA transcrito desde el ácido nucleico insertado tendrá una orientación antisentido a un ácido nucleico diana de interés).

Un agente antisentido puede incluir ribonucleótidos solamente, desoxirribonucleótidos solamente (p. ej., oligodesoxinucleótidos), o tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos. Por ejemplo, un agente antisentido que consiste solamente en ribonucleótidos puede hibridarse a un RNA complementario y prevenir el acceso de maquinaria de traducción al transcrito de RNA diana, previniendo de esta manera la síntesis de proteínas. Una molécula antisentido que incluye solamente desoxirribonucleótidos, o desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, secuencia de DNA flanqueada por una secuencia de RNA en los extremos 5' y 3' del agente antisentido, puede hibridarse a un RNA complementario, y la diana de RNA puede ser escindida subsiguientemente por una enzima, p. ej., RNase H. La degradación del RNA diana previene la traducción. Las secuencias de RNA flanqueadoras pueden incluir nucleótidos 2'-O-metilados, y enlaces fosforotioato, y la secuencia de DNA interna puede incluir enlaces internucleotídicos de fosforotioato. La secuencia de DNA interna tiene preferiblemente por lo menos cinco nucleótidos de longitud cuando se desea el direccionamiento por actividad de RNaseH.

Para mayor resistencia de nucleasa, un agente antisentido puede además modificarse invirtiendo el nucleósido en el término 3' con un enlace 3'-3'. En otra alternativa, el término 3' puede bloquearse con un grupo de aminoalquilo.

En una realización, un agente de oligonucleótidos antisentido incluye una modificación que mejora el direccionamiento, p. ej., una modificación de direccionamiento descrita en este documento.

#### Agentes de oligonucleótido de tipo señuelo

Un agente de oligonucleótido caracterizado en la invención puede ser un ácido nucleico señuelo, p. ej., un RNA señuelo. Un ácido nucleico señuelo se asemeja a un ácido nucleico natural, pero está modificado en un modo tal como para inhibir o interrumpir la actividad del ácido nucleico natural.

Por ejemplo, un RNA señuelo puede imitar el dominio de unión natural hacia un ligando. El RNA señuelo se completa por lo tanto con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. La diana de unión puede ser un ácido nucleico endógeno, p. ej., un pre-miRNA, miRNA, premRNA, mRNA o DNA. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de RNA de respuesta de trans-activación de VIH (TAR) puede actuar como "señuelo" y unir eficientemente el VIH a la proteína, previniendo así que se una a secuencias TAR codificadas en el RNA del VIH.

En una realización, un RNA señuelo incluye una modificación que mejora el direccionamiento, p. ej., una modificación de direccionamiento descrita en la presente memoria.

Las modificaciones químicas descritas anteriormente para los miRNA y los RNA antisentido, y descritas en otras partes de este documento, también son apropiadas para uso en ácidos nucleicos señuelo.

5 Agentes de oligonucleótido de tipo aptámero

Un agente de oligonucleótido descrito en la invención puede ser un aptámero. Un aptámero se une a un ligando de ácido no nucleico, tal como una pequeña molécula orgánica o una proteína, p. ej., un factor de transcripción o traducción, y posteriormente modifica (p. ej., inhibe) la actividad. Un aptámero puede plegarse en una estructura específica que dirige el reconocimiento del sitio de unión diana en el ligando de ácido no nucleico. Un aptámero puede contener cualquiera de las modificaciones descritas en la presente memoria.

En una realización, un aptámero incluye una modificación que mejora el direccionamiento, p. ej., una modificación de direccionamiento descrita en esta memoria.

Las modificaciones químicas descritas anteriormente para los miRN y RNA antisentido y descritas en esta memoria, también son apropiadas para uso en ácidos nucleicos señuelo.

15 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción que sigue. Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención describe antagomirs. Los antagomirs son oligonucleótidos químicamente modificados de estructura de horquilla, monocatenarios, bicatenarios y parcialmente bicatenarios que direccionan un microRNA.

20 Un antagomir consiste esencialmente en o comprende por lo menos 12 o más nucleótidos contiguos sustancialmente complementarios a un miRNA endógeno, y más particularmente agentes que incluyen 12 o más nucleótidos contiguos sustancialmente complementarios a una secuencia diana de una secuencia de nucleótidos de miRNA o pre-miRNA. Preferiblemente, un antagomir descrito en la invención incluye una secuencia de nucleótidos suficientemente complementaria para hibridarse a una secuencia diana de miRNA de aproximadamente 12 a 25 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente 15 a 23 nucleótidos. Más preferiblemente, la secuencia diana difiere en no más de 1, 2 o 3 nucleótidos de una secuencia que se indica en la Tabla I, y en una realización, el antagomir es un agente que se indica en la Tabla 2a-e. En una realización, el antagomir incluye un resto no nucleotídico, p. ej., un resto de colesterol. El resto no nucleotídico puede estar unido, p. ej., al extremo 3' o 5' del agente de oligonucleótidos. En una realización preferida, un resto de colesterol está unido al extremo 3' del agente de oligonucleótidos.

Los antagomir se estabilizan contra degradación nucleolítica tal como por incorporación de una modificación, p. ej., una modificación nucleotídica. En otra realización, el antagomir incluye un fosforotioato en por lo menos el primero, segundo o tercer enlace internucleotídico en el extremo 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos. Incluso en otra realización, el antagomir incluye un nucleótido modificado en 2', p. ej., un 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE) o 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA). En una realización particularmente preferida, el antagomir incluye por lo menos un nucleótido modificado en 2'-O-metilo, y en algunas realizaciones, todos los nucleótidos del antagomir incluyen una modificación 2'-O-metilo.

Un antagomir que es sustancialmente complementario a una secuencia de nucleótidos de un miRNA puede administrarse a una célula o a un ser humano para inhibir o reducir la actividad de un miRNA endógeno, tal como cuando la actividad aberrante o no deseada de miRNA, o la actividad insuficiente de un mRNA diana que se hibrida al miRNA endógeno, está ligada a una enfermedad o trastorno. En una realización, un antagomir descrito en la invención tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente complementaria a miR-122 (véase la Tabla 1), que se hibrida a diversos RNA, incluyendo mRNA de aldolasa A, un gen regulado en dirección 3' N-myc (Ndr3) mRNA, mRNA de la proteína 1 GTPasa que contiene el motivo Q (Iqgap1) mRNA, HMG-CoA-reductasa (Hmgcr) mRNA y mRNA de citrato sintasa y otros. En una realización preferida, el antagomir que es sustancialmente complementario a miR-122 es el antagomir-122 (Tabla 2a-e). Se ha descubierto que las deficiencias de aldolasa A están asociadas con una diversidad de trastornos, incluyendo anemia hemolítica, complejo de artrogriposis congénito, ectopia pituitaria, rabdomiólisis, hipercalemia. Los seres humanos que padecen deficiencias de aldolasa A también experimentan síntomas que incluyen retraso del crecimiento y del desarrollo, hipoplasia mediofacial, hepatomegalia, como también síntomas miopáticos. Por lo tanto, un ser humano que ha sido diagnosticado con estos trastornos o síntomas es candidato a recibir tratamiento con un antagomir que se hibrida a miR-122.

En una realización, la invención proporciona una molécula de ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA) incorporada a un complejo de asociación, tal como un liposoma, para inhibir la expresión de un gen en una célula o mamífero, en donde el dsRNA comprende una cadena antisentido que comprende una región de complementariedad que es complementaria a por lo menos una parte de un mRNA formado en la expresión del gen, y en donde la región de

complementaridad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, en general 19-24 nucleótidos de longitud, y en donde dicho dsRNA, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen, inhibe la expresión de dicho gen en por lo menos 40%. El dsRNA comprende dos cadenas ENA que son suficientemente complementarias para hibridarse a fin de formar una doble estructura. Una cadena del dsRNA (la cadena antisentido) comprende una región de complementaridad que es sustancialmente complementaria, y en general totalmente complementaria, a una secuencia diana, derivada de la secuencia de un mRNA formado durante la expresión de un gen, la otra cadena (la cadena sentido) comprende una región que es complementaria a la cadena antisentido, de modo tal que las dos cadenas se hibridan y forman una doble estructura cuando se combinan bajo condiciones adecuadas. En general, la doble estructura tiene entre 15 y 30, más en general entre 18 y 25, e incluso más en general entre 19 y 24, y lo más en general entre 19 y 21 pares de bases de longitud. De forma similar, la región de complementaridad a la secuencia diana tiene entre 15 y 30, más en general entre 18 y 25, incluso más en general entre 19 y 24, y lo más en general entre 19 y 21 nucleótidos de largo. El dsRNA de la invención puede además comprender uno o más salientes de nucleótidos monocatenarios. El dsRNA puede sintetizarse por métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en detalle a continuación, p. ej., por el uso de un sintetizador de DNA automático, como los comercializados, por ejemplo, por Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Los dsRNA adecuados para incorporar a los complejos de asociación descritos en esta memoria pueden incluir una doble estructura de 18 a 25 pares de bases (p. ej., 21 pares de bases). En algunas realizaciones, los dsRNA incluyen por lo menos una cadena que tiene por lo menos 21 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, los dsRNA incluyen por lo menos una cadena que tiene por lo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos.

Los dsRNA adecuados para incorporar a los complejos de asociación descritos en esta memoria pueden contener uno o más apareamientos incorrectos a la secuencia diana. En una realización preferida, el dsRNA contiene no más de 3 apareamientos incorrectos. Si la cadena antisentido del dsRNA contiene apareamientos incorrectos a una secuencia diana, es preferible que el área de apareamiento incorrecto no esté situada en el centro de la región de complementaridad. Si la cadena antisentido del dsRNA contiene apareamientos incorrectos a la secuencia diana, es preferible que el apareamiento incorrecto se limite a 5 nucleótidos desde cualquiera de los extremos, por ejemplo 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido desde el extremo 5' o 3' de la región de complementaridad.

En una realización, por lo menos un extremo del dsRNA tiene un saliente nucleotídico monocatenario de 1 a 4, en general 1 o 2 nucleótidos. En general, el saliente monocatenario está situado en el extremo terminal 3' de la cadena antisentido, o alternativamente, en el extremo terminal 3' de la cadena sentido. El dsRNA puede también tener un extremo romo, en general situado en el extremo 5' de la cadena antisentido. Dichos dsRNA tienen mejor estabilidad y actividad inhibitoria, permitiendo así la administración en bajas dosis, es decir, inferiores a 5 mg/kg diarios del peso corporal del receptor. En general, la cadena antisentido del dsRNA tiene un saliente nucleotídico en el extremo 3', y el extremo 5' está romo. En otra realización, uno o más nucleótidos en el saliente se reemplazan con un nucleósido tiofosfato.

Incluso en otra realización, un dsRNA incorporado a un complejo de asociación, tal como un liposoma, se modifica químicamente para potenciar la estabilidad. Dichos ácidos nucleicos pueden sintetizarse y/o modificarse por métodos bien consolidados en la técnica, como aquellos descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE. UU. Las modificaciones químicas pueden incluir, aunque sin limitarse a ello, modificaciones en 2', modificaciones en otros sitios del azúcar o la base de un oligonucleótido, introducción de bases no naturales en la cadena del oligonucleótido, unión covalente a un ligando o resto químico y reemplazo de enlaces fosfato internucleotídicos con enlaces alternados tales como tiofosfatos. Se puede emplear más de una de dichas modificaciones.

La unión química de las dos cadenas separadas de dsRNA se puede lograr con cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas, por ejemplo introduciendo enlaces covalente, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals o apilamiento; mediante coordinación de iones de metales, o a través del uso de análogos de purina. Dichos dsRNA químicamente unidos son adecuados para incorporar a los complejos de asociación descritos en la presente memoria. En general, los grupos químicos que se pueden usar para modificar el dsRNA incluyen, sin limitación, azul de metileno; grupos bifuncionales en general bis-(2- cloroetil)amina; N-acetil-N'-(p-gluoxilbenzoil)cistamina; 4-tiouracilo; y psoralen. En una realización, el enlazador es un enlazador de hexaetilenglicol. En este caso, los dsRNA se producen por síntesis de fase sólida y se incorpora el enlazador de hexaetilenglicol de acuerdo con métodos convencionales (p. ej., Williams, D.J. y K.B. Hall, Biochem. (1996) 35:14665-14670). En una realización particular, el extremo 5' de la cadena antisentido y el extremo 3' de la cadena sentido se unen químicamente mediante un enlazador de hexaetilenglicol. En otra realización, por lo menos un nucleótido del dsRNA comprende grupos fosforotioato o fosforoditioato. La unión química en los extremos del dsRNA se forma generalmente por enlaces de triple hélice.

Incluso en otra realización, los nucleótidos en una o ambas cadenas sencillas pueden modificarse para prevenir o inhibir las actividades de degradación de las enzimas celulares, por ejemplo, sin limitación, ciertas nucleasas. Las técnicas para inhibir la actividad de degradación de las enzimas celulares contra ácidos nucleicos se conocen en el campo, incluyendo sin limitación modificaciones en 2'-amino, modificaciones en 2'-amino azúcar, modificaciones en 2'-F azúcar, modificaciones en 2'-F, modificaciones en 2'-alquilo azúcar, modificaciones en 2'-O-alcoxilalquilo como modificaciones de la cadena principal no cargadas y cargadas en 2'-O-metoxietilo, modificaciones de morfolino,

modificaciones en 2'-O-metilo y fosforamidato (véase, p. ej., Wagner, *Nat. Med.* (1995) 1:1116-8). Por ende, por lo menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un dsRNA se reemplaza con un grupo químico, en general con un grupo 2'-F o 2'-O-metilo. A su vez, por lo menos un nucleótido puede ser modificado para formar un nucleótido bloqueado. Dicho nucleótido bloqueado contiene un puente de metileno que conecta el oxígeno de ribosa 2' con el carbono de ribosa 4'. Los oligonucleótidos que contienen el nucleótido bloqueado se describen en Koshkin, A. A., et al., *Tetrahedron* (1998), 54: 3607-3630) y en Obika, S. et al., *Tetrahedron Lett* (1998), 39: 5401-5404). La introducción de un nucleótido bloqueado en un oligonucleótido mejora la afinidad hacia secuencias complementarias y aumenta la temperatura de fusión en varios grados (Braasch, D. A. and D.R. Corey, *Chem. Biol.* (2001), 8:1-7).

Conjugar un ligando a un dsRNA puede potenciar su absorción celular como también dirigirse a un tejido particular o absorción por tipos específicos de células tales como células hepáticas. En ciertos casos, un ligando hidrófobo se conjuga al dsRNA para facilitar la permeación directa de la membrana celular y captar las células hepáticas. Alternativamente, el ligando conjugado al dsRNA es un sustrato para endocitosis mediada por receptores. Estos planteamientos se han utilizado para facilitar la permeación celular de oligonucleótidos antisentido, como también agentes de dsRNA. Por ejemplo, el colesterol se ha conjugado a diversos oligonucleótidos antisentido resultando en compuestos que son sustancialmente más activos en comparación con sus análogos no conjugados. Véase M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002, 12, 103. Otros compuestos lipófilos que se han conjugado a oligonucleótidos incluyen ácido 1-pireno butírico, 1:3-bis-O-(hexadecil)glicerol y mentol. Un ejemplo de un ligando hacia endocitosis mediada por receptores es ácido fólico. El ácido fólico ingresa en la célula mediante endocitosis mediada por los receptores de folato. Los compuestos de dsRNA que contienen ácido fólico se transportarían de manera eficiente hacia la célula mediante la endocitosis mediada por los receptores de folato. Li y colegas describen que la unión de ácido fólico al término 3' de un oligonucleótido produjo un incremento de 8 veces en la absorción celular del oligonucleótido. Li, S.; Deshmukh, H. M.; Huang, L. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1540. Otros ligandos que se han conjugado a oligonucleótidos incluyen polietilenglicoles, agrupamientos de carbohidratos, agentes de reticulación, conjugados de porfirina, péptidos y lípidos de administración tales como colesterol. Otras modificaciones químicas para los siRNA se han descrito en Manoharan, M. *RNA interference and chemically modified small interfering RNAs, Current Opinion in Chemical Biology* (2004), 8(6), 570-575.

En algunos casos, la conjugación de un ligando catiónico a oligonucleótidos produce una mejor resistencia a nucleasas. Los ejemplos representativos de ligandos catiónicos son propilamonio y dimetilpropilamonio. Cabe destacar que se describió que los oligonucleótidos antisentido retienen su gran afinidad de unión hacia mRNA cuando el ligando catiónico se dispersó por el oligonucleótido. Véase M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002,12, 103 y referencias allí citadas.

El dsRNA conjugado al ligando puede sintetizarse con el uso de un dsRNA que porta una funcionalidad reactiva colgante, tal como aquella derivada de la unión de una molécula de enlace al dsRNA. Este oligonucleótido activo puede hacerse reaccionar directamente con ligandos comercialmente disponibles, ligandos que se sintetizan portando cualquiera de una diversidad de grupos protectores o ligandos que tienen un resto de unión unido allí. Los métodos descritos en esta memoria facilitan la síntesis de dsRNA conjugado a ligando mediante el uso de, en algunas realizaciones preferidas, monómeros de nucleósido que han sido apropiadamente conjugados con ligandos y que pueden además unirse a un material de soporte sólido. Dichos conjugados de ligando-nucleósido, opcionalmente unidos a un material de soporte sólido, se preparan de acuerdo con algunas realizaciones preferidas por reacción de un ligando de unión al suero seleccionado con un resto de enlace situado en la posición 5' de un nucleósido u oligonucleótido. En ciertos casos, un dsRNA que porta un ligando de aralquilo unido al término 3' del dsRNA se prepara uniendo primero covalentemente un bloque de construcción monomérico a un soporte de vidrio de poro controlado mediante un grupo de aminoalquilo de cadena larga. Luego, los nucleótidos se unen a través de técnicas de síntesis de fase sólida estándar al bloque de construcción monomérico unido al soporte sólido. El bloque de construcción monomérico puede ser un nucleósido u otro compuesto orgánico compatible con síntesis de fase sólida;

El dsRNA utilizado en los conjugados puede conveniente y rutinariamente prepararse a través de la técnica conocida de síntesis de fase sólida. Los equipos para dicha síntesis son comercializados por varios representantes, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquiera otro método para dicha síntesis conocido en la técnica puede emplearse adicional o alternativamente. También se conoce el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, como fosforotioatos y derivados alquilados.

Las descripciones respecto de la síntesis de oligonucleótidos modificados particulares puede hallarse en las siguientes patentes estadounidenses: patentes de Estados Unidos núm. 138.045 y 5.218.105, referidas a oligonucleótidos conjugados a poliamina; patente de Estados Unidos núm. 5.212.295, referida a monómeros para la preparación de oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quirales; patentes de Estados Unidos núm. 5.378.825 y 5.541.307, referidas a oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas; patente de Estados Unidos núm. 5.386.023, referidas a oligonucleótidos con cadenas principales modificadas y a su preparación, a través de acoplamiento reductor; patente de Estados Unidos núm. 5.457.191, referida a nucleobases modificadas basadas en el sistema de anillo 3-deazapurina y sus métodos de síntesis; patente de Estados Unidos núm. 5.459.255 referida a nucleobases modificadas basadas en purinas sustituidas en N-2; patente de Estados Unidos núm. 5.521.302, referida a procedimientos para preparar oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quirales; patente de Estados

Unidos núm. 5.539.082 referida a ácidos nucleicos peptídicos; patente de Estados Unidos núm. 5.554.746 referida a oligonucleótidos que tienen cadenas principales de lactama; patente de Estados Unidos núm. 5.571.902 referida a métodos y materiales para la síntesis de oligonucleótidos; patente de Estados Unidos núm. 5.578.718 referida a nucleósidos que tienen grupos alquiltio, en donde dichos grupos se pueden usar como enlazadores a otros restos unidos en cualquiera de una diversidad de posiciones del nucleósido; patentes de Estados Unidos núm. 5.557.361 y 5.599.797, referidas a oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato de alta pureza quiral; patente de Estados Unidos núm. 5.50.351, referida a procedimientos para la preparación de 2'-O-alkil ganosina y compuestos relacionados, incluyendo compuestos 2,6-diaminopurina; patente de Estados Unidos núm. 5.587.469 referida a oligonucleótidos que tienen purinas sustituidas en N-2; patente de Estados Unidos núm. 5.587.470 referida a oligonucleótidos que tienen 3-deazapurinas; patente de Estados Unidos núm. 5.223.108 y patente de Estados Unidos núm. 5.608.046, ambas referidas a análogos de 4'-desmetil nucleósido conjugados; patentes de Estados Unidos núm. 5.602.240 y 5.610.289, referidas a análogos de oligonucleótidos con la cadena principal modificada; patentes de Estados Unidos núm. 6.262.241 y 5.459.255, referidas, entre otros, a métodos para sintetizar 2'-fluoro-oligonucleótidos.

En el dsRNA conjugado a ligando y en la molécula de ligando que porta nucleósidos unidos específicos de secuencias, los oligonucleótidos y los oligonucleósidos pueden ensamblarse en un DNA adecuado sintetizado usando precursores convencionales de nucleótidos o nucleósidos, o precursores de conjugados de nucleótidos o nucleósidos que ya portan el resto de enlace, precursores de de ligando-nucleótido o de conjugados de nucleósidos que ya portan la molécula de ligando o los bloques de construcción que portan no nucleósido-ligando.

Cuando se usan precursores de conjugado de nucleótidos que ya portan un resto de enlace, la síntesis de los nucleósidos unidos específicos de las secuencias típicamente se completa, y la molécula de ligando se hace reaccionar entonces con el resto de enlace para formar el oligonucleótido conjugado a ligando. Los conjugados de oligonucleótidos que portan una variedad de moléculas tales como esteroides, vitaminas, lípidos y moléculas indicadoras ya han sido descritos (véase Manoharan et al., solicitud PCT WO 93/07883). En una realización preferida, los oligonucleótidos o los nucleósidos unidos se sintetizan con un sintetizador automático usando fosforoamiditas derivadas de los conjugados ligando-nucleósido, además de las fosforoamiditas convencionales y las fosforoamiditas no convencionales comerciales y rutinariamente empleadas en la síntesis de oligonucleótidos.

Los dsRNA incorporados a los complejos de asociación descritos en este documento pueden incluir uno o más nucleósidos modificados, p. ej., un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-alilo, 2'-O-aminoalquilo o 2'-desoxi-2'-fluoro en los nucleósidos. Dichas modificaciones confieren mejores propiedades de hibridación al oligonucleótido. Otros oligonucleótidos que contienen cadenas principales de fosforotioato poseen mejor estabilidad de nucleasa. Por lo tanto, los nucleósidos unidos funcionalizados pueden aumentarse para incluir alguna o ambas cadenas principales o un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-aminoalquilo, 2'-O-alilo o 2'-desoxi-2'-fluoro. Una lista resumida de algunas de las modificaciones de oligonucleótidos conocidas en la técnica se halla, por ejemplo, en la publicación, PCT WO 200370918.

En algunas realizaciones, las secuencias de nucleósidos funcionalizados que poseen un grupo amino en el término 5' se preparan usando un sintetizador de DNA, y luego se hacen reaccionar con un derivado de éster activo de un ligando seleccionado. Los expertos en la técnica conocen los derivados de éster activo. Los ésteres activos representativos incluyen ésteres de N-hidrosuccinimida, ésteres tetrafluorofenólicos, ésteres pentafluorofenólicos y ésteres pentaclorofenólicos. La reacción del grupo amino y el éster activo produce un oligonucleótido en el que el ligando seleccionado se une a la posición 5' a través de un grupo de enlace. El grupo amino en el término 5' puede prepararse utilizando un reactivo 5'-Amino-Modificador C6. En una realización, las moléculas de ligando pueden conjugarse a oligonucleótidos en la posición 5' mediante el uso de un ligando-nucleósido fosforoamidita en donde el ligando está unido al grupo 5'-hidroxi directa o indirectamente mediante un enlazador. Dichos ligando-nucleósido fosforoamiditas se emplean típicamente al final de un procedimiento de síntesis automática para proporcionar un oligonucleótido conjugado a ligando que porta el ligando en el término 5'.

Los ejemplos de enlaces o cadenas principales de internucleósidos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfortriésteres, aminoalquilfosfortriésteres, metilo y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquileo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforoamidatos incluyendo 3'-amino fosforoamidato y aminoalquilfosforoamidatos, tionofosforoamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfortriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos a 2'-5' de éstos, y aquellos que tienen polaridad invertida, en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos son 3'-5' unidos a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que se refieren a la preparación de los enlaces que contienen átomos de fósforo anteriores incluyen, aunque sin limitarse a ello, las patentes de Estados Unidos núm. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.737; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; y 5.697.248.

Los ejemplos de enlaces o cadenas principales de internucleósidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en ellos (es decir, oligonucleósidos) tienen cadenas principales formadas por enlaces interazúcar de cicloalquilo o

alquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces de interazúcar de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces de interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formaceto y tioformaceto; cadenas principales de formaceto y tioformaceto; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen componentes mixtos de N, O, S y CH<sub>2</sub>.

Las patentes de Estados Unidos representativas que se refieren a la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, aunque sin limitarse a ello, las patentes de Estados Unidos núm. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240. 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En ciertos casos, un oligonucleótido incluido en un complejo de asociación, tal como un liposoma, puede modificarse con un grupo no ligado. Un número de moléculas de no ligado se han conjugado a oligonucleótidos con el fin de potenciar la actividad, la distribución celular o la absorción celular del oligonucleótido, y los procedimientos para efectuar dichas conjugaciones están disponibles en la bibliografía científica. Dichos restos no ligados han incluido restos de lípidos, tales como colesterol (Letsinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86:6553), ácido fólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053), un tioéter, p. ej., hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765), un tiocolésterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), una cadena alifática, p. ej., residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochim. Biophys. Acta, 1993, 75:49), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651), un resto palmitil (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229), o una octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolésterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923). Las patentes de Estados Unidos representativas describen la preparación de dichos conjugados de oligonucleótido mencionados anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de oligonucleótidos que portan un aminoenzimador en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace luego reaccionar con la molécula que se está conjugando usando acoplamiento o reactivos de activación apropiados. La reacción de conjugación se puede efectuar o bien con el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido, o después de la escisión del oligonucleótido en fase de disolución. La purificación del conjugado de oligonucleótido por HPLC típicamente proporciona el conjugado puro.

Las modificaciones descritas anteriormente son apropiadas para uso con un agente de oligonucleótidos descrito en esta memoria.

#### Lípidos fusogénicos

El término "fusogénico" se refiere a la capacidad de un lípido u otro sistema de administración de fármacos de condensarse con las membranas de una célula. Las membranas pueden ser o bien la membrana plasmática o membranas que rodean organelos, p. ej., endosoma, núcleo, etc. Los ejemplos de lípidos fusogénicos adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), DODAC, DODMA, DODAP o DLinDMA. En algunas realizaciones, el complejo de asociación incluye una molécula pequeña tal como un resto imidazol conjugado a un lípido, por ejemplo, para liberación de endosomas.

Además de lípidos catiónicos y fusogénicos, los complejos de asociación incluyen un componente de estabilización bicapa (BSC) tal como un ATTA-lípido o un PEG-lípido. Los lípidos ilustrativos son los siguientes: PEG acoplado a dialquiloilpropilol (PEG-DAA) como se describe, p. ej., en el documento WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) como se describe, p. ej., en las publicaciones de patente de Estados Unidos núm. 20030077829 y 2005008689, PEG acoplado a fosfatidiletanolamina (PE) (PEG-PE) o PEG conjugado a ceramidas, o una de sus mezclas (véase, la patente de Estados Unidos núm. 5.885.613). En una realización preferida, la asociación incluye un lípido de PEG descrito en esta memoria, por ejemplo un lípido de PEG de fórmula (XV), (XV') o (XVI). En una realización preferida, el BSC es un lípido conjugado que inhibe la agregación de los SPLP. Los lípidos conjugados adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, conjugados de PEG-lípido, conjugados de ATTA-lípido, conjugados de polímero catiónico-lípido (CPL) o sus mezclas. En una realización preferida, los SPLP comprenden o bien un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido junto con un CPL.

PEG es un polietilenglicol, un polímero lineal soluble en agua de unidades de repetición de PEG y etileno con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons, y PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5.000 daltons. Los PEG son comercializados por Sigma Chemical Co. y otras empresas, e incluyen, por ejemplo, lo siguiente: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-HH.sub.2), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG- TRES), monometoxipolietilenglicol ácido-

imidazolil-carbonilo (MePEG-IM). Además, el ácido monometoxipoli(etilenglicol)-acético (MePEG-CH.sub.SCOOH), es particularmente útil para preparar los conjugados de PEG-lípido incluyendo, p. ej., conjugados de PEG-DAA.

5 En una realización preferida, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 550 daltons a aproximadamente 10.000 daltons, más preferiblemente de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, más preferiblemente de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, más preferiblemente de aproximadamente 1.500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons e incluso más preferiblemente de aproximadamente 2.000 daltons a aproximadamente 750 daltons. El PEG puede estar opcionalmente sustituido con un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG puede conjugarse directamente al lípido o puede unirse al lípido mediante un resto enlazador. Puede usarse cualquier resto enlazador adecuado para acoplamiento del PEG a un lípido, incluyendo p. ej., restos enlazadores que no contienen éster y restos enlazadores que contienen éster. En una realización preferida, el resto enlazador es un resto enlazador que no contiene éster. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "resto enlazador que no contiene éster" se refiere a un resto enlazador que no contiene un enlace de éster carboxílico (--OC(O)--). Los restos enlazadores que no contienen éster adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, amido (--C(O)NH--), amino (--NR--), carbonilo (--C(O)--), carbamato (--NHC(O)O--), urea (--NHC(O)NH--), disulfuro (--S--S--), éter (--O--), succinilo (--(O)CCH.sub.2CH.Sub.2C(O)--), succinamidilo (--NHC(O)CH.sub.2CH.sub.2C(O)-)NH--), éter, disulfuro, etc. como también sus combinaciones (como un enlazador que contiene tanto un resto enlazador carbamato como un resto enlazador amido). En una realización preferida, se usa un enlazador carbamato para acoplar el PEG al lípido.

10 En otras realizaciones, se usa un resto enlazador que contiene éster para acoplar el PEG al lípido. Los restos enlazadores que contienen éster adecuados incluyen, p. ej., carbonato (--OC(O)O--), succinoilo, ésteres de fosfato (-O--(O)POH--O--), ésteres de sulfonato y sus combinaciones.

#### Agentes de direccionamiento

En algunas realizaciones, los complejos de asociación incluyen un agente de direccionamiento. Por ejemplo, un agente de direccionamiento puede incluirse en la superficie del complejo de asociación (p. ej., liposoma) para ayudar a dirigir el complejo de asociación hacia un área diana del cuerpo.

15 Un ejemplo de agentes de direccionamiento consiste en galactosa, manosa y folato. Otros ejemplos de agentes de direccionamiento incluyen receptores de moléculas pequeñas, péptidos y anticuerpos. En algunas realizaciones, el agente de direccionamiento se conjuga al resto terapéutico tal como un agente de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une directamente a un componente de lípido de un complejo de asociación. En algunas realizaciones, el resto de direccionamiento se une directamente al componente de lípido mediante PEG, preferiblemente con PEG de peso molecular promedio de 2000 amu. En algunas realizaciones, el agente de direccionamiento no está conjugado, por ejemplo, a la superficie del complejo de asociación.

#### Componentes estructurales

En algunas realizaciones, el complejo de asociación incluye uno o más componentes que mejoran la estructura del complejo (p. ej., liposoma). En algunas realizaciones, un agente terapéutico tal como dsRNA puede unirse (p. ej., conjugarse) a un compuesto lipófilo tal como colesterol, proporcionando así un anclaje lipófilo al dsRNA. En algunas realizaciones, la conjugación de dsRNA a un resto lipófilo tal como colesterol puede mejorar la eficiencia de encapsulación del complejo de asociación.

20 Los complejos de asociación tales como liposomas son en general partículas con diámetro hidrodinámico que oscilan entre aproximadamente 25 nm y 500 nm. En algunas realizaciones preferidas, los complejos de asociación tienen menos de 500 nm, p. ej., entre aproximadamente 25 y aproximadamente 400 nm, p. ej., entre aproximadamente 25 nm y aproximadamente 300 nm, preferiblemente aproximadamente 120 nm o menos.

En algunas realizaciones, la relación en peso de los excipientes totales dentro del complejo de asociación a RNA es inferior a aproximadamente 20:1, por ejemplo aproximadamente 15:1. En algunas realizaciones preferidas, la relación en peso es inferior a 10:1, por ejemplo aproximadamente 7.5:1.

En algunas realizaciones, el complejo de asociación tiene un pKa tal que el complejo de asociación se protona bajo condiciones endosomales (p. ej., facilitando la ruptura del complejo), pero no se protona bajo condiciones fisiológicas.

En algunas realizaciones, el complejo de asociación proporciona mejor administración *in vivo* de un oligonucleótido tal como dsRNA. La administración *in vivo* de un oligonucleótido puede medirse usando un ensayo de silenciamiento de genes, por ejemplo un ensayo que mida el silenciamiento del Factor VII.

#### Experimentos de silenciamiento del Factor VII *in vivo*

Ratones C57BL/6 recibieron en la vena del rabo inyecciones de disolución salina o de diversas formulaciones de lípidos. Los siRNA formulados con lípidos se administran en dosis variables en un volumen de inyección de 10 µl/g por peso corporal del animal. Veinticuatro horas después de la administración, se recogen muestras del suero por

sangrado retrorobital. Las concentraciones del Factor VII en el suero se determinan usando un kit de diagnóstico cromogénico (Coaset Factor VII Assay Kit, DiaPharma) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

#### Métodos para preparar complejos de asociación

5 En algunas realizaciones, un complejo de asociación se prepara poniendo en contacto un agente terapéutico tal como un oligonucleótido con un lípido en presencia de un disolvente y un tampón. En algunas realizaciones, se incluye una pluralidad de lípidos en el disolvente, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos (p. ej., un lípido que contiene poliamina o un lípido que incluye un resto bioescindible como se describe en esta memoria), un lípido de PEG, un lípido de direccionamiento o un lípido fusogénico.

10 En algunas realizaciones, el tampón es lo suficientemente resistente como para protonar sustancialmente todas las aminas de un lípido que contiene aminas, tal como el lípido descrito en la presente memoria, p. ej., un lípido de fórmula (I) o de fórmula (X).

En algunas realizaciones, el tampón es un tampón de acetato, tal como acetato de sodio (pH de aproximadamente 5). En algunas realizaciones, el tampón está presente en disolución a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM.

15 En algunas realizaciones, el disolvente es etanol. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la mezcla incluye por lo menos aproximadamente 90% etanol o 100% etanol.

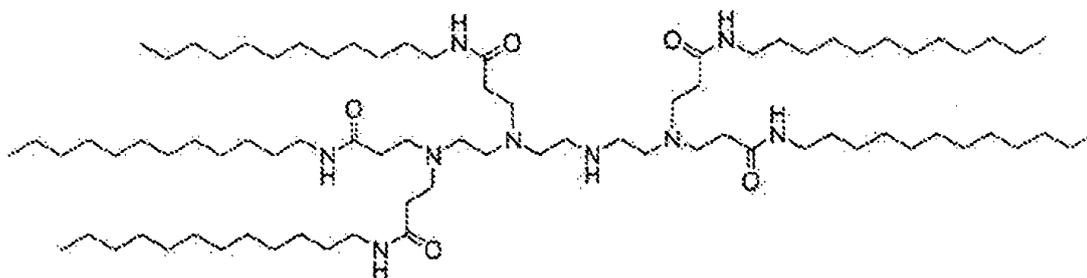
20 En algunas realizaciones, el método incluye extrusar la mezcla para proporcionar complejos de asociación que tienen partículas de un tamaño con diámetro hidrodinámico inferior a aproximadamente 500 nm (p. ej., un tamaño de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 300 nm, por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, los tamaños de partículas oscilan entre aproximadamente 40 y 120 nm). En algunas realizaciones, el método no incluye extrusión de la mezcla.

25 En una realización, un liposoma se prepara proporcionando una disolución de un lípido descrito en este documento mezclado en una disolución con colesterol, PEG, etanol y tampón de acetato 25 mM para proveer una mezcla de aproximadamente pH 5. La mezcla se agita suavemente en vórtex y se le añade sacarosa. La mezcla luego se vuelve a agitar en vórtex hasta que se disuelve la sacarosa. A esta mezcla se le añade una disolución de siRNA en tampón de acetato, se agita ligeramente en vórtex durante aproximadamente 20 minutos. La mezcla luego se extrusa (p. ej., por lo menos aproximadamente 10 veces, p. ej., 11 veces o más) a través de por lo menos un filtro (p. ej., dos filtros de 200 nm) a 40° C y se dializa contra PBS a pH 7,4 durante aproximadamente 90 minutos a TA.

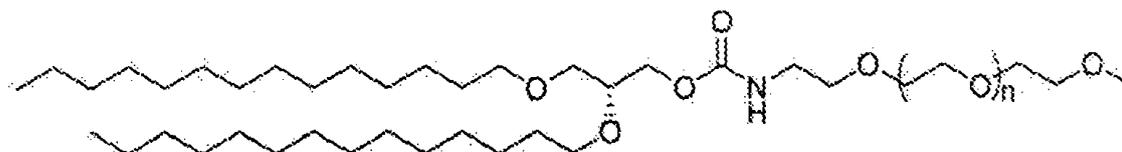
30 En una realización, se prepara un liposoma sin extrusar la mezcla de liposomas. Un lípido descrito en la presente memoria se combina con colesterol, PEG y siRNA en etanol al 100%, agua y tampón de acetato que tiene una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM (pH de aproximadamente 5). La combinación se mezcla rápidamente en etanol al 90%. Tras completarse, la mezcla se dializa (o se trata con ultrafiltración) contra un tampón de acetato que tiene una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM (pH de aproximadamente 5) para eliminar el etanol, y luego se dializa (o se trata con ultrafiltración) contra PBS para cambiar las condiciones del tampón.

35 Los complejos de asociación pueden formarse en ausencia de un agente terapéutico tal como ácido nucleico monocatenario o bicatenario, y luego, tras la formación, tratarse con uno o más restos de ácido nucleico monocatenario o bicatenario terapéuticamente activos para proporcionar un complejo de asociación cargado, es decir, un complejo de asociación que está cargado con los ácidos nucleicos terapéuticamente activos. El ácido nucleico puede estar atrapado dentro del complejo de asociación, adsorbido a la superficie del complejo de asociación o ambos. Por ejemplo, se pueden usar los métodos para formar complejos de asociación tales como los liposomas anteriormente mencionados para formar complejos de asociación libres de un agente terapéutico, como un ácido nucleico, por ejemplo RNA monocatenario o bicatenario, tal como siRNA. Tras la formación del complejo de asociación, el complejo puede tratarse con el agente terapéutico tal como siRNA para proveer un complejo de asociación cargado.

45 En una realización, una mezcla que incluye lípido catiónico tal como un lípido descrito en la fórmula (I), preferiblemente un lípido catiónico de la siguiente fórmula



colesterol y un lípido de PEG, por ejemplo un lípido de PEG descrito en este documento, tal como el lípido de PEG siguiente,



5 se proveen en etanol (p. ej., etanol al 100%) y se combinan con un tampón acuoso tal como NaOAc acuoso, para dar complejos de asociación no cargados. Los complejos de asociación luego se extrusan opcionalmente, proporcionando una distribución de tamaño más uniforme de los complejos de asociación. Los complejos de asociación luego se tratan con el agente terapéutico tal como siRNA en etanol (p. ej., etanol al 35%) para proporcionar así un complejo de asociación cargado. En algunas realizaciones, el complejo de asociación se trata luego con un procedimiento que elimina el etanol, tal como diálisis.

#### Caracterización de complejos de asociación

Los complejos de asociación preparados por cualquiera de los métodos anteriormente mencionados se caracterizan en un modo similar. Los complejos de asociación se caracterizan primero por inspección visual. En general, los complejos de asociación preferidos son disoluciones blancuzcas translúcidas libres de agregados o sedimentos. El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas de lípidos se miden por dispersión de luz dinámica usando un aparato Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EE. UU.). Las partículas preferidas tienen un tamaño de 20-300 nm, más preferiblemente 40-100 nm. En algunas realizaciones preferidas, la distribución del tamaño de partícula es unimodal. La concentración de siRNA total en la formulación, como también la fracción atrapada, se estima usando un ensayo de exclusión de tinte. Una muestra del siRNA formulado se incuba con el tinte de unión a RNA Ribogreen (Molecular Probes) en presencia o ausencia de una formulación de tensioactivo de ruptura, 0,5% Triton-X100. El siRNA total en la formulación se determina por la señal de la muestra que contiene el tensioactivo, en relación con una curva estándar. La fracción atrapada se determina restando el contenido de siRNA "libre" (según lo medido por la señal en ausencia de tensioactivo) del contenido de siRNA total. El porcentaje de siRNA atrapado es típicamente >85%.

25 Métodos para usar complejos de asociación y composiciones que los incluyen

#### Composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de oligonucleótidos

Un agente de oligonucleótidos ensamblado en un complejo de asociación puede administrarse, p. ej., a una célula o a un ser humano, en una configuración monocatenaria o bicatenaria. Un agente de oligonucleótidos que está en una configuración bicatenaria está unido a una cadena de oligonucleótidos sustancialmente complementaria. La administración de un agente de oligonucleótidos en una configuración bicatenaria puede conferir ciertas ventajas al agente de oligonucleótidos, tal como mayor resistencia a las nucleasas.

En una realización, se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas que incluyen un agente de oligonucleótidos incorporado a un complejo de asociación, tal como un liposoma, como se describe en esta memoria, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que comprende el agente de oligonucleótidos incorporado es útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad de un gen diana, tal como un proceso patológico que puede ser mediado por la disminución de la expresión del gen. Dichas composiciones farmacéuticas se formulan en base al modo de administración. Un ejemplo consiste en las composiciones que se formulan para administrar a un órgano/tejido específico, tal como el hígado, mediante administración parenteral.

40 Las composiciones farmacéuticas se administran en dosis suficientes para inhibir la expresión de un gen diana.

En general, una dosis adecuada de un agente de oligonucleótidos incorporado será tal que el agente de oligonucleótidos administrado oscile entre 0,01 y 5,0 miligramos diarios por kilo de peso corporal del receptor, en

general entre 1 microgramo y 1 mg diarios por kilo de peso corporal. La composición farmacéutica puede administrarse una vez al día, o el agente de oligonucleótidos puede administrarse como dos, tres o más subdosis en intervalos apropiados durante el día, o incluso usando infusión continua, o administrarse a través de una formulación de liberación controlada. En ese caso, el agente de oligonucleótidos contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente más pequeño con el fin de lograr la dosis diaria total. La unidad de dosificación puede también combinarse para administrarse durante varios días, p. ej., usando una formulación de liberación sostenida convencional que provea liberación sostenida del agente de oligonucleótidos incorporado durante un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida se conocen en la técnica.

El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo sin limitación la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Asimismo, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un tratamiento individual o una serie de tratamientos. Las estimaciones de dosis eficaces y semividas *in vivo* para los agentes de oligonucleótidos individuales incorporados a los complejos de asociación se pueden efectuar usando metodologías convencionales o basándose en ensayos *in vivo*, usando un modelo animal apropiado, como se describe en otras partes de la presente memoria.

Los avances en la genética del ratón han generado una serie de modelos de ratones para estudio de diversas enfermedades humanas. Dichos modelos se emplean para ensayos *in vivo* de agentes de oligonucleótidos incorporados en composiciones lipófilas, como también para determinar una dosis terapéuticamente eficaz.

Se puede emplear cualquier método para administrar un agente de oligonucleótidos incorporado a un complejo de asociación, tal como un liposoma, a un mamífero. Por ejemplo, la administración puede ser directa; oral; o parenteral (p. ej., inyección subcutánea, intraventricular, intramuscular o intraperitoneal, o por goteo intravenoso). La administración puede ser rápida (p. ej., por inyección), o puede tener lugar durante un período de tiempo (p. ej., por infusión lenta o administración de formulaciones de liberación lenta).

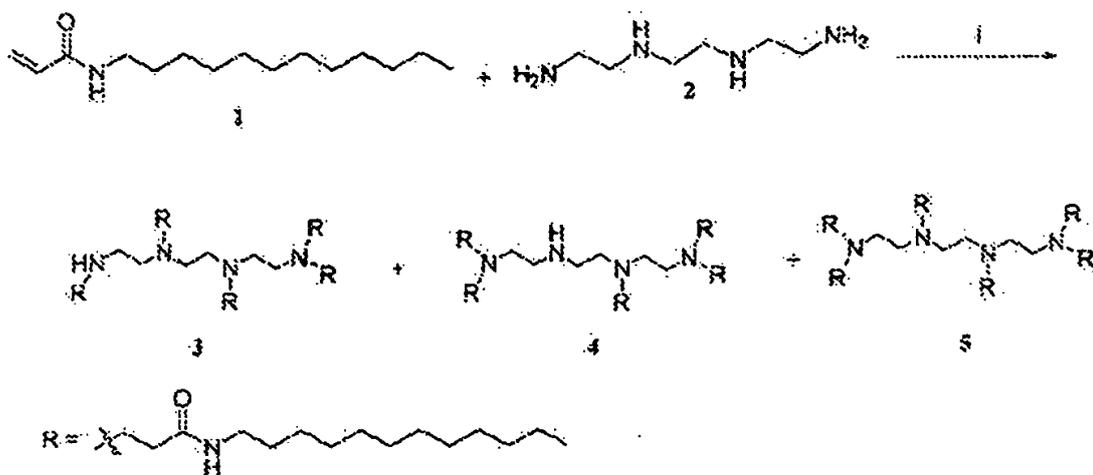
Un agente de oligonucleótidos incorporado a un complejo de asociación puede formularse en composiciones tales como disoluciones estériles y no estériles acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones en bases oleosas líquidas o sólidas. Dichas disoluciones pueden también contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Para administración parenteral, intratecal o intraventricular, un agente de oligonucleótidos puede formularse en composiciones tales como disoluciones acuosas estériles, que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados (p. ej., potenciadores de penetración, compuestos vehículo y otros vehículos farmacéuticamente aceptables).

Los agentes de oligonucleótidos incorporados a un complejo de asociación pueden formularse en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" (también denominado en este documento "excipiente") es un disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte que sea farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos o sólidos, y pueden seleccionarse teniendo en cuenta la manera de administración planificada como para proporcionar el volumen y la consistencia deseados, como también otras propiedades de transporte y químicas pertinentes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables típicos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, agua, disolución salina; agentes de unión (p. ej., polivinilpirrolidona o hidropropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa y otros azúcares, gelatina o sulfato de calcio); lubricantes (p. ej., almidón, polietilenglicol o acetato de sodio); desintegrantes (p. ej., almidón o glicolato de almidón y sodio); y agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico).

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis y purificación de compuestos 3,4 y 4,5: alquilación de trietilentetramina bajo condición de adición de Michael - método 1 (Esquema I) (Ejemplo de referencia)

Esquema 1<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) 90° C, puro, 5 días

En un frasco a presión de 350 ml se recogió N-dodecilacrilamida 1 (84 g, 0,35 mol) [Slee, Deborah H.; Romano, Suzanne J.; Yu, Jinghua; Nguyen, Truc N.; John, Judy K.; Raheja, Neil K.; Axe, Frank U.; Johes, Todd K.; Ripka, William C. Journal of Medicinal Chemistry (2001), 44(13), 2094-2107], y se fusionó el sólido bajo argón calentando suavemente el recipiente. A esto se le añadió trietilentetramina 2 (10,2 g, 0,07 mol) y la mezcla se calentó a 90° C durante 5 días. La adición de Michael de trietilentetramina 2 a la acrilamida 1 proporcionó dos productos alquilados cinco y seis junto con cantidades menores de productos poco alquilados bajo condición de reacción pura. La mezcla de reacción se analizó por TLC usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (90:5:5) como el eluyente. La TLC indicó que se había consumido prácticamente toda la acrilamida de partida 1. La mezcla de reacción se disolvió en diclorometano (40 ml), se cargó en una columna pre-rellena de ge de sílice, y la mezcla se separó usando el eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (48:1:1 a 8:1:1). Con el fin de lograr la separación completa, se realizaron múltiples columna empleando las mismas adiciones, y se obtuvieron los siguientes productos puros. Los productos de cinco adiciones 3 y 4 requeridos se aislaron junto con el producto de seis adiciones 5. En esta mezcla de reacción, algunos de los productos de adición inferiores también se detectaron en la TLC y en la LC-MS de la mezcla de reacción en bruto.

N-Dodecil-3-((2-dodecilcarbamoil-etil)-{2-[(2-dodecilcarbamoil-etil)-2-((2-dodecilcarbamoil-etil)-[2-(2-dodecilcarbamoil-etilamino)-etil]-amino)-etil]-amino)-etil-amino)propionamida. Uno de los dos derivados 5-alquilados, el compuesto 3 (isómero I), se aisló en forma de una espuma amarilla (12 g, 13%). MS m/z 672 (M+2H/2), 448 (M+3H/3). <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0,87 (t, J = 6,5Hz, 15H), 1,20-1,39 (m, 92H), 1,46-1,57 (m, 12H), 2,20-2,50 (m, 16H), 2,60-2,78 (m, 10H), 3,10-3,25 (m, 12H), 6,98 (bs, 3H), 7,41 (bs, 1H), 7,63 (bs, 1H), 8,85 (bs, 1H). <sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> δ 14,33, 22,90, 27,37, 29,59, 29,67, 29,88, 29,89, 29,92, 32,13, 39,74, 172,77.

(3-((2-((2-((2-Bis-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino)-etil)-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino)-etilamino)-etil)-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino)-N-dodecil-propionamida). El segundo derivado 5-alquilado, compuesto 4 (isómero II) se aisló en forma de un polvo blanco (13,7 g, 14%), MS m/z 672 (M+2H/2), 448 (M+3H/3), <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0,87 (t, J = 6,5Hz, 15H), 1,20-1,39 (m, 92H), 1,44-1,54 (m, 12H), 2,30-2,45 (m, 8H), 2,46-2,54 (m, 8H), 2,55-2,85 (m, 10H), 3,15-3,30 (m, 12H), 6,98 (bs, 3H), 7,41 (bs, 1H), 7,63 (bs, 1H), 8,85 (bs, 1H). <sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> δ 14,33, 22,89, 27,28, 27,38, 29,59, 29,69, 29,88, 29,89, 29,92, 32,13, 39,65, 39,74, 50,84, 172,63, 172,75, 172,81.

Junto con esto, también se aisló una mezcla pura de los compuestos 3 y 4 (11,6 g, 12%) en una relación 2:3 (3:4).

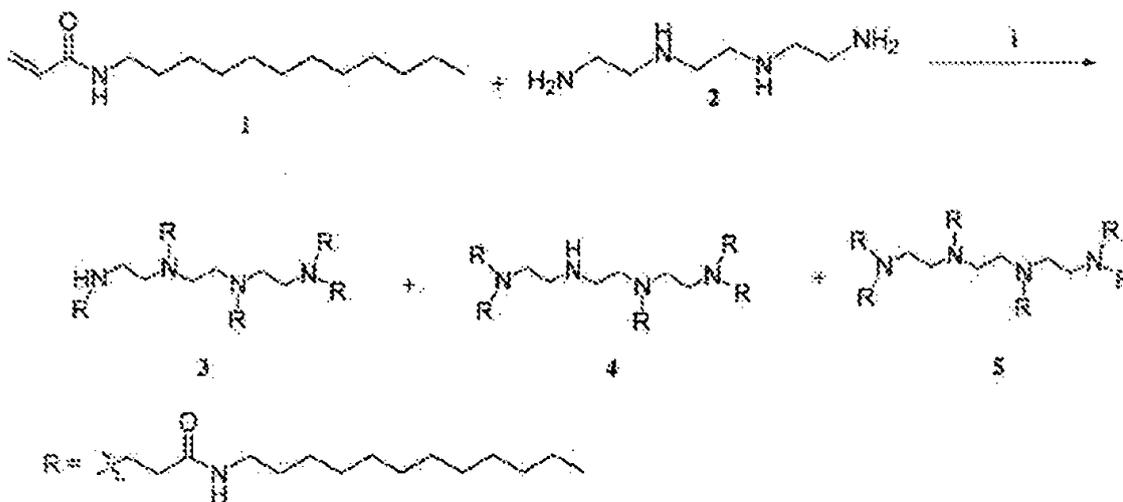
3-[[2-[[2-[[2-Bis-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino]-etil)-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino]-etil)-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino]-etil)-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino]-N-dodecil-propionamida. El sexto producto alquilado 5 se aisló en forma de un polvo de color crema (16,3 g, 17%), MS m/z 7,92 (M+2H/2), 528 (M+3H/3), <sup>1</sup>H NMR DMSO-d<sub>6</sub> δ 0,87 (t, J = 7Hz, 18H), 1,15-1,40 (m, 112H), 1,45-1,53 (m, 12H), 2,20-2,35 (m, 12H), 2,37-2,50 (m, 12H), 2,64-2,78 (m, 12H), 3,10-3,25 (m, 12H), 7,26 (bs, 4H), 7,64 (bs, 2H), <sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> δ 14,32, 22,89, 27,34, 27,38, 29,59, 29,69, 29,90, 29,92, 32,13, 39,77, 50,85, 172,80.

Ejemplo 2: Síntesis y purificación de compuestos 3,4 y 4: alquilación de trietilentetramina bajo condición de adición de Michael – método 2 (Esquema 2)

(Ejemplo de referencia)

En otro experimento, con el fin de prevenir la polimerización de la acrilamida de partida 1 a alta temperatura, se añadió una benzoquinona extinguidora de radicales a la mezcla de reacción.

Esquema 2<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) 90°C, cantidad catalítica (15 mg) de benzoquinona, 5 días.

En este método, se efectuó una reacción similar a aquella del Método 1 (Ejemplo 1) excepto que se añadió una benzoquinona extinguidora de radicales a la mezcla de reacción. En un frasco a presión de 150 ml se recogió N-dodecilacrilamida 1 (24 g, 1,00 mmol) y a esto se le añadieron 15 mg de benzoquinona y la acrilamida sólida bajo argón calentando suavemente el recipiente. A esta mezcla se le añadió trietilentetramina 2 (2,9 g, 20 mmoles) y la mezcla se calentó a 90° C durante 5 días. La mezcla de reacción se analizó por TLC usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (90:5:5) como el eluyente. La TLC indicó el consumo casi completo de la acrilamida de partida 1. La mezcla de reacción se disolvió en diclorometano (40 ml) y los productos deseados 3, 4 y 5 se aislaron como se describió en el Ejemplo 1. En este caso, se observó un ligero incremento del producto de adición 6.

Compuesto 3: El producto de adición 5, el isómero I, se aisló en forma de una espuma amarilla (3,4 g, 13%). Los datos analíticos y espectrales para este compuesto fueron idénticos a aquellos de 3 obtenido por el Método 1.

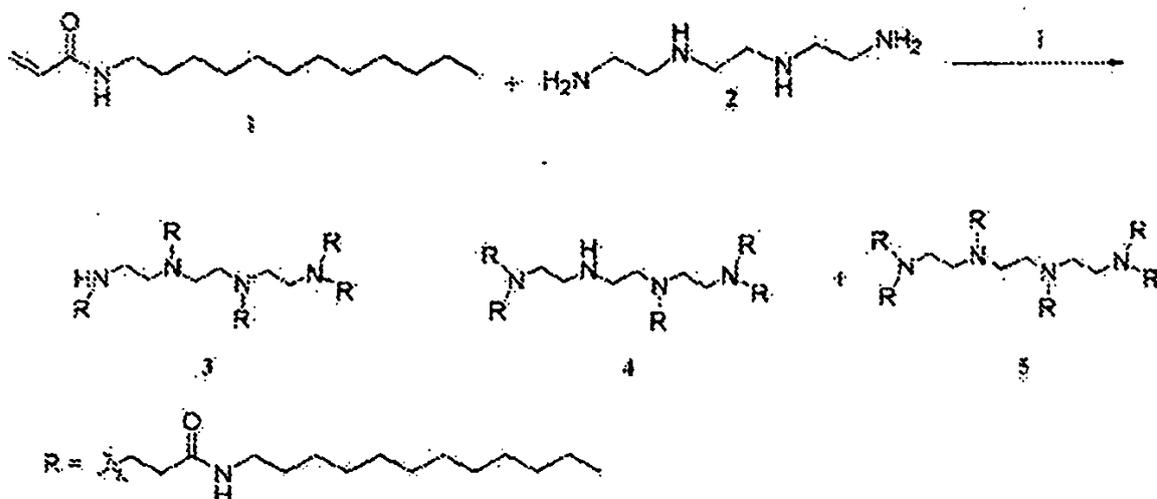
Compuesto 4: El producto de adición 5, el isómero 11, se aisló en forma de un polvo blanco (3,9 g, 14%). Los datos analíticos y espectrales para este compuesto fueron idénticos a aquellos de 4 obtenido por el Método 1. Se aisló también una mezcla pura de los isómeros 3 y 4 (1,9 g, 7%).

Compuesto 5: El producto de adición 6 se aisló en forma de un polvo de color crema (6,9 g, 26%). Los datos analíticos y espectrales para este compuesto fueron idénticos a aquellos de 5 obtenido por el Método 1.

Ejemplo 3: Síntesis y purificación de compuestos 3,4 y 4: alquilación de trietilentetramina bajo condiciones de adición de Michael – método 3 (Esquema 3) (Ejemplo de referencia)

En este método, la adición de Michael se efectuó en presencia de un promotor como ácido bórico (Chaudhuri, Mihir K.; Hussain, Sahid; Kantam, M. Lakshmi; Neelima, B. Tetrahedron Letters (2005), 46(48), 8329-8331.) con el fin de potenciar la velocidad de la reacción.

Esquema 3<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) 90°C, ácido bórico acuoso, 2 días

En este método, se efectuó una reacción similar a aquella del Método 1 (Ejemplo 1) excepto que se añadió ácido bórico saturado acuoso a la mezcla de reacción. En un frasco a presión de 150 ml, se mezcló N-dodecil-acrilamida 1 (24 g, 100 mmoles) bajo argón calentando suavemente el recipiente, y a esto se le añadieron 3 ml de ácido bórico acuoso. A esto se le añadió trietilentetramina 2 (2,9 g, 20 mmoles) y la mezcla se calentó a 90° C durante 2 días. La mezcla de reacción se analizó por TLC usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (90:5:5) como eluyente. La TLC indicó el consumo casi completo de la acrilamida de partida 1. La mezcla de reacción se disolvió en diclorometano (100 ml), la disolución se agitó con bicarbonato de sodio sólido, y la capa orgánica se filtró y concentró en un evaporador giratorio. Este producto bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (48:1:1 a 8:1:1). Con el fin de lograr la separación completa, se efectuaron múltiples columnas usando las mismas condiciones, y se obtuvieron los siguientes productos puros. Bajo esta condición de reacción se logró un incremento de la producción del compuesto: 4 (isómero II) y del sexto producto de adición 5.

Compuesto 3: El quinto producto de adición 3, el isómero I, se aisló en forma de una espuma amarilla clara (3,1 g, 11%). Los datos analíticos y espectrales para este compuesto fueron idénticos a aquellos de 3 obtenido por el Método 1.

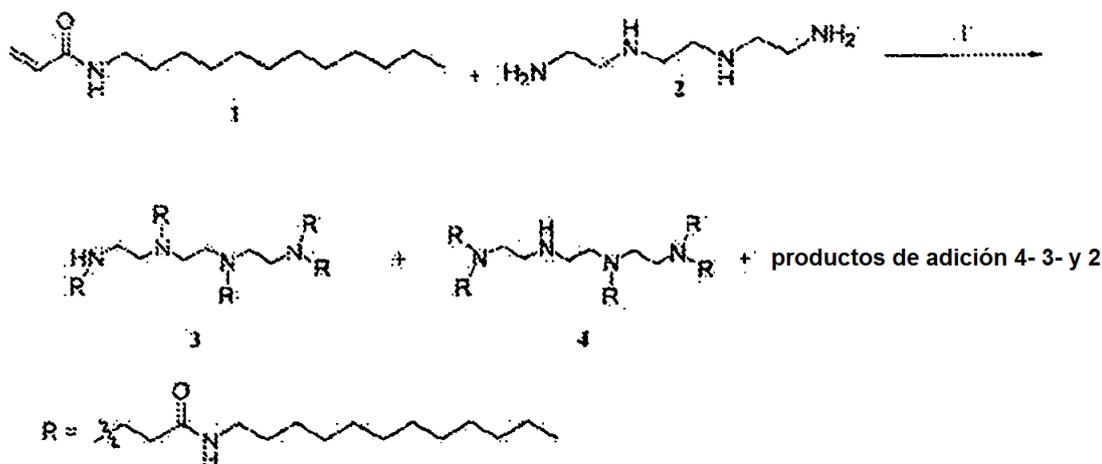
Compuesto 4: El quinto producto de adición 4, el isómero II, se aisló en forma de un polvo blanco (5,7 g, 20%). Los datos analíticos y espectrales para este compuesto fueron idénticos a aquellos de 4 obtenido por el Método 1. Se aisló también una mezcla pura de los isómeros 3 y 4 (2,1 g, 7%).

Compuesto 5: El sexto producto de adición 5 se aisló en forma de un polvo de color crema (7,6 g, 28%). Los datos analíticos y espectrales para este compuesto fueron idénticos a aquellos de 5 obtenidos por el Método 1.

Ejemplo 4: Síntesis y purificación de compuestos 3 y 4: alquilación de trietilentetramina bajo condición de adición de Michael – método 4 (Esquema 4). (Ejemplo de referencia)

En otro experimento, con el fin de minimizar la formación del sexto producto de adición 5, se intentó el uso de disolvente.

Esquema 4<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) 90°C, acetonitrilo DMF, 5 días

En este método se efectuó una reacción similar a aquella del Método 1 (Ejemplo 1) y del Método 2 (Ejemplo 2), excepto que las reacciones se efectuaron en presencia de disolventes a 90° C con agitación. En un frasco a presión de 150 ml, se disolvió N-dodecil-acrilamida 1 (10 g; 41,8 mmoles) en 20 ml de acetonitrilo o de DMF. A esta disolución se le añadió trietilentetramina 2 (1 g, 6,8 mmoles) y la mezcla se calentó a 90°C durante 5 días. La mezcla de reacción se analizó por TLC usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>MeOH:NEt<sub>3</sub> (90:5:5) como el eluyente. La TLC indicó la formación de solamente cantidades menores del quinto producto de adición requerido. El producto de adición en esta reacción fue una mezcla de cuatro productos de adición junto con productos de adición mucho menos polares.

10 Ejemplo 5: Separación de acrilamida sin reaccionar de la mezcla de reacción y/o de los productos aislados 3, 4 y 5 (Ejemplo de referencia)

Para eliminar la acrilamida sin reaccionar 1 de la mezcla de reacción, la mezcla de reacción se diluye con acetato de etilo o DMF y se agita con poliestireno o tiol unido a polímero (o mercaptano) para capturar toda la acrilamida. El tiol inmovilizado se añadió a la disolución y se agitó suavemente a temperatura ambiente, y el sólido se separó por filtración. La adición de Michael del tiol inmovilizado a la acrilamida capturó toda la acrilamida sin reaccionar. Los indicios de acrilamida como contaminante después del aislamiento de cada isómero deseado pudieron también eliminarse completamente bajo la misma condición. El producto aislado 3 (o 4 o 5) se disuelve en DMF o acetato de etilo y se agita suavemente con el extinguidor de acrilamida inmovilizado, se filtra y se evapora el filtrado a vacío para dar un compuesto 3 (o 4 o 5) puro y libre de contaminación con acrilamida.

20 Ejemplo 6: Separación de contaminante de amina primaria y secundaria del compuesto 5 (Ejemplo de referencia)

Después de la separación cromatográfica en columna del compuesto 5 para eliminar indicios de contaminantes de amina primaria y secundaria, el compuesto se disuelve en acetato de etilo o DMF y se agita con isotiocianato sólido ligado o inmovilizado a temperatura ambiente durante una noche. Se separa el sólido por filtración y la evaporación del filtrado proporciona un compuesto puro 5 libre de cualquier contaminación de amina primaria o secundaria.

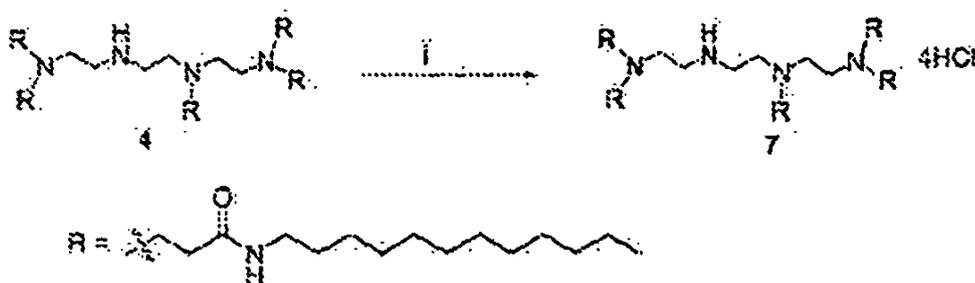
25 Ejemplo 7: Separación de contaminantes de amina primaria de los compuestos 3 y 4 (Ejemplo de referencia)

Después de completar la reacción, la mezcla de reacción se trata con anhídrido tetracloroftálico en presencia de trietilamina en diclorometano a temperatura ambiente, el disolvente se evapora y el residuo se agita con acetato de etilo, y el sólido se filtra y el filtrado se concentra para obtener los productos que carecen del contaminante de amina primaria.

30 Tabla 1

Métodos de síntesis de los productos 3 y 4					
Método	Temperatura	Promotor	Disolvente	Extinguidor de radicales	Observaciones
1	90°C	Ninguno	Puro	Ninguno	Formación de 3 y 4 con un rendimiento combinado aislado de 39%. El sexto producto de adición 5 se aisló con 17%. La reacción demoró seis días en completarse.



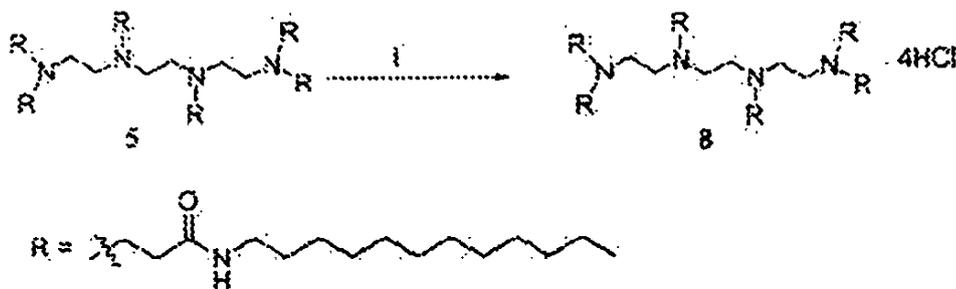


<sup>a</sup>(i) 4M HCl en 1,4-dioxano, ta, 12 h

Compuesto 8

- 5 La amina 5 (13,7 g, 1,2 mmoles) se convirtió al correspondiente HCl 8 usando un procedimiento similar a aquel descrito anteriormente para la sal 6. La sal de tetrahydrocloruro 8 se aisló en forma de un polvo blanco (1,3 g, 96%). <sup>1</sup>H NMR DMSO-d<sub>6</sub> δ 0,87 (t, J = 7Hz, 18H), 1,13-1,30 (m, 112H), 1,35,1,53 (m, 12H), 2,10-2,25 (m, 12H), 2,30-2,40 (m, 12H), 2,60-2,76 (m, 12H), 3,10-3,25 (m, 12H), 7,26 (bs, 4H), 7,64 (bs, 2H), 10,1 (bs, 4H).

Esquema 7<sup>a</sup>



- 10 <sup>a</sup>(i) 4M HCl en 1,4-dioxano, ta, 12 h

Ejemplo 9: Protección selectiva de grupos amino en trietilentetramina para síntesis dirigida de los compuestos 3 y 4 (Ejemplo de referencia)

- 15 Etapa 1: Preparación del compuesto 10: Trietilentetramina 2 (20,55 g; 140,52 mmoles, adquirida de Sigma-Aldrich) en acetonitrilo (500 ml) se enfrió en un baño de hielo bajo agitación constante. Se añadió trifluoroacetato de etilo (35,20 ml, 295,09 mmoles) a la disolución en agitación y se agitó durante 20 h. El disolvente y los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida, y se secó a vacío para obtener 9 en forma de un sólido blanco (44,4 g, 94%). El producto así obtenido se pudo utilizar en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional (Wender P. A. et al. Organic Letters, 2005 7, 4815).

- 20 El compuesto bruto 9 (23,70, 70 mmoles) se disolvió en acetonitrilo (400 ml) y se agitó en un baño de hielo. Se añadieron N-(benciloxicarboniloxi) succinato (Z-OSu, 43,73 g, 175 mmoles, adquirido de Novabiochem) y trietilamina (23,40 ml, 210 mmoles) a la mezcla de reacción y se agitaron durante una noche. Los disolventes se eliminaron y el residuo se extrajo en diclorometano (DCM), se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo así obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente, 30-70% EtOAc/Hexanos) para obtener el compuesto 10 en forma de un sólido blanco (38,2 g, 89%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 9,60-9,50(m, 2H), 7,40-7,20(m, 10H), 5,02(s, 4H), 3,40-3,20(m, 12H). MS: C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> Cal. 606,19, Encontrado. 607,2(M<sup>+</sup>)

- 30 Etapa 2: Preparación del compuesto 11: El compuesto 10 (12,60 g, 20,78 mmoles) se suspendió en metanol (MeOH, 150 ml) a temperatura ambiente y se añadió una disolución 8M de metilamina en etanol (40 ml) a la suspensión bajo agitación constante. Todos los sólidos se convirtieron en disolución. Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la mezcla se calentó a 50° C y se agitó durante 8 h. La reacción se vigiló por TLC. Todos los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente, 10%MeOH/DCM a 10:10:80, MeOH:TEA:DCM) para proveer el producto 11 (7,80 g, 91%) en forma de un líquido gomoso y pálido de color amarillo. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 7,80-7,40(m, 10H), 5,02-4,940(m, 4H), 3,45-3,05(m, 8H), 2,70-2,55(m, 4H), 2,20(bs, 4H). MS: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> Cal. 414,23, Encontrado 415,20(M<sup>+</sup>)

- 35 Etapa 3: Preparación del compuesto 13: El compuesto 12 se preparó a partir de trietilentetramina, 100 (10,25 g, 70,09 mmoles) como se describió en la etapa 1 para la síntesis del compuesto 9, sometiendo a reacción con 1,1 equivalente molar de trifluoroacetato de etilo (8,80 ml, 77,10 mmoles). El compuesto bruto 12 así obtenido se

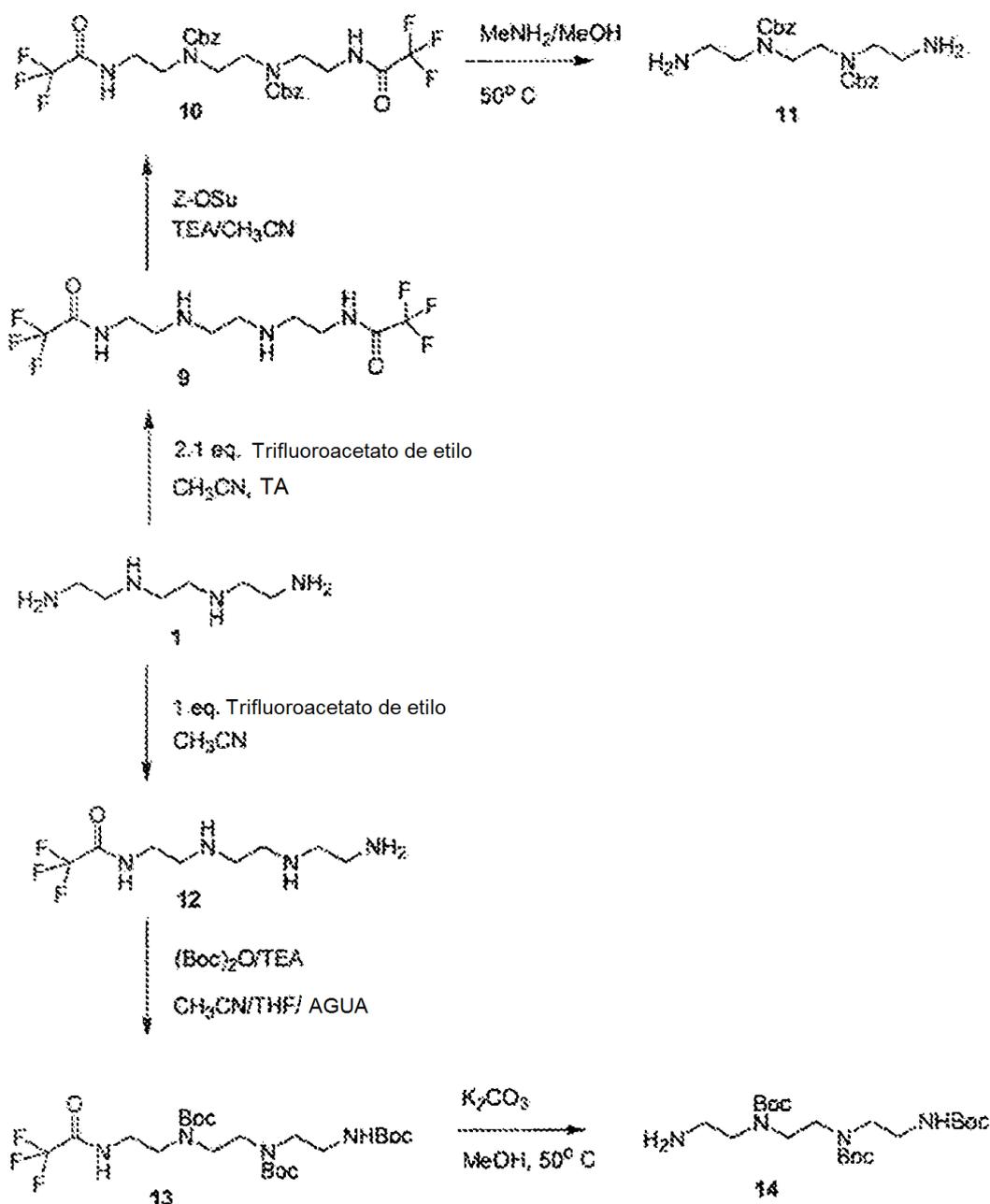
disolvió en DCM anhidro (400 ml) y se enfrió hasta 0° C. Se añadieron (Boc)<sub>2</sub>O (53,53 mmoles, 245,31 mmoles) y trietilamina (48 ml, 350 mmoles) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante toda la noche. El avance de la reacción se vigiló por TLC. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo se extrajo en DCM, se lavó con agua, salmuera, y se secó. Se eliminó el DCM y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente 50% EtOAc/Hexano a EtOAc) para obtener el producto deseado 13 (34,20 g, 92%) en forma de un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 9,51-9,38(m, 1H), 6,82(bs, 1H), 3,30-3,00(m, 12H), 1,58-1,30(s, 27H), MS: C<sub>23</sub>H<sub>41</sub>F<sub>3</sub>O<sub>7</sub> Cal. 542,29, Encontrado 543,4(M<sup>+</sup>).

5

Etapa 4: Preparación de 14: Una disolución del compuesto 13 (25 g, 47,32 mmoles) en MeOH (200 ml) se agitó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 g) en presencia de agua (1 ml) a 50° C durante una noche. El progreso de la reacción se vigiló por TLC. Se separó el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sólido por filtración, se lavó con MeOH se lavó y se eliminaron los disolventes a vacío.

10

El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para proveer el producto deseado 14 (10,2 g, 50%) en forma de un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 6,83(bs, 1H), 2,95-3,30(m, 12H), 2,62-2,50(m, 2H), 1,25-1,45(m, 27H). MS: C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> Cal, 446,31, Encontrado 447,4(M<sup>+</sup>).

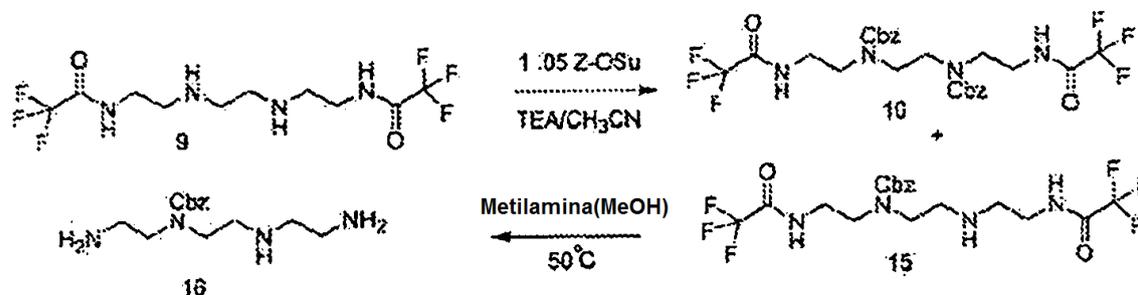
Esquema 8<sup>a</sup>

15

<sup>a</sup>Protección selectiva de nitrógenos de trietilentetramina

5 Etapa 5: Preparación del compuesto 15: El compuesto 9 (23,0 g, 68,02 mmoles) se disolvió en una mezcla de acetonitrilo/diclorometano (1:1, 300 ml) y se enfrió hasta 0° C. Se añadió Z-OSu (17,00 g, 69 mmoles) a la disolución y se agitó durante 10 minutos. Se añadió subsiguientemente trietilamina (23,40 ml, 210 mmoles) a la mezcla de reacción y se dejó agitar durante una noche. Los disolventes y la trietilamina se eliminaron a vacío, y el residuo se extrajo en DCM, se lavó con agua (dos veces), salmuera, y se secó. Después de eliminar el disolvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (se eluyó inicialmente con 20-60% EtOAc/Hexano, luego con 5% MeOH/DCM) para obtener el producto deseado 15 (13,3 g) en forma de un sólido blanco junto con un producto secundario 10 (8,5 g). <sup>1</sup>H NMR (DMSO- d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 9,60(bs, 1H), 9,30(bs, 1H), 7,40-7,28(m, 5H), 5,01(s, 2H), 3-40- 3,10(m, 8H), 2,70-2,50(m, 4H). MS: C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> Cal. 472,15, Encontrado 473,1(M<sup>+</sup>).

15 Etapa 6: Preparación del compuesto 16: El tratamiento del compuesto 15 (13,4 g, 28,38 mmoles) con metilamina (50 ml, disolución 8M en EtOH), como se describió en la etapa 2, proporcionó un compuesto líquido incoloro 16 (6,10 g, 79%). El producto así obtenido pudo usarse en la siguiente reacción sin purificación adicional. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 7,45-7,20(m, 6H), 5,07(s, 2H), 3,45-2,90(m, 8H), 2,60-2,30(m, 4H). MS: C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> Cal. 280,19, Encontrado 281,2(M<sup>+</sup>).

Esquema 9<sup>a</sup><sup>a</sup>Bloqueo selectivo de nitrógeno secundario sencillo de trietilentetramina

## Ejemplo 10: Síntesis del isómero sencillo 5-alquilado 4 - Método 1 (Ejemplo de referencia)

20 Etapa 1: Reacción de 11 con N-dodecilacrilamida: La diamina 11 (1,00 g, 2,41 mmoles) y N-dodecilacrilamida (3,74 g, 14,50 mmoles) se recogieron juntas en un tubo a presión y se calentaron a 90° C durante 5 días. La reacción se vigiló por TLC. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se disolvió en diclorometano y se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener los productos 17, 18 y 19.

25 Etapa 2: Preparación del compuesto 20: El compuesto 15 (2,00 g, 1,46 mmoles) se disuelve en una mezcla de acetato de etilo y metanol (1:2, 15 ml) a la que se añaden 2 eq. de ácido acético. La mezcla se hidrogena a presión reducida (50 psi) usando paladio/carbono (0,200 g, 10% en peso) como catalizador para obtener el producto deseado 20.

30 Etapa 3: Preparación del isómero sencillo 4: El compuesto 20 (1,50 g, 1,36 mmoles) y la acrilamida 1 (0,325 mmol, 1,36 mmoles) se disuelven en tolueno (4 ml) y se calientan a 90° C para formar el compuesto 4. El progreso de la reacción se vigila por TLC. Después de completar la reacción, la mezcla se enfría a temperatura ambiente se disuelve en DCM y se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice ultrarrápida para obtener el producto deseado 4.

## Esquema 10



Etapa 1: Preparación del compuesto 22: El compuesto 14 (5,06 g, 11,30 mmoles) y N-dodecilacrilamida (2,94 g, 12,43 mmoles) se recogieron en tolueno y se calentaron a 90° C durante cinco días. Se revisó la TLC y ésta indicó la formación de producto. La mezcla de reacción se cargó directamente en una columna pre-rellena de gel de sílice y se purificó por cromatografía ultrarrápida (5% MeOH/DCM) para dar el compuesto 22 (4,82 g, 62%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 8,17(bs, 1H), 6,60(bs, 1H), 3,30-2,95(m, 12H), 2,70(t, J = 5,80Hz, 2H), 2,60(t, J = 6,00Hz, 2H), 2,18(t, J = 6,40Hz, 2H), 1,35(m, 29H), 1,26- 1,15(m, 18H), 0,83(t, J = 6,00Hz, 3H). MS: C<sub>36</sub>H<sub>71</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> Cal. 685,54, Encontrado 686,5(M<sup>+</sup>).

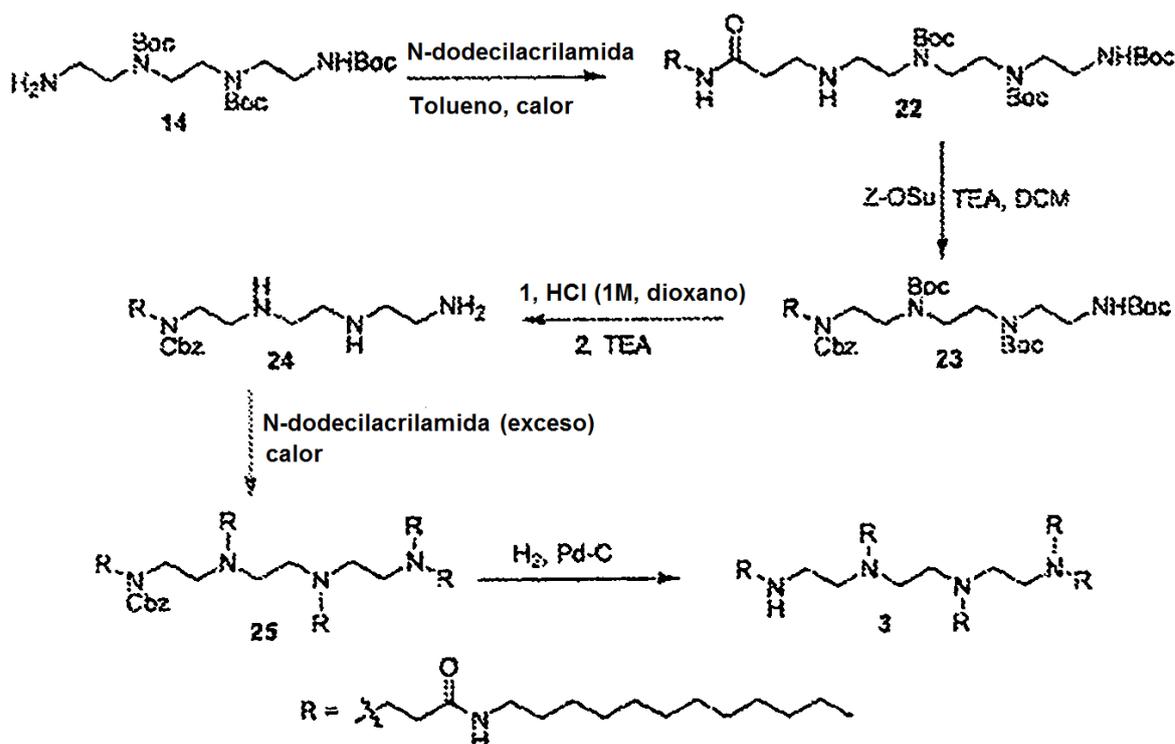
Etapa 2: Preparación del compuesto 23: El compuesto 22 (4,75 g, 6,92 mmoles) se disolvió en diclorometano (100 ml) y se enfrió a 0° C. Se añadió Z-OSu (2,59 g, 1,5 eq) a la disolución y se agitó durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó subsiguientemente con trietilamina (2,82 ml, 20,76 mmoles) durante una noche. Se eliminaron el disolvente y la trietilamina a vacío, y el residuo se extrajo en diclorometano, se lavó sucesivamente con agua (dos veces) y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de eliminar el disolvente, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ultrarrápida (5-10% MeOH/DCM) para obtener el compuesto deseado 23 (5,33 g, 94%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ = 7,49-7,25(m, 5H), 5,11(s, 2H), 3,60-3,02(m, 14H), 2,45-45(m, 4H), 1,50-1,35(m, 27H), 1,24-1,20(m, 18H), 0,87(t, J = 6,00Hz, 3H). MS: C<sub>44</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub> Cal. 819,57, Encontrado 820,7(M<sup>+</sup>).

Etapa 3: Preparación del compuesto 24: Se añadió HCl 4M en dioxano (50 ml) a una disolución del compuesto 23 (5,30 g, 6,50 mmoles) en dioxano (100 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante una noche. El producto precipitó durante el curso de la reacción. El disolvente y el HCl se eliminaron a vacío para dar un sólido blanco. El residuo se recogió en MeOH que contenía exceso de trietilamina, y la suspensión se agitó durante 1 h para obtener una disolución homogénea. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo se trituroó con EtOAc. La sal de hidrocloreuro y la trietilamina se separaron por filtración. El filtrado combinado se evaporó a vacío para obtener un líquido gomoso 24 (3,30 g, 98%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ = 7,37-7,28(m, 5H), 5,05(s, 2H), 3,60-3,20(m, 4H), 3,10-2,70(m, 10H), 2,40-2,20(m, 4H), 1,40-1,30(m, 2H), 1,25- 1,17(m, 1,8H), 0,81(t, J = 6,00Hz, 3H). MS: C<sub>29</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> Cal, 519,41, Encontrado 520,4(M<sup>+</sup>).

Etapa 4: Preparación del compuesto 25: El compuesto 24 (1,00 g, 1,925 mmoles) y N-dodecilacrilamida (3,70 g, 8 eq) se recogieron juntos en un tubo a presión y se calentaron a temperatura elevada para formar el compuesto deseado 25. La formación del producto se vigila por TLC y posteriormente se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice ultrarrápida para proporcionar un compuesto puro 25.

Etapa 5: Preparación del compuesto 3: El compuesto 25 (2,00 g, 1,35 mmoles) se disuelve en una mezcla de acetato de etilo y metanol (1:2, 15 ml) a la que se le añaden 2 eq. de ácido acético. La mezcla se hidrogena a presión (50 psi) sobre paladio-carbono (0,200 g, 10% en peso) para dar el producto deseado 3.

Esquema 12



## Ejemplo 13: Síntesis del isómero sencillo 5-alkilado 3 - Método 2 (Ejemplo de referencia)

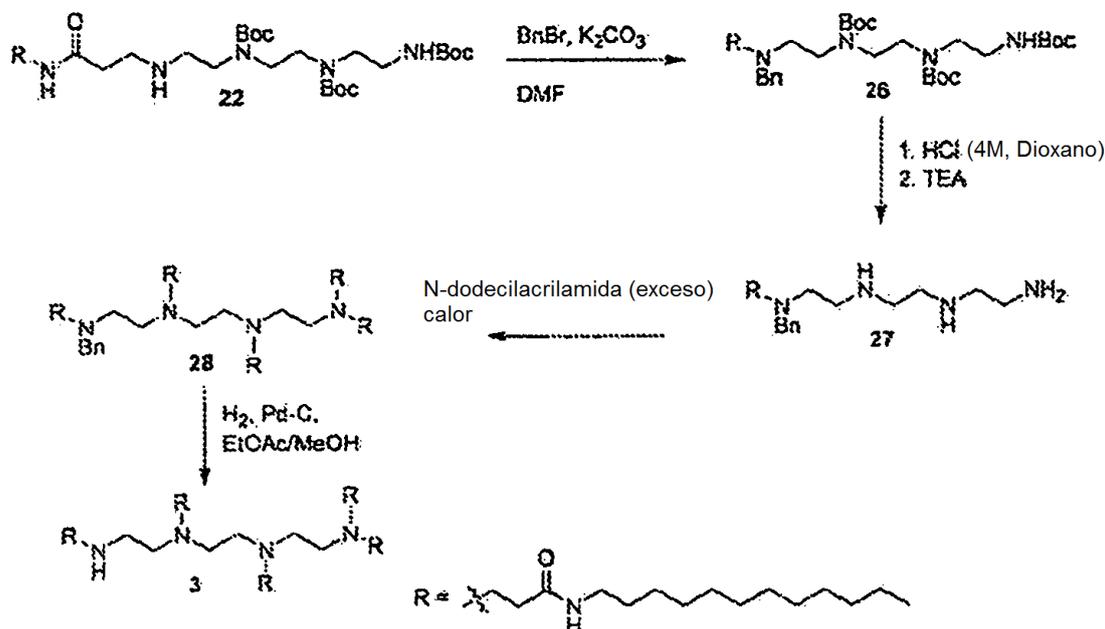
Etapa 1: Preparación del compuesto 26: Se añadió bromuro de bencilo (1,25 ml, 1,5 eq) a una suspensión del compuesto 22 (4,80 g, 7,00 mmoles) y  $K_2CO_3$  (9,67 g, 10 eq) en DMF (100 ml) y la mezcla se agitó durante una noche. El progreso de la reacción se vigiló por TLC. Los sólidos se separaron por filtración, se lavaron con MeOH y acetato de etilo. El filtrado combinado se concentró a presión reducida, y el residuo así obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (50-100% EtOAc/Hexano) para dar el compuesto deseado 26 (3,30 g, 61%)  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz)  $\delta$  = 7,77(bs, 2H), 7,28-7,23(m, 5H), 6,85-6,70(m, 1H), 3,59(s, 2H), 3,20-2,20(m, 18H), 1,35(s, 27H), 1,30-1,23(m, 2H), 1,20-1,15(m, 18H), 6,83(t, J = 6,00Hz, 3H). MS:  $C_{43}H_{77}N_5O_7$  Cal. 775,58, Encontrado 776,5( $M^+$ )

Etapa 2: Preparación del compuesto 27: El compuesto 26 (3,30 g, 4,25 mmoles) en dioxano (50 ml) se agitó con HCl 4M (50 ml) en dioxano durante una noche. Se observó la formación del precipitado blanco durante el curso de la reacción. El disolvente y el ácido se eliminaron a vacío, y el residuo blanco así obtenido se redisolvió en metanol que contenía exceso de trietilamina. La disolución homogénea se evaporó luego a presión reducida para obtener el residuo. El residuo se trituró con EtOAc y se separó la sal de hidrocloreuro y trietilamina por filtración. El filtrado se evaporó a vacío para proporcionar el compuesto deseado 27 (2,36 g, 99%) en forma de un líquido gomoso.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400MHz)  $\delta$  = 8,05(t, J = 5,5Hz, 1H), 7,40-7,20(m, 5H), 3,58(s, 2H), 3,10-2,30(m, 18H), 1,40-1,30(m, 2 Rh), 1,25-1,15(m, 18H), 0,82(t, J = 6,00Hz, 3H). MS:  $C_{28}H_{53}N_5O$  Cal. 475,43, Encontrado. 498,4( $M+Na$ )

Etapa 3: Preparación del compuesto 28: El compuesto 27 puro (1,00 g, 2,10 mmoles) y N-dodecilacrilamida (4,0 g, 8 eq) se mezclan en un tubo a presión y se calientan a temperatura elevada para formar el compuesto 28. La formación de 28 se vigila por TLC y LC-MS. Después de completar la reacción, el producto se aísla por purificación cromatográfica para proporcionar el compuesto 28.

Etapa 4: Preparación del compuesto 3 a partir del compuesto 28: El compuesto 28 (2,00 g, 1,40 mmoles) se disuelve en una mezcla de acetato de etilo y metanol (1:2, 15 ml) a la que se le añaden 6 eq. de ácido acético. La mezcla se hidrogena a presión (50 psi) sobre paladio-carbono (0,200 g, 10% en peso) para obtener el compuesto 3.

## Esquema 13



## Ejemplo 14: Síntesis convencional del isómero 3 - Método 1 (Ejemplo de referencia)

Etapa 1: Preparación de los compuestos 30, 31 y 32: Se recogieron etilendiamina 29 (0,978 ml, 14,63 mmoles), N-dodecilacrilamida (7,00 g, 29,26 mmoles) y ácido bórico (100 mg) en 5 ml de agua, y se calentaron a  $90^\circ C$  durante cuatro días. Se determinó la desaparición completa de la acrilamida por análisis TLC. La mezcla de reacción se disolvió en DCM, se lavó con agua y bicarbonato, y se secó sobre sulfato de sodio. Se eliminó el DCM y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2:2:96 a 10:10:80% MeOH/TEA/DCM) para obtener los compuestos 30 (1,86 g)  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400MHz)  $\delta$  = 7,05(bs, 2H), 3,21 (q, J = 6,30 Hz, 4H), 2,87(t, J = 6,00Hz, 4H), 2,73(s, 4H), 2,34(t, J = 6,00Hz, 4H), 1,57(bs, 2M), 1,49-1,45(m, 4H), 1,28-1,19(m, 40H), 0,87(t, J = 6,8Hz, 6H) MS:  $C_{32}H_{66}N_4O_2$  Cal. 538,52, Encontrado 539,50( $M^+$ ). 31 (3,50 g)  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400MHz)  $\delta$  = 8,20(bs, 1H), 3,20-2,15(m, 22H), 1,36-1,30(m, 6H), 1,25-1,15(m, 30H), 0,81(t, J = 6,00Hz, 9H), MS:  $C_{47}H_{95}N_5O_3$  Cal. 777,74,

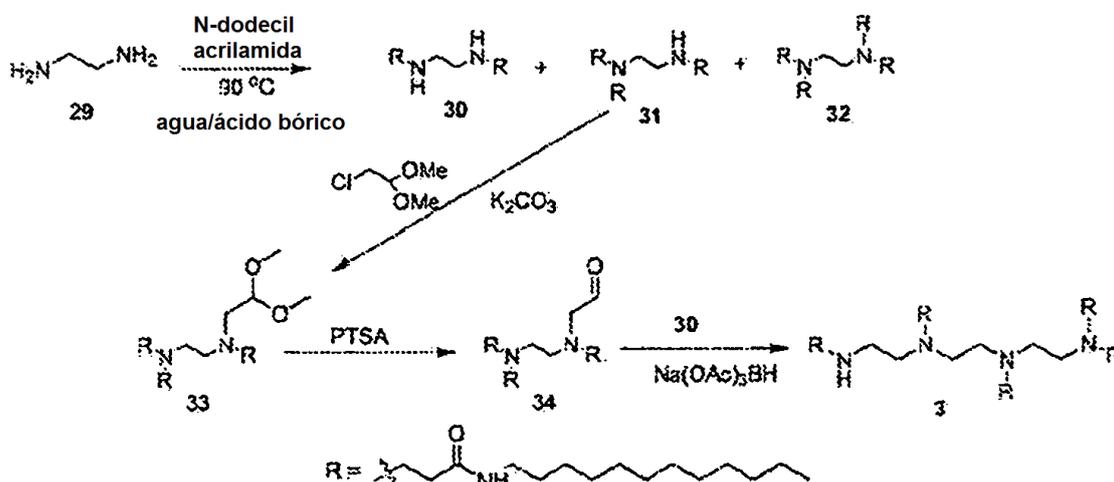
Encontrado 778,7(M+) y 32 (1,75g) <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ = 3,23-2,15(m, 28H), 1,35-1,45(m, 8H), 1,26-1,15(m, 40H), 0,82(t, J = 6,00Hz, 12H). MS: C<sub>62</sub>H<sub>124</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> Cal. 1016,97, Encontrado 1018,0(M+).

5 Etapa 2: Preparación del compuesto 33: El compuesto 31 (1,55 g, 2 mmoles) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,76 g, 20 mmoles) se recogieron en DMF. A eso se le añade cloroacetaldehído dimetil acetal (0,453 ml, 4,00 mmoles) y se agita durante 24 h. La reacción se vigila por TLC, se separa el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por filtración y se lava con MeOH. Los disolventes se eliminan a presión reducida y el residuo se somete a purificación cromatográfica para proporcionar el compuesto 33.

10 Etapa 3: Preparación del compuesto 34: El compuesto 33 (2,00 g, 2,31 mmoles) se recoge en una mezcla de MeOH y DCM, A eso se le añade PTSA (2,0 eq), y la mezcla de reacción se agita durante una noche. La disolución se neutraliza con disolución de bicarbonato sódico y se extrae con DCM y se seca. El compuesto se purifica por separación cromatográfica para dar el producto deseado 34.

15 Etapa 4: Preparación del isómero sencillo 3 a partir de 34: Los compuestos 34 (2,00 g, 2,43 mmoles) y 30 (1,31 g, 2,43 mmoles) se recogen en DCM; a eso se le añaden tamices moleculares activados y se agita durante 3 h. La reacción se vigila por TLC. Una vez que la reacción se completa se eliminan los disolventes. El residuo se disuelve en THF, se añaden triacetoxiborohidruro de sodio (5 eq.) y ácido acético, y se agita durante toda la noche. Los disolventes se eliminan, y los extractos DCM y la separación cromatográfica del residuo proporcionan el isómero 3.

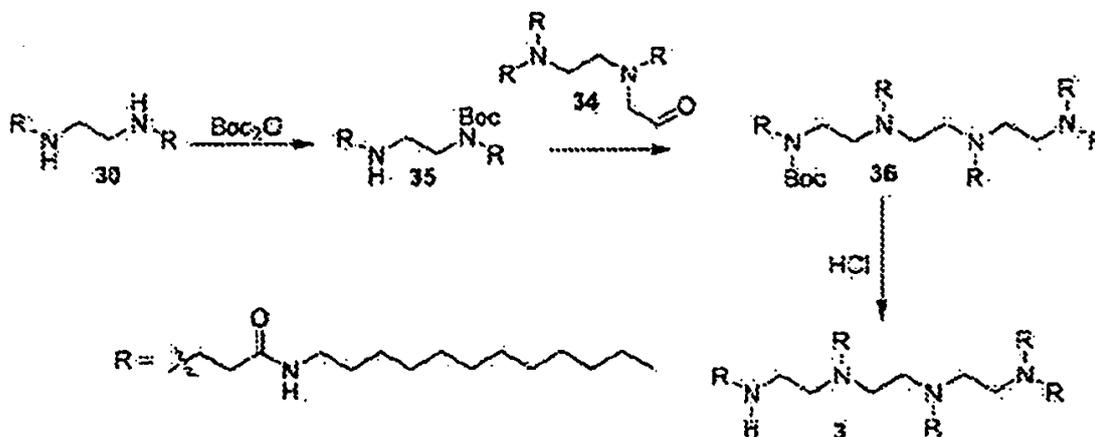
Esquema 8



Ejemplo 15: Síntesis convergente del isómero 3 - Método 2 (Ejemplo de referencia)

20 El isómero sencillo 3 deseado también se prepara a partir del compuesto 30 por protección selectiva de uno de los nitrógenos para obtener el compuesto 35. El compuesto 35 se somete subsiguientemente a reacción con el aldehído 34 bajo condiciones reductoras para obtener el compuesto 36. El tratamiento con ácido de 36 proporciona el compuesto 3.

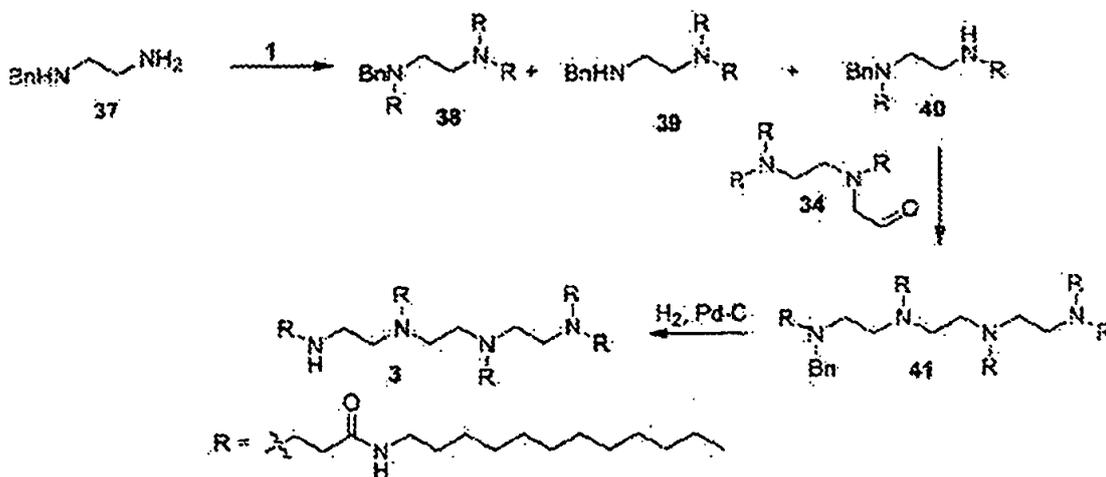
Esquema 15



## Ejemplo 16: Síntesis convergente del isómero 3 – Método 3 (Ejemplo de referencia)

El isómero sencillo 3 deseado también se prepara a partir de monobenciletilendiamina 37. La alquilación de 37 con 1 proporciona una mezcla de compuestos 38, 39 y 40. El compuesto 40 se somete a reacción con el aldehído 34 bajo condiciones reductoras para obtener el compuesto 41. La hidrogenólisis de 41 provee el compuesto deseado 3.

## 5 Esquema 16



## Ejemplo 17: Síntesis convergente del isómero 4 – Método 1 (Ejemplo de referencia)

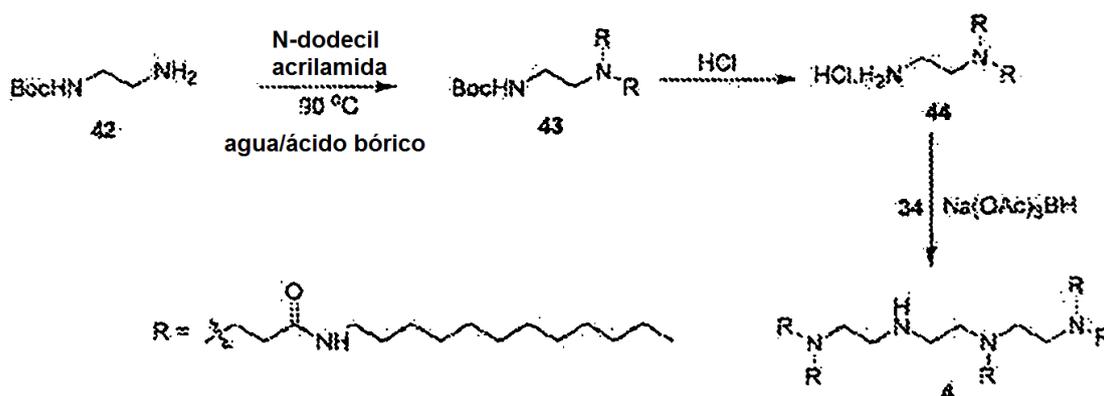
10 Etapa 1: Preparación del compuesto 43: En un frasco a presión de 150 ml se mezcló N-dodecil-acrilamida 1 (16,4 g, 68,8 mmoles) bajo argón calentando moderadamente el recipiente, y a esto se le añadieron 3 ml de ácido bórico acuoso. A esta mezcla se le añadió etilendiamina protegida con Boc 42 (5 g, 31,2 mmoles) y la mezcla se calentó a 90 °C durante una noche.

15 La mezcla de reacción se analizó por TLC usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (90:5:5) como el eluyente. La TLC indicó que se había consumido prácticamente la totalidad de la acrilamida de partida 1. La mezcla de reacción se disolvió en diclorometano (100 ml) y la disolución se agitó con bicarbonato de sodio sólido, y la capa orgánica se filtró y se concentró en un evaporador giratorio. Este producto bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (48:1: 1 a 8:1:1). El producto principal en esta reacción fue el producto de doble adición 43: También se observaron cantidades menores de mono aducto.

20 Etapa 2: Preparación del compuesto 44: El compuesto 43 (2,00 g, 3,13 mmoles) se recogió en dioxano (50 ml) al que se le añade HCl (20 ml, disolución 4M en dioxano) y se agita durante una noche. El disolvente se elimina para obtener el compuesto 44.

25 Etapa 3: Preparación del isómero sencillo 4 a partir de 34 y 44: El compuesto 34 (2,00 g, 2,43 mmoles) y 44 (1,31 g, 2,43 mmoles) se recogen en DCM; a eso se le añaden tamices moleculares activados y se agita durante 3 h. La reacción se vigila por TLC. Una vez que la reacción finaliza, se eliminan los disolventes. El residuo se disuelve en THF y se añaden triacetoxiborohidruro de sodio (5 eq.) y ácido acético, y se agita durante una noche. Los disolventes se eliminan y los extractos con DCM y la separación cromatográfica del residuo proporcionan el isómero puro 4.

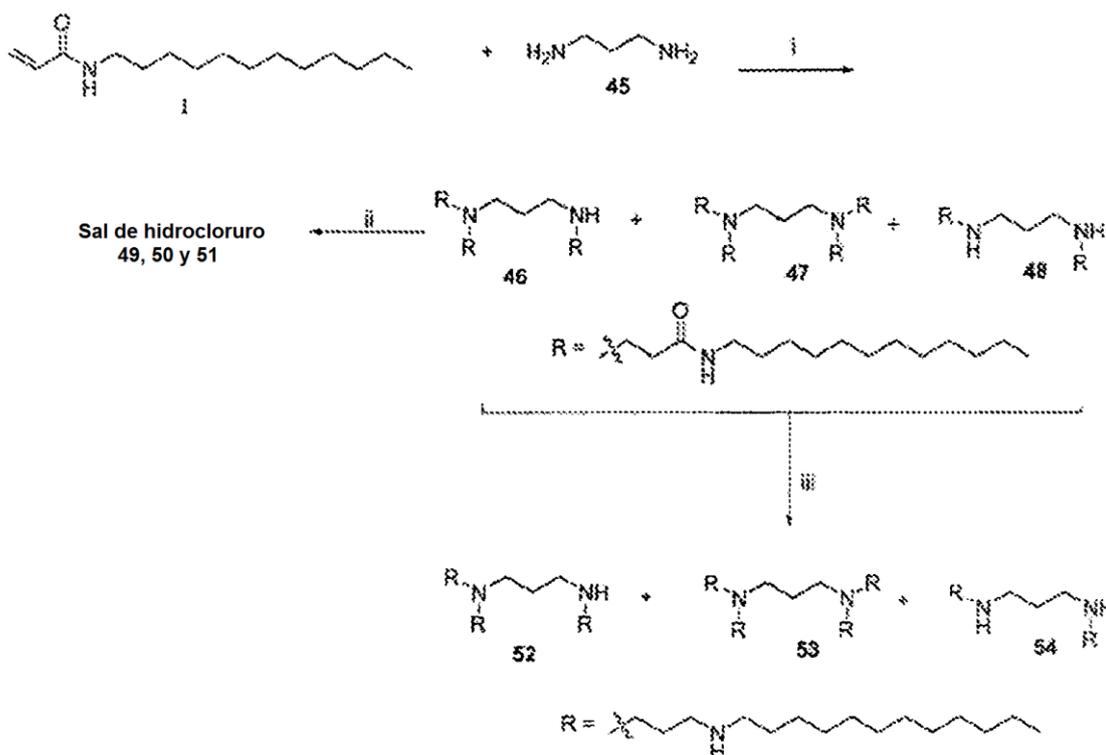
## Esquema 17



Ejemplo 18: Adición de N-dodecilacrilamida a 1,3-diaminopropano y posterior reducción de la amida a amina (Ejemplo de referencia)

5 Con el fin de estudiar el efecto del número de carga en el lípido catiónico, se investigaron los aductos de acrilamida 1 de Michael con 1,3-diaminopropano 45.

Esquema 18<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i)90 °C, ácido bórico acuoso, 16 h; (ii) HCl 4M en 1,4-dioxano, ta, 12 h y (iii) BH<sub>3</sub>

10 Etapa 1: Síntesis de 46, 47 y 48: En un frasco a presión de 150 ml, se mezcló N-dodecil-acrilamida 1 (15,4 g, 64 mmoles) bajo argón calentando moderadamente el recipiente, y a esto se le añadieron 3 ml de ácido bórico acuoso. A esta mezcla se le añadió 1,3-diaminopropano 44 (1,58 g, 21 mmoles), y la mezcla se calentó a 90 °C durante una noche. La mezcla de reacción se analizó por TLC usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (90:5:5) como el eluyente. La TLC indicó el consumo casi completo de la acrilamida de partida 1. La mezcla de reacción se disolvió en diclorometano (100 ml) y la disolución se agitó con bicarbonato de sodio sólido, y la capa orgánica se filtró y concentró en un evaporador giratorio. Este producto bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> (48:1:1 a 8:1:1). El producto principal en esta reacción es el producto de adición triple 46. También se aislaron cantidades menores de tetra aducto 47 y este aducto 48.

15 N-Dodecil-3-((2-dodecilcarbamoil-etil)-[3-(2-dodecilcarbamoil-etilamino)-propil]-amino)-propionamida 46. El producto de adición triple 46 se aisló en forma de un polvo blanco (5,7 g, 35%). MS m/z 793 (MH<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0,87 (t, J

= 6,6Hz, 9H), 1,20-1,30 (m, 60H), 1,42-1,66 (m, 6H), 2,33 (t, J = 6Hz, 4H), 2,38-2,46 (m, 4H), 2,60-2,70 (m, 4H), 2,84 (t, 2H), 3,15-3,28 (m, 6H), 6,65 (bs, 1H), 6,99 (bs, 3H).

4-[[3-[Bis-(2-dodecilcarbamoil-etil)-amino]-propil]-(2-dodecilcarbamoil-etil)amino]-N-dodecil-butiramida 47. El tetra producto de adición 47 también se aisló en cantidades menores.

- 5 N-Dodecil-3-[-(2-dodecilcarbamoil-etilamino)-propilamino]-propionamida 48. El diaducto 48 se aisló en forma de un polvo de color crema (1,6 g, 10%). MS m/z 553 (MH<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0,89 (t, J = 6,6Hz, 6H), 1,10-1,20 (m, 40H), 1,42- 1,66 (m, 4H), 2,20 (t, J = 6Hz, 4H), 2,55 (t, 4H), 2,60 (t, 4H), 3,00 (m, 4H), 8,00 (bs, 2H).

Etapas 2: Conversión de las aminos 4, 35 y 36 a sus correspondientes sales de hidrocloreto 49, 50 y 51.

- 10 La amina 46 (5,5 g) se convirtió al correspondiente HCl 49 usando un procedimiento similar a aquel descrito en el Ejemplo 8, y la sal de dihidrocloreto 49 se aisló en forma de un polvo blanco (5,73 g, 92%). <sup>1</sup>H NMR DMSO-d<sub>6</sub> δ 0,88 (t, J = 7Hz, 9H), 1,17-1,30 (m, 66H), 1,35-1,45 (m, 6H), 2,10-2,25 (m, 2H), 2,55-2,70 (m, 6H), 2,95-3,15 (m, 10H), 3,20-3,35 (m, 6H), 8,16 (t, 1H), 8,24 (t, 1H), 9,15 (bs, 1H), 10,65 (bs, 1H).

En un procedimiento similar a aquel descrito en el Ejemplo 8, se trata la amina 47 con HCl 4M para obtener la sal de dihidrocloreto 50.

- 15 En un procedimiento similar a aquel descrito en el Ejemplo 8, se trata la amina 48 con HCl 4M para obtener la sal de dihidrocloreto 51.

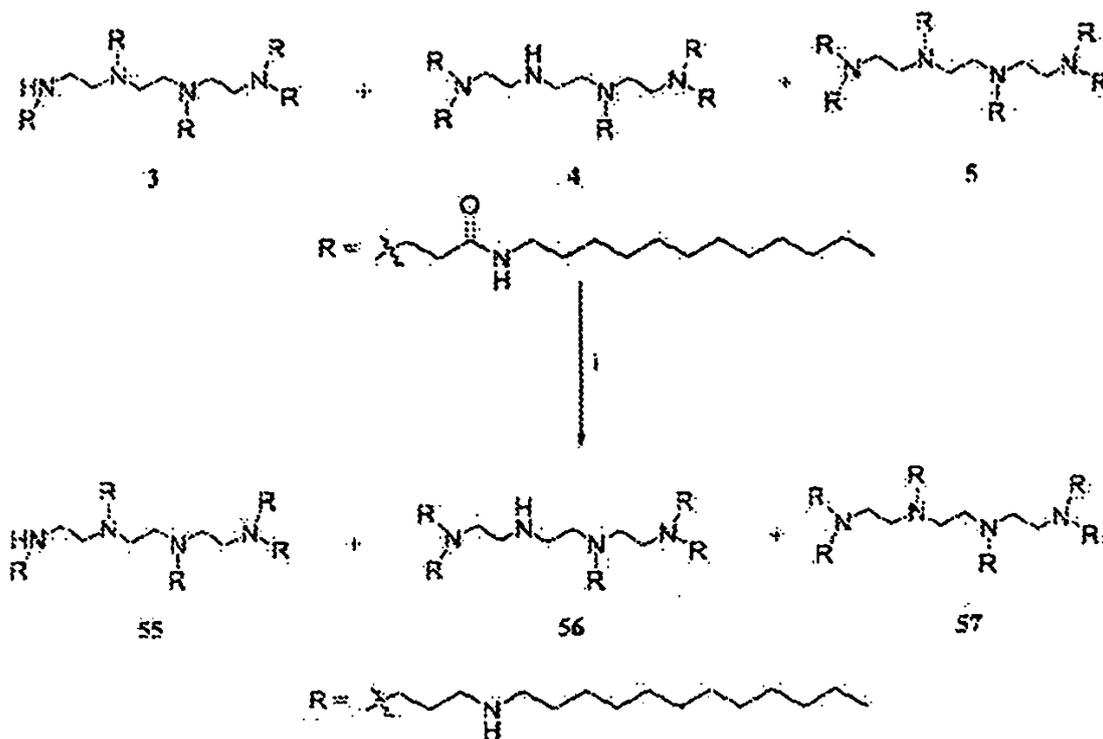
Etapas 3: Reducción de las amidas 46, 47 y 48 a las aminos 52, 53 y 54: La amina 46 se somete a reflujo en THF con exceso de diborano durante una noche, y el tratamiento subsiguiente con HCl 4M proporciona la sal de hidrocloreto de poliamina 52.

- 20 Un tratamiento similar de las aminos 47 y 48 proporciona el correspondiente producto reducido 53 y 54 como su respectiva sal de hidrocloreto.

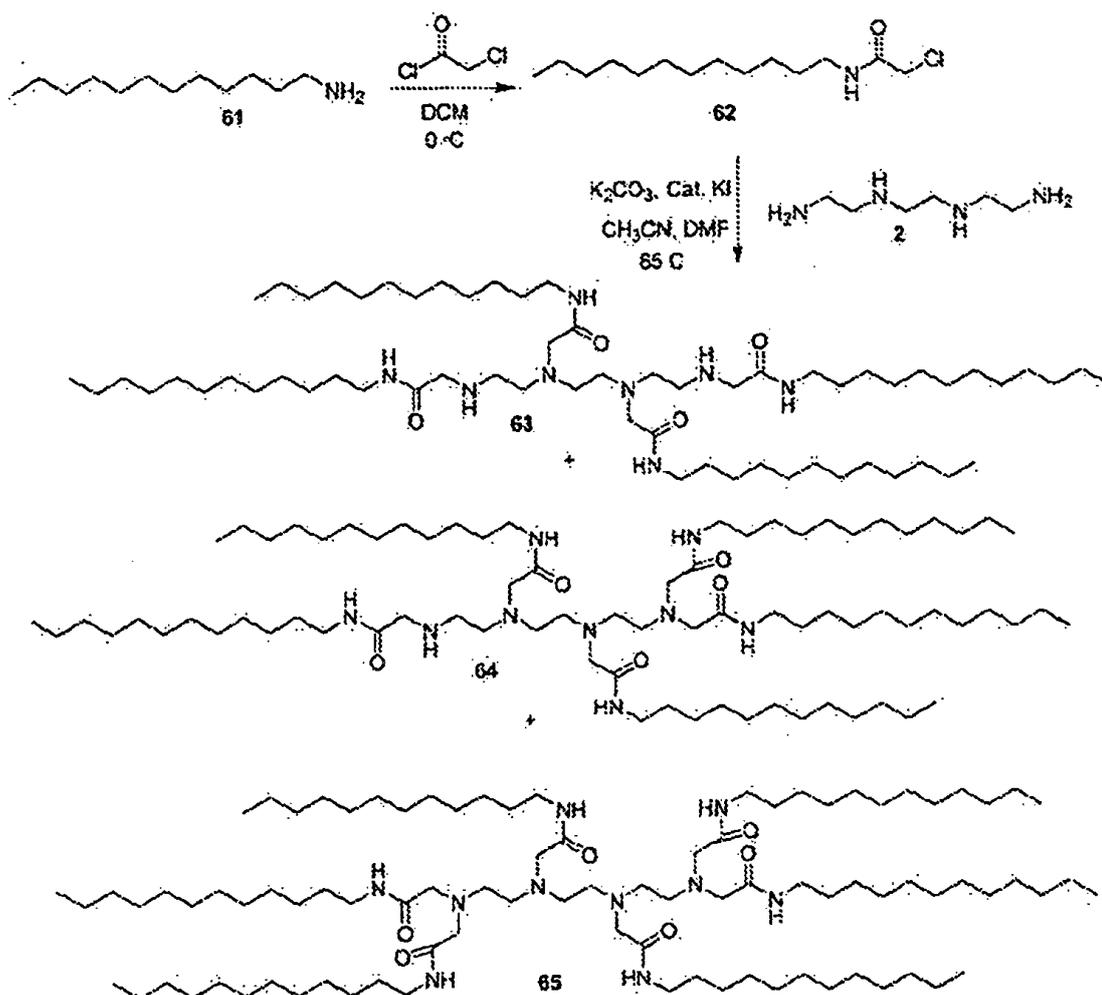
Ejemplo 19: Reducción de las poliamidas 3, 4 y 5 a los correspondientes dendrímeros de poliamina (Ejemplo de referencia)

- 25 El compuesto 3 se somete a reflujo con un gran exceso de diborano en THF para obtener el correspondiente producto reducido 55. Después de completar la reacción, la mezcla de reacción se trata con HCl 4M antes del tratamiento, y el producto se aísla como su sal de hidrocloreto. Las sales de hidrocloreto de 56 y 57 también se obtienen a partir de los correspondientes precursores 4 y 5, respectivamente.

Esquema 19<sup>a</sup>





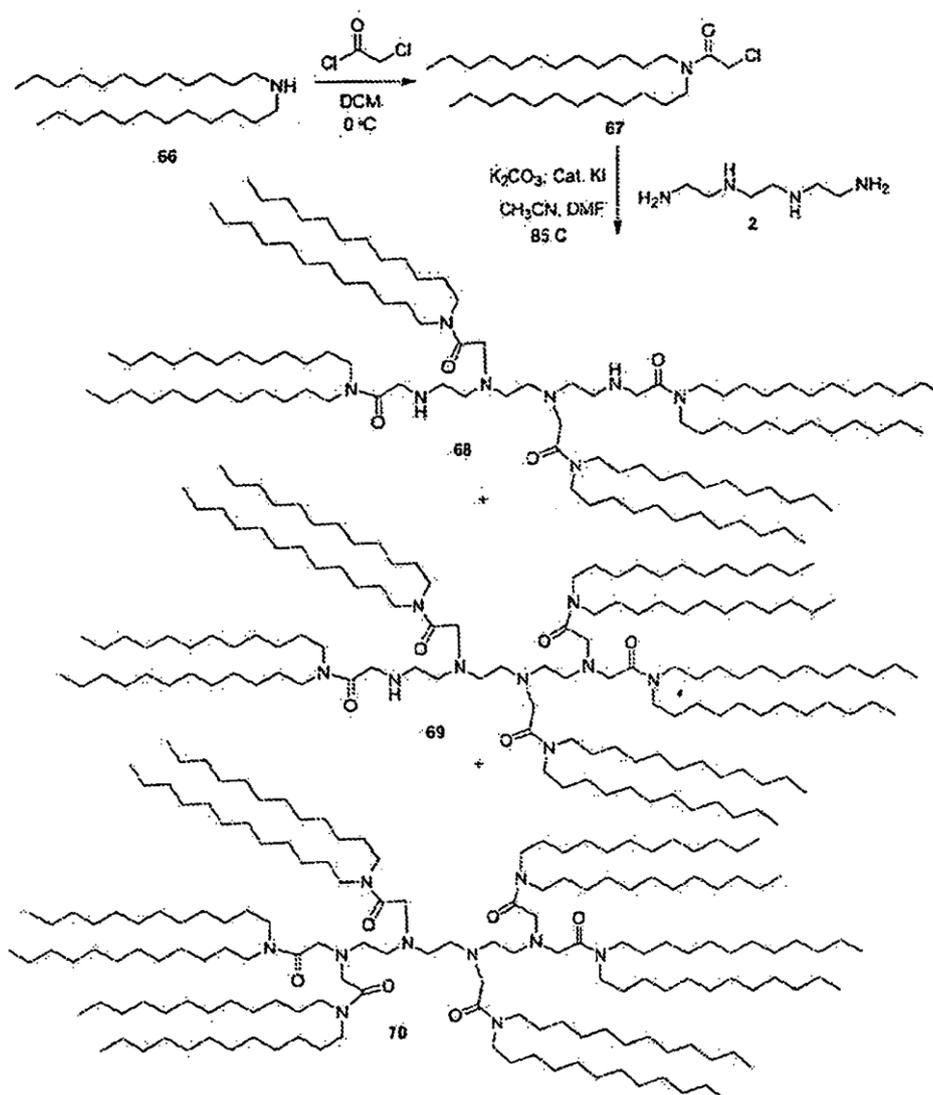


Ejemplo 22: Síntesis de poliamido-poli-amino alquilo – alquilación de aminas usando haluros de alquilo con aminoalquilo ramificados (Ejemplo de referencia)

5 Etapa 1: Preparación de 67: Se recogió cloruro de cloroacetilo (4,05 ml, 51 mmoles) en DCM (100 ml) y se enfrió hasta 0° C. A esto se le añadió disolución de diclorometano de N,N-dodecilamina (66, 15,00 g, 42,41 mmoles) y se añadió gota a gota TEA (14,43 ml, 2,5 eq.) durante un período de 1 h. La mezcla de reacción se tornó amarronada-negra para ese entonces. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de un embudo sinterizado, se lavó con EtOAc, se diluyó con cloroformo, se lavó sucesivamente con agua, disolución de bicarbonato sódico, HCl 1M y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a vacío, y el residuo se purificó por  
10 cromatografía en columna de gel de sílice (5-50% EtOAc/Hexano para obtener el producto requerido 67 (12,5 g, 69%) en forma de un líquido amarronado. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ = 4,04(s, 2H), 3,30(m, 4H), 1,50-1,45(m, 2H), 1,40-1,20(m, 18H), 0,87(t, J = 6,00Hz, 3H). MS: C<sub>26</sub>H<sub>52</sub>ClNO Cal. 430,15. Encontrado 431,2(M<sup>+</sup>).

15 Etapa 2: Preparación de 68, 69 y 70: La trietilentetramina 2 (0,500 g, 6,83 mmoles) y cloroacetamida 67 (8,10 g, 5,5 eq) se recogen juntos en una mezcla de CH<sub>3</sub>CN/DMF (1:3). A eso se le añaden K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,72 g, 10 eq) y KI (30 mg) y se calienta a 85° C durante tres días. La mezcla de reacción se filtró para eliminar los sólidos insolubles, se lavó con DCM, los disolventes se eliminaron, y la separación cromatográfica del residuo proporcionó 68, 69 y 70.

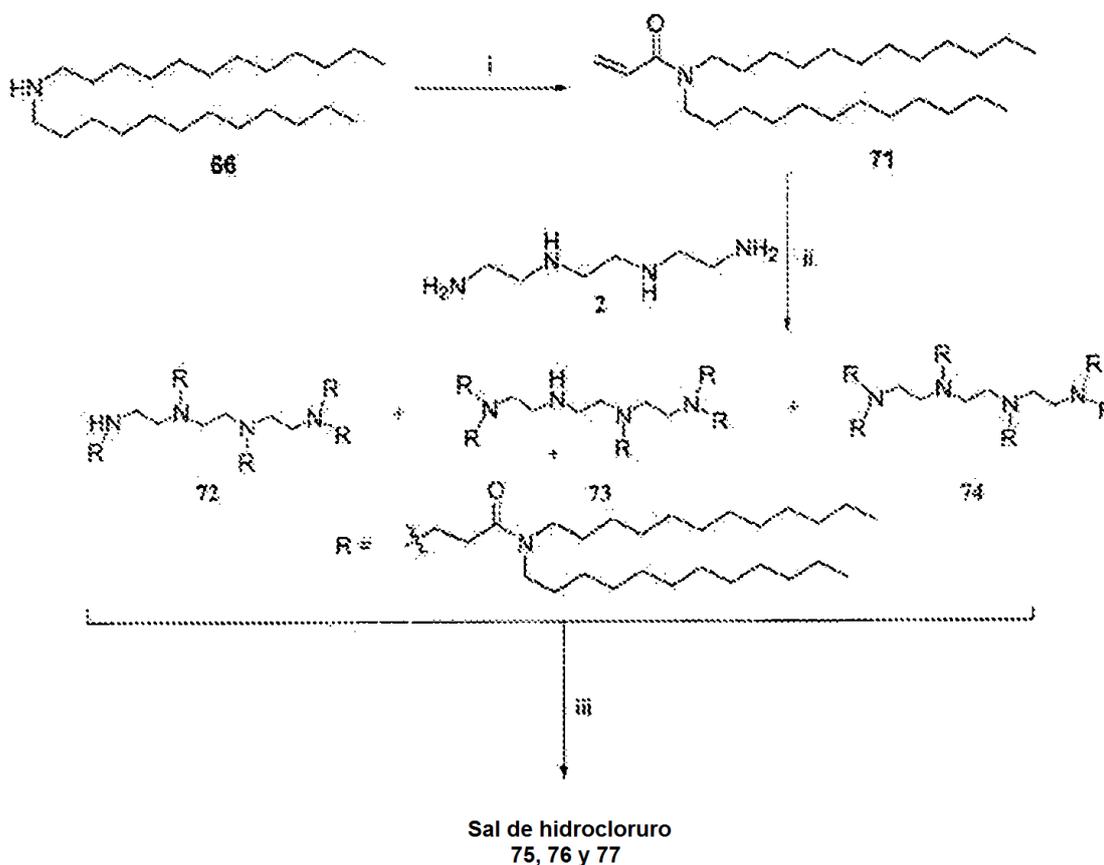
Esquema 22



Ejemplo 23: Adición de N,N-dialquilacrilamida a poliaminas (Ejemplo de referencia)

Con el fin de estudiar el efecto de añadir más cadenas hidrófobas a los lípidos catiónicos, se usó didodecilamina como precursor a la acrilamida.

5 Esquema 23<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) Cloruro de acrilóilo, -10-0° C, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 h, (ii) 90 °C, puro, 5 días y (iii) HCl/Dioxano

Etapa 1: Síntesis de N,N-Didodecilacrilamida 71

5 A una disolución de didodecilamina 66 (25 g, 700 mmoles) y diisopropiletilamina (18 g; 141 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (700 ml) a -10°C, se le añadió gota a gota una disolución de cloruro de acrilóilo (7,68 g, 85 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) durante un período de 20 min. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 4 h a 0° C, después de lo cual la TLC de la mezcla de reacción indicó que la reacción se había completado.

10 La mezcla de reacción se lavó con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (200 ml), agua (200 ml), salmuera (100 ml), y se secó sobre NaSO<sub>4</sub>. La concentración de la capa orgánica proporcionó el producto 71 (28,4 g, 100%) que se usó como tal en la siguiente etapa. <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0,94 (t, J = 6,5Hz, 6H), 1,05-1,69 (m, 40H), 3,15-3,60 (dt, 4H), 5,64 (d, 1H), 6,36 (d, 1H), 6,63 (m, 1H).

Etapa 2: Reacción de las trietilentetraminas 2 y 71.

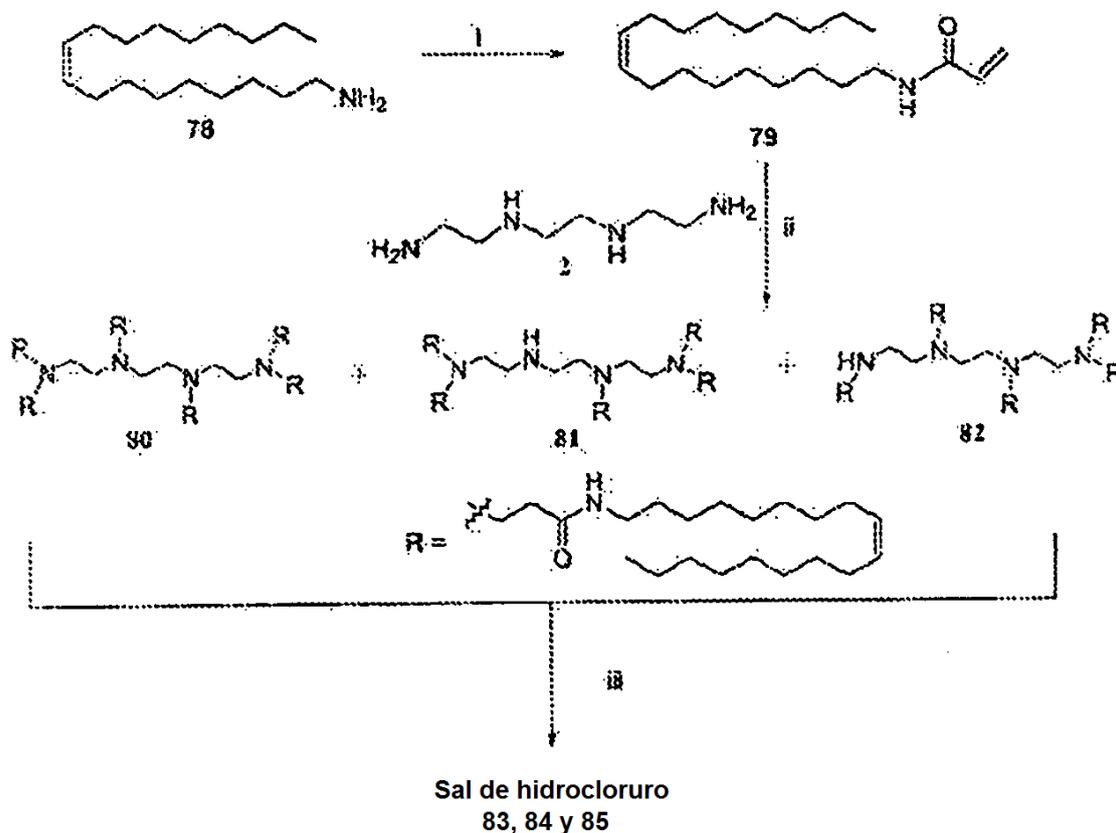
La acrilamida 71 se trató con la amina 2 y, después del tratamiento usual y de la purificación en columna, se aíslan los productos de adición de Michael 72, 73 y 74.

15 Etapa 3: Síntesis de las sales de hidrocloreuro 75, 76 y 77: Cada compuesto individual se recoge en dioxano, se añade HCl 4M en dioxano a la disolución y se agita como se describe en el ejemplo 8 para proporcionar la correspondiente sal de hidrocloreuro.

Ejemplo 24: Alquenilación de poliaminas usando N-alquil acrilamida mono insaturada bajo la condición de adición de Michael (Ejemplo de referencia)

20 Con el fin de estudiar el efecto del doble enlace en la cadena de alquilo, se usó oleilamina como precursor a la acrilamida 79.

Esquema 24a



<sup>a</sup>(i) Cloruro de acrilóilo, -10-0° C, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4h, (ii) 90° C, puro, 5 días y (iii) HCl/Dioxano

Etapa 1: Síntesis del compuesto 79: A una disolución de oleilamina 78 (26,75 g, 100 mmoles) y trietilamina (20 g, 200 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (200 ml) a -10° C, se añade gota a gota una disolución de cloruro de acrilóilo (9,9 g, 110 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) durante un período de 20 min. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 4 h a 0° C, después de lo cual la TLC de la mezcla de reacción indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se lavó con dicha disolución de NaHCO<sub>3</sub> (200 ml), agua (200 ml), salmuera (100 ml), y se secó sobre NaSO<sub>4</sub>. La concentración de la capa orgánica proporcionó el producto 79 (32 g, 100%) que se usó como tal en la etapa siguiente. <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0,91 (t, J = 6,5Hz, 3H), 1,05-1,35 (m, 24H), 1,42 (t, 2H), 1,96 (m, 4H), 5,31 (t, 1H), 5,33-5,36 (m, 1H), 5,54 (dd, 1H), 6,02 (dd, 1H), 6,18 (dd, 1H), 8,03 (bs, 1H).

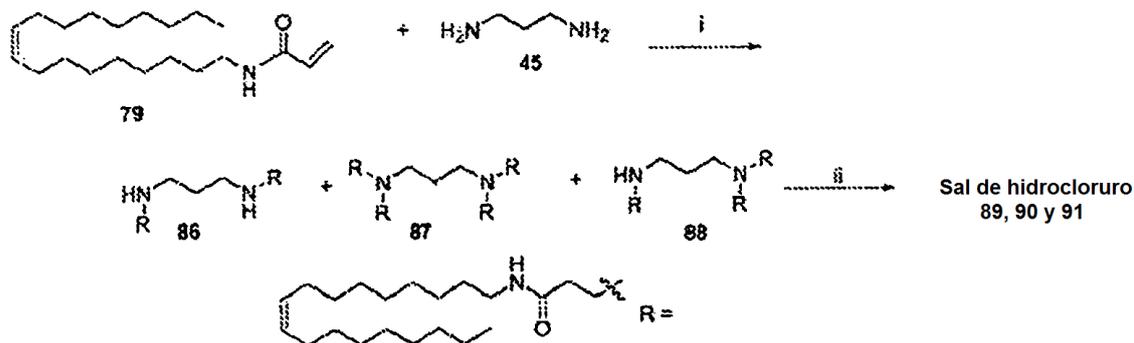
Etapa 2: Reacción del compuesto 79 con trietilentetramina

La acrilamida 79 se trató con la trietilentetramina 2 y, después del tratamiento usual y purificación en columna de los productos de adición de Michael, proporcionó los compuestos 80, 81 y 82,

Etapa 3: Síntesis de las sales de hidrocloreuro 83, 84 y 85: Cada compuesto individual (80, 81 u 82) obtenido se recoge en dioxano, se añade HCl 4M en dioxano a la disolución y se agita como se describe en el ejemplo 8 para proveer la correspondiente sal de hidrocloreuro.

Ejemplo 25: Alquenilación de diaminas usando N-alquil acrilamida mono insaturada bajo condición de adición de Michael (Ejemplo de referencia)

Esquema 25<sup>a</sup>



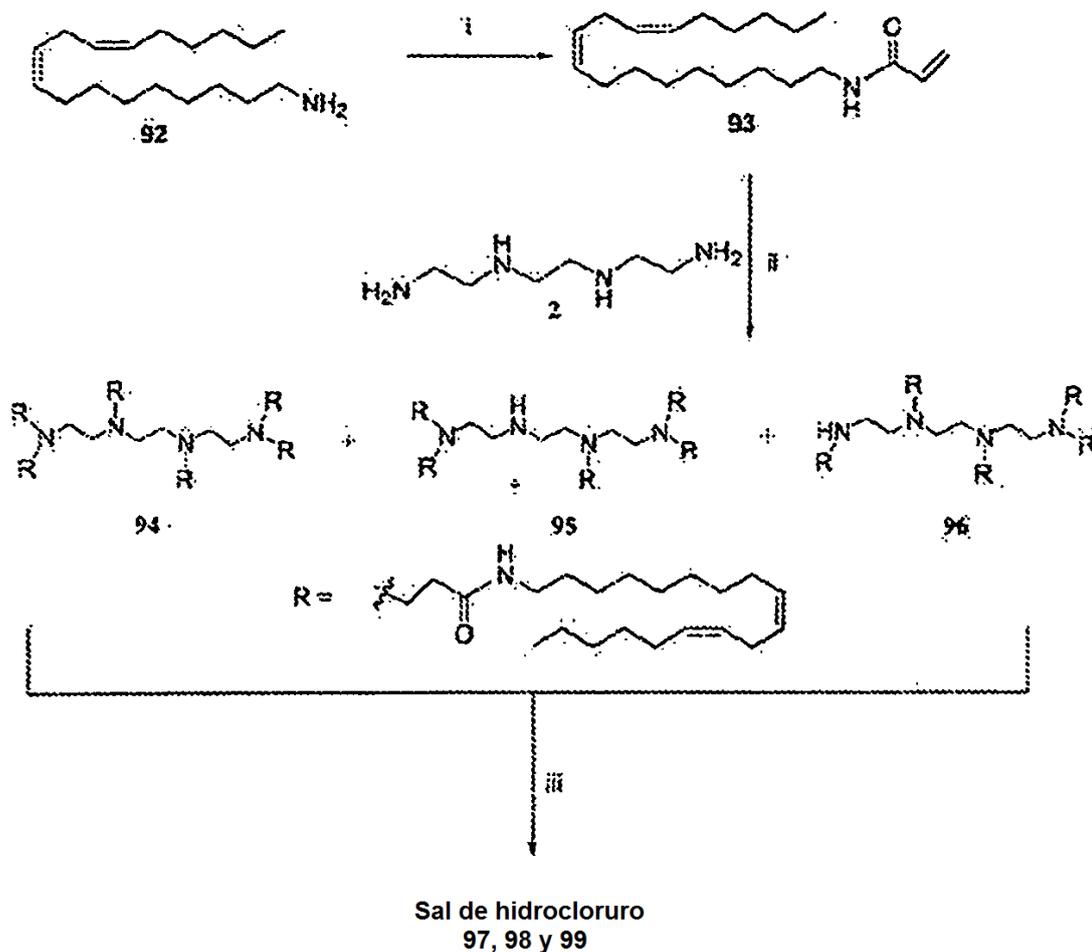
<sup>a</sup>(i) 90° C, ácido bórico acuoso, 16 h y (ii) HCl/Dioxano

5 En un procedimiento similar a aquel del Ejemplo 24, la acrilamida 79 se trata con la diamina 45 y, después del tratamiento usual y purificación en columna, se aíslan los productos de adición de Michael 86, 87 y 88. El tratamiento de la amina libre así obtenida con HCl en dioxano proporciona las correspondientes sales de hidrocioruro 89, 90 y 91 respectivamente.

Ejemplo 26: Alquilación de poliaminas usando N-alquil acrilamida poli insaturada bajo condición de adición de Michael (Ejemplo de referencia)

10 Con el fin de estudiar el efecto de la polinsaturación en la cadena de alquilo, se usó la linoleilamina 92 como precursor a la acrilamida 93.

Esquema 26<sup>a</sup>



<sup>a</sup>(i) Cloruro de acrilóilo, -10-0° C, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 h, (ii) 90° C, puro, 5 días y (iii) HCl/Dioxano

Etapa 1: Compuesto 93: La linolilamina 92 se trata con cloruro de acrilóilo en un procedimiento similar a aquel del Ejemplo 24, etapa 1, y se aísla la correspondiente acrilamida 93.

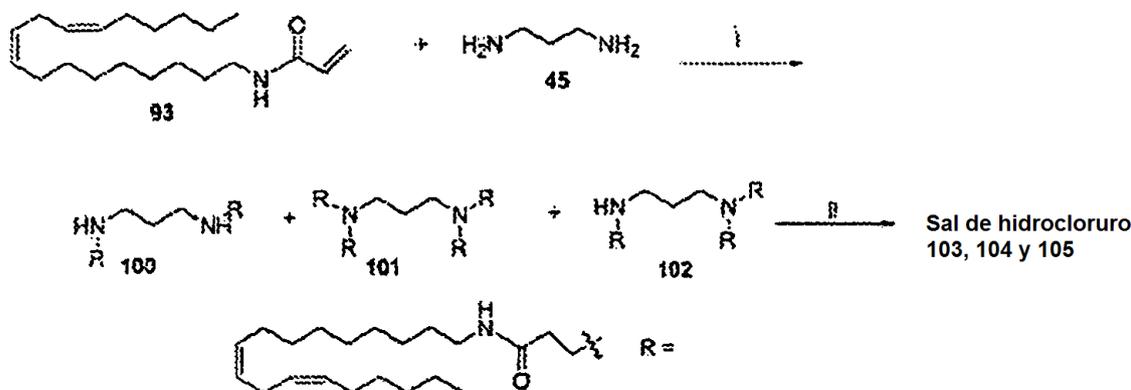
Etapa 2: Reacción del compuesto 93 con trietilentetramina

5 La acrilamida 93 se trata con trietilentetramina 2 en presencia de ácido bórico como se describe en el Ejemplo 3 y, después del tratamiento usual y purificación en columna de los productos de adición de Michael, se producen los compuestos 94, 95 y 96.

10 Etapa 3: Síntesis de las sales de hidrocioruro 97, 98 y 99: Cada compuesto individual (94, 95 o 96) obtenido se recoge en dioxano, se añade HCl 4M a la disolución y se agita como se describe en el Ejemplo 8 para proporcionar la correspondiente sal de hidrocioruro.

Ejemplo 27: Alquenilación de diaminas usando N-alquil acrilamida poli insaturada bajo la condición de adición de Michael (Ejemplo de referencia)

Esquema 27<sup>a</sup>

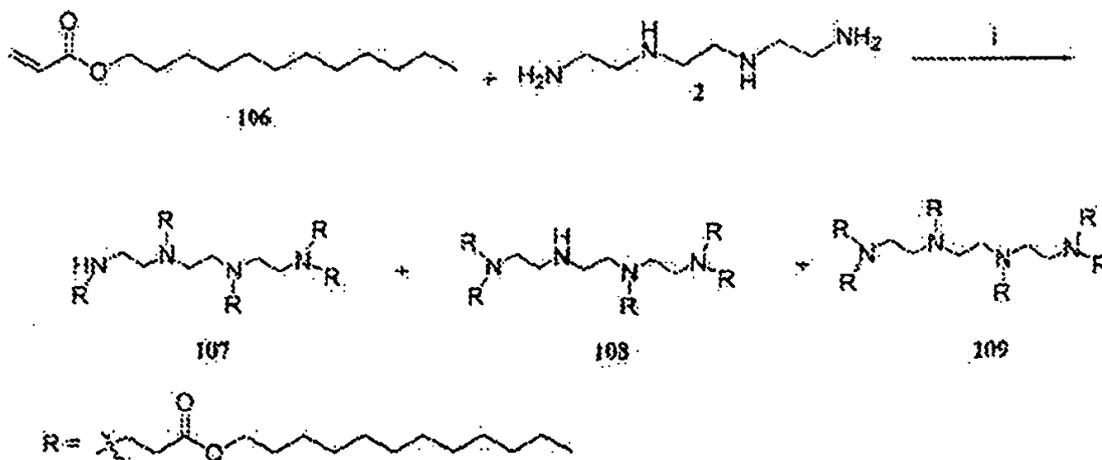


15 <sup>a</sup>(i) 90° C, ácido bórico acuoso, 16 h y (ii) HCl/Dioxano

En un procedimiento similar a aquel del Ejemplo 3, la acrilamida 93 se trata con la diamina 45 en presencia de ácido bórico, y después del tratamiento usual y purificación en columna, se aíslan los productos de adición de Michael 100, 101 y 102. El tratamiento de la amina libre así obtenida con HCl en dioxano proporciona las correspondientes sales de hidrocioruro 103, 104 y 105 respectivamente.

20 Ejemplo 28: Alquenilación de poliaminas usando alquil acrilatos bajo condición de adición de Michael (Ejemplo de referencia)

Esquema 28<sup>a</sup>



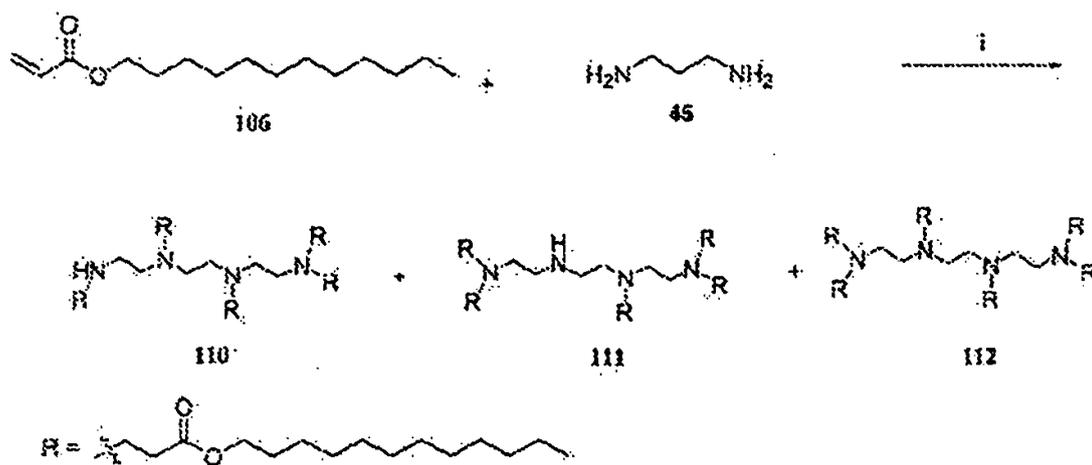
<sup>a</sup>(i) Metanol-agua, 40° C o Metanol, agua, ácido bórico, temperatura ambiente

Método 1: Se agita n-dodecilacrilato (106) con trietilentetramina 2 en metanol-agua a 40° C para obtener los compuestos 107, 108 y 109. Los productos se aíslan por separación cromatográfica.

Método 2: Se agita n-dodecilacrilato (106) con trietilentetramina 2 en presencia de ácido bórico en metanol-agua a 40° C para obtener los compuestos 107, 108 y 109. Los productos se aíslan por separación cromatográfica.

- 5 Ejemplo 29: Alquenilación de diaminas usando alquil acrilatos bajo condición de adición de Michael (Ejemplo de referencia)

Esquema 29<sup>a</sup>

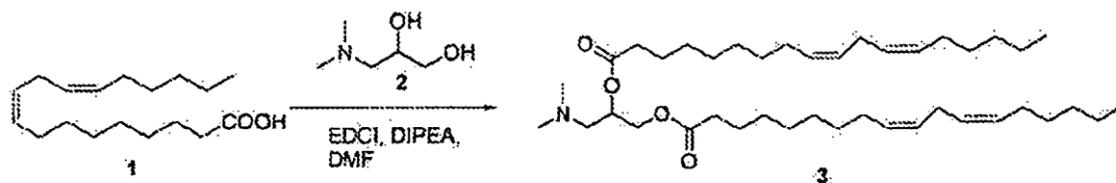


<sup>a</sup>(i) Metanol-agua, 40° C o Metanol, agua, ácido bórico, temperatura ambiente

- 10 Método 1: Se agita n-dodecilacrilato (106) con trietilentetramina 2 en metanol-agua a 40° C para obtener los compuestos 110, 111 y 112. Los productos se aíslan por separación cromatográfica.

Método 2: Se agita n-dodecilacrilato (106) con trietilentetramina 2 en presencia de ácido bórico en metanol-agua a 40° C para obtener los compuestos 110, 111 y 112. Los productos se aíslan por separación cromatográfica.

- 15 Ejemplo 30: Síntesis de éster 3-dimetilamino-2- octadeca-9.12-dienoiloxi-propílico de ácido Octadeca-9.12-dienoico 3 (Ejemplo de referencia)



- 20 A una disolución del ácido linoleico (25 g, 89,1 mmoles) en DMF anhidra (60 ml), se le añadió diisopropil etilamina (17 ml, 100 mmoles) a temperatura ambiente con agitación, seguida de 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol (4,8 g, 40,5 mmoles) y EDCI (17,25 g, 89,9 mmoles), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La TLC de la mezcla de reacción (eluyente 20% EtOAc en hexanos) indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (100 ml) y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La concentración de la capa orgánica proporcionó el producto bruto que se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyente: 20% EtOAc en hexanos). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y concentraron. El
- 25 éster puro se aisló en forma de un líquido claro (5,7 g, 22%). MS m/z 645 (M+H). <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub> δ 0,88 (t, J = 6,3 Hz, 6H), 1,20-1,39 (m, 28H), 1,61 (t, J = 4,9 Hz, 12H), 2,03-2,08 (m, 8H), 2,26-2,38 (m, 10H), 2,44-2,56 (m, 2H), 2,76 (t, J = 6,3 Hz, 4H), 4,09 (dd, J = 6,1 Hz y 11,9 Hz, 1H), 4,36 (dd, J = 3,3 & 11,9 Hz, 1H), 5,29-5,34 (m, 1H), 5,34-5,41 (m, 8H). <sup>13</sup>C NMR CDCl<sub>3</sub> y 14,30, 22,79, 25,08, 25,10, 25,83, 27,40, 29,26, 29,30, 29,34, 29,42, 29,55, 29,83, 31,73, 34,32, 34,58, 46,01, 59,37, 64,02, 128,08, 128,24, 130,21, 130,42, 173,39, 173,65.

- 30 Ejemplo 31: Procedimiento ilustrativo para preparar un liposoma utilizando extrusión

## ES 2 430 206 T3

Se preparan disoluciones madre de ND98 (120 mg/ml), colesterol (25 mg/ml) y C16- PEG-Cer-2000 (100 mg/ml) en etanol al 100%. Se conserva a -20° C. Se calienta a 37° C en un baño de agua antes de preparar las formulaciones (hasta 30 minutos resulta útil – lleva un rato disolver por completo el colesterol).

Prep 2 X 2 ml

- 5 A un tubo Falco de 15 ml, se le añaden:
  - 1) 125 µl de lípido
  - 2) 200 µl de colesterol
  - 3) 70 µl de PEG
  - 4) 5 µl de etanol al 100%
- 10 5) 600 µl de acetato de sodio 25 mM, pH 5
  - 6) Se mezcla suavemente (regulación 5) en un vórtex
  - 7) Se añaden 20 mg de sacarosa
  - 8) Se agita en vórtex nuevamente hasta disolver la sacarosa
- 15 9) Se añade 1 ml de una disolución recientemente preparada (en un nuevo tubo Falcon) de 1 mg/ml de siRNA en acetato de sodio 25 mM (=100 µl de 10 mg/ml siRNA + 900 µl de acetato de sodio 25 mM)
  - 10) Se agita ligeramente en vórtex (Regulación 1, con el adaptador del sujetador del tubo Falcon) durante 20 minutos
  - 11) Después de 15 minutos (5 minutos restantes), se limpia la extrusora
  - 12) Se extrusa 11 veces a través de dos filtros de 200 nm a 40° C
- 20 13) Se dializa contra PBS, pH 7,4 durante 90 minutos a TA en casetes de 3.500 MWCO Pierce

Ejemplo 32: Procedimiento ilustrativo para preparar un liposoma sin el uso de extrusión

Se preparan disoluciones madre de ND9S (120 mg/ml), colesterol (25 mg/ml) y C16- PEG-Cer-2000 (100 mg/ml) en etanol al 100%. Se conserva a -20° C. Se calienta en un baño de agua a 37° C antes de preparar la formulación (hasta 30 minutos resulta útil – lleva un tiempo disolver por completo el colesterol).

- 25 A un tubo Falcon de 15 ml, se le añaden:
  - 1) 125 µl de lípido
  - 2) 200 µl de colesterol
  - 3) 70 µl de PEG
  - 4) 495 µl de etanol al 100%
- 30 5) 100 µl de agua
  - 6) Se prepara 1 ml de 1 mg/ml siRNA en acetato de sodio 100-300 mM, pH ~5
  - 7) Se mezclan rápidamente los lípidos en etanol al 90% con siRNA en tampón de acetato
  - 8) Se dializa (o se usa ultrafiltración) contra acetato de sodio 100-300 mM, pH ~5 para eliminar el etanol
  - 9) Se dializa (o se usa ultrafiltración) contra PBS para cambiar las condiciones del tampón
- 35 Ejemplo 33: Protocolo ilustrativo para cuantificación de RNA en una muestra de liposoma

El siguiente procedimiento se puede utilizar para cuantificar (1) la proporción de siRNA atrapado y (2) la cantidad total de siRNA en un liposoma.

Materiales:

RiboGreen (Molecular Probes)

Tampón 2 % Triton X-100 TE

Protocolo (formato de placa de 96 pocillos):

1. Se diluyen las muestras a ensayar en tampón TE de modo tal que la concentración de siRNA sea 2 µg/ml (0:4 - 4 µg/ml). Obsérvese la dilución de las muestras.
- 5 2. Se disponen en hilera 50 µL de cada muestra en dos 2 pocillos (p. ej., muestras dispuesta en 2 hileras de la microplaca)
3. Se añaden 50 µL de tampón TE a cada una de las 2 muestras (p. ej., muestras de la hilera superior). Esta muestra se usará para determinar el siRNA "libre".
- 10 4. Se añaden 50 µl de 2% Triton X-100 al resto de las dos muestras (p. ej., muestras de la hilera inferior). Esta muestra se usará para determinar el siRNA "total".
5. Se preparan diluciones de siRNA estándar usando cantidades conocidas del siRNA que se va a cuantificar. Se comienza con 50 µl de 4 µg/ml, y se realizan diluciones dobles. Se añaden 50 µl de 2% Triton X-100 a cada una de las diluciones de la muestra estándar.
6. Se incuba durante 15 min a temperatura ambiente.
- 15 7. Se añaden 100 µl de RiboGreen diluido a todas las muestras. Se usará RiboGreen diluido en una dilución de 1:100.
8. Se lee la placa en un fluorímetro (Victor2) usando ajustes de FITC.

Cálculos:

El volumen final en los pocillos será de 200 µl,

- 20 RiboGreen tendrá una dilución final de 1:200.

Triton X-100 será de 0,5%.

Los estándares serán diluciones que comiencen en 1 µg/ml.

Se traza una curva estándar, se efectúa el ajuste lineal.

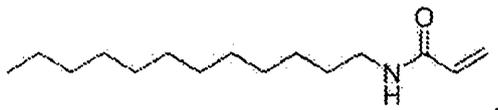
Determinación de % atrapamiento =  $100 \times (1 - \text{señal "libre"} / \text{señal "total"})$

- 25 Determinación de [siRNA]: Primero se convierte la señal "total" a la concentración usando la curva estándar, luego se multiplica por el factor de dilución.

Ejemplo 34: Comparación de restos de lípido según lo formulado en liposomas\_(Ejemplo de referencia)

- 30 La eficacia de las composiciones de lípidos puede ensayarse determinando la capacidad relativa de un lípido de administrar un resto de siRNA a una diana. Por ejemplo, el silenciamiento de una diana indica que el siRNA es administrado a la célula. Los solicitantes han comparado los complejos de liposomas que incluyen cada uno de los siguientes restos de lípidos junto con siRNA, que se usa para silenciar el Factor VII (FVII).

Inicialmente, se emplearon mezclas de reacción no purificadas. Se generaron distintas mezclas de reacción ND98 sintetizando producto en distintas relaciones monoméricas de ND:98: ND 98 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1. ND98 se genera sometiendo a reacción ND, cuya estructura se da a conocer a continuación.



- 35 con la amina 98, cuya estructura se da a conocer a continuación



en las relaciones anteriormente mencionadas (es decir, ND 98 = 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1).

Los liposomas se formularon a ND98:colesterol:FED2000-CerC16:siRNA = 15:0.8:7:1 (relaciones en peso). Los liposomas se prepararon con ND:98 = 1:1 y 2:1, precipitaron durante la formulación y no se siguieron caracterizando.

La Tabla 1 siguiente indica el tamaño de partícula promedio y el porcentaje de atrapamiento de los liposomas usando diversas relaciones monoméricas (es decir, el número indica la relación de ND relativa a 98).

5

Tabla 1:

	Tamaño de partícula promedio Z (nm)	% Atrapamiento
ND98 3	56	>95
ND98 4	56	>95
ND98 5	81	93
ND98 6	72	74

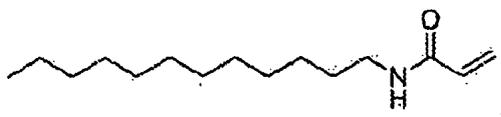
La Figura 1 indica los resultados del ensayo de silenciamiento de FVII para diversas relaciones monoméricas, usando una dosis experimental de 2 mg/kg de siRNA. Los resultados indican que el resto de 5 extremos ND98 y/o el resto de 6 extremos ND 98 son las especies más activas, ya que son las especies más abundantes, o la preparación de ND98 6:1. Como se describió, un resto de 5 extremos indica un compuesto en donde 5 de los hidrógenos en la amina de partida 98 han reaccionado con un resto de acrilamida de partida ND. Un resto de 6 extremos indica un compuesto en el que 6 de los hidrógenos en la amina de partida 98 han reaccionado con un resto de acrilamida ND. Por consiguiente, el número de "extremos" indica el número de hidrógenos que reaccionaron en la amina de partida.

10

Ejemplo 35: Determinación del isómero de lípidos preferido (Ejemplo de referencia)

15

Los solicitantes purificaron productos de lípido ND98. Los restos de lípido ND98 son los restos de lípido que resultan de la reacción de ND, cuya estructura se da a conocer a continuación:

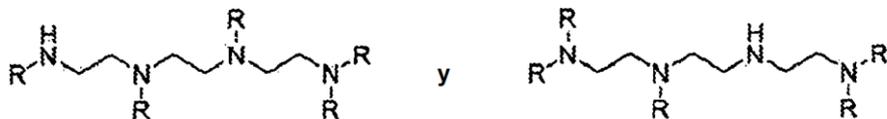


con la amina 98, cuya estructura se da a conocer a continuación



20

Los solicitante ensayaron isómeros mixtos de 4 extremos de ND98 (es decir, en donde cuatro de los hidrógenos de amina han reaccionado con la acrilamida ND anteriormente mencionada), isómeros estructurales sencillos de ND98 de 5 extremos (es decir, donde todos los hidrógenos de amina han reaccionado con la acrilamida ND anteriormente mencionada). Los ejemplos de los dos isómeros de 5 extremos se dan a conocer a continuación:



25

Se formularon liposomas de los productos ND98 purificados con los siguientes componentes en las siguientes relaciones: ND98:colesterol:PEG2000-CerC16:siRNA = 15:5:7:1 (relaciones en peso).

La Tabla 2 siguiente indica el tamaño de partícula promedio y el porcentaje de atrapamiento de los liposomas, usando las diversas relaciones monoméricas (es decir, el número indica la relación de ND relativa a 98).

Tabla 2:

	Tamaño de partícula promedio Z (nm)	% Atrapamiento
ND98 1	88	>95
ND98 2	104	86
ND98 3	115	86
ND98 4	92	>95

Para los propósitos de la Tabla 2 y la Figura 2: ND98 1 = de 5 extremos (isómero I); ND98 2 = de 5 extremos (isómero I + II), ND98 3 = de 5 extremos (isómero II); y ND98 4 = de 4 extremos.

5 Los liposomas se administraron con siRNA en dosis de 2,5 mg/kg, y se evaluaron para el silenciamiento de FVII. La Figura 2 da a conocer los resultados de la mezcla de isómeros de 4 extremos, isómeros sencillos de 5 extremos (es decir, isómero I y II) y la mezcla de isómeros de 5 extremos (es decir, isómero I y II).

Ejemplo 36: Determinación del isómero ND98 preferido (Ejemplo de referencia)

10 Se preparó y purificó un isómero purificado de 6 extremos ND98. La estructura de ND98 se corresponde con aquellas descritas en los ejemplos 34 y 35 anteriores. Los 6 extremos indican que todos los hidrógenos de la amina 98 han reaccionado con el material de partida ND. Con este material de partida de lípido, los liposomas se formularon en las siguientes relaciones: ND98 colesterol:PEG2000-CerC16:siRNA = 15:5:7:1 (relaciones en peso). La Figura 3 demuestra la eficacia del isómero de 6 extremos ND93 en la administración de siRNA, que efectivamente silenció FVII.

15 Ejemplo 37: Tamaño de partícula del liposoma usando diversos materiales de partidas de lípido ND98\_(Ejemplo de referencia)

Se formuló una pluralidad de materiales de partida que tenían las estructuras ND98 (como se indica en los ejemplos 34 y 35 anteriores) en liposomas. Se evaluó el tamaño de partícula de los liposomas. Los resultados se exponen en la siguiente Tabla 3;

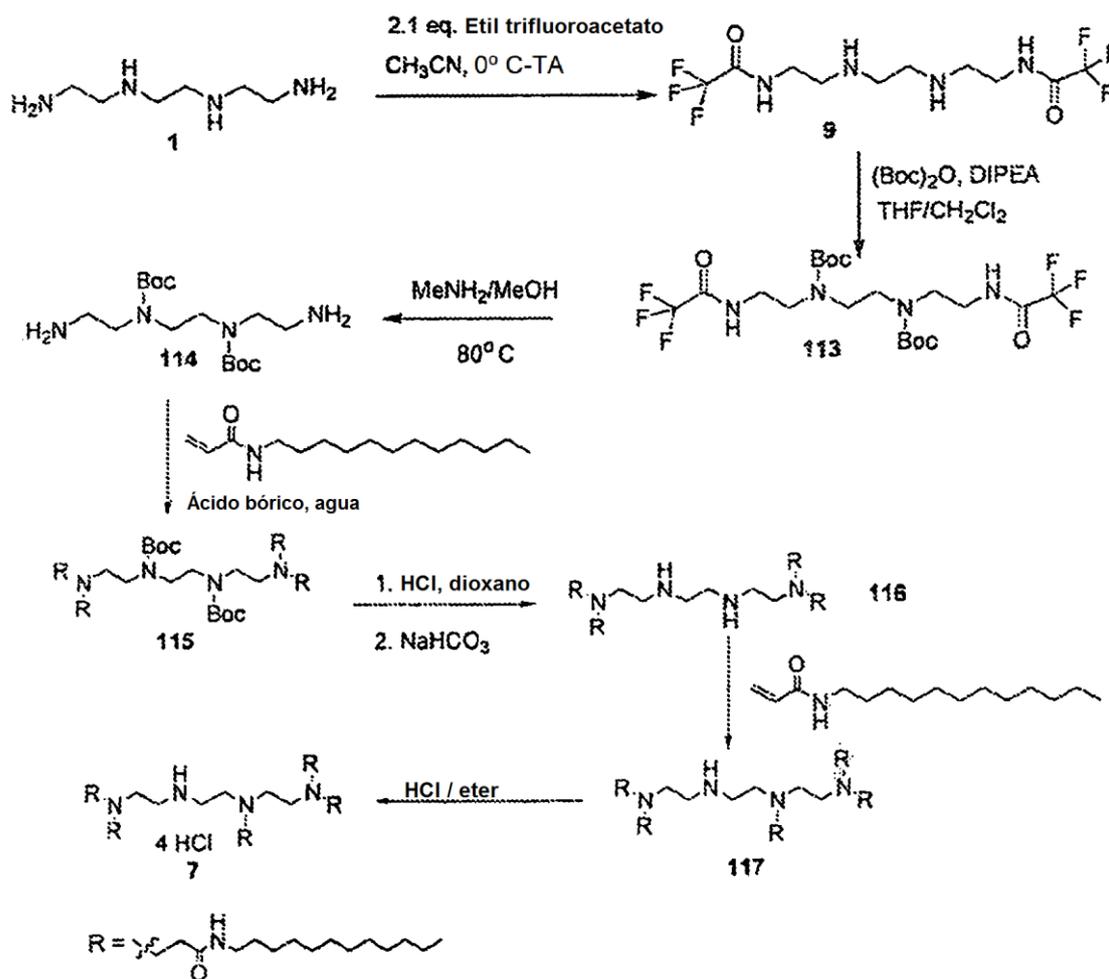
Formulación	Diámetro de partícula (nm)
ND98 3 (Exp 1)	56
ND98 4 (Exp 1)	56
ND98 5 (Exp 1)	81
ND98 6 (Exp 1)	72
ND98 1 (Exp 2)	88
ND98 2 (Exp 2)	104
ND98 3 (Exp 2)	115
ND98 4 (Exp 2)	92
ND98 de 6 extremos (Exp 3)	127

Ejemplo 38: Formulación de liposomas libre de extrusión (Ejemplo de referencia)

20 Se prepararon complejos de liposoma usando lípidos ND98 Las formulaciones incluyen las siguientes relaciones: ND98:colesterol:PEG2000-CerC16-siRNA = 15:57:1 (relaciones en peso). Los liposomas se prepararon sin extrusión, como se describe en general en el Ejemplo 32 anterior. Se prepararon dos muestras, una primera muestra que contiene lo siguiente: 100 mM = siRNA preparado en acetato de sodio 100 mM con una primera etapa de diálisis en acetato 100 mM; y una segunda muestra que contiene 300 mM = siRNA preparado en acetato de sodio 300 mM con una primera etapa de diálisis en acetato 300 mM.

25 La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo de silenciamiento de FVII, demostrando la actividad comparativa de las formulaciones preparadas usando distintos procedimientos.

Ejemplo 39: Síntesis regioselectiva de lípido catiónico 7 – estrategia 1 (Ejemplo de referencia)



Etapa 1. Preparación del compuesto 9: La trietilentetramina, **1** (48,83 g, 0,334 mol, adquirida de Sigma-Aldrich) en acetonitrilo anhidro (500 ml) se enfrió en un baño de hielo con agitación constante. Se añadió trifluoroacetato de etilo (79,6 ml, 0,668 mol) a la disolución y, después de completar la adición, la mezcla de reacción se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 20 h. El disolvente y los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida, y el residuo se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano tibio (100 ml). A esto se le añadieron hexanos fríos con agitación. El producto precipitado se enfrió y filtró para obtener un sólido blanco (**112,2 g**, 99%).

Etapa 2. Síntesis de éster *tert*-butílico de ácido (2-{*tert*-butoxicarbonil-[1-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)etil]-amino}-2-(2,2,2-trifluoro-acetilamino)etil]-carbámico **113**

- 10 La trifluoroacetamida **9** (112,2 g, 0,332 mol) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/THF (600 ml/100 ml) y a eso se le añadió diisopropiletilamina (129,25 g, 1 mol) y se agitó en un baño de hielo. Se añadió gota a gota dicarbonato de di-*tert*-butilo (145 g, 0,664 mol, adquirido de Sigma Aldrich) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante una noche. Los disolventes se eliminaron y el residuo se agitó con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (400 ml), se filtró y lavó con hexanos (100 ml) y se secó a vacío a 45° C durante una noche para obtener el compuesto de diboc puro en forma de un sólido blanco (167 g, 94%). <sup>1</sup>H NMR para **113** (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ 9,60-9,40(m 2H), 3,35-3,15(m, 12H), 1,36(s, 18H) MS: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> Cal. 438,17. Encontrado 439,20(M<sup>+</sup>) MS: C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> Cal. 538,22. Encontrado 539.20(M<sup>+</sup>).

Etapa 3 Síntesis de éster *tert*-butílico de ácido (2-amino-etil)-(2-[(2-amino-etil)-*tert*-butoxicarbonil-amino]-etil)carbámico

- 20 La acetamida **113** (167 g, 0,31 mol) se recogió en un reactor a presión de acero inoxidable y se añadió una disolución de metilamina (33% en peso) en etanol (200 ml).

La mezcla se calentó a 90° C y se agitó durante 24 h. La reacción se vigiló por espectros de masas. Todos los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se sometió a alto vacío a 80° C para proveer el producto **114** (103 g, 96%) en forma de un líquido gomoso. Este compuesto pudo usarse para la siguiente reacción sin más

purificación.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  = 3,20-3,00(m, 4H), 2,62,2,38 (m, 8H), 1,32 (s, 9H). MS:  $\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2$  Cal. 246,21, Encontrado 246,20( $\text{M}^+$ ).

#### Etapa 4. Síntesis del producto de adición de Michael 115

5 La diamina 114 (103 g, 0,297 mmol), *N*-dodecilacrilamida (356 g, 1,487 mol) y disolución saturada de ácido bórico en agua (30 ml) se recogieron juntas en un reactor a presión y se calentaron a 90° C durante 4 días. La reacción se vigiló por TLC y espectros de masas. La mezcla de reacción se extrajo en diclorometano (DCM), se lavó sucesivamente con solución de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo así obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente – acetato de etilo luego 3-10% MeOH DCM) para obtener 115 en forma de un sólido amarillo pálido (228 g, 59%) MS:  $\text{C}_{76}\text{H}_{150}\text{N}_8\text{O}_8$  Cal. 1303,16, Encontrado 1304,20( $\text{M}^+$ ).

#### Etapa 5. Preparación de la diamina 116

15 Se añadió HCl 4M en dioxano (500 ml) a una disolución del compuesto de diboc 115 (228 g, 0,175 mol) en metanol (100 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La reacción se vigiló por espectros de masas. Después de la desaparición completa del compuesto de diboc de partida, la sal de hidrocloreto precipitada se filtró, se lavó con THF (100 ml) y se secó para obtener la sal pura en forma de un polvo blanco (178 g, 93%). La sal anterior se trató con  $\text{NaHCO}_3$  saturado (1l) y se extrajo con diclorometano (3 x 600 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron y concentraron para aislar el tetrámero en forma de un sólido blanco (164 g, 85%). MS:  $\text{C}_{66}\text{H}_{134}\text{N}_8\text{O}_4$  Cal. 1103,05, Encontrado 1104,10( $\text{M}^+$ ).

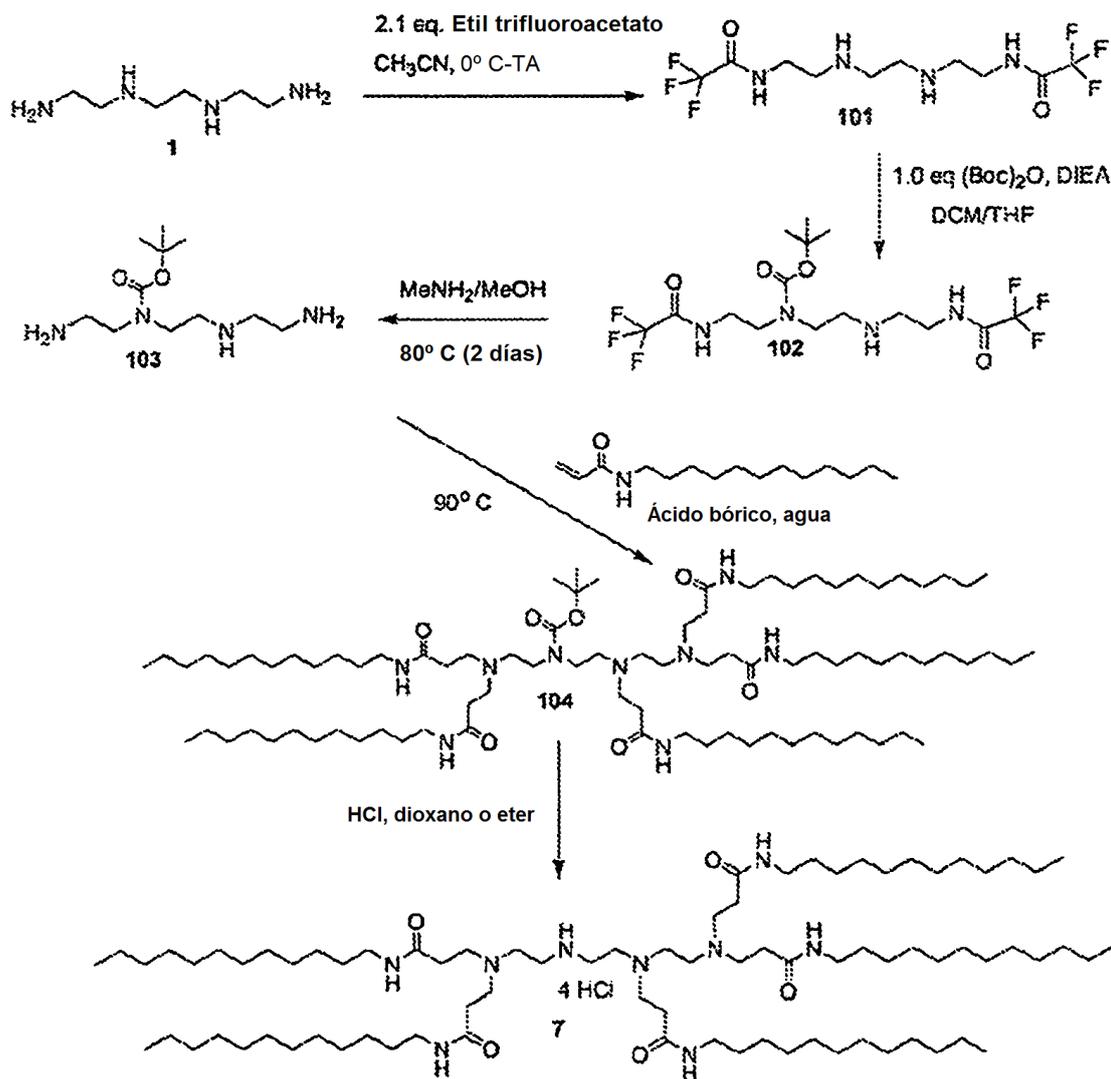
20 Etapa 6: Síntesis de 117: El compuesto 116 (164 g, 149 mmoles), *N*-dodecilacrilamida (35,6 g 149 mmoles) y disolución saturada de ácido bórico en agua (30 ml) se recogieron en un reactor a presión y se calentaron a 90° C durante 3 días. El progreso de la reacción se vigiló por TLC y espectros de masas. La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano (DCM), se lavó sucesivamente con disolución de  $\text{NaHCO}_3$  y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo así obtenido se purificó por cromatografía en columna con gel de sílice (2 Kg) (elución en gradiente-0:5:95-10:10:80% TEA/MeOH/DCM) para obtener 117 en forma de un sólido amarillo pálido (83,8 g, 42%). MS:  $\text{C}_{76}\text{H}_{150}\text{N}_8\text{O}_8$  Cal. 1303,16, Encontrado 1304 20( $\text{M}^+$ ). El material se comparó con TLC de muestra auténtica (cualitativa), HPLC y espectros de masas. MS:  $\text{C}_{81}\text{H}_{163}\text{N}_9\text{O}_5$  Cal. 1342,28, Encontrado 1343,30( $\text{M}^+$ ).

#### Etapa 7. Síntesis de la sal de hidrocloreto 7

30 La amina 117 (54 g, 40 mmoles) se disolvió en etanol (100 ml) y se le añadieron 200 ml de HCl 2M en éter, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Se burbujeó nitrógeno a la mezcla de reacción y la salida se pasó por dryrite y por una disolución al 10% de KOH. Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y el residuo se redisolvió en 500 ml de etanol anhidro, y la mezcla se concentró en un evaporador giratorio. Este procedimiento se repitió una vez más y el residuo así obtenido se secó en un horno de vacío a 43° C durante una noche. El producto puro se aisló en forma de un polvo de color crema (59,5 g, 99%).

35 Ejemplo 40: Síntesis regioselectiva de lípido catiónico 7 - estrategia 2

#### Método 1 (Ejemplo de referencia)



5 Etapa 1: La trietilentetramina 1 (200 g, 1,37 mol, adquirida de Sigma-Aldrich) en acetonitrilo (2 L) en un matraz de 4 cuellos de 5 l con agitador superior se enfrió en un baño de hielo con agitación constante. Se añadió trifluoroacetato de etilo (388,5 g, 2,74 mol) a la disolución en agitación y se agitó durante 20 h. El disolvente y los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida; el residuo se trituró con una mezcla de DCM/Hexano y se filtró para obtener 101 en forma de un sólido blanco (429 g, 93%). El producto así obtenido pudo usarse en la siguiente reacción sin purificación adicional MS:  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_2$  Cal. 338,12, Encontrado 339,0( $\text{M}^+$ ).

10 Etapa 2: El compuesto bruto 101 (427 g, 1,26 mol) se disolvió en una mezcla de disolventes (3 l, THF/DCM (1:2)) y se agitó en un baño de agua con hielo. Se añadieron dicarbonato de di-*tert*-butilo (( $\text{Boc}$ ) $_2\text{O}$ , 270 g, 1,26 mol, adquirido de Sigma Aldrich) y DIEA (500 ml, 2,86 moles) a la mezcla de reacción, y se agitó durante una noche. Los disolventes se eliminaron y el residuo se extrajo en diclorometano (DCM 1000 ml), se lavó sucesivamente con disolución de  $\text{NaHCO}_3$  (500 ml), agua (500 ml x2) y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo así obtenido se trituró con DCM/Hexano (2:1) y se filtró. Los disolventes se eliminaron y el residuo se secó en alto vacío para obtener el compuesto 102 en forma de un líquido gomoso (523 g).

15 Parte del compuesto 102 se purificó por cromatografía de gel de sílice (elución en gradiente, acetato de etilo seguido de 3-10%  $\text{MeOH}$  DCM) para obtener el compuesto 102 en forma de un líquido gomoso (102,00 g.).  $^1\text{H}$  NMR para 102 ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400MHZ)  $\delta$  9,60-9,10(m, 3H), 3,35-3,25(m, 4H), 3,25-3,20(2, 2H), 3,20-3,10(m, 2H), 2,68-2,58(m, 4H), 1,35(s, 9H). MS:  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_4$  Cal. 438,17, Encontrado 439,20( $\text{M}^+$ ).

20 Etapa 3: El compuesto purificado 102 (102,0 g, 233,40 mmol) se disolvió en etanol/metilamina (400 ml, 33% en peso disolución de metilamina en EtOH) a temperatura ambiente en un reactor a presión. La mezcla se calentó a  $90^\circ\text{C}$  y se agitó durante dos días. La reacción se vigiló por espectros de masas. Todos los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo se sometió a alto vacío a  $80^\circ\text{C}$  para proporcionar el producto 103 (58,00 g, 99%) en

forma de un líquido gomoso, y este compuesto pudo usarse para la siguiente reacción sin purificación adicional.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$  = 3,20-3,00(m, 4H), 2,62-2,38 (m, 8H), 1,32(s, 9H), MS:  $\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2$  Cal. 246,21, Encontrado 247,20( $\text{M}^+$ ).

5 Etapa 4: La triamina 103 (56,00 g, 227,64 mmoles), *N*-dodecilacrilamida (327,00 g, 1365 mmoles) y disolución saturada de ácido bórico en agua (50 ml) se recogieron juntas en un reactor a presión y se calentaron a 90° C durante 6 días. La reacción se vigiló por TLC y espectros de masas. La mezcla de reacción se extrajo en diclorometano (DCM), se lavó sucesivamente con disolución de  $\text{NaHCO}_3$  (400 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente – acetato de etilo luego 3-10% MeOH/DCM) para obtener 104 en forma de un sólido amarillo pálido (186 g, 57%)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400MHz)  $\delta$  = 7,20(bs, 1H), 7,05(bs, 1H), 6,85(bs, 1H), 6,74(bs, 1H), 3,25-3,03(m, 12H), 2,80-2,60 (m, 8H), 2,55-2,21(m, 12H) 1,52-1,45(m, 10H), 1,42(s, 9H), 1,34-1,20(m, 100H), 0,87(t, J=6,5Hz, 15H). MS:  $\text{C}_{86}\text{H}_{171}\text{N}_9\text{O}_7$  Cal. 1442 33, Encontrado 1443,30( $\text{M}^+$ ).

15 Etapa 5: Se añadió HCl 4M en dioxano (400 ml) a una disolución del compuesto 105 (184,00 g 127,23 mmoles) en dioxano (300 ml). La mezcla de reacción se dejó luego agitar durante una noche. La reacción se vigiló por espectros de masas. Se eliminó el exceso de HCl pasando nitrógeno por la disolución. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo se coevaporó tres veces con etanol (500 ml X 3) para dar un sólido gomoso de color amarillo pálido 7 (186,00 g, 98%) como sal de tetrahidrocloruro. El material se comparó con TLC de la muestra auténtica (cualitativa), HPLC y espectros de masas. MS  $\text{C}_{81}\text{H}_{163}\text{N}_9\text{O}_5$  Cal. 1342,28, Encontrado 1343,30( $\text{M}^+$ )

#### Método 2

20 El compuesto 102 se preparó como se describe en el Método 1, etapas 1 y 2. El producto bruto obtenido en la etapa 2 del Método 1 se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

25 Etapa 1: El compuesto 102 (103,45 g, 238,90 mmoles), el compuesto bruto de la etapa 2, Método 1, se disolvió en etanol/metilamina (400 ml, 33% en peso de disolución de metilamina en EtOH) a temperatura ambiente en un reactor a presión. La mezcla se calentó a 90° C y se agitó durante dos días. La reacción se vigiló por espectros de masas. Todos los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se sometió a alto vacío a 80° C sobre un baño de agua para proporcionar el producto 103 (63,50 g) en forma de un líquido gomoso de color amarillo pálido. Este compuesto pudo usarse en la siguiente reacción sin purificación adicional.

30 Etapa 4: La triamina 103 (63,50 g, 238 mmoles), *N*-dodecilacrilamida (320,00 g, 1338 mmoles) y disolución saturada de ácido bórico en agua (50 ml) se recogieron juntas en un reactor a presión y se calentaron a 90° C durante 6 días, como se describió en la etapa 4 del Método 1. La reacción se vigiló por TLC y espectros de masas. La mezcla de reacción se extrajo en diclorometano (DCM), se lavó sucesivamente con disolución de  $\text{NaHCO}_3$  (400 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo así obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente – acetato de etilo, luego 3-10% MeOH/DCM) para obtener 104 en forma de un sólido amarillo pálido (65,2 g, 20%).

35 Etapa 5: Se añadió HCl 2M en éter (800 ml) al compuesto 105 (65,00 g 45 mmoles). La mezcla de reacción se dejó entonces agitar durante una noche. La reacción se vigiló por espectros de masas. El exceso de HCl se eliminó pasando nitrógeno por la disolución. Los disolventes se eliminaron a vacío y el residuo se coevaporó tres veces con etanol (500 ml X 3) para dar un sólido gomoso de color amarillo pálido 7 (66 g, 98%) en forma de una sal de tetrahidrocloruro. El material se comparó con TLC de la muestra auténtica (cualitativa), HPLC y espectros de masas MS:  $\text{C}_{81}\text{H}_{163}\text{N}_9\text{O}_5$  Cal 1342,28, Encontrado 1343,30( $\text{M}^+$ )

#### Método 3

El compuesto 102 se preparó como se describió en el Método 1, etapas 1 y 2. El producto bruto obtenido de la etapa 2 del Método 1 se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional:

45 Etapa 3: El compuesto 102 (105,20 g, 240 mmoles, el compuesto bruto del Método 1) se disolvió en etanol/metilamina (400 ml, 33% en peso disolución de metilamina en EtOH) a temperatura ambiente en un reactor a presión. La mezcla se calentó a 90° C y se agitó durante dos días. La reacción se vigiló por espectros de masas. Todos los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se sometió a alto vacío a 80° C en un baño de hielo para proporcionar el producto 103 (64,70 g) en forma de un líquido gomoso de color amarillo pálido. Este compuesto pudo utilizarse en la siguiente reacción sin purificación adicional.

50 Etapa 4: La triamina 103 (64,70 g, 240 mmoles), *N*-dodecilacrilamida (370,00 g, 1569 mmoles) y disolución saturada de ácido bórico en agua (50 ml) se recogieron juntas en un reactor a presión y se calentaron a 90° C durante 6 días. La reacción se vigiló por TLC y espectros de masas. La mezcla de reacción se extrajo en diclorometano (DCM), se lavó sucesivamente con disolución de  $\text{NaHCO}_3$  (400 ml) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo así obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente – Acetato de etilo, luego 3-10% MeOH/DCM) para obtener 104 en forma de un sólido amarillo pálido (192 g)

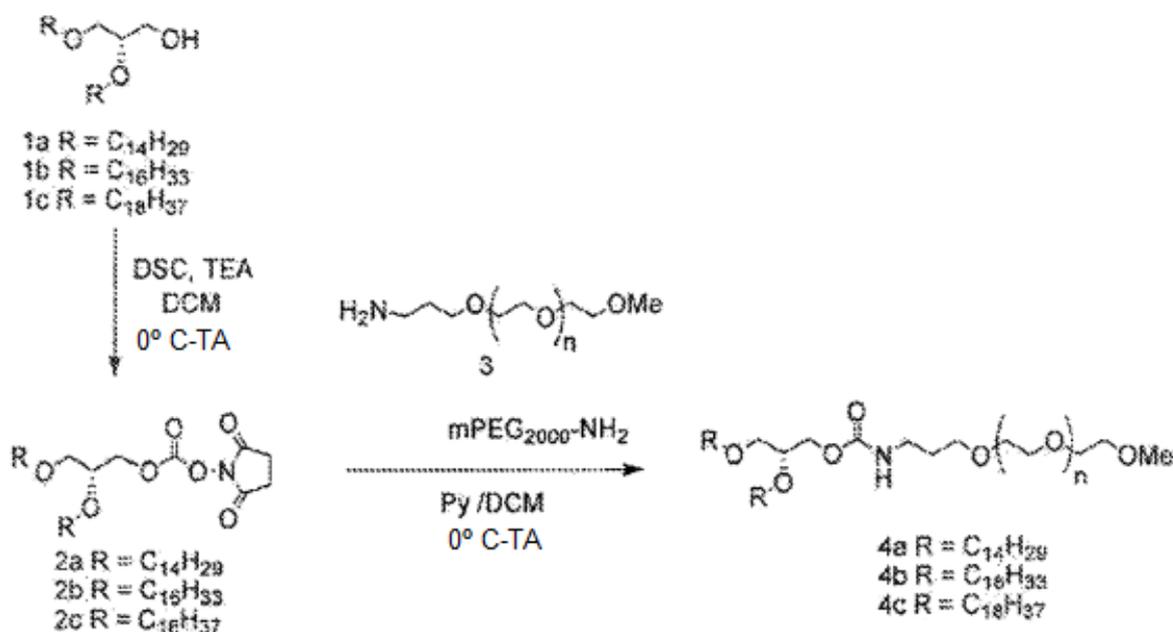
Etapa 5: El compuesto deseado 7 se obtuvo como la sal de hidrocloreto a partir del compuesto 104 como se describe en la etapa 5, Método 1 del Ejemplo 40. Compuesto 7: 194 g (98%) como sal de tetrahidrocloreto. El material se comparó con TLC de la muestra auténtica (cualitativa), HPLC y espectros de masas. MS:  $C_{81}H_{163}N_9O_5$  Cal. 1342.28, Encontrado 1343,30(M<sup>+</sup>).

- 5 Ejemplo 41: Comparación de actividad de siRNA formulado en diversos complejos de asociación que tienen distintos restos de lípido de PEG:

La eficacia de las composiciones de lípidos se puede ensayar determinando la capacidad relativa de un lípido de administrar un resto siRNA a una diana. Por ejemplo, el silenciamiento de una diana indica que el siRNA es administrado a la célula. Los solicitantes han comparado los complejos de asociación que incluyen uno de 13 restos de lípido de PEG distintos, según se indica en la Figura 5, junto con siRNA que se usa para silenciar el Factor VII (FVII).

Los lípidos de PEG 1-13 se sintetizaron usando los siguientes procedimientos:

Esquema 1<sup>a</sup>



- 15 <sup>a</sup>Esquema 1: Mpeg2000-1,2-Di-O-alkil-sn3-carbomilglicérido

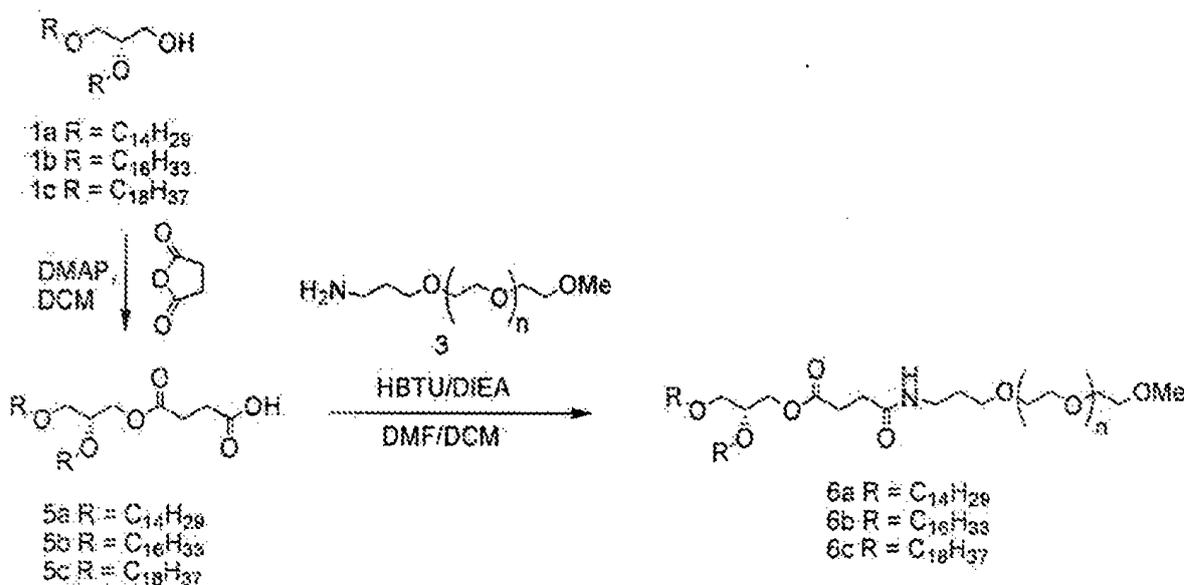
Preparación del compuesto 5: 1,2-Di-O-tetradecil-*sn*-glicérido 1 (30 g, 61,80 mmoles) y *N,N*-succinimidilcarbonato (DSC 23,76 g, 1,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (DCM, 500 ml) y se agitaron en una mezcla de hielo y agua. Se añadió trietilamina (25,30 ml, 3 eq) a una disolución en agitación y posteriormente la mezcla de reacción se dejó agitar durante una noche a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se vigiló por TLC. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (400 ml) y la capa orgánica se lavó con agua (2X500 ml), disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (500 ml) seguida por tratamiento estándar. El residuo obtenido se secó a temperatura ambiente en alto vacío durante una noche. Después de secar, el carbonato crudo 3 obtenido se disolvió en diclorometano (500 ml) y se agitó sobre un baño de hielo. A la disolución en agitación se le añadieron mPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> (4, 103,00 g, 47,20 mmoles, adquirido de NOF Corporation, Japón) y piridina anhidra (80 ml), exceso) bajo argón. La mezcla de reacción se dejó luego agitar a temperatura ambiente durante una noche. Los disolventes y los extractos volátiles se eliminaron a vacío y el residuo se disolvió en DCM (200 ml) y se cargó en una columna de gel de sílice rellena con acetato de etilo. La columna se eluyó inicialmente con acetato de etilo y posteriormente con gradiente de 5-10% metanol en diclorometano para proporcionar el lípido de PEG 5 deseado en forma de un sólido blanco (105,30 g, 83%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5,20-5,12(m, 1H), 4,18-4,01(m, 2H), 3,80-3,70(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2,10-2,01(m, 2H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,56-1,45(m, 4H), 1,31-1,15(m, 48H), 0,84(t, J = 6,5Hz, 6H). intervalo de MS encontrado: 2660-2836.

Preparación de 4b: 1,2-Di-O-hexadecil-*sn*-glicérido 1b (1,00 g 1,848 mmoles) y DSC (0,710 g, 1,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (20 ml) y se enfriaron hasta 0° C en una mezcla de agua y hielo. Se añadió trietilamina (1,00 ml, 3 eq) y se agitó durante una noche. La reacción fue seguida por TLC, se diluyó con DCM, se lavó con agua (2 veces), disolución de NaHCO<sub>3</sub> y se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo 2b en alto vacío durante una noche. Este compuesto se utilizó directamente en la reacción siguiente sin

purificación adicional. MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3 (1,50 g, 0,687 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón) y el compuesto de la etapa previa 2b (0,702 g, 1,5 eq) se disolvieron en diclorometano (20 ml) bajo argón. La reacción se enfrió a 0° C. Se añadió piridina (1 ml, exceso) y se agitó durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. Los disolventes y los componentes volátiles se eliminaron a vacío y el residuo se purificó por cromatografía (primero acetato de etilo, luego 5-10% MeOH/DCM como elución en gradiente) para obtener el compuesto requerido 4b en forma de un sólido blanco (1,46 g, 76%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5,17(t, J= 5,5Hz, 1H), 4,13(dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,05(dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,82-3,75(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2,05-1,90(m, 2H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,45(m, 6H), 1,35-1,17(m 56H), 0,85(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2716-2892.

Preparación de 4c: 1,2-Di-O-octadecil-*sn*-glicérido 1c (4,00 g 6,70 mmoles) y DSC (2,58 g, 1,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (60 ml) y se enfriaron hasta 0° C en una mezcla de agua y hielo. Se añadió trietilamina (2,75 ml, 3 eq) y se agitó durante una noche. La reacción fue seguida por TLC, se diluyó con DCM, se lavó con agua (2 veces), disolución de NaHCO<sub>3</sub>, y se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo en alto vacío durante una noche. Este compuesto se utilizó directamente en la reacción siguiente con purificación adicional. MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3 (1,50 g, 0,687 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón) y el compuesto de la etapa previa 2c (0,760 g, 1,5 eq) se disolvieron en diclorometano (20 ml) bajo argón. La reacción se enfrió a 0° C. Se añadió piridina (1 ml, exceso) y se agitó durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. Los disolventes y los componentes volátiles se eliminaron a vacío, y el residuo se purificó por cromatografía (primero acetato de etilo, luego 5-10% MeOH/DCM como elución en gradiente) para obtener el compuesto requerido 4c en forma de un sólido blanco (0,92 g, 48%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5,22-5,15(m, 1H), 4,16(dd, J = 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,06(dd, J = 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,81-3,75(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,48(m, 4H) 1,31-1,15(m, 64H), 0,85(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado 2774-2948.

Esquema 2<sup>a</sup>



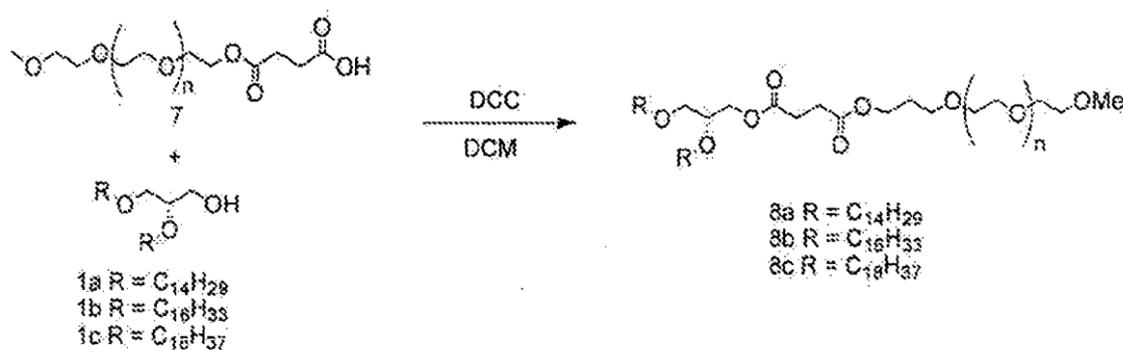
<sup>a</sup>Esquema 2: Mpeg2000-1,2-Di-O-alkil-*sn*3-succinilglicérido

Preparación del compuesto 6a: 1,2-Di-O-tetradecil-*sn*-glicérido (1,00 g, 2,06 mmoles), anhídrido succínico (0,416 g, 2 eq) y DMAP (0,628 g, 2,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (20 ml) y se agitaron durante una noche. A la reacción le siguió el análisis por TLC, se diluyó con DCM, se lavó con ácido cítrico diluido frío, agua, y se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se sometió a alto vacío durante una noche. Este compuesto se usó directamente en la reacción siguiente con purificación adicional. MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3 (1,50 g, 0,687 mmoles, adquirido de NOF Corporation, Japón), el compuesto de la etapa previa 5a (0,66 g, 1,12 eq) y HBTU (0,430 g, 1,13 mmoles) se disolvieron en una mezcla de diclorometano/DMF (2:1, 20 ml) bajo argón. Se añadió DIEA (0,358 ml, 3 eq.) y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se transfirió a un matraz grande, y se eliminaron los disolventes y los extractos volátiles a presión reducida. El residuo se secó en alto vacío durante una noche y se purificó por cromatografía (primero acetato de etilo, luego 5-10% MeOH/DCM como una elución en gradiente) para obtener el compuesto requerido 6a en forma de un sólido blanco (0,822g, 43%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 6,34-6,30(m, 1H), 4,16(dd, J = 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,08(dd, J = 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,82-3,78(m, 2H), 3,70-3,30(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2,64 (t, J= 7,00Hz, 2H), 2,43(t J= 6,80Hz, 2H), 76-1,72(m, 2H), 1,56-1,48(m, 4H), 1,34-1,16(m, 48H), 0,85(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado 2644-2804.

Preparación del compuesto 6b: 1,2-Di-O-hexadecil-*sn*-glicérido 1b (1,00 g, 1,848 mmoles), anhídrido succínico (0,0369 g, 2 eq) y DMAP (0,563 g, 2,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (20 ml) y se agitaron durante una noche. A la reacción le siguió el análisis por TLC, se diluyó con DCM, se lavó con ácido cítrico diluido frío, agua, y se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo se secó en alto vacío durante una noche. Este compuesto se utilizó directamente en la reacción siguiente con purificación adicional. MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3 (1,50 g, 0,687 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), el compuesto de la etapa previa 5b (0,66 g, 1,03 mmoles) y HBTU (0,400 g, 1,05 mmoles) se disolvieron en una mezcla de diclorometano/DMF (2:1, 20 ml) bajo argón. Se añadió DIEA (0,358 ml, 3 eq.) y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se transfirió a un matraz grande, y se eliminaron los disolventes y los componentes volátiles a presión reducida. El residuo se secó en alto vacío durante una noche y se purificó por cromatografía (primero acetato de etilo, luego 5-10% MeOH/DCM como una elución en gradiente) para obtener el compuesto requerido 6b en forma de un sólido blanco (0,300 g, 16%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 6,33-6,28(m, 1H), 4,18(dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,08(dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,82-3,76(m, 2H), 3,70-3,30(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2,65 (t, J= 7,08Hz, 2H), 2,44(t, J 6,83Hz, 2H), 1,76-1,68 (m, 2H), 1,57-1,48(m, 4H), 1,32-1,17(m, 56H), 0,86(t, J= 6,6Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2640-2822.

Preparación del compuesto 6c: 1,2-Di-O-octadecil-*sn*-glicérido (5,00 g, 8,37 mmoles), anhídrido succínico (1,70 g, 2 eq) y DMAP (2,55 g, 2,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (50 ml) y se agitaron durante una noche. A la reacción le siguió el análisis por TLC, se diluyó con DCM, se lavó con ácido cítrico diluido frío, agua, y se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se secó en alto vacío durante una noche. Este compuesto se utilizó directamente en la reacción siguiente con purificación adicional. MPEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> 3 (1,50 g, 0,687 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), el compuesto de la etapa previa 5c (0,718 g, 1,03 mmoles) y HBTU (0,410 g, 1,08 mmoles) se disolvieron en una mezcla de diclorometano/DMF (2:1, 20 ml) bajo argón. Se añadió DIEA (0,350 ml, 3 eq.) y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se transfirió a un matraz grande, y los disolventes y los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo se secó en alto vacío durante una noche y se purificó por cromatografía (primero acetato de etilo, luego 5-10% MeOH/DCM como una elución en gradiente) para obtener el compuesto 6c requerido en forma de un sólido blanco (1,1 g, 56%). <sup>1</sup>H NMR CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 6,38-6,33 (m, 1H), 4,19(dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,07(dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,81-3,74(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2,61 (t, J= 7,03Hz, 2H), 2,43(t, J= 6,87Hz, 2H), 1,76-1,68 (m, 2H), 1,57-1,48(m, 4H), 1,32-1,17(m, 64H), 0,86(t, J=6,60Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2680-2922

Esquema 3<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Esquema 3: Mpeg2000-1,2-Di-O-alkil-*sn*-succinilglicérido

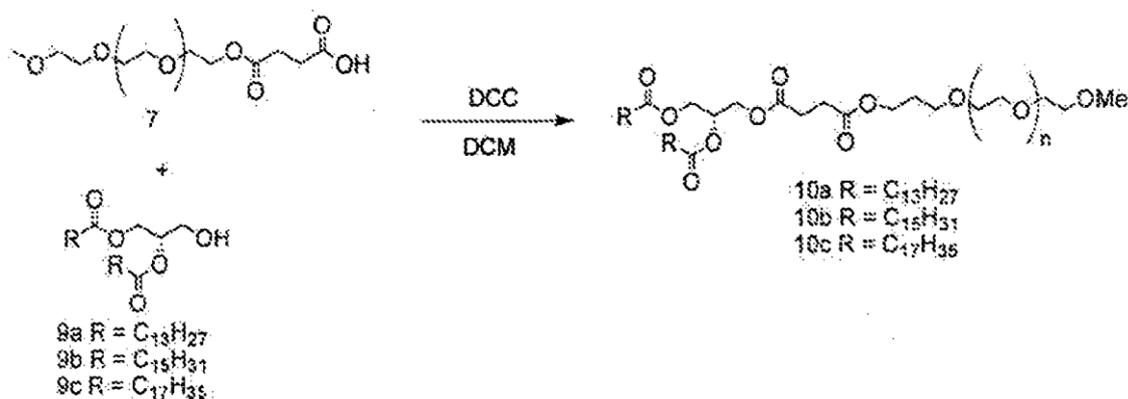
Preparación del compuesto 8a: 1,2-Di-O-tetradecil-*sn*-glicérido 1a (0,300 g, 0,618 mmol), MPEG-Succinato 7 (1,00 g, 0,476 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), DCC (0,127 g, 1,3 eq) y DMAP (0,058 g, 0,476 mmol) se recogieron en diclorometano (20 ml) bajo argón y se agitaron durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a 0° C después de agitar durante una noche, y el sólido precipitado se separó por filtración. Los componentes volátiles y los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía (primero se eluyó con EtOAc, seguido de 5-10% DCM/MeOH elución en gradiente) para obtener el compuesto 8a en forma de un sólido blanco (0,590 g, 48%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 4,25-4,18(m, 2H), 4,08(dd, J= 5,60Hz, 11,50 Hz, 1H), 3,80-3,73(m, 2H), 3,70-3,30(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 1,56-1,47(m, 4H), 1,30-1,15(m, 48H), 0,85(t, J= 6,60Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2440-2708

Preparación del compuesto 8b: 1,2-Di-O-hexadecil-*sn*-glicérido 1b 0,334 g, 0,618 mmol), MPEG-Succinato 7 (1,00g, 0,476 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), DCC (0,127 g, 1,3 eq) y DMAP (0,058 g, 0,476 mmol) se recogieron en diclorometano (20 ml) bajo argón y se agitaron durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a 0° C después de agitar durante una noche, el sólido precipitado se separó por filtración. Los extractos volátiles y los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía (primero se eluyó con EtOAc, seguido de 5-10% DCM/MeOH elución en gradiente) para obtener el

compuesto 8b en forma de un sólido blanco (0,930 g, 74%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 4,25-4,17(m, 2H), 4,09(dd,  $J$  = 5,50Hz, 11,50 Hz, 1H), 3,81-3,73(m, 2H), 3,70-3,30(m,  $-\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ -, PEG- $\text{CH}_2$ ), 1,58-1,47(m, 4H), 1,30-1,17(m, 56H), 0,86(t,  $J$  = 6,60Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2452-2760.

Preparación del compuesto 8c: 1,2-Di-*O*-octadecil-*sn*-glicérido 1c (0,369 g, 0,618 mmol), MPEG-Succinato 7 (1,00 g, 0,476 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), DCC (0,127 g, 1,3 eq) y DMAP (0,058 g, 0,476 mmol) se recogieron en diclorometano (20 ml) bajo argón y se agitaron durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a 0° C después de agitar durante una noche, y el sólido precipitado se separó por filtración. Los extractos volátiles y los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía (se eluyó primero con EtOAc, seguido de 5-10 % DCM/MeOH elución en gradiente) para obtener el compuesto 8c en forma de un sólido blanco (0,960 g, 75%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 4,27-4,20(m, 2H), 4,10(dd,  $J$  = 5,80Hz, 11,50 Hz, 1H), 3,83-3,74(m, 2H), 3,70-3,35(m,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ -, PEG- $\text{CH}_2$ ), 1,54-1,46(m, 4H), 1,30-1,17(m, 64H), 0,86(t,  $J$  = 6,60Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado 2508-2816.

Esquema 4<sup>a</sup>



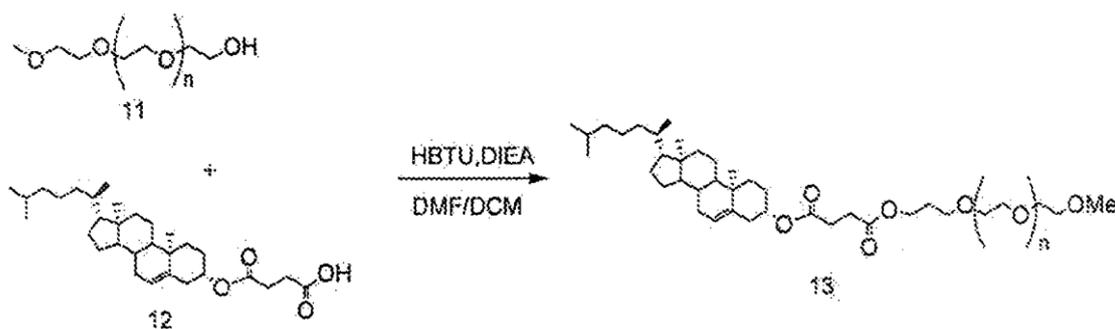
15 <sup>a</sup>Esquema 4: Mpeg2000-1,2-Di-*O*-acil-*sn*3-succinilglicérido

Preparación del compuesto 10a: 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicerol 9a (0,317 g, 0,618 mmol), MPEG-Succinato 7 (1,00 g, 0,476 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), DCC (0,127 g, 1,3 eq) y DMAP (0,058 g, 0,476 mmol) se recogieron en diclorometano (20 ml) bajo argón y se agitaron durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a 0° C después de agitar durante una noche, y el sólido precipitado se eliminó por filtración. Los componentes volátiles y los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía (se eluyó primero con EtOAc, seguido de 5-10% DCM/MeOH elución en gradiente) para obtener el compuesto 10a en forma de un sólido blanco (0,960 g, 78%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 5,26-5,20(m, 1H), 4,30-4,08(m, 6H), 3,81-3,73(m, 2H), 3,70-3,40(m,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ -, PEG- $\text{CH}_2$ ), 2,65-2,60(m, 4H), 2,35-2,28(m, 4H), 1,63-1,52(m, 4H), 1,30-1,15(m, 44H), 0,86(t,  $J$  = 6,60Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2468-2732.

Preparación del compuesto 10b: 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicerol 9b (0,352 g, 0,618 mmol), MPEG-Succinato 7 (1,00 g, 0,476 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), DCC (0,127 g, 1,3 eq) y DMAP (0,058 g, 0,476 mmol) se recogieron en diclorometano (20 ml) bajo argón y se agitaron durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a 0° C durante una noche, y el sólido precipitado se eliminó por filtración. Los componentes volátiles y los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía (se eluyó primero con EtOAc, seguido de 5-10% DCM/MeOH elución en gradiente) para obtener el compuesto 10b en forma de un sólido blanco (1,02 g, 81%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 5,26-5,19(m, 1H), 4,30-4,05(m, 6H), 3,80-3,40(m,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ -, PEG- $\text{CH}_2$ ), 2,65-2,60(m, 4H), 2,33-2,24(m, 4H), 1,63-1,50(m, 4H), 1,30-1,15(m, 52H), 0,85(t,  $J$  = 6,60Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2524-2792.

Preparación del compuesto 10c: 1,2-Distearoil-*sn*-glicerol 9c (0,387 g, 0,618 mmol). MPFG-Succinato 7 (1,00 g, 0,476 mmol, adquirido de NOF Corporation, Japón), DCC (0,127 g, 1,3 eq) y DMAP (0,058 g, 0,476 mmol) se recogieron en diclorometano (20 ml) bajo argón y se agitaron durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a 0° C después de agitar durante una noche, y el sólido precipitado se separó por filtración. Los componentes volátiles y los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía (se eluyó primero con EtOAc, seguido de 5-10% DCM/MeOH elución en gradiente) para obtener el compuesto 10c en forma de un sólido blanco (1,04 g, 80%).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 5,26-5,19(m, 1H), 4,30-4,05(m, 6H), 3,80-3,40(m,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ -, PEG- $\text{CH}_2$ ), 2,66-2 59(m, 4H), 2,31-2,26(m, 4H), 1,63-1,52(m, 4H), 1,30-1,15(m, 52H), 0,85(t,  $J$  = 6,60Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2540-2844

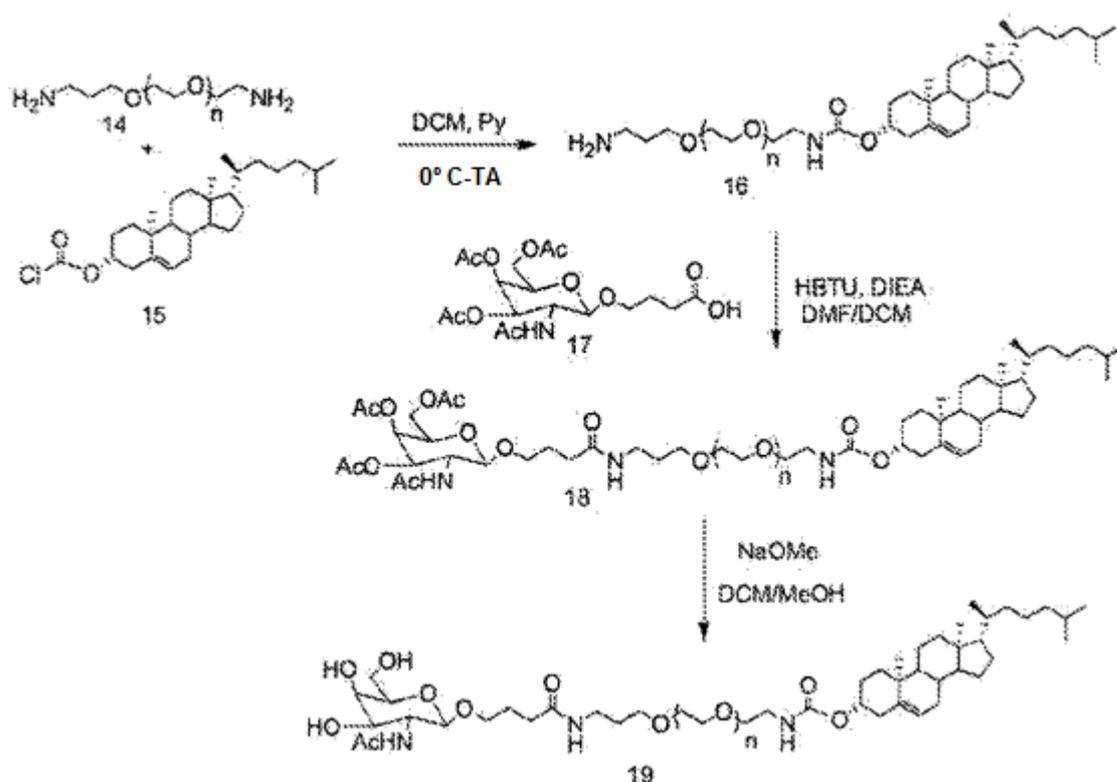
Esquema 5<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Esquema 5: Colesteril-mPEG2000

Preparación del compuesto 13: mPEG<sub>2000</sub>-OH 11 (6,00 g, 3 mmoles, adquirido de Sigma-Aldrich), Colesterol hemisuccinato 12 (1,50 g, 3,08 mmoles) y HBTU (1,23 g, 3,23 mmoles) se disolvieron en una mezcla de diclorometano/DMF (2:1, 100 ml) bajo argón. Se añadió DIEA (1,60 ml, 3 eq.) y se agitó durante una noche. Los disolventes y los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo se secó en alto vacío durante una noche y se purificó por cromatografía (primero acetato de etilo, luego 5-10% MeOH/DCM como una elución en gradiente) para obtener el compuesto 13 requerido en forma de un sólido blanco (5,05 g, 68%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5,35-5,25(m, 1H), 4,60-4,50(m, 1H), 4,22-4,18(m, 2H), 3,80-3,76(m, 2H), 3,72-3,40(m, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, PEG-CH<sub>2</sub>), 2,64-2,56(m, 4H), 2,31-2,20(m, 3H), 2,01-0,8(m, 44H). Intervalo de MS encontrado: 2390-2654.

Ejemplo 42: Lípidos de PEG dirigidos



Preparación de 19:

Eta 1: El compuesto 14 (2,00 g, 1,01 mmoles) y cloroformato de colesterol 15 (0,453 g, 1,01 mmoles) se recogieron juntos en diclorometano (20 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y agua. Se añadió trietilamina (0,448 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. El disolvente se eliminó, y el residuo se purificó por cromatografía de gel de sílice (Acetato de etilo seguido de 5-10% MeOH DCM) para obtener el compuesto 16 deseado (1,10 g, 45,40%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 5,35(m, 1H), 5,15(m, 1H), 3,40-3,85(m, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,10-3,25(m, 10H), 0,80-2,38(m, 44H, Colesterol) Intervalo de MS encontrado: 2220-2490.

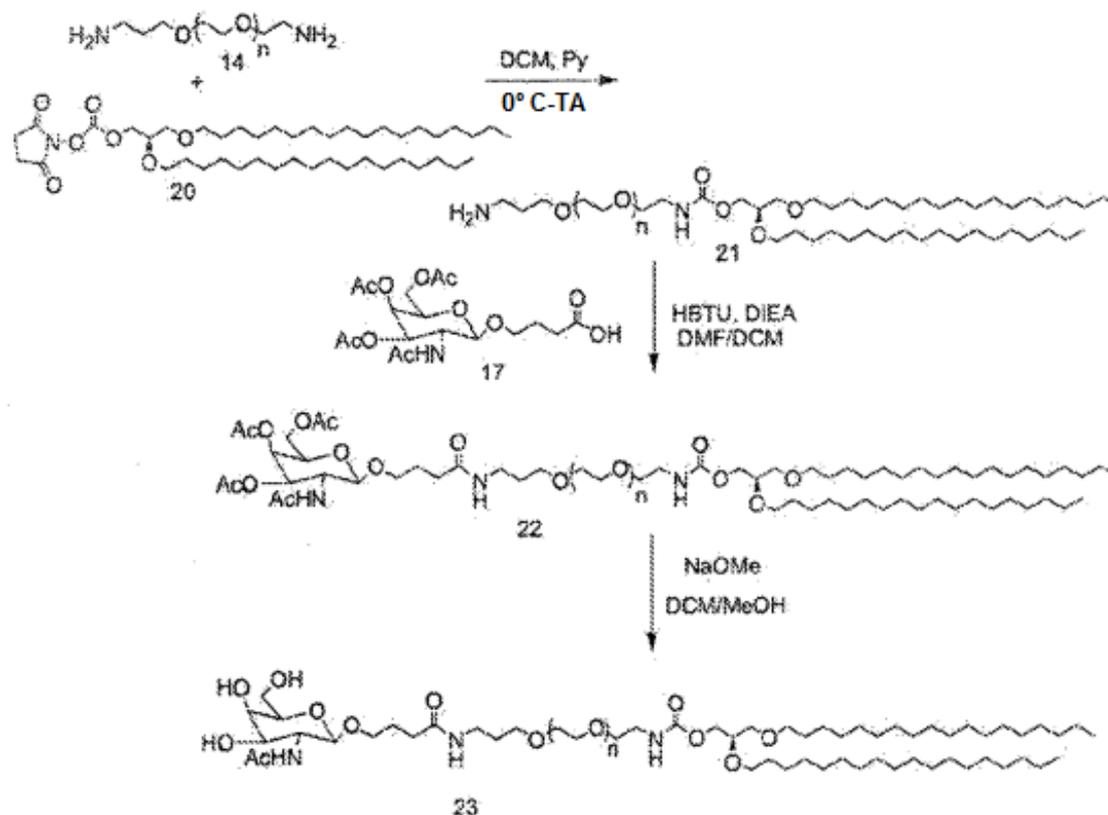
Etapa 2: El compuesto 16 (1,00 g, 0,417 mmol), 17 (0,235 g, 0,542 mmol) y HBTU (0,190 g, 0,5 mmol) se recogieron en una mezcla de DCM/DMF (20 ml, 2:1). A esto se le añadió DIEA y se agitó durante una noche. La reacción se vigiló por TLC, los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía (5-10% MeOH/DCM) para obtener el compuesto 18 deseado (1,02 g, 87%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ = 7,52(d, J= 8,06 Hz, 1H), 7,33(t, J= 7,02 Hz, 1H), 7,25(t, J= 7,32 Hz, 1H), 5,27(m, 1H), 5,18(d, J= 3,2 Hz, 1H), 4,92(dd, J= 3,17, 11,23 Hz, 1H), 4,43(m, 1H), 3,60-4,02(m, 5H), 3,20-3,55(m, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,90-3,10(m, 10H), 2,05(s, 3H), 1,96(s, 3H), 1,84(s, 3H), 1,77(s, 3H), 0,80-2,18(m, 44H, Colesterol). Intervalo de MS encontrado: 2680-2990

5

Etapa 3: El compuesto 18 (1,02 g, 0,362 mmol) se disolvió en una mezcla de MeOH/DCM (10 ml) a la que se le añadió una disolución 0,5 de NaOMe en metanol (exceso) y se agitó durante una noche. El progreso de la reacción se vigiló por TLC. La mezcla se neutralizó con AcOH. Los disolventes se eliminaron a vacío, y el residuo se purificó por cromatografía (5-10% MeOH/DCM) para obtener el compuesto 19 (280 mg, 30%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5,38(m, 1H), 4,02-4,06(m, 7H), 3,30-3,80(m, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,20-3,29(m, 8H), 2,08(s, 3H), 0,80-2,38(m, 44H, Colesterol). Intervalo de MS encontrado: 2600-2900.

10

Ejemplo 43: Lípidos de PEG dirigidos



15

Preparación de 23:

Etapa 1: El compuesto 14 (2,00 g, 1,01 mmoles) y el compuesto 20 (0,453 g, 1,01 mmoles) se recogieron juntos en diclorometano (20 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y agua. Se añadió piridina (1 ml, exceso), y la mezcla de reacción se agitó durante una noche. La reacción se vigiló por TLC. El disolvente se eliminó, y el residuo se purificó por cromatografía de gel de sílice (Acetato de etilo seguido de 5-10% MeOH/DCM) para obtener el compuesto deseado 21 (400 mg, 15%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5,20(m, 1H), 4,05-4,20(m, 2H), 3,20-3,80(m, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1,70-1,82(m, 4H), 1,50-1,61(m, 2H), 1,18-1,38(m, 60H), 0,87(t, J= 6,30 Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2400-2750.

20

Etapa 2: El compuesto 21 (0,415 g, 0,159 mmol), 17 (0,100 g, 1,3 eq) y HBTU (0,90 g, 1,15 eq) se recogieron en una mezcla de DCM/DMF (20 ml, 2:1). A esto se le añadió DIEA (0,2 ml) y se agitó durante una noche. La reacción se vigiló por TLC, los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía (3-10% MeOH/DCM) para obtener el compuesto deseado 22 (0,450 g, 94%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 6,21(d, J= 8,70 Hz, 1H), 5,33(d, J= 2,70 Hz, 1H), 5,15-5,20(m, 2H), 4,55(d, J= 8,15 Hz, 1H), 4,01-4,20(m, 4H), 3,20-3,90(m, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2-14(s, 3H), 2,03(s, 3H), 1,99(s, 3H), 1,93(s, 3H), 1,70-1,82(m, 4H), 1,50-1,61(m, 4H), 1,17-1,38(m, 60H), 0,86(t, J= 6,32 Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2800-3200.

25

30

Etapa 3 El compuesto 22 (0,450 g, 0,359 mmol) se disolvió en una mezcla de MeOH/DCM (5 ml) a la que se le añadió disolución 0,5 M de NaOMe en metanol (exceso) y se agitó durante una noche. El progreso de la reacción se vigiló por TLC. La mezcla se neutralizó con AcOH. Los disolventes se eliminaron a vacío, y el residuo se purificó por cromatografía (5-10% MeOH/DCM) para obtener el compuesto 23 (365 mg, 85%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5,18(m, 1H), 4,05-4,20(m, 4H), 3,20-3,90(m, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,05(s, 3H), 1,71-1,80(m, 4H), 1,50-1,61(m, 4H), 1,17-1,38(m, 60H), 0,87(t, J= 6,32 Hz, 6H) Intervalo de MS encontrado. 2760-3000.

Como se indica en la Figura 6, las formulaciones, cuando se administraron a un sujeto, proporcionaron un grado variable de silenciamiento de FVII. Por ejemplo, la formulación 3 proporcionó un grado relativamente alto de silenciamiento de FVII, al igual que las formulaciones 5, 6 y 12.

#### 10 Ejemplo 44: Tolerabilidad de la formulación LNP01 administrada a ratones (Ejemplo de referencia)

Se prepararon liposomas vacíos con la composición ND98 colesterol:PEG-C14 = 42,48:10 (relación molar) como se describe en el Ejemplo 45. Se añadieron luego diferentes cantidades de siRNA a los liposomas vacíos pre-formados y extrusados para proveer las formulaciones con relaciones iniciales totales de excipiente:siRNA de 30:1, 20:1, 15:1, 10:1 y 5:1 (peso:peso) La preparación de una formulación en una relación total de excipiente:siRNA de 5:1 produce un exceso de siRNA en la formulación, saturando la capacidad de carga de lípido. El exceso de siRNA se eliminó entonces por filtración de flujo tangencial, usando una membrana de 100.000 MWCO contra 5 volúmenes de PBS. Las formulaciones resultantes se administraron luego a ratones G57BL/6 mediante de una inyección en la vena del rabo, en una dosis de 10 mg/kg de siRNA. La tolerabilidad de las formulaciones se evaluó midiendo el aumento de peso corporal de los animales 24 h y 48 h después de la administración de la formulación, cuyos resultados se exhiben en la Figura 7.

Ejemplo 45: Formación de complejos de asociación formando primero complejos no cargados y luego tratando los complejos no cargados con siRNA, y administración de complejos de asociación que incluyen dos agentes terapéuticos (Ejemplo de referencia)

Se prepararon complejos de asociación que tenían dos restos de ácido nucleico distintos, de la siguiente manera: Se prepararon disoluciones madre de ND98, Colesterol y PEG-C14 en etanol en las siguientes concentraciones: 133 mg/ml, 25 mg/ml y 100 mg/ml para ND98, colesterol y PEG-C14, respectivamente Las disoluciones madre de lípido se mezclaron luego para proporcionar relaciones molares de ND98:colesterol PEG-C14 de 42.48 10. Esta mezcla se añadió luego a tampón acuoso, produciendo la formulación espontánea de nanopartículas de lípido en etanol al 35%, acetato sódico 100 mM, pH5. Las nanopartículas de lípido no cargadas se pasaron luego dos veces por una membrana de 0,08 μm Whatman Nucleopore) usando una extrusora (Lipex, Northern Lipids) para dar vesículas unimodales con un tamaño de 20-100 nm. Se añadió luego la cantidad apropiada de siRNA en etanol al 35% a las vesículas no cargadas a las que se les midió previamente el tamaño, a una relación total de excipiente:siRNA de 7,5 1 (peso:peso). La mezcla resultante se incubó entonces a 37° C durante 30 min para permitir la carga de siRNA en las nanopartículas de lípido. Después de la incubación se llevó a cabo la eliminación del etanol y el intercambio de tampón o bien por diálisis o por filtración de flujo tangencial contra PBS. La formulación final se pasó luego por un filtro estéril de 0,2 μm. En la Figura 8 se exhibe un diagrama que demuestra el orden de adición de los excipientes y los agentes terapéuticos.

Se formuló una mezcla 1:1 de los siRNA dirigidos a ApoB y al Factor VII como se describió en el Ejemplo 44. Por separado se formularon individualmente los mismos siRNA dirigidos a ApoB y al Factor VII como se describió en el Ejemplo 31. Las tres formulaciones se administraron luego en dosis variables en un volumen de inyección de 10 μl/g por peso corporal del animal. Cuarenta y ocho horas después de la administración, se recogieron las muestras de suero por sangrado retrorbital. Los animales fueron sacrificados, y se les extirparon los hígados. Las concentraciones de Factor VII en el suero se determinaron usando un kit de diagnóstico cromogénico (Coaset Factor VII Assay Kit, DiaPharma) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los niveles de mRNA hepáticos de ApoB y Factor VII se determinaron usando un ensayo de DNA ramificado (bdNA) (Quantigene, Panomics). Los resultados se exponen en la Figura 9. No se observaron signos de inhibición entre los dos agentes terapéuticos. En cambio, ambos agentes terapéuticos demostraron eficacia cuando se administraron.

#### Ejemplo 46: Métodos para elaborar complejos de asociación usando vesículas preformadas

##### Preparación de disolución madre de lípido

50 Se prepararon disoluciones madre de lípido ND98 4HCl (PM 1487), colesterol, y PEG-C14 metanol en las siguientes concentraciones: 133 mg/ml, 25 mg/ml y 100 mg/ml para ND98, colesterol y PEG-C14, respectivamente. Las disoluciones madre se calentaron a 50° C para ayudar a llevar los lípidos a disolución.

##### Preparación de vesículas vacías

55 Las disoluciones madre de lípido se mezclaron entonces de acuerdo con los volúmenes que se mencionan a continuación para proveer relaciones molares de ND98:colesterol:PEG-C14 de 42:48:10. Se preparó también una mezcla acuosa de acuerdo con los volúmenes que se mencionan en la siguiente tabla.

Volumen de mezcla de lípido (ml)			
ND98	Colesterol	PEG	Total
56.250	90.000	31.500	177.750
Mezcla acuosa (ml)			
Agua	NaOAc 3M	Etanol	Total
378.000	27.000	40.327	445.327

La mezcla de lípido etanólica se añadió luego a la mezcla acuosa mientras se agitaba rápidamente en una placa con agitador magnético. Tras mezclar, las vesículas de lípido se formaron espontáneamente. Las vesículas resultantes se extrusaron luego (2 pasadas) a través de una membrana de 0,08  $\mu$  (Whatman, Nucleopore) para dar tamaño a las vesículas vacías. Todas las manipulaciones se efectuaron a temperatura ambiente.

#### 5 Carga de vesículas vacías con siRNA

Se preparó una disolución madre de siRNA disolviendo siRNA doble desalado en acetato sódico 50 mM, pH 5 a una concentración de 10 mg/ml. Un volumen apropiado de esta disolución madre de siRNA se mezcló con un volumen apropiado de etanol para dar una disolución de siRNA diluida en etanol al 35% (vol) (véase la tabla a continuación).

Dilución de siRNA

Disolución madre de siRNA (mg/ml)	siRNA (NaOAc 50 nM)	Etanol	Total
10	180.000	96.923	276.923

- 10 Se añaden 277 ml de disolución diluida de siRNA a 623 ml de mezcla de vesículas vacías mientras se agita rápidamente en una placa de agitación magnética. La mezcla combinada resultante se incubó luego a 37° C durante 30 min para permitir la carga de siRNA.

Ultrafiltración y filtración en 0,2  $\mu$  terminal

- 15 Después de la incubación, se diluyeron 900 ml de una mezcla de nanopartículas cargadas en 1,8 l de PBS para dar 2,7 l de una mezcla diluida. Esta mezcla diluida se concentró entonces a ~ 1 l y se diafiltró por filtración de flujo tangencial contra 10 volúmenes de PBS, usando un sistema Sartorius TFF que emplea dos cartuchos apilados de 100.000 MWCO. No se aplicó contrapresión al cartucho, y la velocidad de bombeo se fijó en 300 rpm. Después del intercambio de tampón, la disolución resultante se concentró hasta apenas 2 mg/ml de siRNA.

La filtración terminal se efectuó pasando la disolución por una cápsula de filtro de 0,2  $\mu$  (Whatman, Polycap 36 AS).

- 20 En la Figura 10, se expone un diagrama que ilustra este procedimiento

Ejemplo 47: Comparación del tamaño de partícula sobre la eficacia

- 25 Se formaron complejos de asociación usando el procedimiento general descrito en el Ejemplo 46. No obstante, debido a que los complejos estaban siendo evaluados en base al tamaño, se utilizaron distintas membranas de extrusión para producir partículas que tenían los siguientes diámetros: 150 nm, 85 nm, 60 nm y 50 nm. Los siRNA se cargaron en los complejos dirigidos al factor VII.

Las partículas se evaluaron en un ensayo de silenciamiento del Factor VII, demostrando que las partículas de 50 nm eran las más eficaces en relación con las partículas de 150 nm, 85 nm y 60 nm. Los resultados del ensayo se ilustran en la Figura 11.

- 30 Ejemplo 48: Comparación de la semivida de los agentes de ácido nucleico no formulados frente a los formulados en un complejo de asociación

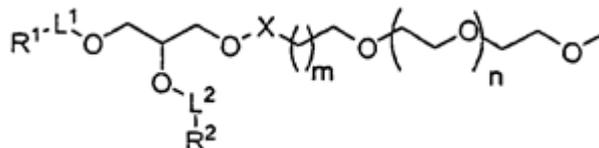
- 35 La semivida de siRNA formulado en complejos de asociación se evaluó *in vitro* en suero humano a 37° C. Los complejos de asociación se prepararon como en el Ejemplo 46. Para propósitos comparativos, se evaluó también siRNA *in vitro* no formulado en suero humano. El porcentaje de producto de longitud total determinado por HPLC se evaluó en ambos siRNA formulados y no formulados. Como se demuestra en la Figura 12, el siRNA formulado tuvo una semivida significativamente mejorada *in vitro* en suero humano.

Ejemplo 49: Comparación de eficacia de complejos de asociación que tienen lípidos de PEG de longitud de cadena variada

5 Se prepararon complejos de asociación como en el Ejemplo 46 con variación de la longitud de la cadena de alquilo del lípido de PEG. Las longitudes de la cadena de alquilo de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 se evaluaron y compararon para eficacia en un ensayo de silenciamiento del Factor VII. Como se indica en la Figura 13, las longitudes de cadena 13, 14 y 15 demostraron el mayor silenciamiento según lo medido en el ensayo.

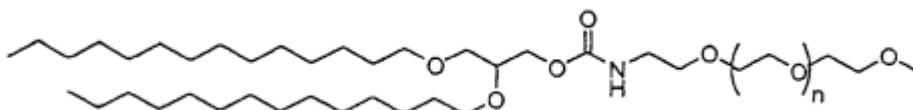
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (XV)



fórmula (XV)

- 5 en la que  
 cada uno de L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> es un enlace;  
 cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es independientemente alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>28</sub> o alquenilo C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub>;  
 X es -C(O)NH-;  
 m es un entero entre 0 y 11; y
- 10 n es un entero entre 1 y 500.
2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es independientemente alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>28</sub>.
3. El compuesto según la reivindicación 2, en el que cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es independientemente alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>.
4. El compuesto según la reivindicación 1, en el que tanto R<sup>1</sup> como R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>14</sub> de cadena lineal o alquilo C<sub>16</sub> que tiene la misma longitud.
- 15 5. El compuesto según la reivindicación 4, en el que tanto R<sup>1</sup> como R<sup>2</sup> es alquilo C<sub>14</sub>.
6. El compuesto según la reivindicación 1, en el que la fórmula XV representa una mezcla racémica.
7. El compuesto según la reivindicación 1, en el que la fórmula XV representa el isómero 'R' enantioméricamente puro, en particular un compuesto que tiene un exceso enantiomérico del isómero R, en particular por lo menos aproximadamente 95% ee, o más de 97% ee, en particular 98% o 99%.
- 20 8. El compuesto según la reivindicación 1, en el que la fórmula XV representa el isómero 'S' enantioméricamente puro, en particular un compuesto que tiene un exceso enantiomérico del isómero S, en particular por lo menos aproximadamente 95% ee, o más de 97% ee, en particular 98% o 99%.
9. El compuesto según la reivindicación 1, en el que cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es el mismo resto alquenilo C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub>.
10. El compuesto según la reivindicación 9, en el que cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> incluye un doble enlace sencillo, en particular un  
 25 doble enlace sencillo en la configuración E o Z.
11. El compuesto según la reivindicación 9, en el que cada R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> incluye dos restos de doble enlace.
12. El compuesto según la reivindicación 1, en el que m es un entero entre 1 y 10, en particular un entero entre 2 y 4 o un entero 2.
13. El compuesto según la reivindicación 1, en el que n es un entero entre 1 y 500, en particular un entero entre 40 y  
 30 400, entre 100 y 350, entre 40 y 50 o entre 42 y 47.
14. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene la fórmula (XVI) siguiente:



fórmula (XVI)

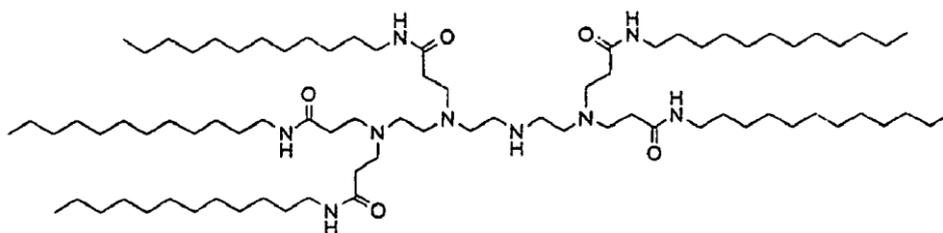
en la que el resto de PEG de repetición tiene un peso molecular promedio de 2000 con un valor de n entre 42 y 47.

15. El compuesto según la reivindicación 14, en el que el compuesto de fórmula XVI es un estereoisómero con una configuración absoluta 'R' preferida, que tiene un exceso enantiomérico del isómero R tal como de 90%, 95%, 97%, 98%, 99%.

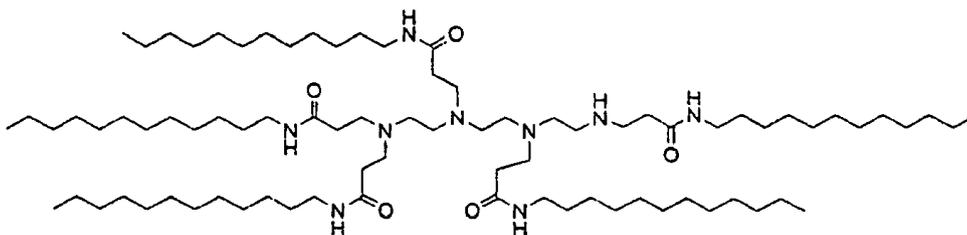
16. Un complejo de asociación que comprende:

- 5 a. un lípido catiónico;  
 b. un lípido de PEG según la reivindicación 1;  
 c. un lípido estructural; y  
 d. un ácido nucleico.

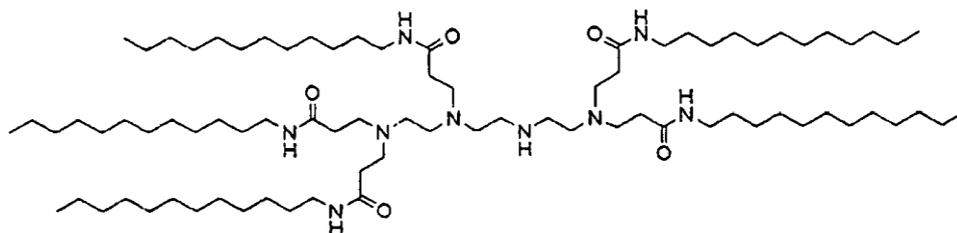
10 17. El complejo de asociación según la reivindicación 16, en el que dicho lípido catiónico es uno de los siguientes o una de sus mezclas:



o

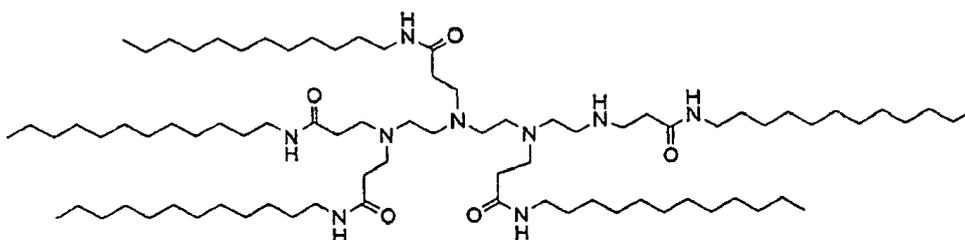


18. El complejo de asociación según la reivindicación 17, en el que dicho lípido catiónico es

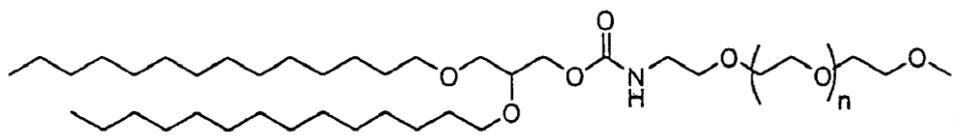


15

19. El complejo de asociación según la reivindicación 17, en el que dicho lípido catiónico es



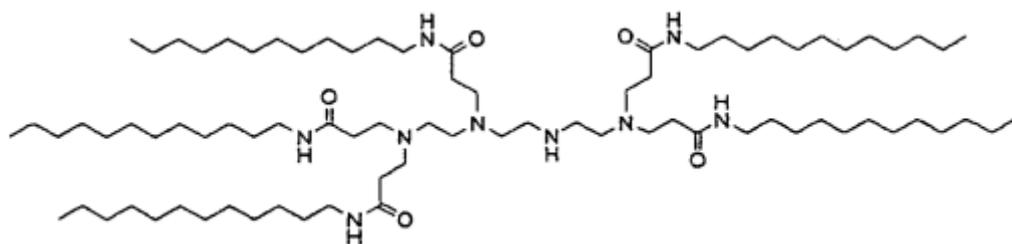
20. El complejo de asociación según la reivindicación 16, en el que dicho lípido de PEG posee la estructura



en donde:

n es un entero entre 1 y 500.

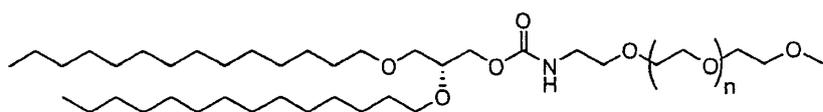
- 5 21. El complejo de asociación según la reivindicación 16, en el que dicho lípido de PEG tiene un exceso enantiomérico del isómero R, en particular de por lo menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99%.
22. El complejo de asociación según la reivindicación 20, en el que dicho lípido estructural es colesterol.
23. El complejo de asociación según la reivindicación 16, en el que la relación molar de dicho lípido catiónico, dicho lípido estructural y dicho lípido de PEG es 36-48:42-54:6-14, en particular 38-48:44-52:8-12, en particular 42:48:10.
- 10 24. El complejo de asociación según la reivindicación 16, en el que la relación en peso de lípidos totales a ácido nucleico es inferior a aproximadamente 15:1.
25. El complejo de asociación según la reivindicación 24, en el que la relación en peso de lípidos totales a ácido nucleico es de aproximadamente 10:1, en particular aproximadamente 7.5:1, en particular aproximadamente 5:1.
26. El complejo de asociación según la reivindicación 16, en el que dicho lípido catiónico es



15

dicho lípido estructural es colesterol; y

dicho lípido de PEG es



en donde:

- 20 n es un entero entre 1 y 500.
27. Un método para formar un complejo de asociación según la reivindicación 16, en donde el método comprende:
- (a) mezclar el lípido catiónico, el lípido de PEG y el lípido estructural en etanol y tampón de NaOAc acuoso para proporcionar partículas; y
- (b) añadir el ácido nucleico a la partícula, formando así el complejo de asociación.
- 25 28. El método según la reivindicación 27, etapa (a) que además comprende extrusar las partículas.

Figura 1

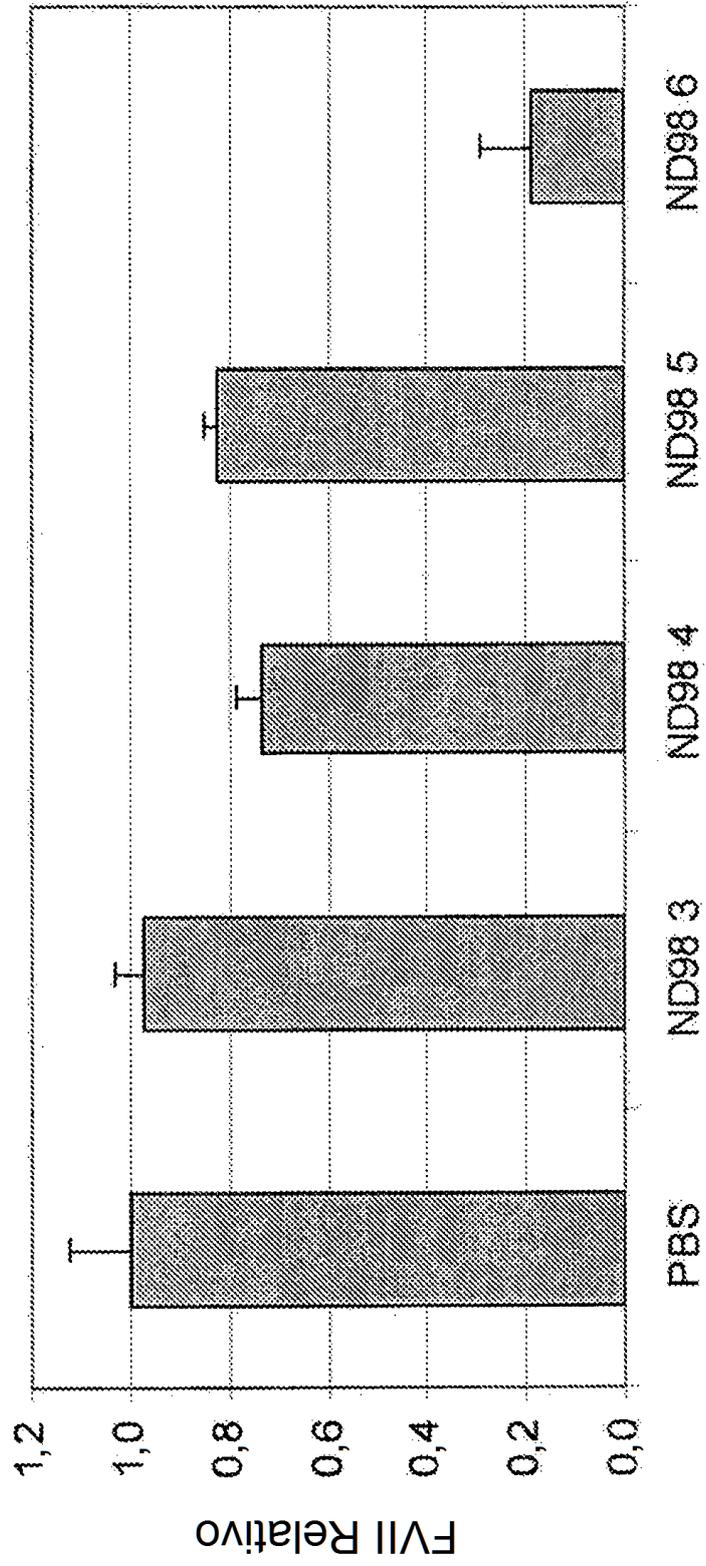
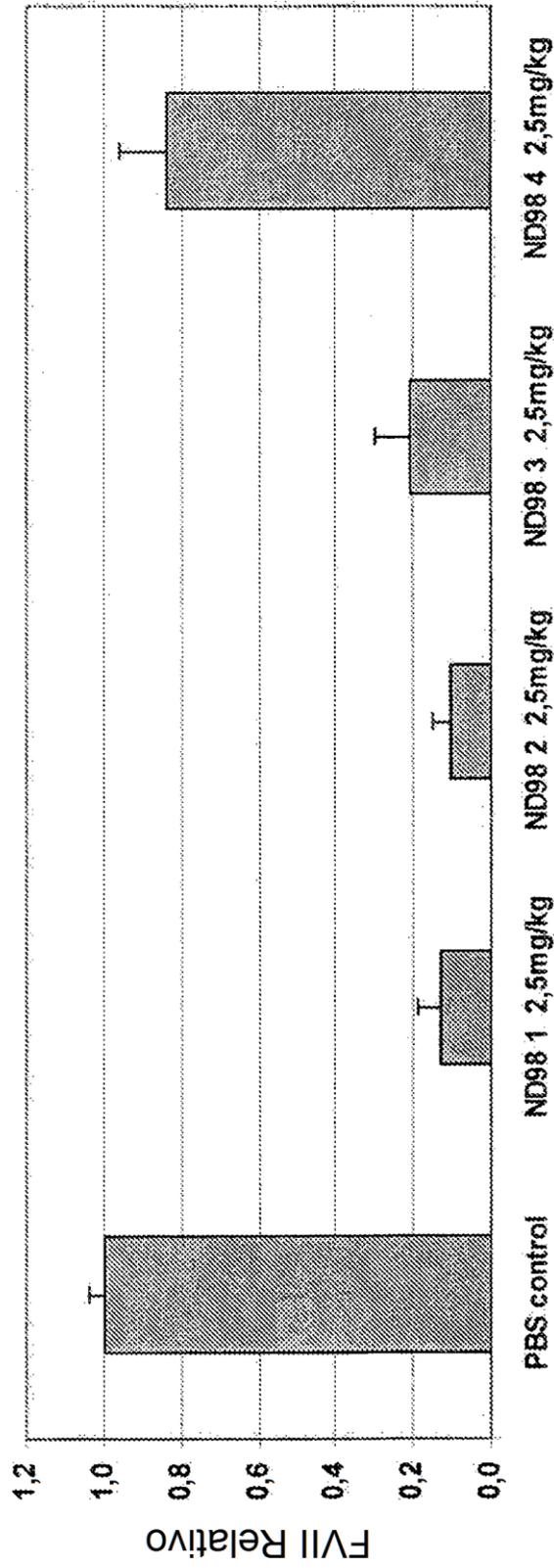


Figura 2



**ND98 1 = de 5 extremos (isómero I)**  
**ND98 2 = de 5 extremos (isómero I+II)**  
**ND98 3 = de 5 extremos (isómero II)**  
**ND98 4 = de 4 extremos**

Figura 3

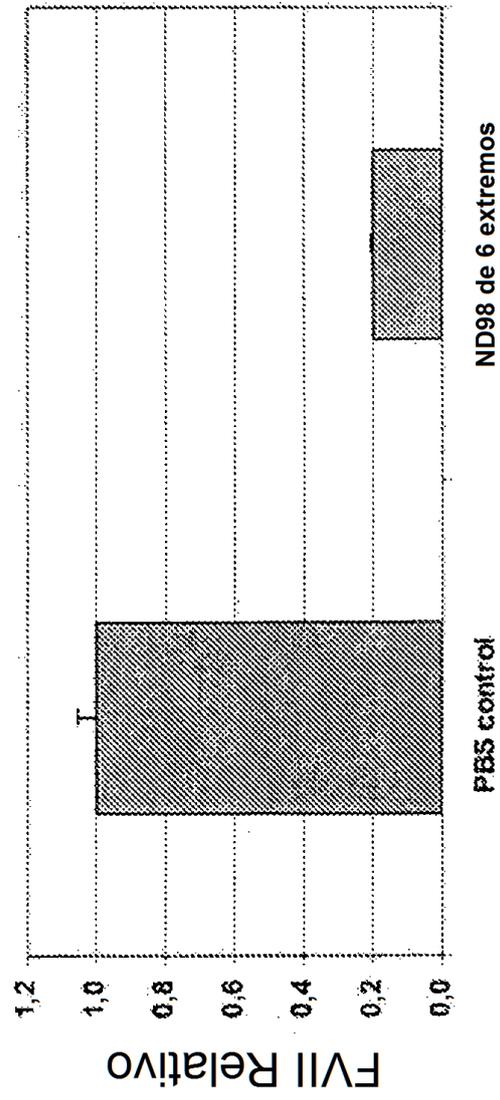


Figura 4

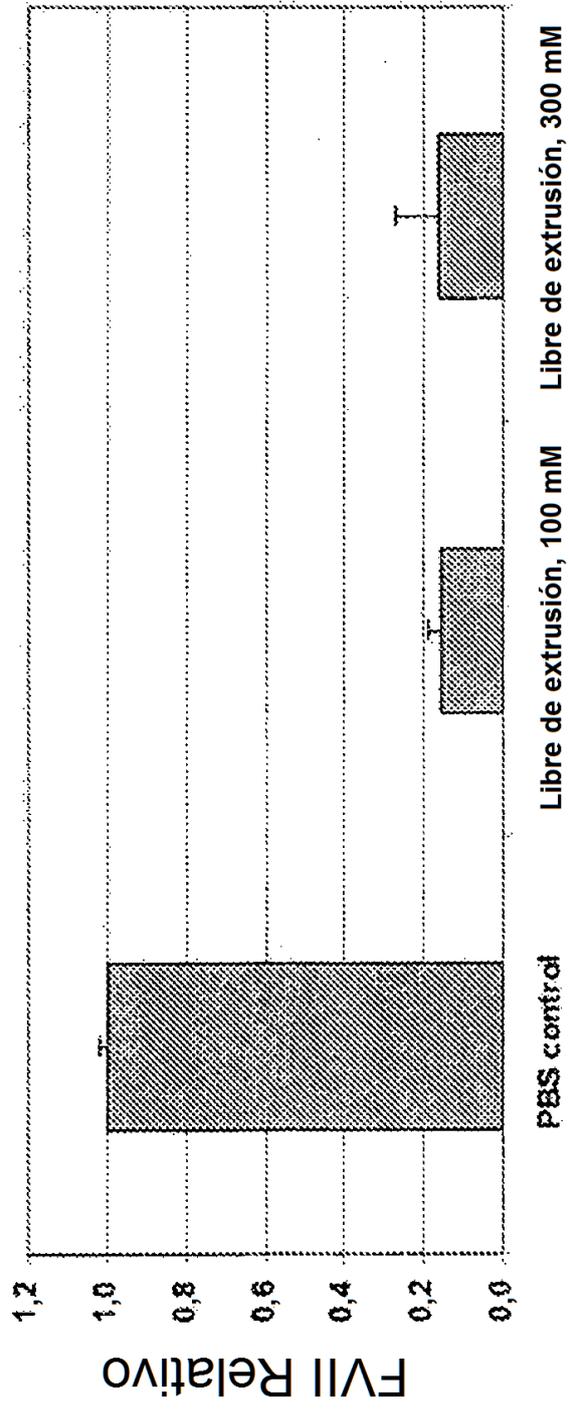


Figura 5

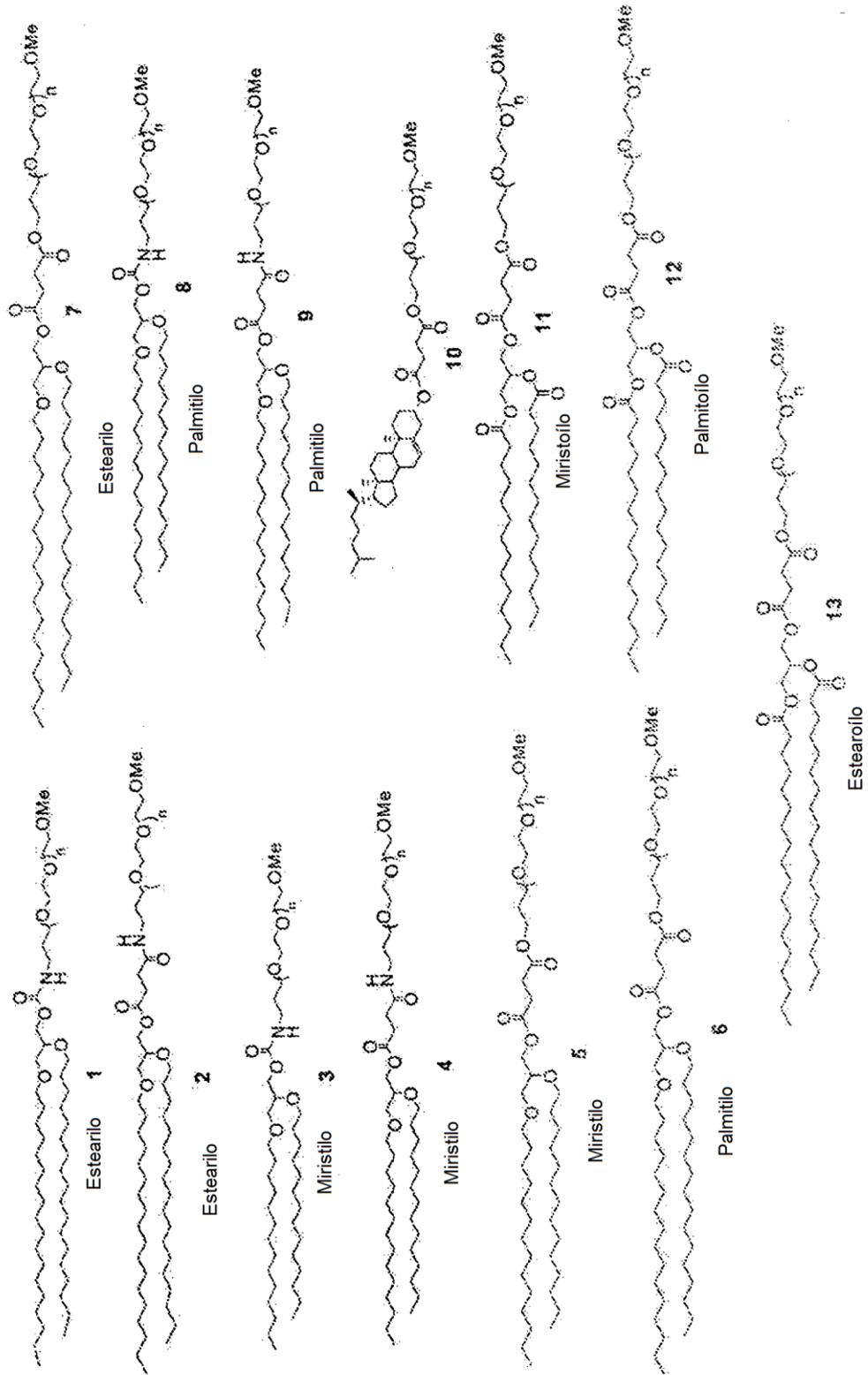


Fig. 6: Formulación de ND98 *in vivo*  
 Resultado del ensayo FVII:

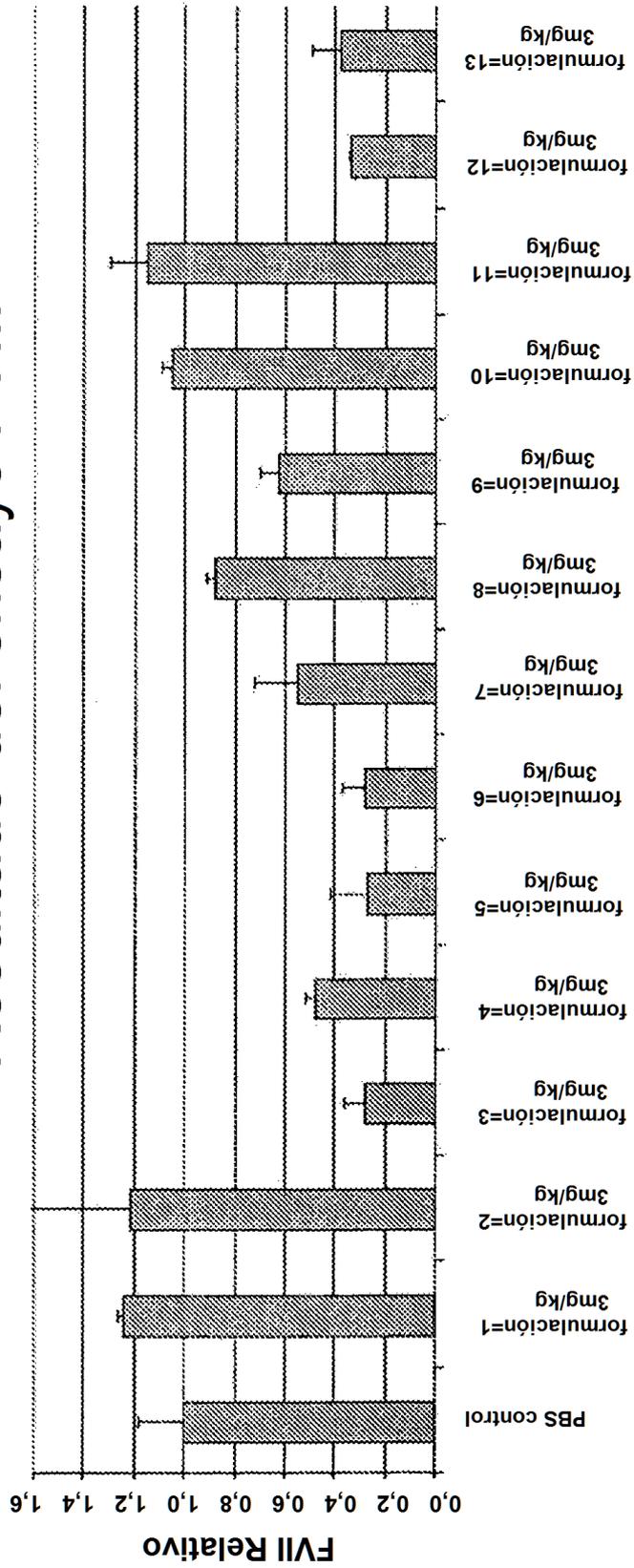
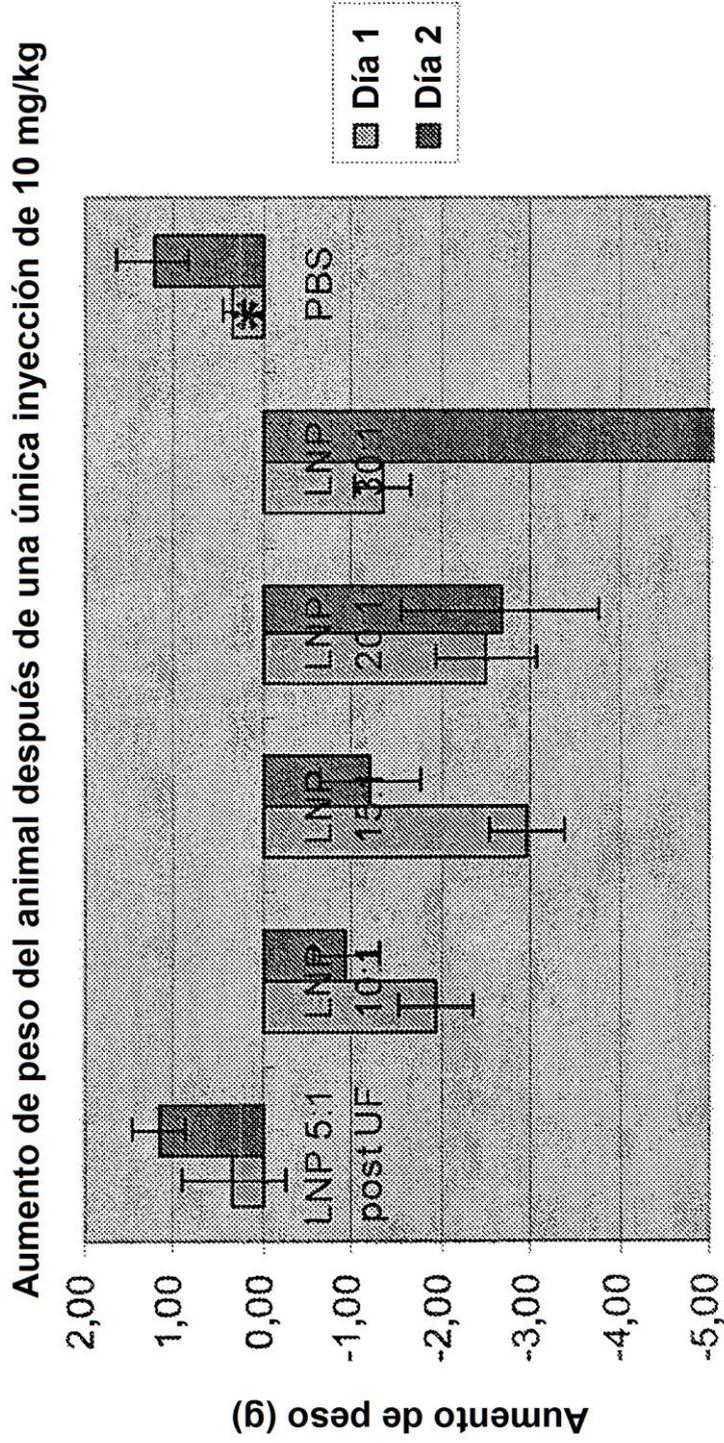


Figura 7: La tolerabilidad de la formulación aumenta a medida que se reduce la relación Lípido:siRNA



No se detectaron cambios de peso con 3, 2, 1,5 mg/kg

\* Animales fallecidos

# Fig. 8

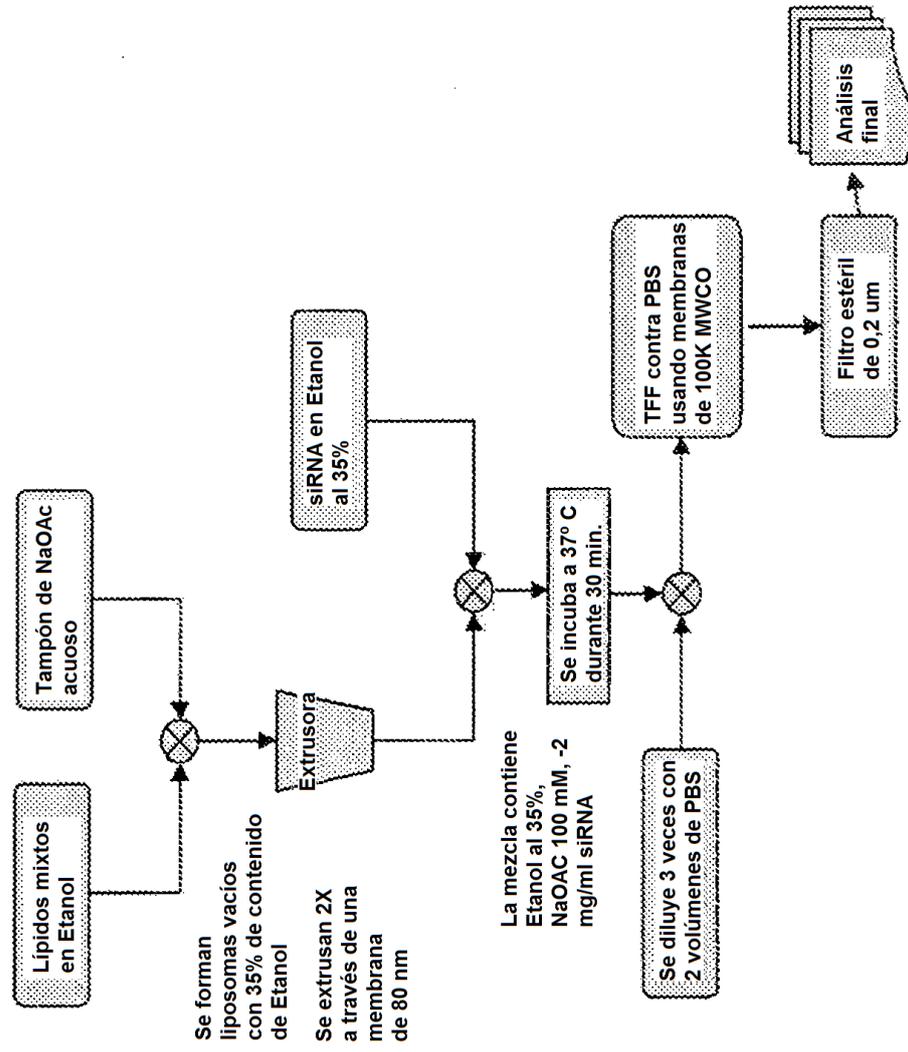


Fig. 9

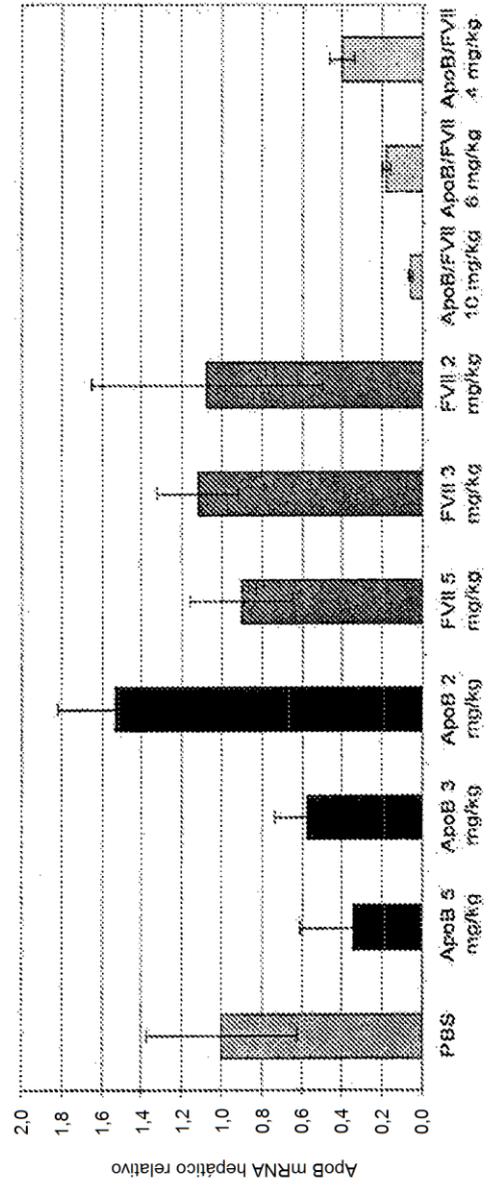
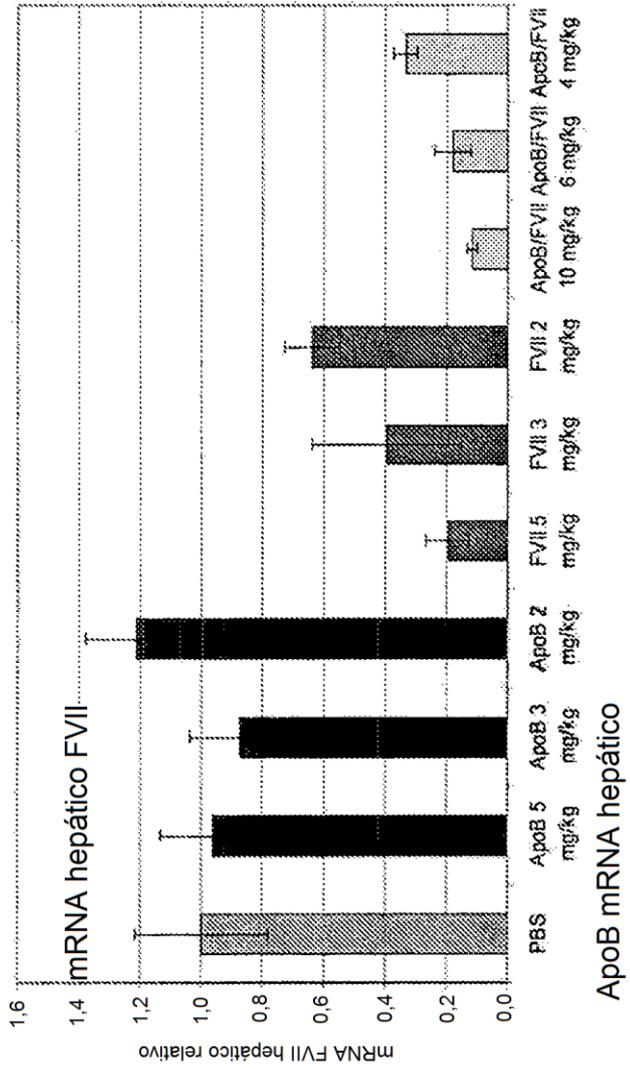


Figura 10

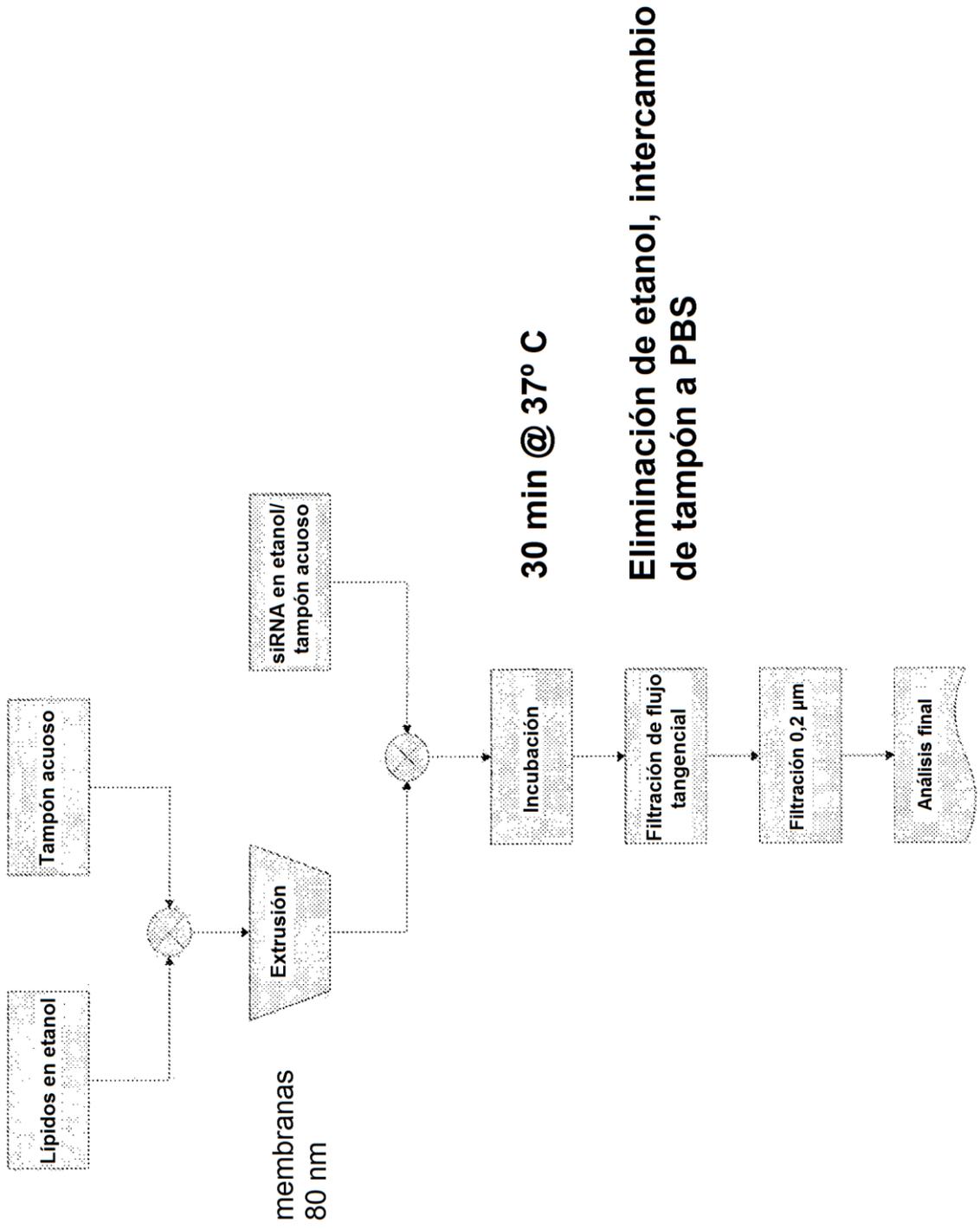


Figura 11

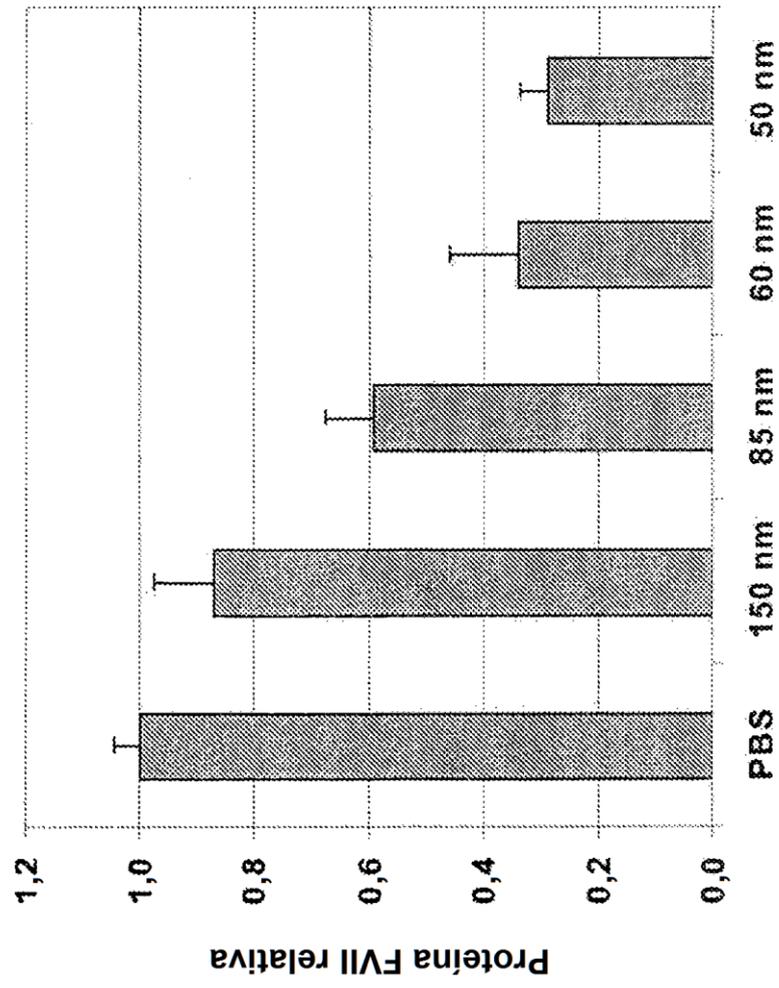


Figura 12

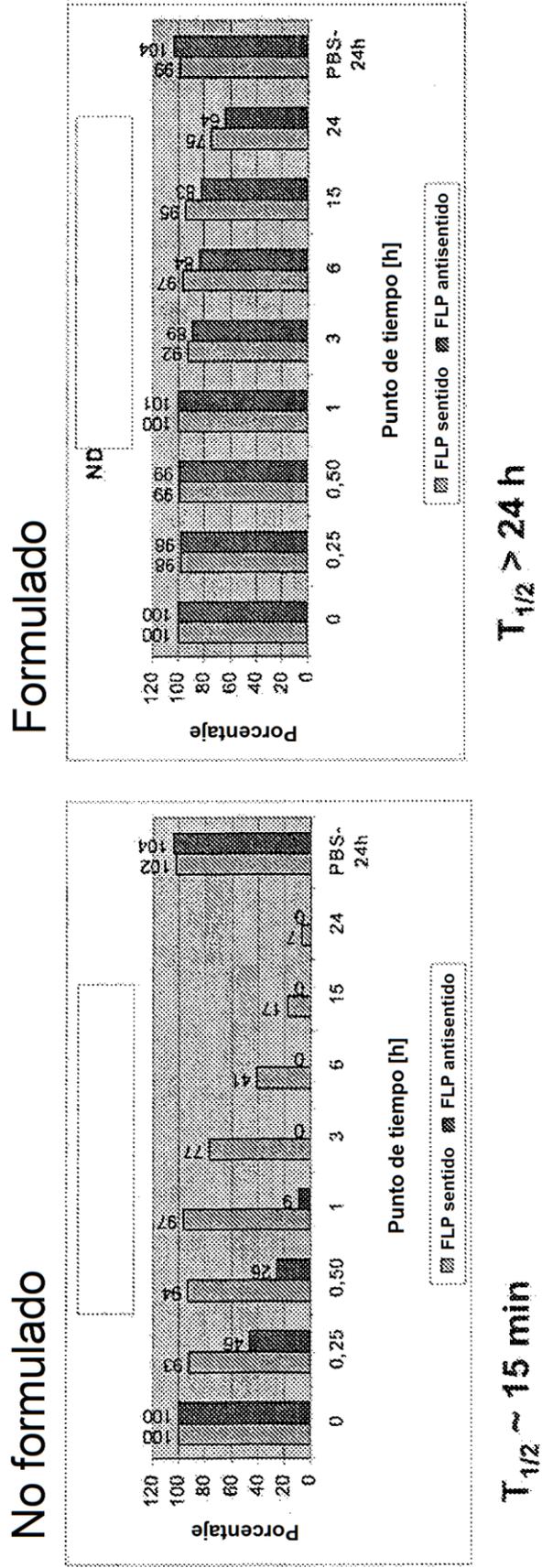


Figura 13

