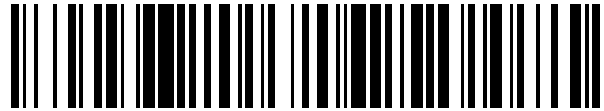


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 184**

51 Int. Cl.:

C07C 237/08 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C07C 237/22 (2006.01)
C07C 323/60 (2006.01)
C07C 333/04 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12728010 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2718261**

54 Título: **Compuestos para dirigir la administración de fármacos y potenciar la actividad de ARNip**

30 Prioridad:

08.06.2011 US 201161494710 P
08.06.2011 US 201161494840 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2016

73 Titular/es:

NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-1-2, Shimohozumi
Ibaraki-shi, Osaka 567-8680, JP

72 Inventor/es:

SRIDHAR, C. NAGARAJAN;
KARMALI, PRIYA;
NIITSU, YOSHIRO;
PAYNE, JOSEPH E.;
HOU, ZHENG;
GAUDETTE, JOHN A.;
KNOPOV, VICTOR;
WITTE, RICHARD P.;
AHMADIAN, MOHAMMAD;
PERELMAN, LOREN A.;
TANAKA, YASUNOBU y
AKOPIAN, VIOLETTA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

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

ES 2 570 184 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

Compuestos para dirigir la administración de fármacos y potenciar la actividad de ARNip

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales estadounidenses n.ºs 61/494.840 y 61/494.710, presentadas el 8 de junio de 2011.

10 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de lípidos catiónicos y compuestos de vitaminas liposolubles para dirigir y potenciar la actividad de moléculas terapéuticas, incluyendo ARNip.

15 **Antecedentes**

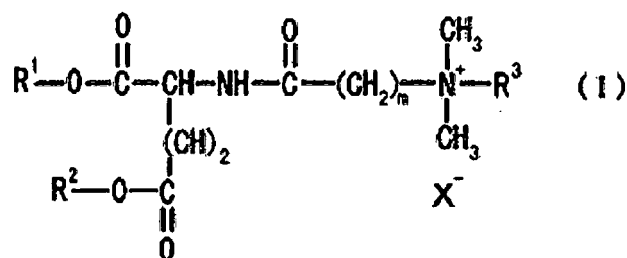
La fibrosis del hígado puede estar provocada por células estrelladas hepáticas (HSC) activadas, dando como resultado que se depositen una pluralidad de tipos de moléculas de colágeno y fibronectina sobre el tejido intersticial. Esto puede conducir a cirrosis hepática, insuficiencia hepática y/o carcinoma hepatocelular. Además, se desarrolla pancreatitis crónica como resultado de la fibrosis pancreática mediante el mismo mecanismo que para la fibrosis hepática (Madro, *et al.*, 2004; *Med Sci Monit.* 10:RA166-70; Jaster, 2004, *Mol Cancer.* 6:26). Además, las células estrelladas están presentes en trastornos de las cuerdas vocales y la laringe tales como cicatrización de las cuerdas vocales, fibrosis mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis laríngea. Para prevenir o tratar la fibrosis en estos órganos y en otras partes en el cuerpo, existe el deseo de desarrollar un portador farmacológico y kit de portador farmacológico.

Las células estrelladas son uno de los candidatos diana importantes para tratar la fibrosis (Fallowfield *et al.*, 2004, *Expert Opin Ther Targets.* 8:423-35; Pinzani, *et al.*, 2004, *Dig Liver Dis.*36:231-42). Durante la fibrosis, las células estrelladas se activan mediante citocinas procedentes de células cercanas y se activan. Las células estrelladas se conocen como células de almacenamiento para vitamina A y pertenecen a la familia de miofibroblastos y producen muchos factores que provocan fibrosis hepática.

Los métodos terapéuticos para prevenir o tratar la fibrosis intentan controlar el metabolismo del colágeno, promover el sistema de degradación del colágeno e inhibir la activación de células estrelladas. Sin embargo, en todos los casos, dado que la especificidad de acción y/o la especificidad de órgano son bajas, hay problemas con la eficacia limitada y con efectos secundarios adversos.

La inhibición de la síntesis de proteínas de colágeno no se ha establecido como método terapéutico. La potencia de moléculas que seleccionan como diana la producción de colágeno es limitada debido a la posibilidad de provocar efectos secundarios. La inhibición directa de la producción del colágeno sería un método terapéutico obvio para prevenir o tratar la fibrosis. Hacer esto requeriría el control de uno o más de los diversos tipos de colágeno, tipos I a IV. Un método para lograr esto puede ser mediante HSP47, una chaperona molecular específica de colágeno que es esencial para el transporte intracelular y la maduración molecular, necesaria para diversos tipos de colágeno. Por tanto, si puede controlarse la función de HSP47 específicamente en las células estrelladas de un órgano, existe la posibilidad de inhibir la fibrosis hepática en el órgano.

Hay varias técnicas disponibles para administrar en una célula un agente terapéutico tal como ARNip, incluyendo el uso de sistemas de transfección virales y sistemas de transfección no virales. Los sistemas de transfección no virales pueden incluir, por ejemplo, polímeros, lípidos, liposomas, micelas, dendrímeros y nanomateriales. Los ejemplos de polímeros que se han estudiado anteriormente para la transfección de células incluyen polímeros catiónicos tales como poli(L-lisina) (PLL), polietilenimina (PEI), quitosano y poli(metacrilato de (2-dimetilamino)etil) (pDMAEMA). El documento WO 2010/061880 A1 describe, entre otras cosas, vesículas que contienen un lípido catiónico que se representa por la siguiente fórmula (I)



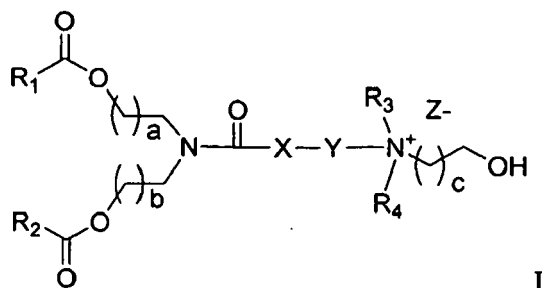
Cada tipo de sistema tiene sus ventajas e inconvenientes respectivos. Por ejemplo, los sistemas virales pueden

producir una alta eficacia de transfección, pero pueden no ser tan seguros como algunos sistemas no virales. Además, los sistemas virales pueden ser complicados y/o caros de preparar. Se ha notificado que sistemas de transfección no virales, tales como polímeros catiónicos, transfieren ADN de plásmido en células. Sin embargo, algunos inconvenientes del uso de polímeros catiónicos incluyen su toxicidad para células y/o su falta de estabilidad.

Como tal, hay una necesidad urgente de nuevos compuestos, composiciones y métodos de uso de componentes catiónicos para mejorar la administración de fármacos terapéuticos, incluyendo ácidos nucleicos, a células, tejidos u organismos.

10 Sumario

Un aspecto de la descripción son compuestos de fórmula I



en la que R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en grupo alquilo de C_{12} a C_{18} , alqueniilo de C_{12} a C_{18} y oleilo; en la que R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en alquilo de C_1 a C_6 y alcohol de C_2 a C_6 ; en la que X se selecciona de un grupo que consiste en $-CH_2-$, $-S-$ y $-O-$, o está ausente; en la que Y se selecciona de $-(CH_2)_n$, $-S(CH_2)_n$, $-O(CH_2)_n$, tiofeno y $-SO_2(CH_2)_n$, en los que $n = 1-4$; en la que $a = 1-4$; en la que $b=1-4$; en la que $c=1-4$; y en la que Z es un contraión. En las reivindicaciones adjuntas se especifican aspectos adicionales de la presente invención.

En el presente documento también se divulga un compuesto para facilitar la administración de fármacos a una célula diana, que consiste en la estructura (molécula de direccionamiento)_m-grupo de unión-(molécula de direccionamiento)_n, en la que la molécula de direccionamiento es un retinoide que tiene un sitio de activación/unión o receptor específico en la célula diana; en la que m y n son independientemente 0, 1, 2 ó 3; y en la que el grupo de unión comprende un polietilenglicol (PEG) o molécula de tipo PEG.

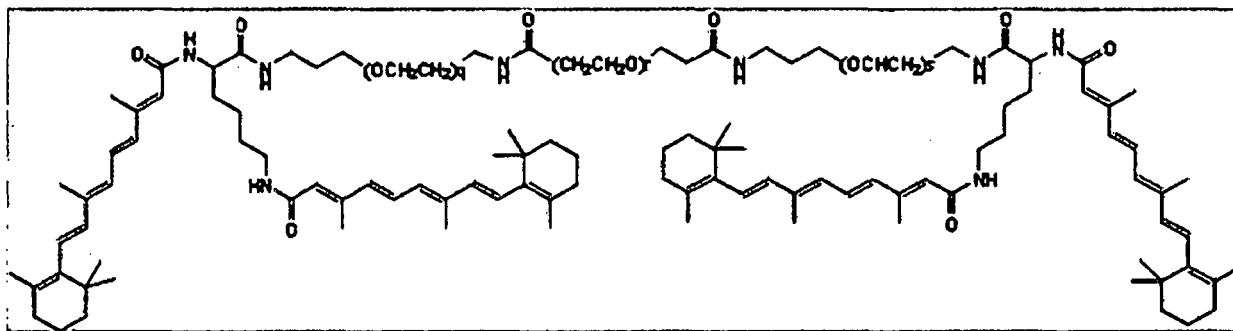
Según una realización de la presente divulgación, el retinoide se selecciona del grupo que consiste en vitamina A, ácido retinoico, tretinoína, adapaleno, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR), palmitato de retinilo, retinal, ácido retinoico saturado y ácido retinoico desmetilado y saturado.

En otra realización de la presente divulgación, el grupo de unión se selecciona del grupo que consiste en bis-amido-PEG, tris-amido-PEG, tetra-amido-PEG, Lys-bis-amido-PEG-Lys, Lys-tris-amido-PEG-Lys, Lys-tetra-amido-PEG-Lys, Lys-PEG-Lys, PEG2000, PEG1250, PEG1000, PEG750, PEG550, PEG-Glu, Glu, C6, Gly₃ y GluNH.

En otra realización de la presente divulgación, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en retinoide-PEG-retinoide, (retinoide)₂-PEG-(retinoide)₂, VA-PEG2000-VA, (retinoide)₂-bis-amido-PEG-(retinoide)₂, (retinoide)₂-Lys-bisamido-PEG-Lys-(retinoide)₂.

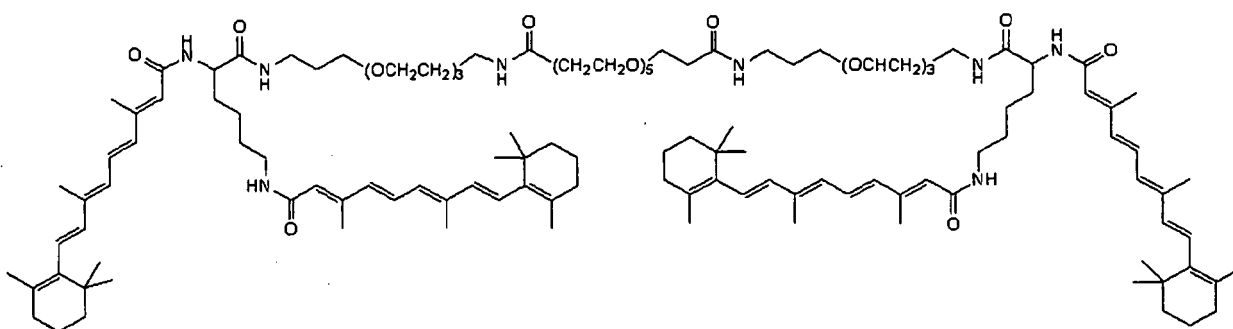
En otra realización de la presente divulgación, el retinoide se selecciona del grupo que consiste en vitamina A, ácido retinoico, tretinoína, adapaleno, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR), palmitato de retinilo, retinal, ácido retinoico saturado y ácido retinoico desmetilado y saturado.

En otra realización de la presente divulgación, el compuesto es una composición de fórmula



en la que q, r y s son cada uno independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

5 En otra realización de la presente divulgación, la fórmula del compuesto comprende



10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un portador farmacológico específico de células estrelladas que comprende una cantidad específica de células estrelladas de una molécula retinoide que consiste en la estructura (retinoide)_m-grupo de unión-(retinoide)_n; en la que m y n son independientemente 0, 1, 2 ó 3; y en la que el grupo de unión comprende un polietilenglicol (PEG) o molécula de tipo PEG.

15 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una composición liposomal. En otras realizaciones de la presente divulgación, la composición liposomal comprende una vesícula lipídica que comprende una bicapa de moléculas lipídicas.

20 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la molécula retinoide se expone al menos parcialmente en el exterior del portador farmacológico antes de que el portador farmacológico alcance la célula estrellada.

En otra realización de la presente divulgación, el retinoide es del 0,1% en moles al 20% en moles de las moléculas lipídicas.

25 En la presente invención también se proporcionan realizaciones en las que las moléculas lipídicas comprenden uno o más lípidos tal como se especifica en las reivindicaciones adjuntas. Adicionalmente se divulgan lípidos seleccionados del grupo que consiste en HEDC, DODC, HEDODC, DSPE, DOPE y DC-6-14. En otra realización, las moléculas lipídicas comprenden además S104.

30 En determinadas realizaciones, el portador farmacológico comprende un ácido nucleico.

En otras realizaciones, el ácido nucleico es un ARNip que es capaz de silenciar la expresión del ARNm de hsp47 en la célula estrellada.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto para facilitar la administración de fármacos a una célula diana, que consiste en la estructura (lípidos)_m-grupo de unión-(molécula de direccionamiento)_n, en la que la molécula de direccionamiento es un retinoide o una vitamina liposoluble que tiene un sitio de activación/unión o receptor específico en la célula diana; en la que m y n son independientemente 0, 1, 2 ó 3; y en la que el grupo de unión comprende una molécula de polietilenglicol (PEG).

40 En una realización de la presente divulgación, el lípido se selecciona de uno o más del grupo que consiste en DODC, HEDODC, DSPE, DOPE y DC-6-14.

En otra realización de la presente divulgación, el retinoide se selecciona del grupo que consiste en vitamina A, ácido retinoico, tretinoína, adapaleno, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR), palmitato de retinilo, retinal, ácido retinoico

saturado y ácido retinoico desmetilado y saturado.

En otra realización de la presente divulgación, la vitamina liposoluble es vitamina D, vitamina E o vitamina K.

5 En otra realización de la presente divulgación, el grupo de unión se selecciona del grupo que consiste en bis-amido-PEG, tris-amido-PEG, tetra-amido-PEG, Lys-bis-amido-PEG-Lys, Lys-tris-amido-PEG-Lys, Lys-tetra-amido-PEG-Lys, Lys-PEG-Lys, PEG2000, PEG1250, PEG1000, PEG750, PEG550, PEG-Glu, Glu, C6, Gly₃ y GluNH.

10 En otra realización de la presente divulgación el compuesto se selecciona del grupo que consiste en DSPE-PEG-VA, DSPE-PEG2000-Glu-VA, DSPE-PEG550-VA, DOPE-VA, DOPE-Glu-VA, DOPE-Glu-NH-VA, DOPE-Gly₃-VA, DC-VA, DC-6-VA y AR-6-VA.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 representa la eficacia de silenciamiento de determinadas realizaciones de la descripción. Esto incluye liposomas de HEDC en comparación con controles de lipoplejo de DC-6-14.

La figura 2 representa una comparación *in vitro* de silenciamiento génico usando lípidos catiónicos.

20 La figura 3 representa una evaluación de la expresión génica *in vivo* con formulaciones de liposoma de HEDODC a modo de ejemplo de la invención (* indica p<0,05).

25 La figura 4 representa una evaluación de la expresión génica *in vitro* con formulaciones de liposoma de HEDC a modo de ejemplo del ejemplo 15. Las barras de error indican desviaciones estándar (n=3). Se muestra una curva de dosis-respuesta sigmoidea basada en el mejor ajuste. Se calculó un valor de CE₅₀ a partir de la curva. Se indica que es de 11,8 nM.

30 La figura 5 muestra los resultados de las mediciones *in vivo* usando un modelo de DMNQ de rata. Tras restar los niveles de ARNm de gp46 de fondo determinados a partir del grupo sin tratamiento, se normalizaron todos los valores de grupo de prueba al ARNm de gp46 promedio del grupo de vehículo (expresado como porcentaje del grupo de vehículo). El nivel de ARNm de gp46 medio tras el tratamiento mostró una respuesta dependiente de la dosis y un ajuste de curva a una curva de dosis-respuesta sigmoidea. El valor de DE₅₀ calculado es de 0,79 mg/kg.

35 La figura 6 muestra los resultados de las mediciones *in vivo* usando un modelo de DMNC de rata. Tras restar los niveles de ARNm de gp46 de fondo determinados a partir del grupo sin tratamiento, se normalizaron todos los valores de grupo de prueba al ARNm de gp46 promedio del grupo de vehículo (expresado como porcentaje del grupo de vehículo). Se determinaron los niveles de ARNm de MRPL19 mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®). Se normalizaron los niveles de ARNm para gp46 frente a los niveles de MRPL19. (***) indica p<0,02).

40 La figura 7 muestra los resultados de las mediciones *in vivo* usando un modelo de bleomicina pulmonar de rata. El gráfico de barras resume la puntuación de fibrosis (T. Ashcroft) de secciones de pulmón teñidas con Azan para cada grupo. Se realizó un análisis estadístico usando ANOVA de un factor, prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con software Prism5.

45 Figura 8: la adición de conjugado de VA a liposomas mediante decoración potencia la actividad de ARNip.

Figura 9: la adición de conjugado de VA a liposomas mediante cosolubilización potencia la actividad de ARNip.

50 Figura 10: la adición de conjugado de VA a liposomas mediante cosolubilización potencia la actividad de ARNip.

Figura 11: la adición de conjugado de VA a lipoplejos mediante cosolubilización potencia la actividad de ARNip.

Figura 12: adición de conjugado de VA a lipoplejos mediante cosolubilización frente a decoración.

55 Figura 13: eficacia *in vivo* en modelo de CCl₄ de ratón.

Figura 14: eficacia *in vivo* de conjugados de retinoide decorados frente a cosolubilizados.

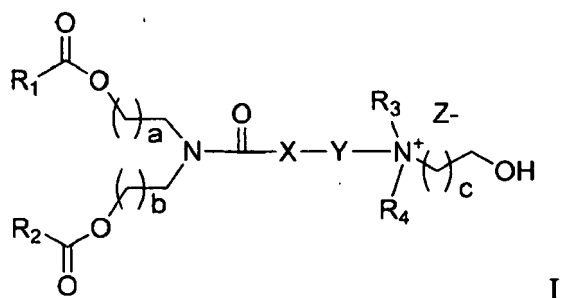
60 Figura 15: eficacia *in vitro* (pHSC), efecto de conjugados de retinoide en formulaciones de liposoma.

La figura 16 muestra la correlación del contenido de conjugado de retinoide (% en moles) con respecto a la eficacia *in vivo* (DMNQ de rata). A ratas Sprague-Dawley macho se les inyectaron por vía intravenosa o bien formulaciones que contenían DiVA al 0, 0,25, 0,5, 1 y 2% a una dosis de 0,75 mg/kg de ARNip o bien PBS (vehículo), una hora después de la última inyección de DMN.

65

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

Dentro del alcance de la invención están los compuestos de fórmula I



I

5 en la que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en grupo alquilo de C₁₂ a C₁₈, alqueniilo de C₁₂ a C₁₈ y oleilo; en la que R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en alquilo de C₁ a C₆ y alcanol de C₂ a C₆; en la que X se selecciona de un grupo que consiste en -CH₂-, -S- y -O-, o está ausente; en la que Y se selecciona de -(CH₂)_n, -S(CH₂)_n, -O(CH₂)_n-, tiofeno y -SO₂(CH₂)_n-, en los que n = 1-4; en la que a = 1-4; en la que b=1-4; en la que c=1-4; y en la que Z es un contraión.

10 En el presente documento también se menciona que los compuestos de la invención están dentro de la clase de compuestos conocidos como "lípidos catiónicos". Los lípidos catiónicos son compuestos que incluyen al menos un resto lipídico y un nitrógeno cargado positivamente asociado con un contraión. En la técnica se entiende que los "lípidos" están compuestos por un resto alquilo o alqueniilo hidrófobo y un resto éster o ácido carboxílico.

15 Ahora se ha descubierto que el resto amino-alkil-hidroxi (-N-alkil-OH) de los compuestos de fórmula I confiere propiedades a las formulaciones de la invención no observadas anteriormente con otros lípidos catiónicos anteriormente notificados. Las formulaciones de la invención que incluyen compuestos de fórmula I dan como resultado una mayor reducción en la expresión de proteínas, en comparación con formulaciones que no incluyen compuestos de fórmula I. Resulta particularmente sorprendente la capacidad de las formulaciones de la invención que incluyen compuestos de fórmula I para reducir la expresión de HSP47.

20 Los compuestos preferidos de la invención incluyen aquellos en los que R₁ y R₂ son cada uno independientemente alquilo C₁₂-C₁₈. Las realizaciones particularmente preferidas incluyen aquellas en las que R₁ y R₂ son cada uno independientemente alquilo C₁₃-C₁₇. Los más preferidos son los compuestos en los que R₁ y R₂ son cada uno alquilo C₁₃.

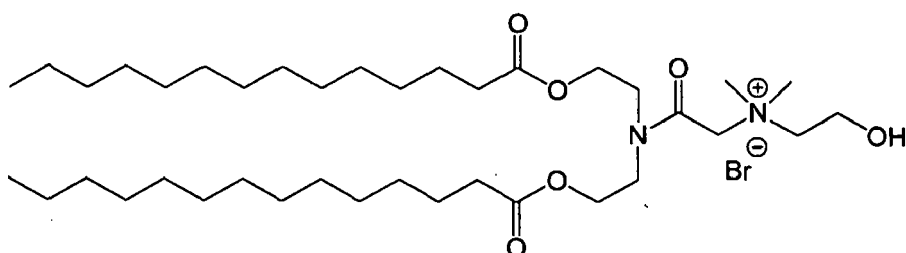
25 En otras realizaciones, R₁ y R₂ son cada uno independientemente alqueniilo C₁₂-C₁₈. En aún otras realizaciones, R₁ y R₂ son cada uno independientemente alqueniilo C₁₃-C₁₇. Los compuestos más preferidos de la invención incluyen aquellos en los que R₁ y R₂ son cada uno alqueniilo C₁₇.

30 También para los compuestos de fórmula I, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en alquilo de C₁ a C₆. En realizaciones preferidas, R₃ y R₄ son cada uno independientemente alquilo C₁-C₃. Lo más preferiblemente, R₃ y R₄ son cada uno metilo. En otras realizaciones, al menos uno de R₃ y R₄ es -CH₂CH₂OH.

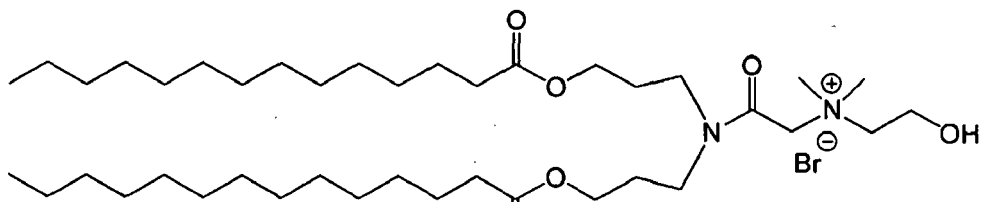
35 Los más preferidos son aquellos compuestos de fórmula I en la que a = b = c = 1.

40 Z puede ser cualquier contraión de nitrógeno, tal como se entiende fácilmente ese término en la técnica. Los contraiones de nitrógeno preferidos incluyen halógenos, prefiriéndose particularmente cloruro y bromuro y mesilato (SO₃CH₃⁻). Al contrario que otros lípidos catiónicos anteriormente descritos en los que el efecto del lípido catiónico depende del contraión, sorprendentemente la eficacia de los compuestos de fórmula I no parece estar relacionada con el contraión seleccionado.

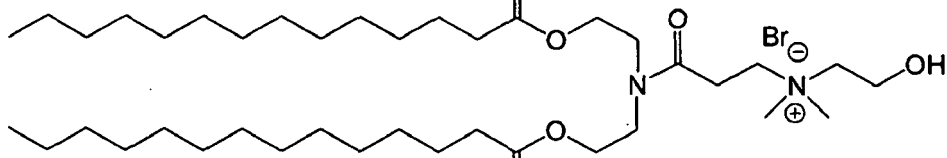
45 Los compuestos de fórmula I a modo de ejemplo incluyen:



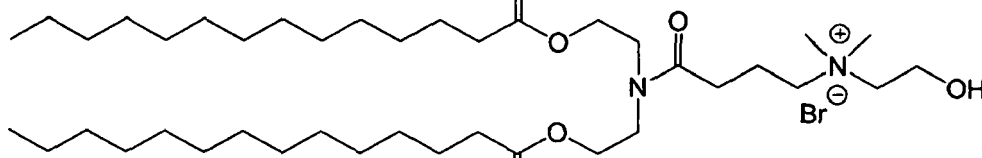
HEDC



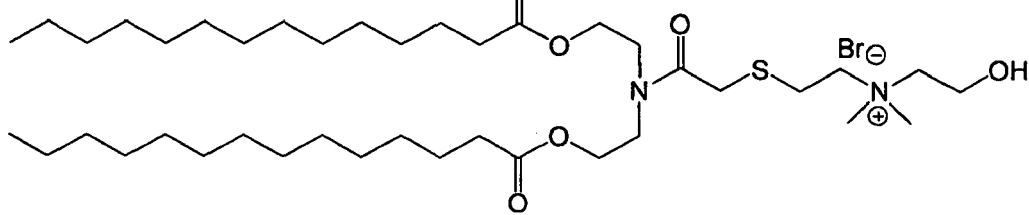
Pr-HEDC



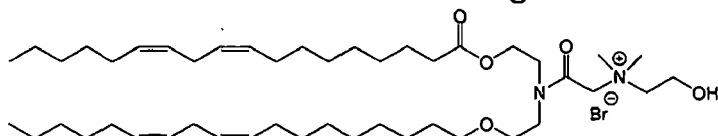
HE-Et-DC



HE-Pr-DC

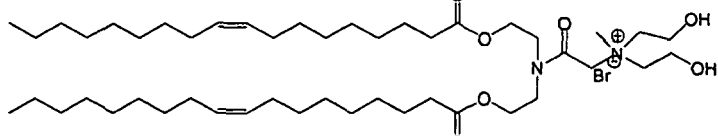


HES104

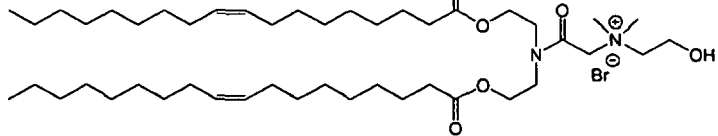


HE-DODC-DLin

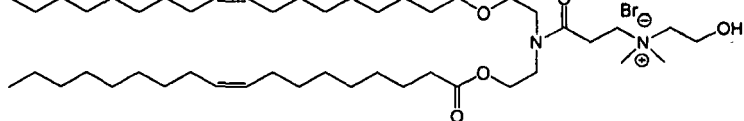
5



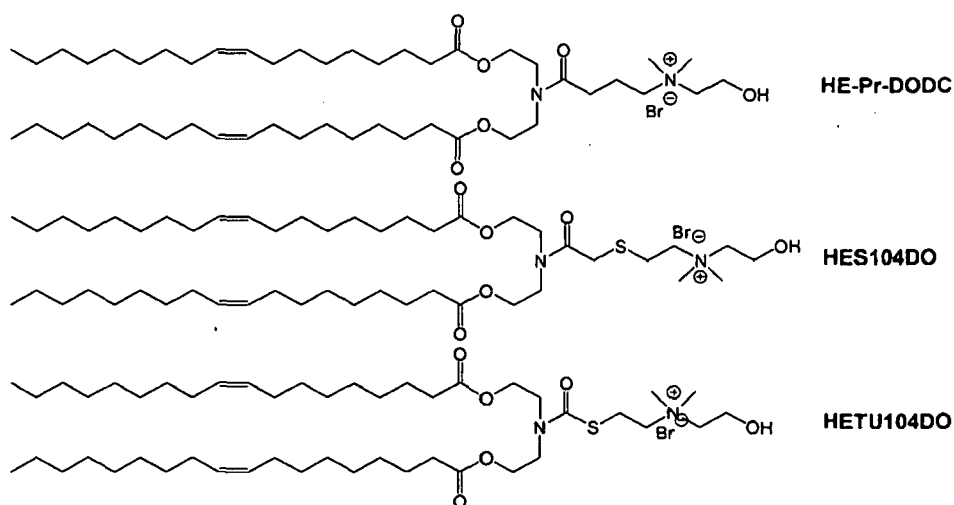
HE2-DODC



HE-DODC



HE-Et-DODC



5 En el presente documento se divulga un compuesto para facilitar la administración de fármacos a una célula diana, que consiste en la estructura (molécula de direccionamiento)_m-grupo de unión-(molécula de direccionamiento)_n, en la que la molécula de direccionamiento es un retinoide o una vitamina liposoluble que tiene un [sitio de activación/unión] o receptor específico en la célula diana; y en la que m y n son independientemente 0, 1, 2 ó 3; y en la que el grupo de unión comprende un polietilenglicol (PEG) o molécula de tipo PEG y se denomina "fórmula A".

10 La presente divulgación también incluye un compuesto para facilitar la administración de fármacos a una célula diana, que consiste en la estructura (lípidos)_m-grupo de unión-(molécula de direccionamiento)_n, en la que la molécula de direccionamiento es un retinoide o una vitamina liposoluble que tiene un receptor específico en la célula diana; en la que m y n son independientemente 0, 1, 2 ó 3; y en la que el grupo de unión comprende un polietilenglicol (PEG) o molécula de tipo PEG y se denomina "fórmula B".

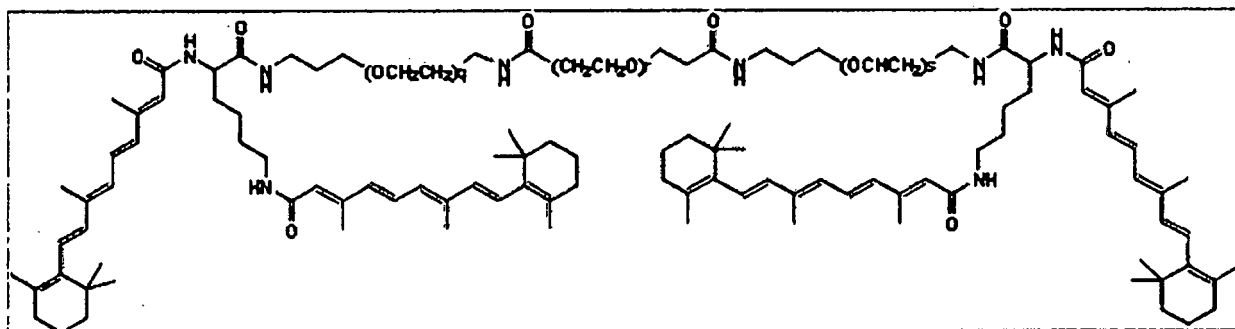
15 Ahora se ha descubierto que los compuestos de fórmula A o fórmula B confieren propiedades a las formulaciones de la invención no observadas anteriormente. Las formulaciones de la invención que incluyen compuestos de fórmula A o fórmula B dan como resultado una mayor reducción en la expresión génica, en comparación con formulaciones que no incluyen estos compuestos. Resulta particularmente sorprendente la capacidad de las formulaciones divulgadas en el presente documento que incluyen compuestos de fórmula A para reducir la expresión de HSP47.

20 En determinadas realizaciones de la presente divulgación, el retinoide se selecciona del grupo que consiste en vitamina A, ácido retinoico, tretinoína, adapaleno, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR), palmitato de retinilo, retinal, ácido retinoico saturado y ácido retinoico desmetilado y saturado.

25 Las realizaciones de la presente divulgación incluyen compuestos en los que el grupo de unión se selecciona del grupo que consiste en bis-amido-PEG, tris-amido-PEG, tetra-amido-PEG, Lys-bis-amido-PEG-Lys, Lys-tris-amido-PEG-Lys, Lys-tetra-amido-PEG-Lys, Lys-PEG-Lys, PEG2000, PEG1250, PEG1000, PEG750, PEG550, PEG-Glu, Glu, C₆, Gly₃, y GluNH. En otras realizaciones, el PEG está monodispersado.

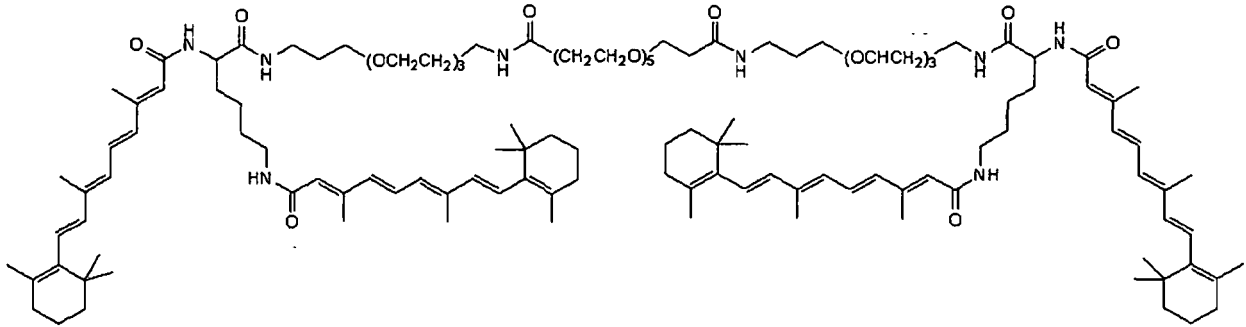
30 En el presente documento también se divulga un compuesto en el que la fórmula A se selecciona del grupo que consiste en retinoide-PEG-retinoide, (retinoide)₂-PEG-(retinoide)₂, VA-PEG2000-VA, (retinoide)₂-bis-amido-PEG-(retinoide)₂, (retinoide)₂-Lys-bis-amido-PEG-Lys-(retinoide)₂.

35 En otra realización de la presente divulgación, el compuesto es la fórmula



40 en la que q, r y s son cada uno independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

En otras realizaciones de la presente divulgación, la fórmula del compuesto comprende

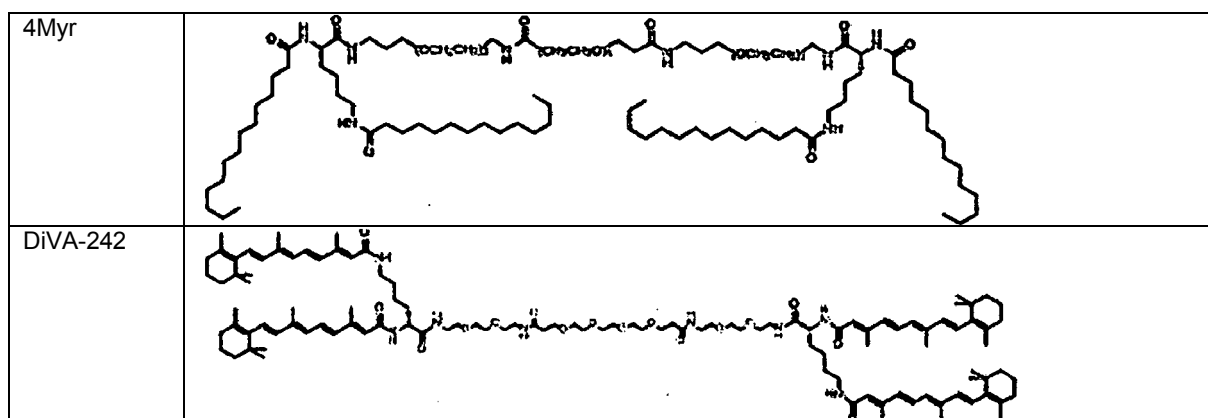


5

Otras realizaciones de la presente divulgación incluyen las estructuras mostradas en la tabla 1.

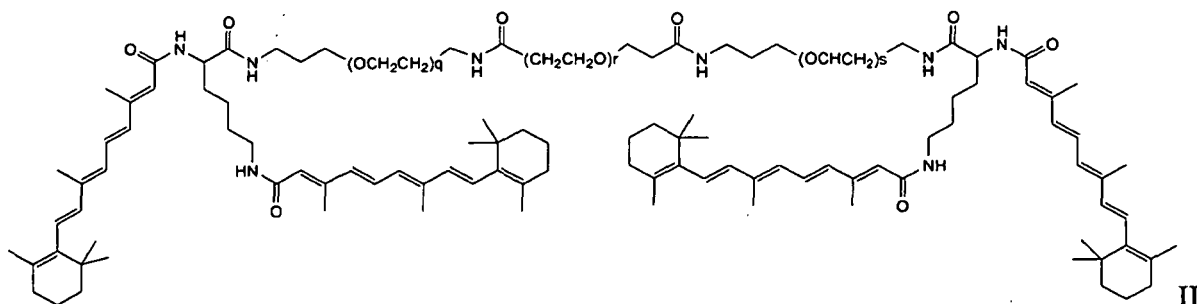
Tabla 1

Nombre del lípido	Estructura del compuesto
SatDiVA	
SimDiVA	
DiVA-PEG18	
TriVA	
4TTNPB	



Las composiciones de la invención que incluyen al menos un compuesto de fórmula I y un liposoma pueden comprender además uno o más conjugados de retinoide. En realizaciones preferidas de la invención, el conjugado de retinoide estará presente a una concentración de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 30 por ciento en peso, basándose en el peso total de la composición o formulación, lo cual es equivalente a de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10% en moles, lo cual es equivalente a una proporción molar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10. Preferiblemente, el conjugado de retinoide es una molécula de retinoide-grupo de unión-lípido o una molécula de retinoide-grupo de unión-retinoide.

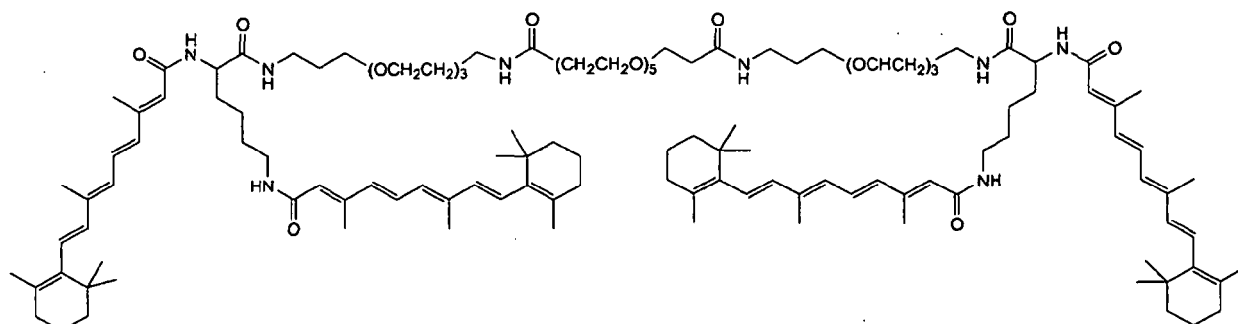
10 Un ejemplo de conjugados de retinoide incluye aquellos compuestos de fórmula II:



15 en la que q, r y s son cada uno independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, y enantiómeros y diastereómeros de los mismos.

Los compuestos preferidos de fórmula II incluyen aquellos en los que q, r y s son cada uno independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7. Se prefieren más aquellos compuestos de fórmula II en la que q, r y s son cada uno independientemente 3, 4 ó 5. Los más preferidos son aquellos compuestos de fórmula II en la que q es 3, r es 5 y s es 3. Un ejemplo de un compuesto de fórmula II es

20



DiVA-PEG-DiVA

25 DiVA-PEG-DiVA incluye estereocentros y se considera que todos los enantiómeros y diastereómeros están dentro del alcance de la invención.

La concentración de lípidos catiónicos de fórmula I en composiciones de la invención puede ser de desde el 1 hasta aproximadamente el 80 por ciento en peso, basándose en el peso total de la composición de lípido. Más preferiblemente, la concentración es de desde el 1 hasta aproximadamente el 75 por ciento en peso. Incluso más

- preferiblemente, la concentración es de desde aproximadamente el 30 hasta aproximadamente el 75 por ciento en peso. Una concentración de desde aproximadamente el 30 hasta aproximadamente el 75 por ciento en peso corresponde a aproximadamente del 30 al 60% en moles y a una proporción molar de aproximadamente 30-60. Las más preferidas son aquellas composiciones que tienen una concentración de lípido catiónico de aproximadamente el 50 por ciento en peso. En formulaciones que contienen una mezcla de un lípido catiónico ionizable y un lípido catiónico de amina cuaternaria de fórmula I, el % en moles preferido es de desde el 5% hasta el 45% en moles, prefiriéndose incluso más una mezcla de aproximadamente el 20% en moles del lípido catiónico ionizable y el 20% en moles del lípido catiónico de amina cuaternaria para la fórmula I.
- 5
- 10 Tales composiciones también pueden incluir un medio acuoso. Los lípidos catiónicos, incluyendo aquellos de fórmula I, pueden estar encapsulados dentro del liposoma en tales realizaciones y pueden estar inaccesibles para el medio acuoso. Además, los lípidos catiónicos, incluyendo aquellos de fórmula I, pueden ubicarse sobre la superficie exterior del liposoma y estar accesibles para el medio acuoso.
- 15 Las composiciones de la invención que incluyen al menos un compuesto de fórmula I y un liposoma, y opcionalmente un conjugado de retinoide tal como un compuesto de fórmula II, también pueden incluir ARNip. También están dentro del alcance de la invención formulaciones que incluyen al menos un compuesto de fórmula I y que comprenden además al menos un compuesto de fórmula A o B y ARNip.
- 20 Se prevé que cualquier molécula de ARNip puede usarse dentro del alcance de la invención. El ARNip puede incluir una secuencia antisentido con respecto a la secuencia codificante de ARNm para hsp47 humana mostrada a modo de ejemplo mediante la SEQ ID NO: 1, que se muestra a continuación.

ucuuuggc	uuuuuggc	agcugggg	cccuccgg	gcguuucc	cuuuccaga	60
guuucucg	acgggcag	gggggugg	acugccau	auagauc	ggagcaggg	120
agcgggcu	gaguagaa	gugucg	ucgagagc	gagucac	ccggcgcu	180
cccagccc	cccaggcc	ccguggug	cgcaaacc	uuccuggc	ugcguc	240
ccugcuuc	agcgcuu	gccuccug	ggcggccc	gccgccg	ugaagaa	300
ugcagccg	gcagcucc	gcacugcg	gaaguag	cccaagg	ccacgcu	360
cgagcgag	gccggccu	ccuucag	guaccagg	auggcca	accaggc	420
ggagaaca	cugguguc	ccguggug	ggccucg	cuagggc	ugucguc	480
cggcaagg	accacggc	cgcaggcc	ggcagug	agcggcg	agcugcg	540
cgaggagg	cacgccc	ugggcgag	gcugcgcu	cucagca	ccacggc	600
caacgug	uggaagc	gcagccg	guaccgg	agcucag	gcucgcu	660
ugacuucg	cgcagcag	agcagca	caacugcg	cacucca	ucaacu	720
cgacaagc	agcgcg	aguccau	cgagugg	gcgcag	ccgacgg	780
gcugccc	gucacca	acguggag	cacggac	gccucg	ucaacgc	840
guucuuca	ccacacug	augagaa	ccaccaca	augggga	accgugg	900
caugugag	gguccua	ccguggug	caugaag	caccggc	gccuca	960
cuacuacg	gacgaga	aaaagcg	aaucgug	augccc	cccaca	1020
cuccagcc	aucaucc	ugcccc	cguggag	cucgag	uugaaa	1080
gcuaacca	gagcagc	agaucug	ggggaag	cagaaga	cuguugc	1140
cuccuugc	aagggug	uggaggug	ccaugac	cagaaac	uggcugg	1200
ggccugac	gagccau	acaaga	ggccgcu	ucacgca	caggca	1260
ggaccug	cuggcag	uguucca	caccgcu	gaguugg	caguggc	1320
ccccuug	caggaca	acgggcg	ggagcug	agcccc	uguucac	1380
cgaccac	uucaucu	uagucg	cacccaa	ggcucc	uauuca	1440
gcgccug	cgccua	gugaca	gcgagac	uuauag	ucaggug	1500
cacaggau	caggagg	ccaaagg	cugagac	ugggug	uggggu	1560
ggggagug	gguaacc	uugguac	caugggu	gggugg	acagacc	1620
guuccgug	gccugag	accuucc	cuagaau	cuccacu	acaugg	1680
cagauacc	gaugcug	ccggaa	cacauc	gggacc	ccauag	1740
ucugccug	cugaaag	cagauca	cugccu	caguau	auuuau	1800
agguaccu	ucaccug	gaccaa	agcuag	gucagc	ccucuuc	1860
cacuaaa	ccucag	cucccc	cuaucc	cucucc	uauaaa	1920
ggugcug	ccccugg	caggcccc	cagaau	uggccg	gagcgga	1980
gagaagg	ucccagg	ggcuuc	cagacuc	ucaaga	ucguguc	2040
cguugugg	augaacuu	uguuuug	cuuccuu	uaguucu	aagauag	2100
gggaaggg	aacaugag	uuuguug	ucaaucc	aacuuau	uacauuu	2160
uuuucua	aaauucc	augacuu	guuggag	ggaaaa		2208

25 Por ejemplo,

Sentido (5'→3') GGACAGGCCUCUACAACUATT (SEQ. ID. NO. 2)

30 Antisentido (3'→5') TTCCUGUCCGGAGAUGUUGAU (SEQ. ID. NO. 3).

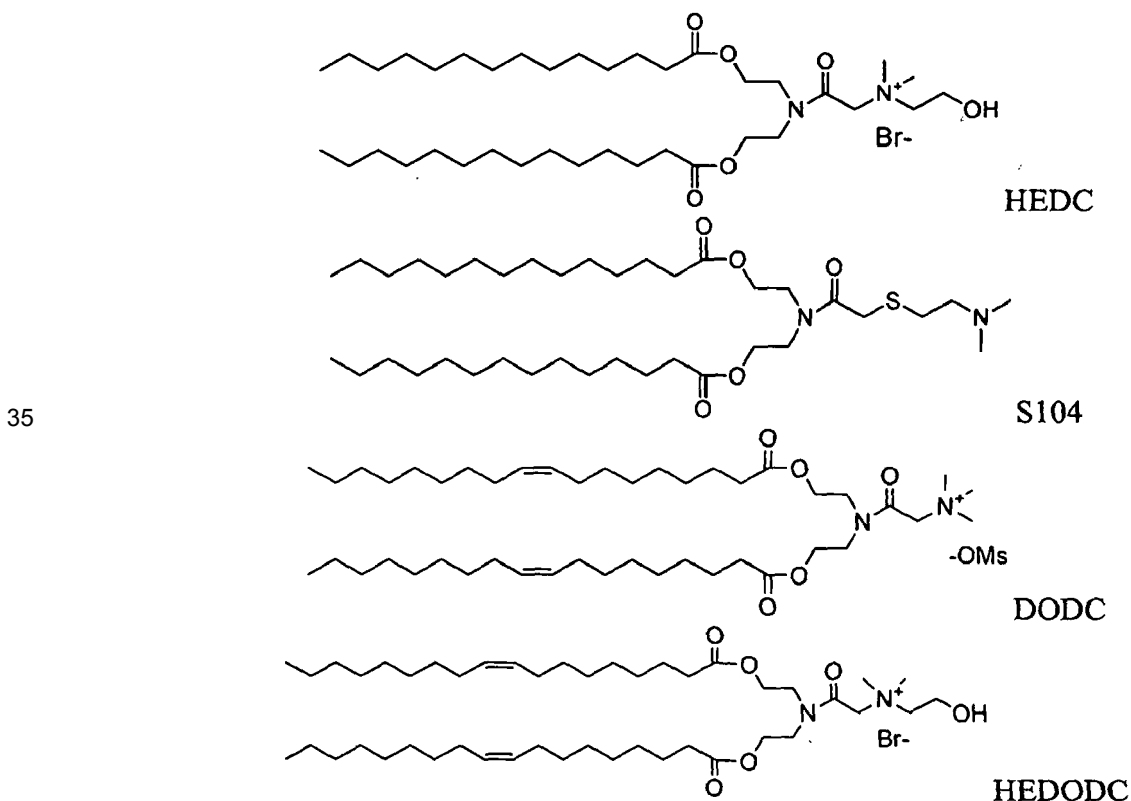
5 Tales composiciones también pueden incluir un medio acuoso. Preferiblemente, tales composiciones consisten esencialmente en al menos un compuesto de fórmula I en un complejo con carga con el ARNip. Tales composiciones que incluyen un compuesto de fórmula I y un ARNip pueden comprender además un medio líquido. En una realización, el medio líquido es adecuado para su inyección en un organismo vivo. Los medios líquidos dentro del alcance de cualquiera de las realizaciones descritas de la invención pueden ser acuosos, es decir, estar compuestos totalmente por un disolvente acuoso, e incluir sales, tampones y/u otros excipientes farmacéuticos. En otra realización, el medio líquido puede consistir en un disolvente acuoso en combinación con otro disolvente líquido tal como, por ejemplo, un disolvente orgánico. Los medios líquidos dentro del alcance de cualquiera de las realizaciones descritas de la invención también pueden incluir al menos un disolvente orgánico. Los disolventes orgánicos se conocen en la técnica en sí mismos e incluyen alcoholes de C₁ a C₄, dimetilsulfóxido ("DMSO") y similares. Aquellos medios líquidos que incluyen una mezcla de agua y al menos un disolvente orgánico también están dentro del alcance de cualquiera de las realizaciones descritas de la invención.

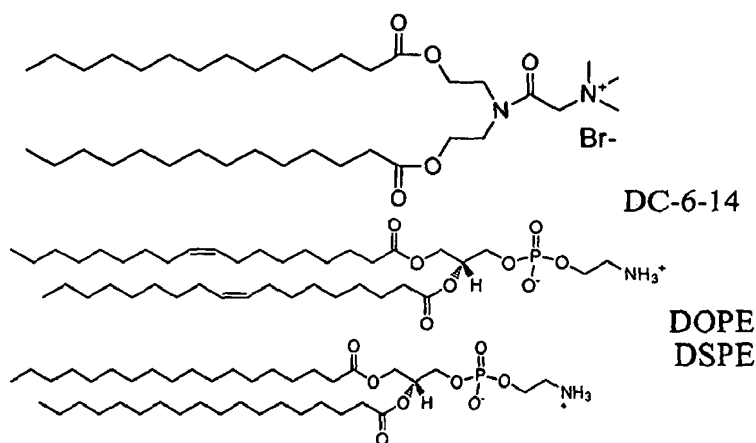
10 También están dentro del alcance de la invención composiciones que comprenden al menos un compuesto de fórmula I y un liposoma. Algunas realizaciones pueden incluir mezclas de compuestos de fórmula I y un liposoma. Otras realizaciones pueden incluir un liposoma y uno o más compuestos de fórmula I además de lípidos catiónicos que no están dentro del alcance de fórmula I.

15 En algunas realizaciones, el ARNip estará encapsulado por el liposoma de modo que el ARNip está inaccesible para el medio acuoso. En otras realizaciones, el ARNip no estará encapsulado por el liposoma. En tales realizaciones, el ARNip puede estar complejado sobre la superficie exterior del liposoma. En estas realizaciones, el ARNip está accesible para el medio acuoso.

20 Otras realizaciones incluyen un portador farmacológico específico de células estrelladas que comprende una composición liposomal. La composición liposomal puede comprender una vesícula lipídica que comprende una bicapa de moléculas lipídicas. En determinadas realizaciones puede preferirse que la molécula retinoide se exponga al menos parcialmente en el exterior del portador farmacológico antes de que el portador farmacológico alcance la célula estrellada.

25 Determinadas realizaciones de la presente divulgación proporcionan que las moléculas lipídicas comprenden uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en HEDC, DODC, HEDODC, DSPE, DOPE y DC-6-14. En otras realizaciones, las moléculas lipídicas pueden comprender además S104.





- 5 En algunas realizaciones, el ARNip estará encapsulado por el liposoma de modo que el ARNip está inaccesible para el medio acuoso. En otras realizaciones, el ARNip no estará encapsulado por el liposoma. En tales realizaciones, el ARNip puede estar complejoado sobre la superficie exterior del liposoma. En estas realizaciones, el ARNip está accesible para el medio acuoso.
- 10 Otras realizaciones incluyen un portador farmacológico específico de células estrelladas que comprende una composición liposomal. La composición liposomal puede comprender una vesícula lipídica que comprende una bicapa de moléculas lipídicas. En otras realizaciones, la molécula retinoide se expone al menos parcialmente en el exterior del portador farmacológico antes de que el portador farmacológico alcance la célula estrellada.
- 15 En determinadas realizaciones preferidas, el retinoide es del 0,1% en moles al 20% en moles de las moléculas lipídicas.

Las composiciones anteriores también pueden incluir lípidos conjugados con PEG, que se conocen en sí mismos en la técnica, incluyendo PEG-fosfolípidos y PEG-ceramidas, incluyendo una o más moléculas seleccionadas de las siguientes: PEG2000-DSPE, PEG2000-DPPE, PEG2000-DMPE, PEG2000-DOPE, PEG1000-DSPE, PEG1000-DPPE, PEG1000-DMPE, PEG1000-DOPE, PEG550-DSPE, PEG550-DPPE, PEG-550DMPE, PEG-1000DOPE, PEG-colesterol, PEG2000-ceramida, PEG1000-ceramida, PEG750-ceramida y PEG550-ceramida.

25 Las composiciones anteriores de la invención pueden incluir uno o más fosfolípidos tales como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina ("DSPC"), dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina ("DPPE") y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina ("DOPE"). Preferiblemente, el fosfolípido cooperador es DOPE.

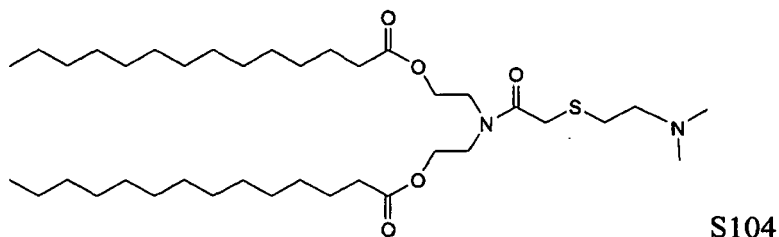
30 Por ejemplo, se prepararon liposomas dentro del alcance de la invención usando diversos PEG-lípidos, incorporados usando métodos de cosolubilización descritos en el presente documento. Estas formulaciones comprendían lípido catiónico:DOPE:colesterol:DiVAPEG-DiVA:PEG-Lípido (proporción molar de 50:10:38:5:2) y se sometió a prueba cada formulación en el ensayo *in vitro* de pHSC descrito en el presente documento usando ARNip de HSP47-C humana/de rata a una concentración de 200 nM. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

PEG-Lípido	Silenciamiento génico de gp46 (%)	Desv. est.
Sin tratar	0	5,6
Control de RNAimax	50,0	7,9
PEG-BML	95,5	1,7
PEG1000-DMPE	93,2	0,8
PEG1000-DPPE	92,8	1,3
PEG1000-DSPE	93,5	0,8
PEG1000-DOPE	90,7	2,5
PEG2000-Ceramida	91,8	1,0
PEG2000-DMPE	93,7	3,4
PEG2000-DPPE	91,1	1,4
PEG2000-DSPE	89,4	1,7

35 Las composiciones anteriores de la invención pueden incluir uno o más fosfolípidos tales como, por ejemplo, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina ("DSPC"), dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina ("DPPE") y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina ("DOPE"). Preferiblemente, el lípido cooperador es DOPE.

40

Además del lípido catiónico de fórmula I, otros lípidos pueden ser útiles. Estos incluyen lípidos catiónicos ionizables, incluyendo S104, mostrado a continuación.



5 Las formulaciones de administración pueden consistir en un lípido catiónico de fórmula I en combinación con un lípido catiónico ionizable. Un lípido catiónico ionizable puede incluir, por ejemplo, S104. El lípido catiónico ionizable puede estar presente a una concentración del 0 al 45% en moles, incluyendo una concentración seleccionada del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45% en moles.

10 También están dentro del alcance de la presente divulgación formulaciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de las composiciones anteriormente mencionadas además de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación incluirán al menos un agente terapéutico. Preferiblemente, el agente terapéutico es un ARNip. Se prevé que cualquier molécula de ARNip puede usarse dentro del alcance de la presente divulgación.

15 También están dentro del alcance de la presente divulgación formulaciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente además de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación incluirán al menos un agente terapéutico. Preferiblemente, el agente terapéutico es un ARNip. Se prevé que cualquier molécula de ARNip puede usarse dentro del alcance de la presente divulgación. Tal como se describió anteriormente, el ARNip incluye las secuencias mostradas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

20 En formulaciones preferidas de la presente divulgación que incluyen ARNip, el ARNip está encapsulado por el liposoma. En otras realizaciones, el ARNip puede estar fuera del liposoma. En esas realizaciones, el ARNip puede estar complejoado al exterior del liposoma.

25 Un intervalo útil de lípido catiónico:ARNip (proporción de nitrógeno lipídico con respecto a fosfato de ARNip, "N:P") es de 0,2 a 5,0. Un intervalo particularmente preferido de N:P es de 1,5 a 2,5 para composiciones y formulaciones de la presente divulgación.

30 Las formulaciones preferidas de la invención incluyen aquellas que comprenden HEDC:S104:DOPE:colesterol:PEGDMPE:DiVA-PEG-DiVA (proporción molar de 20:20:30:25:5:2) y HEDC:S104:DOPE:colesterol:PEG-DMPE:DiVA-PEG-Di-VA (proporción molar de 20:20:30:25:5:2) en las que DiVA-PEG-DiVA se cosolubiliza. También se divulgan formulaciones de DODC:DOPE:colesterol:Peg-lípido:DiVA-PEG-DiVA (proporción molar de 50:10:38:2:5) y DODC:DOPE:colesterol:Peg-Lípido:DiVA-PEG-DiVA en las que DiVA-PEG-DiVA se cosolubiliza.

35 Otras formulaciones de la invención incluyen aquella que comprenden formulaciones de HEDODC:DOPE:colesterol-PEG-lípido:DiVAPEG-DiVA (proporción molar de 50:10:38:2:5) y HEDODC:DOPE:colesterol-PEG-lípido:DiVA-PEG-DiVA en las que DiVA-PEG-DiVA se cosolubiliza.

40 Otras formulaciones preferidas de la presente divulgación incluyen aquellas que comprenden DC-6-14:DOPE:colesterol:DiVA-PEG-DiVA (proporciones molares de 40:30:30:5) y DC-6-14:DOPE:colesterol:DiVA-PEG-DiVA, en las que DiVA-PEG-DiVA se cosolubiliza.

45 También están dentro del alcance de la presente divulgación métodos de administración de un agente terapéutico a un paciente. Estos métodos comprenden proporcionar una formulación farmacéutica que incluye cualquiera de las composiciones anteriores y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable; y administrar la formulación farmacéutica al paciente.

Definiciones

55 Tal como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado, completamente saturado (sin dobles o triples enlaces), por ejemplo, un grupo que tiene la fórmula general $-C_nH_{2n+1}$. El grupo alquilo puede tener de 1 a 50 átomos de carbono (siempre que aparezca en el presente documento, un intervalo numérico tal como "de 1 a 50" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "de 1 a 50 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3

átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 50 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término “alquilo” cuando no se designa ningún intervalo numérico). El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 30 átomos de carbono. El grupo alquilo también puede ser un alquilo inferior que tiene de 1 a 5 átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos puede denominarse “alquilo C₁-C₄” o con designaciones similares. Únicamente a modo de ejemplo, “alquilo C₁-C₄” indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilo, es decir, la cadena de alquilo se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilos típicos incluyen, pero no se limitan de ninguna manera a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares.

Tal como se usa en el presente documento, “alquenoilo” se refiere a un grupo alquilo que contiene en la cadena de hidrocarburo lineal o ramificada uno o más dobles enlaces. Un grupo alquenoilo puede estar no sustituido o sustituido. Cuando está sustituido, el/los sustituyente(s) puede(n) seleccionarse de los mismos grupos divulgados anteriormente con respecto a la sustitución del grupo alquilo a menos que se indique lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, “alquinoilo” se refiere a un grupo alquilo que contiene en la cadena de hidrocarburo lineal o ramificada uno o más triples enlaces. Un grupo alquinoilo puede estar no sustituido o sustituido. Cuando está sustituido, el/los sustituyente(s) puede(n) seleccionarse de los mismos grupos divulgados anteriormente con respecto a la sustitución del grupo alquilo a menos que se indique lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, “halógeno” se refiere a F, Cl, Br y I.

Tal como se usa en el presente documento, “mesilato” se refiere a -OSO₂CH₃.

Tal como se usa en el presente documento, el término “formulación farmacéutica” se refiere a una mezcla de una composición divulgada en el presente documento con uno o más de otros componentes químicos, tales como diluyentes o portadores farmacéuticos adicionales. La formulación farmacéutica facilita la administración de la composición a un organismo. Existen múltiples técnicas de administración de una formulación farmacéutica en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, inyección y administración parenteral.

Tal como se usa en el presente documento, el término “portador farmacéutico” se refiere a un compuesto químico que facilita la incorporación de un compuesto en células o tejidos. Por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) es un portador comúnmente usado ya que facilita la captación de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “diluyente” se refiere a compuestos químicos diluidos en agua que disolverán la formulación de interés (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) así como estabilizará la forma biológicamente activa de la formulación. En la técnica se usan sales disueltas en disoluciones tamponadas como diluyentes. Una disolución tamponada comúnmente usada es solución salina tamponada con fosfato porque imita las condiciones salinas de la sangre humana. Dado que las sales de tampón pueden controlar el pH de una disolución a concentraciones bajas, un diluyente tamponado pocas veces modifica la actividad biológica de la formulación. Tal como se usa en el presente documento, un “excipiente” se refiere a una sustancia inerte que se añade a una formulación para proporcionar, sin limitación, volumen, consistencia, estabilidad, capacidad de unión, lubricación, capacidad de disgregación, etc., a la composición. Un “diluyente” es un tipo de excipiente.

Tal como se usa en el presente documento, “agente terapéutico” se refiere a un compuesto que, tras la administración a un mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz, proporciona un beneficio terapéutico al mamífero: un agente terapéutico puede denominarse fármaco en el presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán que el término “agente terapéutico” no se limita a fármacos que han recibido aprobación reguladora. Un “agente terapéutico” puede estar operativamente asociado con un compuesto tal como se describe en el presente documento, un retinoide y/o un segundo lípido. Por ejemplo, un segundo lípido tal como se describe en el presente documento puede formar un liposoma, y el agente terapéutico puede estar operativamente asociado con el liposoma, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento.

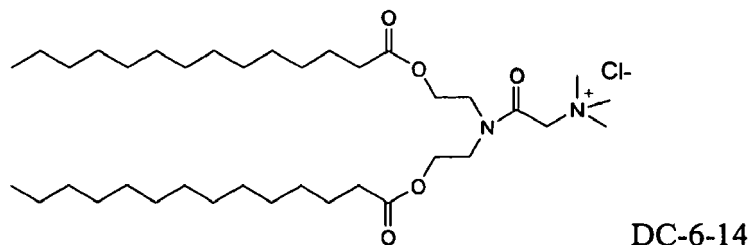
Tal como se usa en el presente documento, “formulaciones de lipoplejo” se refieren a aquellas formulaciones en las que el ARNip está fuera del liposoma. En formulaciones de lipoplejo preferidas, el ARNip está complejado al exterior del liposoma. Otras formulaciones de lipoplejo preferidas incluyen aquellas en las que el ARNip está accesible a cualquier medio presente fuera del liposoma.

Tal como se usa en el presente documento, “formulaciones de liposoma” se refieren a aquellas formulaciones en las que el ARNip está encapsulado dentro del liposoma. En formulaciones de liposoma preferidas, el ARNip está inaccesible para cualquier medio presente fuera del liposoma.

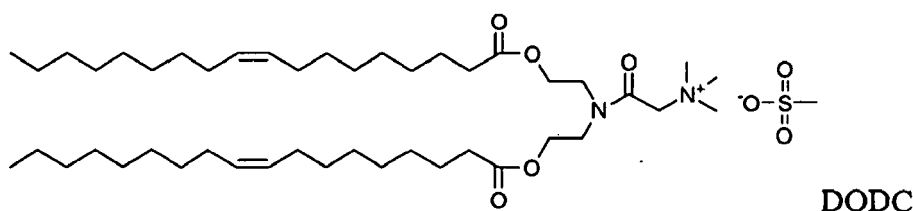
Tal como se usa en el presente documento, el término “cosolubilizado” se refiere a la adición de un componente a la mezcla de lípido catiónico antes de formarse la vesícula vacía.

Tal como se usa en el presente documento, el término “decorado” se refiere a la adición de un componente tras la formación de la vesícula.

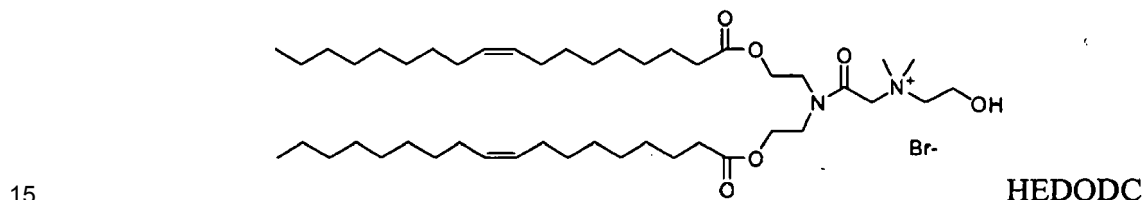
5 Tal como se usa en el presente documento, “DC-6-14” se refiere al siguiente compuesto de lípido catiónico:



10 Tal como se usa en el presente documento, “DODC” se refiere al siguiente compuesto de lípido catiónico:



Tal como se usa en el presente documento, “HEDODC” se refiere al siguiente compuesto de lípido catiónico:



15 Tal como se usa en el presente documento, un “retinoide” es un miembro de la clase de compuestos que consisten en cuatro unidades de isoprenoide unidas de manera cabeza con cola, véase G. P. Moss, “Biochemical Nomenclature and Related Documents”, 2ª Ed. Portland Press, págs. 247-251 (1992). La “vitamina A” es el descriptor genérico para retinoides que muestran cualitativamente la actividad biológica del retinol. Tal como se usa en el presente documento, retinoide se refiere a retinoides naturales y sintéticos incluyendo retinoides de primera generación, segunda generación y tercera generación. Los ejemplos de retinoides que se producen de manera natural incluyen, pero no se limitan a, (1) 11-cis-retinal, (2) todo-trans-retinol, (3) palmitato de retinilo, (4) ácido todo-trans-retinoico y (5) ácidos 13-cis-retinoicos. Además, el término “retinoide” abarca retinoles, retinales, ácidos retinoicos, rexinoides, ácidos retinoicos desmetilados y/o saturados, y derivados de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, “conjugado de retinoide” se refiere a una molécula que incluye al menos un resto retinoide.

30 Tal como se usa en el presente documento, “molécula de retinoide-grupo de unión-lípido” se refiere a una molécula que incluye al menos un resto retinoide unido a al menos un resto lipídico a través de al menos un grupo de unión tal como, por ejemplo, un resto PEG.

35 Tal como se usa en el presente documento, “molécula de retinoide-grupo de unión-retinoide” se refiere a una molécula que incluye al menos un resto retinoide unido a al menos otro resto retinoide (que puede ser el mismo o diferente) a través de al menos un grupo de unión tal como, por ejemplo, un resto PEG.

40 Tal como se usa en el presente documento, “vitamina D” es un descriptor genérico para un grupo de vitaminas que tienen actividad antirraquítica. El grupo de la vitamina D incluye: vitamina D2 (calciferol), vitamina D3 (22-dihidroergosterol irradiado), vitamina D4 (deshidrositosterol irradiado) y vitamina D5 (deshidrositosterol deshidrositosterol).

45 Tal como se usa en el presente documento, “vitamina E” es un descriptor genérico para un grupo de moléculas con actividad antioxidante. La familia de la vitamina E incluye α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol, siendo α -tocoferol el más prevalente. (Brigelius-Flohe y Traber, The FASEB Journal. 1999; 13:1145-1155).

Tal como se usa en el presente documento, "vitamina K" es un descriptor genérico para un factor antihemorrágico e incluye vitamina K1 (fitonodiona), vitamina K2 (menaquinona), vitamina K3, vitamina K4 y vitamina K5. Las vitaminas K1 y K2 son naturales, mientras que K3-5 son sintéticas.

5 Tal como se usa en el presente documento, "molécula de retinoide-grupo de unión-lípido" se refiere a una molécula que incluye al menos un resto retinoide unido a al menos un resto lipídico a través de al menos un grupo de unión tal como, por ejemplo, un resto PEG.

10 Tal como se usa en el presente documento, "molécula de retinoide-grupo de unión-retinoide" se refiere a una molécula que incluye al menos un resto retinoide unido a al menos otro resto retinoide (que puede ser el mismo o diferente) a través de al menos un grupo de unión tal como, por ejemplo, un resto PEG.

15 Tal como se usan en el presente documento, los términos "lípido" y "lipófilo" se usan en el presente documento con sus significados habituales tal como los entienden los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de lípidos y grupos lipófilos incluyen ácidos grasos, esteroides, alquilo C₂-C₅₀, heteroalquilo C₂-C₅₀, alqueno C₂-C₅₀, heteroalqueno C₂-C₅₀, arilo C₅-C₅₀, heteroarilo C₅-C₅₀, alquino C₂-C₅₀, heteroalquino C₂-C₅₀, carboxialqueno C₂-C₅₀ y carboxiheteroalqueno C₂-C₅₀. Un ácido graso es un ácido monocarboxílico de cadena larga saturado o insaturado que contiene, por ejemplo, de 12 a 24 átomos de carbono. Un lípido se caracteriza por ser esencialmente insoluble en agua, teniendo una solubilidad en agua de menos de aproximadamente el 0,01% (base en peso). Tal como se usan en el presente documento, los términos "resto lipídico" y "resto lipófilo" se refieren a un lípido o parte del mismo que se ha unido a otro grupo. Por ejemplo, un grupo lípido puede unirse a otro compuesto (por ejemplo, un monómero) mediante una reacción química entre un grupo funcional (tal como un grupo ácido carboxílico) del lípido y un grupo funcional apropiado de un monómero.

25 Tal como se usa en el presente documento, "ARNip" se refiere a ARN de interferencia pequeño, también conocido en la técnica como ARN de interferencia corto o ARN de silenciamiento. ARNip es una clase de moléculas de ARN bicatenario que tienen una variedad de efectos conocidos en la técnica, siendo el más notable la interferencia con la expresión de genes específicos y la expresión de proteínas.

30 Tal como se usa en el presente documento, "encapsulado por el liposoma" se refiere a un componente que está sustancial o totalmente dentro de la estructura del liposoma.

35 Tal como se usa en el presente documento, "accesible para el medio acuoso" se refiere a un componente que puede entrar en contacto con el medio acuoso.

Tal como se usa en el presente documento, "inaccesible para el medio acuoso" se refiere a un componente que no puede entrar en contacto con el medio acuoso.

40 Tal como se usa en el presente documento, "complejado sobre la superficie exterior del liposoma" se refiere a un componente que está operativamente asociado con la superficie exterior del liposoma.

Tal como se usa en el presente documento, "ubicado sobre la superficie exterior del liposoma" se refiere a un componente que está en o cerca de la superficie exterior del liposoma.

45 Tal como se usa en el presente documento, "complejado con carga" se refiere a una asociación electrostática.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "operativamente asociado" se refiere a una interacción electrónica entre un compuesto tal como se describe en el presente documento, un agente terapéutico, un retinoide y/o un segundo lípido. Tal interacción puede adoptar la forma de un enlace químico, incluyendo, pero sin limitarse a, un enlace covalente, un enlace covalente polar, un enlace iónico, una asociación electrostática, un enlace covalente coordinado, un enlace aromático, un enlace de hidrógeno, un dipolo o una interacción de Van der Waals. Los expertos habituales en la técnica entienden que las fuerzas relativas de tales interacciones pueden variar ampliamente.

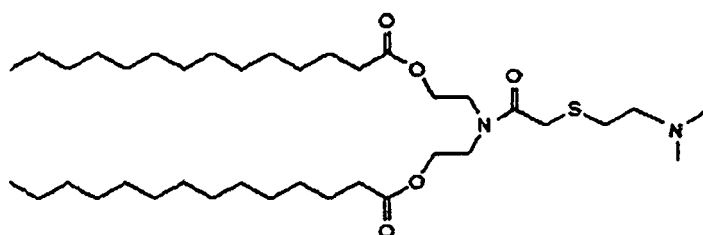
55 El término "liposoma" se usa en el presente documento con su significado habitual tal como lo entienden los expertos en la técnica, y se refiere a una estructura de bicapa lipídica que contiene lípidos unidos a grupos hidrófilos polares que forman una estructura sustancialmente cerrada en medios acuosos. En algunas realizaciones, el liposoma puede estar operativamente asociado con uno o más compuestos, tales como un agente terapéutico y un retinoide o conjugado de retinoide. Un liposoma puede estar compuesto por una única bicapa lipídica (es decir, unilaminar) o puede estar compuesto por dos o más bicapas lipídicas concéntricas (es decir, multilaminar). Adicionalmente, un liposoma puede tener una forma aproximadamente esférica o elipsoidal.

65 El término "facilitar administración de fármacos a una célula diana" se refiere a la capacidad potenciada de los presentes compuestos de retinoide o vitamina liposoluble para potenciar la administración de una molécula terapéutica tal como ARNip a una célula. Sin desear limitarse a la teoría, el compuesto de retinoide o vitamina

liposoluble interacciona con un [sitio de activación/unión] o receptor específico en una célula diana con especificidad que puede medirse. Por ejemplo, la unión se considera generalmente específica cuando la afinidad de unión (K_a) es de $10^6 M^{-1}$ o más, preferiblemente de $10^7 M^{-1}$ o más, más preferiblemente de $10^8 M^{-1}$ o más y lo más preferiblemente de $10^9 M^{-1}$ o más. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarla fácilmente un experto habitual en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660, 1949).

Los sistemas de administración de ácido nucleico pueden incluir, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, pomadas, disoluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases de hidrocarburos y polvos, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la penetración (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos), y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbófilo y polivinilpirrolidona).

Además del lípido catiónico de fórmula I, otros lípidos pueden ser útiles. Estos incluyen lípidos catiónicos ionizables, incluyendo



S104

Las formulaciones de administración pueden consistir en un lípido catiónico de fórmula I en combinación con un lípido catiónico ionizable. Un lípido catiónico ionizable puede incluir, por ejemplo, S104. El lípido catiónico ionizable puede estar presente a una concentración del 0 al 45% en moles, incluyendo una concentración seleccionada del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45% en moles.

Un lípido conjugado con una molécula de polietilenglicol (PEG) puede estar presente en las partículas de liposoma. Los PEG-lípidos incluyen

- 1,2-dimiristoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DMPE)
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DPPE),
- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DSPE), o
- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DOPE) y/o
- PEG-ceramida.

Las formulaciones de administración pueden consistir en un lípido catiónico de fórmula I en combinación con un PEG-lípido. El PEG-lípido puede estar presente a una concentración del 0 al 15% en moles, preferiblemente del 1 al 10% en moles, incluyendo una concentración seleccionada del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10% en moles.

Los ejemplos no limitativos de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomiélna, esfingomiélna de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, ácido fosfátidico, cerebrósidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometilfosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoilfosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, y mezclas de los mismos. También pueden usarse otros fosfolípidos de diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferiblemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tienen cadenas de carbono C_{10} - C_{24} , por ejemplo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo u oleoilo.

En determinadas realizaciones, la cantidad de fosfolípido presente en partículas comprende desde aproximadamente el 0% en moles hasta aproximadamente el 55% en moles, más específicamente a una concentración seleccionada del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55%. Como ejemplo no limitativo, el fosfolípido es DOPE.

Los ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen esteroides tales como colesterol y derivados del mismo tales como colestanol, colestanona, colesteno, coprostanol, colestiril 2'-hidroxietil éter, colestiril 4'-hidroxibutil éter y mezclas de los mismos.

5 En determinadas realizaciones, el colesterol o derivado de colesterol presente en partículas comprende desde aproximadamente el 0% en moles hasta aproximadamente el 55% en moles, más específicamente a una concentración seleccionada del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55% en moles. Como ejemplo no limitativo, está presente colesterol en las partículas de lípido.

10 En determinadas otras realizaciones, el colesterol presente en partículas de lípido que contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol comprende desde aproximadamente el 30% en moles hasta aproximadamente el 40% en moles, desde aproximadamente el 30% en moles hasta aproximadamente el 35% en moles, o desde aproximadamente el 35% en moles hasta aproximadamente el 40% en moles del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula de lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol a aproximadamente el 34% en moles del lípido total presente en la partícula.

15 En realizaciones adicionales, el colesterol presente en partículas de lípido que contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol comprende desde aproximadamente el 10% en moles hasta aproximadamente el 30% en moles, desde aproximadamente el 15% en moles hasta aproximadamente el 25% en moles, o desde aproximadamente el 17% en moles hasta aproximadamente el 23% en moles del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitativo, una partícula de lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol a aproximadamente el 20% en moles del lípido total presente en la partícula.

20 El retinoide o conjugado de retinoide útil para la administración de ácido nucleico está en un estado en el cual está disuelto en o mezclado con un medio que puede disolverlo o contenerlo.

25 En la presente descripción puede usarse cualquier retinoide o conjugado de retinoide siempre que se acumule de manera activa por células estrelladas; los ejemplos de retinoide incluyen, pero no se limitan a, tretinoína, adapaleno, palmitato de retinol y, en particular, vitamina A, vitamina A saturada, ácido retinoico y retinal. Los ejemplos del conjugado de retinoide incluyen conjugados de PEG-retinoide. La presente descripción usa la propiedad de células estrelladas para incorporar de manera positiva un retinoide y/o un conjugado de retinoide, y usando el retinoide y/o conjugado de retinoide como portador farmacológico o uniéndolo a o incluyéndolo en otro componente de portador farmacológico, se transporta un material o cuerpo deseado específicamente a células estrelladas. Un retinoide es un miembro de la clase de compuestos que tienen un esqueleto en el que cuatro unidades de isoprenoide están unidas de manera cabeza con cola. Véase G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents", 2ª ed. Portland Press, págs. 247-251 (1992). La vitamina A es un descriptor genérico para un retinoide que muestra cualitativamente la actividad biológica del retinol. El retinoide en la presente descripción fomenta la administración de sustancia específica a una célula cancerosa y un CAF (es decir, la sustancia se dirige a esas células). Un retinoide de este tipo no está particularmente limitado y ejemplos del mismo incluyen retinol, vitamina A, vitamina A saturada, retinal, ácido retinoico, un éster de retinol y un ácido graso, un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico, etretinato, tretinoína, isotretinoína, adapaleno, acitretina, tazaroteno y palmitato de retinol, y análogos de vitamina A tales como fenretinida y bexaroteno. Los conjugados de retinoide incluyen conjugados de PEG, por ejemplo, diVA-PEG-diVA y VA-PEG-VA.

30 Por tanto, el portador farmacológico de la presente descripción puede contener un componente de portador farmacológico distinto de un retinoide y/o conjugado de retinoide. Un componente de este tipo no está particularmente limitado, y puede usarse cualquier componente conocido en los campos de la medicina y la farmacia, pero es preferible que sea capaz de incluir un retinoide y/o conjugado de retinoide. Además, el portador farmacológico de la presente descripción puede contener una sustancia que mejora la incorporación en células estrelladas, por ejemplo, proteína de unión a retinol (RBP). La unión o inclusión del retinoide y/o conjugado de retinoide con el portador farmacológico de la presente descripción también puede llevarse a cabo mediante unión o inclusión del retinoide y/o conjugado de retinoide con otro componente del portador farmacológico mediante métodos químicos y/o físicos. Alternativamente, la unión o inclusión del retinoide y/o conjugado de retinoide con el portador farmacológico de la presente descripción también puede llevarse a cabo mezclando el retinoide y/o conjugado de retinoide que tiene afinidad de formación y componentes básicos del portador farmacológico, en los componentes de portador farmacológico durante la preparación del portador farmacológico.

35 La cantidad de retinoide y/o conjugado de retinoide unido a o incluido en el portador farmacológico de la presente descripción puede ser del 0,1% en moles al 20% en moles como una proporción en peso con respecto a los componentes de portador farmacológico, preferiblemente del 0,2% al 10%, y más preferiblemente del 0,5% al 5% en moles, incluyendo una concentración seleccionada de los valores del 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 y 5,0% en moles.

40 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un liposoma que va a producirse mediante mezclado en una cámara. Esto incluye un procedimiento que proporciona una disolución acuosa que comprende un ácido nucleico tal como un ARN de interferencia en un primer depósito, proporcionar una disolución de lípido

orgánico en un segundo depósito y mezclar la disolución acuosa con la disolución de lípido orgánico de tal manera que la disolución de lípido orgánico se mezcla con la disolución acuosa para producir un liposoma que encapsula el ácido nucleico (por ejemplo, ARNip) en un gradiente de concentración de disolvente orgánico.

5 El liposoma formado usando el método de mezclado tiene normalmente un tamaño de desde aproximadamente 40 nm hasta aproximadamente 250 nm, desde aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 150 nm, desde aproximadamente 60 nm hasta aproximadamente 150 nm. Las partículas así formadas no se agregan y opcionalmente se dimensionan para alcanzar un tamaño de partícula uniforme.

10 El portador farmacológico de la presente descripción puede estar en cualquier forma siempre que pueda transportarse un material o cuerpo deseado a células diana estrelladas, y ejemplos de la forma incluyen, pero no se limitan a, micelas poliméricas, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera. Además, el portador farmacológico de la presente descripción puede incluir en su interior la sustancia que tiene que transportarse, unirse al exterior de la sustancia que tiene que transportarse, o mezclarse con la sustancia que tiene que transportarse siempre que el retinoide y/o conjugado de retinoide incluido en el mismo se exponga al menos parcialmente en el exterior de la preparación como muy tarde antes de que alcance las células estrelladas.

15 El portador farmacológico de la presente descripción selecciona específicamente como diana células estrelladas y permite que se muestre un efecto deseado tal como, por ejemplo, inhibición o prevención de fibrosis, con el máximo efecto y los mínimos efectos secundarios transportando eficazmente a células estrelladas un material o cuerpo deseado tal como, por ejemplo, un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas. El material o cuerpo que administra el presente portador farmacológico no está particularmente limitado, pero preferiblemente tiene un tamaño que permite el movimiento físico en un organismo vivo desde un sitio de administración hasta el hígado, páncreas, etc., en el que están presentes células estrelladas. Por tanto, el portador farmacológico de la presente descripción puede transportar no sólo un material tal como un átomo, una molécula, un compuesto, una proteína o un ácido nucleico, sino también un cuerpo tal como un vector, una partícula de virus, una célula, un sistema de liberación de fármaco constituido por uno o más elementos, o una micromáquina. El material o cuerpo tiene preferiblemente la propiedad de ejercer algún efecto sobre células estrelladas, y los ejemplos del mismo incluyen uno que marca células estrelladas y uno que controla la actividad o el crecimiento de células estrelladas.

20 Por tanto, en una realización de la presente descripción, el portador farmacológico administra un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas. Esto puede ser cualquier fármaco que inhibe directa o indirectamente las acciones fisicoquímicas de células estrelladas implicadas en promover la fibrosis, y ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la actividad de TGF β tales como un receptor de TGF β tipo II truncado y un receptor de TGF β tipo II soluble, preparaciones de factores de crecimiento tales como HGF y vectores de expresión de los mismos, promotores de la producción de MMP tales como un vector de adenovirus que contiene el gen de MMP, inhibidores de la producción de TIMP tales como un ácido nucleico de TIMP antisentido, un ligando de PPAR γ , inhibidores de la activación celular y/o inhibidores del crecimiento celular tales como un inhibidor de la actividad de angiotensina, un inhibidor de la actividad de PDGF y un inhibidor de canales de sodio, y también inductores de la apoptosis tales como compuesto 861 y gliotoxina, adiponectina y un compuesto que tiene actividad inhibidora de Rho cinasa tal como (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano. Además, el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas en la presente descripción puede ser cualquier fármaco que fomenta directa o indirectamente las acciones fisicoquímicas de células estrelladas directa o indirectamente implicadas en la inhibición de la fibrosis, y ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, un fármaco para fomentar un sistema de degradación de colágeno, por ejemplo, promotores de la producción de MMP tales como un vector de expresión de MMP, HGF, y fármacos que tienen actividad de tipo HGF tales como análogos de HGF y vectores de expresión del mismo.

45 Otros ejemplos del fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas en la presente descripción incluyen un fármaco para controlar el metabolismo de una matriz extracelular tal como colágeno, por ejemplo, una sustancia que tiene un efecto en la inhibición de la expresión de una molécula diana, tal como ARNip, ribozima, y ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, ANP y un material compuesto de los mismos), una sustancia que tiene un efecto negativo dominante, y vectores que expresan los mismos, que seleccionan como diana, por ejemplo, una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por células estrelladas o seleccionan como diana una o más moléculas que tienen la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular.

50 La presente descripción también se refiere a un medicamento para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, el medicamento que contiene el portador farmacológico y el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas, y se refiere al uso del portador farmacológico en la producción de una composición farmacéutica para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas. El trastorno relacionado con células estrelladas al que se hace referencia en el presente documento significa un trastorno en el que las células estrelladas están directa o indirectamente implicadas en el proceso del trastorno, es decir, la aparición, exacerbación, mejora, remisión, cura, etc. del trastorno, y ejemplos de los mismos incluyen trastornos hepáticos tales como hepatitis, en particular hepatitis crónica, fibrosis hepática, cirrosis hepática y cáncer de hígado, y

trastornos pancreáticos tales como pancreatitis, en particular pancreatitis crónica, fibrosis pancreática y cáncer de páncreas.

5 En el medicamento de la presente descripción, el portador farmacológico puede incluir un fármaco en su interior, unirse al exterior de una sustancia que contiene fármaco o mezclarse con un fármaco siempre que el retinoide y/o conjugado de retinoide incluido en el portador farmacológico se exponga al menos parcialmente en el exterior de la preparación como muy tarde antes de que alcance las células estrelladas. Por tanto, dependiendo de la vía de administración o la manera en la que se libera el fármaco, el medicamento puede cubrirse con un material apropiado, tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material que se disgrega a lo largo del tiempo, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármaco apropiado.

15 Por tanto, la presente descripción incluye un kit de preparación de medicamento o portador farmacológico que contiene uno o más recipientes que contienen uno o más de un constituyente de portador farmacológico, un retinoide y/o un conjugado de retinoide y/o un fármaco, y también incluye un componente esencial para el portador farmacológico o el medicamento proporcionado en forma de un kit de este tipo. El kit de la presente descripción puede contener, además de lo descrito anteriormente, una descripción, etc. en la que se describe un método de preparación o un método de administración para el portador farmacológico y el medicamento de la presente descripción. Además, el kit de la presente descripción puede contener todos los componentes para completar el portador farmacológico o el medicamento de la presente descripción pero no se necesita que contenga necesariamente todos los componentes. Por tanto, no se necesita que el kit de la presente descripción contenga un reactivo o un disolvente que está normalmente disponible en un lugar de tratamiento médico, una instalación experimental, etc. tal como, por ejemplo, agua estéril, solución salina o una disolución de glucosa.

25 La presente descripción se refiere además a un método para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, incluyendo el método administrar una cantidad eficaz del medicamento a un sujeto que lo necesita. La cantidad eficaz a la que se hace referencia en el presente documento es una cantidad que suprime la aparición del trastorno diana, reduce los síntomas del mismo o previene la progresión del mismo, y es preferiblemente una cantidad que previene la aparición del trastorno diana o cura el trastorno diana. También es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo puede determinarse según sea apropiado mediante una prueba *in vitro* usando células en cultivo, etc. o mediante una prueba en un animal de modelo tal como un ratón, una rata, un perro o un cerdo, y tales métodos de prueba los conoce bien un experto en la técnica.

35 En el método de la presente descripción, el término "sujeto" significa cualquier individuo vivo, preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente un individuo humano. En la presente descripción, el sujeto puede estar sano o afectado por algún trastorno, y en el caso de que se pretenda el tratamiento de un trastorno, el sujeto significa normalmente un sujeto afectado por el trastorno o que corre el riesgo de verse afectado.

40 Además, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervención profiláctica y/o terapéutica médicamente aceptable con el propósito de la cura, remisión temporal, prevención, etc. de un trastorno. Por ejemplo, cuando el trastorno es fibrosis hepática, el término "tratamiento" incluye la intervención médicamente aceptable para diversos fines incluyendo retrasar o detener la progresión de la fibrosis, regresión o desaparición de lesiones, prevención de la aparición de la fibrosis, o prevención de la recidiva.

45 La presente descripción también se refiere a un método para administrar un fármaco a células estrelladas usando el portador farmacológico. Este método incluye, pero no se limita a, una etapa de soportar una sustancia que va a administrarse sobre el portador farmacológico, y una etapa de administrar o añadir el portador farmacológico que porta la sustancia que va a administrarse a un medio u organismo vivo que contiene células estrelladas, tal como, por ejemplo, un medio de cultivo. Estas etapas pueden lograrse según sea apropiado según cualquier método conocido, el método descrito en la presente memoria descriptiva, etc. Este método de administración puede combinarse con otro método de administración, por ejemplo, otro método de administración en el que un órgano en el que están presentes células estrelladas es la diana, etc.

55 Las moléculas de ácido nucleico pueden estar adaptadas para usarse para prevenir o tratar enfermedades, rasgos, estados y/o trastornos de fibrosis (por ejemplo, de hígado, riñón, peritoneal y pulmonar) y/o cualquier otro rasgo, enfermedad, trastorno o estado relacionado con o que responderá a los niveles de hsp47 en una célula o tejido, solas o en combinación con otras terapias. Una molécula de ácido nucleico puede incluir un vehículo de administración, incluyendo liposomas, para la administración a un sujeto, portadores y diluyentes y sus sales, y/o puede estar presente en formulaciones farmacéuticamente aceptables.

Las moléculas de ácido nucleico de la descripción pueden incluir las secuencias mostradas en la tabla 3. Ejemplos de tales moléculas de ácido nucleico consisten esencialmente en las secuencias proporcionadas en la tabla 3.

65 Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse mediante administración pulmonar, tal como mediante inhalación de un aerosol o formulación secada por pulverización administrada mediante un dispositivo de inhalación

o nebulizador, proporcionando una rápida captación local de las moléculas de ácido nucleico en tejidos pulmonares relevantes. Pueden prepararse composiciones particuladas sólidas que contienen partículas secas respirables de composiciones de ácido nucleico micronizadas triturando composiciones de ácido nucleico secadas o liofilizadas, y después haciendo pasar la composición micronizada a través, por ejemplo, de un tamiz de 400 de malla para romper o separar aglomerados grandes. Una composición particulada sólida que comprende las composiciones de ácido nucleico de la descripción puede contener opcionalmente un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol así como otros compuestos terapéuticos. Un dispersante adecuado es lactosa, que puede combinarse con el compuesto de ácido nucleico en cualquier proporción adecuada, tal como una proporción de 1 con respecto a 1 en peso.

Los aerosoles de partículas líquidas pueden incluir unas moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento y pueden producirse mediante cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador (véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.501.729). Los nebulizadores son dispositivos comercialmente disponibles que transforman disoluciones o suspensiones de un principio activo en una niebla de aerosol terapéutica o bien por medio de aceleración de un gas comprimido, normalmente aire u oxígeno, a través de un orificio de Venturi estrecho o bien por medio de una agitación por ultrasonidos. Las formulaciones adecuadas para su uso en nebulizadores incluyen el principio activo en un portador líquido en una cantidad de hasta el 40% p/p, preferiblemente inferior al 20% p/p de la formulación. El portador es normalmente agua o una disolución alcohólica acuosa diluida, preferiblemente que se vuelve isotónica con los líquidos corporales mediante la adición, por ejemplo, de cloruro de sodio u otras sales adecuadas. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara de manera estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, aromatizantes, aceites volátiles, agentes tamponantes y emulsionantes y otros tensioactivos de formulación. Los aerosoles de partículas sólidas que incluyen la composición activa y tensioactivo pueden producirse asimismo con cualquier generador de aerosol particulado sólido. Los generadores de aerosol para administrar productos terapéuticos particulados sólidos a un sujeto producen partículas que son respirables, tal como se explicó anteriormente, y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de una composición terapéutica a una tasa adecuada para la administración a humanos. Un tipo ilustrativo de generador de aerosol particulado sólido es un insuflador. Las formulaciones adecuadas para su administración mediante insuflación incluyen polvos finamente desmenuzados que pueden administrarse por medio de un insuflador. En el insuflador, el polvo, por ejemplo, una dosis medida del mismo eficaz para llevar a cabo los tratamientos descritos en el presente documento, está contenido en cápsulas o cartuchos, normalmente compuestos por gelatina o plástico, que o bien se perforan o bien se abren *in situ* y el polvo se administra mediante aire extraído a través del dispositivo tras la inhalación o por medio de una bomba accionada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste o bien únicamente en el principio activo o bien en una combinación en polvo que comprende el principio activo, un diluyente en polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El principio activo incluye normalmente desde 0,1 hasta 100 p/p de la formulación. Un segundo tipo de generador de aerosol ilustrativo incluye un inhalador de dosis medida. Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol a presión, que contienen normalmente una formulación en suspensión o disolución del principio activo en un propelente licuado. Durante el uso estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen medido para producir una pulverización de partículas finas que contiene el principio activo. Los propelentes adecuados incluyen determinados compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener adicionalmente uno o más codisolventes, por ejemplo, etanol, emulsionantes y otros tensioactivos de formulación, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitano, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados. Otros métodos para administración pulmonar se describen, por ejemplo, en los documentos US20040037780, US6592904, US6582728 y US6565885. El documento WO08132723 se refiere a la administración en aerosol de oligonucleótidos en general, y de ARNip en particular, al sistema respiratorio.

Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse al sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico (SNP). Experimentos han demostrado la captación eficaz *in vivo* de ácidos nucleicos por neuronas. Véanse, por ejemplo, Sommer *et al.*, 1998, *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 8:75; Epa *et al.*, 2000, *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 10:469; Broaddus *et al.*, 1998, *J. Neurosurg.*, 88:734; Karle *et al.*, 1997, *Eur. J. Pharmacol.*, 340:153; Bannai *et al.*, 1998, *Brain Research*, 784:304; Rajakumar *et al.*, 1997, *Synapse*, 26:199; Wu-pong *et al.*, 1999, *BioPharm*, 12:32; Bannai *et al.*, 1998, *Brain Res. Protoc.*, 3:83; y Simantov *et al.*, 1996, *Neuroscience*, 74:39. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico pueden someterse a administración a, y captación por, células en el SNC y/o SNP.

La administración de moléculas de ácido nucleico al SNC se proporciona mediante una variedad de estrategias diferentes. Los enfoques tradicionales de administración al SNC que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, administración intratecal e intracerebroventricular, implantación de catéteres y bombas, inyección directa o perfusión en el sitio de la herida o lesión, inyección en el sistema arterial cerebral, o mediante apertura química u osmótica de la barrera hematoencefálica. Otros enfoques pueden incluir el uso de diversos sistemas de transporte y portador, por ejemplo mediante el uso de conjugados y polímeros biodegradables. Además, pueden usarse enfoques de terapia génica, por ejemplo, tal como se describe en Kaplitt *et al.*, patente estadounidense n.º 6.180.613 y Davidson, documento WO 04/013280, para expresar moléculas de ácido nucleico en el SNC.

Pueden formularse o complejarse moléculas de ácido nucleico con polietilenimina (por ejemplo, PEI lineal o

ramificada) y/o derivados de polietilimina, incluyendo por ejemplo PEI injertadas tales como galactosa-PEI, colesterol-PEI, PEI derivatizada con anticuerpo, y polietilenglicol-PEI (PEG-PEI) derivados de los mismos (véase por ejemplo Ogris *et al.*, 2001, AAPA PharmSci, 3, 1-11; Furgeson *et al.*, 2003, Bioconjugate Chem., 14, 840-847; Kunath *et al.*, 2002, Pharm Res 19:810-17; Choi *et al.*, 2001, Bull. Korean Chem. Soc., 22:46-52; Bettinger *et al.*, 1999, Bioconjugate Chem., 10:558-561; Peterson *et al.*, 2002, Bioconjugate Chem. 13:845-54; Erbacher *et al.*, 1999, J Gene Med 1:1-18; Godbey *et al.*, 1999., PNAS, 96:5177-81; Godbey *et al.*, 1999, J Controlled Release, 60:149-60; Diebold *et al.*, 1999, J Biol Chem, 274:19087-94; Thomas *et al.*, 2002, PNAS, 99, 14640-45; y Sagara, patente estadounidense n.º 6.586.524).

Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir un bioconjugado, por ejemplo un conjugado de ácido nucleico tal como se describe en Vargeese *et al.*, documento estadounidense con n.º de serie 10/427.160; patente estadounidense n.º 6.528.631; patente estadounidense n.º 6.335.434; patente estadounidense n.º 6.235.886; patente estadounidense n.º 6.153.737; patente estadounidense n.º 5.214.136; patente estadounidense n.º 5.138.045.

Las composiciones, métodos y kits divulgados en el presente documento pueden incluir un vector de expresión que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una molécula de ácido nucleico de la descripción de una manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico. Los métodos de introducción de moléculas de ácido nucleico o uno o más vectores capaces de expresar las cadenas de ARNbc en el entorno de la célula dependerán del tipo de célula y la constitución de su entorno. La molécula de ácido nucleico o el constructo de vector puede introducirse directamente en la célula (es decir, de manera intracelular); o introducirse extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducirse por vía oral, o puede introducirse mediante baño de un organismo o una célula en una disolución que contiene ARNbc. La célula es preferiblemente una célula de mamífero; más preferiblemente una célula humana. La molécula de ácido nucleico del vector de expresión puede incluir una región sentido y una región antisentido. La región antisentido puede incluir una secuencia complementaria a una secuencia de ARN o ADN que codifica para hsp47 y la región sentido puede incluir una secuencia complementaria a la región antisentido. La molécula de ácido nucleico puede incluir dos cadenas diferenciadas que tienen regiones sentido y antisentido complementarias. La molécula de ácido nucleico puede incluir una única cadena que tiene regiones sentido y antisentido complementarias.

Pueden expresarse moléculas de ácido nucleico que interactúan con moléculas de ARN diana y regulan por disminución el gen que codifica para moléculas de ARN diana (por ejemplo, moléculas de ARN diana a las que se hace referencia mediante números de registro de Genbank en el presente documento) a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores virales. Pueden construirse vectores virales que expresan moléculas de ácido nucleico basándose en, pero sin limitarse a, virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus o alfavirus. Los vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse tal como se describe en el presente documento, y persistir en células diana. Alternativamente, pueden usarse vectores virales que proporcionan la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Tales vectores pueden administrarse repetidamente según sea necesario. Una vez expresados, las moléculas de ácido nucleico se unen y regulan por disminución la función o expresión génica mediante interferencia de ARN (iARN). La administración de vectores que expresan moléculas de ácido nucleico puede ser sistémica, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células diana explantadas de un sujeto seguido por reintroducción en el sujeto o mediante cualquier otro medio que permita la introducción en la célula diana deseada.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una formulación farmacéutica que comprende uno o más surfactantes fisiológicamente aceptables, portadores farmacéuticos, diluyentes, excipientes y agentes de suspensión, o una combinación de los mismos; y una formulación (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) divulgada en el presente documento. En la técnica farmacéutica se conocen bien diluyentes o portadores farmacéuticos adicionales aceptables para su uso terapéutico, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y similares en la formulación farmacéutica. Por ejemplo, pueden añadirse benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico como conservantes. Además, pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión. En diversas realizaciones, pueden usarse alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y similares como surfactantes; pueden usarse sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, metasilicato-aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrogenofosfato de calcio, carboximetilcelulosa cálcica y similares como excipientes; pueden usarse aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, soja como agentes de suspensión o lubricantes; puede usarse acetato-ftalato de celulosa como derivado de un hidrato de carbono tal como celulosa o azúcar, o copolímero de acetato de metilo-metacrilato como derivado de polivinilo como agentes de suspensión; y pueden usarse plastificantes tales como ésteres ftalatos y similares como agentes de suspensión.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente humano en sí mismas, o en formulaciones farmacéuticas en las que se mezclan con otros principios activos, como en terapia de combinación, o excipiente(s) o portadores farmacéuticos adecuados. Pueden encontrarse técnicas para la

formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, 18ª edición, 1990.

5 Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. La formulación (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) también puede administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, incluyendo inyecciones de depósito, bombas osmóticas y similares, para la administración pulsada, prolongada y/o sincronizada a una tasa predeterminada. Adicionalmente, la vía de administración puede ser local o sistémica.

15 Las formulaciones farmacéuticas pueden fabricarse de una manera que se conoce en sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, pulverización, emulsionamiento, encapsulación, atrapamiento y fabricación de comprimidos.

20 Pueden formularse formulaciones farmacéuticas de cualquier manera convencional usando uno o más portadores farmacéuticos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y componentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos para obtener preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida. Puede usarse cualquiera de las técnicas, portadores farmacéuticos y excipientes bien conocidos según sea adecuado y tal como se entiende en la técnica; por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente.

25 Pueden prepararse productos inyectables en formas convencionales, o bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, sacarosa, glucosa, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, clorhidrato de cisteína y similares. En adición, si se desea, las formulaciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes de tamponamiento del pH y similares. Los tampones fisiológicamente compatibles incluyen, pero no se limitan a, solución de Hanks, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Si se desea, pueden usarse preparaciones de potenciación de la absorción.

35 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua, incluyen disoluciones acuosas de la formulación activa (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones para inyección aceitosas adecuadas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las formulaciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

50 Además de las preparaciones descritas anteriormente, las formulaciones también pueden formularse como preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, las formulaciones (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como sal escasamente soluble.

55 Algunas realizaciones de la divulgación en el presente documento se refieren a un método de administración de un agente terapéutico a una célula. Por ejemplo, algunas realizaciones se refieren a un método de administración de un agente terapéutico tal como ARNip en una célula. Las células adecuadas para su uso según los métodos descritos en el presente documento incluyen procariontas, levaduras o células eucariotas superiores, incluyendo células vegetales y animales (por ejemplo, células de mamífero). En algunas realizaciones, las células pueden ser células de fibrosarcoma humano (por ejemplo, línea celular HT1080). En otras realizaciones, las células pueden ser células cancerosas. Pueden usarse líneas celulares que son sistemas de modelo para cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de mama (líneas celulares MCF-7, MDA-MB-438), línea celular de glioblastoma U87, células B16F0 (melanoma), células HeLa (cáncer de cuello uterino), células A549 (cáncer de pulmón) y líneas celulares de tumor de rata GH3 y 9L. En estas realizaciones, las formulaciones descritas en el presente documento pueden usarse para transfectar una célula. Estas realizaciones pueden incluir poner en contacto la célula con una formulación descrita en el presente documento que incluye un agente terapéutico, para así administrar un agente terapéutico a la célula.

En el presente documento se divulgan métodos para tratar un estado caracterizado por fibrosis anómala, que pueden incluir administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación descrita en el presente documento. Los estados caracterizados por fibrosis anómala pueden incluir cáncer y/o una enfermedad fibrótica. Los tipos de cáncer que pueden tratarse o mejorarse mediante una formulación descrita en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de estómago y cáncer de colon. En una realización, el cáncer que puede tratarse o mejorarse es cáncer de páncreas. En otra realización, el cáncer que puede tratarse o mejorarse es cáncer de pulmón. Los tipos de enfermedad fibrótica que pueden tratarse o mejorarse mediante una formulación descrita en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, fibrosis hepática, cirrosis hepática, pancreatitis, fibrosis pancreática, fibrosis quística, cicatrización de las cuerdas vocales, fibrosis mucosa de las cuerdas vocales, fibrosis laríngea, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal y fibrosis sistémica nefrogénica. En una realización, el estado que puede tratarse o mejorarse es fibrosis hepática.

Las formulaciones o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse al sujeto mediante cualquier medio adecuado. Los ejemplos no limitativos de métodos de administración incluyen, entre otros, (a) administración mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, o similares, incluyendo administración mediante bomba de infusión; (b) administración local tal como mediante inyección directamente en la zona renal o cardíaca, por ejemplo, mediante implantación de depósito; así como según consideren apropiado los expertos en la técnica para poner el compuesto activo en contacto con tejido vivo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración incluyen formulaciones (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr su propósito previsto. La cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos divulgados en el presente documento requerida como dosis dependerá de la vía de administración, el tipo de animal, incluyendo humano, que esté tratándose, y las características físicas del animal específico en consideración. La dosis puede adaptarse para lograr un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicación simultánea y otros factores que reconocerán los expertos en las técnicas médicas. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de composición eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que está tratándose. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz queda dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Tal como resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica, la dosificación *in vivo* útil que va a administrarse y el modo de administración particular variarán dependiendo de la edad, peso y especie de mamífero que esté tratándose, los compuestos particulares empleados y el uso específico para el que se empleen estos compuestos. La determinación de niveles de dosificación eficaces, es decir los niveles de dosificación necesarios para lograr el resultado deseado, puede lograrla un experto en la técnica usando métodos farmacológicos de rutina. Normalmente, las aplicaciones clínicas en humanos de productos se comienzan a niveles de dosificación inferiores, aumentándose el nivel de dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Alternativamente, pueden usarse estudios *in vitro* aceptables para establecer dosis y vías de administración útiles de las composiciones identificadas mediante los presentes métodos usando métodos farmacológicos establecidos.

En estudios con animales no humanos, las aplicaciones de posibles productos comienzan a niveles de dosificación superiores, disminuyéndose la dosificación hasta que ya no se logra el efecto deseado o desaparecen los efectos adversos. La dosificación puede variar de manera amplia, dependiendo de los efectos deseados y la indicación terapéutica. Normalmente, las dosificaciones pueden ser de aproximadamente 10 microgramos/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 100 microgramos/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Alternativamente las dosificaciones pueden basarse y calcularse con respecto al área superficial del paciente, tal como entienden los expertos en la técnica.

La formulación, vía de administración y dosificación exactas para las composiciones farmacéuticas puede elegir las el médico individual en vista del estado del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl *et al.* 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", con referencia particular al capítulo 1, pág. 1). Normalmente, el intervalo de dosis de la composición administrada al paciente puede ser de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosificación puede ser una única o una serie de dos o más administradas a lo largo de uno o más días, según necesite el paciente. En casos en los que se han establecido dosificaciones para humanos para compuestos para al menos algún estado, las dosificaciones serán aproximadamente las mismas, o dosificaciones que son de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 500%, más preferiblemente de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 250% de la dosificación establecida para humanos. Cuando no se ha establecido ninguna dosificación para humanos, tal como será el caso para composiciones farmacéuticas recién descubiertas, puede deducirse una dosificación para humanos adecuada a partir de valores de DE_{50} o DI_{50} , u otros valores apropiados derivados de estudios *in vitro* o *in vivo*, según se indica mediante estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

Debe observarse que el médico encargado sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad o disfunciones de órganos. A la inversa, el médico encargado también sabrá ajustar el tratamiento a niveles superiores si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno de interés variará con la intensidad del estado que va a tratarse y la vía de administración. La intensidad del estado puede evaluarse, por ejemplo, en parte, mediante métodos de evaluación de pronóstico convencionales. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. Puede usarse un programa comparable al comentado anteriormente en medicina veterinaria.

Aunque la dosificación exacta se determinará para cada fármaco, en la mayoría de los casos pueden hacerse algunas generalizaciones referentes a la dosificación. El régimen de dosificación diaria para un paciente humano adulto puede ser, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 0,1 mg a 2000 mg de cada principio activo, preferiblemente de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, por ejemplo de 5 a 200 mg. En otras realizaciones, se usa una dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular de cada principio activo de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg. En casos de administración de una sal farmacéuticamente aceptable, pueden calcularse dosificaciones basándose en la base libre. En algunas realizaciones, la formulación se administra de 1 a 4 veces al día. Alternativamente las formulaciones pueden administrarse mediante infusión intravenosa continua, preferiblemente a una dosis de cada principio activo de hasta aproximadamente 1000 mg al día. Tal como entenderán los expertos en la técnica, en determinadas situaciones puede ser necesario administrar las formulaciones divulgadas en el presente documento en cantidades que superan, o incluso superan mucho, el intervalo de dosificación preferido mencionado anteriormente con el fin de tratar de manera eficaz o agresiva enfermedades o infecciones particularmente agresivas. En algunas realizaciones, las formulaciones se administrarán durante un periodo de terapia continua, por ejemplo durante una semana o más, o durante meses o años.

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma del resto activo que son suficientes para mantener los efectos moduladores o una concentración eficaz mínima (MEC). La MEC variará para cada compuesto pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de características individuales y la vía de administración. Sin embargo, pueden usarse ensayos o bioensayos de HPLC para determinar las concentraciones en plasma.

También pueden determinarse intervalos de dosificación usando el valor de MEC. Las composiciones deben administrarse usando un régimen que mantenga los niveles en plasma por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre el 30-90% y lo más preferiblemente entre el 50-90%.

En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

La cantidad de formulación administrada puede depender del sujeto que esté tratándose, del peso del sujeto, la intensidad de la afección, la manera de administración y el criterio del médico encargado.

Las formulaciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) pueden evaluarse para determinar la eficacia y toxicidad usando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular, o de un subconjunto de los compuestos que comparten determinados restos químicos, puede establecerse determinando la toxicidad *in vitro* hacia una línea celular, tal como una línea celular de mamífero, y preferiblemente de humano. Los resultados de tales estudios predicen con frecuencia la toxicidad en animales, tales como mamíferos, o más específicamente, humanos. Alternativamente, la toxicidad de compuestos particulares en un modelo de animal, tal como ratones, ratas, conejos o monos, puede determinarse usando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede establecerse usando varios métodos reconocidos, tales como métodos *in vitro*, modelos de animales o ensayos clínicos con humanos. Existen modelos *in vitro* reconocidos para casi cada clase de estado, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer, enfermedad cardiovascular y diversas disfunciones inmunitarias. De manera similar, pueden usarse modelos de animales aceptables para establecer la eficacia de productos químicos para tratar tales estados. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, el experto en la técnica puede verse guiado por el estado de la técnica para elegir un modelo, dosis y vía de administración y régimen apropiados. Evidentemente, también pueden usarse ensayos clínicos con humanos para determinar la eficacia de un compuesto en humanos.

Si se desea, las formulaciones pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El envase puede comprender por ejemplo lámina de metal o de plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado por un aviso asociado con el recipiente en forma recomendada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la comercialización de productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma del fármaco para su administración a humanos o veterinaria. Tal aviso puede ser, por ejemplo,

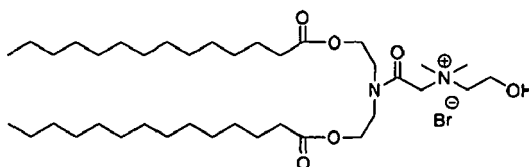
el etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para la receta de fármacos, o el prospecto de producto aprobado. También pueden prepararse composiciones que comprenden un compuesto formulado en un portador farmacéutico compatible, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de un estado indicado.

5 Se entiende que, en cualquier compuesto descrito en el presente documento que tiene uno o más estereocentros, si no se indica expresamente una estereoquímica absoluta, entonces cada centro puede ser independientemente de configuración R o configuración S o una mezcla de las mismas. Por tanto, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden ser enantioméricamente puros o pueden ser mezclas estereoisoméricas. Además se
10 entiende que, en cualquier compuesto que tiene uno o más dobles enlaces que generan isómeros geométricos que pueden definirse como E o Z, cada doble enlace puede ser independientemente E o Z o una mezcla de los mismos. Asimismo, también se pretende incluir todas las formas tautoméricas.

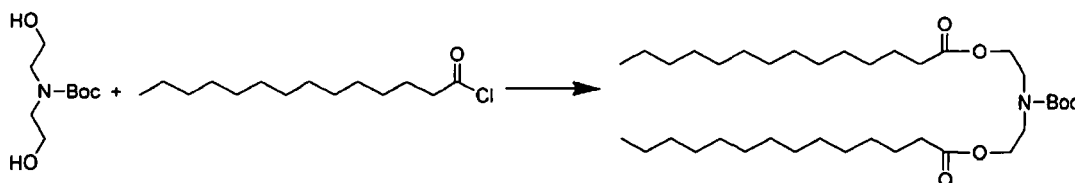
15 La invención puede mostrarse adicionalmente a modo de ejemplo mediante referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Preparación de bromuro de 2-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio (HEDC)

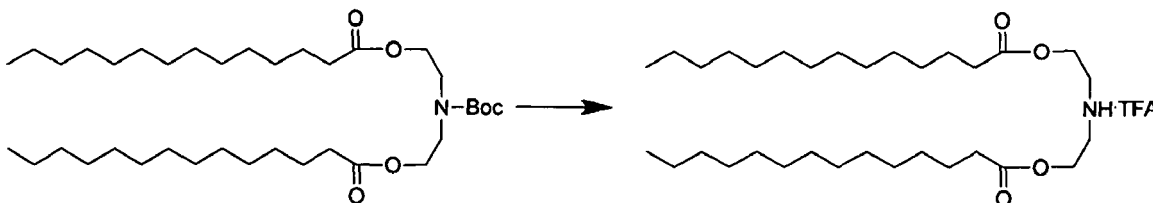


25 Preparación del producto intermedio 1: ditetradecanoato de 2,2'-(terc-butoxicarbonilazanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (HEDC-BOC-IN)



30 Se enfrió una disolución de *N*-BOC-dietanolamina (194 g, 0,946 mol), trietilamina (201 g, 2,03 mol) y diaminopiridina (23,1 g, 0,19 mol) en DCM (1750 ml) hasta 0°C. Se añadió una disolución de cloruro de miristoilo (491 g, 1,99 mol) en DCM (440 ml) a lo largo de un periodo de 50 minutos a 0-10°C, y se dejó calentar la mezcla hasta temperatura ambiental. Se indicó una conversión completa mediante CCF tras 1,5 horas a 20-24°C. Se añadió agua (1750 ml) y se midió el pH 8,3 mediante un pH-metro. Se separó la fase orgánica, se lavó con (1) NaHCO₃ al 6% (500 ml), (2)
35 HCl 0,3 M (1700 ml), (3) cloruro de sodio al 12,5% (1700 ml), y se secó con sulfato de magnesio anhidro (120 g). La evaporación del filtrado a 50°C y 50 mbar dio 622 g de ditetradecanoato de 2,2'-(terc-butoxicarbonilazanodiil)bis(etano-2,1-diilo), (HEDC-BOC-IN). Se usó este residuo de destilación, que solidificó al reposar, en la siguiente etapa.

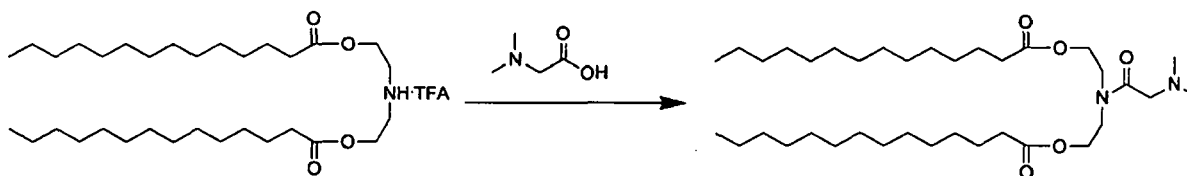
40 Preparación del producto intermedio 2: sal de TFA de ditetradecanoato de 2,2'-(terc-butoxicarbonilazanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (HEDC-amina-IN)



45 Se transformó HEDC-BOC-IN (620 g, 0,990 mol) en un líquido calentándolo brevemente en un baño a 50°C y después se enfrió por debajo de 25°C. Se añadió TFA (940 ml, 1,39 kg, 1,18 mol) al líquido a lo largo de un periodo de 30 minutos, usando enfriamiento moderado con el fin de mantener una temperatura no superior a 25°C. Habiendo añadido dos tercios de la cantidad de TFA, se observó desprendimiento de gas significativo. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiental. CCF indicó trazas de HEDC-BOC-IN. Se calentó la mezcla de reacción para la destilación de TFA a presión reducida (125-60 mbar) a partir de baño de agua a 50-55°C, y se

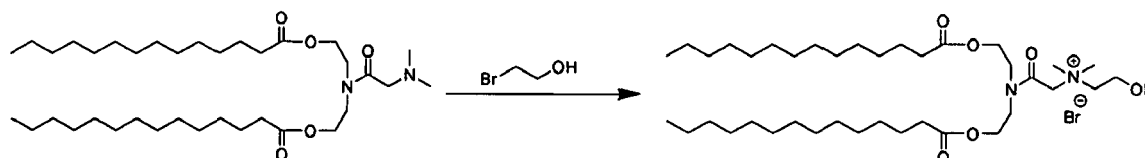
continuó la destilación hasta que se volvió muy lenta. Se absorbieron los vapores de TFA en un lavador químico con hidróxido de sodio al 10%. Se añadió heptano (2000 ml), se agitó y se eliminó por destilación a presión reducida. Se añadió heptano (2000 ml) al residuo parcialmente solidificado y se calentó la mezcla hasta 45°C, temperatura a la cual se formó una disolución ligeramente turbia. Se enfrió la disolución, se sembró a 40°C y se formó un precipitado mediante agitación durante un periodo de 25 minutos a 40-36°C. Habiendo enfriado y agitado durante un periodo de 40 minutos a temperatura ambiental, se aisló mediante filtración el precipitado de cristales pesados y se lavó la torta de filtro con heptano (1000 ml). Se secó la torta de filtro húmeda (914 g) durante la noche a temperatura ambiental a presión reducida (<1 mbar) para dar 635 g (100%) de sal de TFA de ditetradecanoato de 2,2'-(terc-butoxicarbonilazanodii)bis(etano-2,1-diilo) (HEDC-amina-IN) como cristales blancos.

Preparación del producto intermedio 3: ditetradecanoato de 2,2'-(2-(dimetilamino)acetilazanodii)bis(etano-2,1-diilo) (HEDC-DiMeGly-IN)



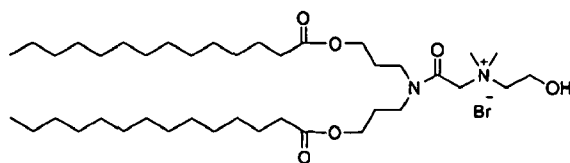
Se añadieron N,N-dimetilglicina (56,6 g, 548 mmol), hidrato de HOBt (83,9 g, 548 mmol) y clorhidrato de EDC (105 g, 548 mmol) a DMF (3,5 l), y se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante un periodo de una hora. Se formó una disolución transparente. Se mezcló sal de TFA de HEDC-amina-IN (270 g, 442 mmol) con DCM (1,15 l) y bicarbonato de sodio al 6% (1,15 l). Se añadió la fase orgánica separada con la amina libre a la mezcla de acoplamiento en DMF, y se observó una precipitación así como un aumento de temperatura de aproximadamente 9°C. Se añadió trietilamina (47,0 g, 464 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a 25-30°C durante un periodo de cinco horas. CCF indicó conversión incompleta y se añadió clorhidrato de EDC adicional (29,5 g, 154 mmol). Habiendo agitado durante la noche a temperatura ambiental, se observó una disolución transparente, y CCF ahora indicó conversión completa. Se mezcló la mezcla de reacción con DCM (2,3 l) y bicarbonato de sodio al 2% (7 l). Se lavó la fase orgánica dos veces con cloruro de sodio al 1,25% (5 l cada vez) y se secó con sulfato de magnesio anhidro (186 g). Se evaporó el filtrado a 50°C y 30 mbar para dar 253 g de aceite en bruto. Se cargó el material en bruto en una columna empaquetada con 2,6 kg de gel de sílice 60 (40-63 μ). Se eluyó el producto con tolueno:acetato de etilo (8:2) (4 l), y seguido por acetato de etilo:metanol (1:1) (5 l). Se evaporó las fracciones que contenían producto (3,5-8 l) (50°C/250-20 mbar) para dar 208 g (66%) de ditetradecanoato de 2,2'-(2-(dimetilamino)acetilazanodii)bis(etano-2,1-diilo) (HEDC-DiMeGly-IN) como un aceite.

Preparación de HEDC: bromuro de 2-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxetanaminio



Se agitó una mezcla de HEDC-DiMeGly-IN (206 g, 337 mmol) y 2-bromoetanol (274 g, 2,19 mol) a 80°C durante un periodo de dos horas. HPLC indicó el 8,1% de producto intermedio de dimetilglicina sin reaccionar. Tras un periodo adicional de 40 minutos a 80°C, HPLC indicó el 7,8% de producto intermedio de dimetilglicina sin reaccionar. Se añadió acetato de etilo (2 l) caliente (65°C). Se lavó una filtración de blanco de la disolución caliente con acetato de etilo caliente (0,5 l). Se enfriaron los filtrados combinados hasta 0°C y se inició la cristalización mediante siembra. Se enfrió lentamente la suspensión de producto y se agitó a de -16 a -18°C durante un periodo de 40 minutos. Se aisló el precipitado mediante filtración, y se lavó la torta de filtro con acetato de etilo frío (200 ml). El secado durante la noche (20°C/<1 mbar) dio 211 g de material en bruto. Después se recrystalizó el material a partir de una mezcla de acetato de etilo (2,1 l) y etanol (105 ml) calentando hasta 35°C y sembrando a 25°C. Se aisló el precipitado a 10°C, se lavó con acetato de etilo frío (300 ml) y se secó (20°C/<1 mbar) durante la noche para dar 161 g (66%) de bromuro de 2-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio (HEDC). HPLC indicó una pureza del 99,5%. QTOF EM ESI+: m/z 655,6 (M + H).

Ejemplo 2: Preparación de bromuro de 2-(bis(3-(tetradecanoiloxi)propil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio (Pr-HEDC)



Preparación del producto intermedio 1: 3,3'-azanodiilbis(propan-1-ol)



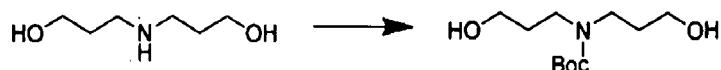
5

Se sometió a reflujo una mezcla de 3-amino-1-propanol (14,5 ml, 19,0 mmol), 1-cloro-3-hidroxipropano (8 ml, 95,6 mmol) y H₂O (~50 ml) a lo largo de 24 horas. Después se añadió hidróxido de potasio (5,40 g). Tras la disolución, se evaporó la totalidad del H₂O para dejar un aceite viscoso y grandes cantidades de cloruro de potasio. Se filtraron y se lavaron con acetona seca y diclorometano. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. Después se purificó el producto mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH para producir 12,5 g de 3,3'-azanodiilbis(propan-1-ol).

10

Preparación del producto intermedio 2: bis(3-hidroxipropil)carbamato de terc-butilo

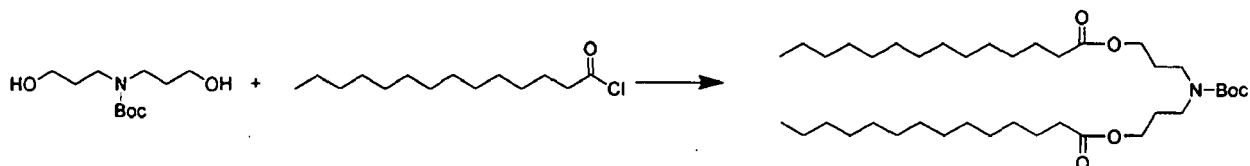
15



Se diluyó 3,3'-azanodiilbis(propan-1-ol) (12,5 g, 95,4 mmol) en DCM (25 ml). Se añadió lentamente una disolución de dicarbonato de di-terc-butilo (26 g, 119,25 mmol) en DCM (25 ml) mientras se agitaba bajo una capa de gas Ar. Se dejó agitar la reacción durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/Me-OH produjo bis(3-hidroxipropil)carbamato de terc-butilo.

20

Preparación del producto intermedio 3: ditetradecanoato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo)



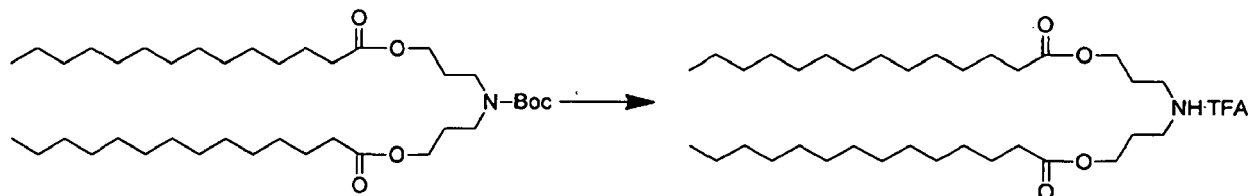
25

Se disolvieron bis(3-hidroxipropil)carbamato de terc-butilo (4,00 g, 17,3 mmol), trietilamina (4,80 ml, 34,6 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (529 mg, 4,33 mmol) en cloroformo (50 ml). Mientras se agitaba en un baño de hielo, se añadió la disolución de cloruro de miristoilo en ~15 min. Se llevó a cabo la adición de tal manera que la temperatura de la reacción no superó 30°C. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añadieron MeOH (50 ml) y solución salina al 0,9% (50 ml) para extinguir la reacción. Se separó la fase orgánica y se lavó con NaHCO₃ 1 M. Se secó el disolvente con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío para producir ditetradecanoato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) como un aceite.

30

Preparación del producto intermedio 4: sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(propano-3,1-diilo)

35

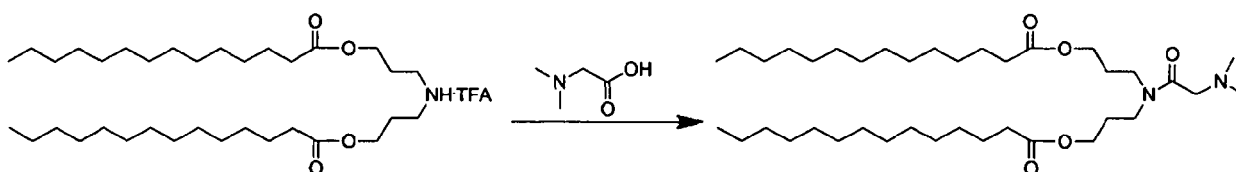


Se disolvió ditetradecanoato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) (11,3 g, 17,3 mmol) en TFA/CHCl₃ (1:1, 20 ml) y se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se concentró la mezcla a vacío. Esto se repitió una segunda vez. Después se disolvió el residuo en DCM y se lavó con H₂O, se secó con Na₂SO₄ y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo ditetradecanoato de azanodiilbis(propano-3,1-diilo) como sal de TFA (750 mg).

40

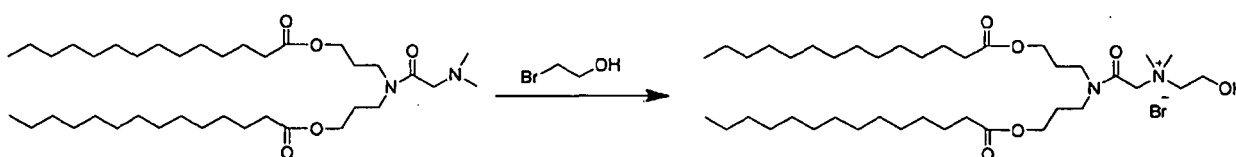
Preparación del producto intermedio 5: ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo)

45



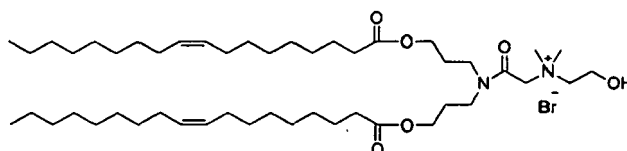
Se diluyó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(propano-3,1-diilo) (750 mg, 1,35 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla previamente activada de N,N-dimetilglicina (154 mg, 1,49 mmol), HATU (616 mg, 1,62 mmol) y DIEA (495 μ l, 2,84 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el producto con argón y se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y después se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo 465 mg ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino) acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo).

10 Preparación de Pr-HEDC: bromuro de 2-(bis(3-(tetradecanoiloxi)propil)amino)-N-(2-hidroxi-etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio

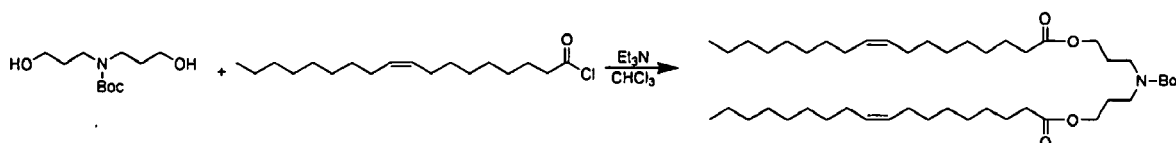


15 En un sistema sellado, se disolvió ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) (246 mg, 0,385 mmol) en ACN (10 ml), y se añadió 2-bromoetanol (500 μ l). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la mezcla hasta 80°C, se agitó durante la noche, y después se enfrió y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo 99 mg de bromuro de 2-(bis(3-(tetradecanoiloxi)propil)amino)-N-(2-hidroxi-etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio. QTOF EM ESI+: m/z 683,6 (M + H).

Ejemplo 3: Preparación de bromuro de 2-(bis(3-(oleoiloxi)propil)amino)-N-(2-hidroxi-etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio (Pr-HE-DODC)

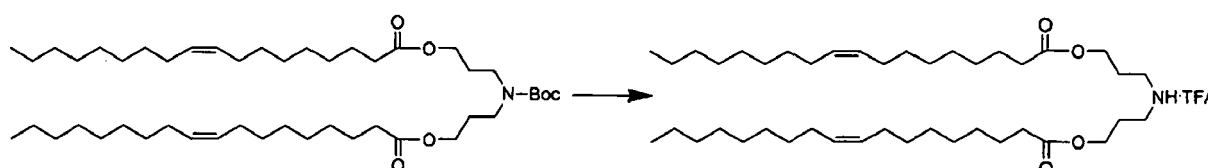


Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo)



Se disolvieron bis(3-hidroxi)propil)carbamato de terc-butilo (síntesis descrita anteriormente), trietilamina y DMAP en cloroformo. Mientras se agitaba en un baño de hielo, se añadió una disolución de cloruro de oleilo en 15 min. Se llevó a cabo la adición de tal manera que la temperatura de la reacción no superó 30°C. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añadieron MeOH (50 ml) y solución salina al 0,9% (50 ml) para extinguir la reacción. Se separó la fase orgánica y se lavó con NaHCO₃ 1 M. Se secó el disolvente con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para producir un aceite. Se continuó con el dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) sin purificación adicional.

Preparación del producto intermedio 2: sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(propano-3,1-diilo)

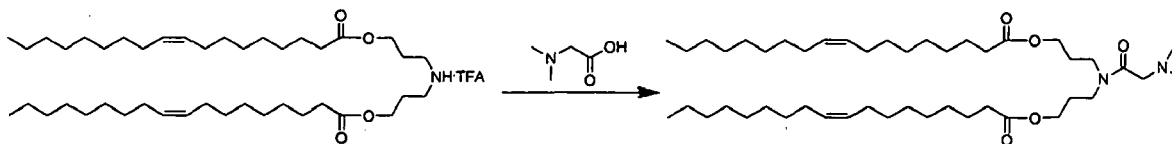


Se disolvió dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) (13,2 g, 17,3 mmol) en TFA/CHCl₃

(1:1, 20 ml) y se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min. Después se concentró la mezcla a vacío. Esto se repitió una segunda vez. Después se disolvió el residuo en DCM y se lavó con H₂O, se secó con Na₂SO₄ y se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(propano-3,1-diilo) (750 mg).

5

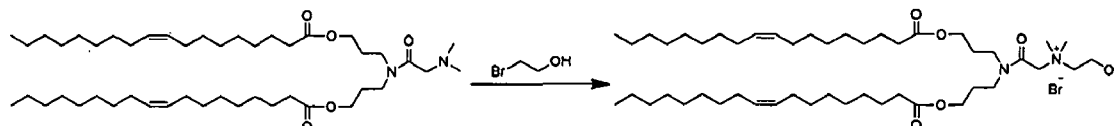
Preparación del producto intermedio 3: dioleato de (Z)-((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo)



10 Se diluyó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(propano-3,1-diilo) (750 mg, 1,13 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla previamente activada de N,N-dimetilglicina (128 mg, 1,24 mmol), HATU (517 mg, 1,36 mmol) y DIEA (413 μ l, 2,37 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el matraz con argón y se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción, y se sometió a cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH para producir dioleato de (Z)-((2-(dimetilamino) acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo).

15

Preparación de Pr-HE-DODC: bromuro de 2-(bis(3-(oleoiloxi)propil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio



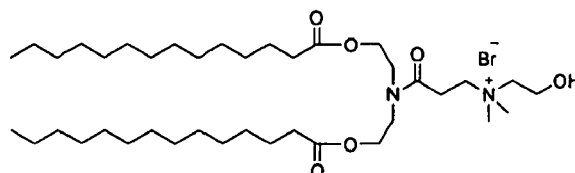
20

En un sistema sellado, se disolvió dioleato de (Z)-((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil) (269 mg, 0,360 mmol) en ACN (10 ml) y se añadió 2-bromoetanol (200 μ l). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 80°C y se dejó agitar durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción y se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro 2-(bis(3-(oleoiloxi)propil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio (129 mg). QTOF EM ESI+: m/z 791,7 (M + H).

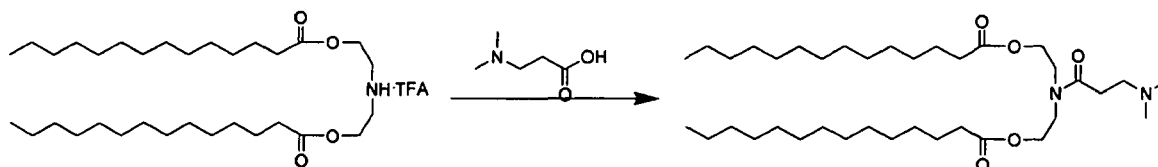
25

Ejemplo 4: Preparación de bromuro de 3-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-3-oxopropan-1-aminio (HE-Et-DC)

30



Preparación del producto intermedio 1: ditetradecanoato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

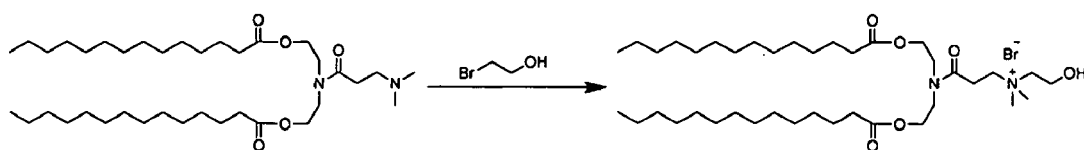


35

La síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) se describió anteriormente. Se diluyó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (1,5 g, 2,85 mmol) con DCM (10 ml) y se añadió a una mezcla previamente activada de sal de HCl de ácido 3-(dimetilamino)propiónico (482 mg, 3,14 mmol), HATU (1,30 g, 3,42 mmol) y DIEA (1,04 ml, 5,98 mmol) en DCM (10 ml). Se purgó el matraz de fondo redondo con argón y se dejó agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo ditetradecanoato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo).

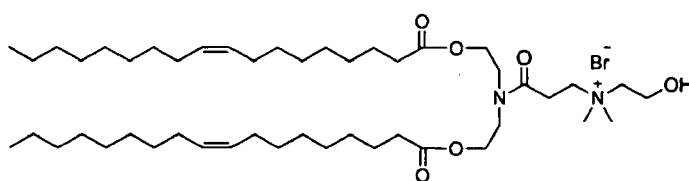
40

45 Preparación de HE-Et-DC: bromuro de 3-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-3-oxopropan-1-aminio

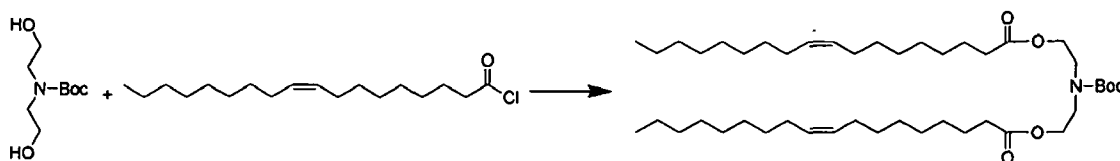


5 En un sistema sellado, se disolvió ditetradecanoato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (606 mg, 0,970 mmol) en ACN (10 ml) y se añadió 2-bromoetanol (500 ul). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 80°C y se agitó durante la noche, después se enfrió y se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 3-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-3-oxopropan-1-aminio (80 mg). QTOF EM ESI+: m/z 669,6 (M + H).

10 Ejemplo 5: Preparación de bromuro de 3-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-3-oxopropan-1-aminio (HE-Et-DODC)

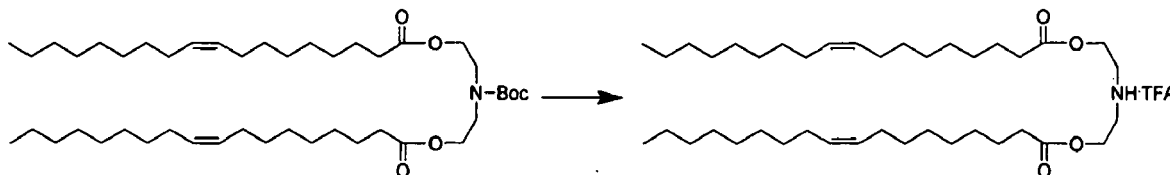


15 Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



20 Se disolvieron *N*-Boc-dietanolamina (Aldrich 15268, n.º de lote 0001406013, PM 205,25; 17,81 g, 0,087 mol), trietilamina (Aldrich, PM 101,19; 24,4 ml, 0,176 mol) y 4-(dimetilamino)piridina (Aldrich, PM 122,17; 2,76 g, 1,3 g, 0,023 mol) en 350 ml de cloroformo. Mientras se agitaba, se añadió una disolución de cloruro de oleoílo (PM 300,91; 61,6 g, 0,174 mol) en 100 ml de cloroformo en 10 min (alternativamente, se sumergió la disolución en cloroformo de *N*-Boc-dietanolamina en un baño de hielo/agua mientras se añadía cloruro de oleoílo). Se llevó a cabo la adición de tal manera que la temperatura de la mezcla de reacción no superó 50°C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió una mezcla de 200 ml de metanol (EMD MX0485-5, lote 50350) y 200 ml de solución salina al 0,9% (cloruro de sodio, BDH, BDH8014, n.º de lote 92717) para extinguir la reacción. Se separó la fase orgánica y se lavó con 2 x 100 ml de bicarbonato de sodio acuoso diluido (Aldrich S6014, n.º de lote 095K0143). Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria para proporcionar 59,5 g de producto en bruto como un aceite de color amarillo pálido (PM 734,14; 59,5 g, 0,081 mol, rendimiento del 100%). Se usó este material para la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) 0,87 (t, 6H, CH₃), 1,20-1,40 (m, 40H, CH₂), 1,45 (s, 9H, tBu CH₃), 1,59 (m, 4H, CH₂CH₂C(=O)), 2,00 (m, 8H, CH₂CH=CH), 2,33 (t, 4H, CH₂C(=O)), 3,48 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 4,18 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 5,33 (m, 4H, CH=CH).

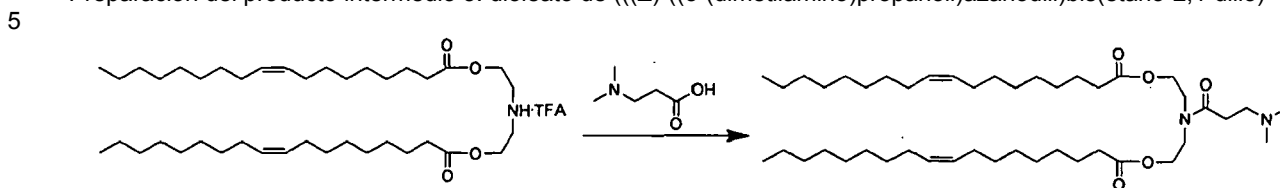
35 Preparación del producto intermedio 2: sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo)



40 Se trató el dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (59,5 g, 0,081 mol) dos veces con 100 ml de ácido trifluoroacético (Alfa Aesar, n.º de mezcla madre A12198, n.º de lote D07W005, PM 114,02; 100 ml, 1,35 mol) y 100 ml de cloroformo (Aldrich 154733, n.º de lote KBF5943V). Cada vez consistió en agitar a temperatura ambiente durante diez minutos, y se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria al final de cada tratamiento. Tras el segundo tratamiento, se concentró la mezcla de reacción mediante evaporación rotatoria. Se disolvió el residuo en 200 ml de cloruro de metileno y se lavó la mezcla con 100 ml de agua dos veces. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice usando una mezcla de metanol (EMD MX0485-5, lote 50350) y cloruro de metileno (EMD DX0835-5, lote 51090) como eluyente para producir 44 g de sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (44,0 g). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) 0,87 (t, 6H, CH₃), 1,20-1,40 (m, 40H,

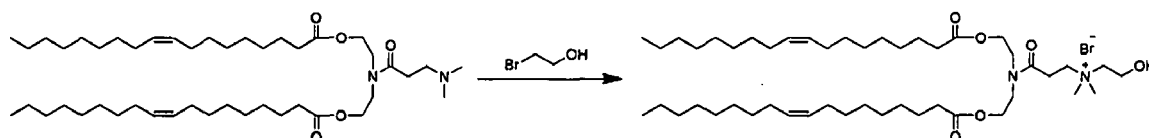
CH₂), 1,59 (m, 4H, CH₂CH₂C(=O)), 2,00 (m, 8H, CH₂CH=CH), 2,33 (t, 4H, CH₂C(=O)), 3,31 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 4,38 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 5,33 (m, 4H, CH=CH).

Preparación del producto intermedio 3: dioleato de (((Z)-((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



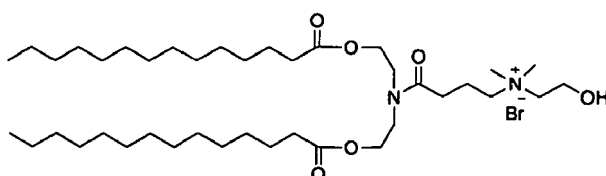
10 Se diluyó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (1,50 g, 2,37 mmol) con DCM (10 ml) y se añadió a una mezcla previamente activada de sal de HCl de ácido 3-(dimetilamino)propiónico (383 mg, 2,49 mmol), HATU (1034 mg, 2,72 mmol) y DIEA (831 ul, 4,77 mmol) en DCM (10 ml). Se purgó el matraz de fondo redondo con argón y se dejó agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo dioleato de (Z)-((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo).

15 Preparación de HE-Et-DODC: bromuro de 3-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-3-oxo-propan-1-aminio

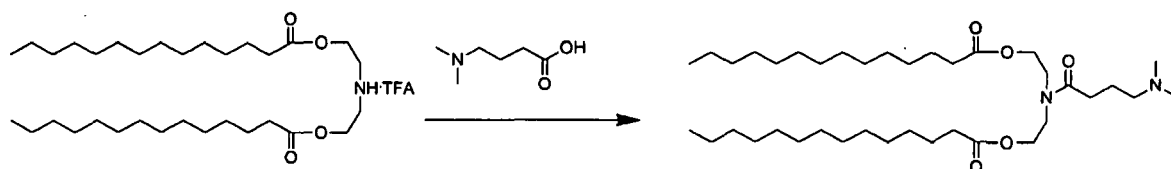


20 En un sistema sellado, se disolvió dioleato de (((Z)-((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (588 mg, 0,802 mmol) en ACN (10 ml) y se añadió 2-bromoetanol (200 ul). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 80°C y se agitó durante la noche, después se enfrió y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 3-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-3-oxopropan-1-aminio (160 mg). QTOF EM ESI+: m/z 764,3 (M + H).

Ejemplo 6: Preparación de bromuro de 4-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-4-oxobutan-1-aminio (HE-Pr-DC)

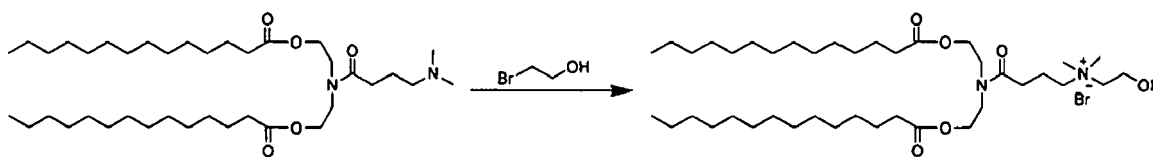


Preparación del producto intermedio 1: ditetradecanoato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



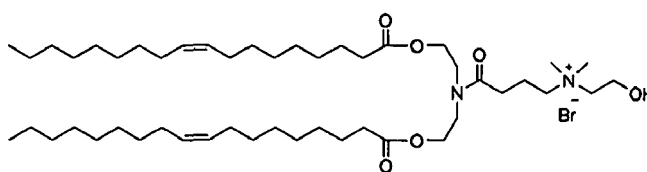
35 La síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) se describió anteriormente. Se diluyó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (1,00 g, 1,90 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla previamente activada de sal de HCl de ácido 4-(dimetilamino)butírico (382 mg, 2,28 mmol), HATU (867 mg, 2,28 mmol) y DIEA (728 ul, 4,18 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el matraz con argón y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche, después se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo ditetradecanoato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo).

45 Preparación de HE-Pr-DC: bromuro de 4-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-4-oxobutan-1-aminio

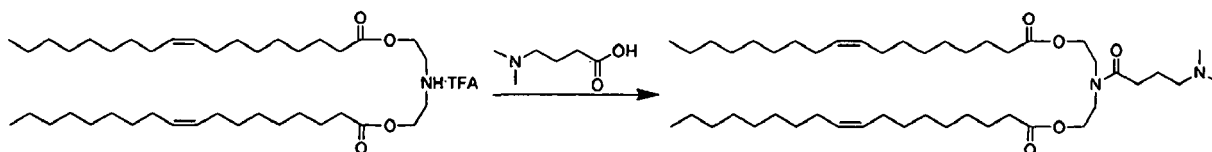


5 En un sistema sellado, se disolvió ditetradecanoato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (300 mg, 0,469 mmol) en ACN (5 ml) y se añadió 2-bromoetanol (500 ul). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 80°C y se agitó durante la noche, después se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 4-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-4-oxobutan-1-aminio (140 mg). CL-EM ESI+: m/z 684,4 (M + H).

10 Ejemplo 7: Preparación de bromuro de 4-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-4-oxobutan-1-aminio (HE-Pr-DODC)

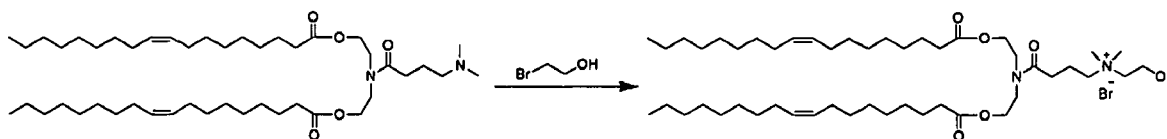


15 Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



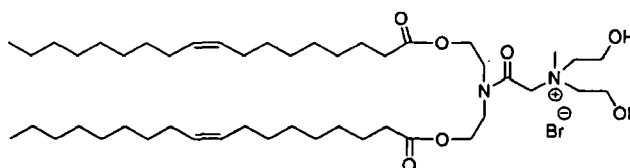
20 La síntesis de sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) se describió anteriormente. Se diluyó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (1,00 g, 1,58 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla previamente activada de sal de HCl de ácido 4-(dimetilamino)butírico (317 mg, 1,89 mmol), HATU (719 mg, 1,89 mmol) y DIEA (606 ul, 3,48 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el matraz con argón y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche, después se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo dioleato de (Z)-((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo).

Preparación de HE-Pr-DODC: bromuro de 4-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-4-oxobutan-1-aminio

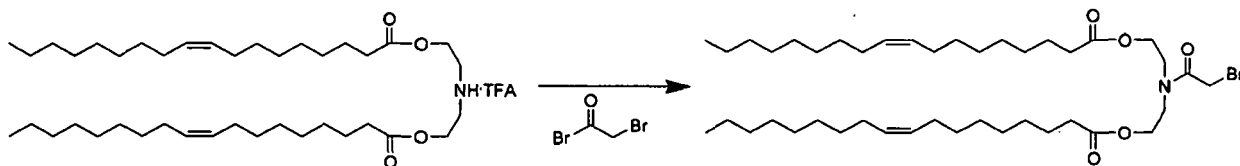


30 En un sistema sellado, se disolvió ditetradecanoato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (400 mg, 0,535 mmol) en ACN (5 ml) y se añadió 2-bromoetanol (500 ul). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 80°C y se agitó durante la noche, después se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 4-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-4-oxobutan-1-aminio (255 mg). CL-EM ESI+: m/z 792,5 (M + H).

40 Ejemplo 8: Preparación de bromuro de 2-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N,N-bis(2-hidroxi)etil)-N-metil-2-oxoetanaminio (HE2DODC)

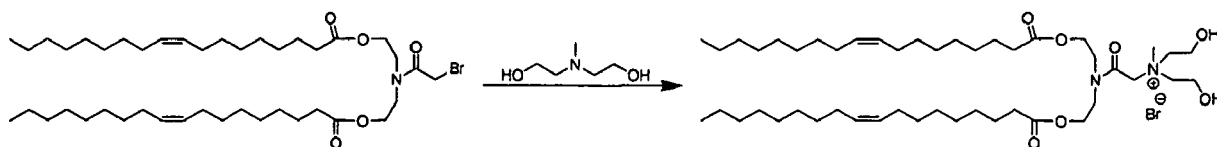


Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-((2-bromoacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



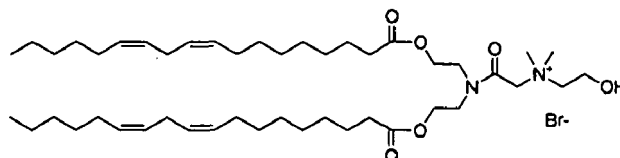
5 La síntesis de sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) se describió anteriormente. Se disolvió sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (1,50 g, 2,34 mmol) en DCM (20 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se añadió bromuro de bromoacetilo (214 μ l, 2,46 mmol) seguido por trietilamina (685 μ l, 4,91 mmol). Se retiró el baño de hielo y se dejó agitar la reacción durante la noche a temperatura ambiente bajo gas inerte, después se diluyó con DCM hasta 100 ml, y se lavó con HCl 1 M (75 ml), H₂O (75 ml), disolución saturada de NaHCO₃ (75 ml) y disolución saturada de salmuera (75 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a retroextracción con DCM (25 ml). Se secaron las fases orgánicas con MgSO₄, se filtraron y se concentraron a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con acetato de etilo produjo dioleato de (Z)-((2-bromoacetyl)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,22 g).

15 Preparación de HE2DODC: bromuro de 2-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N,N-bis(2-hidroxi)etil)-N-metil-2-oxoetanaminio



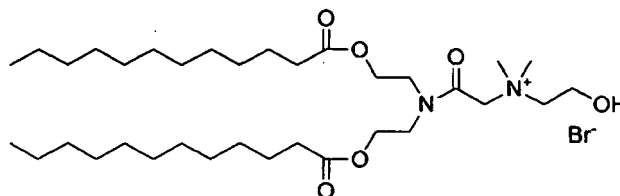
20 En un sistema sellado, se combinó dioleato de (Z)-((2-bromoacetyl)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (2,08 g, 2,75 mmol) con N-metildietilamina (1,58 ml, 13,8 mmol). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 50°C y se agitó durante la noche, y después se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 2-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-N,N-bis(2-hidroxi)etil)-N-metil-2-oxoetanaminio (479 mg). CL-EM ESI+: m/z 793,7 (M + H).

25 Ejemplo 9: Preparación de bromuro de 2-(bis(2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio (HEDC-DLin)



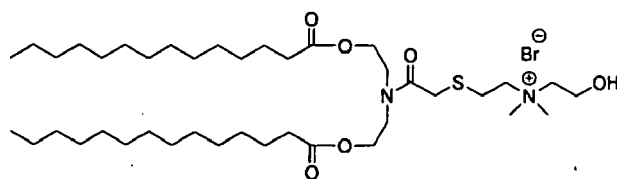
30 Se preparó bromuro de 2-(bis(2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio de una manera similar a HEDC con la sustitución de cloruro de miristoilo por cloruro de (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoilo.

35 Ejemplo 10: Preparación de bromuro de 2-(bis(2-(dodecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio (HEDC-12) (ejemplo comparativo)



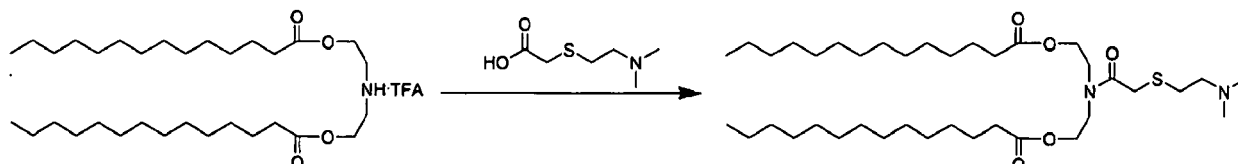
40 Se preparó bromuro de 2-(bis(2-(dodecanoiloxi)etil)amino)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetil-2-oxoetanaminio de una manera similar a HEDC con la sustitución de cloruro de miristoilo por cloruro de dodecanoilo.

Ejemplo 11: Preparación de bromuro de 2-((2-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-2-oxoetil)tio)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetiletanaminio (HES104)



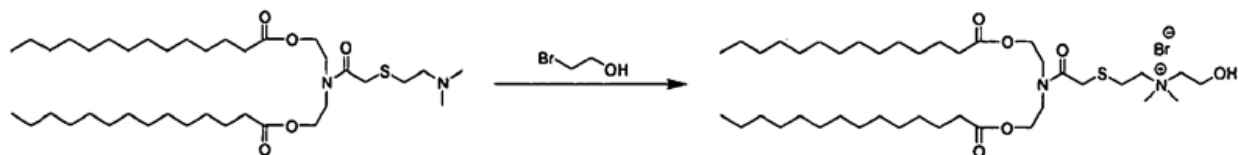
Preparación del producto intermedio 1: ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (S104).

5



La síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) se describió anteriormente. Se agitó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (152 g, 238 mmol) con DCM (2,3 l) y bicarbonato de potasio al 10% (1,15 l) a 0-5°C. Se separó la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (1,15 l). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con sulfato de magnesio hidratado (236 g) durante un periodo de 30 minutos a 0-5°C, se filtraron y se lavaron con DCM (1,15 l). A los filtrados combinados se les añadió clorhidrato de ácido 2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acético (57,0 g, 285 mmol), clorhidrato de EDC (68,4 g, 357 mmol) y DMAP (2,91 g, 23,8 mmol), y se agitó la suspensión durante la noche a temperatura ambiental, periodo de tiempo tras el cual se formó una disolución transparente. Se añadieron agua MQ (2,3 l) y metanol (460 ml) y tras haberse agitado durante un periodo de 10 minutos se separó la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia (pH 3,0) con DCM (575 ml). Se concentraron los extractos orgánicos combinados produciendo 143 g de material en bruto como la sal de clorhidrato. Se transfirió el material en bruto (142,6 g) a un matraz de destilación con DCM (500 ml), y se añadió acetato de etilo (1 l). Se calentó la disolución hasta la destilación a presión atmosférica, y se continuó la destilación a lo largo de un periodo de 70 minutos con el fin de obtener una temperatura del residuo de 76°C. Se obtuvo un volumen total de 1,4 l mediante adición de acetato de etilo (800 ml), y se añadió etanol (70 ml). Se enfrió hasta 37°C la disolución transparente a 50°C y se añadieron cristales de siembra. Habiendo observado el inicio de una cristalización significativa a lo largo de un periodo de 10 minutos a 37-35°C, se enfrió la suspensión y se agitó a 0°C durante la noche y se aisló el precipitado mediante filtración, y se lavó con acetato de etilo frío (210 ml). Secar hasta obtener un peso constante a temperatura ambiental a vacío con bomba de aceite a lo largo de un periodo de 4,5 horas dio 134 g de material recristalizado como la sal de clorhidrato, sólido cristalino blanco. Se añadieron fosfato de tripotasio (85 g, 0,40 mol) e hidrogenofosfato de dipotasio (226 g, 1,30 mol) a agua purificada (1,7 l), y se enfrió la disolución formada con pH 10,9 hasta 18-20°C. Se añadieron DCM (1,3 l) y clorhidrato de S104 recristalizado (133 g, 0,188 mol), y se agitó la mezcla durante un periodo de 10 min. Se separó una fase orgánica transparente a una velocidad moderada (a lo largo de un periodo de 35 minutos) y se extrajo adicionalmente la fase acuosa turbia con DCM (650 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con sulfato de magnesio anhidro (65 g) durante un periodo de 40 min, y se filtró la mezcla, lavando con DCM (200 ml). Se evaporaron los filtrados combinados a partir de un baño de agua a 50°C a presión reducida (hasta 20 mbar, presión a la cual se continuó la evaporación durante una hora). La evaporación adicional a partir de un baño de agua a 15-20°C a vacío de bomba de aceite dio como resultado 126 g de aceite parcialmente solidificado. Enfriar en un baño de enfriamiento a -20°C dio la solidificación completa, y tras secar a -20°C a vacío de bomba de aceite, se obtuvieron 126 g de ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (S104). HPLC indicó una pureza del 98,1%.

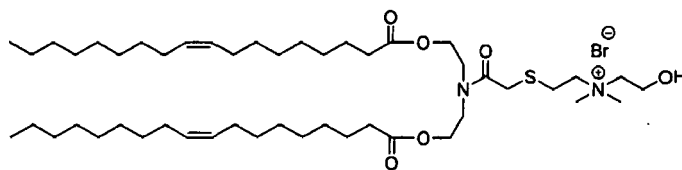
Preparación de HES104: bromuro de 2-((2-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-2-oxoetil)tio)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetiletanaminio



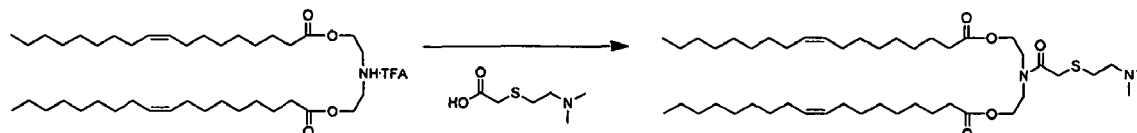
En un sistema sellado, se combinó ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,00 g, 1,49 mmol) con 2-bromoetanol (687 ul, 9,69 mmol). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 75°C y se dejó agitar durante la noche, después se enfrió, y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 2-((2-(bis(2-(tetradecanoiloxi)etil)amino)-2-oxoetil)tio)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetiletanaminio (HES104) (790 mg). CL-EM ESI+: m/z 715,7 (M + H).

50

Ejemplo 12: Preparación de bromuro de 2-((2-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-2-oxoetil)tio)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetiletanaminio (HES104-DO)

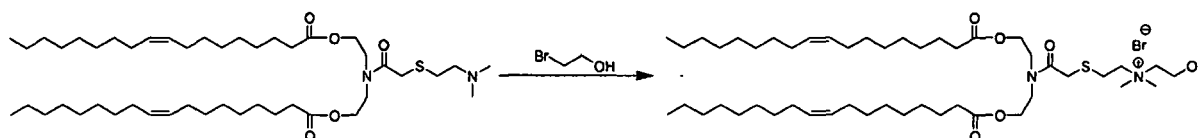


5 Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



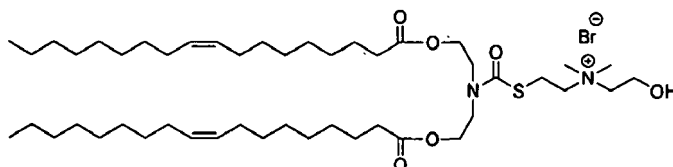
10 La síntesis de sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) se describió anteriormente. Se agitó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (4,06 g, 6,41 mmol) en DCM (60 ml) con K_2CO_3 al 10% (30 ml) a 0-5°C. Tras 30 min, se separó la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (30 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con $MgSO_4$ anhidro durante un periodo de 30 minutos a 0-5°C, se filtraron y se lavaron con DCM (30 ml). A los filtrados combinados se les añadieron ácido 2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acético (1,26 g, 7,70 mmol), sal de HCl de EDC (1,84 g, 9,62 mmol), DMAP (78,3 mg, 0,64 mmol). Se agitó la suspensión diluida durante la noche a temperatura ambiente; periodo de tiempo tras el cual la disolución se volvió transparente. Al día siguiente, se añadieron agua desionizada (60 ml) y metanol (30 ml). Tras agitar durante 10 minutos, se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM. Se concentraron los extractos orgánicos combinados. Se filtró el material en bruto a través de un lecho de sílice y se llevó a DCM (40 ml) y se añadió PBS (pH=11, 50 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Después, se separó la fase orgánica y se extrajo de nuevo la fase acuosa con DCM (15 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con $MgSO_4$ anhidro durante un periodo de 30 min. Después se filtró la mezcla y se lavó con DCM. Se concentraron los filtrados combinados a vacío para producir dioleato de (Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (3,44 g).

25 Preparación de HES104-DO

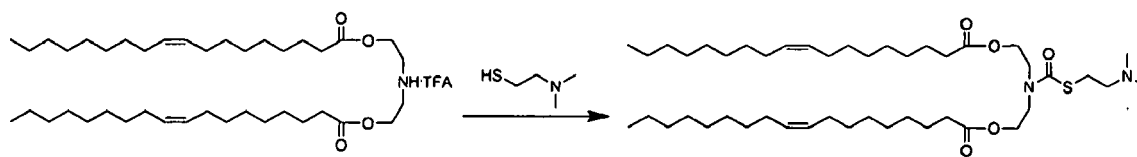


30 En un sistema sellado, se combinó dioleato de (Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (540 mg, 0,693 mmol) con 2-bromoetanol (319 μ l, 4,50). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 75°C y se dejó agitar durante la noche. Al día siguiente, se enfrió y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 2-((2-(bis(2-(oleoiloxi)etil)amino)-2-oxoetil)tio)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetiletanaminio (324 mg). CL-EM ESI+: m/z 823,8 (M + H).

Ejemplo 13: Preparación de bromuro de 2-((bis(2-(oleoiloxi)etil)carbamoil)tio)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetiletanaminio (HETU104-DO)

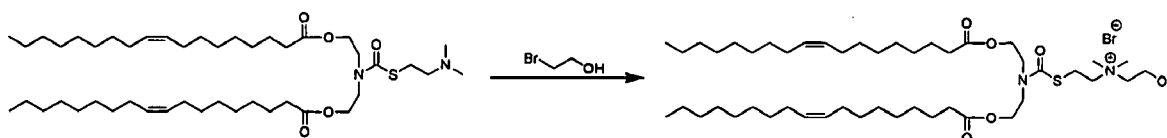


40 Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-(((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



La síntesis de dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) se describió anteriormente. Se disolvió dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (4,2 g, 5,72 mmol) en DCM (20 ml) y se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadió TFA (20 ml) y se dejó agitar la mezcla bajo una capa de gas inerte durante 20 minutos. Después de eso, se concentró la mezcla a vacío. Se repartió el residuo entre K₂CO₃ al 10% (20 ml) y DCM (20 ml). Se agitó la mezcla en un baño de hielo durante 20 minutos. Se recogió la parte orgánica y se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (2 x 10 ml). Se añadieron los extractos orgánicos combinados con MgSO₄ anhidro y se agitaron a 0°C durante 20 minutos. Se filtró la suspensión y se lavó con DCM (10 ml). Se añadió difosgeno (1,38 ml, 11,4 mmol) al material de dioleato de (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diilo) en DCM y se agitó bajo una capa de gas inerte a temperatura ambiente. Al día siguiente, se eliminó DCM y el difosgeno en exceso a vacío. Se llevó la sal de HCl de 2-(dimetilamino)etanotiol (4,05 g, 28,6 mmol) a DCM (50 ml) y trietilamina (5,2 ml, 37,2 mmol) y se añadió al residuo de dioleato de (Z)-((clorocarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se diluyó la mezcla con DCM y se lavó con HCl 0,3 M (75 ml), agua (75 ml) y K₂CO₃ al 10% (75 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a retroextracción con DCM (25 ml). Se secaron las fases orgánicas sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con gradiente de DCM/MeOH produjo dioleato de (Z)-(((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,90 g).

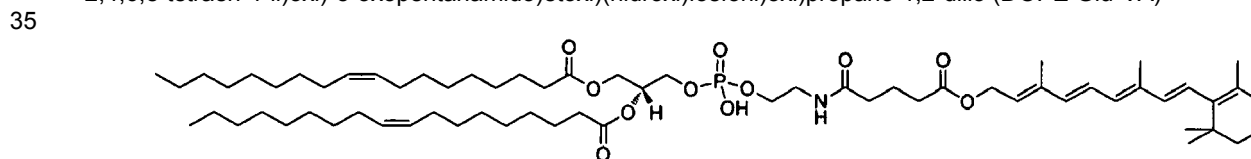
20 Preparación de HETU104DO



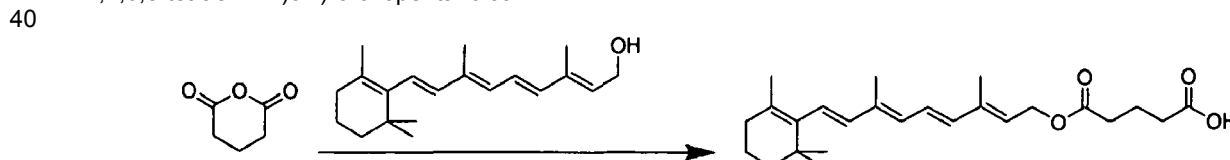
En un sistema sellado, se combinó dioleato de (Z)-(((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (615 mg, 0,804 mmol) con 2-bromoetanol (370 ul, 5,22 mmol). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y después se selló. Se calentó la reacción hasta 75°C y se dejó agitar durante la noche, después se enfrió y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de DCM/MeOH produjo bromuro de 2-((bis(2-(oleoiloxi)etil)carbamoil)tio)-N-(2-hidroxi)etil)-N,N-dimetiletanaminio (473 mg). CL-EM ESI+: m/z 809,8 (M + H).

30 Ejemplo 14: Síntesis de Dope-Glu-VA (ejemplo preparativo)

Preparación de dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(5-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)oxi)-5-oxopentanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (DOPE-Glu-VA)

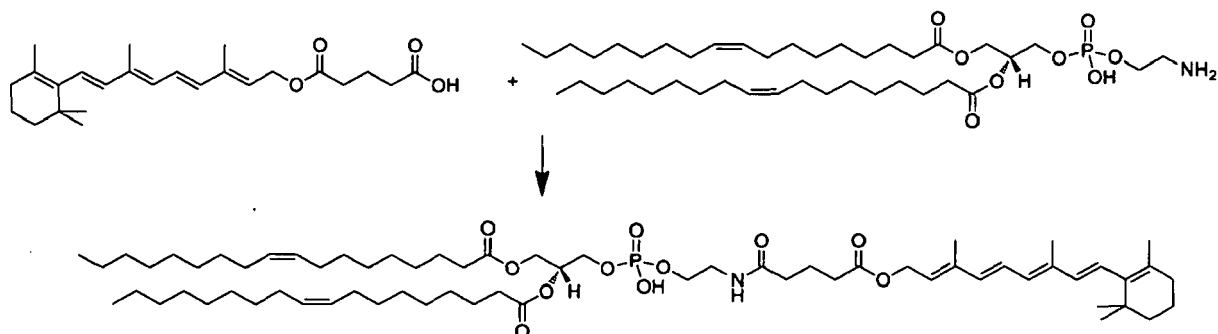


Preparación del producto intermedio 1: ácido 5-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)oxi)-5-oxopentanoico



Se disolvieron anhídrido glutárico (220 mg, 1,93 mmol) y retinol (500 mg, 1,75 mmol) en diclorometano (5 ml) en un vial de color ámbar. Se añadió trietilamina (513 ul, 3,68 mmol) y se purgó el vial con argón. Se dejó agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. Se concentró el material y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol. Se combinaron las fracciones y se concentraron para producir un aceite amarillento (700 mg). Se verificó el producto mediante RMN.

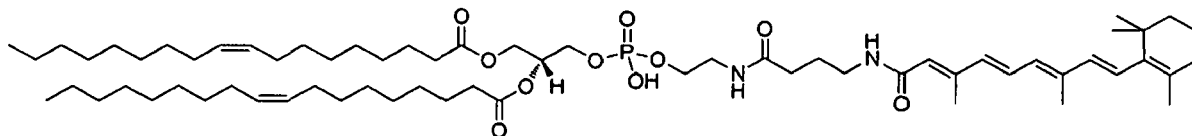
Preparación de DOPE-Glu-VA: dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(5-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)oxi)-5-oxopentanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo



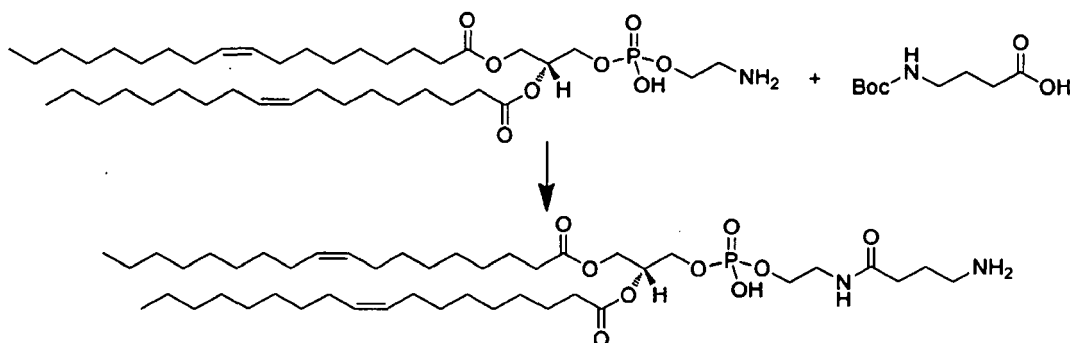
5 Se disolvieron 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (500 mg, 0,672 mmol), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (306,5 mg, 0,806 mmol) y ácido 5-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)oxi)-5-oxopentanoico (269 mg, 0,672 mmol) en cloroformo/DMF (10 ml, mezcla 1:1) en un vial de color ámbar purgado con argón y se añadió N,N-diisopropiletilamina (300 ul, 1,68 mmol). Se dejó agitar la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente. Se concentró la mezcla de reacción y después se purificó mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de diclorometano/metanol. Se combinaron las fracciones y se concentraron para producir un aceite amarillento (460 mg, 61%). Se verificó el producto mediante RMN. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H: 8,6 (d, 1H), 8,27 (d, 1H), 6,57-6,61 (dd, 1H), 6,08-6,25 (m, 4H), 5,57 (t, 1H), 5,30-5,34 (m, 4H), 5,18 (m, 1H), 4,68-4,70 (d, 2H), 4,28-4,35 (m, 1H), 4,05-4,15 (m, 1H), 3,81-3,97 (m, 4H), 3,52-3,62 (m, 1H), 3,35-3,45 (m, 2H), 2,95-3,05 (m, 1H), 2,33-2,35 (t, 3H), 2,2-2,3 (m, 7H), 1,9-2,05 (m, 17H), 1,85 (s, 3H), 1,69 (s, 3H), 1,5-1,65 (m, 6H), 1,4-1,5 (m, 2H), 1,18-1,38 (m, ~40H), 1,01 (s, 3H), 0,84-0,88 (m, 12H).

Ejemplo 15: DOPE-Glu-NH-VA (ejemplo preparativo)

20 Preparación de dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(4-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)butanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (DOPE-Glu-NH-VA)

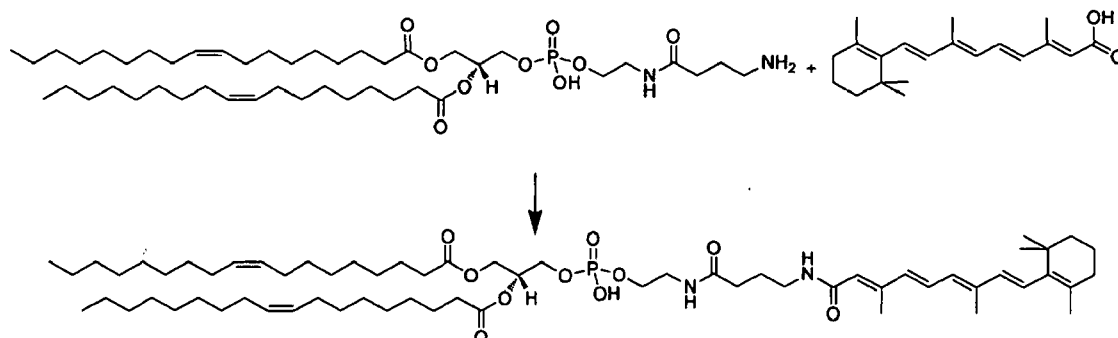


25 Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(4-aminobutanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo



30 Se disolvieron 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (2500 mg, 3,36 mmol), Boc-GABA-OH (751 mg, 3,70 mmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (1531 mg, 4,03 mmol) en DMF/cloroformo (25 ml, mezcla 1:1). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (880 ul, 5,05 mmol) y se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche bajo una capa de argón. Se diluyó la mezcla de reacción con ~200 ml de H₂O y se extrajo el producto con diclorometano (3x100 ml). Se lavó el producto con ~75 ml de tampón PBS pH 4,0, se secaron las fases orgánicas con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. Después se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol, y se concentró para producir un aceite incoloro (2,01 g, 64%). Se verificó el producto mediante RMN. Después se llevó el material a 30 ml de HCl 2 M/dietil éter. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente en un baño de H₂O. Tras 2 horas, se concentró la disolución para producir dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(4-aminobutanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo.

Preparación de DOPE-Glu-NH-VA: dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(4-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)butanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo



5

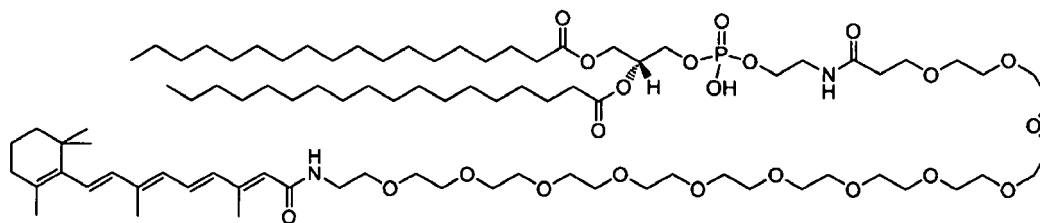
Se suspendieron dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(4-aminobutanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (1200 mg, 1,45 mmol), ácido retinoico (500 mg, 1,66 mmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (689 mg, 1,81 mmol) en DMF/cloroformo (10 ml, mezcla 1:1). Se añadió N,N-diisopropiletamina (758 μ l, 4,35 mmol). Se purgó el matraz de fondo redondo con argón y se cubrió con lámina de aluminio. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas, se repartió en diclorometano (75 ml) y H₂O (75 ml), se extrajo con diclorometano, se secó (sulfato de sodio), se filtró y se concentró. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de diclorometano/metanol produjo dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(4-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)butanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (292 mg, 18%). Se caracterizó el producto mediante CL-EM y RMN. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H : 8,55 (s, 1H), 8,2 (d, 1H), 7,3 (s, 1H), 6,6 (dd, 1H), 6,10-6,27 (m, 5H), 5,5 (t, 1H), 5,31 (s, 4H), 5,1-5,2 (m, 2H), 4,68 (d, 2H), 4,3 (d, 2H), 4,1 (m, 2H), 3,9 (m, 8H), 3,58 (q, 4H), 3,4 (s, 4H), 3,0 (q, 4H), 2,33-2,35 (t, 3H), 2,2-2,3 (m, 7H), 1,9-2,05 (m, 17H), 1,85 (s, 3H), 1,69 (s, 3H), 1,5-1,65 (m, 6H), 1,4-1,5 (m, 2H), 1,18-1,38 (m, ~40H), 1,01 (s, 3H), 0,84-0,88 (m, 12H). EM: m/z 1112,44 (M + H⁺).

20

Ejemplo 16: DSPE-PEG550-VA (ejemplo preparativo)

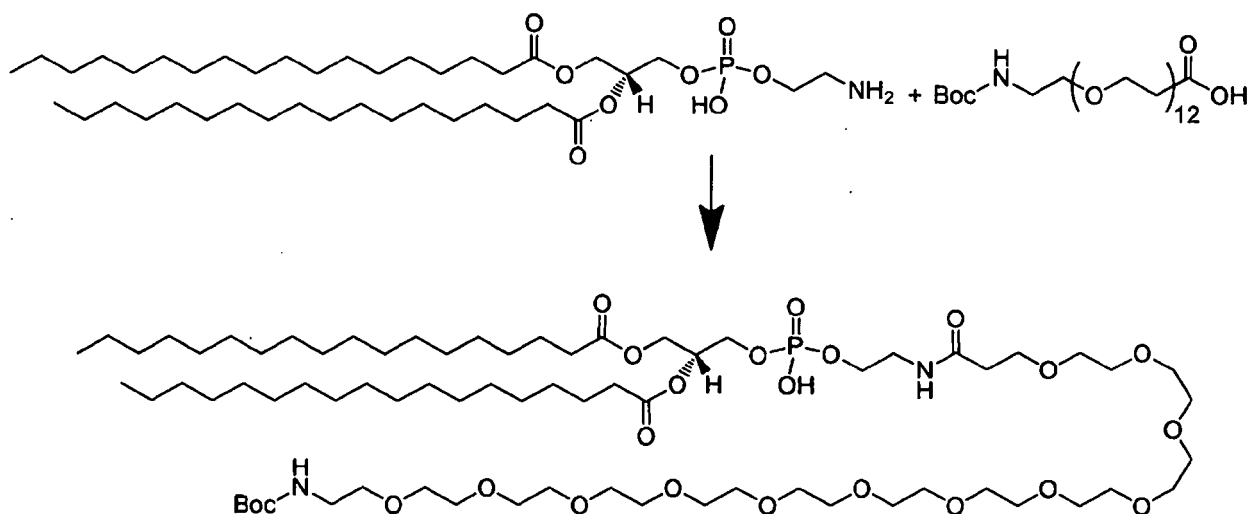
Preparación de diestearato de (2R)-3-((((45E,47E,49E,51E)-46,50-dimetil-4,44-dioxo-52-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazadopentaconta-45,47,49,51-tetraen-1-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (DSPE-PEG550-VA)

25



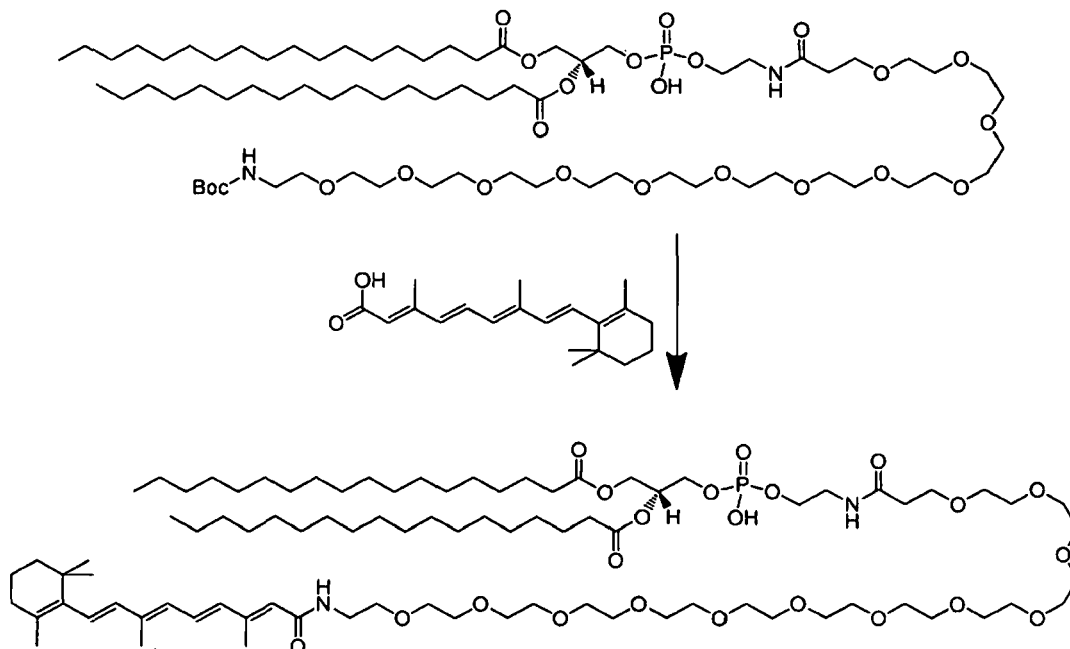
Preparación del producto intermedio 1: diestearato de (2R)-3-((((2,2-dimetil-4,44-dioxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41-tridecaoxa-5,45-diazaheptatetracontan-47-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo

30



5 Se disolvieron 1,2-di-stearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (200 mg, 0,267 mmol), ácido t-Boc-N-amido-dPEG₁₂ (211 mg, 0,294 mmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (122 mg, 0,320 mmol) en cloroformo/metanol/H₂O (6 ml, 65:35:8) en un vial de centelleo de 20 ml purgado con argón. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (116 ul, 0,668 mmol). Se dejó agitar la reacción a 25°C durante 4 horas y se concentró. Después se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir diesteurato de (2R)-3-(((2,2-dimetil-4,44-dioxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41-tridecaoxa-5,45-diazaheptatetracontan-47-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo como un aceite (252 mg, 65%).

15 Preparación de DSPE-PEG550-VA: diesteurato de (2R)-3-(((45E,47E,49E,51E)-46,50-dimetil-4,44-dioxo-52-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazadopentaconta-45,47,49,51-tetraen-1-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo



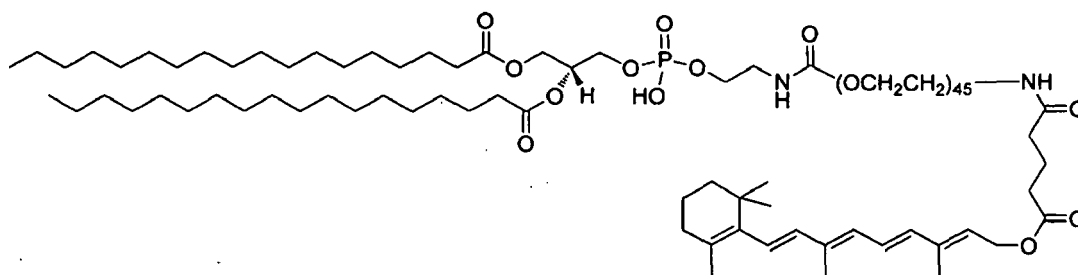
20 Se disolvió diesteurato de (2R)-3-(((2,2-dimetil-4,44-dioxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41-tridecaoxa-5,45-diazaheptatetracontan-47-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (252 mg, 0,174 mmol) en dietil éter (5 ml). Se colocó la reacción en un baño de H₂O a temperatura ambiente. Se añadió HCl 2 M/dietil éter (2 ml, 4 mmol) y se dejó agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora. Después de eso, se eliminaron el disolvente y HCl en exceso a vacío. Se suspendió el material en 2 ml de N,N-dimetilformamida en un matraz de fondo redondo purgado con argón. Se añadieron ácido retinoico (57,5 mg, 0,191 mmol), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (79 mg, 0,209 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (106 ul, 0,609 mmol). El material no se disolvió completamente, por tanto se añadió más cloroformo/metanol/H₂O (1 ml, mezcla de 65:35:8 v:v:v) para obtener una reacción homogénea. Tras 3,5 horas, se concentró la mezcla de reacción. Después se purificó el

25

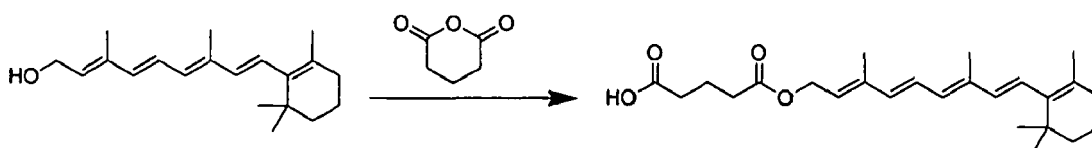
material mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir diestearato de (2R)-3-((((45E,47E,49E,51E)-46,50-dimetil-4,44-dioxo-52-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazadopentaconta-45,47,49,51-tetraen-1-il)oxi)(hidroxifosforil)oxi)propano-1,2-diilo como un sólido tostado (210 mg, 74%). Se verificó el producto mediante RMN y CL-EM. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H: 8,6 (s, 1H), 8,25 (d, 1H), 6,8-6,9 (dd, 1H), 6,3-6,4 (m, 1H), 6,12-6,25 (dd, 5H), 5,71 (s, 1H), 5,18 (m, 2H), 4,33 (dd, 2H), 4,13 (m, 2H), 3,95 (m, 2H), 3,74 (m, 8H), 3,63 (s, ~48H), 3,0 (q, 2H), 2,5 (t, 3H), 2,35 (s, 3H), 2,25 (t, 8H), 1,97 (m, 7H), 1,7 (3, 3H), 1,5 (m, 2H), 1,36 (m, 12H), 1,23 (m, ~56H), 1,01 (s, 6H), 0,86 (t, 12H). EM: *m/z* 1630,28 (M + H⁺).

10 Ejemplo 17: DSPE-PEG2000-Glu-VA (ejemplo preparativo)

Preparación de DSPE-PEG2000-Glu-VA

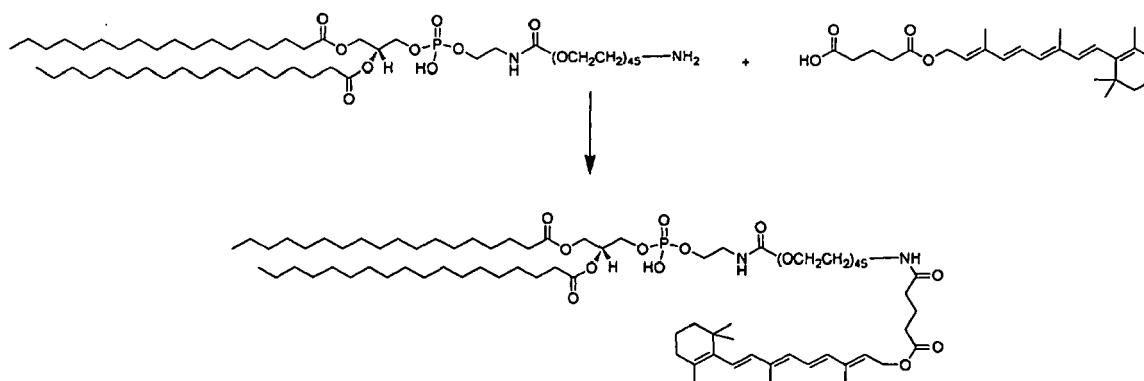


15 Preparación del producto intermedio 1: ácido 5-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)oxi)-5-oxopentanoico



20 Se disolvieron anhídrido glutárico (115 mg, 1,01 mmol) y retinol (240 mg, 0,838 mmol) en diclorometano (3 ml) en un vial de color ámbar. Se añadió trietilamina (257 ul, 1,84 mmol) y se purgó el vial con argón. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción y después se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir ácido 5-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)oxi)-5-oxopentanoico como un aceite amarillento (700 mg, 78%). Se caracterizó el material mediante RMN.

Preparación de DSPE-PEG2000-Glu-VA

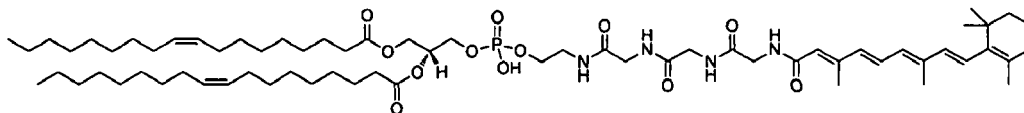


30 Se disolvieron ácido 5-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraen-1-il)oxi)-5-oxopentanoico (43 mg, 0,108 mmol), DSPE-PEG2000-NH₂ (250 mg, 0,090 mmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (45 mg, 0,117 mmol) en N,N-dimetilformamida (2 ml) en un vial de centelleo de color ámbar purgado con gas argón. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (47 ul, 0,270 mmol) y se dejó agitar la reacción durante la noche a temperatura ambiente, después se purificó mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir un aceite amarillento (59 mg, 20,7%). Se verificó el producto mediante RMN. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H: 7,06 (m, 1H), 6,59-6,66 (dd, 1H), 6,06-6,30 (m 5H), 5,56-5,60 (t, 1H), 5,17-5,23 (m, 2H), 4,35-4,42 (dd, 2H), 4,12-4,25 (m, 5H), 3,96-3,97 (m, 6H), 3,79-3,81 (t, 1H), 3,66 (m, ~180H), 3,51-3,58 (m, 2H), 3,4-3,48 (m, 4H), 3,3-3,38 (m, 2H), 2,25-2,45 (m, 14H), 1,5-2,0 (m, 15H), 1,23-1,32 (m, ~56H),

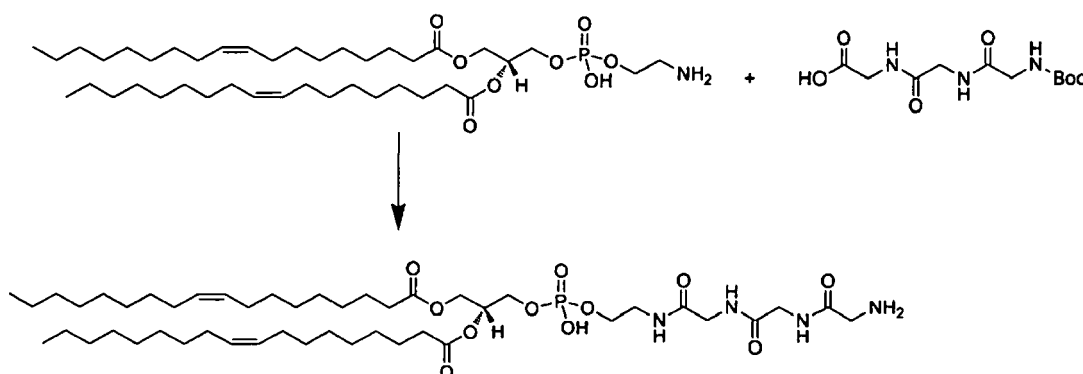
1,01 (s, 3H), 0,85-0,88 (t, 12H).

Ejemplo 18: DOPE-Gly₃-VA (ejemplo preparativo)

- 5 Preparación de dioleato de (Z)-(2R)-3-((((14E,16E,18E,20E)-15,19-dimetil-4,7,10,13-tetraoxo-21-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-3,6,9,12-tetraazahenicososa-14,16,18,20-tetraen-1-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (DOPE-Gly₃-VA)

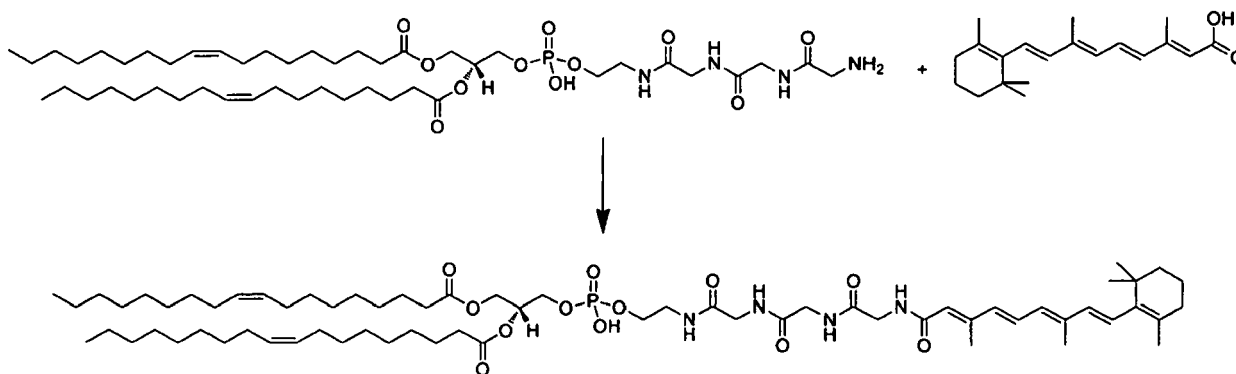


- 10 Preparación del producto intermedio 1: dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(2-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)acetamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo



- 15 Se disolvieron Boc-Gly-Gly-Gly-OH (382 mg, 1,34 mmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (532 mg, 1,4 mmol) en DMF (5 ml). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (488 ul, 2,8 mmol) y se dejó agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Después de eso, se añadió una disolución de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (833 mg, 1,12 mmol) en cloroformo (5 ml) y se purgó el recipiente de reacción con argón. Tras 16 horas a temperatura ambiente, se concentró la mezcla de reacción y se repartió entre diclorometano (50 ml) y H₂O (50 ml), se extrajo con diclorometano (3 x 50 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de diclorometano/metanol para producir un residuo de aceite incoloro. A esto se le añadió HCl 2 M/dietil éter (5 ml) y se dejó agitar la mezcla de reacción en un baño de H₂O durante aproximadamente 2 horas. Se concentró la mezcla de reacción y se llevó el residuo a diclorometano (75 ml), se lavó con disolución saturada de bicarbonato de sodio (75 ml), se extrajo el producto con diclorometano (3x75 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró para producir dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(2-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)acetamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo como semisólido (765 mg, 90%). Se verificó mediante RMN.

- 30 Preparación de DOPE-Gly₃-VA: dioleato de (Z)-(2R)-3-((((14E,16E,18E,20E)-15,19-dimetil-4,7,10,13-tetraoxo-21-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-3,6,9,12-tetraazahenicososa-14,16,18,20-tetraen-1-il)oxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo

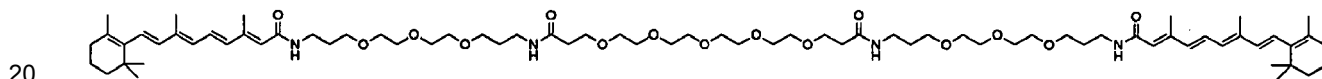


- 35 Se suspendieron dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-(2-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)acetamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (765 mg, 0,836 mmol), ácido

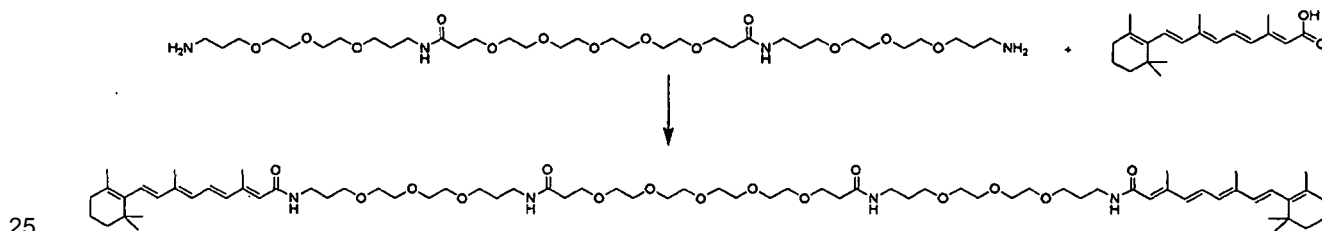
retinoico (301 mg, 1,00 mmol), y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (413 mg, 1,09 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (437 μ l, 2,51 mmol) y se purgó el recipiente de reacción con gas argón. Se añadió cloroformo (5 ml) para ayudar en la solvatación de materiales. Se dejó agitar la reacción durante ~4 horas a temperatura ambiente en un matraz de fondo redondo cubierto con lámina de aluminio. Se repartió el material entre H₂O (100 ml) y diclorometano (100 ml). Se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Después se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de diclorometano/metanol para producir dioleato de (Z)-(2R)-3-((((14E,16E,18E,20E)-15,19-dimetil-4,7,10,13-tetraoxo-21-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-3,6,9,12-tetraazahenicosa-14,16,18,20-tetraen-1-il)oxi)(hidroxifosforil)oxi)propano-1,2-diilo como un aceite de color naranja (704 mg, 70%). Se verificó el producto mediante CL-EM y RMN. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H : 6,90 (t, 1H), 6,21 (q, 2H), 6,08-6,12 (d, 2H), 5,83 (s, 1H), 5,31 (s, 4H), 5,30 (s, 2H), 4,37 (d, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,91 (m, 8H), 3,59 (m, 2H), 3,29 (m, 2H), 3,01 (m, 2H), 2,28 (m, 6H), 1,95-1,98 (m, 12H), 1,44 (s, 3H), 1,5-1,6 (m, 2H), 1,44 (m, 6H), 1,24 (m, ~48H), 1,00 (s, 6H), 0,86 (t, 3H). EM: *m/z* 1198,42 (M + H⁺).

15 Ejemplo 19: VA-PEG-VA (ejemplo preparativo)

Preparación de N1,N19-bis((16E,18E,20E,22E)-17,21-dimetil-15-oxo-23-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azatricosa-16,18,20,22-tetraen-1-il)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida (VA-PEG-VA)



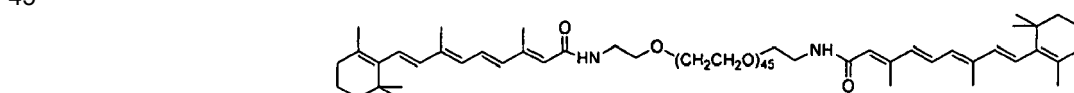
Preparación de VA-PEG-VA: N1,N19-bis((16E,18E,20E,22E)-17,21-dimetil-15-oxo-23-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14-azatricosa-16,18,20,22-tetraen-1-il)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida



Se suspendieron ácido retinoico (2913 mg, 9,70 mmol), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (3992 mg, 10,50 mmol) y diamido-dPEG₁₁-diamina (3000 mg, 4,04 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (4222 μ l, 24,24 mmol) y se purgó el recipiente con argón. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante la noche en un matraz de fondo redondo cubierto con lámina de aluminio. Al día siguiente, se repartió el material entre acetato de etilo (125 ml) y agua (125 ml). Se extrajo con acetato de etilo (3x125 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Después se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol. Se combinaron las fracciones y se concentró para producir un aceite de color amarillo (2900 mg, 54,9%). Se verificó el producto mediante CL-EM y RMN. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H : 7,1 (s, 2H), 6,87 (t, 2H), 6,51 (t, 2H), 6,12-6,20 (dd, 8H), 5,66 (s, 2H), 3,6-3,8 (m, ~44H), 3,4 (q, 4H), 3,3 (q, 4H), 2,46 (t, 4H), 2,32 (s, 6H), 1,9-2,05 (m, 10H), 1,7-1,85 (m, 15H), 1,6 (m, 4H), 1,3-1,5 (m, 6H), 1,01 (s, 12H). QTOF EM: *m/z* 1306 (M + H⁺).

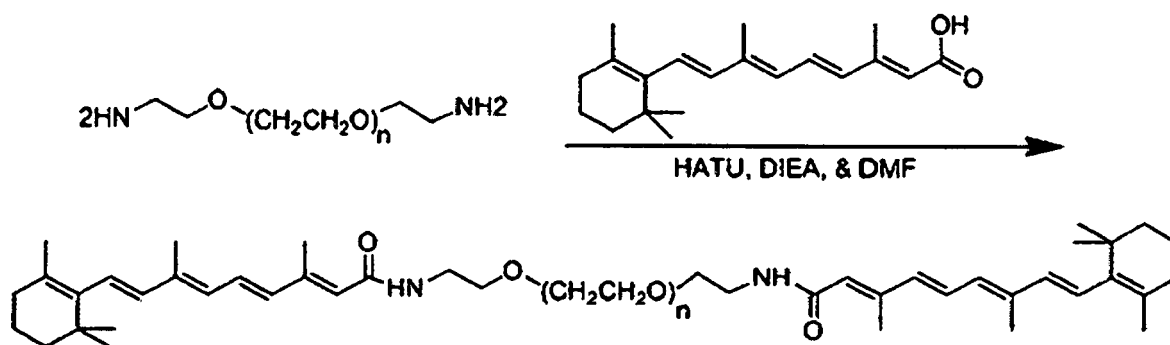
40 Ejemplo 20: VA-PEG2000-VA (ejemplo preparativo)

Preparación de (2E,2'E,4E,4'E,6E,6'E,8E,8'E)-N,N'-(3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108,111,114,117,120,123,126,129,132,135,138-hexatetracontaoxatetracontahectano-1,140-diil)bis(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamida) (VA-PEG2000-VA)



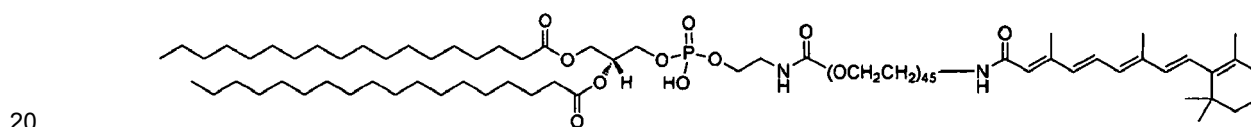
Preparación de VA-PEG2000-VA: (2E,2'E,4E,4'E,6E,6'E,8E,8'E)-N,N'-(3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108,111,114,117,120,123,126,129,132,135,138-hexatetracontaoxatetracontahectano-1,140-diil)bis(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamida)

50

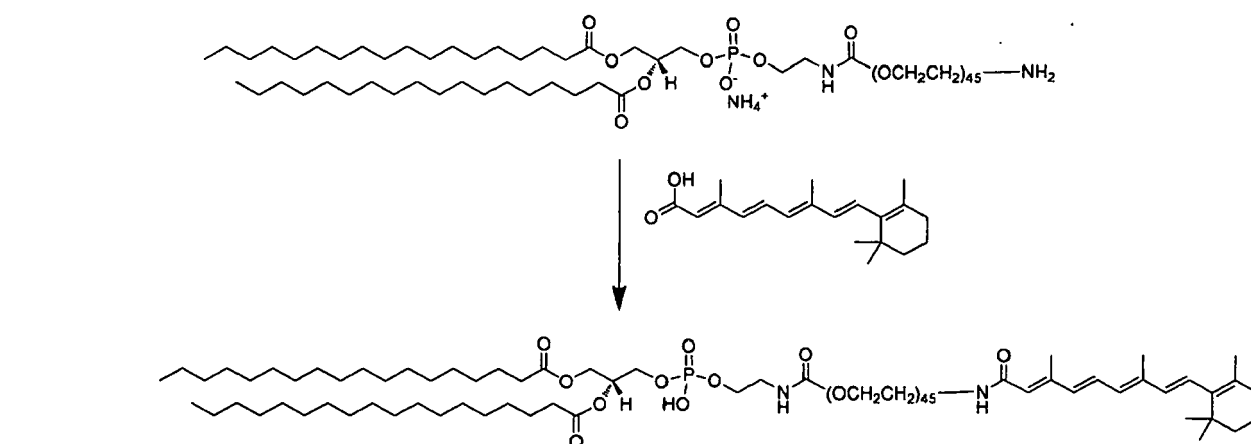


5 Se suspendieron ácido retinoico (109 mg, 0,362 mmol), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (149 mg, 0,392 mmol) y amina-PEG_{2K}-amina (333 mg, 0,151 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (158 μ l, 0,906 mmol) y se purgó el recipiente con argón. Se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante la noche en un matraz de fondo redondo cubierto con lámina de aluminio. Al día siguiente, se repartió el material entre acetato de etilo (30 ml) y agua (30 ml). Se extrajo con acetato de etilo (3x30 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Después se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol. Se combinaron las fracciones y se concentraron para producir (2E,2'E,4E,4'E,6E,6'E,8E,8'E)-N,N'-(3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108,111,114,117,120,123,126,129,132,135,138-hexatetracontaoxatetracontahectano-1,140-diil)bis(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamida) como un aceite de color amarillo (97 mg, 23%). Se verificó el producto mediante CL-EM y RMN. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H : 6,85-6,92 (t, 2h), 6,20-6,32 (M, 6H), 6,08-6,12 (d, 4H), 5,72 (s, 2H), 3,55-3,70 (m, ~180H), 3,4-3,5 (m, 4H), 2,79 (m, 4H), 2,78 (s, 6H), 2,33 (s, 6H), 2,05 (m, 4H), 1,97 (s, 6H), 1,80 (m, 2H), 1,79 (s, 6H), 1,69 (s, 6H), 1,60 (m, 4H), 1,45 (m, 4H), 1,01 (s, 12H). QTOF EM: *m/z* 2651 (M + H⁺).

Ejemplo 21: DSPE-PEG2000-VA (ejemplo preparativo)



Preparación de DSPE-PEG2000-VA

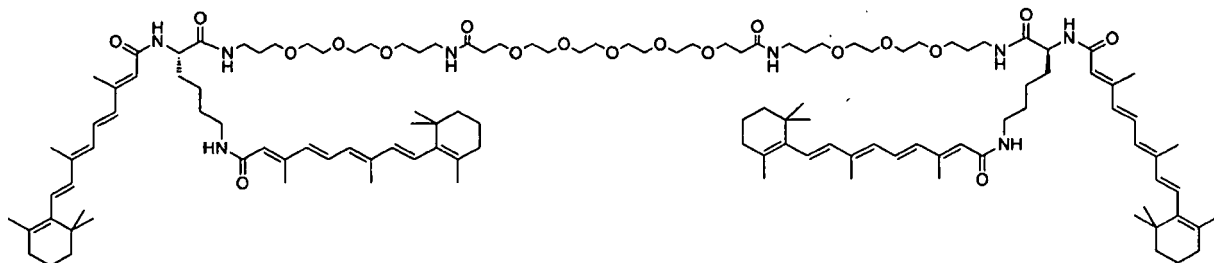


25 Se disolvieron DSPE-PEG2000-NH₂ (250 mg, 0,090 mmol), ácido retinoico (33 mg, 0,108 mmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (45 mg, 0,117 mmol) en N,N-dimetilformamida. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (47 μ l, 0,270 mmol) a la mezcla. Se purgó el vial de centelleo de color ámbar con argón y se dejó agitar 3 días a temperatura ambiente. Después se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de diclorometano/metanol. Se combinaron las fracciones y se concentraron para producir DSPE-PEG2000-VA como un aceite de color amarillo (245 mg, 89%). Se verificó el producto mediante RMN. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H : 6,86 (dd, 1H), 6,25 (m, 1H), 6,09-6,21 (dd, 4H), 5,71 (s, 1H), 5,1-5,2 (m, 1H), 4,3-4,4 (d, 1H), 4,1-4,2 (m, 3H), 3,85-4,0 (m, 4H), 3,8 (t, 1H), 3,5-3,75 (m, ~180H), 3,4-3,5 (m, 8H), 3,3 (m, 2H), 2,35 (s, 3H), 2,26 (m, 4H), 1,70 (s, 3H), 1,55-1,65 (m, 6H), 1,47 (m, 2H), 1,23 (s, ~60H), 1,01 (s, 6H), 0,85 (t, 6H).

Ejemplo 22: diVA-PEG-diVA, también conocido como "DiVA" (ejemplo preparativo)

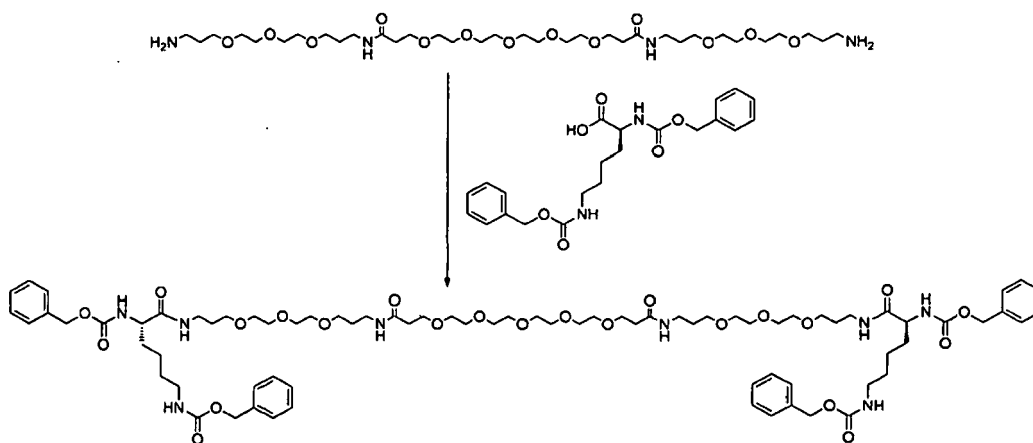
Preparación de N1,N19-bis((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclo-hex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)-24,28-dimetil-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriaconta-23,25,27,29-tetraen-1-il)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida (diVA)

5



Preparación del producto intermedio 1: ((5S,57S)-6,22,40,56-tetraoxo-11,14,17,25,28,31,34,37,45,48,51-undeca-oxa-7,21,41,55-tetraazahenhexacontano-1,5,57,61-tetrail)tetracarbamato de tetrabencilo, también conocido como Z-DiVA-PEG-DiVA-IN

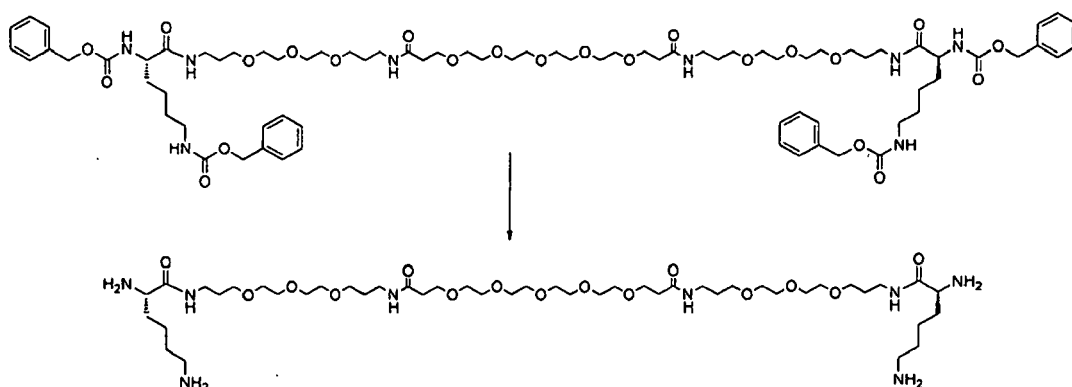
10



Se purgó un matraz de reacción de 1 l enfriado hasta 5 - 10°C con nitrógeno y se cargó con diclorometano (300 ml), d-PEG-11-diamina (Quanta lote EK1-A-1100-010, 50,0 g, 0,067 mol), Z-(L)-Lys(Z)-OH (61,5 g, 0,15 mol), e hidrato de HOBT (22,5 g, 0,15 mol). Se añadió 4-metilmorfolina (4-MMP) (15,0 g, 0,15 mol) a la suspensión y se observó una ligera reacción exotérmica. Se añadió una suspensión de clorhidrato de EDC (43,5 g, 0,23 mol) y 4-MMP (20,0 g, 0,20 mol) en diclorometano (150 ml) a lo largo de un periodo de 30 minutos, y se requirió enfriamiento moderado con el fin de mantener una temperatura de 20-23°C. Se agitó la disolución ligeramente turbia durante la noche a temperatura ambiental, y HPLC indica terminación de la reacción. Se añadió agua desionizada (300 ml) y tras haberse agitado durante 10 minutos, se observó una rápida separación de fases. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano (150 ml) con una separación de fases algo más lenta. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con bicarbonato de sodio al 6% (300 ml) y se secaron con sulfato de magnesio (24 g). La evaporación a partir de un baño de agua a 40-45°C a presión reducida da 132 g de producto en bruto. Se cargó una disolución de producto en bruto (131 g) en metanol al 8% en acetato de etilo en una columna de gel de sílice 60 (40-63 μ), empaquetada con metanol al 8% en acetato de etilo. Se eluyó la columna con metanol al 8% en acetato de etilo (7,5 l). Se evaporaron las fracciones que contenían producto suficientemente puro (5,00-7,25 l) a partir de un baño de agua a 45°C a presión reducida y 83,6 g de producto purificado. Se cargó una disolución de producto purificado (83,6 g) en diclorometano (200 ml) sobre una columna de Dowex 650 C (H⁺) (200 g), que se había lavado con diclorometano (250 ml). Se eluyó la columna con diclorometano (200 ml). Se secaron las fracciones que contenían producto combinadas (300-400 ml) con sulfato de magnesio (14 g) y se evaporaron a partir de un baño de agua a 45°C a presión reducida para producir ((5S,57S)-6,22,40,56-tetraoxo-11,14,17,25,28,31,34,37,45,48,51-undeca-oxa-7,21,41,55-tetraazahenhexacontano-1,5,57,61-tetrail)tetracarbamato de tetrabencilo, también conocido como Z-DiVA-PEG-DiVA-IN (77,9 g, pureza mediante HPLC del 94,1%).

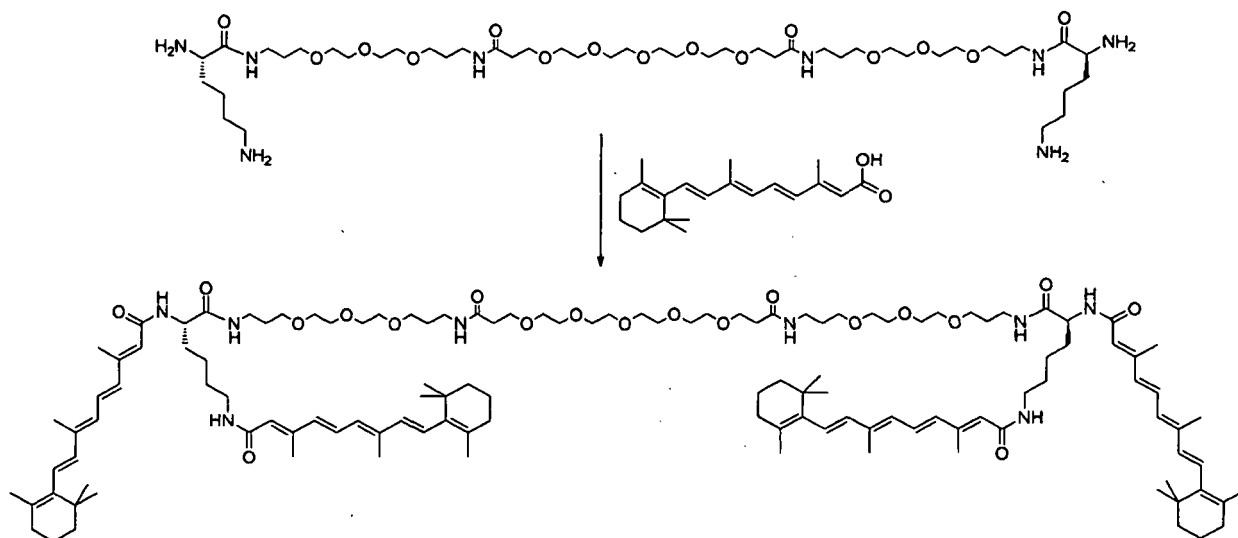
35

Preparación del producto intermedio 2: N1,N19-bis((S)-16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida, también conocida como DiVA-PEG-DiVA-IN



5 Se purgó un matraz de reacción de 1 l con nitrógeno y se cargó con metanol (600 ml) y Z-DiVA-PEG-DiVA-IN (92,9, 60,5 mmol). Se agitó la mezcla bajo nitrógeno hasta que se obtuvo una disolución. Se añadió el catalizador, Pd al 10%/C/agua al 50% (Aldrich, 10 g). Se evacuó la mezcla, y después se igualó la presión mediante nitrógeno. Se evacuó la mezcla, y después se igualó la presión mediante hidrógeno. Garantizando un flujo constante y bajo de hidrógeno sobre la mezcla de reacción, se inició el agitador. Se continuó la hidrogenación en un flujo de hidrógeno durante una hora. Después se cerró el sistema y se continuó la hidrogenación a ~0,1 bar durante una hora. Se evacuó la mezcla y después volvió a presurizarse hasta ~0,1 bar con hidrógeno. Tras otra hora de hidrogenación, se evacuó la mezcla y después volvió a presurizarse hasta 0,1 bar con hidrógeno. Se continuó la agitación bajo hidrógeno durante 15 horas tiempo tras el cual no pudo detectarse nada de material de partida mediante HPLC. Se evacuó la mezcla, y después se igualó la presión mediante nitrógeno. Se evacuó la mezcla, y después se igualó la presión mediante nitrógeno. Después se filtró la mezcla de reacción sobre un lecho de Celite 545. Se lavó la torta de filtro con metanol (100 ml). Se concentró el filtrado combinado finalmente a 45°C y a una presión de menos de 50 mbar. Se añadió tolueno (100 ml) y se concentró de nuevo la mezcla resultante finalmente a 45°C y a una presión de menos de 40 mbar para producir N1,N19-bis((S)-16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida, también conocida como DiVA-PEG-DiVA-IN (63,4 g), como un aceite que se solidifica al reposar.

20 Preparación de DiVA-PEG-DiVA: N1,N19-bis((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)-24,28-dimetil-15,22-dioxo-30-(2,6,6-tri-metilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriaconta-23,25,27,29-tetraen-1-il)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida

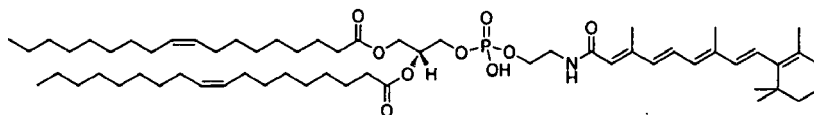


25 Se llenó un reactor de 2 l con argón y se cargó con diclorometano (500 ml), DiVA-PEG-DiVA-IN (52,3 g, 52,3 mmol), ácido retinoico (70,6 g, 235 mmol) y 4-N,N-dimetilaminopiridina (2,6 g, 21,3 mmol). Se agitó la mezcla bajo argón hasta que se disolvió (~20 minutos). Manteniendo la temperatura de la reacción a 10 - 20°C, se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (70,6 g, 369 mmol) en porciones a lo largo de un periodo de 10 - 15 minutos (la reacción fue ligeramente exotérmica durante los primeros 30 - 60 minutos). Se cubrió el reactor con lámina de aluminio y se agitó la mezcla a 18 - 21°C durante 15-20 horas. Se añadió hidroxitolueno butilado (BHT) (25 mg) y después se vertió la mezcla de reacción sobre hidrogenocarbonato de sodio al 6% acuoso (500 ml) mientras se mantenía una atmósfera de argón sobre la mezcla. Se separó la fase orgánica. Se lavó la fase acuosa con diclorometano (50 ml). Se secó la fase orgánica combinada con sulfato de magnesio (150 g) bajo atmósfera inerte y

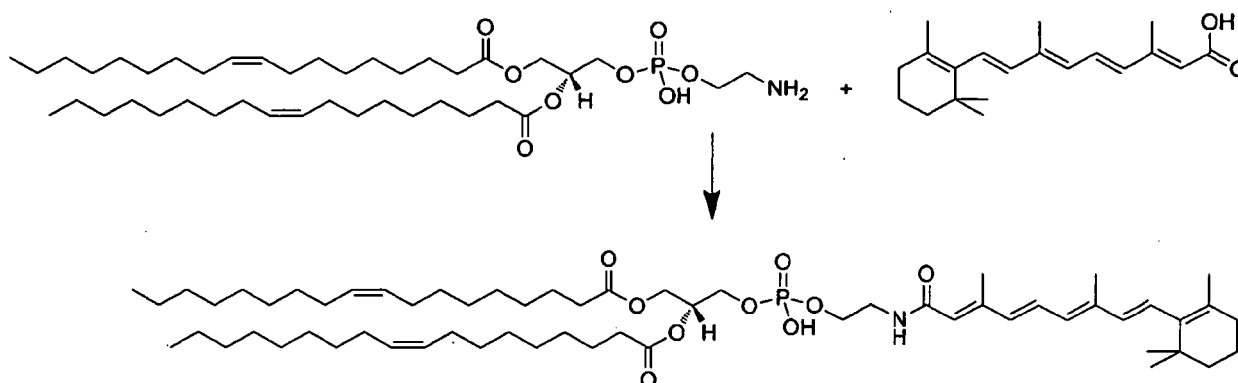
protegido de la luz. Se separó por filtración el agente de secado (se prefiere un filtro a presión) y se lavó la torta de filtro con diclorometano (500 ml). Se concentró el filtrado mediante evaporación a presión reducida usando un baño de agua de 35-40°C. Al residuo aceitoso se le añadió tolueno (150 ml) y se evaporó de nuevo para producir un residuo semisólido de 210 g. Se disolvió este residuo en diclorometano (250 ml) y se aplicó sobre una columna preparada a partir de gel de sílice 60 (1,6 kg) y metanol al 0,5% en diclorometano (4 l). Se eluyó la columna con diclorometano (7,2 l), 2), metanol al 3% en diclorometano (13 l), metanol al 5% en diclorometano (13 l), metanol al 10% en diclorometano (18 l). Se tomó una fracción de 10 l, y después se tomaron fracciones de 2,5 l. Se tomaron muestras de las fracciones protegidas de la luz, se purgaron con argón y se sellaron. Se analizaron las fracciones tomadas mediante CCF (metanol al 10% en diclorometano, UV). Se analizaron adicionalmente mediante HPLC las fracciones que contenían DiVA-PEG-DiVA. Volvieron a purificarse 5 fracciones puras a < 85% (dieron 32 g de residuo de evaporación) de la misma manera, usando sólo el 25% de las cantidades originales de gel de sílice y disolventes. Se combinaron las fracciones puras a >85% mediante HPLC y se evaporaron a presión reducida, usando un baño de agua de 35 - 40°C. Volvió a disolverse el residuo de evaporación (120 g) en diclorometano (1,5 l) y se hizo pasar lentamente (aproximadamente 1 hora) a través de una columna preparada a partir de agente de intercambio iónico Dowex 650C, forma H⁺ (107 g). Después se lavó la columna con diclorometano (1 l). Se mezcló bien el eluato combinado (3277,4 g) y se evaporó una muestra (25 ml, 33,33 g) finalmente a temperatura ambiente y a presión de < 0,1 mbar para proporcionar 0,83 g de una espuma. A partir de esta cifra se calculó por tanto que la cantidad total de material sólido producía 80,8 g (72,5%). Se concentraron los 3,24 kg restantes de disolución hasta obtener 423 g. Se concentraron adicionalmente 266 g de esta disolución para producir un jarabe y después volvieron a disolverse en etanol abs. (200 ml). Se continuó la evaporación a presión reducida, usando un baño de agua de 35 - 40°C, para producir una disolución en etanol final de 94,8 g que contenía 50,8 g (el 53,6% p/p) de N1,N19-bis((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)-24,28-dimetil-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriaconta-23,25,27,29-tetraen-1-il)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida, también conocida como DiVA-PEG-DiVA, también conocida como "DiVA". Se caracterizó mediante RMN y QTOF. ¹H-RMN (400 MHz), δ_H: 7,07 (t, 2H), 7,01 (t, 2H), 6,87-6,91 (m, 4,0H), 6,20-6,24 (m, 10H), 6,10-6,13 (m, 8H), 5,79 (s, 2H), 5,71 (s, 2H), 4,4 (q, 2H), 3,70 (t, 6H), 3,55-3,65 (m, ~34H), 3,59 (t, 6H), 3,4 (m, 2H), 3,25-3,33 (m, 10H), 3,16 (m, 2H), 2,44 (t, 4H), 2,33 (s, 12H), 1,97-2,01 (m, 12H), 1,96 (s, 6H), 1,7-1,9 (m, 12H), 1,69 (s, 12H), 1,5-1,65 (m, 12H), 1,35-1,5(m, 24H), 1,01 (s, 24H). QTOF EM ESI+: m/z 2128 (M + H⁺).

Ejemplo 23: DOPE-VA (ejemplo preparativo)

Preparación de dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (DOPE-VA)



Preparación de DOPE-VA: dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo



A una disolución de ácido retinoico (250 mg, 0,83 mmol) en dietil éter con agitación (20 ml) a -78°C, se le añadió una disolución de trifluoruro de (dietilamino)azufre (130 µl, 0,90 mmol) en éter frío (20 ml) a través de una jeringa. Se sacó la mezcla de reacción del baño frío y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 2 h adicionales. Al final, se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria. Volvió a disolverse el residuo en cloroformo (50 ml) en presencia de Na₂CO₃ sólido (50 mg). A esta disolución se le añadió 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (600 mg, 0,81 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h adicionales. Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir dioleato de (Z)-(2R)-3-(((2-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-

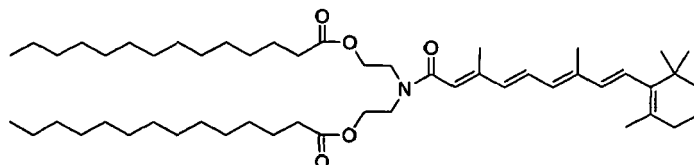
trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (240 mg, 28%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0,87 (t, 6H, CH_3), 1,01 (s, 6H, CH_3), 1,20-1,40 (m, 40H, CH_2), 1,40-1,60 (m, 8H, CH_2), 1,70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=C}$), 1,80-2,10 (m, 8H), 2,32 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{C(=O)}$), 3,50 (m, 2H), 3,92-4,18 (m, 5H), 4,35 (m, 2H), 5,20 (m, 1H, NHC(=O)), 5,31 (m, 4H, CH=CH), 5,80-6,90 (m, 6H, CH=CH).

5

Ejemplo 24: DC-VA (ejemplo preparativo)

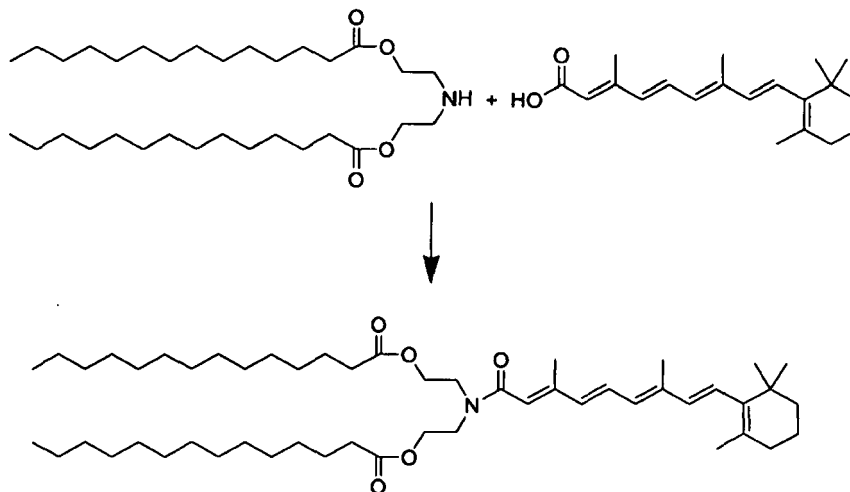
Preparación de ditetradecanoato de (((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (DC-VA)

10



Preparación de DC-VA: ditetradecanoato de (((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

15



A una disolución de ácido retinoico (600 mg, 2,0 mmol) en dietil éter (25 ml) con agitación a -78°C , se le añadió una disolución de trifluoruro de (dietilamino)azufre (0,3 ml, 2,1 mmol) en 5 ml de éter frío a través de una jeringa. Se sacó la mezcla de reacción del baño frío y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 1 h adicional. Tras eliminarse el disolvente mediante evaporación rotatoria, volvió a disolverse el residuo en diclorometano (20 ml) en presencia de Na_2CO_3 sólido (25 mg). A esta disolución se le añadió el ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (1,05 g, 2,0 mmol), y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h adicionales. Se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano (50 ml) y se secó sobre MgSO_4 . Tras eliminarse el disolvente mediante evaporación rotatoria, se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir ditetradecanoato de (((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (800 mg, 50%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0,87 (t, 6H, CH_3), 1,02 (s, 6H, CH_3), 1,20-1,40 (m, 40H, CH_2), 1,40-1,60 (m, 8H, CH_2), 1,70 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=C}$), 1,97 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=C}$), 2,05 (m, 2H, CH_2), 2,15 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=C}$), 2,32 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{C(=O)}$), 3,67 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4,15-4,30 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 5,80-6,90 (m, 6H, CH=CH).

20

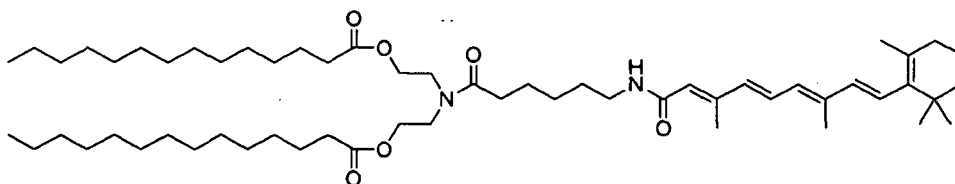
25

30

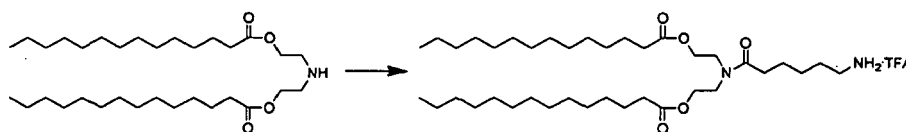
Ejemplo 25: DC-6-VA (ejemplo preparativo)

Preparación de ditetradecanoato de ((6-(((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (DC-6-VA)

35

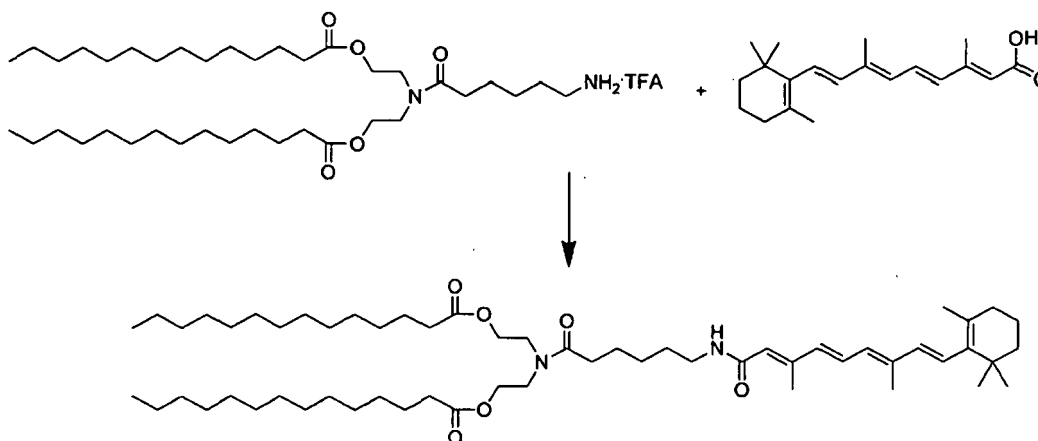


Preparación del producto intermedio 1: sal de TFA de ditetradecanoato de ((6-aminohexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



5 Se disolvió una mezcla de ditetradecanoato de azanodiilbis(etano-2,1-diilo) (2,5 g, 4,8 mmol), ácido Boc-amino-caproico (1,3 g, 5,6 mmol), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (1,3 g, 6,3 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2,6 ml, 0,015 mmol) en piridina (40 ml). Se agitó la disolución a 60°C durante la noche. Se diluyó la mezcla con diclorometano (50 ml) y se lavó con solución salina (3x50 ml). Tras concentrarse mediante evaporación rotatoria, se trató el residuo con ácido trifluoroacético/diclorometano (100 ml, 1:1). Se concentró la mezcla y volvió a disolverse en diclorometano (50 ml) y se lavó con solución salina (3x50 ml). Se aisló la fase orgánica y se concentró para producir sal de TFA de ditetradecanoato de ((6-aminohexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,5 g, 33%).

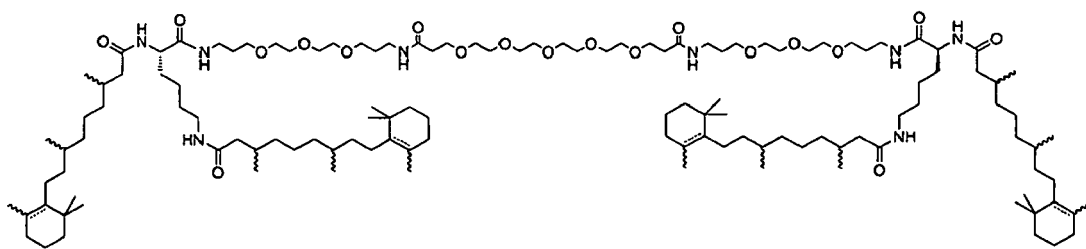
15 Preparación de DC-6-VA: ((6-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



20 A una disolución de ácido retinoico (800 mg, 2,67 mmol) en dietil éter (40 ml) con agitación a -78°C, se le añadió una disolución de trifluoruro de (dietilamino)azufre (0,4 ml, 22,80 mmol) en éter frío (7 ml) a través de una jeringa. Se sacó la mezcla de reacción del baño frío y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 1 h adicional. Tras eliminarse el disolvente mediante evaporación rotatoria, volvió a disolverse el residuo en diclorometano (25 ml) en presencia de Na₂CO₃ sólido (40 mg). A esta disolución se le añadió la sal de TFA de ditetradecanoato de ((6-aminohexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,5 g, 1,6 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h adicionales. Se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano (50 ml) y se secó sobre MgSO₄. Tras eliminarse el disolvente mediante evaporación rotatoria, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna usando metanol al 5%/diclorometano como eluyente para producir ((6-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (360 mg, 24%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0,87 (t, 6H, CH₃), 1,02 (s, 6H, CH₃), 1,20-1,40 (m, 42H, CH₂), 1,40-1,60 (m, 12H, CH₂), 1,70 (s, 3H, CH₃-C=C), 1,97 (s, 3H, CH₃-C=C), 2,05 (m, 2H, CH₂), 2,15 (s, 3H, CH₃-C=C), 2,32 (m, 6H, CH₂C(=O)), 3,20 (m, 2H, CH₂NHC(=O)), 3,56 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 4,15-4,30 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 5,10 (m, 1H), 5,80-6,90 (m, 6H, CH=CH).

35 Ejemplo 26: Síntesis de satDiVA (ejemplo preparativo)

Preparación de N1,N19-bis((16S)-16-(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanamido)-24,28-dimetil-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida (satDiVA).



Preparación del producto intermedio 1: ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico

5

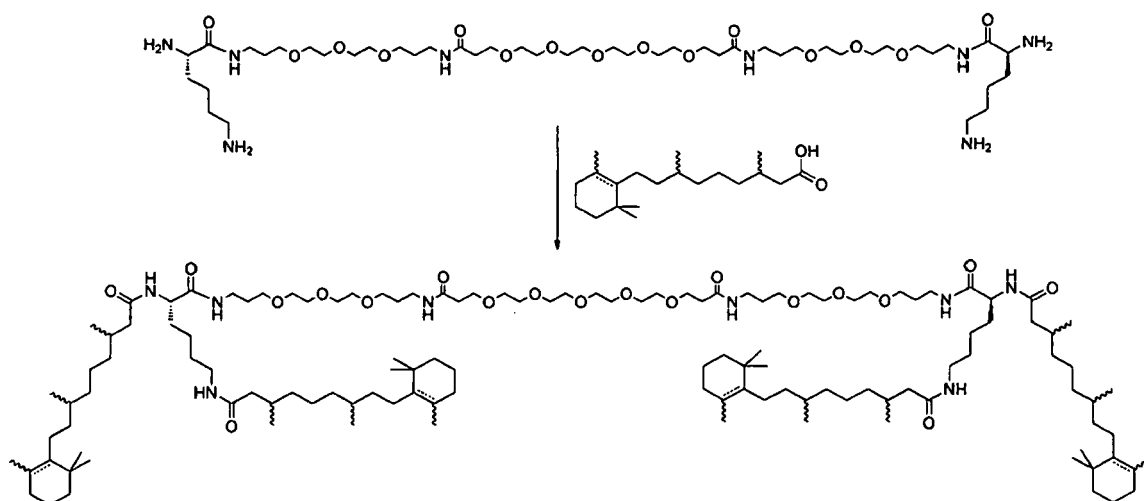


10

Se disolvió ácido todo-trans-retinoico (2000 mg, 6,66 mmol) en hexanos/IPA (3:1, 40 ml) con ayuda de sonicación. Se colocó el material en una botella de agitador Parr y se purgó con gas inerte. Se añadió Pd al 10%/C (200 mg) y se purgó el recipiente una vez más con gas inerte. Se colocó el material en el agitador Parr durante la noche con >70 psi de gas hidrógeno. Después se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite y se concentró para producir ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico (2 g).

15

Preparación de satDIVA: N1,N19-bis((16S)-16-(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanamido)-24,28-dimetil-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida



20

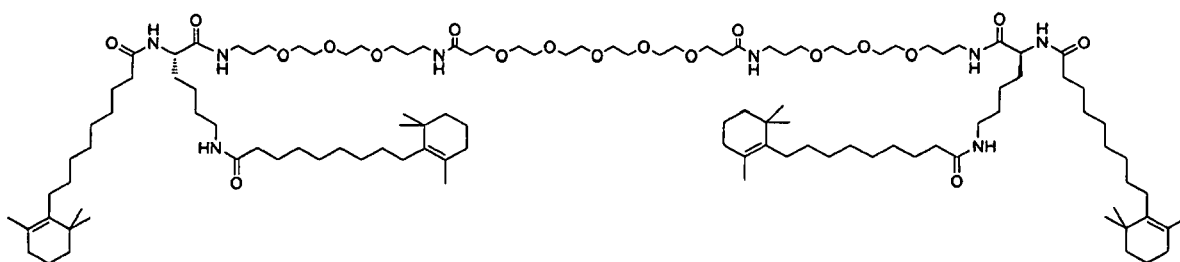
Se preparó N1,N19-bis((16S)-16-(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanamido)-24,28-dimetil-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida, también conocida como satDIVA, de una manera similar a diva-PEG-diVA a partir de la N1,N19-bis((S)-16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida anteriormente descrita con la sustitución de ácido todo-trans-retinoico por ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico. QTOF EM ESI+: m/z 2161, 2163, 2165 y 2167 ($M + H^+$)

25

Ejemplo 27: Síntesis de simDIVA (ejemplo preparativo)

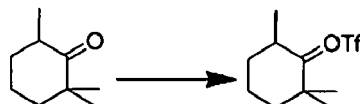
30

Preparación de N1,N19-bis((S)-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-16-(9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanamido)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida (simDiVA).



Preparación del producto intermedio 1: trifluorometanosulfonato de 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo

5



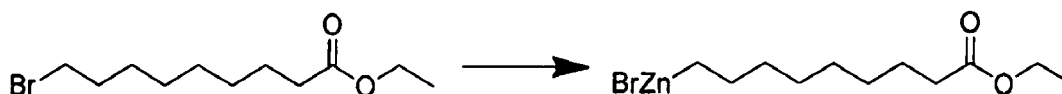
10

15

A una disolución de 2,2,6-trimetilciclohexanona en THF seco a -78°C bajo nitrógeno se le añadió gota a gota una disolución 2 M de diisopropilamida de litio. Se agitó la mezcla a -78°C durante 3 h. Después se añadió gota a gota una disolución de *N*-fenil-bis(trifluorometanosulfonimida) en THF (a -78°C). Se colocó el matraz de reacción en nieve carbónica y se agitó durante la noche. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 3 h tiempo en el cual todo el material se había disuelto. Se concentró la mezcla de reacción y se añadió el residuo lentamente a hexano (350 ml) con agitación vigorosa. Se retiró el material sólido mediante filtración y se lavó con hexano (2 x 50 ml). Se concentró el filtrado y se añadió más hexano (150 ml). Se retiró el material sólido mediante filtración y se concentró el filtrado. Se repitió la precipitación una vez más tras lo cual se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (sílice, hexano) para dar trifluorometanosulfonato de 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo como un aceite incoloro (23,2 g, rendimiento del 60%).

Preparación del producto intermedio 2: 9-(bromozincio)nonanoato de etilo

20

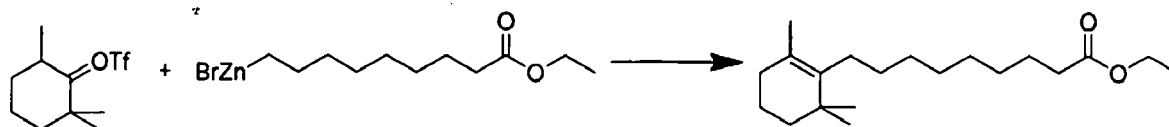


25

En un tubo de reacción seco bajo nitrógeno se cargaron polvo de zinc (3,70 g, 56,6 mmol), yodo (479 mg, 1,89 mmol) y DMA seca (20 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta que desapareció el color del yodo. Se añadió 9-bromononanoato de etilo, y se agitó la mezcla a 80°C durante 4 horas y después a temperatura ambiente durante la noche. (Se comprobó que se completó la reacción de inserción de zinc mediante análisis por CG-EM de la mezcla de reacción hidrolizada). Se usó la mezcla de reacción sin tratamiento adicional en la etapa posterior. CG-EM m/z 186 [M]⁺ (nonanoato de etilo).

30

Preparación del producto intermedio 3: 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo)nonanoato de etilo



35

40

45

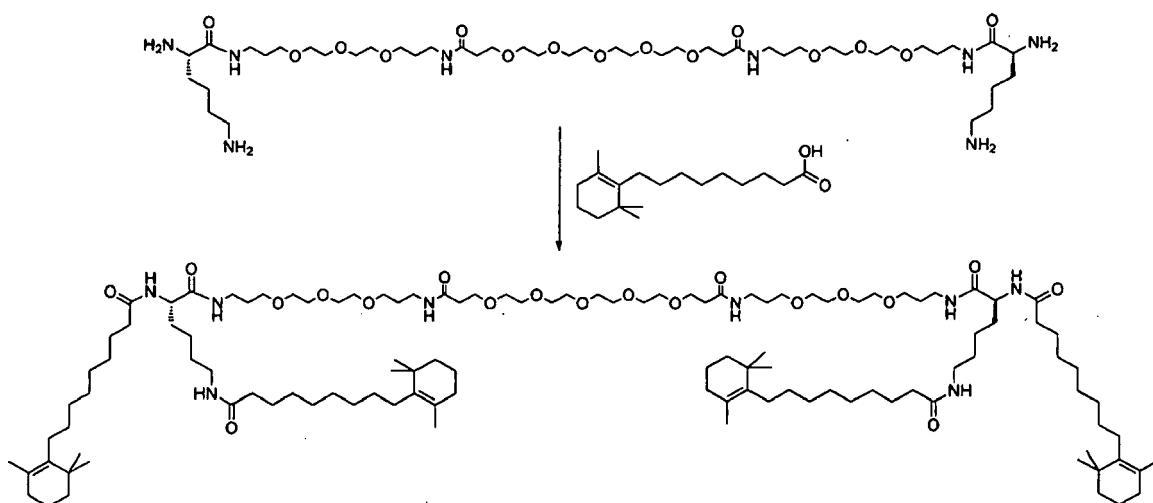
A 9-(bromozincio)nonanoato de etilo recién preparado (37,7 mmol) en dimetilacetamida bajo nitrógeno en un tubo de reacción se le añadió trifluorometanosulfonato de 2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo (10,8 g, 39,6 mmol) seguido por tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (872 mg, 0,754 mmol). Se selló el tubo y se agitó la mezcla a 95°C durante 2 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción y después se vertió en dietil éter (100 ml). Se decantó la fase superior y se lavó la fase inferior dos veces con dietil éter (2 x 25 ml). Se lavaron las fases de éter combinadas con NH_4Cl sat. y salmuera, se secaron (MgSO_4) y se concentraron para dar material en bruto (~12 g). Se purificó el material mediante cromatografía ultrarrápida (sílice, EtOAc a del 0 al 1,5% en hexano). Se agitó el aceite obtenido a vacío durante 8 h con el fin de retirar la mayor parte del producto secundario, nonanoato de etilo, y después se purificó mediante una segunda cromatografía ultrarrápida (sílice, tolueno a del 0 al 15% en hexano). Se analizaron las fracciones mediante CL-EM y CG-EM. Se recogieron las fracciones más puras y se concentraron a una temperatura inferior a 25°C para dar 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo)nonanoato de etilo como un aceite incoloro (6,16 g, rendimiento del 53% a lo largo de dos etapas). CL-EM ESI⁺ m/z 309 [M+H]⁺; CG-EM m/z 308 [M]⁺.

Preparación del producto intermedio 4: ácido 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-ilo)nonanoico



5 A 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoato de etilo (13,2 g, 42,9 mmol) en etanol (80 ml) se le añadió KOH 4 M (43 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se añadió agua (350 ml) y se lavó la disolución con terc-butil metil éter (2 x 100 ml). Se enfrió la fase acuosa de SimVA, se acidificó con HCl 4 M (~45 ml) y se extrajo con pentano (3 x100 ml). Se lavaron los extractos de pentano combinados con agua (200 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron, se concentraron y se secaron a alto vacío. Volvió a disolverse el material en pentano (100 ml), se concentró y se secó a alto vacío una vez más para dar ácido 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico como un aceite incoloro (11,1 g, rendimiento del 92%). EM ESI- m/z 279 [M-H].

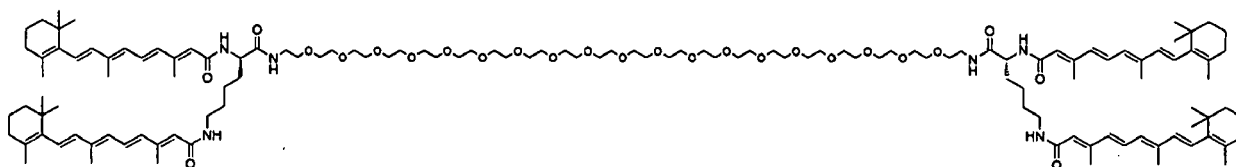
10 Preparación de simdiVA: N1,N19-bis((S)-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-16-(9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanamido)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida.



15 Se preparó simDIVA de una manera similar a diVA a partir de la N1,N19-bis((S)-16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida anteriormente descrita con la sustitución de ácido todo-trans-retinoico por ácido 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico. QTOF EM ESI+: m/z 2050 (M + H⁺)

20 Ejemplo 28: Síntesis de DiVA-PEG18 (ejemplo preparativo)

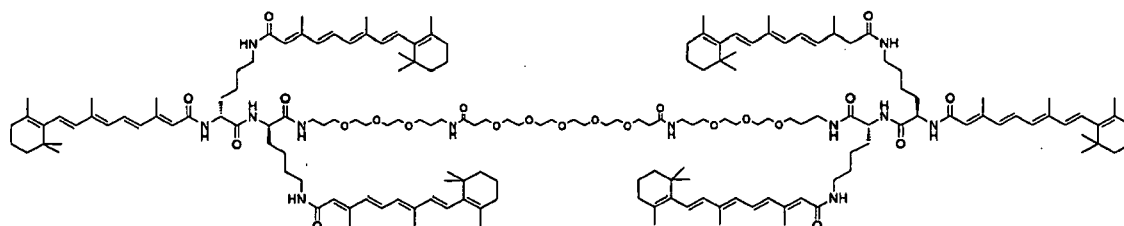
25 Preparación de (2E,2'E,2''E,4E,4'E,4''E,6E,6'E,6''E,8E,8'E,8''E)-N,N',N''-((5R,69R,76E,78E,80E,82E)-77,81-dimetil-6,68,75-trioxa-83-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64-nonadecaosa-7,67,74-triazatrioctaonta-76,78,80,82-tetraeno-1,5,69-triil)tris(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamida) (DIVA-PEG18).



30 Se preparó (2E,2'E,2''E,4E,4'E,4''E,6E,6'E,6''E,8E,8'E,8''E)-N,N',N''-((5R,69R,76E,78E,80E,82E)-77,81-dimetil-6,68,75-trioxa-83-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64-nonadecaosa-7,67,74-triazatrioctaonta-76,78,80,82-tetraeno-1,5,69-triil)tris(3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamida), también conocida como DiVA-PEG18, de una manera similar a diVA con la sustitución de diamido-dPEG₁₁-diamina por PEG₁₈-diamina. CL-EM ESI+: m/z 2305 (M + Na).

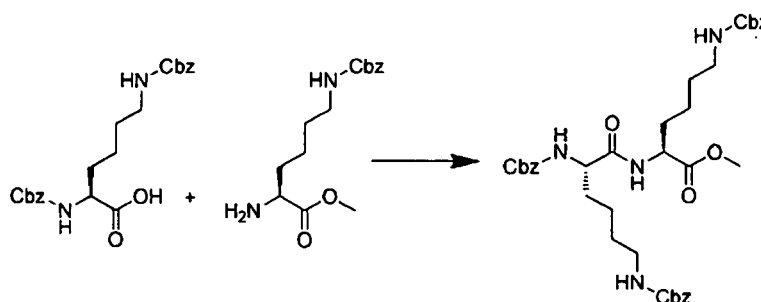
35 Ejemplo 29: Síntesis de TriVA (ejemplo preparativo)

Preparación de TriVA



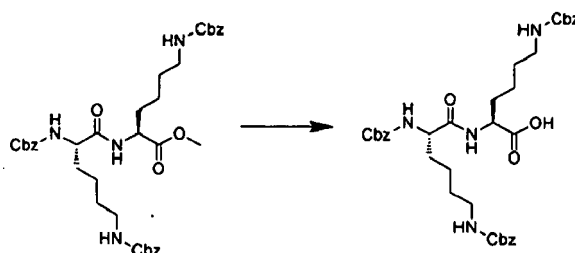
No pudo generarse un nombre para esta estructura

- 5 Preparación del producto intermedio 1: (S)-6-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((S)-2,6-bis(((benciloxi)carbonil)amino)hexanamido)hexanoato de metilo



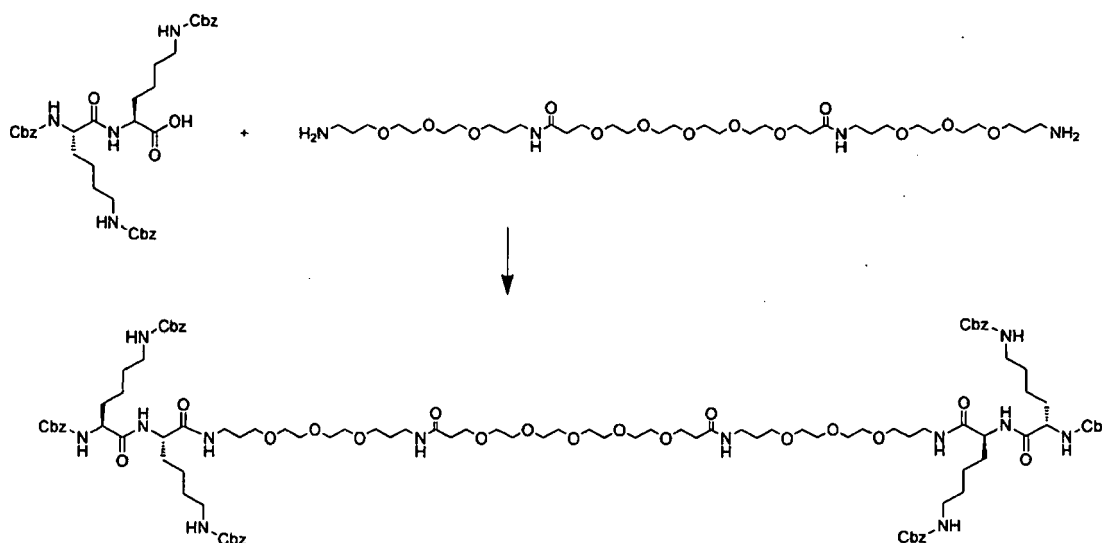
- 10 Se purgó un matraz con gas inerte y se suspendieron sal de HCl de H-Lys(Z)-OMe (4 g, 12,1 mmol), hidrato de HOBt (1,84 g, 13,6 mmol), Z-Lys(Z)-OH (5,64 g, 13,6 mmol) en diclorometano (50 ml). Se añadió NMM (1,5 ml, 13,6 mmol) a la suspensión y la disolución se volvió transparente. Se añadió una suspensión de sal de HCl de EDC (4,01 g, 20,9 mmol) y NMM (2,0 ml, 18,2 mmol) en diclorometano (50 ml) a lo largo de un periodo de 10 minutos. Se agitó la reacción durante la noche a temperatura ambiente, después se lavó con HCl 1 M (100 ml), H₂O (100 ml), disolución saturada de bicarbonato (100 ml) y disolución saturada de salmuera (100 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a retroextracción con diclorometano (50 ml). Se secaron las fases orgánicas con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir (S)-6-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((S)-2,6-bis(((benciloxi)carbonil)amino)hexanamido)hexanoato de metilo (6,91 g).

- 20 Preparación del producto intermedio 2: ácido (S)-6-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((S)-2,6-bis(((benciloxi)carbonil)amino)hexanamido)hexanoico



- 25 Se disolvió 6-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((S)-2,6-bis(((benciloxi)carbonil)amino)hexanamido)hexanoato (6,91 g, 10 mmol) con metanol (50 ml). Se añadió KOH (2,24 g, 40 mmol) y se dejó agitar la mezcla a 35°C. Tras 2 horas, se extinguió la reacción añadiendo H₂O (200 ml) y se lavó la mezcla con dietil éter (50 ml). Después de eso, se ajustó el pH a ~2 con HCl 1 M. Se extrajo el producto con diclorometano (3x100 ml), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para producir ácido (S)-6-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-((S)-2,6-bis(((benciloxi)carbonil)amino)hexanamido)hexanoico (4 g).

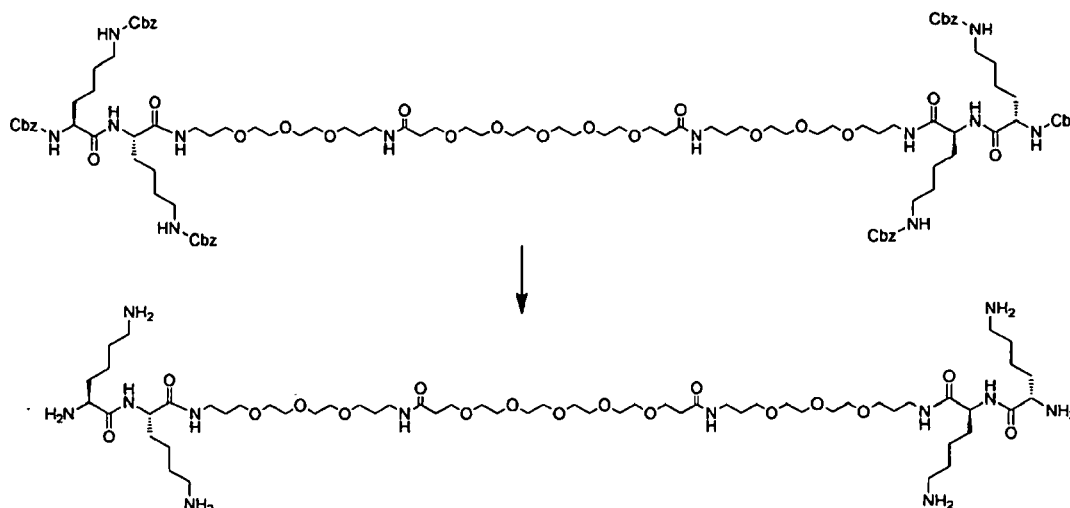
Preparación del producto intermedio 3: N1,N19-bis((16S,19S)-19,23-diamino-16-(4-aminobutil)-15,18-dioxo-4,7,10-trioxa-14,17-diazatricosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida protegida con (Cbz)₆



5 Se purgó un matraz de fondo redondo con gas inerte y se suspendieron diamido-dPEG11-diamina (1 g, 1,35 mmol), ácido (S)-6-(((benciloxi)carbonil)amino)-2-(((S)-2,6-bis(((benciloxi)carbonil)amino)hexanamido)hexanoic (2,05 g, 3,03 mmol), hidrato de HOBt (409 mg, 3,03 mmol) en diclorometano (25 ml). Se añadió NMM (333 ul, 3,03 mmol) a la suspensión y la disolución se volvió transparente. Se añadió una suspensión de HCl de EDC (893 mg, 4,66 mmol) y NMM (445 ul, 4,05 mmol) en diclorometano (25 ml) a lo largo de un periodo de 10 minutos. Se dejó agitar la reacción durante la noche a temperatura ambiente, después se lavó con HCl 1 M (100 ml), H₂O (100 ml), disolución saturada de bicarbonato (100 ml) y disolución saturada de salmuera (100 ml). Se sometieron todos los lavados

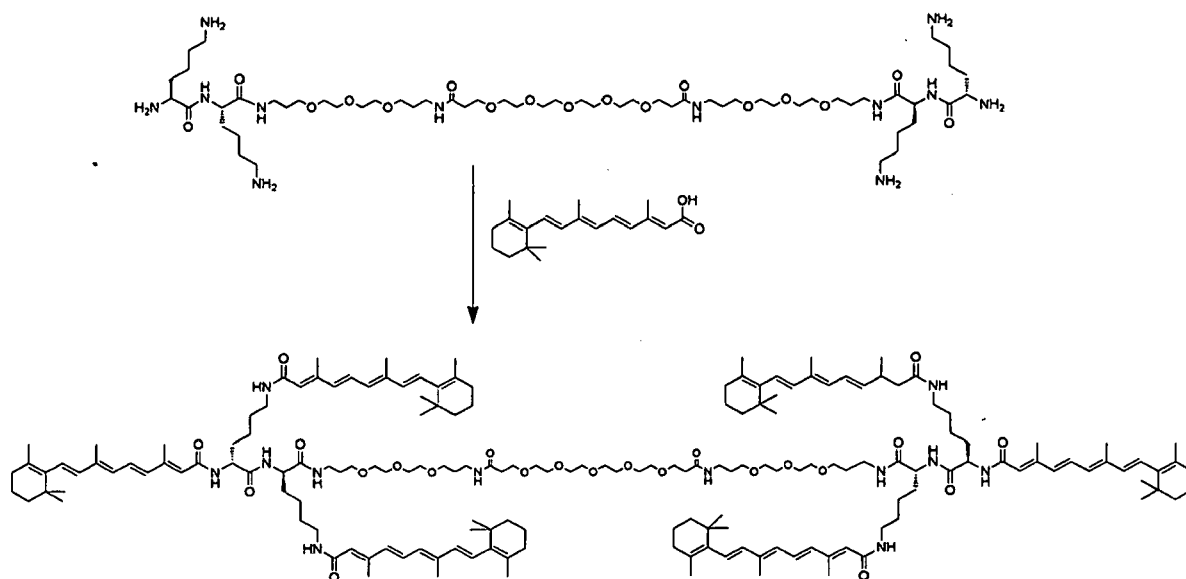
10 acuosos a retroextracción con diclorometano (50 ml). Se secaron las fases orgánicas con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el material mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol para producir N1,N19-bis((16S,19S)-19,23-diamino-16-(4-aminobutil)-15,18-dioxo-4,7,10-trioxa-14,17-diazatricosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida protegida con (Cbz)₆ (480 mg).

15 Preparación del producto intermedio 4: N1,N19-bis((16S,19S)-19,23-diamino-16-(4-aminobutil)-15,18-dioxo-4,7,10-trioxa-14,17-diazatricosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida



20 Se disolvió N1,N19-bis((16S,19S)-19,23-diamino-16-(4-aminobutil)-15,18-dioxo-4,7,10-trioxa-14,17-diazatricosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida protegida con (Cbz)₆ en metanol (30 ml) en un matraz de fondo redondo y se purgó con un gas inerte. Se añadió Pd al 10%/C (135 mg) y se purgó una vez más el matraz con gas inerte y después se retiró todo el aire mediante una bomba de vacío. Se añadió un globo de H₂ de 8" y se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente. Tras 2 horas, se retiró el Pd/C mediante filtración a través de un lecho de Celite lavando con metanol, y se concentró para producir N1,N19-bis((16S,19S)-19,23-diamino-16-(4-aminobutil)-15,18-dioxo-4,7,10-trioxa-14,17-diazatricosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida (823 mg).

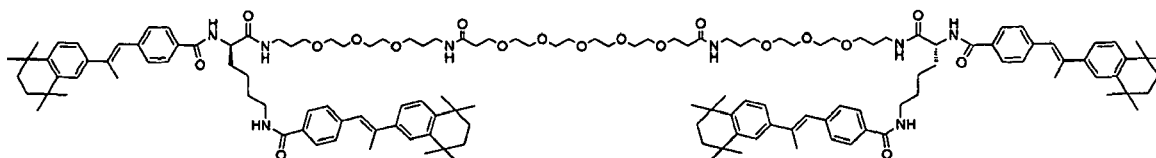
Preparación de TriVA



5 Se agitó N1,N19-bis((16S,19S)-19,23-diamino-16-(4-aminobutil)-15,18-dioxo-4,7,10-trioxa-14,17-diazatricosil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida en diclorometano y se añadieron DMAP y ácido retinoico. Se añadió NMM y se agitó la disolución en un matraz de fondo redondo cubierto con lámina de aluminio purgado con gas inerte a temperatura ambiente. Se añadió lentamente una suspensión de sal de HCl de EDC y NMM en diclorometano (20 ml) a la reacción a lo largo de un periodo de 10 minutos. Se dejó agitar la reacción durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se diluyó con diclorometano hasta 100 ml. Se lavó con H₂O (100 ml), disolución saturada de bicarbonato (100 ml) y disolución saturada de salmuera (100 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a retroextracción con diclorometano (50 ml). Se secaron las fases orgánicas con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el material mediante cromatografía de alúmina básica eluyendo con gradiente de diclorometano/etanol para producir TriVA (780 mg). CL-EM ESI+: *m/z* 2972 (M + Na).

15 Ejemplo 30: Síntesis de 4TTNPB (ejemplo preparativo)

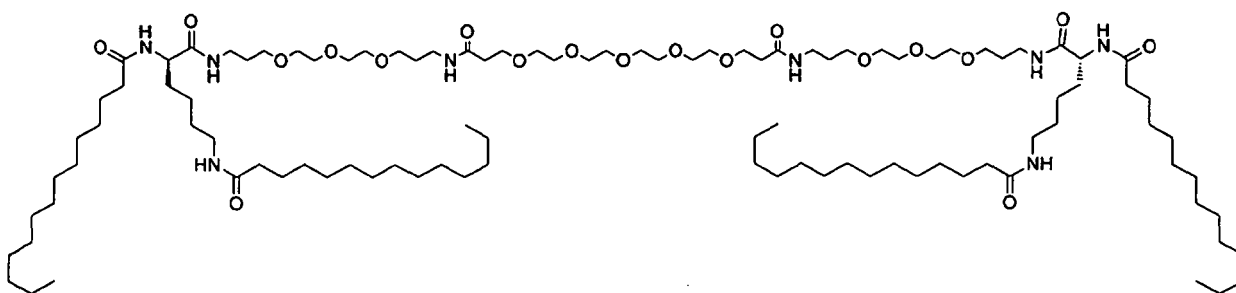
Preparación de N1,N19-bis((R)-1,8-dioxo-7-(4-((E)-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)prop-1-en-1-il)benzamido)-1-(4-((E)-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)prop-1-en-1-il)fenil)-13,16,19-trioxa-2,9-diazadocosan-22-il)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida (4TTNPB).



20 Se preparó N1,N19-bis((R)-1,8-dioxo-7-(4-((E)-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-il)prop-1-en-1-il)benzamido)-1-(4-((E)-2-(5,5,8,8-tetrametil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)prop-1-en-1-il)fenil)-13,16,19-trioxa-2,9-diazadocosan-22-il)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida, también conocida como 4TTNPB, de una manera similar a N1,N19-bis((S,23E,25E,27E,29E)-16-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)-24,28-dimetil-15,22-dioxo-30-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-4,7,10-trioxa-14,21-diazatriaconta-23,25,27,29-tetraen-1-il)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida, también conocida como diVA, a partir de N1,N19-bis((S)-16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida con la sustitución de ácido todo-trans-retinoico por TTNPB. CL-EM ESI+: *m/z* 2343 (M + Na).

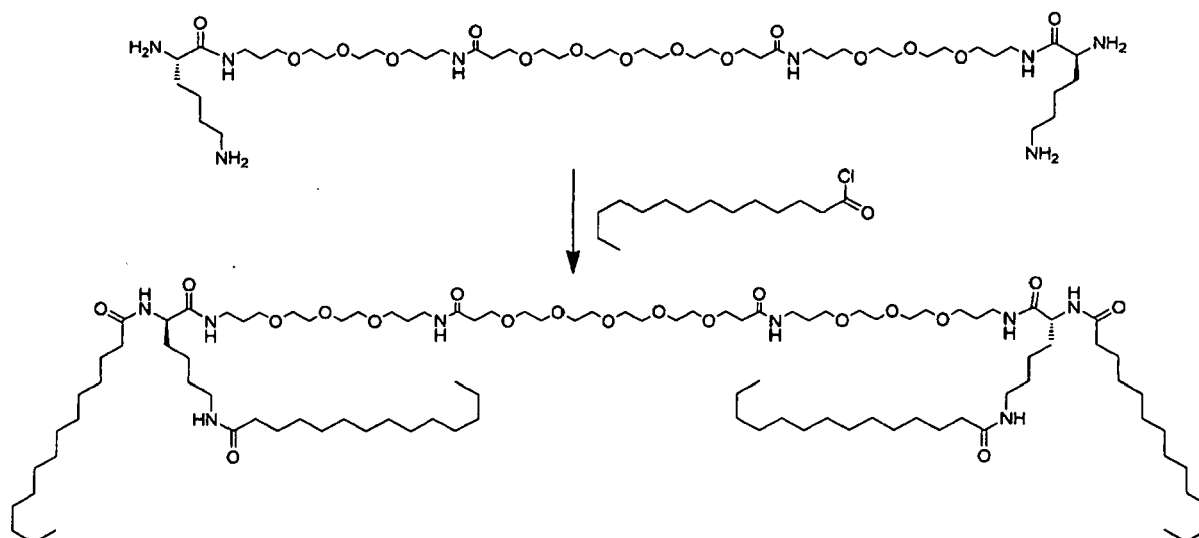
30 Ejemplo 31: Síntesis de 4Myr (ejemplo preparativo)

35 Preparación de N1,N19-bis((R)-15,22-dioxo-16-tetradecanamido-4,7,10-trioxa-14,21-diazapenta-triacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxanonadecano-1,19-diamida (4Myr).



Preparación de 4Myr: N1,N19-bis((R)-15,22-dioxo-16-tetradecanamido-4,7,10-trioxa-14,21-diaza-penta-triacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida

5



Se disolvió N1,N19-bis((S)-16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida (síntesis descrita anteriormente) en diclorometano y se colocó en un baño de hielo. Se añadió cloruro de miristoilo seguido por trietilamina. Se retiró el baño de hielo y se dejó agitar la reacción durante la noche a temperatura ambiente bajo una capa de gas inerte. Al día siguiente, se diluyó con diclorometano hasta 100 ml y se lavó con HCl 1 M (75 ml), H₂O (75 ml), disolución saturada de bicarbonato (75 ml) y disolución saturada de salmuera (75 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a retroextracción con diclorometano (25 ml). Se secaron las fases orgánicas con MgSO₄, se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol produjo N1,N19-bis((R)-15,22-dioxo-16-tetradecanamido-4,7,10-trioxa-14,21-diaza-penta-triacontil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida (410 mg). CL-EM ESI+: *m/z* 1841 (M + H).

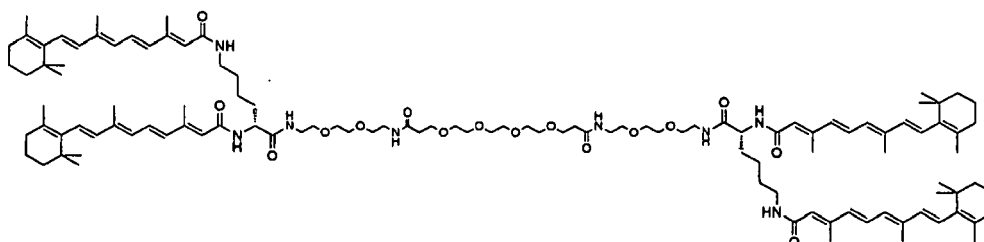
10

15

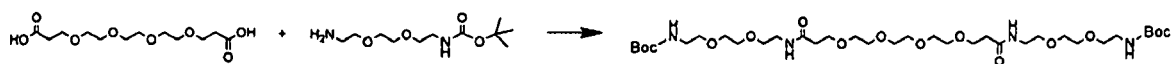
Ejemplo 32: Síntesis de DiVA-242 (ejemplo preparativo)

Preparación de N1,N16-bis((R,18E,20E,22E,24E)-11-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-ciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)-19,23-dimetil-10,17-dioxo-25-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-3,6-dioxa-9,16-diazapentacosá-18,20,22,24-tetraen-1-il)-4,7,10,13-tetraoxahexadecano-1,16-diamida, también conocida como DiVA-242

25

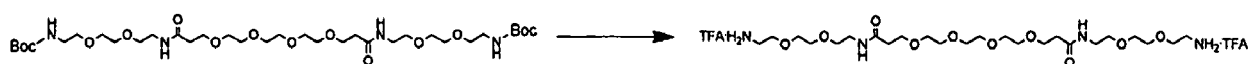


Preparación del producto intermedio 1: (10,25-dioxo-3,6,13,16,19,22,29,32-octaoxa-9,26-diazatetracontano-1,34-diil)dicarbamato de di-terc-butilo



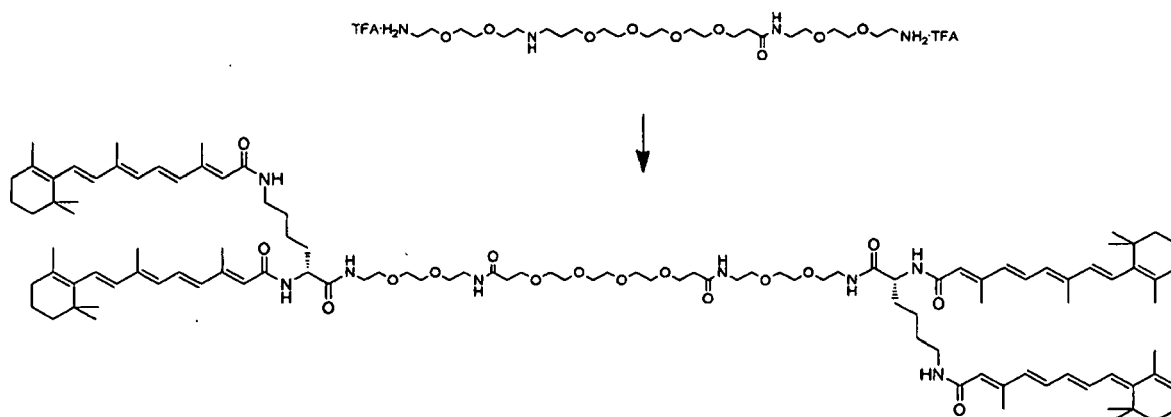
5 Se purgó un matraz de fondo redondo que contenía diclorometano (25 ml) con gas inerte y se añadieron ácido bis-dPeg₄ (1000 mg, 3,40 mmol), N-Boc-3,6-dioxa-1,8-octano-diamina (1816 ul, 7,65 mmol) e hidrato de HOBt (1034 mg, 7,65 mmol). Se añadió NMM (841 ul, 7,65 mmol) a la suspensión y la disolución se volvió transparente. Se añadió una suspensión de sal de HCl de EDC (2249 mg, 11,7 mmol) y NMM (1121 ul, 10,2 mmol) en diclorometano (25 ml) seguido por DMAP (62 mg, 0,51 mmol). Se dejó agitar la reacción durante la noche a temperatura ambiente. Después se diluyó con diclorometano hasta 100 ml y se lavó con H₂O (100 ml), K₂CO₃ al 10% (100 ml) y disolución saturada de salmuera (100 ml), se sometieron todos los lavados acuosos a retroextracción con diclorometano (30 ml), se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice con un gradiente de diclorometano/metanol produjo (10,25-dioxo-3,6,13,16,19,22,29,32-octaoxa-9,26-diazatetratriacontano-1,34-diil)dicarbamato de di-terc-butilo (2,57 g).

15 Preparación del producto intermedio 2: sal de TFA de N1,N16-bis(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4,7,10,13-tetraoxahexa-decano-1,16-diamida



20 Se disolvió (10,25-dioxo-3,6,13,16,19,22,29,32-octaoxa-9,26-diazatetratriacontano-1,34-diil)dicarbamato de di-terc-butilo en diclorometano (15 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se purgó el matraz de fondo redondo con gas inerte y se añadió TFA (15 ml). Se dejó agitar la mezcla durante 20 minutos. Después de eso, se concentró la mezcla de reacción para producir sal de TFA de N1,N16-bis(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4,7,10,13-tetraoxahexadecano-1,16-diamida (1885 mg).

25 Preparación de DIVA-242: N1,N16-bis((R,18E,20E,22E,24E)-11-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)-19,23-dimetil-10,17-dioxo-25-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-3,6-dioxa-9,16-diazapentacosa-18,20,22,24-tetraen-1-il)-4,7,10,13-tetraoxahexadecano-1,16-diamida



30 La síntesis de N1,N16-bis((R,18E,20E,22E,24E)-11-((2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nona-2,4,6,8-tetraenamido)-19,23-dimetil-10,17-dioxo-25-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-3,6-dioxa-9,16-diazapentacosa-18,20,22,24-tetraen-1-il)-4,7,10,13-tetraoxahexadecano-1,16-diamida (DIVA-242) sigue el mismo protocolo que diVA a partir de sal de TFA de N1,N16-bis(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-4,7,10,13-tetraoxahexadecano-1,16-diamida. CL-EM ESI+: m/z 1940 (M + H).

Ejemplo 33: Formación de partículas de ácido nucleico-lípido

40 El ARNip al que se hace referencia en los protocolos de formulación es una secuencia de ARNip bicatenario con 21 meros que selecciona como diana HSP47/gp46 en la que HSP47 (ratón) y gp46 (rata) son homólogos, el mismo gen en especies diferentes:

ARNip bicatenario de HSP47-C de rata usado para ensayo *in vitro* (pHSC de rata)

45 Sentido (5'->3') GGACAGGCCUCUACAACUATT (SEQ. ID NO. 2)

Antisentido (3'->5') TTCCUGUCCGGAUGUUGAU (SEQ. ID NO. 3)

ARNip bicatenario de HSP47-C de ratón usado en formulaciones para ensayo *in vivo* (modelo de CCl₄ de ratón)

Sentido (5'→3') GGACAGGCCUGUACAACUATT (SEQ. ID NO. 4)

Antisentido (3'→5') TTCCUGUCCGGACAUGUUGAU (SEQ. ID NO. 5)

Preparación de disolución madre de lípido catiónico. Se prepararon disoluciones madre de lípidos catiónicos combinando el lípido catiónico con DOPE, colesterol y diVA-PEG-diVA en etanol a concentraciones de 6,0, 5,1 y 2,7 y 2,4 mg/ml respectivamente. Si se necesitaba, se calentaron las disoluciones hasta aproximadamente 50°C para facilitar la disolución de los lípidos catiónicos en disolución.

Preparación de liposoma vacío. Se inyectó una disolución madre de lípido catiónico en una mezcla acuosa con agitación rápida a 35-40°C a través de aguja(s) de inyección a 1,5 ml/min por orificio de inyección. La proporción de disolución madre de lípido catiónico con respecto a disolución acuosa (v/v) se fija a 35:65. Tras mezclar, se formaron vesículas vacías de manera espontánea. Después se dejaron equilibrar las vesículas resultantes a 35-40°C durante 10 minutos antes de reducir el contenido en etanol hasta ~12%. Después se diafiltraron los liposomas vacíos frente a 10X volúmenes de tampón acuoso para eliminar el etanol.

Preparación de lipoplejo. Se diluyó la vesícula vacía preparada según el método anterior hasta el volumen final de una concentración de 1 mM de lípido catiónico mediante sacarosa al 9%. A la disolución con agitación se le añadieron 100 µl de glucosa al 5% en agua libre de ARNasa por cada ml de la vesícula vacía diluida ("EV") y se mezcló exhaustivamente. Después se añadieron 150 µl de disolución de ARNip 10 mg/ml en agua libre de ARNasa de una vez y se mezcló exhaustivamente. Después se diluyó la mezcla con disolución de glucosa al 5% con 1,750 ml por cada ml de la EV usada. Se agitó la mezcla a aproximadamente 200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Usando una membrana semipermeable con MWCO de ~100000 en un sistema de ultrafiltración de flujo cruzado usando una bomba peristáltica elegida apropiadamente (por ejemplo Midgee Hoop, UFP-100-H24LA), se concentró la mezcla hasta aproximadamente 1/3 del volumen original (o volumen deseado) y después se diafiltró frente a 5 veces el volumen de muestra usando una disolución acuosa que contenía sacarosa al 3% y glucosa al 2,9%. Después se filtró el producto a través de un filtro combinado con un tamaño de poro de 0,8/0,2 micrómetros en condiciones asépticas antes de su uso.

Formación de liposomas que contienen ARNip distintos de diVA. Se solubilizaron lípido catiónico, DOPE, colesterol y un lípido conjugado con PEG en etanol absoluto (200 proof) a una proporción molar de 50:10:38:2. Se solubilizó el ARNip en tampón de citrato 50 mM y se ajustó la temperatura hasta 35-40°C. Después se añadió la mezcla de etanol/lípido al tampón que contenía ARNip mientras se agitaba para formar espontáneamente liposomas cargados con ARNip. Se combinaron lípidos con ARNip para alcanzar una proporción final de lípido total con respecto a ARNip de 15:1 (p:p). El intervalo puede ser de 5:1 a 15:1, preferiblemente de 7:1 a 15:1. Se diafiltraron los liposomas cargados con ARNip frente a 10X volúmenes de PBS (pH 7,2) para eliminar el etanol e intercambiar el tampón. Se filtró el producto final a través de un filtro de PES de calidad para esterilización, de 0,22 µm, para la reducción de la biocarga. Este procedimiento produjo liposomas con un diámetro medio de partícula de 50-100 nm, PDI <0,2, y eficacia de atrapamiento de >85%.

Formación de liposomas que contienen ARNip cosolubilizados con diVA. Se prepararon formulaciones de ARNip-diVA-liposoma usando el método descrito anteriormente. Se cosolubilizó DiVA-PEG-diVA en etanol absoluto con los demás lípidos (lípido catiónico, DOPE, colesterol y lípidos conjugados con PEG a una proporción de 50:10:38:2) antes de la adición al tampón que contenía ARNip. El contenido molar de diVA-PEG-diVA osciló entre 0,1 y 5 de proporción molar (50:10:38:2:0,1 a 50:10:38:2:5). Este procedimiento produjo liposomas con un diámetro medio de partícula de 50-100 nm, PDI <0,2, y eficacia de atrapamiento de >85%.

Formación de liposomas que contienen ARNip con lípidos catiónicos. Se prepararon formulaciones de ARNip-diVA-liposoma y formulaciones de ARNip-liposoma usando el método descrito anteriormente. El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, HEDC, HEDODC, DC-6-14 (comparativo), o cualquier combinación de estos lípidos catiónicos.

Formación de liposomas que contienen ARNip decorados con diVA. Se prepararon formulaciones de ARNip-liposoma usando el método descrito anteriormente y se diluyeron hasta una concentración de ARNip de 0,5 mg/ml en PBS. El lípido catiónico puede ser HEDC, HEDODC, DC-6-14 (comparativo), o cualquier combinación de estos lípidos catiónicos. Se disolvió diVA-PEG-diVA en etanol absoluto (200 proof) hasta una concentración final que oscilaba entre 10 y 50 mg/ml. Se añadió una cantidad apropiada de disolución de etanol a la disolución de ARNip-liposoma para producir un porcentaje molar final de entre el 2 y el 10% en moles. Se aspiró y se reintrodujo la disolución repetidamente con una pipeta para mezclar. Se ajustaron la concentración de diVA-PEG-diVA y el volumen de adición de etanol para mantener el volumen de adición >1,0 µl y la concentración de etanol final < 3% (vol/vol). Después se agitaron suavemente los liposomas decorados a temperatura ambiental durante 1 h en un agitador orbital antes de la evaluación *in vitro* o *in vivo*.

Las siguientes tablas exponen realizaciones preferidas de la invención expresadas en cuanto a proporciones molares, así como los % en moles y porcentajes en peso equivalentes.

Formulación	Proporción molar				
	Lípido catiónico	DOPE	Colesterol	PEG-lípido	diVA
Liposoma de HEDODC	50	10	38	2	-
Liposoma de HEDODC +diVA	50	10	38	2	5
Lipoplejo de DC-6-14*	40	30	30	-	-
Lipoplejo de DC-6-14 + diVA*	40	30	30	-	5

Formulación	% en moles				
	Lípido catiónico	DOPE	Colesterol	PEG-lípido	diVA
Liposoma de HE-DODC	50	10	38	2	-
Liposoma de HE-DODC + diVA	47,6	9,5	36,2	1,9	4,8
Lipoplejo de DC-6-14*	40	30	30	-	-
Lipoplejo de DC-6-14 + diVA*	38,1	28,6	28,6	-	4,8

Formulación	Por ciento en peso				
	Lípido catiónico	DOPE	Colesterol	PEG-lípido	diVA
Liposoma de HE-DODC	61,1	10,8	21,3	6,9	-
Liposoma de HE-DODC +diVA	52,9	9,3	18,4	5,9	13,4
DC-6-14-Lipoplejo*	43,8	37	19,2	-	-
DC-6-14-Lipoplejo+diVA*	37,2	31,4	16,3	-	15,0

5 *: comparativo

Ejemplo 34: Transfección con formulaciones liposomales

10 El método de transfección es el mismo para LX-2 y pHSC. Se mezclaron las formulaciones de liposoma o formulaciones de lipoplejo de la invención con medio de crecimiento a concentraciones deseadas. Se añadieron 100 µl de la mezcla a las células en una placa de 96 pocillos y se incubaron las células durante 30 min a 37°C en la incubadora con CO₂ al 5%. Tras 30 min, se sustituyó el medio por medio de crecimiento nuevo. Tras 48 h de transfección, se procesaron las células usando reactivos de lisis Cell-to-Ct® (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante.

15 *RT-PCR cuantitativa para medir la expresión de ARNm de HSP47 (qRT-PCR).* Se adquirieron ensayos TaqMan® de HSP47 y GAPDH y mezcla maestra para RT-PCR One-Step de Applied Biosystems. Cada reacción de PCR contenía la siguiente composición: 5 µl de mezcla para RT-PCR One-Step, 0,25 µl de mezcla de enzimas RT de TaqMan®, 0,25 µl de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (HSP47), 0,5 µl de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (GAPDH), 3,25 µl de agua libre de ARNasa, 0,75 µl de lisado celular, volumen total de 10 µl. Se usó GAPDH como control endógeno para la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de HSP47. Se realizó la RT-PCR cuantitativa en un sistema de PCR en tiempo real ViiA 7 (Applied Biosciences) usando un método de cuantificación relativa incorporado. Se normalizaron todos los valores a la expresión de HSP47 promedio de las células transfectadas de manera simulada y se expresaron como porcentaje de la expresión de HSP47 en comparación con la simulación.

25 *Experimentos in vivo:* Para este estudio se usaron ratones reproductores retirados C57B1/6 hembra (Charles River) con un intervalo de peso de 24-30 gramos. Se distribuyeron los animales aleatoriamente por peso en 10 grupos de 10 animales cada uno. Todos los procedimientos con animales los aprobó el IACUC de Bio-Quant y/o el veterinario encargado según fuera necesario y se trataron y documentaron todas las cuestiones de bienestar de los animales. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se extrajo sangre a través de la vena cava inferior.

35 Se indujo regulación por incremento de proteína de choque térmico 47 (HSP47) mediante inyección intraperitoneal de CCl₄ (CCl₄ en aceite de oliva, 1:7 (vol/vol), 1 µl por gramo de peso corporal) administrada cada dos días durante 7 días (días 0, 2, 4, 6). En el día 3 se trataron los ratones durante 4 días consecutivos (días 3, 4, 5, 6) con formulaciones de liposoma o lipoplejo de la invención o PBS mediante inyección i.v. en la vena de la cola. Un grupo de diez ratones (sin tratamiento) no recibieron ni tratamiento con CCl₄ ni inyección i.v. y sirvieron como grupo de control para la expresión génica de HSP47 normal.

40 Programa experimental

Día	0	1	2	3	4	5	6	7
Inyección i.p. de CCl ₄	X	X	X	X	X	X	X	
Inyección i.v. de artículo de prueba				X	X	X	X	
Toma de muestras (n=10)								X

En el día 7 y aproximadamente 24 horas tras la inyección i.v. final, se sacrificaron todos los ratones restantes y se sometieron los hígados a perfusión con PBS antes de recoger muestras de hígado para análisis mediante PCR. Se recogió una muestra de aproximadamente 150 mg de cada hígado de ratón y se colocó en 1,5 ml de reactivo de estabilización RNAlater (Qiagen) y se almacenó a 2-8°C hasta su análisis. No se recogieron muestras de hígado de zonas con necrosis y/o daño hepático claro y marcado.

Se extrajo ARN total de hígados de ratón usando columnas RNeasy (Qiagen) según el protocolo del fabricante. Se usaron 20 ng de ARN total para RT-PCR cuantitativa para medir la expresión de HSP47. Se adquirieron ensayos TaqMan® de HSP47 y GAPDH y mezcla maestra para RT-PCR One-Step de Applied Biosystems. Cada reacción de PCR contenía la siguiente composición: 5 µl de mezcla para RT-PCR One-Step, 0,25 µl de mezcla de enzimas RT de TaqMan®, 0,25 µl de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (HSP47), 0,5 µl de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (GAPDH), 3,25 µl de agua libre de ARNasa, 0,75 µl de ARN, volumen total de 10 µl. Se usó GAPDH como control endógeno para la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de HSP47. Se realizó una RT-PCR cuantitativa en un sistema de PCR en tiempo real ViiA 7 (Applied Biosciences) usando un método de cuantificación relativa incorporado. Se normalizaron todos los valores a la expresión de HSP47 promedio del grupo de animales sin tratamiento y se expresaron como porcentaje de la expresión de HSP47 en comparación con el grupo sin tratamiento.

Las formulaciones descritas en la figura 1 son las siguientes:

Formulación	Proporción molar				
	Lípido catiónico	DOPE	Colesterol	PEG-lípido	VA o conjugado de VA
Lipoplejo de DC-6-14 [#]	40	30	30	-	-
Lipoplejo de DC-6-14 + VA ^{*#}	40	30	30	-	40
Liposoma de HEDC	50	10	38	2	-
Liposoma de HEDC + VA-PEG-VA*	50	10	38	2	5
Liposoma de HEDC + diVA-PEG-diVA*	50	10	38	2	5

*VA-PEG-VA y diVA-PEG-diVA se añadieron mediante cosolubilización. VA se añadió mediante decoración tras el procedimiento

[#]: comparativo

Las formulaciones descritas en la figura 2 son las siguientes:

Formulación	Proporción molar				
	Lípido catiónico	DOPE	Colesterol	PEG-lípido	VA o conjugado de VA
Lipoplejo de DC-6-14 [#]	40	30	30	-	-
Lipoplejo de DC-6-14 + VA ^{*#}	40	30	30	-	40
Liposoma de DC-6-14 [#]	50	10	38	2	-
Liposoma de DC-6-14 + [#] diVA-PEGdiVA*	50	10	38	2	5
Liposoma de HEDODC	50	10	38	2	-
Liposoma de HEDODC + diva-PEG-diVA*	50	10	38	2	5

*diVA-PEG-diVA se añadió mediante cosolubilización. VA se añadió mediante decoración tras el procedimiento.

[#]: comparativo

Las formulaciones descritas en la figura 3 son las siguientes:

Formulación	Proporción molar				
	Lípido catiónico	DOPE	Colesterol	PEG-lípido	VA o conjugado de VA
Lipoplejo de DC-6-14 [#]	40	30	30	-	-
Lipoplejo de DC-6-14 + VA ^{*#}	40	30	30	-	40
Liposoma de HEDODC	50	10	38	2	-
Liposoma de HEDODC + diVA-PEGdiVA*	50	10	38	2	5

*diVA-PEG-diVA se añadió mediante cosolubilización. VA se añadió mediante decoración tras el procedimiento

#: comparativo

5

Ejemplo 35: Eficacia *in vitro* (pHSC) – respuesta a la dosis

Descripción del ensayo *in vitro* de pHSC:

10 Se incubaron células estrelladas hepáticas primarias (pHSC) en una placa de 96 pocillos con formulaciones (HEDC:S104:DOPE:Chol:Peg-DMPE:DiVA, 20:20:30:25:5:2) de concentración de ARNip creciente. Tras 30 minutos, se lavaron las células y se trataron con medio de crecimiento nuevo y se incubaron a 37°C durante 48 horas. En ese momento, se sometieron las células a lisis y se midieron los niveles de ARNm de gp46 y GAPDH mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®). Se normalizaron los niveles de ARNm de gp46 frente a los niveles de GAPDH.

15 Se expresan los niveles de gp46 normalizados como porcentaje de células de control sin tratar. La figura 4 muestra los resultados. Las barras de error indican las desviaciones estándar (n=3). El ajuste de los datos a una curva de dosis-respuesta sigmoidea usando Graphpad produjo una CE₅₀ de 11,8 nM.

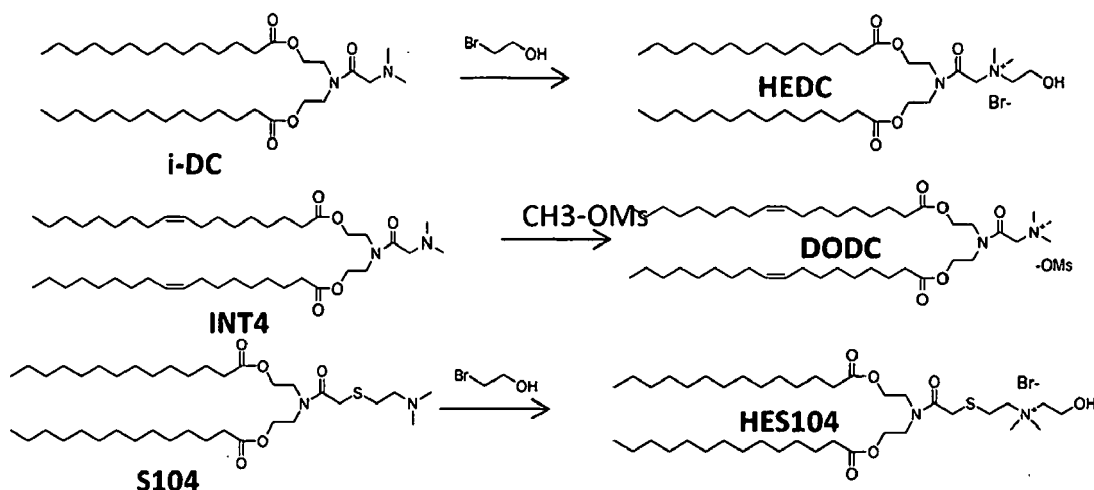
Ejemplo 36: Toxicidad

20

Descripción del ensayo de citotoxicidad de HepG2:

25 Se cultivaron células HepG2, una línea celular adherente derivada de carcinoma hepatocelular humano, en MEM/EBSS (Hyclone, Logan, Utah, n.º de cat. SH30024.01) complementado con FBS al 10% (Hyclone, Logan, Utah n.º de cat. SH30910). Se sembraron células HepG2 en placas negras Optilux de 96 pocillos (BD Falcon, n.º de cat. BD353220) a la densidad de 5000 células/pocillo durante la noche. Se añadieron formulaciones a cada pocillo hasta la concentración final de ARNip indicada (n=3). A las 48 h tras la adición de la formulación, se determinó la viabilidad celular usando un kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, n.º de cat. G7572) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la señal quimioluminiscente con un lector de microplacas de luminiscencia Clarity (502-Biotek, Winooski, Vermont). Se calculó la viabilidad basándose en el % de la señal quimioluminiscente en el pocillo tratado con formulación normalizado frente a pocillos tratados de manera simulada.

35 Tras explorar formulaciones con los lípidos catiónicos de amina cuaternaria más potentes de fórmula I, se evaluaron combinaciones de lípidos catiónicos de amina cuaternaria de fórmula I con sus respectivos precursores sintéticos ionizables (tal como se muestra en los siguientes ejemplos, i-DC* y HEDC, INT4* y DODC*, S104* y HES104 (*: compuesto que no es según la fórmula I de las reivindicaciones adjuntas)).



40

45 La siguiente tabla proporciona resultados a modo de ejemplo de diferentes formulaciones. Las combinaciones de lípidos catiónicos de amina cuaternaria con lípidos catiónicos ionizables fueron sorprendentes e inesperadamente menos tóxicas que los liposomas que contenían un único lípido catiónico (véanse los ejemplos HEDC frente a HEDC+ iDC; y DODC frente a DODC+INT4 en la siguiente tabla). Se identificó la combinación de HEDC+S104 como otra formulación preferida.

Descripción de la variante	Variantes de formulación	KD <i>in vitro</i> * (%)	Tox. <i>in vitro</i> (% de viabilidad celular, HepG2 a 200 nM)
Contenido en lípido catiónico	HEDC al 40% en moles,	90% a 200 nM	27%

ES 2 570 184 T3

	sin lípido ionizable		
(PEG-lípido al 2% en moles)	DODC al 50% en moles, sin lípido ionizable	90% a 200 nM	55%
	DODC al 25% en moles : INT4 al 25% en moles	90% a 200 nM	90%
	HEDC al 20% en moles : i- DC al 20% en moles	89% a 200 nM	57%
	HEDC al 20% en moles : S104 al 20% en moles	90% a 200 nM	52%
	HEDC al 10% en moles : S104 al 30% en moles	90% a 200 nM	71%
	HEDC al 5% en moles : S104 al 35% en moles	90% a 200 nM	80%
Contenido en PEG-lípido	2% en moles	70%	
(DMPE-PEG)	5% en moles	60%	
	7% en moles	55%	
	10% en moles	45%	
Contenido en DIVA	0,25% en moles	35%	
(con DMPE-PEG al 5% en moles)	0,5% en moles	40%	
	1,0% en moles	60%	
	2,0% en moles	70%	
Proporción de DOPE : colesterol	DOPE al 0% : colesterol al 55%	89%	
(con DMPE-PEG al 5% en moles)	DOPE al 5% : colesterol al 50%	82%	
	DOPE al 10% : colesterol al 45%	77%	
	DOPE al 15% : colesterol al 40%	74%	
	DOPE al 20% : colesterol al 35%	80%	
	DOPE al 25% : colesterol al 30%	79%	
	DOPE al 30% : colesterol al 25%	82%	
	DOPE al 35% : colesterol al 20%	80%	
	DOPE al 40% : colesterol al 15%	84%	
	DOPE al 45% : colesterol al 10%	80%	
	DOPE al 50% : colesterol al 5%	78%	
	DOPE al 55% : colesterol al 0%	72%	
Proporción de ARNip : lípido total	0,07	80%	
(con DMPE-PEG al 5% en moles)	0,09	75%	
	0,11	82%	
* Todos los datos con HEDC al 20% en moles, S104 al 20% en moles y DIVA al 2% en moles a una dosis de ARNip de 50 nM a menos que se indique lo contrario			

Toxicidad *in vivo*

- 5 La formulación de HEDC:S104 (20:20) se toleró excepcionalmente bien en estudios de toxicidad *in vivo* preliminares. No se observó ninguna toxicidad cuando se inyectó la formulación por vía intravenosa a dosis de hasta 25 mg/kg (rata) y 12 mg/kg (mono). Se consideró que esto era superior en este campo. Por ejemplo, Alnylam Pharmaceuticals el 1 de marzo de 2012 divulgó en la conferencia AsiaTIDES que sus nanopartículas de lípido de tercera generación menos tóxicas tenían un NOAEL de 10 mg/kg (dosis individual, rata).
- 10 Ejemplo 37: Eficacia *in vivo* (DMNQ de rata)

Se evaluó la actividad *in vivo* de la formulación diana en el modelo de daño hepático a corto plazo (denominado modelo rápido, DMNQ). En este modelo, el daño hepático a corto plazo inducido por tratamiento con un agente hepatotóxico tal como dimetilnitrosamina (DMN) va acompañado por el aumento de los niveles de ARNm de gp46. Para inducir estos cambios, a ratas Sprague-Dawley macho se les inyectó por vía intraperitoneal DMN en seis días consecutivos. Al final del periodo de tratamiento de DMN, se aleatorizaron los animales a grupos basándose en el peso corporal de animales individuales. Se administraron formulaciones como una única dosis intravenosa, una hora tras la última inyección de DMN. Veinticuatro horas después, se escindieron los lóbulos hepáticos y se determinaron los niveles de ARNm tanto de gp46 como de MRPL19 mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®). Se normalizaron los niveles de ARNm de gp46 frente a los niveles de MRPL19.

Se trataron ratas Sprague-Dawley macho con DMN a 10 mg/kg en los días 1, 2, 3 y a 5 mg/kg en los días 4, 5, 6 mediante administración de dosis por vía intraperitoneal para inducir daño hepático. A los animales (n = 8/grupo) se les inyectaron por vía intravenosa o bien formulaciones a una dosis de 0,5, 0,75, 1,0, 2 mg/kg de ARNip en una formulación que consistía en HEDC:S104:DOPE:Chol:Peg-DMPE:DiVA (20:20:30:25:5:2), o bien PBS (vehículo), una hora tras la última inyección de DMN. Veinticuatro horas después, se purificó ARNip total a partir de una sección del lóbulo hepático derecho de cada animal y se almacenó a 4°C hasta el aislamiento de ARN. Los grupos de control incluyeron un grupo de vehículo de PBS (tratado con DMN) y grupo sin tratamiento (no tratado; sin DMN). La figura 5 muestra los resultados de las mediciones. Tras restar los niveles de ARNm de gp46 de fondo determinados a partir del grupo sin tratamiento, se normalizaron todos los valores de grupo de prueba frente al ARNm de gp46 promedio del grupo de vehículo (expresado como porcentaje del grupo de vehículo). El nivel de ARNm de gp46 medio tras el tratamiento mostró una respuesta dependiente de la dosis y el ajuste de la curva a una curva de dosis-respuesta sigmoidea produjo una CE₅₀ de 0,79 mg/kg.

Ejemplo 38: Eficacia *in vivo* (DMNC de rata)

Se trataron ratas Sprague Dawley macho (130-160 g) con DMN mediante administración de dosis intraperitoneal para inducir fibrosis hepática. El régimen de tratamiento con DMN fue de 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) con 10 mg/kg (es decir, 5,0 mg/ml de DMN a una dosis de 2,0 ml/kg de peso corporal) durante las 3 primeras semanas y media dosis de 5 mg/kg (es decir, 5 mg/ml de DMN a una dosis de 1,0 ml/kg) desde el día 22 hasta el 57. A los animales del grupo de simulación se les inyectó PBS (disolvente para DMN) usando el mismo calendario. En el día 22, 24 h tras el último tratamiento con DMN, se extrajeron muestras de sangre y se sometieron a ensayo para detectar biomarcadores de enfermedad hepática para confirmar la eficacia del tratamiento con DMN. Se asignaron los animales tratados con DMN a diferentes grupos de tratamiento basándose en el peso corporal para garantizar que los pesos corporales medios y el intervalo de pesos corporales de los animales en cada grupo no tenían ninguna diferencia significativa. Se sacrificaron los animales del grupo de pretratamiento en el día 25 para evaluar el estadio de progresión de la enfermedad antes de comenzar el tratamiento. Se comenzaron tratamientos con formulaciones que contenían ARNip de gp46 en el día 25 con 2 tratamientos/semana a la dosis de ARNip especificada un total de 10 veces. En el día 59, 48 horas tras el último tratamiento con formulación y 72 horas tras el último tratamiento con DMN, se sacrificaron los animales mediante inhalación de CO₂. Se escindieron lóbulos hepáticos y se determinaron los niveles de ARNm tanto de gp46 como de MRPL19 mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®). Se normalizaron los niveles de ARNm para gp46 frente a los niveles de MRPL19.

Se trataron ratas Sprague-Dawley macho con DMN a 10 mg/kg durante tres semanas (tres veces/semana) y después a 5 mg/kg desde el día 22 hasta el 57 (tres veces/semana) mediante administración de dosis intraperitoneal para inducir fibrosis hepática. A los animales (n = diez/grupo) se les inyectaron por vía intravenosa o bien formulaciones que consistían en HEDC:S104:DOPE:Chol:Peg-DMPE:DiVA (20:20:30:25:5:2) a 1,5, 1,0, 0,75 y 0,5 mg/kg de ARNip o bien PBS (vehículo) 10 veces (2 veces/semana), una hora tras la última inyección de DMN. En el día 59, se purificó ARNip total a partir de una sección del lóbulo hepático derecho de cada animal y se almacenó a 4°C hasta el análisis. Los grupos de control incluyeron un grupo de vehículo de PBS (inducido con DMN, tratado con PBS, n=7) y un grupo de simulación (tratado con PBS en lugar de DMN y formulación, n=10). La figura 6 muestra los resultados de las mediciones. Tras restar los niveles de ARNm de gp46 de fondo determinados a partir del grupo sin tratamiento, se normalizaron todos los valores de grupo de prueba frente al ARNm de gp46 promedio del grupo de vehículo (expresado como porcentaje del grupo de vehículo). Se sacrificaron los animales del grupo de pretratamiento (n=7) en el día 25 para evaluar el nivel de progresión de la enfermedad antes de comenzar el tratamiento. Un análisis de Anova de un factor seguido por prueba de Dunnett mostró un silenciamiento génico de gp46 significativo en todos los grupos de tratamiento en comparación con el grupo de vehículo (***, P<0,001).

La siguiente tabla resume los compuestos descritos en el presente documento y los resultados obtenidos sometiendo a prueba estos compuestos *in vivo* e *in vitro*.

Nombre de lípido catiónico	Estructura	% de KD <i>in vitro</i> (pHSC)	% de KD <i>in vivo</i> (DMNQ de rata)
----------------------------	------------	--------------------------------	---------------------------------------

ES 2 570 184 T3

Pr-HEDC		75% a 50 nM	
Pr-HE-DODC		73% a 50 nM	
HE-Et-DC		70% a 50 nM	
HE-Et-DODC		71% a 50 nM	
HE-Pr-DC		47% a 50 nM	
HE-Pr-DODC		75% a 50 nM	
HE2DODC		78% a 50 nM	
HEDC-DLin		50% a 50 nM	
HEDC		68% a 50 nM	52% a 0,5 mpk
HEDC-12*		0% a 50 nM	
HES104			
HES104DO			
HETU104DO			

*: comparativo

Ejemplo 39: Anti-fibrosis pulmonar *in vivo*

A ratas S-D macho (8 ratas/grupo, 8 semanas de edad, Charles River Laboratories Japan, Inc.) se les administraron una vez 0,45 mg de bleomicina (BLM) disuelta en 0,1 ml de solución salina en el pulmón mediante cánula intratraqueal (MicroSprayer, Penn-Century, Inc.) con anestesia, para producir un modelo de fibrosis pulmonar de bleomicina. Con este método, se produce una fibrosis significativa en el pulmón generalmente tras aproximadamente 2 semanas. Se administró la formulación de liposoma (1,5 mg/kg como cantidad de ARNip, 1 ml/kg en volumen, es decir, 200 μ l para una rata de 200 g) o PBS (1 ml/kg en volumen) a las ratas a través de la vena de la cola, comenzando desde las 2 semanas tras la administración de bleomicina, un total de diez veces (cada dos días). Se sacrificaron las ratas a los dos días tras el último tratamiento, se realizó una investigación histológica del tejido pulmonar (véase la figura 7). Se usó un ANOVA de un factor y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para la evaluación de la diferencia estadísticamente significativa.

Se fijó en formalina una parte del pulmón extirpado según un método de rutina, y se sometió a tinción de Azan (azocarmina, disolución de azul de anilina y naranja G).

Tal como se muestra mediante los resultados de puntuación histológica (puntuación de T. Ashcroft) en la figura 7, en el grupo de administración de formulación (tratamiento), la puntuación de fibrosis disminuyó significativamente.

Ejemplo 40: Evaluación *in vitro* de formulaciones de VA-ARNip-liposoma para determinar la eficacia de silenciamiento en línea celular LX-2 y células estrelladas hepáticas primarias (pHSC) de rata

Se hicieron crecer células LX2 (Dr. S.L. Friedman, Mount Sinai School of Medicine, NY) en DMEM (Invitrogen) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen) a 37°C en la incubadora con CO₂ al 5%. Se tripsinizaron las células usando disolución TryPLExpress (Invitrogen) durante 3 min a 37°C en la incubadora. Se determinó la concentración celular mediante recuento de células en hemocitómetro y se sembraron 3000 células/pocillo en las placas de 96 pocillos. Se hicieron crecer las células durante 24 h antes de la transfección.

Se aislaron células estrelladas hepáticas primarias (pHSC) de rata a partir de ratas Sprague-Dawley según el método anteriormente publicado (Nat. Biotechnol. 2008, 26(4):431-42). Se hicieron crecer pHSC en DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%. Se hicieron crecer las células hasta dos pases tras el aislamiento antes de usarlas para la selección *in vitro*. Se sembraron las células a la densidad celular de 1000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se hicieron crecer durante 48 h antes de usarlas para la transfección.

Transfección con formulaciones de VA-ARNip-liposoma. El método de transfección es el mismo para células LX-2 y pHSC. Se mezclaron las formulaciones de VA-ARNip-liposoma o VA-ARNip-lipoplejo con medio de crecimiento a concentraciones deseadas. Se añadieron 100 μ l de la mezcla a las células en una placa de 96 pocillos y se incubaron las células durante 30 min a 37°C en la incubadora con CO₂ al 5%. Tras 30 min, se sustituyó el medio por medio de crecimiento nuevo. Tras 48 h de transfección, se procesaron las células usando reactivos de lisis Cell-to-Ct (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante.

RT-PCR cuantitativa (q) para medir la expresión de ARNm de HSP47. Se adquirieron ensayos de TaqMan® de HSP47 y GAPDH y mezcla maestra para RT-PCR One-Step de Applied Biosystems. Cada reacción de PCR contenía la siguiente composición: 5 μ l de mezcla para RT-PCR One-Step, 0,25 μ l de mezcla de enzimas RT de TaqMan®, 0,25 μ l de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (HSP47), 0,5 μ l de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (GAPDH), 3,25 μ l de agua libre de ARNasa, 0,75 μ l de lisado celular, volumen total de 10 μ l. Se usó GAPDH como control endógeno para la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de HSP47. Se realizó la RT-PCR cuantitativa en un sistema de PCR en tiempo real ViiA™ 7 (Applied Biosciences) usando un método de cuantificación relativa incorporado. Se normalizaron todos los valores a la expresión de HSP47 promedio de las células transfectadas de manera simulada y se expresaron como porcentaje de la expresión de HSP47 en comparación con la simulación.

El ARNip al que se hace referencia en los protocolos de formulación es una secuencia de ARNip bicatenario con 21 meros que selecciona como diana HSP47/gp46 en la que HSP47 (ratón) y gp46 (rata) son homólogos, el mismo gen en especies diferentes:

ARNip bicatenario de HSP47-C de rata usado para el ensayo *in vitro* (pHSC de rata)

Sentido (5'→3') GGACAGGCCUCUACAACUATT (SEQ. ID NO. 1)

Antisentido (3'→5') TTCCUGUCCGGAUGUUGAU (SEQ. ID NO. 2).

Preparación de disolución madre de lípido catiónico. Se prepararon disoluciones madre de lípidos catiónicos combinando el lípido catiónico con DOPE, colesterol y diVA-PEG-DiVA en etanol a concentraciones de 6,0, 5,1 y 2,7

y 2,4 mg/ml respectivamente. Si se necesitaba, se calentaron las disoluciones hasta aproximadamente 50°C para facilitar la disolución de los lípidos catiónicos en la disolución.

5 Preparación de liposoma vacío. Se inyectó una disolución madre de lípido catiónico en una mezcla acuosa con agitación rápida de sacarosa al 9% a 40±1°C a través de aguja(s) de inyección a 1,5 ml/min por orificio de inyección. La proporción de disolución madre de lípido catiónico con respecto a la disolución acuosa (v/v) se fija a 35:65. Tras mezclar, se formaron vesículas vacías de manera espontánea. Después se dejaron equilibrar las vesículas resultantes a 40°C durante 10 minutos antes de reducir el contenido en etanol hasta ~12%.

10 Preparación de lipoplejo. Se diluyó la vesícula vacía preparada según el método anterior hasta el volumen final de una concentración de 1 mM de lípido catiónico mediante sacarosa al 9%. A la disolución con agitación se le añadieron 100 µl de glucosa al 5% en agua libre de ARNasa por cada ml de la vesícula vacía diluida ("EV") y se mezcló exhaustivamente. Después se añadieron 150 µl de disolución de ARNip 10 mg/ml en agua libre de ARNasa de una vez y se mezcló exhaustivamente. Después se diluyó la mezcla con disolución de glucosa al 5% con 15 1,750 ml por cada ml de la EV usada. Se agitó la mezcla a aproximadamente 200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Usando una membrana semipermeable con MWCO de ~100000 en un sistema de ultrafiltración de flujo cruzado usando una bomba peristáltica elegida apropiadamente (por ejemplo Midgee Hoop, UFP-100-H24LA), se concentró la mezcla hasta aproximadamente 1/3 del volumen original (o volumen deseado) y después se 20 diafiltró frente a 5 veces el volumen de muestra usando una disolución acuosa que contenía sacarosa al 3% y glucosa al 2,9%. Después se filtró el producto a través de un filtro combinado con un tamaño de poro de 0,8/0,2 micrómetros en condiciones asépticas antes de su uso.

25 Formación de liposomas que contienen ARNip distintos de diVA. Se solubilizaron lípido catiónico, DOPE, colesterol, y lípidos conjugados con PEG (por ejemplo, PEG-lípido) en etanol absoluto (200 proof) a una proporción molar de 50:10:38:2. Se solubilizó el ARNip en tampón de citrato 50 mM y se ajustó la temperatura hasta 35-40°C. Después se añadió la mezcla de etanol/lípido al tampón que contenía ARNip mientras se agitaba para formar espontáneamente liposomas cargados con ARNip. Se combinaron los lípidos con ARNip para alcanzar una proporción final de lípido total con respecto a ARNip de 15:1 (p:p). El intervalo puede ser de 5:1 a 15:1, preferiblemente de 7:1 a 15:1. Se diafiltraron los liposomas cargados con ARNip frente a 10X volúmenes de PBS 30 (pH 7,2) para eliminar el etanol e intercambiar el tampón. Se filtró el producto final a través de un filtro de PES de calidad para esterilización, de 0,22 µm, para la reducción de la biocarga. Este procedimiento produjo liposomas con un diámetro medio de partícula de 50-100 nm, PDI <0,2, eficacia de atrapamiento de >85%.

35 Formación de liposomas que contienen ARNip cosolubilizados con diVA. Se prepararon formulaciones de ARNip-diVA-liposoma usando el método descrito anteriormente. Se cosolubilizó diVA-PEG-diVA en etanol absoluto con los demás lípidos (lípido catiónico, DOPE, colesterol y lípidos conjugados con PEG a una proporción de 50:10:38:2) antes de la adición al tampón que contenía ARNip. El contenido molar de diVA-PEG-diVA osciló entre 0,1 y 5 de proporción molar. Este procedimiento produjo liposomas con un diámetro medio de partícula de 50-100 nm, PDI 40 <0,2, eficacia de atrapamiento de >85%.

45 Formación de liposomas que contienen ARNip con lípidos catiónicos. Se prepararon formulaciones de ARNip-diVA-liposoma y formulaciones de ARNip-liposoma usando el método descrito anteriormente. El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, DODC*, HEDC, HEDODC, DC-6-14*, o cualquier combinación de estos lípidos catiónicos (*: comparativo).

50 Formación de liposomas que contienen ARNip decorados con diVA. Se prepararon formulaciones de ARNip-liposoma usando el método descrito anteriormente y se diluyeron hasta una concentración de ARNip de 0,5 mg/ml en PBS. El lípido catiónico puede ser DODC*, HEDC, HEDODC, DC-6-14*, o cualquier combinación de estos lípidos catiónicos (*: comparativo). Se disolvió diVA-PEG-diVA en etanol absoluto (200 proof) hasta una concentración final que oscilaba entre 10 y 50 mg/ml. Se añadió una cantidad apropiada de disolución de etanol a la disolución de ARNip-liposoma para producir un porcentaje molar final de entre el 2 y el 10% en moles. Se aspiró y se reintrodujo la disolución repetidamente con una pipeta para mezclar. Se ajustaron la concentración de diVA-PEG-diVA y el volumen de adición de etanol para mantener el volumen de adición >1,0 µl y la concentración de etanol final < 3% (vol/vol). Después se agitaron suavemente los liposomas decorados a temperatura ambiental durante 1 h en un 55 agitador orbital antes de la evaluación *in vitro* o *in vivo*.

Resultados

60 La figura 8 muestra que la adición del conjugado de VA a liposomas mediante decoración mejoró la eficacia de silenciamiento de ARNip, potenciando la actividad de ARNip. Peg-lípido. La dosis para todas las muestras fue de 867 nM de ARNip de HSP47-C. Los resultados mostraron que en cada caso en el que se añadió conjugado de VA a liposomas, la actividad de ARNip se potenció en comparación con liposomas sin un retinoide y en comparación con liposomas decorados con retinol libre (no conjugado). RNAiMAX fue un reactivo de transfección comercial.

65 La figura 9 muestra que la adición de conjugados de VA a liposomas mediante cosolubilización mejora la eficacia de

silenciamiento de ARNip. Fueron liposomas que contenían DODC* con conjugados de VA añadidos mediante cosolubilización (*: comparativo). La formulación es de 50:10:38:2:X, en la que X = de 1 a 10 (DODC:DOPE:colesterol:PEG-lípido:conjugado de VA, proporción en moles). La concentración en cada caso fue de 100 nM de ARNip de HSP47-C. Los resultados muestran que la adición de conjugados de VA a liposomas mediante cosolubilización potencia la actividad de ARNip.

La figura 10 muestra que la adición de conjugado de VA a liposomas mediante cosolubilización mejora drásticamente la eficacia de silenciamiento de ARNip. Los resultados incluyen tres liposomas diferentes, DC-6-14*, DODC*, HEDODC con conjugados de VA añadidos mediante cosolubilización (*: comparativo). La formulación es la misma para todos, 50:10:38:2, lípido catiónico:DOPE:colesterol:Peg-lípido, variando únicamente el lípido catiónico. La concentración de ARNip es de 200 nM de ARNip de HSP47-C y es la misma para todos. Los resultados muestran que la adición de conjugado de VA a liposomas que tienen diferentes lípidos catiónicos potenció significativamente la actividad de ARNip, cuando se preparó mediante cosolubilización.

La figura 11 muestra que la adición de conjugados de VA a lipoplejos que tienen lípido catiónico DC-6-14* mediante cosolubilización, y ARNip que recubre el exterior del liposoma, potencia la actividad de ARNip (*: comparativo). La formulación es una formulación de lipoplejo al 40%, 40:30:30, DC-6-14:DOPE:colesterol. La concentración para todas las muestras es de 867 nM de ARNip de HSP47-C. Los resultados muestran que la adición de conjugado de VA a lipoplejos mediante cosolubilización potencia la actividad de ARNip.

La figura 12 muestra la adición de conjugado de VA a lipoplejos formados mediante cosolubilización en comparación con lipoplejos con conjugado de VA añadido mediante decoración. Estos resultados son de lipoplejos de DC-6-14* y DODC* (*: comparativo). La formulación consiste en 40:30:30, DC-6-14:DOPE:colesterol. La concentración en cada muestra es de 867 nM de ARNip de HSP47-C. La adición de conjugado de VA mediante cosolubilización mejora significativamente la eficacia de silenciamiento *in vitro*, con respecto a los conjugados de VA añadidos mediante decoración.

Ejemplo 41: Experimentos *in vivo*

Se usaron ratones reproductores retirados C57B1/6 hembra (Charles River) con un intervalo de peso de 24-30 gramos. Se distribuyeron los animales aleatoriamente por peso en 10 grupos de 10 animales cada uno. Todos los procedimientos con animales los aprobó el IACUC de Bio-Quant y/o el veterinario encargado según fuera necesario y se trataron y documentaron todas las cuestiones de bienestar de los animales. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se extrajo sangre a través de la vena cava inferior.

ARNip bicatenario de HSP47-C de ratón usado en formulaciones para el ensayo *in vivo* (modelo de CCl₄ de ratón)

Sentido (5'→3') GGACAGGCCUGUACAACUATT (SEQ. ID NO. 3)

Antisentido (3'→5') TTCCUGUCCGGACAUGUUGAU (SEQ. ID NO. 4)

Se indujo regulación por incremento de proteína de choque térmico 47 (HSP47) mediante inyección intraperitoneal de CCl₄ (CCl₄ en aceite de oliva, 1:7 (vol/vol), 1 µl por gramo de peso corporal) administrado cada dos días durante 7 días (días 0, 2, 4, 6). En el día 3 se trataron los ratones durante 4 días consecutivos (días 3, 4, 5, 6) con formulaciones de liposoma o lipoplejo de la invención o PBS mediante inyección i.v. en la vena de la cola. Un grupo de diez ratones (sin tratamiento) no recibieron ni tratamiento con CCl₄ ni inyección i.v. y sirvieron como grupo de control para la expresión génica de HSP47 normal.

Programa experimental

Día	0	1	2	3	4	5	6	7
Inyección i.p. de CCl ₄	X	X	X	X	X	X	X	
Inyección i.v. de artículo de prueba				X	X	X	X	
Toma de muestras (n=10)								X

En el día 7 y aproximadamente 24 horas tras la inyección i.v. final, se sacrificaron todos los ratones restantes y se sometieron los hígados a perfusión con PBS antes de recoger muestras de hígado para análisis mediante PCR. Se recogió una muestra de aproximadamente 150 mg de cada hígado de ratón y se colocó en 1,5 ml de reactivo de estabilización RNAlater (Qiagen) y se almacenó a 2-8°C hasta su análisis. No se recogieron muestras de hígado de zonas con necrosis y/o daño hepático claro y marcado.

Se extrajo ARN total de hígados de ratón usando columnas RNeasy® (Qiagen) según el protocolo del fabricante. Se usaron 20 ng de ARN total para RT-PCR cuantitativa para medir la expresión de HSP47. Se adquirieron ensayos TaqMan® de HSP47 y GAPDH y mezcla maestra para RT-PCR One-Step de Applied Biosystems. Cada reacción de PCR contenía la siguiente composición: 5 µl de mezcla para RT-PCR One-Step, 0,25 µl de mezcla de enzimas RT

de TaqMan®, 0,25 µl de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (HSP47), 0,5 µl de sonda de ensayo de expresión génica de TaqMan® (GAPDH), 3,25 µl de agua libre de ARNasa, 0,75 µl de ARN, volumen total de 10 µl. Se usó GAPDH como control endógeno para la cuantificación relativa de niveles de ARNm de HSP47. Se realizó RT-PCR cuantitativa en un sistema de PCR en tiempo real ViiA™ 7 (Applied Biosciences) usando un método de cuantificación relativa incorporado. Se normalizaron todos los valores frente a la expresión de HSP47 promedio del grupo de animales sin tratamiento y se expresaron como porcentaje de la expresión de HSP47 en comparación con el grupo sin tratamiento.

Ejemplo 42: Eficacia *in vitro* de conjugado de selección como diana de vitamina liposoluble, HEDC:S104:DOPE:Chol:PEG-DMPE:DiVA

Se sometieron a prueba formulaciones de liposoma con ARNip 50 nM. Los liposomas fueron o bien: HEDC:S104:DOPE:Chol:PEG-DMPE:DiVA (+DiVA) o bien controles que carecían de restos de vitamina A (-DiVA) y se incubaron en placas de 96 pocillos que contenían células estrelladas hepáticas de rata durante 30 minutos. Tras 30 minutos, se sustituyó el medio por medio de crecimiento nuevo. Cuarentaiocho horas después, se sometieron las células a lisis y se midieron los niveles de ARNm de gp46 y GAPDH mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®), y se normalizaron los niveles de gp46 frente a los niveles de GAPDH.

Eficacia *in vitro* (pHSC), el efecto de ARNip con DiVA al 2% fue eficaz con DiVA al 2% y tuvo una CE₅₀ de 14 nM. Se incubaron PHSC en placas de 96 pocillos con formulación que carecía de restos de vitamina A para la selección como diana (-DiVA), o formulación que incluía restos de vitamina A (+DiVA) a ARNip 50 nM. Tras 30 minutos, se sustituyó el medio por medio de crecimiento nuevo. Cuarentaiocho horas después, se sometieron las células a lisis y se midieron los niveles de ARNm de gp46 y GAPDH mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®), y se normalizaron los niveles de gp46 frente a los niveles de GAPDH. Se expresaron los niveles de gp46 normalizados como porcentaje de células de control simulado. Las barras de error indican desviaciones estándar (n=3). El nivel de gp46 medio tras el tratamiento que contenía DiVA es significativamente diferente del tratamiento de control simulado (P < 0,001) basándose en una prueba de la t unilateral.

COMPARACIÓN DE DiVA Y satDiVA

Se transfectaron formulaciones de liposoma en pHSC de rata durante 30 min en placas de 96 pocillos. Tras 48 horas, se procesaron las células usando reactivos de lisis Cells-to-Ct® (Applied Biosystems) y se cuantificaron los niveles de ARNm de HSP47 mediante qRT-PCR. Se normalizó la expresión de HSP47 frente a control simulado. Se determinó la CE₅₀ midiendo el silenciamiento (KD) de HSP47 a seis dosis semilogarítmicas de ARNip y ajustando los datos a la "función de dosis-respuesta sigmoidea clásica" en Graphpad Prism® 5.04.

Los resultados muestran que tanto DiVA como SatDiVA aumentaron la eficacia de KD (tabla a continuación y también figura 15). La CE₅₀ es de 12 nM para DiVA y la CE₅₀ es de 14 nM para Sat DiVA.

Conjugado de retinoide	Formulación	CE ₅₀ o % de KD <i>in vitro</i> (pHSC)	% de KD <i>in vivo</i> (DMNQ de rata)
DiVA	20:20 HEDC:S104 con DiVA al 2%	CE ₅₀ = 12 nM	60% a 0,75 mpk
satDiVA	20:20 HEDC:S104 con satDiVA al 2%	CE ₅₀ = 14 nM	74% a 0,75 mpk

Conjugado de retinoide frente a conjugado no retinoide

Se encontró que los conjugados de retinoide eran sistemáticamente más potentes *in vitro* con respecto a los equivalentes no retinoides (véase 4TTNBB y 4Myr frente a los equivalentes de conjugado de retinoide satDiVA y DiVA).

Compuesto (tipo de conjugado)	Formulación	CE ₅₀ o % de KD <i>in vitro</i> (pHSC)
DiVA (retinoide)	20:20 HEDC:S104 con DiVA al 2%	74% a 50 nM
satDiVA (retinoide)	20:20 HEDC:S104 con satDiVA al 2%	73% a 50 nM
4TTNPB (no retinoide)	20:20 HEDC:S104 con 4TTNPB al 2%	34% a 50 nM
4Myr (no retinoide)	20:20 HEDC:S104 con 4Myr al 2%	27% a 50 nM

Ejemplo 43: Eficacia *in vivo* de conjugado de selección como diana de vitamina liposoluble HEDC:S104:DOPE:Chol:PEG-DMPE:DiVA

Se evaluó la actividad *in vivo* de formulación de selección como diana en el modelo de daño hepático a corto plazo (denominado modelo rápido, DMNQ). En este modelo, se induce daño hepático a corto plazo mediante tratamiento con un agente hepatotóxico tal como dimetilnitrosamina (DMN), y está acompañado por el aumento de los niveles de ARNm de gp46. Para inducir estos cambios, se inyectó a ratas Sprague-Dawley macho por vía intraperitoneal DMN en seis días consecutivos. Al final del periodo de tratamiento con DMN, se aleatorizaron los animales a grupos basándose en el peso corporal de animal individuales. Se administraron formulaciones como una única dosis i.v., y

se administró una hora tras la última inyección de DMN. Veinticuatro horas después, se escindieron los lóbulos hepáticos y se determinaron los niveles de ARNm tanto de gp46 como de MRPL19 mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®). Se normalizaron los niveles de ARNm para gp46 frente a los niveles de MRPL19.

5 Los resultados (figura 16) muestran que es evidente una correlación entre la cantidad de conjugado de retinoide y la eficacia. Únicamente se requirió el 0,25% en moles para ver un efecto significativo en el modelo de DMNQ de rata. Con DiVA al 2% en moles se observa un silenciamiento robusto de la expresión de gp46. La figura 16 muestra ratas Sprague-Dawley macho que se trataron con DMN a 10 mg/kg en los días 1, 2, 3 y a 5 mg/kg en los días 4, 5, 6 mediante administración de dosis intraperitoneal para inducir daño hepático. A los animales (n = 8/grupo) se les inyectaron por vía intravenosa o bien formulaciones que contenían DiVA al 0, 0,25, 0,5, 1 y 2% a una dosis de 10
10 0,75 mg/kg de ARNip, o bien PBS (vehículo), una hora después de la última inyección de DMN. Veinticuatro horas después, se purificó el ARNip total a partir de una sección del lóbulo hepático derecho de cada animal y se almacenó a 4°C hasta el aislamiento de ARN. Los grupos de control incluyeron un grupo de vehículo de PBS (tratado con DMN) y grupo sin tratamiento (no tratado; sin DMN). Tras restar los niveles de ARNm de gp46 de fondo
15 determinados a partir del grupo sin tratamiento, se normalizaron todos los valores de grupo de prueba frente al ARNm de gp46 promedio del grupo de vehículo (expresado como porcentaje del grupo de vehículo).

Se trataron ratas Sprague Dawley macho (130-160 g) con DMN mediante administración de dosis intraperitoneal para inducir fibrosis hepática. El régimen de tratamiento con DMN fue de 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) con 10 mg/kg (es decir, 5,0 mg/ml de DMN a una dosis de 2,0 ml/kg de peso corporal) durante las 3 primeras semanas y media dosis de 5 mg/kg (es decir, 5 mg/ml de DMN a una dosis de 1,0 ml/kg) desde el día 22 hasta el 57. A los animales del grupo de simulación se les inyectó PBS (disolvente para DMN) usando el mismo calendario. En el día 22, 24 h tras el último tratamiento con DMN, se extrajeron muestras de sangre y se sometieron a ensayo para detectar biomarcadores de enfermedad hepática para confirmar la eficacia del tratamiento con DMN.
20 Se asignaron los animales tratados con DMN a diferentes grupos de tratamiento basándose en el peso corporal y para garantizar que los pesos corporales medios y el intervalo de pesos corporales de los animales en cada grupo no tenían ninguna diferencia significativa. Se sacrificaron los animales del grupo de pretratamiento en el día 25 para evaluar el estado de progresión de la enfermedad antes de comenzar el tratamiento. Se comenzaron tratamientos con formulaciones que contenían ARNip de gp46 en el día 25 con 2 tratamientos/semana a la dosis de ARNip especificada un total de 10 veces. En el día 59, 48 horas tras el último tratamiento con formulación y 72 horas tras el último tratamiento con DMN, se sacrificaron los animales mediante inhalación de CO₂. Se escindieron los lóbulos hepáticos y se determinaron los niveles de ARNm tanto de gp46 como de MRPL19 mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan®). Se normalizaron los niveles de ARNm para gp46 frente a los niveles de MRPL19.

35 Resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica que pueden realizarse diversas sustituciones y modificaciones en la descripción divulgada en el presente documento sin apartarse del alcance y el espíritu de la descripción. Tales realizaciones adicionales están dentro del alcance de la presente invención siempre que queden cubiertas por las siguientes reivindicaciones. La presente descripción le enseña a un experto en la técnica a someter a prueba diversas combinaciones y/o sustituciones de modificaciones químicas descritas en el presente documento para generar constructos de ácido nucleico con actividad mejorada para mediar en la actividad de iARN. Tal actividad mejorada puede incluir estabilidad mejorada, biodisponibilidad mejorada y/o activación mejorada de respuestas celulares que median en iARN. Por tanto, las realizaciones específicas descritas en el presente documento no son limitativas y un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que pueden someterse a prueba combinaciones específicas de las modificaciones descritas en el presente documento sin experimentación excesiva
40 para identificar moléculas de ácido nucleico con actividad de iARN mejorada dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Las descripciones descritas de manera ilustrativa en el presente documento pueden ponerse en práctica de manera adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no divulgadas específicamente en el presente documento. Por tanto, por ejemplo, los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la descripción (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse como que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye”, “que contiene”, etc. deben interpretarse de manera expansiva y sin limitación (por ejemplo, significando “que incluye, pero no se limita a”). Se pretende que la mención de intervalos de valores en el presente documento simplemente sirva como método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente de otro modo. Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, simplemente ilustre mejor la descripción y no plantee una limitación sobre el alcance de la descripción a menos que se reivindique lo contrario. No debe interpretarse que ninguna expresión en la memoria descriptiva indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la descripción. Adicionalmente, los términos y las expresiones empleados en el presente documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay ninguna intención al usar tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características

5 mostradas y descritas o partes de las mismas, sino que se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la descripción reivindicada. Por tanto, debe entenderse que aunque la presente descripción se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de las descripciones realizadas en las mismas divulgadas en el presente documento, y que se considera que tales modificaciones y variaciones están dentro del alcance de esta descripción.

10 La descripción se ha descrito de manera amplia y genérica en el presente documento. Cada una de las especies más estrechas y agrupamientos subgenéricos que se encuentran dentro de la divulgación genérica también forman parte de la descripción. Esto incluye la descripción genérica de la descripción eliminando la condición o limitación negativa cualquier contenido del género, independientemente de si el material extraído se menciona específicamente o no en el presente documento. Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones. Además, cuando se describen características o aspectos de la descripción en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la descripción también se describe de ese modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

Lista de secuencia

20 <110> NITTO DENKO CORPORATION

<120> COMPUESTOS PARA DIRIGIR LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS Y POTENCIAR LA ACTIVIDAD DE ARNip

25 <130> F3137WO (NITT-0017)

<140> Documento PCT/US2012/041753

<141> 08-06-2012

30 <150> 61/494.840

<151> 08-06-2011

<150> 61/494.710

35 <151> 08-06-2011

<160> 5

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2208

45 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 1

ES 2 570 184 T3

ucuuuggcuu	uuuuuggcgg	agcuggggcg	cccuccggaa	gcguuuccaa	cuuuccagaa	60
guuucucggg	acgggcagga	gggggugggg	acugccauau	auagaucccg	ggagcagggg	120
agcgggcuaa	gaguagaauc	gugucgcggc	ucgagagcga	gagucacguc	ccggcgcuag	180
cccagcccga	cccaggccca	ccguggugca	cgcaaaccac	uuccuggcca	ugcgcucccu	240
ccugcuucuc	agcgccuucu	gccuccugga	ggcggcccug	gccgccgagg	ugaagaaacc	300
ugcagccgca	gcagcuccug	gcacugcgga	gaaguugagc	ccaaggcgg	ccacgcuugc	360
cgagcgcagc	gccggccugg	ccuucagcuu	guaccaggcc	auggccaagg	accaggcagu	420
ggagaacauc	cuggugucac	ccgugguggu	ggccucgucg	cuagggcucg	ugucgcuggg	480
cggcaaggcg	accacggcgu	cgcaggccaa	ggcagugcug	agcgccgagc	agcugcgcga	540
cgaggaggug	cacgccggcc	ugggcgagcu	gcugcgcuca	cucagcaacu	ccacggcgcg	600
caacgugacc	uggaagcugg	gcagccgacu	guacggaccc	agcucaguga	gcuucgcuga	660
ugacuucgug	cgcagcagca	agcagcacua	caacugcgag	cacuccaaga	ucaacuuccg	720
cgacaagcgc	agcgcgcugc	aguccaucaa	cgaguggggc	gcgcagacca	ccgacggcaa	780
gcugcccgag	gucaccaagg	acguggagcg	cacggacggc	gcccugcuag	ucaacgccau	840
guucuucaag	ccacacuggg	augagaaauu	ccaccacaag	augguggaca	accguggcuu	900
cauggugacu	cgguccuaua	ccgugggugu	caugaugaug	caccggacag	gccucuacaa	960
cuacuacgac	gacgagaagg	aaaagcugca	aaucguggag	augccccugg	cccacaagcu	1020
cuccagccuc	aucauccuca	ugccccauca	cguggagccu	cucgagcgcc	uugaaaagcu	1080

ES 2 570 184 T3

gcuaacccaaa gagcagcuga agaucuggau ggggaagaug cagaagaagg cuguugccau 1140
 cuccuugccc aagggugugg uggaggugac ccaugaccug cagaaacacc uggcugggcu 1200
 gggccugacu gaggccauug acaagaacaa ggccgacuug ucacgcaugu caggcaagaa 1260
 ggaccuguac cuggccagcg uguuccacgc caccgccuuu gaguuggaca cagauggcaa 1320
 ccccuuugac caggacaucu acgggcgcga ggagcugcgc agccccaagc uguucuacgc 1380
 cgaccacccc uucaucuucc uagugcggga cacccaaagc ggcucccugc uauucauugg 1440
 gcgccugguc cggccuaagg gugacaagau gcgagacgag uuauagggcc ucagggugca 1500
 cacaggauug caggaggcau ccaaaggcuc cugagacaca ugggugcuau uggggugggg 1560
 ggggagguga gguaccagcc uuggauacuc cauggggugg ggguggaaaa acagaccggg 1620
 guccccgugu gccugagcgg accuucccag cuagaauuca cuccacuugg acaugggccc 1680
 cagauaccuau gaugcugagc ccggaaacuc cacauccugu gggaccuggg ccuagucuu 1740
 ucugccugcc cugaaagucc cagaucaagc cugccucaau caguauucau auuuauagcc 1800
 agguaccuuc ucaccuguga gaccaaauug agcuaggggg gucagccagc ccucuucuga 1860
 cacuaaaaca ccucagcugc cuccccagcu cuaucccaac cucucccaac uauaaaacua 1920
 ggugcugcag ccccugggac caggcacccc cagaauagcc uggccgcagu gaggcggauu 1980
 gagaaggagc ucccaggagg ggcuucuggg cagacucugg ucaagaagca ucgugucugg 2040
 cguugugggg augaacuuuu uguuuuguuu cuuccuuuuu uaguucuuca aagauagggg 2100
 ggggaagggg aacaugagcc uuuguugcua ucaauccaag aacuuuuug uacauuuuuu 2160
 uuuucaauaa aacuuuucca augacuuuu guuggagcgu ggaaaaaa 2208

<210> 2

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<220>

<221> fuente

20

<223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético"

<400> 2

25 ggacaggccu cuacaacuat t

21

<210> 3

<211> 21
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
10 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
<220>
15 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético"
20 <400> 3
uaguuguaga ggccugucct t 21
<210> 4
25 <211> 21
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
<220>
40 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético"
45 <400> 4
ggacaggccu guacaacuat t 21
<210> 5
50 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <220>
<221> fuente
60 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
<220>
<221> fuente
65 <223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético"

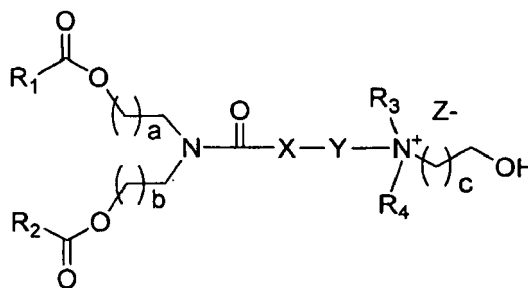
<400> 5

5 uaguuguaca gccugucct t

21

REIVINDICACIONES

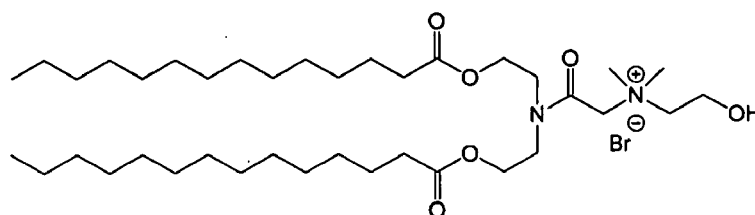
1. Compuesto de fórmula I



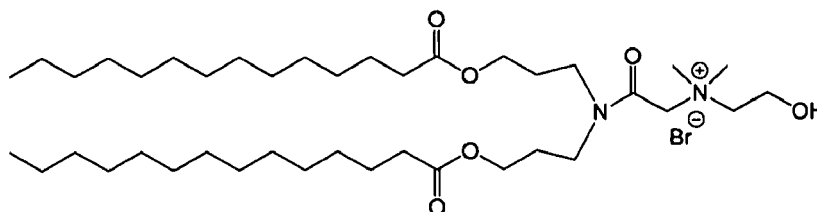
I

en la que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en grupo alquilo de C₁₂ a C₁₈, alquenoilo de C₁₂ a C₁₈ y oleilo; en la que R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en alquilo de C₁ a C₆, y alcohol de C₂ a C₆; en la que X se selecciona de un grupo que consiste en -CH₂-, -S- y -O- o está ausente; en la que Y se selecciona de -(CH₂)_n-, -S(CH₂)_n-, -O(CH₂)_n-, tiofeno y -SO₂(CH₂)_n-, en los que n = 1-4; en la que a = 1-4; en la que b=1-4; en la que c=1-4; y en la que Z es un contraión, preferiblemente un halógeno o mesitato y en la que dicho grupo alquenoilo se deriva de un grupo alquilo y contiene en la cadena de hidrocarburo lineal o ramificada uno o más dobles enlaces.

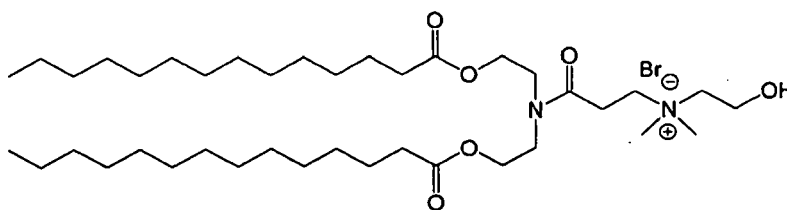
2. Compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en



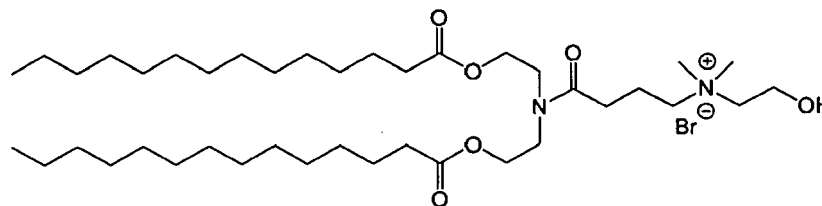
HEDC



Pr-HEDC

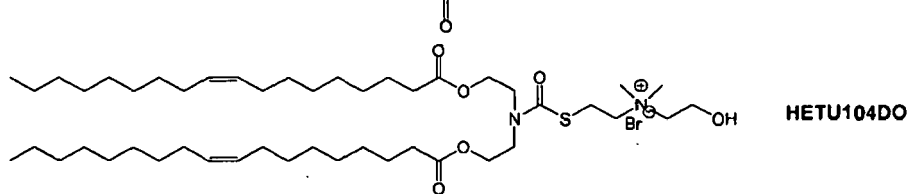
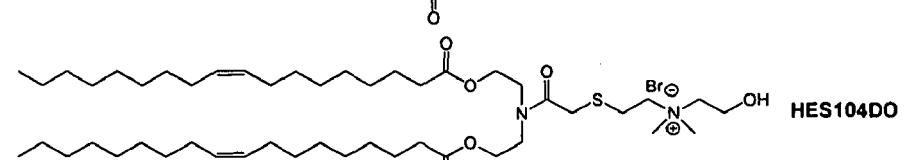
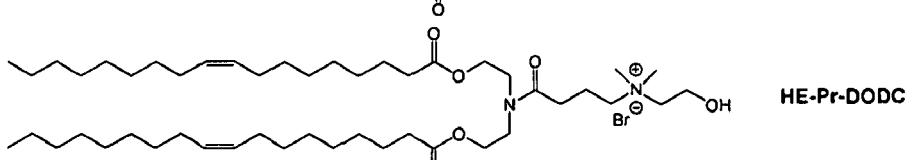
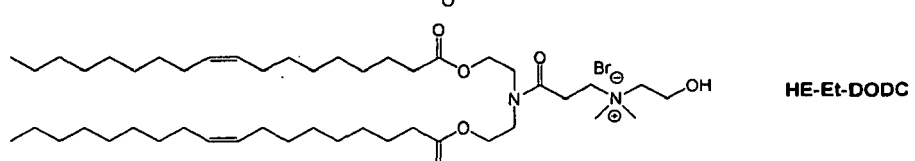
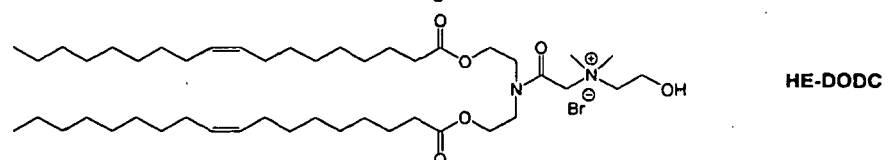
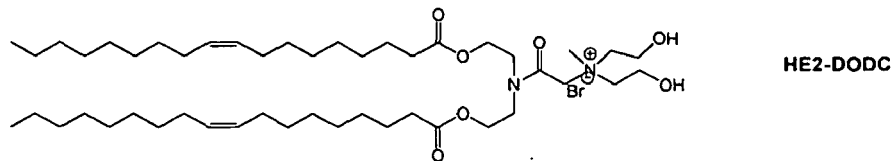
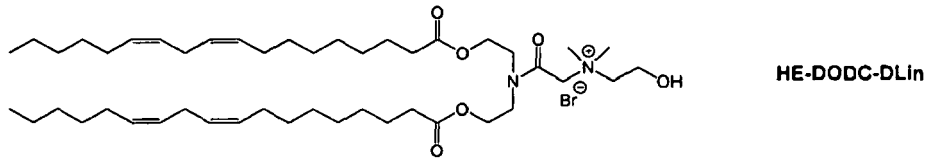
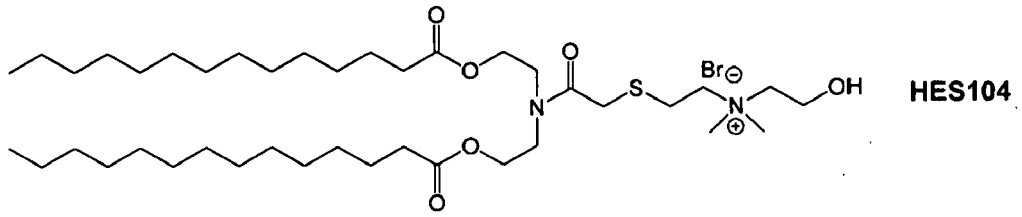


HE-Et-DC



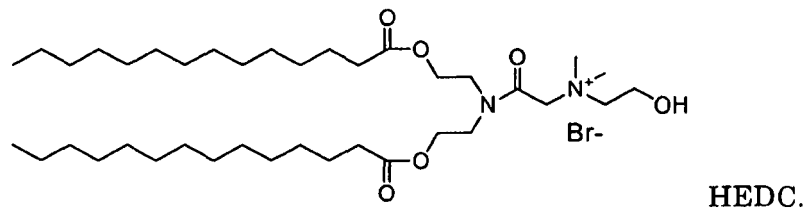
HE-Pr-DC

20



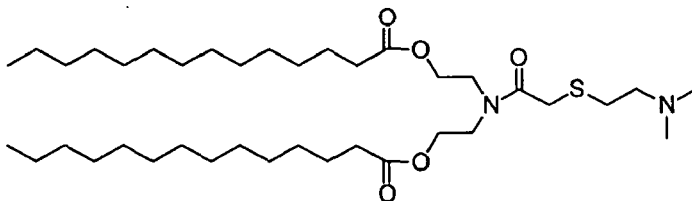
5

- 10 3. Composición que comprende un lípido catiónico que consiste en el compuesto según la reivindicación 1 ó 2, preferiblemente

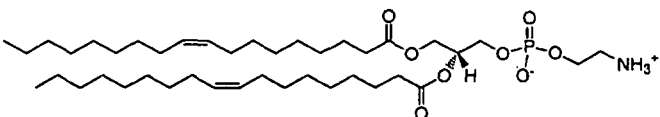


- 15 4. Composición según la reivindicación 3, que comprende una composición liposomal.

5. Composición según la reivindicación 4, que comprende además un lípido seleccionado del grupo que consiste en un PEG-lípido, preferiblemente PEG-DMPE (1,2-dimiristoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG), un lípido catiónico ionizable, preferiblemente

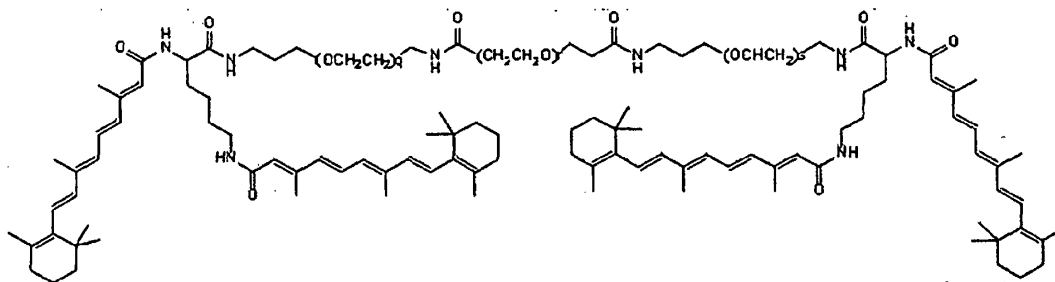


- 5 preferiblemente seleccionado de colesterol y fosfolípido tal como



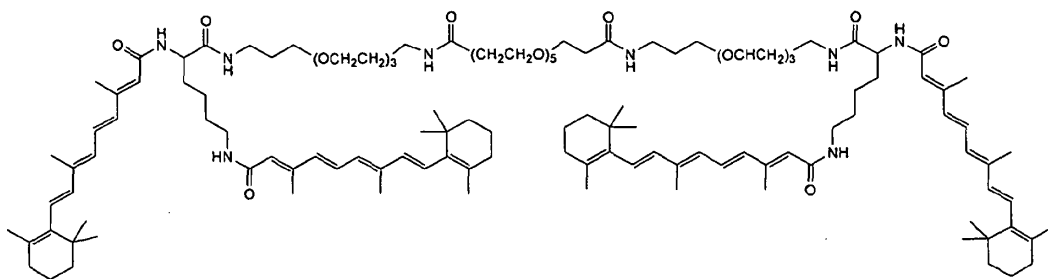
DOPE.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, que comprende además una molécula retinoide.
 7. Composición según la reivindicación 6, en la que la molécula retinoide es un conjugado de retinoide seleccionado del grupo que consiste en retinoide-grupo de unión-retinoide o retinoide-grupo de unión-lípido.
 8. Composición según la reivindicación 7, en la que el conjugado de retinoide es de fórmula



en la que q, r y s son cada uno independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

9. Composición según la reivindicación 8, en la que el conjugado de retinoide es de fórmula



10. Composición de reivindicaciones 3-9, que comprende además un agente terapéutico.
 11. Composición según la reivindicación 10, en la que el agente terapéutico es un ácido nucleico, preferiblemente un ARNip.
 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, para su uso en el tratamiento de un estado caracterizado por fibrosis anómala, opcionalmente seleccionado de cáncer y una enfermedad fibrótica.

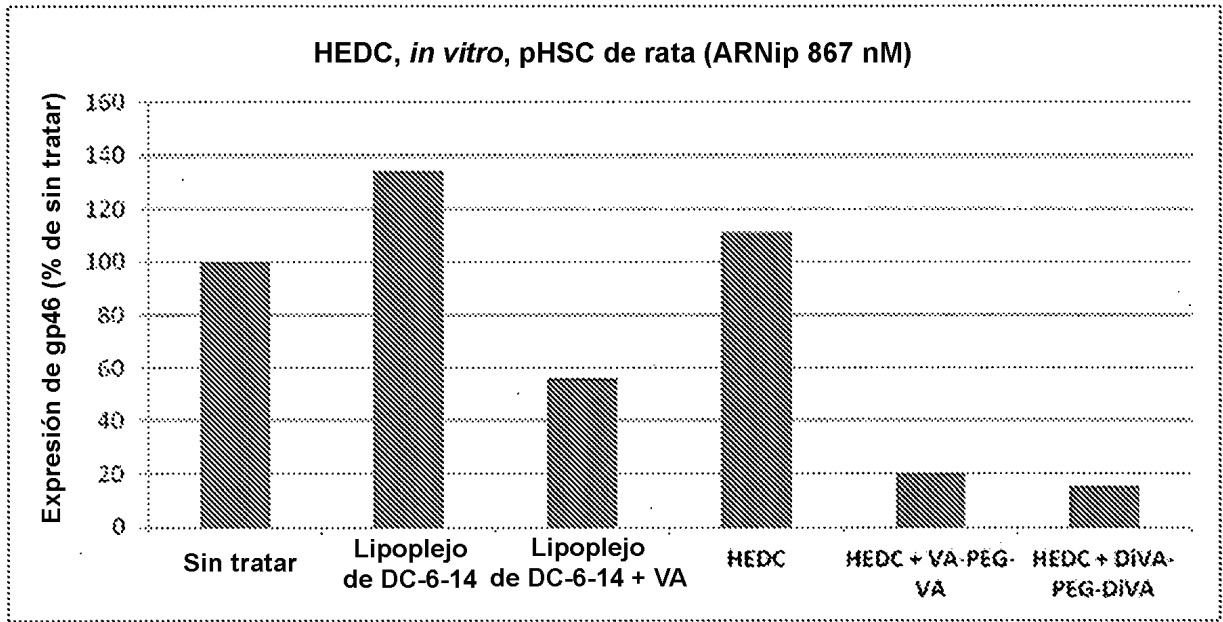


FIG. 1

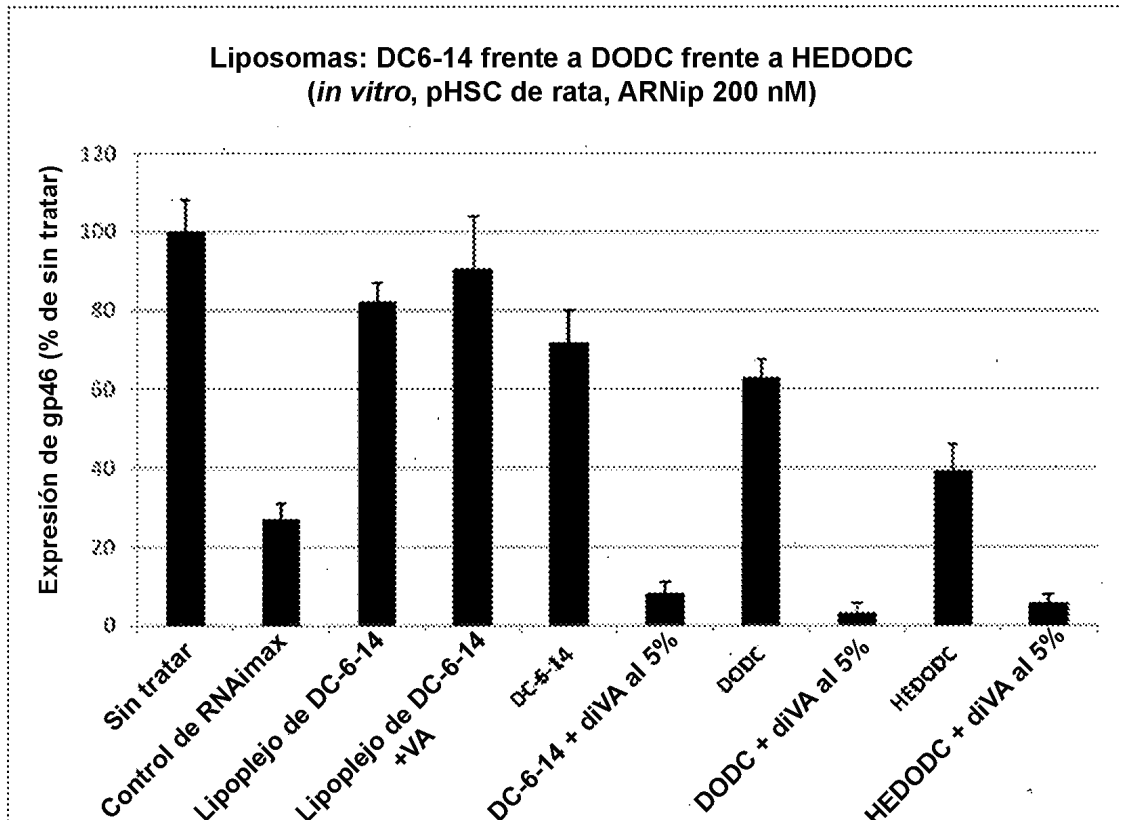


FIG. 2

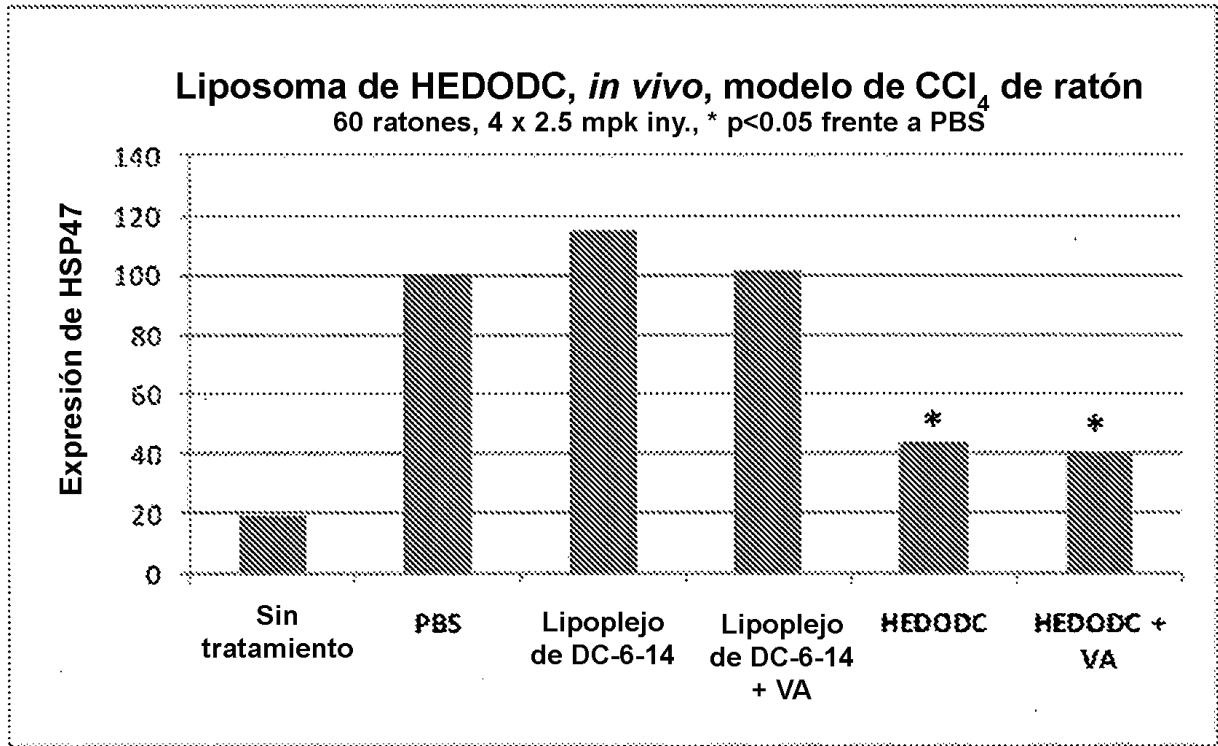


FIG. 3

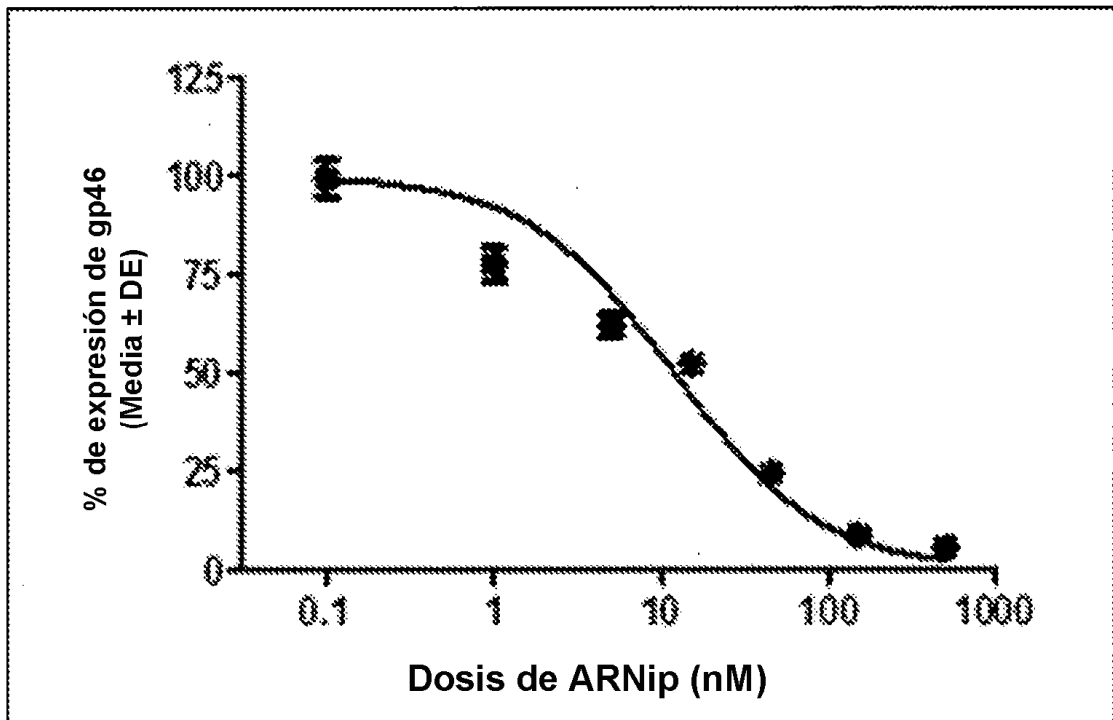


FIG. 4

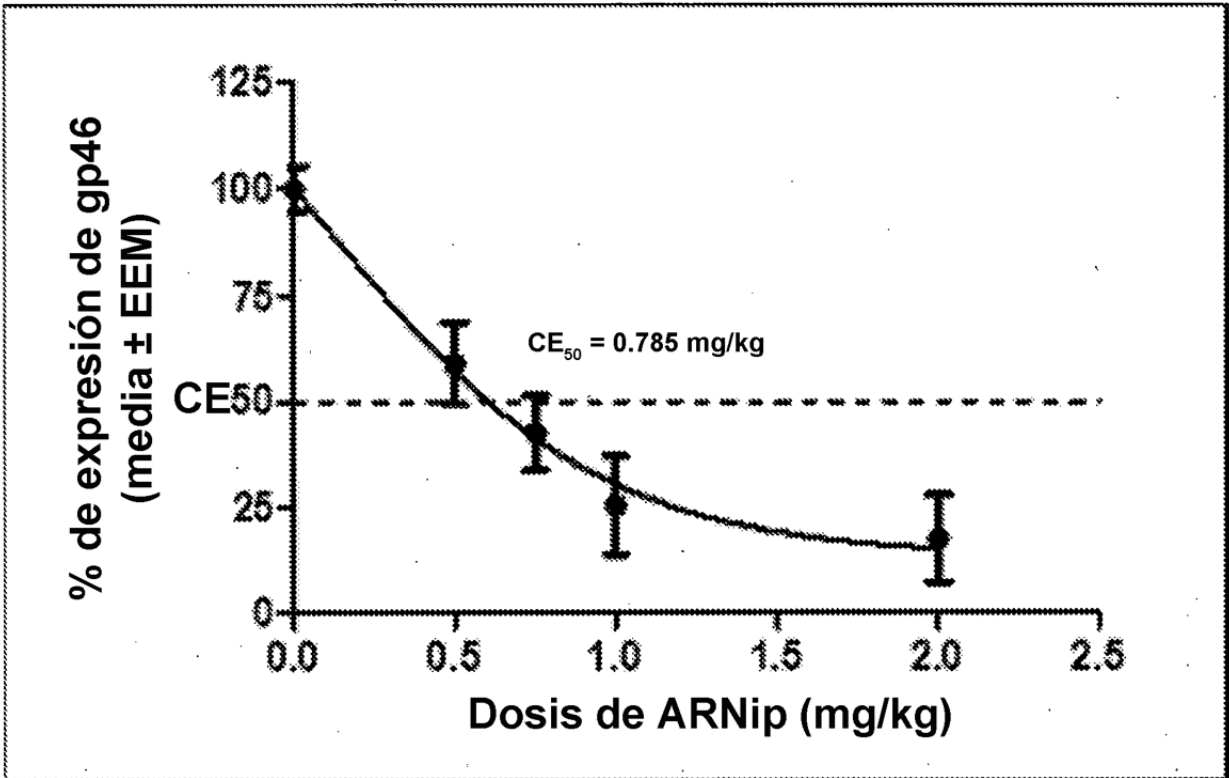


FIG. 5

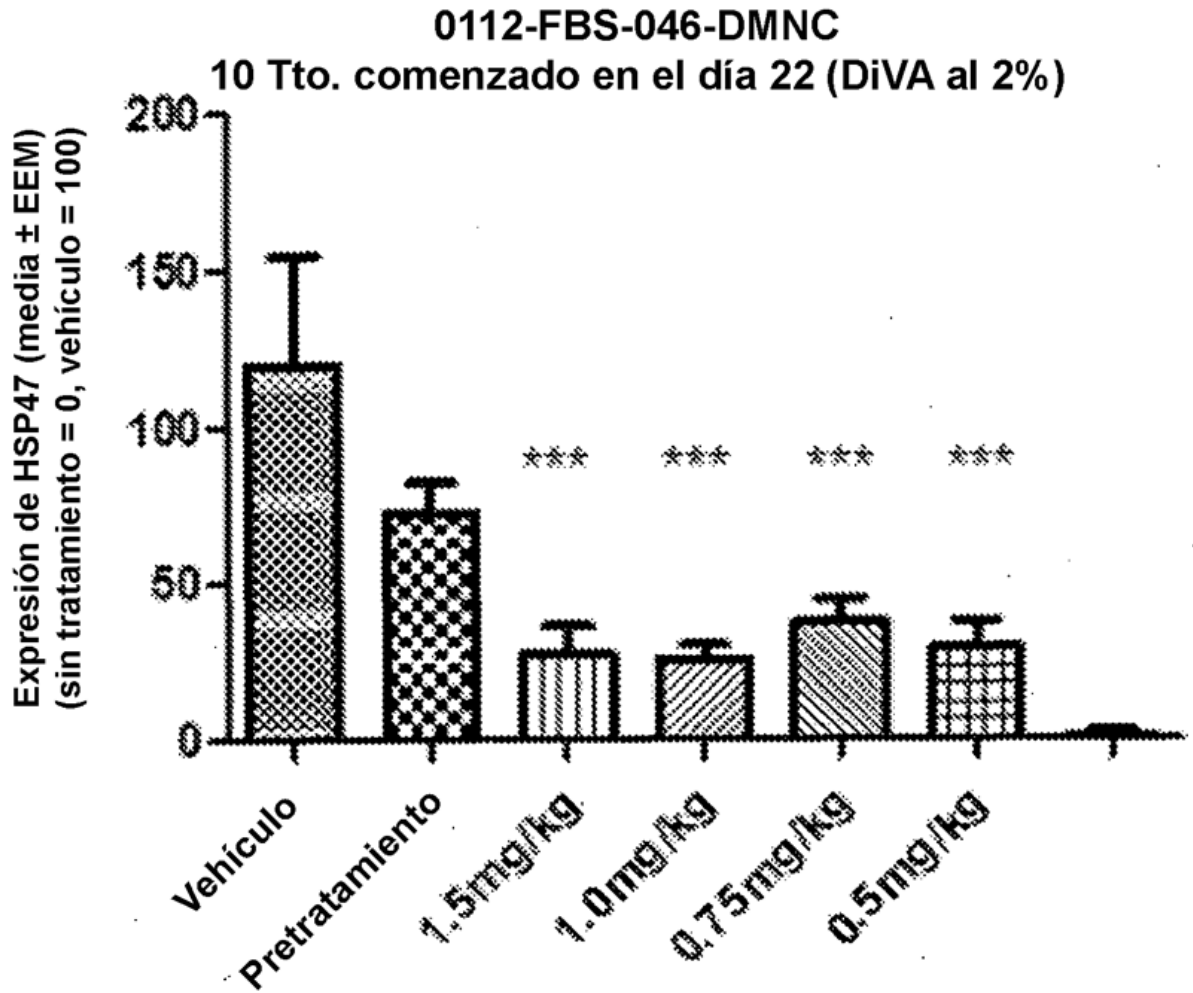


FIG. 6

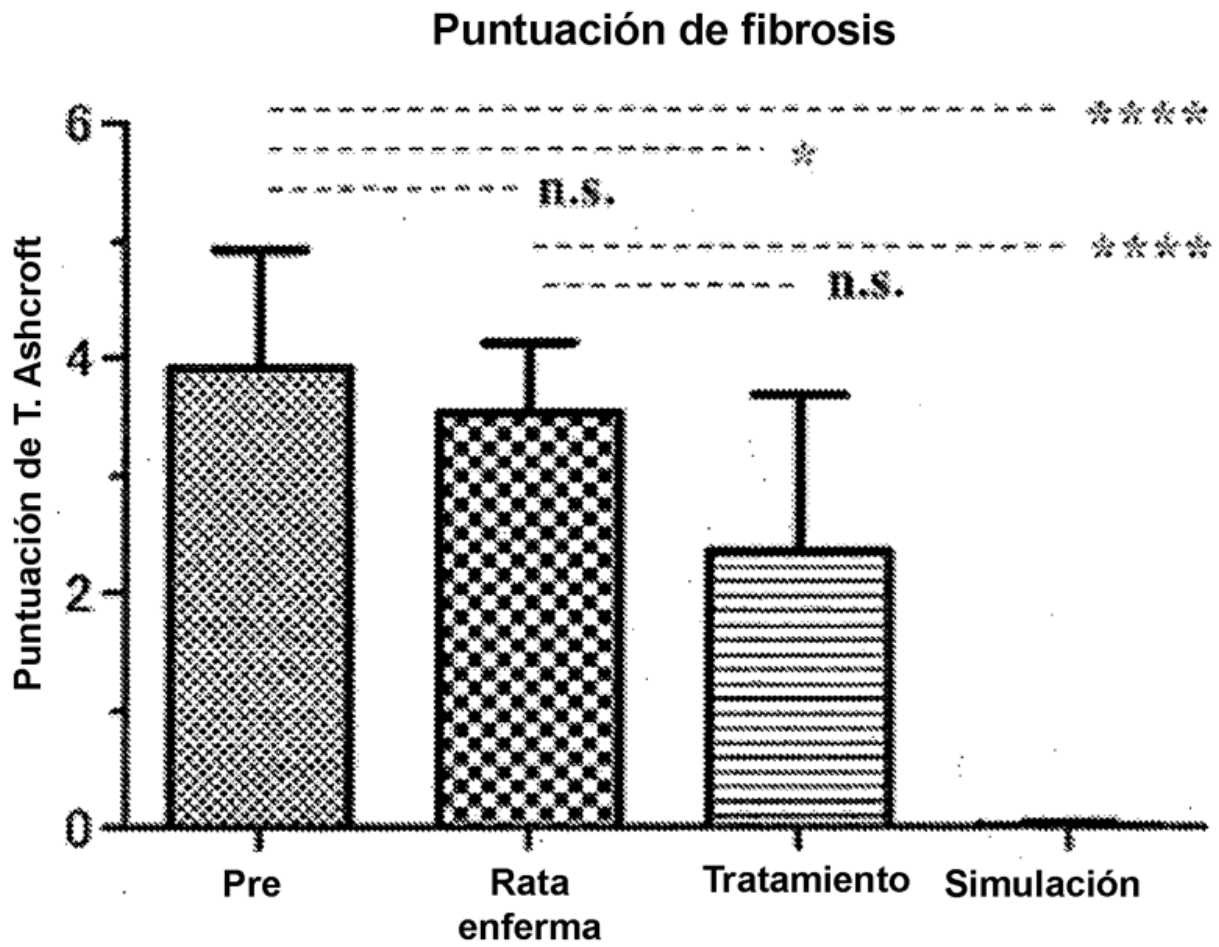
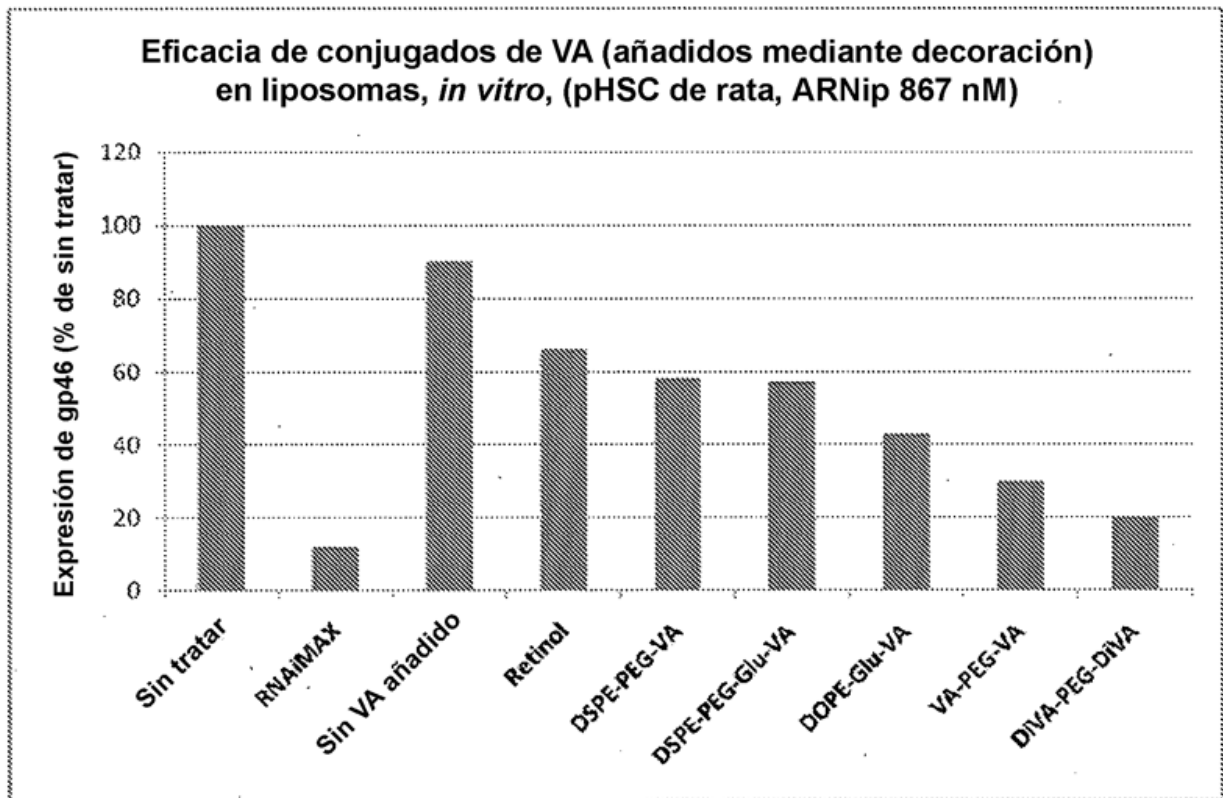


FIG. 7

**FIG. 8**

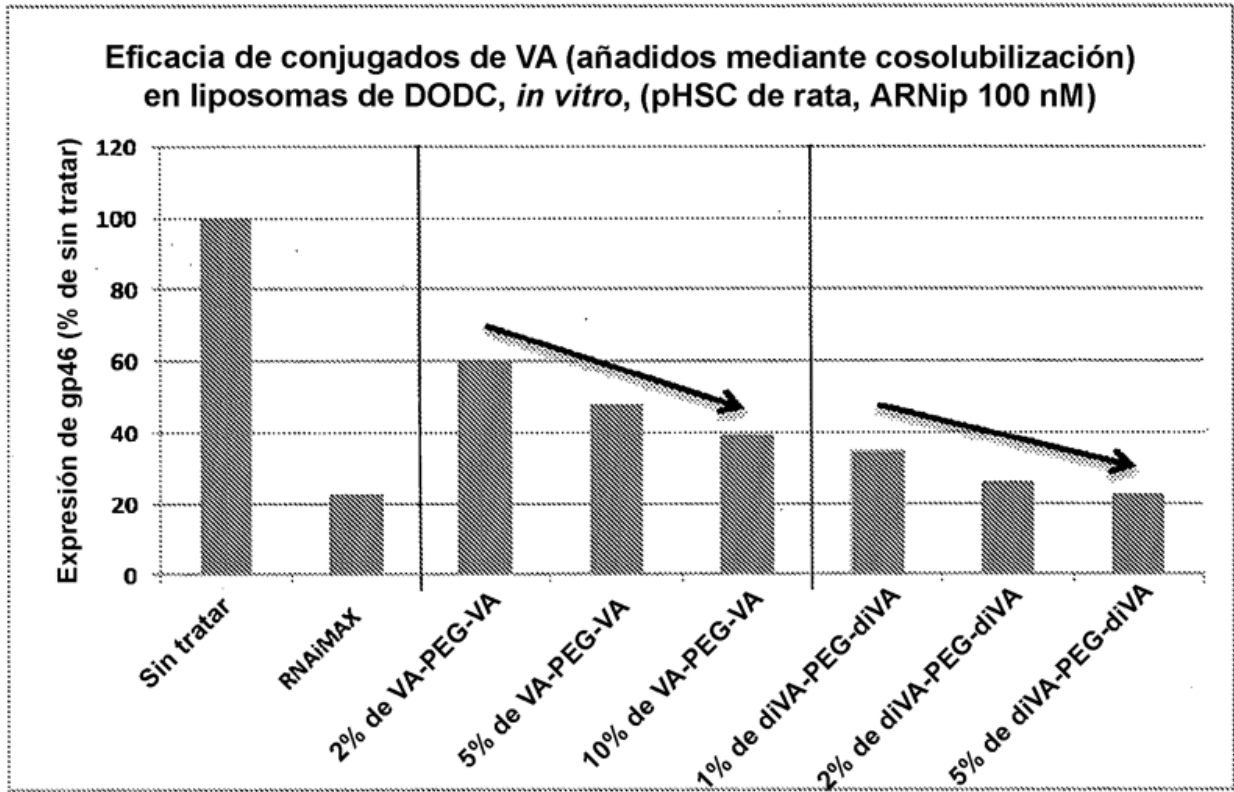


FIG. 9

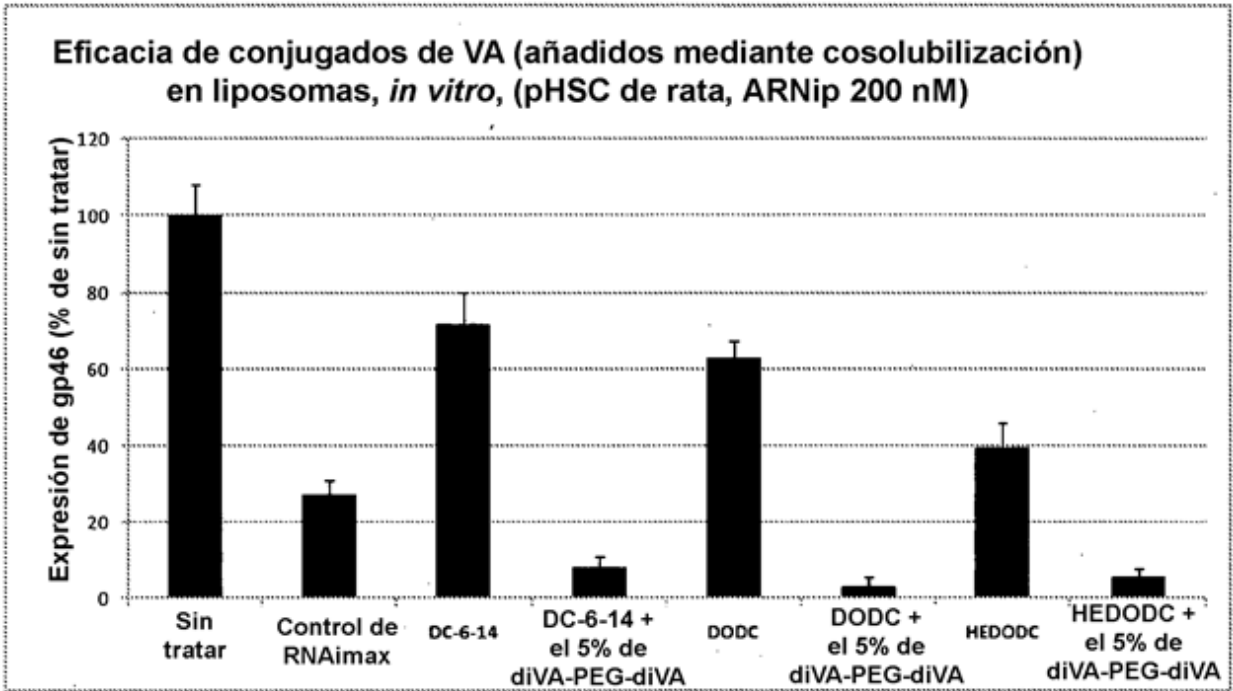


FIG. 10

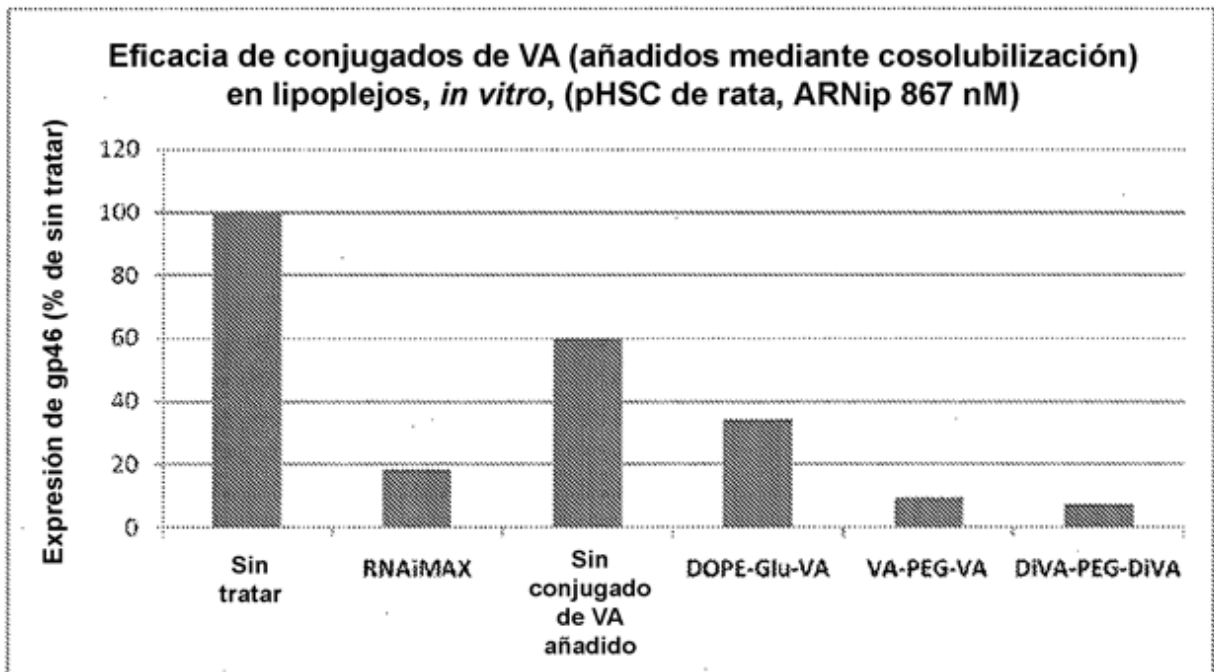


FIG. 11

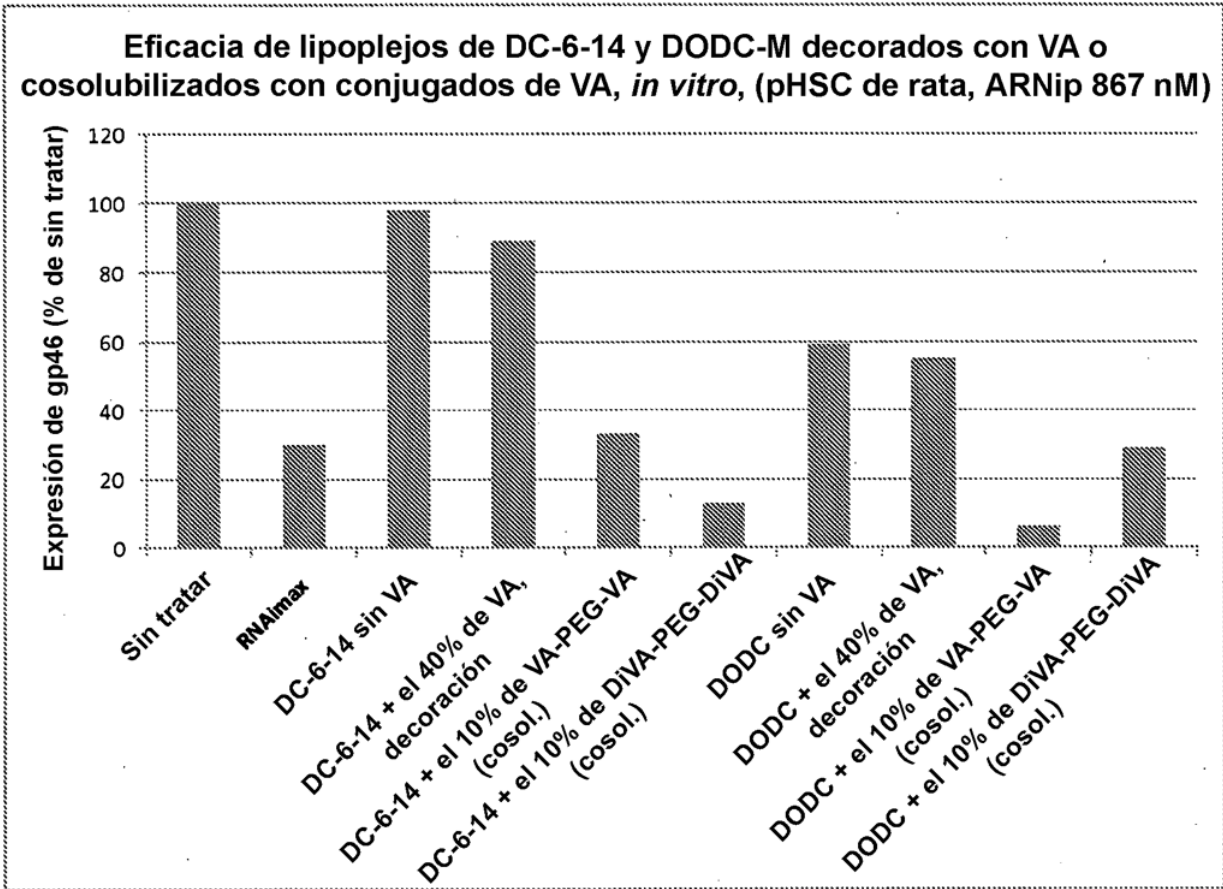


FIG. 12

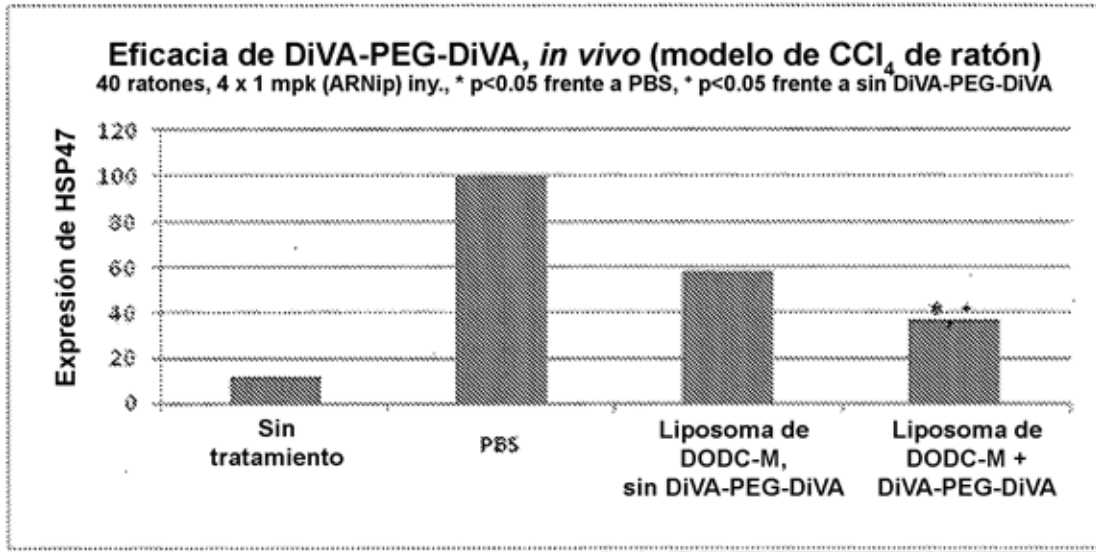


FIG. 13

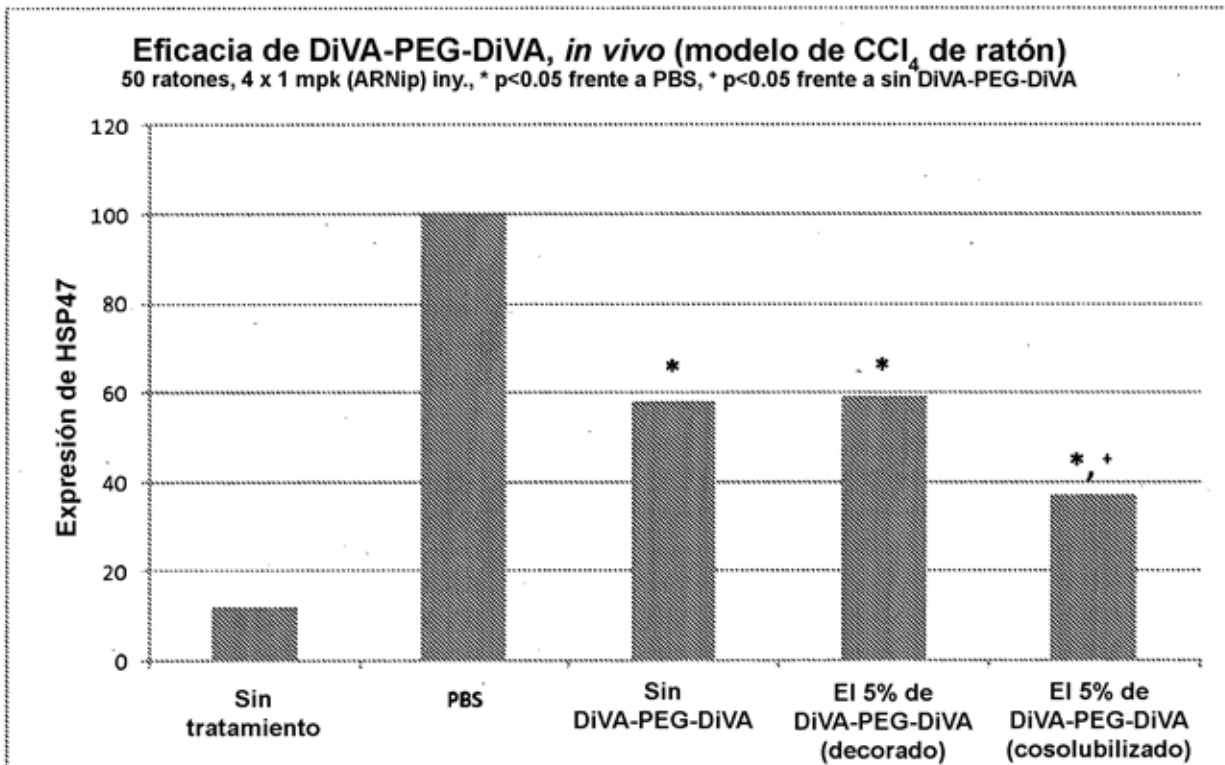


FIG. 14

Eficacia *in vitro* (pHSC), efecto de conjugados de retinoide en lípido

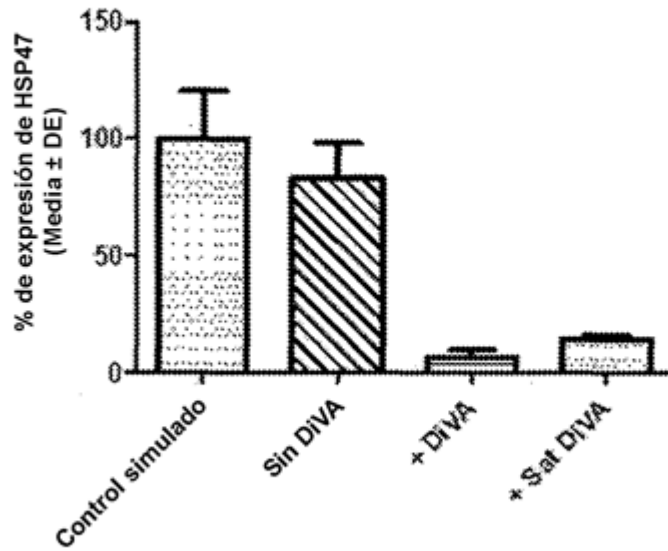


FIG. 15

Correlación de contenido de DiVA con respecto a la eficacia *in vivo* (DMNQ de rata)

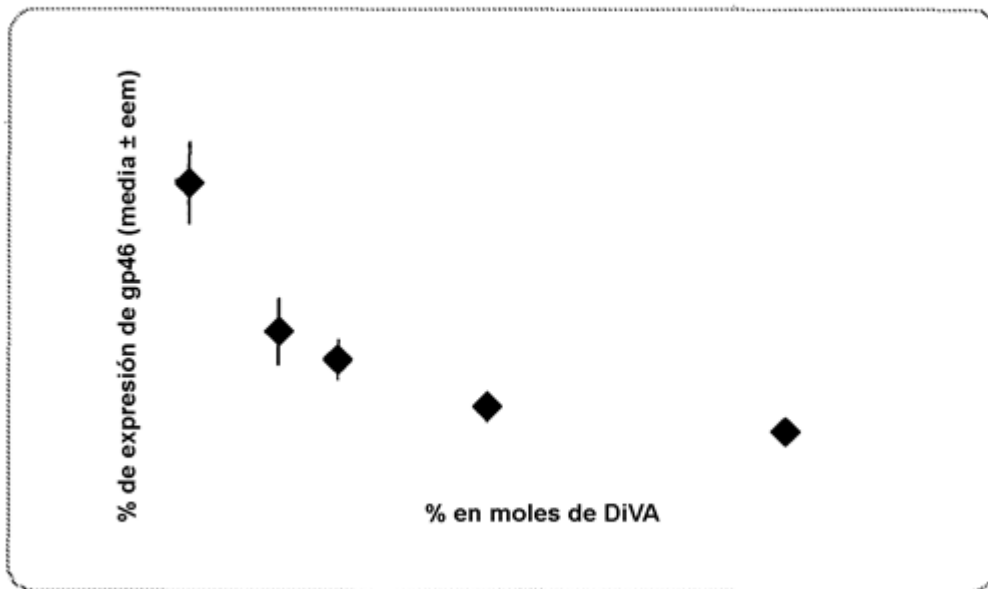


FIG. 16