

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 936**

51 Int. Cl.:

**C07C 229/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2010 E 10810531 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2467357**

54 Título: **Nuevos lípidos catiónicos con diversos grupos de cabeza para el suministro oligonucleotídico**

30 Prioridad:

**20.08.2009 US 235476 P**

**18.05.2010 US 345754 P**

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

**17.08.2016**

73 Titular/es:

**SIRNA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**

**300 Third Street**

**Cambridge MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**CAMERON, MARK;**

**DAVIS, JENNIFER, R.;**

**GEISER, ANDREA, R.;**

**STANTON, MATTHEW, G.;**

**TELYATNIKOV, VLADISLAV, V.;**

**TIAN, LU y**

**WANG, WEIMIN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 579 936 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**

Nuevos lípidos catiónicos con diversos grupos de cabeza para el suministro oligonucleotídico

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a nuevos lípidos catiónicos que se pueden usar en combinación con otros componentes lipídicos tales como colesterol y lípidos de PEG para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos, para facilitar la absorción celular y el escape endosómico, y para reducir ARNm diana tanto *in vitro* como *in vivo*.

10 Los lípidos catiónicos y el uso de lípidos catiónicos en nanopartículas lipídicas para el suministro de oligonucleótidos, en particular ARNpi y miARN, se han descrito previamente. Las nanopartículas lipídicas y el uso de nanopartículas lipídicas para el suministro de oligonucleótidos, en particular ARNpi y miARN, se han descrito previamente. Los oligonucleótidos (que incluyen ARNpi y miARN) y la síntesis de oligonucleótidos se han descrito previamente. (Véanse las solicitudes de patentes US: US 2006/0083780, US 2006/0240554, US 2008/0020058, US 2009/0263407 y US 2009/0285881 y las solicitudes de patentes PCT: WO 2009/086558, WO2009/127060, WO2009/132131, WO2010/042877, WO2010/054384, WO2010/054401, WO2010/054405 y WO2010/054406). Véase también Semple S. C. et al., Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, Nature Biotechnology, publicado en línea el 17 de enero de 2010; doi:10.1038/nbt.1602.

15 Butil CLinDMA es uno de los lípidos catiónicos descritos en el documento US 2006/0240554. Otros lípidos catiónicos también se describen genéricamente en el documento US 2006/0240554 incluyendo octil CLinDMA. Hemos sintetizado y ensayado tanto butil CLinDMA como octil CLinDMA en formulaciones de nanopartículas lipídicas, y hemos encontrado que octil CLinDMA tiene propiedades superiores a butil CLinDMA. Octil CLinDMA (conocido de otro modo como OCD) también se describe en el documento WO2010/021865.

20 Adoptamos un enfoque racional para diseñar lípidos catiónicos para uso en formulaciones de nanopartículas lipídicas para suministrar ARN pequeño interferente (ARNpi). Partiendo del lípido catiónico octil CLinDMA (denominado "Compuesto 12" en esta solicitud) como punto de referencia, diseñamos nuevos lípidos catiónicos con propiedades superiores como se demostró en experimentos con ratones, ratas y monos.

25 Los compuestos de la presente invención contienen un ligador de 1,3-diéter.

30 Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos lípidos catiónicos que se pueden usar en combinación con otros componentes lipídicos, tales como colesterol y lípidos de PEG para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos, para facilitar la absorción celular y el escape endosómico, y para reducir el ARNm diana tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los documentos US 2008/0188675 y US 6060455 describen diversos lípidos catiónicos.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

35 La presente invención proporciona nuevos lípidos catiónicos que se pueden usar en combinación con otros componentes lipídicos tales como colesterol y lípidos de PEG para formar nanopartícula lipídica con oligonucleótidos, para facilitar la absorción celular y el escape endosómico, y para reducir el ARNm diana tanto *in vitro* como *in vivo*.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

FIGURA 1: Inducción de citocina *in vivo* en ratón 3 horas después de la inyección.

FIGURA 2: Datos de ratón que comparan Compuesto 12 con Compuesto 9.

40 FIGURA 3: Datos de rata que comparan Compuesto 12 con Compuesto 9.

FIGURA 4: Datos de mono que comparan Compuesto 12 con Compuesto 9.

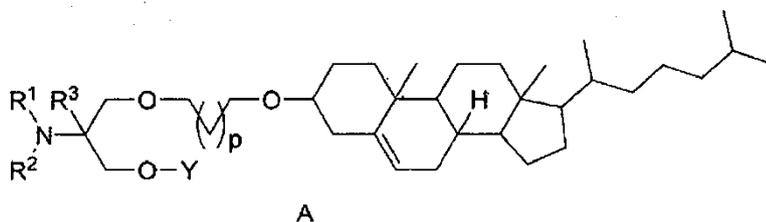
**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

45 Los diversos aspectos y realizaciones de la invención se dirigen a la utilidad de nuevos lípidos catiónicos útiles en nanopartículas lipídicas para suministrar oligonucleótidos, en particular ARNpi y miARN, a cualquier gen diana. (Véanse las solicitudes de patentes US: US 2006/0083780, US 2006/0240554, US 2008/0020058, US 2009/0263407 y US 2009/0285881, y las solicitudes de patentes PCT: WO 2009/086558, WO2009/127060, WO2009/132131, WO2010/042877, WO2010/054384, WO2010/054401, WO2010/054405 y WO2010/054406). Véase también Semple S. C. et al., Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, Nature Biotechnology, publicado en línea el 17 de enero de 2010; doi:10.1038/nbt.1.602.

50 Los lípidos catiónicos de la presente invención son componentes útiles en una nanopartícula lipídica para el

suministro de oligonucleótidos, específicamente ARNpi y miARN.

En una primera realización de esta invención, los lípidos catiónicos se ilustran mediante la Fórmula A:



en la que:

5 p es 1 a 8;

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclilo, y poliamina, en los que dicho heterociclilo y poliamina están opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados de R<sup>4</sup>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se pueden tomar junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo monocíclico con 4-7 miembros que contiene opcionalmente, además del nitrógeno, uno o dos heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S, estando dicho heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados de R<sup>4</sup>;

R<sup>3</sup> se selecciona de H y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), estando dicho alquilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados de R<sup>4</sup>;

R<sup>4</sup> se selecciona independientemente de halógeno, OR<sup>5</sup>, SR<sup>5</sup>, CN, CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup> y CON(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;

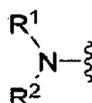
15 R<sup>5</sup> se selecciona independientemente de H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) y arilo; e

Y es un alquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), perfluoroalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), o un alquenilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>);

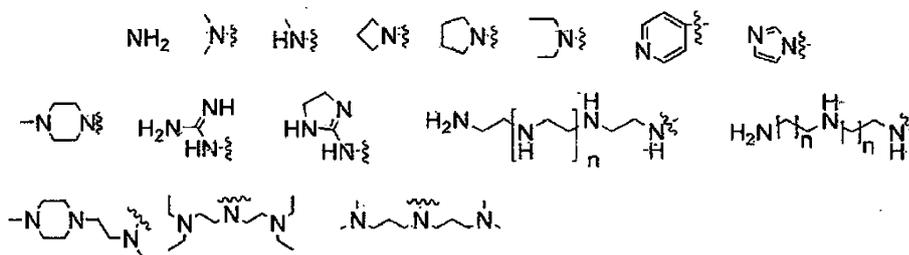
o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero de los mismos.

En otra realización, la invención incluye un compuesto que tiene la Fórmula A, en la que:

p es 1 a 8;



20 se selecciona de:



25 n es 1 a 10;

R<sup>3</sup> es H; e

Y es un alquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), perfluoroalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), o un alquenilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>);

o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

Lípidos catiónicos específicos son:

30 (2S)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto 4);

- (2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto 5);  
 1-[(2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-il]guanidina (Compuesto 6);  
 1-[(2R)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto 7);
- 5 1-[(2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto 8);  
 (2S)-1-[(6-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]hexil)oxi]-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto 9);  
 (3β)-3-[6-[(2S)-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-2-(pirrolidin-1-il)propil]oxi]hexil]oxi]colest-5-eno (Compuesto 10);
- 10 (2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-amina (Compuesto 11);  
 (2R)-1-[(8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi]-N,N-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amina (Compuesto 13);  
 (2R)-1-[(8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi]-3-(heptiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto 14);  
 (2R)-1-[(8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi]-N,N-dimetil-3-[(2Z)-pent-2-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto 15);
- 15 (2S)-1-butoxi-3-[(8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto 16);  
 (2S)-1-[(8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi]-3-[2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexadecafluorononil]oxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto 17);  
 2-amino-3-[(9-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-colest-5-en-3-iloxi]nonil)oxi]-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]metil]propan-1-ol (Compuesto 19); y
- 20 2-amino-3-[(6-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-colest-5-en-3-iloxi]hexil)oxi]-2-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]metil]propan-1-ol (Compuesto 20);

o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero de los mismos.

En otra realización, los lípidos catiónicos descritos son útiles en la preparación de nanopartículas lipídicas.

- 25 En otra realización, los lípidos catiónicos descritos son componentes útiles en una nanopartícula lipídica para el suministro de oligonucleótidos.

En otra realización, los lípidos catiónicos descritos son componentes útiles en una nanopartícula lipídica para el suministro de ARNpi y miARN.

En otra realización, los lípidos catiónicos descritos son componentes útiles en una nanopartícula lipídica para el suministro de ARNpi.

- 30 Las siguientes composiciones de nanopartículas lipídicas (LNPs) de la presente invención son útiles para el suministro de oligonucleótidos, específicamente ARNpi y miARN:

Lípido catiónico/colesterol/ PEG-DMG 56,6/38/5,4;

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 60/38/2;

Lípido catiónico/ colesterol/PEG-DMG 67,3/29/3,7;

- 35 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 49,3/47/3,7;

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 50,3/44,3/5,4;

Lípido catiónico/colesterol/PEG-C-DMA/DSPC 40/48/2/10; y

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG/DSPC 40/48/2/10.

- 40 Los lípidos catiónicos de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales, y planos quirales (como se describe en: E.L. Eliel y S.H. Wilen, Stereochemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, Nueva York, 1994, páginas 1119-1190), y aparecen como racematos, mezclas racémicas, y como diastereómeros individuales, incluyéndose en la presente invención todos los posibles isómeros y mezclas de los mismos, incluyendo isómeros ópticos. Además, los lípidos catiónicos descritos aquí pueden existir como tautómeros, y ambas

formas tautómeras están destinadas a estar englobadas por el alcance de la invención, incluso aunque se represente solamente una estructura tautomérica.

5 Cuando cualquier variable (por ejemplo R<sup>4</sup>) aparece más de una vez en cualquier constituyente, su definición en cada aparición es independiente en cada una de las otras apariciones. También, las combinaciones de sustituyentes y variables son permisibles solamente si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Si el sistema anular es bicíclico, se pretende que el enlace esté unido a cualquiera de los átomos adecuados en cualquier anillo del resto bicíclico.

10 Se entiende que los sustituyentes y patrones de sustitución en los lípidos catiónicos de la presente invención se pueden seleccionar por alguien de pericia normal en la técnica para proporcionar lípidos catiónicos que son químicamente estables y que se pueden sintetizar fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, así como aquellos métodos expuestos más abajo, a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Si un sustituyente está él mismo sustituido con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar en el mismo carbono o en carbonos diferentes, en tanto que resulte una estructura estable.

15 Se entiende que se pueden incorporar uno o más átomos de Si en los lípidos catiónicos de la presente invención por alguien de pericia normal en la técnica para proporcionar lípidos catiónicos que son químicamente estables y que se pueden sintetizar fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica a partir de materiales de partida fácilmente disponibles.

20 En los compuestos de Fórmula A, los átomos pueden mostrar sus abundancias isotópicas naturales, o uno o más de los átomos pueden estar artificialmente enriquecidos en un isótopo particular que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico encontrado predominantemente en la naturaleza. La presente invención incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas de los compuestos de Fórmula A. Por ejemplo, las formas isotópicas diferentes de hidrógeno (H) incluyen protio (<sup>1</sup>H) y deuterio (<sup>2</sup>H). El protio es el isótopo de hidrógeno predominante encontrado en la naturaleza. El enriquecimiento en deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas, tales como el incremento de la semivida *in vivo* o la reducción de los requisitos de dosis, o puede proporcionar un compuesto útil como un estándar para la caracterización de muestras biológicas. Los compuestos isotópicamente enriquecidos en la Fórmula A se pueden preparar sin experimentación excesiva mediante técnicas convencionales bien conocidas por aquellos de pericia en la técnica o mediante procedimientos análogos a los descritos en el Esquema y Ejemplos aquí usando reactivos y/o intermedios apropiados enriquecidos isotópicamente.

30 Como se usa aquí, "alquilo" significa un hidrocarburo alifático saturado que tiene el número especificado de átomos de carbono.

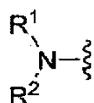
Como se usa aquí, "alqueno" significa un hidrocarburo alifático insaturado que tiene el número especificado de átomos de carbono.

35 Como se usa aquí, "arilo" pretende significar cualquier anillo de carbono monocíclico o bicíclico estable de hasta 7 átomos en cada anillo, en el que al menos un anillo es aromático. Los ejemplos de tales elementos arílicos incluyen fenilo, naftilo, tetrahidro-naftilo, indanilo y bifenilo.

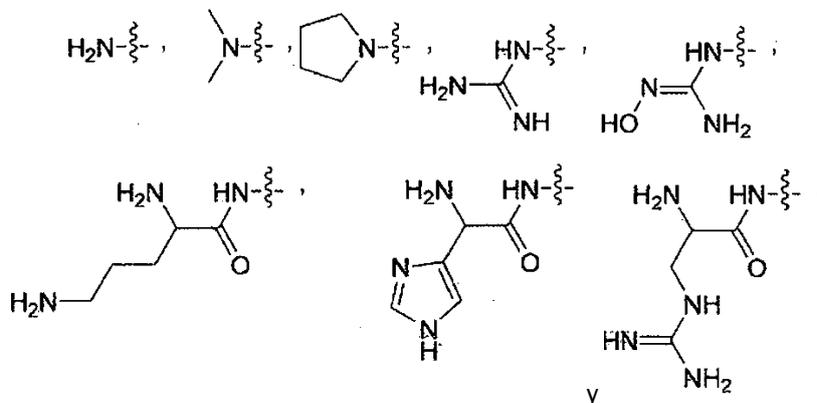
40 Como se usa aquí, "heterociclilo" significa un heterociclo aromático o no aromático de 4 a 10 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, e incluye grupos bicíclicos. Por lo tanto, "heterociclilo" incluye los siguientes: benzoimidazolilo, benzofuranilo, benzofurazanilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cinolinilo, furanilo, imidazolilo, indolinilo, indolilo, indolazino, indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, oxazolona, isoxazolona, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridiazino, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrahidropiranilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, azetidino, 1,4-dioxano, hexahidroazepino, piperazino, piperidino, pirrolidino, morfolino, tiomorfolino, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisoxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihidroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrotienilo, dihidrotriazolilo, dihidroazetidino, metilendioxibenzolilo, tetrahidrofuranilo, y tetrahidrotienilo, y N-óxidos de los mismos, todos los cuales están opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados de R3.

50 Como se usa aquí, "poliamina" significa compuestos que tienen dos o más grupos amino primarios – tales como putrescina, cadaverina, espermidina, y espermina.

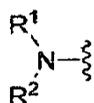
En una realización,



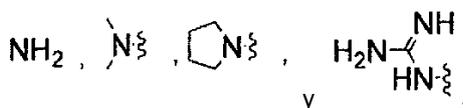
se selecciona de:



5 En una realización,

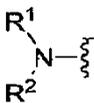


se selecciona de:



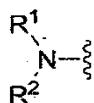
En una realización,

10



se selecciona de NH<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>.

En una realización,



es NH<sub>2</sub>.

15 En una realización, n es 1 a 5.

En una realización, p es 1 a 8.

En una realización, R<sup>3</sup> es H o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), dicho alquilo está opcionalmente sustituido con uno a tres OH.

En una realización, R<sup>3</sup> es H, metilo, etilo o propilo, dicho metilo, etilo o propilo está opcionalmente sustituido con un OH.

20 En una realización, R<sup>3</sup> es H o hidroximetilo.

En una realización, R<sup>3</sup> es H.

En una realización, R<sup>4</sup> es independientemente halógeno, OH, O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), SH, S-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), CN, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), CONH<sub>2</sub>, o CON-alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2</sub>.

En una realización, R<sup>4</sup> es independientemente halógeno, OH u O-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).

En una realización, R<sup>5</sup> es independientemente H o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).

En una realización, Y es un alquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), perfluoroalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), o alquenilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>).

En una realización de Fórmula A, "heterociclilo" es pirrolidina, piperidina, morfolina, imidazol o piperazina.

5 En una realización de Fórmula A, "heterociclilo monocíclico" es pirrolidina, piperidina, morfolina, imidazol o piperazina.

En una realización de Fórmula A, "poliamina" es putrescina, cadaverina, espermidina, y espermina.

10 Se incluye en la presente invención la forma libre de lípidos catiónicos de Fórmula A, así como las sales farmacéuticamente aceptables o estereoisómeros de los mismos. Algunos de los lípidos catiónicos específicos aislados ejemplificados aquí son las sales protonadas de lípidos catiónicos de amina. La expresión "forma libre" se refiere a los lípidos catiónicos de amina en forma no salina. Las sales farmacéuticamente aceptables englobadas incluyen no solamente las sales aisladas ejemplificadas para los lípidos catiónicos específicos descritos aquí, sino también todas las sales farmacéuticamente aceptables típicas de la forma libre de lípidos catiónicos de Fórmula A. La forma libre de los lípidos catiónicos de sales específicas descrita se puede aislar usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la forma libre se puede regenerar tratando la sal con una disolución de base acuosa diluida adecuada, tal como NaOH acuoso diluido, carbonato potásico, amoníaco y bicarbonato sódico. Las formas libres pueden diferir de sus formas salinas respectivas en cierto modo en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero para los fines de la invención las sales de ácidos y de bases son de otro modo farmacéuticamente equivalentes a sus formas libres respectivas.

20 Las sales farmacéuticamente aceptables de los lípidos catiónicos presentes se pueden sintetizar a partir de los lípidos catiónicos de esta invención que contienen un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales. Generalmente, las sales de los lípidos catiónicos básicos se preparan mediante cromatografía de intercambio iónico o haciendo reaccionar la base libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido inorgánico u orgánico formador de sal deseado en un disolvente adecuado o diversas combinaciones de disolventes. De forma similar, las sales de los compuestos ácidos se forman mediante reacciones con la base inorgánica u orgánica apropiada.

25 De este modo, las sales farmacéuticamente aceptables de los lípidos catiónicos de esta invención incluyen las sales no tóxicas convencionales de los lípidos catiónicos de esta invención como se forman haciendo reaccionar lípidos catiónicos presentes básicos con un ácido inorgánico u orgánico. Por ejemplo, las sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similar, así como sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, trifluoroacético (TFA) y similar.

35 Cuando los lípidos catiónicos de la presente invención son ácidos, "sales farmacéuticamente aceptables" adecuadas se refiere a sales preparadas a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre, férrica; ferrosa, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosa, potasio, sodio, cinc y similar. Se prefieren particularmente las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N<sup>1</sup>-dibenziletildiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

45 La preparación de las sales farmacéuticamente aceptables descritas anteriormente y otras sales farmacéuticamente aceptables típicas se describen más completamente por Berg et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 1977:66:1-19.

50 También se observará que los lípidos catiónicos de la presente invención son potencialmente sales internas o zwitteriones, puesto que en condiciones fisiológicas un resto ácido desprotonado en el compuesto, tal como un grupo carboxilo, puede ser aniónico, y esta carga electrónica puede compensarse internamente frente a la carga catiónica de un resto básico protonado o alquilado, tal como un átomo de nitrógeno cuaternario.

#### UTILIDAD

55 Los lípidos catiónicos y el uso de lípidos catiónicos en nanopartículas lipídicas para el suministro de oligonucleótidos, en particular ARNpi y miARN, para fines terapéuticos, se han descrito previamente. (Véanse las solicitudes de patentes US: US 2006/0240554 y US 2008/0020058). Las nanopartículas lipídicas y el uso de nanopartículas lipídicas para el suministro de oligonucleótidos, en particular ARNpi y miARN, para fines terapéuticos, se han

descrito previamente. (Véanse las solicitudes de patentes US: US 2006/0240554 y US 2008/0020058). Los oligonucleótidos (incluyendo ARNpi y miARN) y la síntesis de oligonucleótidos se han descrito previamente. (Véanse las solicitudes de patentes US: US 2006/0240554 y US 2008/0020058).

5 La utilidad de lípidos catiónicos en LPNs para el suministro de oligonucleótidos para fines terapéuticos también se describe en Guo, K. et al. *Molecular Pharmaceutics* (2009) 6:3, 651-658; y Whitehead, K.A. et al. *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8, 129-138.

**EJEMPLOS**

10 Los ejemplos proporcionados aquí están destinados a ayudar a una comprensión adicional de la invención. Los materiales particulares empleados, las especies y condiciones están destinados a ilustrar adicionalmente la invención y no limitar el alcance razonable de la misma. Los reactivos utilizados en la síntesis de los lípidos catiónicos están comercialmente disponibles o se preparan fácilmente por alguien de pericia normal en la técnica.

**ESQUEMAS GENERALES**

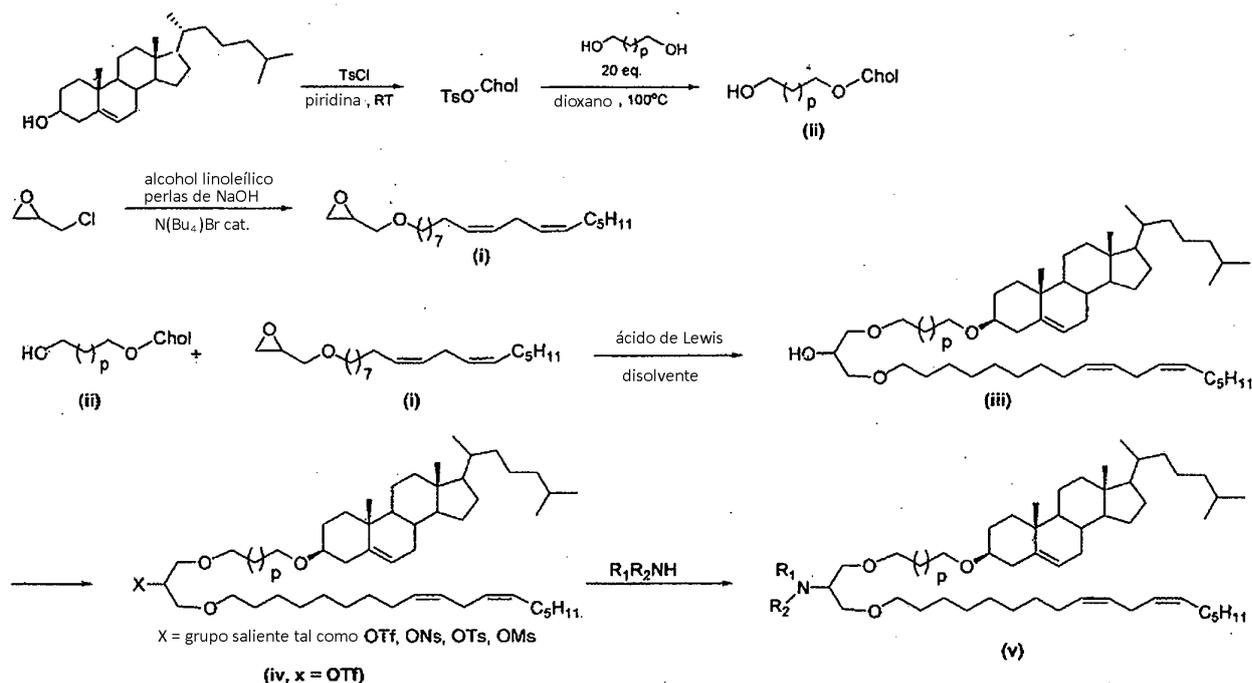
15 Esquema General 1: La síntesis de los nuevos lípidos catiónicos es un procedimiento convergente mediante el cual la reacción catalizada por ácido de Lewis entre el epóxido (i) y el ligador (ii) da el regioisómero alcohólico deseado (iii). La interconversión de grupos funcionales del grupo hidroxilo en un grupo saliente adecuado, por ejemplo un triflato (iv), X = OTf), seguido del desplazamiento con una amina apropiada, da el lípido catiónico requerido (v).

20 Esquema General 2: Los lípidos catiónicos de tipo (x) se pueden preparar como se esquematiza más abajo. Los aminodioles se pueden proteger como un hemiaminal cíclico (vi). La alquilación del alcohol libre con mesilato de linoleilo puede generar compuestos de tipo (vii). La desprotección del hemiaminal, seguido de la protección de la amina primaria, puede generar el alcohol (viii). La alquilación de este alcohol, la desprotección de la amina y la aminación reductora pueden producir los compuestos de tipo (x).

25 Esquema General 3: Los compuestos de tipo (xv) se pueden preparar como se esquematiza más abajo. El grupo amino de tris se puede proteger, y el diol se puede convertir en un cetal cíclico. La alquilación del alcohol libre puede generar el compuesto (xii). La desprotección del cetal, seguido de la reprotección de la amina, puede dar el diol (xiii). Un esquema sintético análogo al descrito en el Esquema General 2 generaría entonces compuestos de tipo (xv).

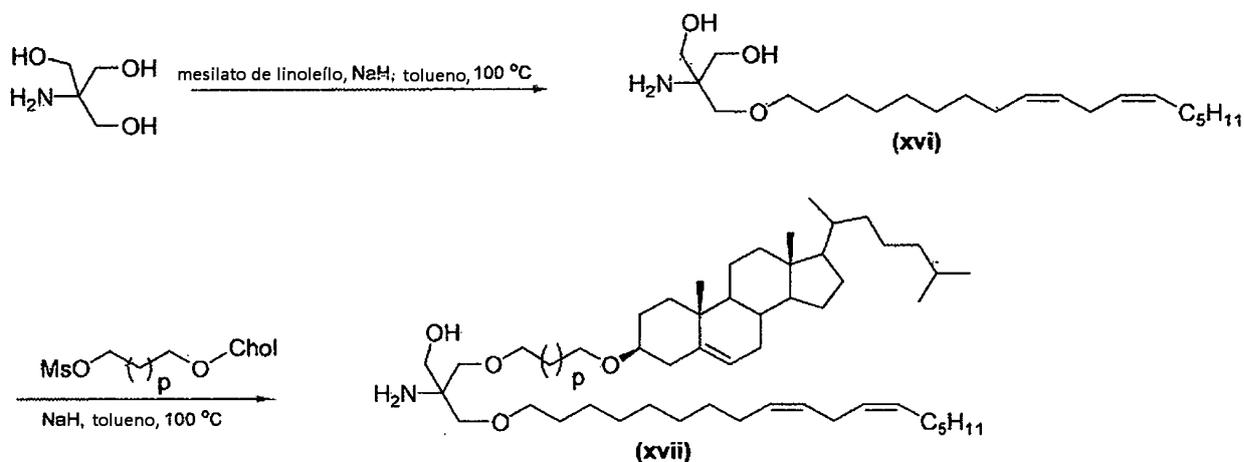
30 Esquema General 4: Los compuestos de tipo (xvii) se pueden preparar como se esquematiza más abajo. 2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol se puede monoalquilar al tratarlo con hidruro de sodio y un electrófilo lipídico en tolueno para generar el derivado de monoéter (xvi). Se puede llevar a cabo una segunda alquilación en condiciones similares para generar los derivados de diéter tris de tipo (xvii).

**ESQUEMA GENERAL 1**

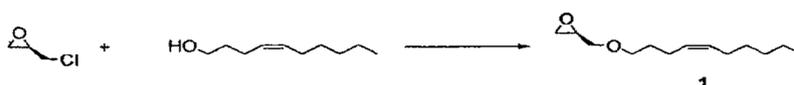




## ESQUEMA GENERAL 4

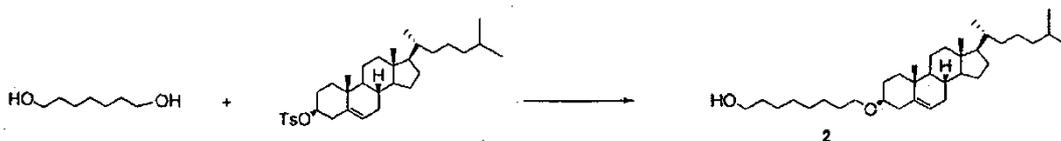


Preparación de (2R)-2-[[4Z]-dec-4-en-1-ilo]metil]oxirano (Compuesto 1)



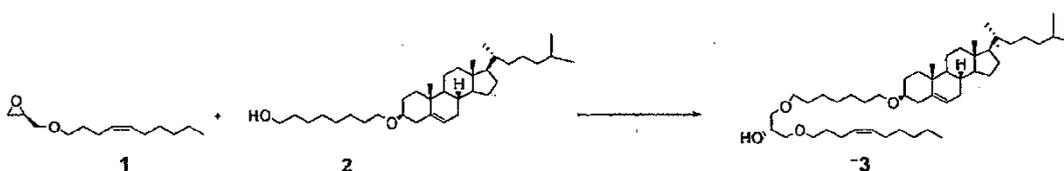
- 5 A una mezcla agitada, enfriada (< 5°C) de cis-4-decen-1-ol (1, 14,42 g, 156 mmoles), bromuro de tetrabutilamonio (1,26 g, 3,91 mmoles) e hidróxido de sodio (4,67 g, 117 mmoles) se añadió R-(-)-epiclorohidrina (6,1 ml, 78 mmoles) en una porción, la mezcla se agitó durante 2 horas, y después se añadió una segunda porción de R-(-)-epiclorohidrina (6,1 ml, 78 mmoles). La mezcla se agitó toda la noche. Se añadió hexano (150 ml), y la mezcla se filtró. El filtrado se concentró hasta un aceite, y la purificación a través de cromatografía ultrarrápida dio producto (1,
- 10 14,3 g, 67,3 mmoles) con un rendimiento de 86%. Compuesto 1: C<sub>13</sub>R<sub>24</sub>O<sub>2</sub> HRMS M+H esperado 213,1856; encontrado 213,1849 uma. <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,34 (2H, multiplete); 3,70 (1H, dd, J = 3,2, 11,5 Hz); 3,52 (1H, dt, J = 6,6,9,2 Hz); 3,47 (1H, dt, J = 6,6, 9,2 Hz); 3,39 (1H, dd, J = 5,5, 11,6 Hz); 3,15 (1H, multiplete); 2,80 (1H, dd, J = 4,1,4,9 Hz); 2,61, (1H, dd, J = 2,7, 5,0 Hz); 2,11 (2H, c, 7,2 Hz); 2,02 (2H, c, J = 7,2 Hz); 1,66 (1H, c, J = 6,7 Hz); 1,63 (1H, t, J = 6,9 Hz); 1,38-1,24 (6H, complejo); 0,89 (3H, t, J = 6,9 Hz) ppm.

- 15 Preparación de 8-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]octan-1-ol (Compuesto 2)



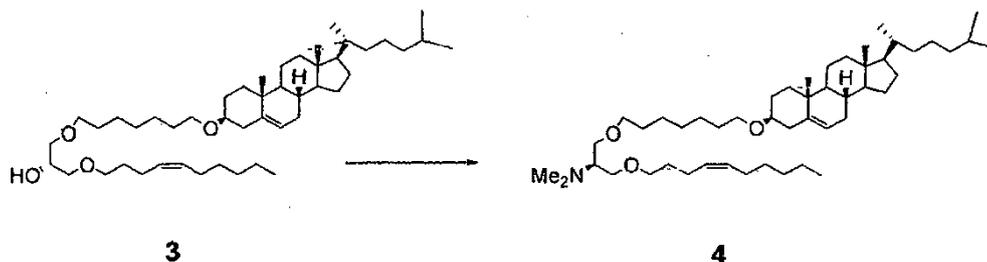
- Una mezcla de 1,7-heptanodiol (30,6 g, 231 mmoles) y tosilato de colestero (25 g, 46,2 mmoles) en tolueno (80 ml) se calentó a 80°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se añadió hexano (70 ml). Las dos capas resultantes se separaron, y la capa superior se recogió y se lavó con una disolución
- 20 1:1 de salmuera saturada y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (100 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, y finalmente se concentró hasta un volumen bajo (~ 40 ml). El aceite bruto se purificó a través de cromatografía ultrarrápida para dar producto (2, 17,0 g, 33,9 mmoles) con un rendimiento de 73%. Compuesto 2: C<sub>34</sub>H<sub>60</sub>O<sub>2</sub>: HRMS M+Na esperado 523,4491; encontrado 523,4486 uma. <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,34 (1H, complejo); 3,64 (2H, complejo); 3,45 (2H, complejo); 3,12 (1H, complejo); 2,35 (1H, ddd, J = 2,2, 4,7, 13,2 Hz); 2,19 (1H, complejo); 2,05-1,77 (5H, complejo); 1,63-0,83 (44H, complejo); 0,68 (3H,s) ppm.

- Preparación de (2R)-1-[[7-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]heptil]oxi]-3-[[4Z]-dec-4-en-1-ilo]propan-2-ol. (Compuesto 3)



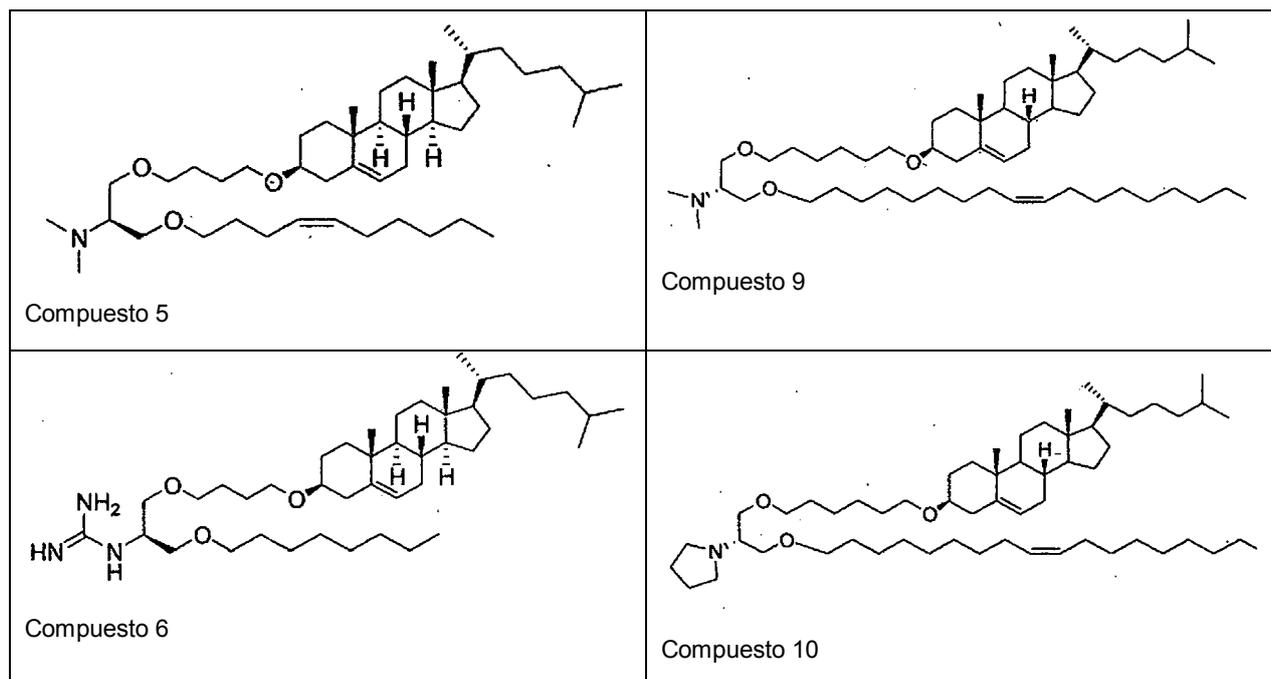
A una disolución agitada, enfriada (0°C), del alcohol (2, 6,00 g, 12 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (20 ml), en una atmósfera de nitrógeno, se añadió SnCl<sub>4</sub> 1M en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,2 ml, 1,2 mmoles). Una disolución del epóxido (1, 3,1 g, 14,6 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se añadió gota a gota durante 2 horas. La disolución se agitó durante 1 hora adicional. La reacción se paralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (3 ml), y se añadió hexano (50 ml). La mezcla se filtró, y el filtrado se recogió y se concentró hasta un aceite bruto (9,7 g). La purificación a través de cromatografía ultrarrápida produjo producto (3, 4,95 g, 6,94 mmoles) con un rendimiento de 58%. C<sub>47</sub>H<sub>84</sub>O<sub>4</sub> HRMS M+H esperado 713,6442; encontrado 713,6423 uma. <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,42-5,30 (3H, complejo); 3,94 (1H, complejo); 3,52-3,40 (10H, complejo); 3,12 (1H, complejo); 2,45 (1H, d, J = 4,1 Hz); 2,35 (1H, ddd, J = 2,4, 13,2 Hz); 2,18 (1H, t ancho, J = 12,7 Hz); 2,09 (2H, c ancho, J = 7,0 Hz); 2,05-1,77 (7H, complejo); 1,67-0,82 (55H, complejo); 0,68 (3H, s) ppm.

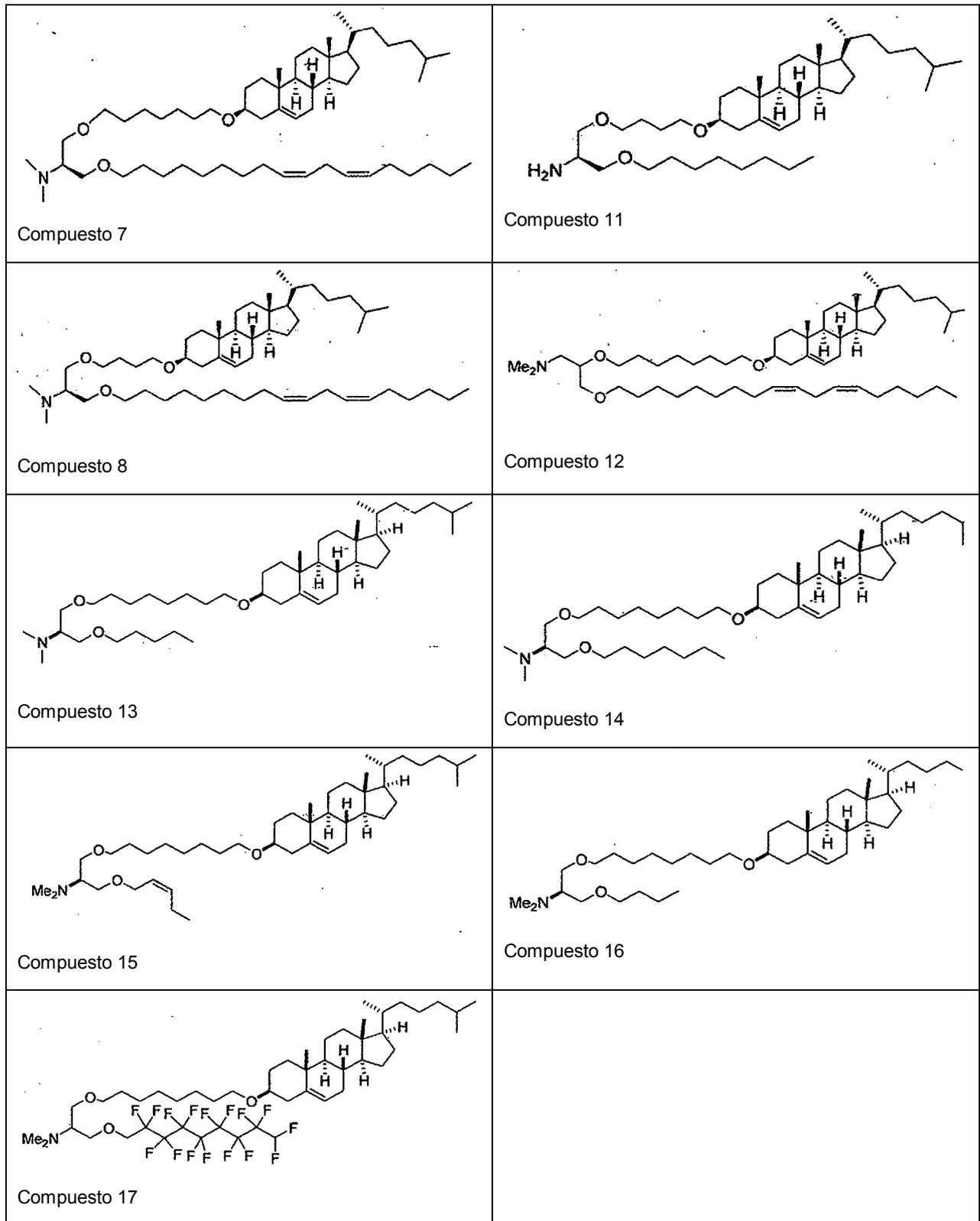
10 Preparación de (2 S)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina. (Compuesto 4)



A una disolución agitada enfriada (0°C) del alcohol (3, 4,9 g, 6,87 mmoles) y piridina anhidra (0,7 ml, 8,67 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (20 ml), en una atmósfera de nitrógeno, se añadió anhídrido triflico (1,4 ml, 8,3 mmoles) gota a gota. La disolución se agitó durante 2 horas, y después se añadió a una disolución 2M de dimetilamina en THF (18 ml, 36 mmoles) a 0°C. La disolución se agitó durante 2 horas, y después se añadió diclorometano (150 ml). La disolución se lavó entonces con NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M (150 ml). La capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta un aceite (6,2 g). Se añadió hexano (60 ml), los sólidos formados se eliminaron mediante filtración, y el filtrado se concentró para dar un aceite bruto (5,4 g). La purificación a través de cromatografía produjo producto (4, 2,83 g, 3,82 mmoles) con un rendimiento de 56%. C<sub>49</sub>H<sub>87</sub>NO<sub>3</sub> HRMS M+H esperado 740,6921; encontrado 740,6898 uma. <sup>1</sup>H RMN (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,41-5,31 (3H, complejo); 3,53 (2H, dd, J = 5,6, 9,9 Hz); 3,47 (2H, dd, J = 5,6, 9,9 Hz); 3,44 (2H, multiplete); 3,41 (2H, t, J = 6,9 Hz) 3,40 (2H, t, J = 6,9 Hz); 3,12 (1H, multiplete); 2,73 (1H, multiplete); 2,38 (6H,s); 2,35 (1H, ddd, J = 2,2, 4,8, 3,1 Hz); 0,84-2,25 (64 H, complejo); 0,68 (3H, s) ppm.

25 Los Compuestos 5-11 y 13-17 son lípidos catiónicos nuevos. El Compuesto 12 es S-Octil CLinDMA. Los Compuestos se pueden preparar según el Esquema anterior. A continuación se muestra la síntesis del Compuesto 9.





Preparación de (2S)-1-((6-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]hexil)oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-ilo]ilpropan-2-amina. (Compuesto 9)



9

A una disolución agitada, enfriada (-7°C) del alcohol (41,99 g, 50,7 mmoles) y lutidina (5,90 g, 55,1 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (420 ml) se añadió anhídrido trifílico (9 ml, 53,3 mmoles) en porciones durante 30 minutos. La disolución se agitó durante 2,5 horas, y después se transfirió a una NHMe<sub>2</sub> 2M agitada enfriada (2°C) en THF (1425 ml, 2850 mmoles). La disolución se agitó entonces durante 3 horas. Los volátiles se evaporaron, y el residuo oleoso se disolvió en hexanos (500 ml) y se lavó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% (500 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se volvió a extraer con hexanos (200 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (200 ml), y los orgánicos se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y los volátiles se evaporaron, y el bruto se purificó a través de HPFC para producir compuesto **9** (25,5 g, 30,4 mmoles) con un rendimiento de 60%. C<sub>56</sub>H<sub>103</sub>NO<sub>3</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 838,8017 uma, m/z medida 838,7996 uma. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,36-5,33 (3H, complejo); 4,13-3,40 (10H, complejo); 3,13 (1H, multiple); 2,76 (1H, multiplete); 2,40 (6H, s) 2,35, (1H, ddd, J = 2,3, 4,8, 13,2 Hz); 2,18 (1H, complejo); 2,06-0,86 (77H, complejo); 0,68 (3H,s) ppm.

Compuesto 5: (2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina.

2,70 g, 3,90 mmoles, con un rendimiento de 57%. C<sub>46</sub>H<sub>83</sub>NO<sub>3</sub>: HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 698,6446, medida m/z 698,6480. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,42-5,31, (3H, complejo); 3,57-3,38, (10H, complejo); 3,12 (1H, multiplete); 2,73, (1H, multiplete); 2,38 (6H, s); 2,35, (1H, ddd, J = 2,3, 4,8, 13,2 Hz); 2,22-0,84 (58H, complejo); 0,68, (3H, s) ppm.

Compuesto 6: 1-[(2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(ociloxi)propan-2-il]guanidina

1,28 g, 1,87 mmoles, con un rendimiento de 51%. C<sub>43</sub>H<sub>79</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 686,6194 uma, medida m/z 686,6201 uma. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,92 (1H, d, J = 5,9 Hz); 7,52 (2H, ancho); 7,13 (2H, ancho); 5,34 (1H, complejo); 3,71-3,40 (10H, complejo); 3,12 (1H, complejo); (2,35 (1H, ddd, 2,2, 4,6, 13,4 Hz); 2,18 (1H, complejo); 2,03-0,82 (57H); 0,68 (3H,s) ppm.

Compuesto 7: 1-[(2R)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina.

2,00 g, 2,35 mmoles, con un rendimiento de 64%. C<sub>57</sub>H<sub>103</sub>N<sub>3</sub>: HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 850,8011 uma, medida m/z 850,8011 uma. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,42-5,29 (5H, complejo); 3,53 (2H, dd, J = 5,6, 9,9 Hz); 3,47 (2H, dd, J = 5,6, 9,9 Hz); 3,44 (2H, multiplete); 3,40 (2H, t, 6,6 Hz); 3,39 (2H, t, 6,6 Hz); 3,12 (1H, multiplete); 2,77 (2H, t, 6,7 Hz); 2,71 (1H, multiplete); 2,37 (6H, s); 2,35 (1H, ddd, J = 2,3, 4,6, 13,2 Hz); 2,18 (1H, multiplete); 2,08-1,93 (6H, complejo); 1,92-1,78 (3H, complejo); 1,70-0,84 (66H, complejo); 0,68 (3H, s) ppm.

Compuesto 8: 1-[(2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina.

2,90 g, 3,60 mmoles, con un rendimiento de 56%. C<sub>54</sub>H<sub>97</sub>NO<sub>3</sub>: HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 808,7654 uma, medida m/z 808,7580 uma. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,42-5,30 (3H complejo); 3,56-3,37 (10H, complejo); 3,12 (1H, complejo); 2,77 (2H, t, J = 6,5 Hz); 2,72 (1H, multiplete); 2,38 (6H,s); 2,35 (1H, ddd, J = 2,3, 4,5, 3,4 Hz); 2,26-0,83 (70H, complejo); 0,68 (3H,s) ppm.

Compuesto 9: (2S)-1-([6-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]hexil]oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]propan-2-amina.

14,2 g, 16,9 mmoles, con un rendimiento de 68%. C<sub>56</sub>H<sub>103</sub>NO<sub>3</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 838,8017 uma, medida m/z 838,7996 uma. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,36-5,33 (3H, complejo); 4,13-3,40 (10H, complejo); 3,13 (1H, multiplete); 2,76 (1H, multiplete); 2,40 (6H, s) 2,35, (1H, ddd, J = 2,3, 4,8,13,2 Hz); 2,18 (1H, complejo); 2,06-0,86 (77H, complejo); 0,68 (3H,s) ppm.

Compuesto 10: (3β)-3-[6-[(2S)-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-2-(pirrolidin-1-il)propil]oxi]hexil]oxi]colest-5-eno.

1,72 g, 1,99 mmoles, con un rendimiento de 81% C<sub>58</sub>H<sub>105</sub>NO<sub>4</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 864,8172 uma, medida m/z 864,8240 uma. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,38-5,30 (3H, complejo); 3,58-3,52 (4H, complejo); 3,48-3,39 (6H, complejo); 3,12 (1H, multiple); 2,66 (4H, ancho); 2,50 (1H, c, J = 4Hz); 2,36 (1H, ddd, J = 2, 4, 12 Hz) 2,18 (1H, multiplete) 2,05-1,75 (14H, complejo); 1,57-0,86 (66H, complejo); 0,68 (3H,s) ppm.

Compuesto 11: (2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(ociloxi)propan-2-amina.

3,79 g, 5,88 mmoles, con un rendimiento de 76%. C<sub>42</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>4</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 644,5976 uma, medida m/z 644,6012 uma. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,73 (2H, ancho); 5,29 (1H, multiplete); 3,56-3,35 (10H, complejo); 3,08 (1H, multiplete); 2,29 (1H, multiplete); 2,13 (1H, multiplete); 2,01-1,74 (4H, complejo); 1,64-0,81 (54H, complejo); 0,64 (3H, s) ppm.

Compuesto 13: (2*R*)-1-((8-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]octil)oxi)-*N,N*-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amina.

C<sub>45</sub>H<sub>83</sub>NO<sub>3</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 686,6446 uma, medida m/z 686,6443 uma. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,30 (1H, multiplete); 3,50-3,33 (10H, complejo); 3,06 (1H, multiplete); 2,66 (1H, multiplete); 2,31 (6H, singlete); 2,29 (1H, multiplete); 2,13 (1H, multiplete); 1,94-1,72 (5H, complejo); 1,53-0,80 (54H, complejo); 0,62 (3H, singlete) ppm.

Compuesto 14: (2*R*)-1-((8-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]octil)oxi)-3-(heptiloxi)-*N,N*-dimetilpropan-2-amina.

C<sub>47</sub>H<sub>87</sub>NO<sub>3</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 714,6759 uma, medida m/z 714,6746 uma. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,30 (1H, multiplete); 3,52-3,35 (10H, complejo); 3,08 (1H, multiplete); 2,67 (1H, multiplete); 2,33 (6H, singlete); 2,30 (1H, multiplete); 2,15 (1H, multiplete); 2,00-1,74 (5H, complejo); 1,59-0,82 (58H, complejo); 0,64 (3H, singlete) ppm.

Compuesto 15: (2*R*)-1-((8-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]octil)oxi)-*N,N*-dimetil-3-[(2*Z*)-pent-2-en-1-ilo]propan-2-amina.

C<sub>45</sub>H<sub>81</sub>NO<sub>3</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 684,6289 uma, medida m/z 684,6276 uma. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,49 (2H, multiplete); 5,30 (1H, multiplete); 3,99 (2H, d, J = 6 Hz); 3,51-3,33 (8H, complejo); 3,08 (1H, multiplete); 2,69 (1H, multiplete); 2,33 (6H, singlete); 2,30 (1H, multiplete); 2,20-1,70 (8H, complejo); 1,51-0,82 (48H, complejo); 0,64 (3H, singlete) ppm.

Compuesto 16: (2*S*)-1-butoxi-3-((8-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]octil)oxi)-*N,N*-dimetilpropan-2-amina:

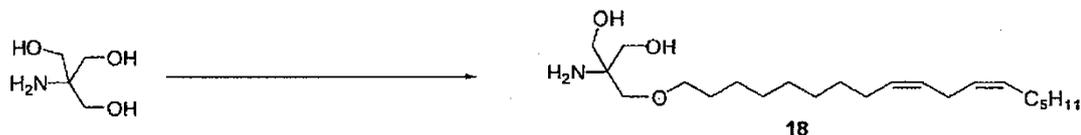
C<sub>44</sub>H<sub>81</sub>NO<sub>3</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 672,6289 uma, medida m/z 672,6285 uma. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,31 (1H, multiplete); 3,51-3,34 (10H, complejo); 3,08 (1H, multiplete); 2,67 (1H, multiplete); 2,33 (6H, singlete); 2,30 (1H, multiplete); 2,14 (1H, multiplete); 2,00-1,75 (5H, complejo); 1,54-0,81 (52H, complejo); 0,64 (3H, singlete) ppm.

Compuesto 17: (2*S*-1-((8-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]octil)oxi)-3-[2,2,3,3,7,4,4,5,5,-6,6,7,7,8,8,9,9-hexadecafluoronil]oxi)-*N,N*-dimetilpropan-2-amina.

C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>F<sub>16</sub>NO<sub>3</sub> HRMS (ESI positiva) M+H, m/z teórica 1030,5564 uma, medida m/z 1030,5506 uma. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,15-5,89 (1H, tt, J = 6,3, 65,0 Hz); 5,30 (1 H, multiplete); 3,95-3,88 (2H, t, J = 16,8 Hz); 3,69 (2H, multiple); 3,51-3,33 (6H, complejo); 3,08 (1H, multiplete); 2,72 (1H, multiplete); 2,33 (6H, singlete); 2,03 (1H, multiplete); 2,15 (1H, multiplete); 1,96 (2H, multiplete); 1,80 (3H, multiplete); 1,56-0,82 (45H, complejo); 0,64 (3H, singlete) ppm.

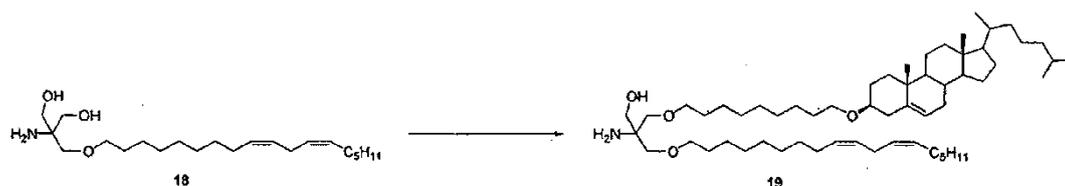
<sup>19</sup>FNMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 119,92 (2F, singlete); -122,40 (6F, singlete); -123,73 (4F, singlete); -129,74 (2F, singlete); -137,33 a -137,44 (2F, doblete, J = 55,0 Hz) ppm.

Preparación de 2-amino-2-[[[(9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dien-1-ilo]metil]propano-1,3-diol. (Compuesto 18)



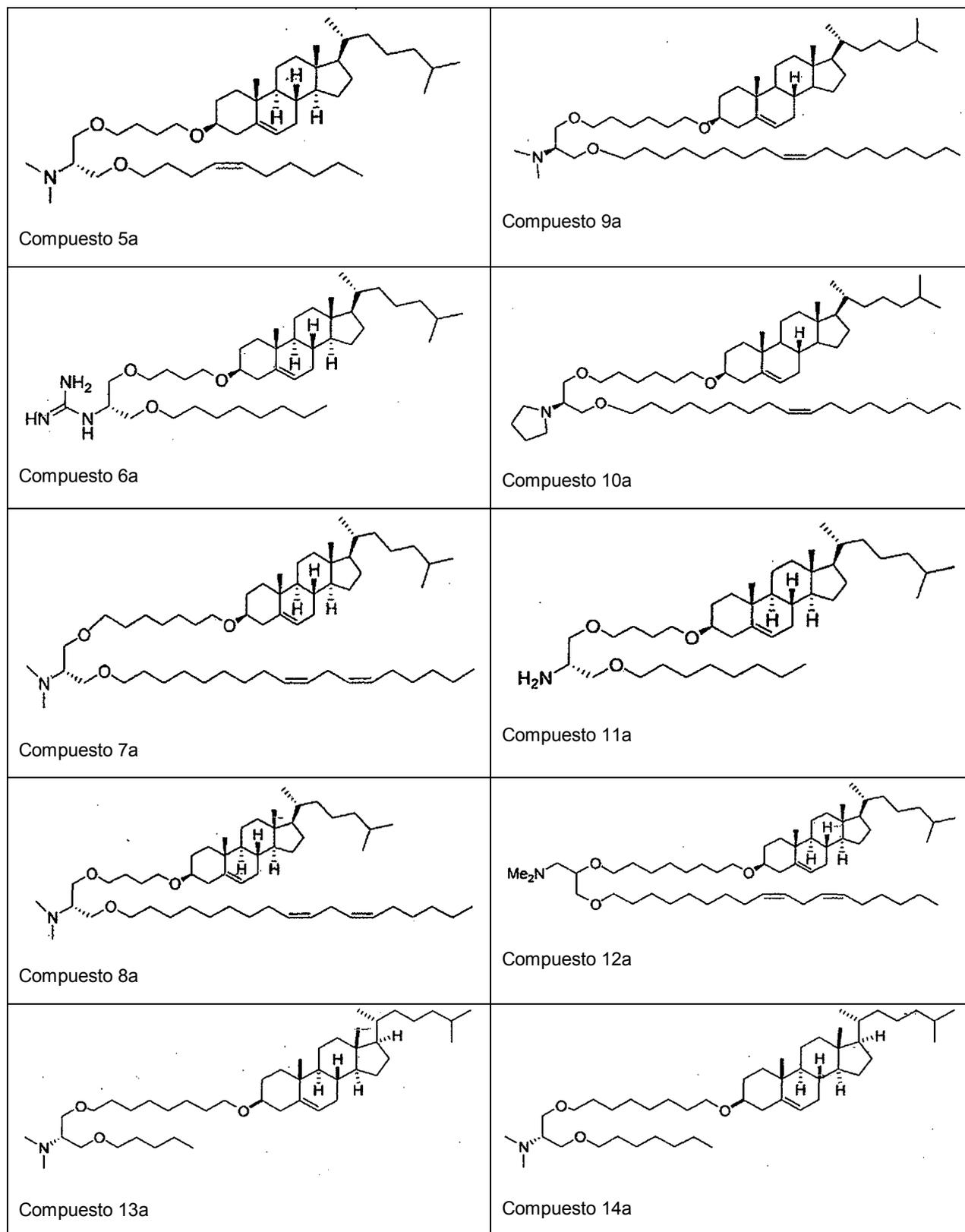
A una disolución agitada de hidruro de sodio (2,2 g, 55 mmoles) en tolueno (200 ml) a 0°C se añadió lentamente 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (5 g, 41,3 mmoles). La suspensión resultante se agitó a 0°C durante 1 hora. A esta mezcla se añadió mesilato de linoleílo (15 g, 43,5 mmoles), y la mezcla resultante se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La reacción se paralizó mediante adición lenta de alcohol isopropílico, seguido de hielo. La reacción se repartió entre éter y agua. Los orgánicos se lavaron con agua y con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron a vacío. El compuesto del título se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (MeOH/DCM-amoniaco 0-20%) para dar 3,25 g del producto deseado. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,39 (m, 4H), 3,53 (s, 4H), 3,49 (s, 2H), 3,43 (t, J = 6,59 Hz, 2H), 3,41 (s, 2H), 2,78 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,05 (m, 6H), 1,72 (s ancho, 4H), 1,57 (m, 4H), 1,34 (m, 14H), 0,89 (t, J = 6,78 Hz, 3H).

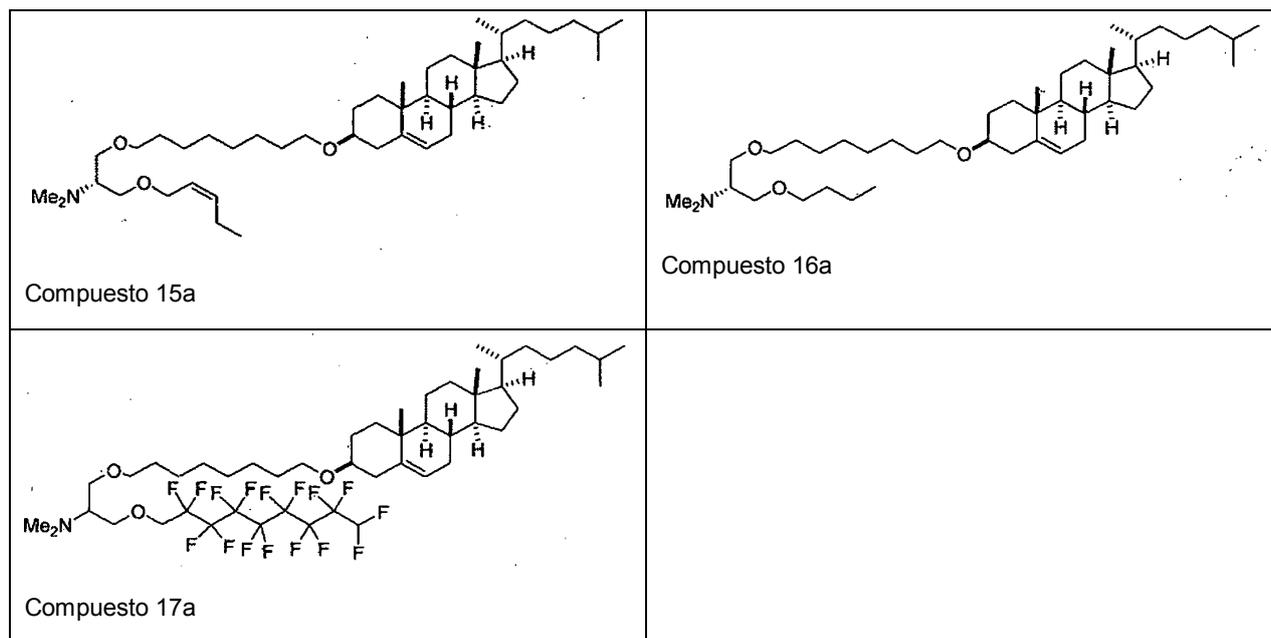
Preparación de 2-amino-3-((9-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-colest-5-en-3-ilo]nonil)oxi)-2-[[[(9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dien-1-ilo]metil]propano-1-ol. (Compuesto 19)



A una disolución agitada de 2-amino-2-[[[(9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dien-1-ilo]metil]propano-1,3-diol (2,7 g, 7,31 mmoles) en tolueno (50 ml) a 0°C se añadió hidruro de sodio (0,44 g, 11 mmoles) en porciones pequeñas. La suspensión resultante se curó durante 30 minutos y se trató con metanosulfonato de 9-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-colest-5-en-3-ilo]nonilo (6,5 g, 11 mmoles). La reacción se calentó a reflujo durante 24 horas, después se enfrió







- (2R)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **4a**);
- 5 (2S)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **5a**);
- 1-[(2S)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-il]guanidina (Compuesto **6a**);
- 1-[(2S)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **7a**);
- 10 1-[(2S)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **8a**);
- (2R)-1-{{6-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]hexil}oxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **9a**);
- (3β)-3-[6-{{(2R)-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-2-(pirrolidin-1-il)propil}oxi}hexil}oxi]colest-5-eno (Compuesto **10a**);
- 15 (2S)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-amina (Compuesto **11a**);
- (2S)-1-{{8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi}-N,N-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amina (Compuesto **13a**);
- (2S)-1-{{8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi}-3-(heptiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **14a**);
- (2S)-1-{{8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi}-N,N-dimetil-3-[(2Z)-pent-2-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **15a**); y
- 20 (2R)-1-butoxi-3-{{8-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi}-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **16a**).

#### COMPOSICIÓN LNP

##### Descripción 1 del procedimiento de LNP:

Las nanopartículas lipídicas (LNP) se preparan mediante un procedimiento de chorro incidente. Las partículas se forman mezclando volúmenes iguales de lípidos disueltos en alcohol con ARNpi disuelto en un amortiguador de citrato. La disolución lipídica contiene un nuevo lípido catiónico de la presente invención, un lípido auxiliar (colesterol) y un lípido de PEG (PEG-DMG) a una concentración de 5-15 mg/ml con un objetivo de 9-12 mg/ml en un alcohol (por ejemplo etanol). La relación de los lípidos tiene un intervalo de porcentaje en moles de 25-98 para el lípido catiónico con un objetivo de 45-65, el lípido auxiliar tiene un intervalo de porcentaje en moles de 0-75 con un

objetivo de 30-50, y el lípido de PEG tiene un intervalo de porcentaje en moles de 1-6 con un objetivo de 2-5. La disolución de ARNpi contiene una o más secuencias de ARNpi en un intervalo de concentraciones de 0,7 a 1,0 mg/ml con un objetivo de 0,8-0,9 mg/ml en un amortiguador de citrato de sodio:cloruro de sodio pH 4. Los dos líquidos se mezclan en una mezcladora de chorro incidente, formando instantáneamente las LNP. El ID tiene un intervalo de 0,25 a 1,0 mm, y un caudal total de 10-200 ml/min. La combinación de caudal e ID de tubo tiene un efecto sobre el control del tamaño de partículas de las LNPs entre 50 y 200 nm. Las LNPs mixtas se mantienen desde 30 minutos hasta 48 h antes de una etapa de dilución. La etapa de dilución comprende un mezclado de chorro incidente similar que diluye instantáneamente las LNP. Este procedimiento usa IDs de tubo que oscilan de 1 mm ID a 5 mm ID y un caudal de 10 a 400 ml/min. Las LNPs se concentran y diafiltran vía un procedimiento de ultrafiltración en el que se elimina el alcohol y el amortiguador de citrato se intercambia con la disolución de amortiguador final, tal como disolución salina amortiguada con fosfato. El procedimiento de ultrafiltración usa un formato de filtración de flujo tangencial (TFF). Este procedimiento usa un intervalo de corte de pesos moleculares nominal de membrana de 30-500 KD. El formato de la membrana puede ser fibra hueca o casete de lámina plana. Los procedimientos de TFF con el corte de pesos moleculares apropiado retienen las LNP en el retenido, y el filtrado o permeado contiene el alcohol, amortiguador de citrato, desechos del amortiguador final. El procedimiento de TFF es un procedimiento de múltiples etapas con una concentración inicial hasta una concentración de ARNpi de 1-3 mg/ml. Tras la concentración, la disolución de las LNPs se diafiltra frente al amortiguador final durante 15-20 volúmenes para eliminar el alcohol y llevar a cabo el intercambio de amortiguador. El material se concentra entonces 1-3 veces adicionales. Las etapas finales del procedimiento de LNP son filtrar de forma estéril la disolución de LNP concentrada e introducir el producto en un vial.

Procedimiento analítico:

#### 1) Concentración de ARNpi

Las concentraciones de los dúplex de ARNpi se determinan mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) usando un sistema Waters 2695 Alliance (Water Corporation, Milford MA) con un detector 2996 PDA. Las LNPs, de otro modo denominadas como vehículos de suministro de ARNi (RDVs), se tratan con 0,5% de Triton X-100 para liberar ARNpi total, y se analizan mediante separación con SAX usando una columna Dionex BioLC DNAPac PA 200 (4 x 250 mm) con detección de UV a 254 nm. La fase móvil está compuesta de A: 25 mM de NaClO<sub>4</sub>, 10 mM de Tris, 20% de EtOH, pH 7,0 y B: 250 mM de NaClO<sub>4</sub>, 10 mM de Tris, 20% de EtOH, pH 7,0 con gradiente lineal de 0-15 min. y caudal de 1 ml/min. La cantidad de ARNpi se determina comparando la curva patrón de ARNpi.

#### 2) Tasa de encapsulamiento

El reactivo de fluorescencia SYBR Gold se emplea para la cuantificación de ARN para monitorizar la tasa de encapsulamiento de los RDVs. Los RDVs con o sin Triton X-100 se usan para determinar la cantidad de ARNpi libre y ARNpi total. El ensayo se lleva a cabo usando un espectrofotómetro de microplaca SpectraMax M5e de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Las muestras se excitan a 485 nm, y la emisión de fluorescencia se mide a 530 nm. La cantidad de ARNpi se determina comparando con la curva patrón de ARNpi.

$$\text{Tasa de encapsulamiento} = (1 - \text{ARNpi libre} / \text{ARNpi total}) \times 100\%$$

#### 3) Tamaño de partículas y polidispersidad

Los RDVs que contienen 1 µg de ARNpi se diluyen hasta un volumen final de 3 ml con 1 x PBS. El tamaño de partículas y la polidispersidad de las muestras se miden mediante un método de dispersión dinámica de la luz usando el instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY). La intensidad dispersada se mide con un láser de He-Ne a 25°C con un ángulo de dispersión de 90°.

#### 4) Análisis del potencial zeta

Los RDVs que contienen 1 µg de ARNpi se diluyen hasta un volumen final de 2 ml con amortiguador de Tris 1 mM (pH 7,4). La movilidad electroforética de las muestras se determina usando el instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) con electrodo y láser de He-Ne como fuente de luz. En el cálculo de los potenciales zeta se adopta el límite Smoluchowski.

#### 5) Análisis de lípidos

Las concentraciones de lípidos individuales se determinan mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones de fase inversa (RP-HPLC) usando el sistema Waters 2695 Alliance (Water Corporation, Milford-MA) con un detector de aerosol cargado Corona (CAD) (ESA Biosciences, Inc, Chelmsford, MA). Los lípidos individuales en los RDVs se analizan usando una columna Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 4,6 mm, tamaño de partículas 1,8 µm) con CAD a 60°C. La fase móvil está compuesta de A: 0,1% de TFA en H<sub>2</sub>O y B: 0,1% de TFA en IPA. El gradiente es 75% de fase móvil A y 25% de fase móvil B desde tiempo 0 hasta 0,10 min.; 25% de fase móvil A y 75% de fase móvil B desde 0,10 a 1,10 min.; 25% de fase móvil A y 75% de fase móvil B desde 1,10 a 5,60 min.; 5% de fase móvil A y 95% de fase móvil B desde 5,60 a 8,01 min.; y 75% de fase móvil A y 25% de fase móvil B desde 8,01 hasta 13 min., con

caudal de 1 ml/min. La concentración de lípidos individuales se determina comparando la curva patrón con todos los componentes lipídicos en los RDVs con un ajuste cuadrático de curva. El porcentaje molar de cada lípido se calcula en base a su peso molecular.

5 Utilizando el procedimiento de LNP descrito anteriormente, se identificaron LNPs específicos con las siguientes relaciones y ARNpi:

Composición nominal:

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 60/38/2.

ARNpi de Luc

5'-iB-**AUAAGGCUAUGAAGAGAUATT**-iB 3' (SEC.ID.NO.:1)

10 3'-UUUAUUCCGAUACUUCUUAU-5' (SEC.ID.NO.:2)

AUGC – Ribosa

iB – Desoxi abásico invertido

UC - 2' Fluoro

**AGT** - 2' Desoxi

15 AGU - 2'OCH<sub>3</sub>

Lípido catiónico /colesterol/PEG-DMG 60/38/2

ARNpi de ApoB

5'-iB-**CUUUAACAAUCCUGAAUUTT**-iB (SEC ID NO.:3)

3'-UUGAAAUUGUUAAGGACUUAU-5' (SEQ ID NO.:4)

20 AUGC – Ribose

iB - Desoxi abásico invertido

UC - 2' Fluoro

**AGT** - 2' Desoxi

AGU - 2'-OCH<sub>3</sub>

25 Descripción 2 del procedimiento de LNP:

Las nanopartículas lipídicas (LNP) se preparan mediante un procedimiento de chorro incidente. Las partículas se forman mezclando lípidos disueltos en alcohol con ARNpi disuelto en un amortiguador de citrato. La relación de mezclado de lípidos a ARNpi se centran en 45-55% de lípido y 65-45% de ARNpi. La disolución lipídica contiene un nuevo lípido catiónico de la presente invención, un lípido auxiliar (colesterol), lípido de PEG (por ejemplo PEG-C-DMA, PEG-DMG), y DSPC a una concentración de 5-15 mg/ml con un objetivo de 9-12 mg/ml en un alcohol (por ejemplo etanol). La relación de los lípidos tiene un intervalo de porcentaje en moles de 25-98 para el lípido catiónico con un objetivo de 35-65, el lípido auxiliar tiene un intervalo de porcentaje en moles de 0-75 con un objetivo de 30-50, el lípido de PEG tiene un intervalo de porcentaje en moles de 1-15 con un objetivo de 1-6, y el DSPC tiene un intervalo de porcentaje en moles de 0-15 con un objetivo de 0-12. La disolución de ARNpi contiene una o más secuencias de ARNpi en un intervalo de concentraciones de 0,3 a 1,0 mg/ml con un objetivo de 0,3-0,9 mg/ml en una disolución salina amortiguada con citrato de sodio con pH en el intervalo de 3,5-5. Los dos líquidos se calentaron hasta una temperatura en el intervalo de 15-40°C, con un objetivo de 30-40°C, y después se mezclaron en una mezcladora de chorro incidente, formando instantáneamente las LNP. El ID tiene un intervalo de 0,25 a 1,0 mm, y un caudal total de 10-600 ml/min. La combinación de caudal e ID de tubo tiene un efecto sobre el control del tamaño de partículas de las LNPs entre 30 y 200 nm. La disolución se mezcla entonces con una disolución amortiguada a un pH mayor con una relación de mezclado en el intervalo de 1:1 a 1:3 vol:vol pero con un objetivo de 1:2 vol:vol. Esta disolución amortiguada está a una temperatura en el intervalo de 15-40°C, con un objetivo de 30-40°C. Las LNPs mixtas se mantienen desde 30 minutos hasta 2 h antes de una etapa de filtración de intercambio aniónico. La temperatura durante la incubación está en el intervalo de en el intervalo de 15-40°C, con un objetivo de 30-40°C. Tras la incubación, la disolución se filtra a través de un filtro de 0,8 um que contiene una etapa de separación de intercambio aniónico. Este procedimiento usa IDs de tubo que oscilan de 1 mm ID a 5 mm ID y un caudal de 10 a 2000 ml/min. Las LNPs se concentran y diafiltran vía un procedimiento de ultrafiltración en el que se elimina el alcohol y el amortiguador de citrato se intercambia con la disolución de amortiguador final, tal como

disolución salina amortiguada con fosfato. El procedimiento de ultrafiltración usa un formato de filtración de flujo tangencial (TFF). Este procedimiento usa un intervalo de corte de pesos moleculares nominal de membrana de 30-500 KD. El formato de la membrana puede ser fibra hueca o casete de lámina plana. Los procedimientos de TFF con el corte de pesos moleculares apropiado retienen las LNP en el retenido, y el filtrado o permeado contiene el alcohol, amortiguador de citrato, desechos del amortiguador final. El procedimiento de TFF es un procedimiento de múltiples etapas con una concentración inicial hasta una concentración de ARNpi de 1-3 mg/ml. Tras la concentración, la disolución de las LNPs se diafiltra frente al amortiguador final durante 10-20 volúmenes para eliminar el alcohol y llevar a cabo el intercambio de amortiguador. El material se concentra entonces 1-3 veces adicionales. Las etapas finales del procedimiento de LNP son filtrar de forma estéril la disolución de LNP concentrada e introducir el producto en un vial.

### EJEMPLO 1

Evaluación de eficacia y toxicidad *in vivo* de ratón

Las LNPs que utilizan Compuesto **9** o **12**, en las composiciones nominales descritas inmediatamente antes, se evaluaron para determinar la eficacia *in vivo* y la inducción de citocinas inflamatorias en un modelo de ratón de luciferasa. El ARNpi se dirige al transcrito de ARNm para el gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (número de acceso M15077). La secuencia primaria y el patrón de modificación química del ARNpi de luciferasa se muestran anteriormente. El modelo de luciferasa *in vivo* emplea un ratón transgénico en el que la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga está presente en todas las células. Ratones transgénicos ROSA26-LoxP-Stop-LoxP-Luc (LSL-Luc) autorizados del Dana Farber Cancer Institute son inducidos a expresar el gen de luciferasa eliminando en primer lugar la secuencia de LSL con un virus Ad-Cre recombinante (Vector Biolabs). Debido a la naturaleza organotrópica del virus, la expresión está limitada al hígado cuando se suministra mediante inyección en la vena de la cola. Los niveles de expresión de luciferasa en el hígado se cuantifican midiendo la producción de luz, usando un formador de imágenes IVIS (Xenogen) tras la administración del sustrato luciferina (Caliper Life Sciences). Los niveles de luminiscencia antes de la dosis se miden antes de la administración de los RDVs. La luciferina en PBS (15 mg/ml) se inyecta intraperitonealmente (IP) en un volumen de 150  $\mu$ l. Tras un período de incubación de cuatro minutos, los ratones se anestesian con isoflurano y se colocan en el formador de imágenes IVIS. Los RDVs (que contienen ARNpi) en el vehículo PBS se inyectaron en la vena de la cola en un volumen de 0,2 ml. Los niveles de dosis finales oscilaron de 0,3 a 3 mg/kg de ARNpi. Como control, se dosificó vehículo PBS solo. Tres horas después de la dosis, los ratones se sangraron retroorbitalmente para obtener plasma para el análisis de citocinas. Se formaron imágenes de los ratones 48 horas tras la dosis usando el método descrito anteriormente. Los cambios en la producción de luz por luciferina se correlacionan con los niveles de ARNm de luciferasa y representan una medida indirecta de la actividad de ARNpi de luciferasa. Los resultados de la eficacia *in vivo* se expresan como % de inhibición de luminiscencia con respecto a niveles de luminiscencia previos a la dosis. Los niveles de citocinas plasmáticas se determinaron usando la matriz quimioluminiscente de citocinas multiplexada SearchLight (Pierce/Thermo). La administración sistémica de los RDVs con ARNpi de luciferasa disminuyó la expresión de luciferasa de una manera dependiente de la dosis. Se observó una mayor eficacia en ratones a los que se les dosificaron compuestos **9** que contienen RDVs que con el RDV que contiene el lípido catiónico octil-CLinDMA, Compuesto **12**, (Tabla 1 y Figura 2). Los RDVs que contienen el Compuesto **9** y **12** aumentaron significativamente los niveles plasmáticos de ratón de las citocinas IL-6 y mKC con respecto al control de PBS. Sin embargo, la inducción media de citocinas fue menor en los animales dosificados con el RDV que contiene el Compuesto **9**, con respecto al RDV que contiene el Compuesto **12** (Figura 1).

Tabla 1: Datos de eficacia *in vivo* de ratón. % de inhibición media de bioluminiscencia por LNPs preparados a partir de los compuestos 9 y 12

Compuesto 9			Compuesto 12		
0.1 mg Kg <sup>-1</sup>	0.3 mg Kg <sup>-1</sup>	1.0 mg Kg <sup>-1</sup>	0.1 mg Kg <sup>-1</sup>	0.3 mg Kg <sup>-1</sup>	1.0 mg Kg <sup>-1</sup>
<u>80</u>	<u>89</u>	<u>91</u>	<u>54</u>	<u>74</u>	<u>88</u>

### EJEMPLO 2

Evaluación de eficacia y toxicidad *in vivo* de rata

Las LNPs que utilizan los Compuestos **9** o **12** en las composiciones nominales descritas anteriormente se evaluaron para determinar la eficacia *in vivo* y los incrementos en alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en ratas hembra Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)) (Charles River Labs). El ARNpi selecciona como diana el transcrito de ARNm para el gen ApoB (número de acceso NM 019287). La secuencia primaria y el patrón de modificación química del ARNpi de ApoB se presentan anteriormente. Los RDVs (que contienen ARNpi) en vehículo PBS se inyectaron en la vena de la cola en un volumen de 1 a 1,5 ml. La velocidad de infusión es aproximadamente 3 ml/min. En cada grupo de dosificación se usaron cinco ratas. Tras la administración de las LNP, las ratas se colocaron en jaulas con dieta normal y agua. Seis horas después de la dosis, se retiró la comida de las jaulas. La necropsia de los animales

se llevó a cabo 24 horas tras la dosificación de las LNP. Las ratas se anestesiaron en isoflurano durante 5 minutos, después se mantuvieron bajo anestesia colocándolas en conos de nariz que continuaban suministrando el isoflurano hasta que se terminó la exsanguinación. La sangre se recoge de la vena cava usando un conjunto de venipunción de mariposa de calibre 23, y se distribuyeron en alícuotas a tubos al vacío separadores del suero para el análisis químico del suero. Se tomaron punciones del lóbulo hepático caudado cortado y se colocan en ARNLater (Ambion) para el análisis del ARNm. El tejido hepático conservado se homogeneizó, y se aisló ARNm total usando un molino de perlas de Qiagen y el kit de aislamiento de ARN de Qiagen miRNA-Easy siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles hepáticos de ARNm de ApoB se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa. El mensaje se amplificó a partir de ARN purificado utilizando un conjunto de sondas comercial de ApoB de rata (número de catálogo de Applied Biosystems RN01499054\_ml). La reacción de PCR se llevó a cabo en un instrumento ABI 7500 con un Fast Block de 96 pocillos. El nivel de ARNm de ApoB se normaliza al ARNm de PPIB (NM 011149) de mantenimiento. Los niveles de ARNm de PPIB se determinaron mediante RT-PCR usando un conjunto de sondas comercial (número de catálogo de Applied Biosystems Mm00478295\_ml). Los resultados se expresan como una relación de ARNm de ApoB/ARNm de PPIB. Todos los datos de ARNm se expresan con respecto a la dosis de control de PBS. Los análisis de ALT y AST del suero se llevaron a cabo en el Siemens Advia 1800 Clinical Chemistry Analyzer utilizando los reactivos de alanina aminotransferasa (número de catálogo 03039631) y aspartato aminotransferasa (número de catálogo 03039631) de Siemens. Los RDVs que emplean ambos Compuestos **9** y **12** presentaron niveles similares de reducción de ARNm de ApoB a la dosis de 1 mpk (Figura 3). Se observó un incremento en LFTs para ambos RDVs, con respecto a ratas a las que se les dosificó el control de PBS (Figura 3). Mientras que los niveles de ALT aumentaron en mayor grado en ratas a las que se les dosificó el RDV del Compuesto **9**, los niveles de AST aumentaron más fuertemente con el RDV del Compuesto 12 (Figura 3).

### EJEMPLO 3

Evaluación de eficacia y toxicidad *in vivo* de mono Rhesus

Las LNPs que utilizan los Compuestos **9** o **12** en las composiciones nominales descritas anteriormente se evaluaron para determinar la eficacia *in vivo* y los incrementos de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en monos *Macaca mulatta* (rhesus) machos o hembras. El ARNpi selecciona como diana el transcrito de ARNm para el gen ApoB (número de acceso XM 001097404). La secuencia primaria y el patrón de modificación química del ARNpi de ApoB se presenta anteriormente. Los RDVs (que contienen ARNpi) en vehículo de PBS se administraron mediante inyección intravenosa en la vena safena a una velocidad de inyección de 20 ml/minuto a un nivel de dosis de 3,6 mg/kilogramo de ARNpi. Los volúmenes de inyección fueron de 1,9 a 2,1 ml/kilogramo, y el peso de los monos osciló de 2,5 a 4,5 kilogramos. Cada RDV o control de PBS se administró a dos monos. En múltiples días después de la dosis, se extrajeron muestras de sangre de 1 ml de la arteria femoral para el análisis químico del suero. Los monos ayunaron toda la noche antes de las extracciones de sangre. Los análisis de ALT y AST del suero se llevaron a cabo en el Siemens Advia 1800 Clinical Chemistry Analyzer utilizando los reactivos alanina aminotransferasa (número de catálogo 03039631) y aspartato aminotransferasa (número de catálogo 03039631) de Siemens. Como medida de la eficacia, LDL-C se monitorizó como marcador sustituto de la reducción de ARNm de ApoB aguas abajo. A los ocho días después de la administración sistémica, los RDVs que contienen los Compuestos **9** o **12** redujeron los niveles séricos de LDL-C a menos de 50% de los niveles antes de la dosis (Figura 4). El RDV que contiene el Compuesto **9** redujo los niveles de LDL-C en mayor medida que el RDV que contiene el Compuesto **12** (media: -63% frente a -53%). ALT y AST se evaluaron con respecto a valores previos a la dosis en monos tratados con los dos RDVs de los Compuestos 9 y 12 (Figura 4). La elevación de ALT fue aproximadamente equivalente para ambos RDVs, pero AST se elevó hasta un nivel notablemente mayor en el RDV que contiene el Compuesto **12**.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.

Cameron, Mark

Davis, Jennifer R.

Geiser, Andrea R.

Stanton, Matthew G.

50 Telyatnikov, Vladislav V.

Tian, Lu

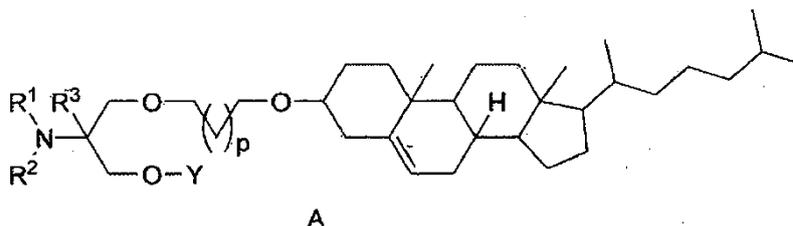
Wang, Weimin

<120> NUEVOS LÍPIDOS CATIONICOS CON DIVERSOS GRUPOS DE CABEZA PARA EL SUMINISTRO OLIGONUCLEOTÍDICO

<130> MRL-MIS-00013  
<150> 61/235,476  
<151> 2009-08-20  
<150> 61/345,754  
5 <151> 2010-05-18  
<160> 4  
<170> FastSEQ para Windows Version 4.0  
<210> 1  
<211> 21  
10 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Ácido nucleico enzimático  
<221> característica diversa  
15 <222> (1)..(1)  
<223> 2'-desoxi  
<221> característica diversa  
<222> (2)..(2)  
<223> 2'-fluoro  
20 <221> característica diversa  
<222> (3)..(6)  
<223> 2'-desoxi  
<221> característica diversa  
<222> (7)..(8)  
25 <223> 2'-fluoro  
<221> característica diversa  
<222> (9)..(9)  
<223> 2'-desoxi  
<221> característica diversa  
30 <222> (10)..(10)  
<223> 2'-fluoro  
<221> característica diversa  
<222> (11)..(17)  
<223> 2'-desoxi  
35 <221> característica diversa

REIVINDICACIONES

1. Un lípido catiónico de Fórmula A:



en la que:

5 p es 1 a 8;

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), heterociclilo, y poliamina, en los que dicho heterociclilo y poliamina están opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados de R<sup>4</sup>, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se pueden tomar junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo monocíclico con 4-7 miembros que contiene opcionalmente, además del nitrógeno, uno o dos heteroátomos adicionales seleccionados de N, O y S, estando dicho heterociclo monocíclico opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados de R<sup>4</sup>;

R<sup>3</sup> se selecciona de H y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), estando dicho alquilo opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados de R<sup>4</sup>;

R<sup>4</sup> se selecciona independientemente de halógeno, OR<sup>5</sup>, SR<sup>5</sup>, CN, CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup> y CON(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;

15 R<sup>5</sup> se selecciona independientemente de H, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) y arilo; e

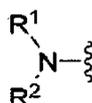
Y es un alquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), perfluoroalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), o un alquenilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>);

o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero de los mismos.

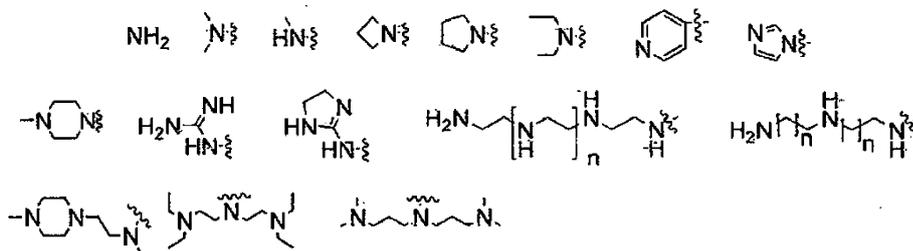
2. Un lípido catiónico de Fórmula A según la reivindicación 1, en el que:

p es 1 a 8;

20



se selecciona de:



25 n es 1 a 10;

R<sup>3</sup> es H; e

Y es un alquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), perfluoroalquilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>), o un alquenilo (C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>);

o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

3. Un lípido catiónico según la reivindicación 1, que se selecciona de:

30 (2S)-1-{7-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto 4);

(2R)-1-{4-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto 5);

- 1-[(2R)-1-{4-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-il]guanidina (Compuesto **6**);
- 1-[(2R)-1-{7-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **7**);
- 5 1-[(2R)-1-{4-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **8**);
- (2S)-1-({6-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]hexil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **9**);
- (3 $\beta$ )-3-[6-[(2S)-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-2-(pirrolidin-1-il)propil]oxi]hexil}oxi]colest-5-eno (Compuesto **10**);
- (2R)-1-{4-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-amina (Compuesto **11**);
- 10 (2R)-1-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amina (Compuesto **13**);
- (2R)-1-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-3-(heptiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **14**);
- (2R)-1-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(2Z)-pent-2-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **15**);
- (2S)-1-butoxi-3-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **16**);
- 15 (2S)-1-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-3-[2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexadecafluorononil]oxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **17**);
- 2-amino-3-({9-[(3 $\beta$ , 8 $\xi$ , 9 $\xi$ , 14 $\xi$ , 17 $\xi$ , 20 $\xi$ )-colest-5-en-3-iloxi]nonil}oxi)-2-[(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-iloxi]metil}propan-1-ol (Compuesto **19**); y
- 20 2-amino-3-({6-[(3 $\beta$ , 8 $\xi$ , 9 $\xi$ , 14 $\xi$ , 17 $\xi$ , 20 $\xi$ )-colest-5-en-3-iloxi]hexil}oxi)-2-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]metil}propan-1-ol (Compuesto **20**);
- o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.
4. Un lípido catiónico según la reivindicación 1, que se selecciona de:
- (2R)-1-{7-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **4a**);
- 25 (2S)-1-{4-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-[(4Z)-dec-4-en-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **5a**);
- 1-[(2S)-1-{4-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-il]guanidina (Compuesto **6a**);
- 1-[(2S)-1-{7-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]heptiloxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **7a**);
- 30 1-[(2S)-1-{4-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-N,N-dimetil-3-[(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **8a**);
- (2R)-1-({6-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]hexil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **9a**);
- 35 (3 $\beta$ )-3-[6-[(2R)-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-2-(pirrolidin-1-il)propil]oxi]hexil}oxi]colest-5-eno (Compuesto **10a**);
- (2S)-1-{4-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]butoxi}-3-(octiloxi)propan-2-amina (Compuesto **11a**);
- (2S)-1-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amina (Compuesto **13a**);
- (2S)-1-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-3-(heptiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **14a**);
- 40 (2S)-1-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(2Z)-pent-2-en-1-iloxi]propan-2-amina (Compuesto **15a**); y
- (2R)-1-butoxi-3-({8-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina (Compuesto **16a**).

5. El lípido catiónico según la reivindicación 1, que es:

(2S)-1-({6-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-ilo]hexil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-ilo]propan-2-amina  
(Compuesto **9**);

o cualquier sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

5 6. El lípido catiónico según la reivindicación 1, que es:

(2R)-1-({6-[(3 $\beta$ )-colest-5-en-3-ilo]hexil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z)-octadec-9-en-1-ilo]propan-2-amina  
(Compuesto **9a**).

Inducción de citocinas *in vivo* de ratón

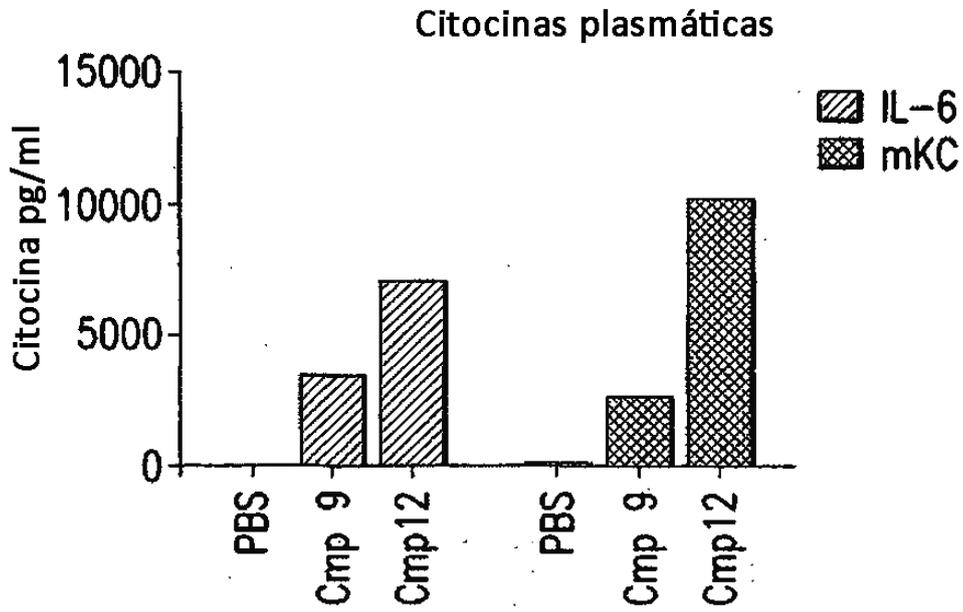


FIG. 1

Eficacia *in vivo* de ratón

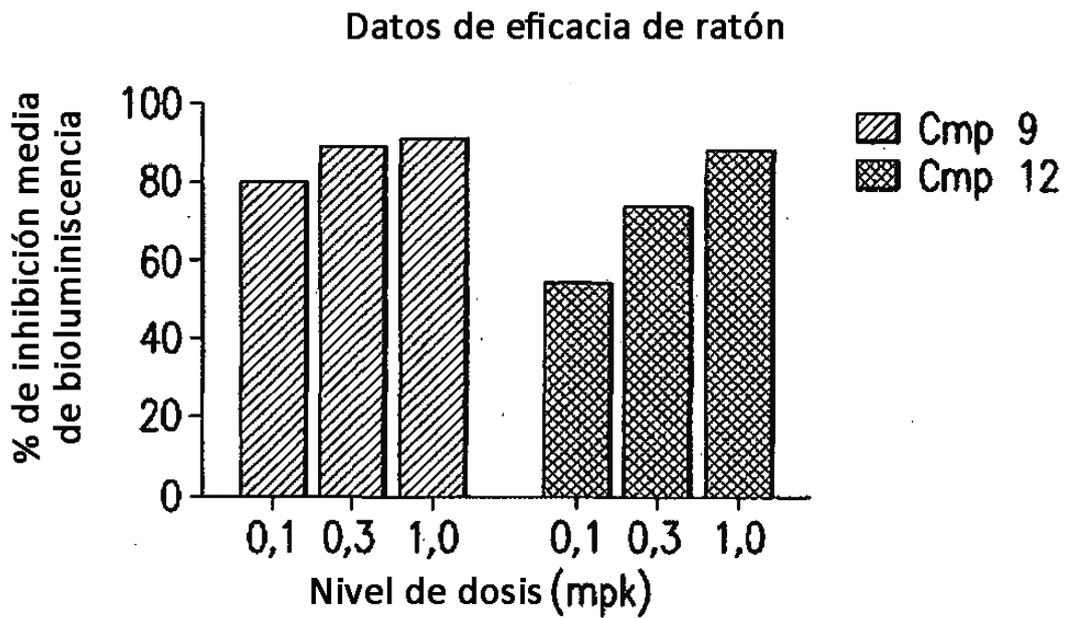


FIG. 2

Eficacia *in vivo* Y LFTs de rata

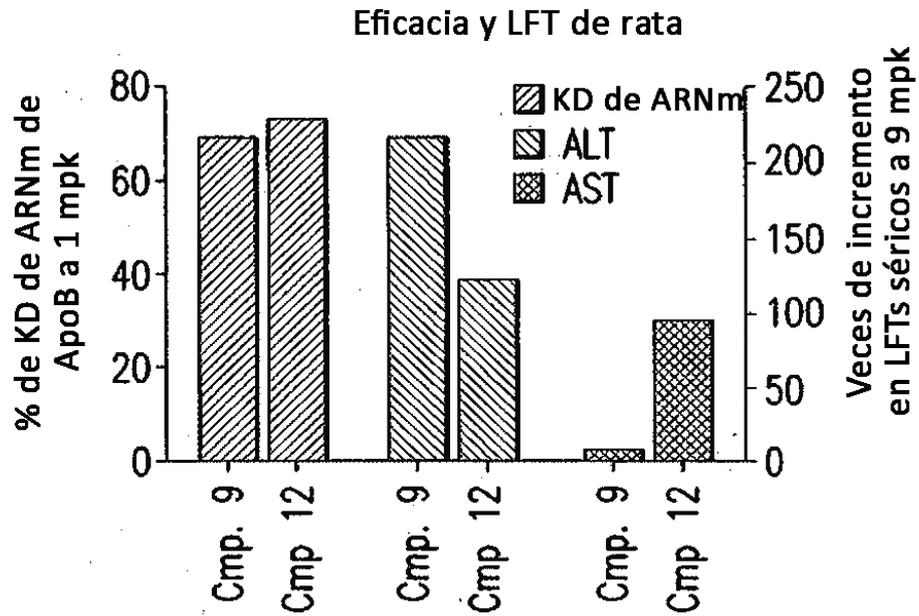


FIG.3

Eficacia *in vivo* y LFTs de Rhesus

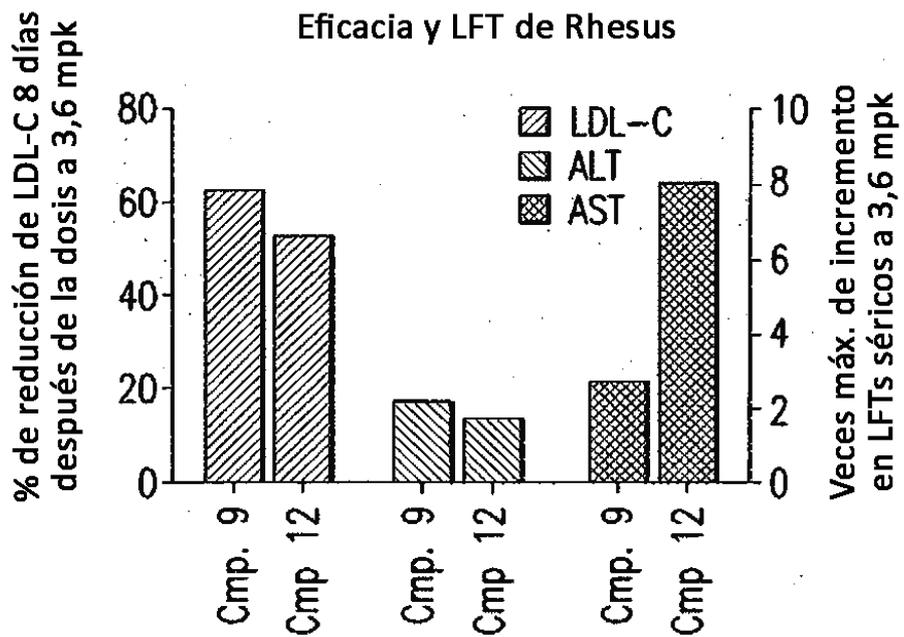


FIG.4