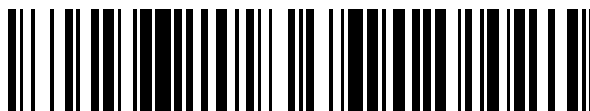


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 701**

51 Int. Cl.:

A61K 47/00 (2006.01)

A61K 31/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2009 PCT/US2009/063927**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10054401**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2009 E 09825609 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2355851**

54 Título: **Nuevos lípidos y composiciones para el suministro de agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

20.02.2009 US 154350 P

09.06.2009 US 185438 P

10.11.2008 US 113179 P

14.08.2009 US 234098 P

21.04.2009 US 171439 P

15.07.2009 US 225898 P

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

07.05.2018

73 Titular/es:

ARBUTUS BIOPHARMA CORPORATION (100.0%)

100- 8900 Glenlyon Parkway

Burnaby, BC V5J 5J8, CA

72 Inventor/es:

MANOHARAN, MUTHIAH;

JAYARAMAN, MUTHUSAMY;

RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL, G,;

ELTEPU, LAXMAN;

ANSELL, STEVEN y

CHEN, JIANXIN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 666 701 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 y composiciones para el suministro de agentes terapéuticos

5 La presente invención se refiere al campo del suministro de agentes terapéuticos utilizando partículas lipídicas. En particular, la presente invención proporciona lípidos catiónicos y partículas lipídicas que comprenden estos lípidos, que son ventajosos para el suministro *in vivo* de ácidos nucleicos, así como composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido adecuadas para el uso terapéutico *in vivo*. Adicionalmente, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden dichas partículas lipídicas.

10 Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, p.ej., ARN de interferencia pequeño (ARNip), microARN (miARN), oligonucleótidos antisentido, ribozimas, plásmidos, ácidos nucleicos estimuladores del sistema inmunitario, antisentido, antagomir, antimir, miméticos de micro ARN, supermir, adaptador U1 y aptámero. Estos ácidos nucleicos actúan a través de una variedad de mecanismos. En el caso de ARNip o miARN, estos ácidos nucleicos pueden regular a la baja los niveles intracelulares de proteínas específicas a través de un procedimiento denominado
15 interferencia de ARN (ARNi). Después de la introducción de ARNip o miARN en el citoplasma de la célula, estas construcciones de ARN de doble hebra se pueden unir a una proteína llamada RISC. La hebra sentido del ARNip o miARN se desplaza del complejo RISC proporcionando un molde dentro de RISC que puede reconocer y unir el ARNm con una secuencia complementaria a la del ARNip o miARN unidos. Habiendo unido el ARNm complementario, el complejo RISC escinde el ARNm y libera las hebras escindidas. La ARNi puede proporcionar una
20 regulación a la baja de proteínas específicas dirigiendo a la destrucción específica del ARNm correspondiente que codifica la síntesis de proteínas.

25 Las aplicaciones terapéuticas de la ARNi son extremadamente amplias, ya que las construcciones de ARNip y miARN se pueden sintetizar con cualquier secuencia de nucleótidos dirigida contra una proteína diana. Hasta la fecha, las construcciones de ARNip han demostrado la capacidad de regular a la baja las proteínas diana en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, las construcciones de ARNip están siendo evaluadas actualmente en estudios clínicos.

30 Sin embargo, dos problemas con los que se enfrentan actualmente las construcciones de ARNip o miARN son, primero, su susceptibilidad a la digestión con nucleasas en el plasma y, segundo, su capacidad limitada para acceder al compartimento intracelular donde se pueden unir al RISC cuando se administra sistémicamente en forma de ARNip o miARN libres. Estas construcciones de doble hebras se pueden estabilizar mediante la incorporación de conectores de nucleótidos químicamente modificados dentro de la molécula, por ejemplo, grupos fosfotioato. Sin embargo, estas modificaciones químicas proporcionan solamente una protección limitada frente a la digestión con
35 nucleasas y pueden disminuir la actividad de la construcción. El suministro intracelular de ARNip o miARN se puede facilitar mediante el uso de sistemas de soporte tales como polímeros, liposomas catiónicos o mediante modificación química de la construcción, por ejemplo mediante el anclaje covalente de moléculas de colesterol. Sin embargo, se requieren sistemas de suministro mejorados para aumentar la potencia de las moléculas de ARNip y miARN y reducir o eliminar el requisito de modificación química.

40 Los oligonucleótidos antisentido y las ribozimas también pueden inhibir la traducción del ARNm a la proteína. En el caso de construcciones antisentido, estos ácidos desoxinucleicos de hebra sencilla tienen una secuencia complementaria a la del ARNm de la proteína diana y pueden unirse al ARNm mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick. Esta unión impide la traducción del ARNm diana y/o desencadena la degradación por ARNasa H
45 de los transcritos de ARNm. En consecuencia, los oligonucleótidos antisentido tienen un tremendo potencial para la especificidad de acción (*es decir*, regulación a la baja de una proteína relacionada con una enfermedad específica). Hasta la fecha, se ha demostrado que estos compuestos son prometedores en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo modelos de enfermedades inflamatorias, cáncer y VIH (revisado en Agrawal, Trends in Biotech. 14: 376-387 (1996)). Las moléculas antisentido también pueden afectar a la actividad celular hibridando específicamente con
50 ADN cromosómico. Se encuentran actualmente en curso evaluaciones clínicas avanzadas en seres humanos de varios medicamentos antisentido. Las dianas de estos fármacos incluyen los genes de bcl2 y apolipoproteína B y los productos de ARNm.

55 Los ácidos nucleicos inmunoestimuladores incluyen ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos. En el caso de los ácidos desoxirribonucleicos, se ha demostrado que ciertas secuencias o motivos provocan la estimulación inmunitaria en los mamíferos. Estas secuencias o motivos incluyen el motivo CpG, las secuencias ricas en pirimidina y las secuencias palindrómicas. Se cree que el motivo CpG en los ácidos desoxirribonucleicos es específicamente reconocido por un receptor endosomal, receptor 9 de tipo Toll (TLR-9), que a continuación desencadena la ruta de estimulación inmunitaria tanto innata como adquirida. También se ha informado sobre ciertas secuencias de ácido
60 ribonucleico estimuladoras del sistema inmunitario. Se cree que estas secuencias de ARN desencadenan la activación inmunitaria al unirse a los receptores 6 y 7 de tipo Toll (TLR-6 y TLR-7). Además, también se informa de que el ARN de doble hebra es inmunoestimulador y se cree que se activa mediante la unión a TLR-3.

Un problema bien conocido con el uso de ácidos nucleicos terapéuticos se refiere a la estabilidad del enlace internucleotídico fosfodiéster y a la susceptibilidad de este conector a las nucleasas. La presencia de exonucleasas y

endonucleasas en el suero da como resultado la digestión rápida de ácidos nucleicos que poseen enlaces fosfodiéster y, por lo tanto, los ácidos nucleicos terapéuticos pueden tener semividas muy cortas en presencia de suero o dentro de las células. (Zelphati, O., et al., *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993); y Thierry, A.R., et al., pág. 147-161 en *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Eds. Erickson, RP e Izant, JG; Raven Press, NY (1992)). El ácido nucleico terapéutico que se está desarrollando actualmente no emplea la química básica del fosfodiéster que se encuentra en los ácidos nucleicos naturales, debido a estos y otros problemas conocidos.

Este problema ha sido parcialmente superado por modificaciones químicas que reducen la degradación sérica o intracelular. Se han sometido a ensayo modificaciones en el puente fosfodiéster internucleotídico (*p.ej.*, utilizando enlaces fosforotioato, metilfosfonato o fosforamidato), en la base nucleotídica (*p.ej.*, 5-propinil-pirimidinas), o en el azúcar (*p.ej.*, azúcares modificados en 2') (Uhlmann E., et al. *Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer*, Vol. X., pág 64-81 Academic Press Inc. (1997)). Otros han intentado mejorar la estabilidad utilizando enlaces azúcar 2'-5' (véase, *p.ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.532.130). Se han intentado otros cambios. Sin embargo, se ha demostrado que ninguna de estas soluciones es completamente satisfactoria, y los ácidos nucleicos terapéuticos libres *in vivo* todavía tienen una eficacia limitada.

Además, como se indicó anteriormente en relación con el ARNip y el miRNA, persisten los problemas con la capacidad limitada de los ácidos nucleicos terapéuticos para atravesar las membranas celulares (véase, Vlassov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1197:95-1082 (1994)) y los problemas asociados con la toxicidad sistémica, tales como la anafilaxia mediada por el complemento, las propiedades coaguladoras alteradas y la citopenia (Galbraith, et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994)).

Para intentar mejorar la eficacia, los investigadores también han empleado sistemas portadores basados en lípidos para suministrar ácidos nucleicos terapéuticos químicamente modificados o no modificados. En Zelphati, O y Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), los autores se refieren al uso de liposomas aniónicos (convencionales), liposomas sensibles al pH, inmunoliposomas, liposomas fusogénicos y productos agregados de lípidos catiónicos/moléculas antisentido. De forma similar, el ARNip se ha administrado sistémicamente en liposomas catiónicos, y se ha informado de que estas partículas de ácido nucleico-lípido proporcionan una regulación a la baja mejorada de las proteínas diana en mamíferos, incluyendo los primates no humanos (Zimmermann et al., *Nature* 441: 111-114 (2006)).

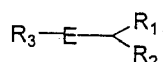
En este contexto, el documento DE 34 02 146 A1 describe ciertos compuestos de amonio cuaternario, métodos para su producción, así como su uso como emolientes textiles. En este contexto, dicho documento describe un éster 2-(dimetilamino)etílico de ácido 2-hexadecileicosanoico. Adicionalmente, el documento WO 2010/068816 A1 describe moléculas de ARN de doble hebra que se dirigen a un gen G heterotrimérico, así como los métodos para utilizarlas. En este contexto, dicho documento describe un éster (10Z,13Z)-1-(9Z,12Z)-9,12-octadecadien-1-il-10,13-nonadecadien-1-ílico de ácido 4-(dimetilamino)butanoico. Además, el documento WO 2010/042877 A1 describe composiciones basadas en lípidos y métodos para el suministro de agentes terapéuticos a las células. En este contexto, dicho documento describe un éster (10Z,13Z)-1-(9Z,12Z)-9,12-octadecadien-1-il-10,13-nonadecadien-1-ílico de N,N-dimetil-beta-alanina.

A pesar de este progreso, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones de lípido-ácido nucleico terapéuticas mejoradas que sean adecuadas para el uso terapéutico general. Preferiblemente, estas composiciones encapsularían los ácidos nucleicos con una alta eficacia, tendrían razones de fármaco:lípido elevadas, protegerían al ácido nucleico encapsulado de la degradación y aclaramiento en el suero, serían adecuadas para el suministro sistémico y proporcionarían el suministro intracelular del ácido nucleico encapsulado. Además, estas partículas de lípido-ácido nucleico deberían ser bien toleradas y proporcionar un índice terapéutico adecuado, de modo que el tratamiento del paciente a una dosis eficaz del ácido nucleico no esté asociado con una toxicidad y/o riesgo significativos para el paciente. La presente invención proporciona tales composiciones y usos de las mismas para introducir ácidos nucleicos en células, incluyendo el tratamiento de enfermedades.

La presente invención proporciona nuevos lípidos catiónicos, así como partículas lipídicas que comprenden los mismos. Estas partículas lipídicas pueden comprender adicionalmente un agente activo y utilizarse de acuerdo con los métodos relacionados descritos en la presente memoria para suministrar el agente activo a una célula.

En particular, la presente invención se refiere a los siguientes apartados:

1. Un compuesto que tiene la estructura



(XXXIII)

o sus sales,
en donde:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada caso alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueniilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido,

en donde el término "sustituido" se refiere a la sustitución de uno o más radicales hidrógeno en una estructura dada por el radical de un sustituyente específico seleccionado del grupo que consiste en halo, alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, heterociclilo, tiol, alquiltio, oxo, tioxi, ariltio, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, haloalquilo, amino, trifluorometilo, ciano, nitro, alquilamino, arilamino, alquilaminoalquilo, arilaminoalquilo, aminoalquilamino, hidroxilo, alcoxialquilo, carboxialquilo, alcoxicarbonilalquilo, aminocarbonilalquilo, acilo, aralcoxicarbonilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfonilo, ácido fosfónico, arilo, heteroarilo, heterocíclico y alifático, en donde el sustituyente puede estar sustituido adicionalmente con amino, alquilamino, dialquilamino, o compuestos amino cíclicos;

R₃ es ω -amino-*n*-butilo, o ω -(sustituido)amino-*n*-butilo, en donde un ω -(sustituido)amino-*n*-butilo es un ω -amino-*n*-butilo en donde al menos uno de los H en N ha sido reemplazado por alquilo; y E es C(O)O.

2. Una partícula lipídica que comprende un compuesto del apartado 1.

3. La partícula lipídica del apartado 2, en donde la partícula comprende adicionalmente un lípido neutro y un lípido capaz de reducir la agregación.

4. La partícula lipídica del apartado 3, en donde la partícula lipídica consiste esencialmente en

- a. un compuesto del apartado 1;
- b. un lípido neutro seleccionado entre DSPC, DPPC, POPC, 1,2-dioleoil-*sn*-3-fosfoetanolamina (DOPE) y esfingomielina;
- c. esteroles; y
- d. PEG-DMG o PEG-DMA;

a una razón molar de lípido a aproximadamente 20-60%: lípido neutro al 5-25%: esteroles al 25-55%: PEG-DMG o PEG-DMA al 0,5-15%.

5. La partícula lipídica del apartado 2, que comprende adicionalmente un agente terapéutico.

6. La partícula lipídica del apartado 5, en donde el agente terapéutico es un ácido nucleico, seleccionado del grupo que consiste en un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulador, un ARNip, un oligonucleótido antisentido, un microARN, un antagomir, un aptámero y una ribozima.

7. La partícula lipídica del apartado 5 o 6 para su uso en la modulación de la expresión de un gen diana en una célula.

8. La partícula lipídica para el uso del apartado 7, en donde el agente terapéutico se selecciona entre un ARNip, un antagomir, un oligonucleótido antisentido, un plásmido capaz de expresar un ARNip, una ribozima, un aptámero o un oligonucleótido antisentido, y un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, de manera que la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento del mismo se incrementa.

9. La partícula lipídica para el uso del apartado 8, en donde el gen diana se selecciona del grupo que consiste en Factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen de Ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen de Ciclina A, gen de Ciclina E, gen WNT-1, gen de beta-catenina, gen c-MET, gen PKC, gen NFkB, gen STAT3, gen de survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen de topoisomerasa I, gen de topoisomerasa alfa II, gen p73, gen p21(WAF1/CIP1), gen p27(KIP1), gen PPM1D, gen de caveolina I, gen MIB I, gen MTAI, gen M68, genes supresores tumorales y gen supresor tumoral p53.

10. Una composición farmacéutica que comprende una partícula lipídica del apartado 6 y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptables.

11. La composición farmacéutica del apartado 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizados por la expresión en exceso de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico se selecciona entre un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNip, ARNm o ARN antisentido comprenden un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un

complemento del mismo.

12. La composición farmacéutica del apartado 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizados por la expresión anormalmente baja de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.

13. La composición farmacéutica del apartado 10 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un oligonucleótido inmunoestimulador.

14. Una vacuna que comprende la partícula lipídica del apartado 6 y un antígeno asociado con una enfermedad o patógeno, en donde el ácido nucleico es un plásmido, y dicho antígeno es un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno parásito.

Las figuras muestran:

Figura 1. Representación esquemática de un lípido ópticamente puro con ligandos de direccionamiento conjugados.

Figura 2. Representación esquemática de las características de los lípidos de la presente invención.

Figura 3. Muestra una tabla que representa los valores de CE50 y pKa de lípidos ilustrativos sometidos a ensayo utilizando el método descrito en los Ejemplos.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de lípidos catiónicos que proporcionan ventajas cuando se utilizan en partículas lipídicas para el suministro *in vivo* de un agente terapéutico. En particular, como se ilustra mediante los Ejemplos adjuntos, la presente invención proporciona composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden un lípido catiónico de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria proporciona un aumento de la actividad del ácido nucleico y/o una mejor tolerabilidad de las composiciones. *in vivo*, que puede dar como resultado un aumento significativo en el índice terapéutico en comparación con las composiciones de partículas de lípido-ácido nucleico previamente descritas. Adicionalmente, se describen composiciones y métodos de uso que pueden proporcionar una mejora de la toxicidad observada con ciertas partículas terapéuticas de ácido nucleico-lípido.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona específicamente composiciones mejoradas para el suministro de moléculas de ARNip. En la presente memoria se muestra que estas composiciones son eficaces para regular a la baja los niveles de proteína y/o los niveles de ARNm de las proteínas diana. Además, se muestra que la actividad de estas composiciones mejoradas depende de la presencia de ciertos lípidos catiónicos y que la razón molar de lípidos catiónicos en la formulación puede influir en la actividad.

Las partículas lipídicas y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para una variedad de propósitos, que incluyen el suministro de agentes terapéuticos asociados o encapsulados a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, se describen en la presente memoria métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto que lo necesita, poniendo en contacto al sujeto con una partícula lipídica de la presente invención asociada con un agente terapéutico adecuado.

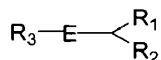
Como se describe en la presente memoria, las partículas lipídicas de la presente invención son particularmente útiles para el suministro de ácidos nucleicos, incluyendo, *p.ej.*, moléculas de ARNip y plásmidos. Por lo tanto, las partículas lipídicas y las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para modular la expresión de genes y proteínas diana tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una partícula lipídica de la presente invención asociada con un ácido nucleico que reduce la expresión del gen diana (*p.ej.*, un ARNip) o un ácido nucleico que se puede utilizar para aumentar la expresión de una proteína deseada (*p.ej.*, un plásmido que codifica la proteína deseada).

Varias realizaciones ilustrativas de los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria, así como partículas lipídicas y composiciones que las comprenden, y su uso para suministrar agentes terapéuticos y modular la expresión de genes y proteínas se describen con más detalle a continuación.

LÍPIDOS

En la presente memoria, se describen nuevos lípidos que tienen ciertas características de diseño. Como se muestra en la Figura 2, las características de diseño de lípidos incluyen al menos uno de los siguientes: un grupo de cabeza con pKa variable, un catiónico, 1°, 2° y 3°, monoamina, di y triamina, oligoamina/poliamina, un grupo de cabeza de bajo pKa - imidazoles y piridina, guanidinio, colas aniónicas, zwitteriónicas e hidrófobas pueden incluir cadenas simétricas y/o asimétricas, largas y cortas, cadenas saturadas e insaturadas, la cadena principal incluye glicéridos de cadena principal y otros análogos acíclicos, cíclicos, espiro, bicíclicos y policíclicos enlaces con éteres, ésteres, fosfato y análogos, sulfonato y análogos, disulfuros, enlaces sensibles al pH como acetales y cetales, iminas e hidrazonas y oximas.

En la presente memoria se describen lípidos novedosos que se usan ventajosamente en partículas lipídicas descritas en la presente memoria para el suministro *in vivo* de agentes terapéuticos a células, que incluyen lípidos que tienen la siguiente estructura. En un aspecto, el lípido es un compuesto de fórmula XXXIII,



XXXIII

5 sales o isómeros de los mismos, en donde:

R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada caso alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o -conector-ligando;

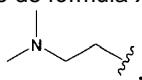
10 R₃ es H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω-aminoalquilos, ω-aminoalquilos (sustituidos), ω-fosfoalquilos, ω-tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, pm 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (pm 120-40K), heteroarilo, heterociclo o conector-ligando; y

15 E es C(O)O o OC(O).

En una realización, R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada caso alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alcoxi C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueniloxi C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquinil(C₁₀-C₃₀)oxi opcionalmente sustituido, o acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido.

En otra realización, R₃ es H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosfato opcionalmente sustituido, fosfoalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosforotioato opcionalmente sustituido, fosforotioalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosforoditioato opcionalmente sustituido, fosforoditioalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosfonato opcionalmente sustituido, fosfonoalquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquilaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquil)aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, pm 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (pm 120-40K), heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido o conector-ligando.

En una realización, donde el lípido es un compuesto de fórmula XXXIII, siempre que cuando E sea C(O)O y R₃ sea

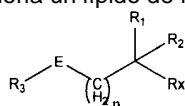


35 R¹ y R² no son ambos linoleilo.

En una realización, el lípido es un compuesto de fórmula XXXIII, en donde R₃ es H, alquenilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω-aminoalquilos, ω-aminoalquilos(sustituidos), ω-fosfoalquilos, ω-tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, pm 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (pm 120-40K), heteroarilo, heterociclo o conector-ligando.

En otra realización más, el lípido es un compuesto de fórmula XXXIII, en donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada caso alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o conector-ligando.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un lípido de fórmula XXXVIII:



XXXVIII,

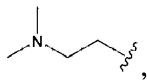
en donde

50 E es C(O)O o OC(O);

R₁ y R₂ y R_x son cada uno independientemente para cada caso H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquenilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alquinilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o conector-ligando, siempre que al menos uno de R₁, R₂ y R_x no sea H;

5 R_3 es H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo, alquilfosfato, alquilfosforotioato, alquilfosforoditioato, alquilfosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω -aminoalquilos, ω -aminoalquilos(sustituidos), ω -fosfoalquilos, ω -tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, pm 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (pm 120-40K), heteroarilo, heterociclo o conector-ligando; n es 0, 1, 2 o 3.

En una realización, donde el lípido es un compuesto de fórmula XXXVIII, siempre que cuando E es C(O)O, R^3 es



10 y uno de R_1 , R_2 o R_X es H, el resto de R_1 , R_2 o R_X no son ambos linoleilo.

En algunas realizaciones, cada uno de R_1 y R_2 es independientemente para cada caso alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o conector-ligando.

15 En algunas realizaciones, R_X es H o alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R_X es alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o conector-ligando.

20 En una realización, R_1 y R_2 son cada uno independientemente para cada caso alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alcoxi C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno(C₁₀-C₃₀)oxi opcionalmente sustituido, alqueno(C₁₀-C₃₀)oxi opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno(C₁₀-C₃₀)oxi opcionalmente sustituido, o acilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido o ligando-ligando.

25 En una realización, R_3 es independientemente para cada caso H, alquilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido, alquilheterociclo opcionalmente sustituido, heterocicloalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosfato opcionalmente sustituido, fosfoalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosforotioato alquilo opcionalmente sustituido, fosforotioalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosforoditioato opcionalmente sustituido, fosforoditioalquilo opcionalmente sustituido, alquilfosfonato opcionalmente sustituido, fosfonoalquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, alquilamino opcionalmente sustituido, di(alquil)amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, alquilaminoalquilo opcionalmente sustituido, di(alquil)aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, pm 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (pm 120-40K), heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclo opcionalmente sustituido, o ligando-conector.

35 En una realización, E es -C(O)O- o -OC(O)-.

40 En una realización, Z' es -O-, -S-, -N(Q)- o alqueno.

En algunas circunstancias, R_3 es ω -aminoalquilo, ω -aminoalquilo(sustituido), ω -fosfoalquilo o ω -tiofosfoalquilo; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido. Los ejemplos de grupos ω -aminoalquilo(sustituido) incluyen 2-(dimetilamino)etilo, 3-(diisopropilamino)propilo o 3-(N-etil-N-isopropilamino)-1-metilpropilo.

45 Se ha encontrado que los lípidos catiónicos que comprenden cadenas de alquilo insaturadas son particularmente útiles para formar partículas de ácido nucleico y lípido con un aumento de la fluidez de membrana. En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres sitios de insaturación, p.ej. doble enlace o triple enlace.

50 En una realización, solamente uno de R_1 o R_2 comprende al menos uno, al menos dos o al menos tres sitios de insaturación.

En una realización, R_1 y R_2 comprenden ambos al menos uno, al menos dos o al menos tres sitios de insaturación.

55 En una realización, R_1 y R_2 comprenden diferentes números de insaturación, p.ej., uno de R_1 y R_2 tiene un sitio de insaturación y el otro tiene dos o tres sitios de insaturación.

En una realización, R_1 y R_2 comprenden ambos el mismo número de sitios de insaturación.

60 En una realización, R_1 y R_2 comprenden diferentes tipos de insaturación, p.ej. la insaturación en uno de R_1 y R_2 es un doble enlace y en el otro la insaturación es un triple enlace.

En una realización, R_1 y R_2 comprenden ambos el mismo tipo de insaturación, p.ej. un doble enlace o un triple

enlace.

En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 comprende al menos un doble enlace y al menos un triple enlace.

5 En una realización, solamente uno de R_1 o R_2 comprende al menos un doble enlace y al menos un triple enlace.

En una realización, R_1 y R_2 comprenden ambos al menos un doble enlace y al menos un triple enlace.

10 En una realización, R_1 y R_2 son ambos iguales, p.ej. R_1 y R_2 son ambos linoleilo (C18) o R_1 y R_2 son ambos heptadeca-9-enilo.

En una realización, R_1 y R_2 son diferentes el uno del otro.

En una realización, al menos uno de R_1 y R_2 es colesterol

15 En una realización, uno de R_1 y R_2 es un conector-ligando.

En una realización, uno de R_1 y R_2 es un -conector-ligando y el ligando es un lipófilo.

20 En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 comprende al menos un grupo CH_2 grupo con uno o ambos H reemplazados por F, p.ej. CHF o CF_2 . En una realización, R_1 y R_2 comprenden ambos al menos un grupo CH_2 con uno o dos H reemplazados por F, p.ej. CHF o CF_2 .

25 En una realización, solamente uno de R_1 y R_2 comprende al menos un grupo CH_2 con uno o ambos H reemplazados por F.

En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 termina en CH_2F , CHF_2 o CF_3 . En una realización, R_1 y R_2 terminan ambos en CH_2F , CHF_2 o CF_3 .

30 En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 es $-(\text{CF}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CH}_2)_y\text{-CH}_3$, en donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

En una realización, R_1 y R_2 son ambos $-(\text{CF}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CH}_2)_y\text{-CH}_3$, en donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

35 En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 es $-(\text{CH}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CF}_2)_y\text{-CF}_3$, en donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

40 En una realización, R_1 y R_2 son ambos $-(\text{CH}_2)_y\text{-Z}''-(\text{CF}_2)_y\text{-CF}_3$, en donde cada y es independientemente 1-10 y Z'' es O, S o N(Q).

En una realización, al menos uno de R_1 o R_2 es $-(\text{CF}_2)_y\text{-(CF}_2)_y\text{-CF}_3$, en donde cada y es independientemente 1-10. En una realización, R_1 y R_2 son ambos $-(\text{CF}_2)_y\text{-(CF}_2)_y\text{-CF}_3$, en donde cada y es independientemente 1-10.

45 En una realización, R_3 se selecciona de un grupo que consiste en metilo, etilo, poliamina, $-(\text{CH}_2)_h\text{-heteroarilo}$, $-(\text{CH}_2)_h\text{-N(Q)}_2$, $-\text{O-N(Q)}_2$, $-(\text{CH}_2)_h\text{-Z}''-(\text{CH}_2)_h\text{-heteroarilo}$, conector-ligando, $-(\text{CH}_2)_h\text{-heterociclo}$, y $-(\text{CH}_2)_h\text{-Z}''-(\text{CH}_2)_h\text{-heterociclo}$, en donde cada h es independientemente 0-13 y Z'' es O, S o N(Q).

En una realización, cuando Z es C(R_3), al menos un R_3 es ω -aminoalquilo o ω -aminoalquilo(sustituido).

50 En una realización, cuando Z' es O, S o alquilo, al menos un R_3 es ω -aminoalquilo o ω -aminoalquilo (sustituido).

En una realización, Q es conector-ligando.

55 En una realización, el ligando es un péptido fusogénico.

En una realización, el lípido es una mezcla racémica.

60 En una realización, el lípido está enriquecido en un diastereómero, p.ej. el lípido tiene al menos 95%, al menos 90%, al menos 80% o al menos 70% de exceso diastereomérico.

En una realización, el lípido está enriquecido en un enantiómero, p.ej. el lípido tiene al menos 95%, al menos 90%, al menos 80% o al menos 70% de exceso de enantiómero.

65 En una realización, el lípido es quiralmente puro, p.ej. es un solo isómero óptico.

En una realización, el lípido está enriquecido en un isómero óptico.

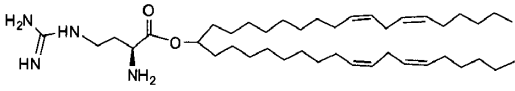
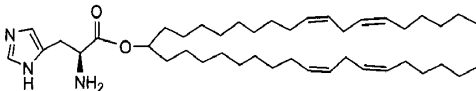
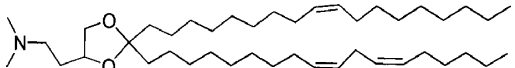
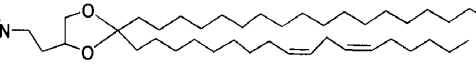
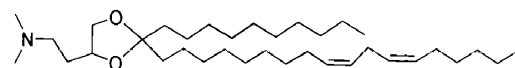
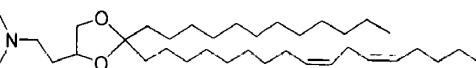
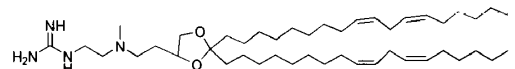
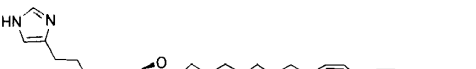
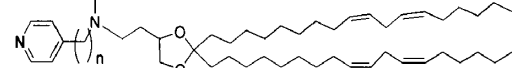
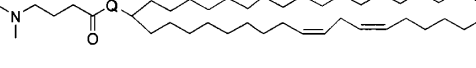
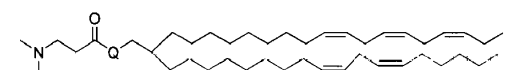
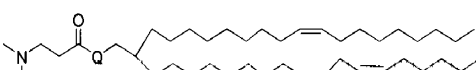
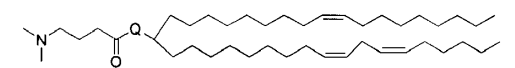
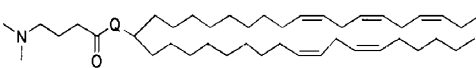
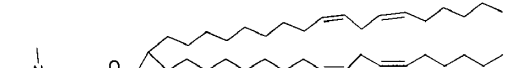
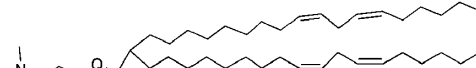
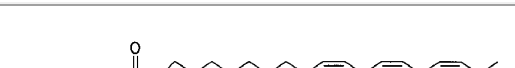
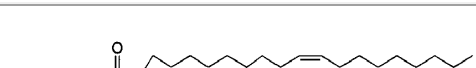

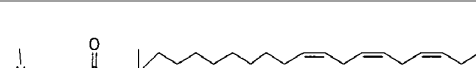
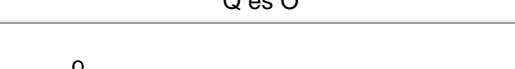
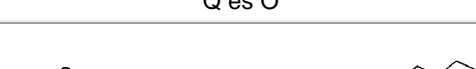
5 Cuando está presente un doble enlace (p.ej., un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno), puede haber isomería en la configuración sobre el doble enlace (es decir, isomería cis/trans o E/Z). Cuando se ilustra la configuración de un doble enlace en una estructura química, se entiende que el isómero correspondiente también puede estar presente. La cantidad de isómero presente puede variar, dependiendo de las estabildades relativas de los isómeros y de la energía requerida para la conversión entre los isómeros. De acuerdo con esto, algunos enlaces dobles están, para fines prácticos, presentes en una sola configuración, mientras que otros (p.ej., cuando las estabildades relativas son similares y la energía de conversión es baja) pueden estar presentes en forma de una mezcla de configuraciones en equilibrio inseparables.

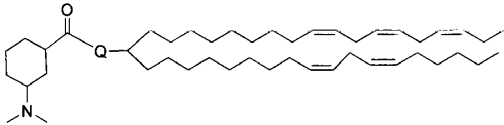
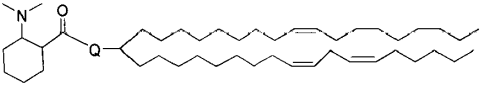
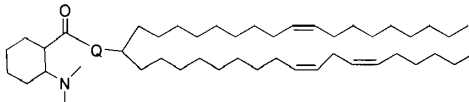
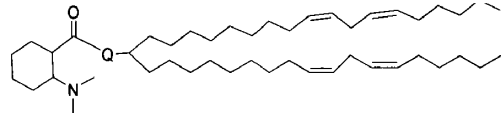
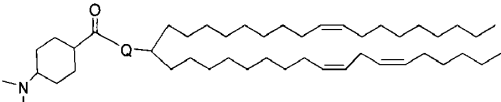
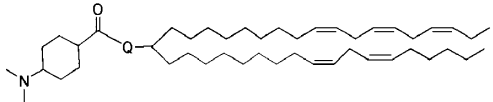
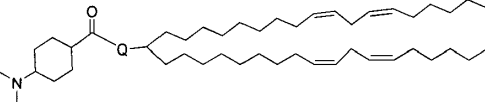
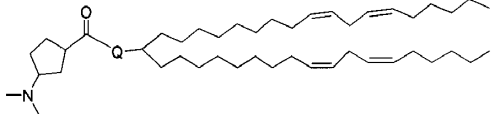
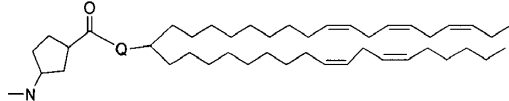
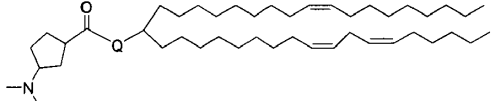
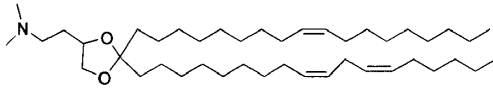
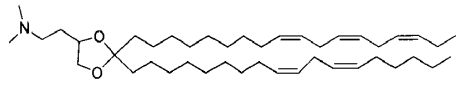
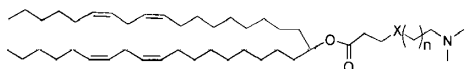
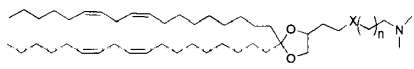
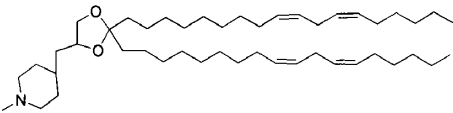
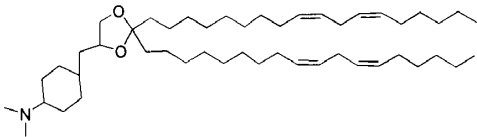
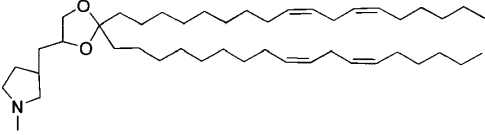
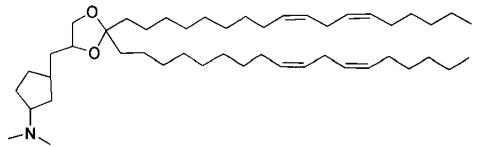
15 En la presente memoria se describe la síntesis de lípidos descrita en la presente memoria en forma racémica así como en forma ópticamente pura.

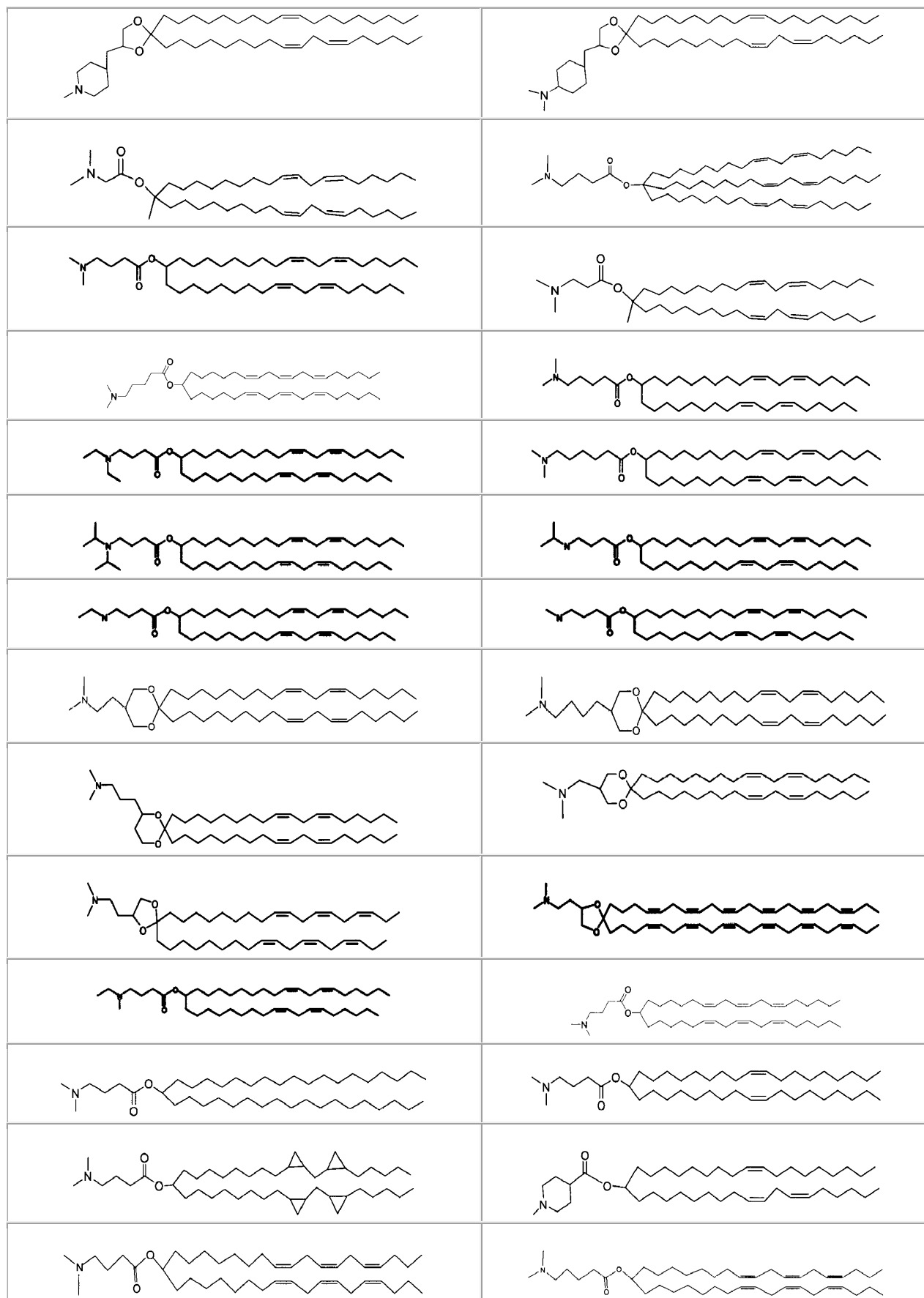
En una realización, el lípido catiónico se elige de un grupo que consiste en lípidos que se muestran en la Tabla 1 a continuación.

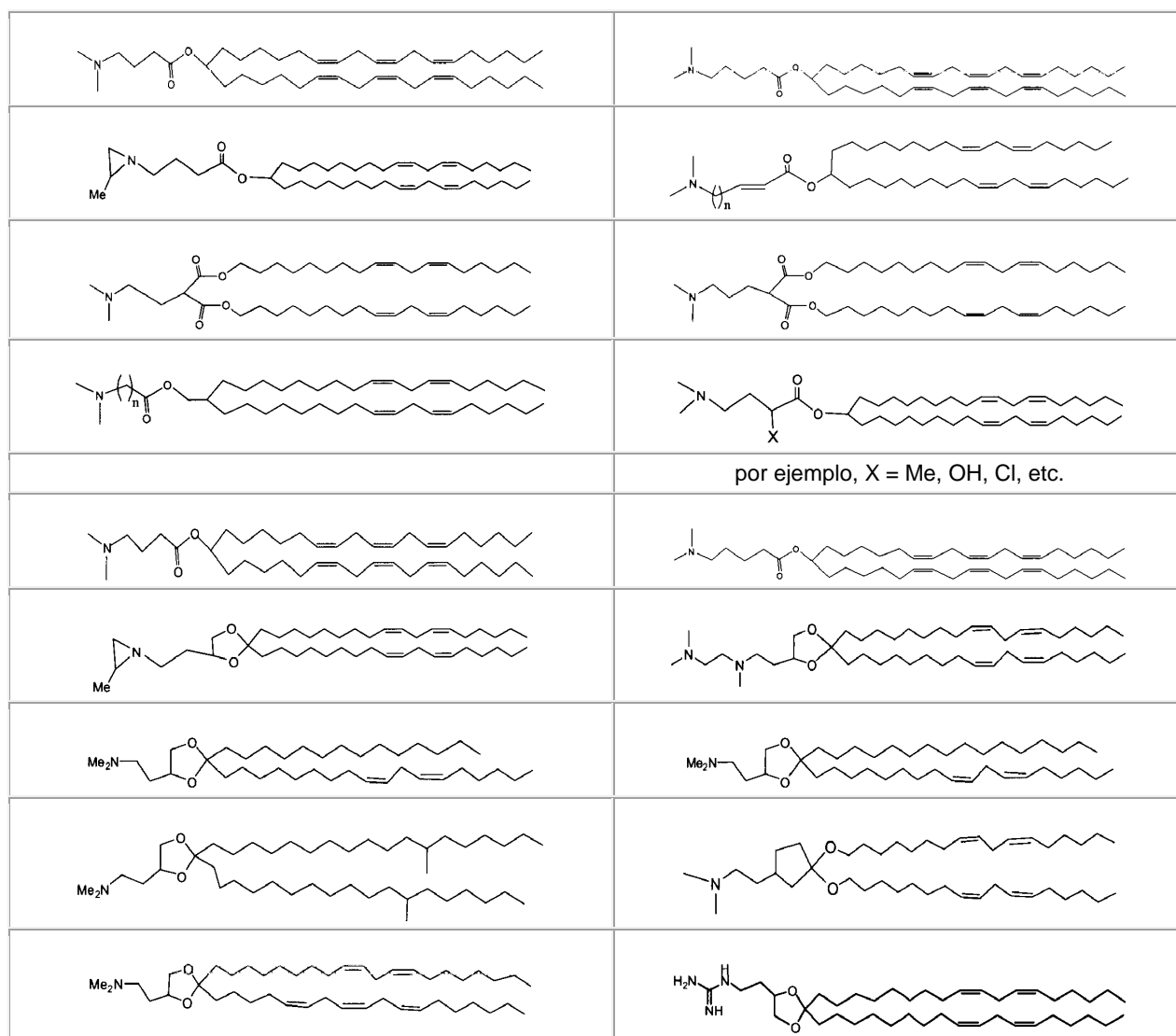
Tabla 1: Algunos lípidos catiónicos.

	n = 1-10
n = 0-6	
Racémico y ópticamente puro	Racémico y ópticamente puro

	
	
	
	
	
n = 0-6	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O

	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
Q es O	Q es O
	
	
x = O, S, NH, NMe; n = 0-6	X = O, S, NH, NMe; n = 0-6
	
	





Aunque no se muestran todos los diastereómeros para un lípido, un aspecto descrito en la presente memoria consiste en proporcionar todos los diastereómeros y, como tales, también se describen en la presente memoria los lípidos quiralmente puros y diastereoméricamente enriquecidos.

5 En una realización, R_3 es -conector-ligando.

10 En realizaciones concretas, los lípidos descritos en la presente memoria son lípidos catiónicos. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "lípido catiónico" incluya aquellos lípidos que tienen una o dos cadenas de ácido graso o alquilo graso y un grupo amino de cabeza (que incluye un grupo alquilamino o dialquilamino) que se puede protonar para formar un lípido catiónico a pH fisiológico. En algunas realizaciones, un lípido catiónico se denomina "aminolípido".

15 Otros lípidos catiónicos incluirían aquellos que tienen grupos de ácidos grasos alternativos y otros grupos dialquilamino, incluyendo aquellos en los que los sustituyentes alquilo son diferentes (p.ej., N-etil-N-metilamino-, N-propil-N-etilamino- y similares). Para aquellas realizaciones en las que R_1 y R_2 son ambos grupos alquilo o acilo de cadena larga, éstos pueden ser iguales o diferentes. En general, los lípidos (p.ej., un lípido catiónico) que tienen cadenas de acilo menos saturadas se dimensionan más fácilmente, particularmente cuando los complejos tienen un tamaño por debajo de aproximadamente 0,3 micras, con el propósito de la esterilización por filtración. Los lípidos catiónicos que contienen ácidos grasos insaturados con longitudes de la cadena carbonada en el intervalo de C_{10} a C_{20} son típicos. También se pueden utilizar otros armazones para separar el grupo amino (p.ej., el grupo amino del lípido catiónico) y la porción de ácido graso o alquilo graso del lípido catiónico. Los armazones adecuados son conocidos por los expertos en la técnica.

25 En ciertas realizaciones, los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria tienen al menos un grupo

protonable o desprotegeble, de manera que el lípido está cargado positivamente a un pH igual o inferior al pH fisiológico (p.ej., pH 7,4) y es neutro a un segundo pH, preferiblemente a pH fisiológico o un pH superior. Tales lípidos también se denominan lípidos catiónicos. Naturalmente, se entenderá que la adición o eliminación de protones en función del pH es un proceso de equilibrio, y que la referencia a un lípido cargado o neutro se refiere a la naturaleza de las especies predominantes y no requiere que todo del lípido esté presente en la forma cargada o neutral. Los lípidos que tienen más de un grupo protonable o desprotonable, o que son zwitteriónicos, también se describen en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, los lípidos protonables (es decir, lípidos catiónicos) descritos en la presente memoria tienen un pKa del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. Típicamente, los lípidos tendrán un pKa de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, p.ej., entre aproximadamente 5 y 7, tal como entre aproximadamente 5,5 y 6,8, cuando se incorporan a partículas lipídicas. Tales lípidos serán catiónicos en una etapa de formulación de pH inferior, mientras que las partículas se neutralizarán en gran parte (aunque no completamente) en superficie a un pH fisiológico de alrededor de pH 7,4. Uno de los beneficios de un pKa en el intervalo entre aproximadamente 4 y 7 es que al menos algún ácido nucleico asociado con la superficie exterior de la partícula perderá su interacción electrostática a pH fisiológico y se eliminará por simple diálisis; lo que reduce en gran medida la susceptibilidad de la partícula al aclaramiento. Las mediciones de pKa de los lípidos dentro de las partículas lipídicas se pueden realizar, por ejemplo, utilizando la sonda fluorescente ácido 2-(p-toluidino)-6-naftalenosulfónico (TNS), utilizando los métodos descritos en Cullis et al., (1986) *Chem Phys Lipids* 40, 127-144.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria están atrapadas en al menos 75%, al menos 80% o al menos 90%.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria comprenden adicionalmente una apolipoproteína. Según se utiliza en la presente memoria, el término "apolipoproteína" o "lipoproteína" se refiere a apolipoproteínas conocidas por los expertos en la técnica y variantes y fragmentos de las mismas y a agonistas, análogos o fragmentos de la apolipoproteína descritos a continuación. Las apolipoproteínas adecuadas incluyen, pero sin limitación, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V y ApoE, y formas polimorfas activas, isoformas, variantes y mutantes, así como fragmentos o formas truncadas de los mismos. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína es una apolipoproteína que contiene tiol. "Apolipoproteína que contiene tiol" se refiere a una apolipoproteína, variante, fragmento o isoforma que contiene al menos un residuo de cisteína. Las apolipoproteínas que contienen tiol más comunes son ApoA-I Milano (ApoA-I_M) y ApoA-I París (ApoA-I)_P que contienen un residuo de cisteína (Jia et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 206-13; Bielicki y Oda, 2002, *Biochemistry* 41: 2089-96). ApoA-II, ApoE2 y ApoE3 también son apolipoproteínas que contienen tiol. Las ApoE aisladas y/o fragmentos activos y sus análogos polipeptídicos, incluidas sus formas producidas recombinantemente, se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.672.685; 5.525.472; 5.473.039; 5.182.364; 5.177.189; 5.168.045; 5.116.739. ApoE3 se describe en Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms", *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 9077-9083; y Rall, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects", *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1982) 79: 4696-4700. Véase también el número de acceso GenBank K00396.

En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede estar en su forma madura, en su forma de preproapolipoproteína o en su forma de proapolipoproteína. También se pueden utilizar homo y heterodímeros (cuando sea factible) de pro- y ApoA-I maduro (Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (12): 1424-29), ApoA-I Milano (Klon et al., 2000, *Biophys. J.* 79:(3) 1679-87; Franceschini et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260:1632-35), ApoA-I París (Daum et al., 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22), ApoA-II (Shelness et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260 (14):8637-46; Shelness et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(15): 9929-35), ApoA-IV (Duverger et al., 1991, *Euro. J. Biochem.* 201(2):373-83) y ApoE (McLean et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258(14): 8993-9000).

En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser un fragmento, variante o isoforma de la apolipoproteína. El término "fragmento" se refiere a cualquier apolipoproteína que tiene una secuencia de aminoácidos más corta que la de una apolipoproteína nativa y cuyo fragmento conserva la actividad de la apolipoproteína nativa, incluyendo las propiedades de unión a lípidos. Por "variante" se quiere significar sustituciones o alteraciones en las secuencias de aminoácidos de la apolipoproteína, cuyas sustituciones o alteraciones, p.ej., adiciones y deleciones de residuos de aminoácidos, no anulan la actividad de la apolipoproteína nativa, incluyendo las propiedades de unión a lípidos. Por lo tanto, una variante puede comprender una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una apolipoproteína nativa proporcionada en la presente memoria en la que uno o más residuos de aminoácido han sido sustituidos conservativamente por aminoácidos químicamente similares. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de al menos un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro. Asimismo, la presente descripción contempla, por ejemplo, la sustitución de al menos un residuo hidrófilo tal como, por ejemplo, entre arginina y lisina, entre glutamina y asparragina, y entre glicina y serina (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166). El término "isoforma" se refiere a una proteína que tiene la misma función, mayor función o una función parcial y una secuencia similar, idéntica o parcial, y puede o no ser el producto del mismo gen y, por lo general, específico del tejido (véanse Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson y Powers 1991, *J. Lipid Res.*

- 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261 (9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz y Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sacre et al., 2003, *FEBS Lett.* 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, *Biophys. Chem.* 100(1-3): 481-92; Gong et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277(33): 29919-26; Ohta et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(23): 14888-93 y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.372.886).
- 5
- 10 En ciertas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen el uso de una construcción quimérica de una apolipoproteína. Por ejemplo, una construcción quimérica de una apolipoproteína puede estar compuesta por un dominio de apolipoproteína con una alta capacidad de unión a lípidos asociada con un dominio de apolipoproteína que contiene propiedades protectoras frente a la isquemia-reperfusion. Una construcción quimérica de una apolipoproteína puede ser una construcción que incluye regiones separadas dentro de una apolipoproteína (es decir, construcción homóloga) o una construcción quimérica puede ser una construcción que incluye regiones separadas entre diferentes apolipoproteínas (es decir, construcciones heterólogas). Las composiciones que comprenden una construcción quimérica también pueden incluir segmentos que son variantes o segmentos de apolipoproteína diseñados para que tengan un carácter específico (p.ej., propiedad de unión a lípidos, unión a receptores, enzimática, activadora de enzimas, antioxidante o de reducción-oxidación) (véase Weisgraber
- 15
- 20 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson y Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1): 468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz y Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4): 2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (2):328-38; Thurberg et al., *J. Biol. Chem.* 271(11):6062-70; Dyer 1991, *J. Biol. Chem.* 266(23):150009-15; Hill 1998, *J. Biol. Chem.* 273(47):30979-84).
- 25
- 30 Las apolipoproteínas utilizadas en la presente memoria también incluyen apolipoproteínas recombinantes, sintéticas, semisintéticas o purificadas. Los métodos para obtener apolipoproteínas o equivalentes de las mismas, utilizados en la presente memoria son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las apolipoproteínas se pueden separar del plasma o productos naturales, por ejemplo, mediante centrifugación en gradiente de densidad o cromatografía de inmunoafinidad, o se pueden producir sintéticamente, semi-sintéticamente o utilizando mecanismos de ADN recombinante conocidos por los expertos en la técnica (véase, p.ej., Mulugeta et al., 1998, *J. Chromatogr.* 798(1-2):83-90; Chung et al., 1980, *J. Lipid Res.* 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, *J. Lipid Res.* 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, *J. Chromatogr.* 711:97-109; Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.059.528, 5.834.596, 5.876.968 y 5.721.114; y Publicaciones PCT WO 86/04920 y WO 87/02062).
- 35
- 40 Las apolipoproteínas utilizadas en la presente memoria incluyen además agonistas de apolipoproteína tales como péptidos y análogos peptídicos que imitan la actividad de ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-IM), ApoA-I Paris (ApoA-Ip), ApoA-II, ApoA-IV y ApoE. Por ejemplo, la apolipoproteína puede ser cualquiera de las descritas en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.004.925, 6.037.323, 6.046.166 y 5.840.688.
- 45
- 50 Los péptidos agonistas de apolipoproteína o análogos peptídicos se pueden sintetizar o fabricar utilizando cualquier mecanismo de síntesis de péptidos conocido en la técnica, incluyendo, p.ej., los mecanismos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar utilizando el mecanismo de síntesis en fase sólida descrito inicialmente por Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154). Otros mecanismos de síntesis de péptidos se pueden encontrar en Bodanszky et al., *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2ª Ed., (1976)) y otras referencias fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Se puede encontrar un resumen de las técnicas de síntesis de polipéptidos en Stuart y Young, *Solid Phase Peptide*, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). Los péptidos también se pueden sintetizar por medio de métodos en solución como se describe en *The Proteins*, vol. II, 3d Ed., Neurath et. al., Eds., p. 105-237, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976)). Los grupos protectores apropiados para su uso en diferentes síntesis de péptidos se describen en los textos mencionados anteriormente, así como en McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1973). Los péptidos descritos en la presente memoria también se podrían preparar por escisión química o enzimática a partir de porciones mayores, por ejemplo, de apolipoproteína A-I.
- 55
- 60 En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser una mezcla de apolipoproteínas. En una realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla homogénea, es decir, un tipo único de apolipoproteína. En otra realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla heterogénea de apolipoproteínas, es decir, una mezcla de dos o más apolipoproteínas diferentes. Las realizaciones de mezclas heterogéneas de apolipoproteínas pueden comprender, por ejemplo, una mezcla de una apolipoproteína de una fuente animal y una apolipoproteína de una fuente semisintética. En ciertas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de
- 65

ApoA-I y ApoA-I Milano. En ciertas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de ApoA-I Milano y ApoA-I Paris. Las mezclas adecuadas para su uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria serán evidentes para un experto en la técnica.

5 Si la apolipoproteína se obtiene de fuentes naturales, se puede obtener de una fuente vegetal o animal. Si la apolipoproteína se obtiene de una fuente animal, la apolipoproteína puede ser de cualquier especie. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína se puede obtener de una fuente animal. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína se puede obtener de una fuente humana. En realizaciones preferidas descritas en la presente memoria, la apolipoproteína deriva de la misma especie que el individuo al que se administra la apolipoproteína.

10

PARTÍCULAS LIPÍDICAS

En la presente memoria se describen también partículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos descritos anteriormente. Las partículas lipídicas incluyen, pero no se limitan a, liposomas. Según se utiliza en la presente memoria, un liposoma es una estructura que tiene membranas que contienen lípidos que encierran un interior acuoso. Los liposomas pueden tener una o más membranas lipídicas. En la presente memoria se contemplan tanto liposomas de una sola capa, que se denominan liposomas unilamelares como de múltiples capas, que se denominan multilamelares. Cuando forman complejos con ácidos nucleicos, las partículas lipídicas también pueden ser lipoplexas, que están compuestas por bicapas de lípidos catiónicos intercaladas entre capas de ADN, como describen, p.ej., Felgner, Scientific American.

20

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria pueden comprender además uno o más lípidos adicionales y/u otros componentes tales como colesterol. Se pueden incluir otros lípidos en las composiciones de liposomas descritas en la presente memoria para una variedad de propósitos, por ejemplo para prevenir la oxidación de lípidos o para unir ligandos sobre la superficie del liposoma. Cualquiera de una serie de lípidos puede estar presente en los liposomas descritos en la presente memoria, incluyendo lípidos anfipáticos, neutros, catiónicos y aniónicos. Tales lípidos se pueden utilizar solos o combinados. Los ejemplos específicos de componentes lipídicos adicionales que pueden estar presentes se describen a continuación.

25

Los componentes adicionales que pueden estar presentes en una partícula lipídica descrita en la presente memoria incluyen componentes estabilizadores de bicapa tales como oligómeros de poliamida (véase, p.ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.320.017), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípidos, tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado a ceramidas (véase, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.885.613).

30

En realizaciones concretas, las partículas lipídicas incluyen uno o más de un segundo aminolípido o lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroil y un lípido seleccionado para reducir la agregación de partículas lipídicas durante la formación, que puede ser el resultado de la estabilización estérica de partículas que evita agregación inducida por las carga durante la formación.

35

Los ejemplos de lípidos que reducen la agregación de partículas durante la formación incluyen lípidos modificados con polietilenglicol (PEG), monosialogangliósido Gm1 y oligómeros de poliamida ("PAO") tales como (descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.320.017). Otros compuestos con radicales de barrera estérica, hidrófilos, no cargados, que evitan la agregación durante la formulación, como PEG, Gm1 o ATTA, también se pueden acoplar a lípidos para su uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Los ATTA-lípidos se describen, p.ej., en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.320.017, y los productos conjugados de PEG-lípido se describen, p.ej., en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.820.873, 5.534.499 y 5.885.613. Típicamente, la concentración del componente lipídico seleccionado para reducir la agregación es de aproximadamente 1 a 15% (en porcentaje en moles de lípidos).

40

45

Los ejemplos específicos de lípidos modificados con PEG (o productos conjugados de lípido-polioxi-etileno) que son útiles en la presente memoria pueden tener una variedad de porciones lipídicas de "anclaje" para asegurar la porción de PEG a la superficie de la vesícula lipídica. Los ejemplos de lípidos modificados con PEG adecuados incluyen fosfatidiletanolamina modificada con PEG y ácido fosfatídico, productos conjugados de PEG-ceramida (p.ej., PEG-CerC14 o PEG-CerC20) que se describen en el documento USSN pendiente de aprobación. 08/486.214, dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Son particularmente preferidos los diacilgliceroles y dialquilgliceroles modificados con PEG.

50

55

En realizaciones en las que un radical estéricamente grande tal como PEG o ATTA se conjuga con un ancla lipídica, la selección del ancla lipídica depende del tipo de asociación que el producto conjugado debe tener con la partícula lipídica. Es bien sabido que mPEG (pm2000)-diastearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) permanecerá asociado con un liposoma hasta que la partícula se aclare de la circulación, posiblemente en cuestión de días. Otros productos conjugados, tales como PEG-CerC20, tienen una capacidad de permanencia similar. PEG-CerC14, sin embargo, se intercambia rápidamente fuera de la formulación al exponerse al suero, con un $T_{1/2}$ menor de 60 minutos en algunos ensayos. Como se ilustra en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos SN 08/486,214, al menos tres características influyen en la tasa de cambio: la longitud de la cadena de acilo, la saturación de la cadena de acilo y el tamaño del grupo de cabeza con barrera estérica. Los compuestos que tienen variaciones

60

65

adecuadas de estas características pueden ser útiles en la presente memoria. Para algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser preferible que el lípido modificado con PEG se pierda rápidamente de la partícula de ácido nucleico-lípido *en vivo* y por lo tanto, el lípido modificado con PEG poseerá anclas lipídicas relativamente cortas. En otras aplicaciones terapéuticas, puede ser preferible que la partícula de ácido nucleico - lípido muestre una vida de circulación plasmática más larga y, por lo tanto, el lípido modificado con PEG poseerá anclas lipídicas relativamente más largas.

Se debe observar que los compuestos que evitan la agregación no requieren necesariamente la conjugación de lípidos para funcionar adecuadamente. El PEG libre o el ATTA libre en solución puede ser suficientes para evitar la agregación. Si las partículas son estables después de la formulación, se pueden someter a diálisis PEG o ATTA antes de la administración a un sujeto.

Los lípidos neutros, cuando están presentes en la partícula lipídica, pueden ser cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma zwitteriónica no cargada o neutra a pH fisiológico. Tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiélinea, dihidroesfingomiélinea, cefalina y cerebrósidos. La selección de lípidos neutros para su uso en las partículas descritas en la presente memoria generalmente está guiada por la consideración, por ejemplo, del tamaño del liposoma y la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Preferiblemente, el componente lipídico neutro es un lípido que tiene dos grupos acilo, (es decir, diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina). Los lípidos que tienen una variedad de grupos de cadena de acilo de longitud de cadena y grado de saturación variables están disponibles o se pueden aislar o sintetizar mediante técnicas bien conocidas. En un grupo de realizaciones, son preferidos los lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de cadena carbonada en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. En otro grupo de realizaciones, se utilizan los lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de cadena carbonada en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. Adicionalmente, se pueden utilizar lípidos que tienen mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. Preferiblemente, los lípidos neutros utilizados en la presente memoria son DOPE, DSPC, POPC, DPPC o cualquier fosfatidilcolina relacionada. Los lípidos neutros útiles en la presente invención también pueden estar compuestos por esfingomiélinea, dihidroesfingomiélinea o fosfolípidos con otros grupos de cabeza, tales como serina e inositol.

El componente de esteroles de la mezcla lipídica, cuando está presente, puede ser cualquiera de los esteroides utilizados convencionalmente en el campo de la preparación de liposomas, vesículas lipídicas o partículas lipídicas. Un esteroles preferido es el colesterol.

Otros lípidos catiónicos, que llevan una carga neta positiva a aproximadamente pH fisiológico, además de los específicamente descritos anteriormente, también se pueden incluir en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria. Tales lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); sal cloruro de 1,2-dioleiloxi-3-trimetilaminopropano ("DOTAP.Cl"); 3 β -(N,N'-dimetilaminoetano)-carbamoilcolesterol ("DC-Chol"), trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)etil-N,N-dimetilamonio ("DOSPA"), dioctadecilamidoglicil carboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleoil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina ("DODMA") y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio bromuro ("DMRIE"). Adicionalmente, se pueden usar varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, p.ej., LIPOFECTIN (incluyendo DOTMA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL), y LIPOFECTAMINE (que comprende DOSPA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL). En realizaciones concretas, un lípido catiónico es un amino lípido.

Los lípidos aniónicos adecuados para su uso en partículas lipídicas descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoil fosfatidiletanolamina, N-succinil fosfatidiletanolamina, N-glutaril fosfatidiletanolamina, lisilfosfatidilglicerol y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

En numerosas realizaciones, los lípidos anfipáticos se incluyen en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria. Los "lípidos anfipáticos" se refieren a cualquier material adecuado, en donde la porción hidrófoba del material lipídico se orienta hacia una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Los fosfolípidos representativos incluyen esfingomiélinea, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o dilinoleoilfosfatidilcolina. También se pueden utilizar otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilgliceroles y α -aciloxiacidos. Adicionalmente, tales lípidos anfipáticos se pueden mezclar fácilmente con otros lípidos, tales como triglicéridos y esteroides.

También son adecuados para su inclusión en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria los lípidos de fusión programables. Dichas partículas lipídicas tienen poca tendencia a fusionarse con las membranas celulares y suministrar su carga útil hasta que se produce un evento de señalización dado. Esto permite que la partícula lipídica

se distribuya más uniformemente después de la inyección en un organismo o sitio de enfermedad antes de que comience a fusionarse con las células. El evento de señalización puede ser, por ejemplo, un cambio en el pH, la temperatura, el entorno iónico o el tiempo. En el último caso, un componente de retardo de la fusión o "camuflaje", tal como un producto conjugado de ATTA-lípido o un producto conjugado de PEG-lípido, puede simplemente transferirse fuera de la membrana de la partícula lipídica a lo largo del tiempo. En el momento en que la partícula lipídica se distribuye adecuadamente en el organismo, ha perdido suficiente agente de camuflaje como para ser fusogénica. Con otros eventos de señalización, es deseable elegir una señal que esté asociada con el sitio de enfermedad o la célula diana, tal como el aumento de la temperatura en un sitio de inflamación.

En ciertas realizaciones, es deseable dirigir las partículas lipídicas descritas en la presente memoria utilizando radicales de direccionamiento que son específicos para un tipo de célula o tejido. El direccionamiento de partículas lipídicas utilizando una variedad de radicales de direccionamiento, tales como ligandos, receptores de superficie celular, glicoproteínas, vitaminas (p.ej., riboflavina) y anticuerpos monoclonales, se ha descrito previamente (véase, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos Núm. 4.957.773 y 4.603.044). Los radicales de direccionamiento pueden comprender la proteína completa o fragmentos de la misma. Los mecanismos de direccionamiento generalmente requieren que los agentes de direccionamiento se coloquen sobre la superficie de la partícula lipídica de tal manera que el radical diana esté disponible para la interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Se conocen y están disponibles en la técnica una variedad de diferentes agentes y métodos de direccionamiento, incluidos los descritos, p.ej., por Sapra, P. y Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); y Abra, RM et al., *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

El uso de partículas lipídicas es decir, se han propuesto liposomas, con un recubrimiento superficial de cadenas poliméricas hidrófilas, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG), para la selección (Allen, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1237:99-108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104 (1996); Blume, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1149:180-184 (1993); Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2:321-334 (1992); Patente de los Estados Unidos Núm. 5.013.556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353:71-74 (1994); Zalipsky, en *Stealth Liposomes* Capítulo 9 (Lasic y Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton FL (1995). En un enfoque, un ligando, tal como un anticuerpo, para el direccionamiento de la partícula lipídica está unido al grupo de cabeza polar de los lípidos que forman la partícula lipídica. En otro enfoque, el ligando de direccionamiento se une a los extremos distales de las cadenas de PEG que forman el recubrimiento de polímero hidrófilo (Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2:321-334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388: 115-118 (1996)).

Se pueden utilizar métodos convencionales para acoplar los agentes diana. Por ejemplo, se puede utilizar fosfatidiletanolamina, que se puede activar para la unión de agentes diana, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como bleomicina derivatizada con lípidos. Los liposomas dirigidos a anticuerpos se pueden construir utilizando, por ejemplo, liposomas que incorporan proteína A (véase, Renneisen, et al., *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) y Leonetti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87: 2448-2451 (1990). Otros ejemplos de conjugación de anticuerpos se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.027.726. Los ejemplos de radicales de direccionamiento también pueden incluir otras proteínas, específicas para componentes celulares, que incluyen antígenos asociados con neoplasmas o tumores. Las proteínas utilizadas como radicales de direccionamiento se pueden anclar a los liposomas a través de enlaces covalentes (Véanse, Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros métodos de direccionamiento incluyen el sistema de biotina-avidina.

En una realización ilustrativa, la partícula lipídica comprende una mezcla de un lípido catiónico descrito en la presente memoria, lípidos neutros (distintos de un lípido catiónico), un esteroide (p.ej., colesterol) y un lípido modificado con PEG (p.ej., un PEG-DMG o PEG-DMA). En ciertas realizaciones, la mezcla de lípidos consiste en o consiste esencialmente en un lípido catiónico descrito en la presente memoria, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG. En realizaciones preferidas adicionales, la partícula lipídica consiste en o consiste esencialmente en la mezcla de lípidos anterior en razones molares de amino lípido a aproximadamente 20-70%:lípido neutro al 5-45%:colesterol al 20-55%:lípido modificado con PEG al 0,5-15%.

En una realización, la partícula lipídica comprende al menos dos lípidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede utilizar una mezcla de lípidos catiónicos en una partícula lipídica, de modo que la mezcla comprende 20-60% del contenido total de lípidos en una base molar.

En realizaciones concretas, la partícula lipídica consiste en o consiste esencialmente en un lípido catiónico seleccionado de la Tabla 1, DSPC, Chol, y PEG-DMG o PEG-DMA, p.ej., a una razón molar de lípido catiónico a aproximadamente 20-60%:DSPC al 5-25%: Chol al 25-55%: PEG-DMG o PEG-DMA al 0,5-15%. En realizaciones concretas, la razón de lípidos molares es aproximadamente 40/10/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro, DSPC, en estas composiciones se reemplaza por POPC, DPPC, DOPE o SM.

Composiciones y formulaciones de partículas de agentes terapéuticos-lípidos

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden una partícula lipídica descrita en la presente memoria y un agente activo, en donde el agente activo está asociado con la partícula lipídica. En realizaciones concretas, el agente activo es un agente terapéutico. En realizaciones concretas, el agente activo está encapsulado dentro de un interior acuoso de la partícula lipídica. En otras realizaciones, el agente activo está presente dentro de una o más capas de lípidos de la partícula lipídica. En otras realizaciones, el agente activo está unido a la superficie lipídica exterior o interior de una partícula lipídica.

"Completamente encapsulado" según se utiliza en la presente memoria indica que el ácido nucleico en las partículas no se degrada significativamente después de la exposición al suero o un ensayo de nucleasa que degradaría significativamente los ácidos nucleicos libres. En un sistema totalmente encapsulado, preferiblemente menos de 25% de ácido nucleico de la partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría 100% de ácido nucleico libre, más preferiblemente menos de 10% y lo más preferiblemente menos de 5% del ácido nucleico de la partícula es degradado. Alternativamente, la encapsulación completa se puede determinar mediante un ensayo Oligreen®. Oligreen® es una tinción de ácido nucleico fluorescente ultrasensible para cuantificar oligonucleótidos y ADN de hebra sencilla en solución (disponible en Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Completamente encapsulado también sugiere que las partículas son estables en suero, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus partes componentes tras la administración *in vivo*.

Los agentes activos, según se utilizan en la presente memoria, incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado sobre una célula, tejido, órgano o sujeto. Tales efectos pueden ser biológicos, fisiológicos o cosméticos, por ejemplo. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto, incluyendo p.ej., ácidos nucleicos, péptidos y polipéptidos, incluyendo, p.ej., anticuerpos, tales como, p.ej., anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos; anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes y anticuerpos Primatized™, citoquinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores inductores de diferenciación, receptores de superficie celular y sus ligandos; hormonas; y moléculas pequeñas, incluyendo pequeñas moléculas o compuestos orgánicos.

En una realización, el agente activo es un agente terapéutico, o una sal o derivado del mismo. Los derivados de agentes terapéuticos pueden ser terapéuticamente activos por sí mismos o pueden ser profármacos, que se vuelven activos tras nuevas modificaciones. Por lo tanto, en una realización, un derivado de agente terapéutico retiene parte o la totalidad de la actividad terapéutica en comparación con el agente no modificado, mientras que en otra realización, un derivado de agente terapéutico carece de actividad terapéutica.

En diversas realizaciones, los agentes terapéuticos incluyen cualquier agente o fármaco terapéuticamente eficaz, tales como compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicación anticonceptiva, antipiréticos, vasodilatadores, antiangiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de la señal de transducción, medicamentos cardiovasculares, p.ej., agentes antiarrítmicos, vasoconstrictores, hormonas y esteroides.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un fármaco oncológico, que también puede denominarse fármaco antitumoral, fármaco anticancerígeno, fármaco tumoral, agente antineoplásico o similar. Los ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden utilizar de acuerdo con la descripción incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, alquerano, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, azatioprina, bexaroteno, biCNU, bleomicina, busulfán intravenoso, busulfán oral, capecitabina (Xeloda), carboplatino, carmustina, CCNU, celecoxib, clorambucilo, cisplatino, cladribina, ciclosporina A, citarabina, citosin-arabinósido, daunorrubicina, citoxan, daunorrubicina, dexametasona, dexrazoxano, dodecetaxel, doxorubicina, doxorubicina, DTIC, epirubicina, estramustina, etopósido fosfato, etopósido y VP-16, exemestano, FK506, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, gemcitabina (Gemzar), gemtuzumab-ozogamicina, acetato de goserelina, hidrea, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón, irinotecán (Camptostar, CPT-111), letrozol, leucovorina, leustatina, leuprolida, levamisol, litretinoína, megastrol, melfalán, L-PAM, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza nitrogenada, paclitaxel, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfímero sódico, prednisona, rituxan, estreptozocina, STI-571, tamoxifeno, taxótero, temozolamida, tenipósido, VM-26, topotecán (Hycamtin), toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, velban, vinblastina, vincristina, VP 16 y vinorelbina. Otros ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden utilizar de acuerdo con la descripción son elipticina y los análogos o derivados de elipticina, eptilonas, inhibidores de quinasas intracelulares y camptotecinas.

Partículas de ácido nucleicos-lípidos

En ciertas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria están asociadas con un ácido nucleico, dando como resultado una partícula de ácido nucleico-lípido. En realizaciones concretas, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula lipídica. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "ácido nucleico" incluya cualquier oligonucleótido o polinucleótido. Los fragmentos que contienen hasta 50

nucleótidos generalmente se denominan oligonucleótidos, y los fragmentos más largos se denominan polinucleótidos. En realizaciones concretas, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria tienen una longitud de 15-50 nucleótidos.

5 En el contexto de esta descripción, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consiste en bases naturales, azúcares y enlaces interazúcar (cadena principal). Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros no naturales, o porciones de los mismos, que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, la mejor absorción celular y la mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

10 El ácido nucleico que está presente en una partícula de lípido-ácido nucleico descrita en la presente memoria incluye cualquier forma de ácido nucleico que sea conocida. Los ácidos nucleicos utilizados en la presente memoria pueden ser ADN o ARN de hebra sencilla, o ADN o ARN de doble hebra, o híbridos ADN-ARN. Los ejemplos de ADN de doble hebra incluyen genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y terminación, y sistemas autorreplicantes tales como ADN vírico o plásmido. Los ejemplos de ARN de doble hebra incluyen ARNip y otros reactivos de interferencia de ARN. Los ácidos nucleicos de hebra sencilla incluyen, p.ej., oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN y oligonucleótidos formadores de triplex. El ácido nucleico que está presente en una partícula de lípido-ácido nucleico descrita en la presente memoria puede incluir una o más de las modificaciones de oligonucleótidos descritas a continuación.

15 Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden tener diversas longitudes, generalmente dependientes de la forma particular de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes pueden tener de aproximadamente 1.000 a 100.000 residuos de nucleótidos de longitud. En realizaciones concretas, los oligonucleótidos pueden variar de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud. En diversas realizaciones relacionadas, la longitud de los oligonucleótidos, de hebra sencilla, de doble hebra y de triple hebra, pueden variar de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

20 En realizaciones concretas, el oligonucleótido (o una hebra del mismo) descrito en la presente memoria hibrida específicamente o es complementario a un polinucleótido diana. "Hibridable específicamente" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad de modo que se produce una unión estable y específica entre la diana de ADN o ARN y el oligonucleótido. Se entiende que no es necesario que un oligonucleótido sea 100% complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere en la función normal de la molécula diana para causar una pérdida de utilidad o expresión del mismo, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o, en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en que se realizan los ensayos. Por lo tanto, en otras realizaciones, este oligonucleótido incluye 1, 2 o 3 sustituciones de bases, p.ej. emparejamientos erróneos, en comparación con la región de una secuencia de gen o ARNm a la que se dirige o a la que hibrida específicamente.

25 **Ácidos nucleicos de interferencia de ARN**

30 En realizaciones concretas, las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria están asociadas con moléculas de interferencia de ARN (ARNi). Se pueden utilizar métodos de interferencia de ARN utilizando moléculas de ARNi para interrumpir la expresión de un gen o polinucleótido de interés. El ARN de interferencia pequeño (ARNip) ha reemplazado esencialmente los ODN antisentido y ribozimas como la próxima generación de fármacos oligonucleotídicos de direccionamiento en desarrollo.

35 Los ARNip son dúplex de ARN normalmente de 16-30 nucleótidos de longitud que pueden asociarse con un complejo citoplasmático de múltiples proteínas conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARNi (RISC). El RISC cargado con ARNip media la degradación de transcritos de ARNm homólogos, por lo tanto, el ARNip puede diseñarse para inactivar la expresión de proteínas con alta especificidad. A diferencia de otras tecnologías antisentido, la función del ARNip a través de un mecanismo natural evolucionó para controlar la expresión génica a través del ARN no codificante. Esto generalmente se considera la razón por la cual su actividad es más potente *in vitro* e *in vivo* que cualquier ODN antisentido o ribozima. Una variedad de reactivos de ARNi, incluidos los ARNip que se dirigen a dianas clínicamente relevantes, se encuentra actualmente en fase de desarrollo farmacéutico, tal como describen. p.ej., de Fougerolles, A. et al., Nature Reviews 6: 443-453 (2007).

40 Mientras que las primeras moléculas de ARNi descritas fueron híbridos de ARN:ARN que comprendían tanto ARN efector como una hebra de ARN antisentido, ahora se ha demostrado que los híbridos de ADN efector:ARN antisentido, los híbridos de ARN efector:ADN antisentido y los híbridos de ADN:ADN son capaces de mediar la ARNi

(Lamberton, J.S. y Christian, A.T., (2003) *Molecular Biotechnology* 24: 111-119). Por lo tanto, la descripción incluye el uso de moléculas de ARNi que comprenden cualquiera de estos diferentes tipos de moléculas de doble hebra. Además, se entiende que las moléculas de ARNi se pueden utilizar e introducir en células en una variedad de formas. Por consiguiente, según se utiliza en la presente memoria, las moléculas de ARNi abarcan todas y cada una de las moléculas capaces de inducir una respuesta de ARNi en las células, que incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos de doble hebra que comprenden dos hebras separadas, es decir una hebra efectora y una hebra antisentido, p.ej., ARN de interferencia pequeño (ARNip); oligonucleótidos de doble hebra que comprende dos hebras separadas que están unidas entre sí mediante un conector no nucleotídico; oligonucleótidos que comprenden un bucle en horquilla de secuencias complementarias, que forma una región de doble hebra, p.ej., moléculas de ARNhc y vectores de expresión que expresan uno o más polinucleótidos capaces de formar un polinucleótido de doble hebra solo o combinado con otro polinucleótido.

Un "compuesto de ARNip de hebra sencilla" según se utiliza en la presente memoria, es un compuesto ARNip que está formado por una sola molécula. Puede incluir una región dúplex, formada por el emparejamiento entre hebras, p.ej., puede ser, o incluir, una estructura en forma de horquilla o asa. Los compuestos de ARNip de hebra sencilla pueden ser antisentido con respecto a la molécula diana.

Un compuesto de ARNip de hebra sencilla puede ser lo suficientemente largo como para que pueda entrar en el RISC y participar en la escisión mediada por RISC de un ARNm diana. Un compuesto de ARNip de hebra sencilla tiene al menos 14, y en otras realizaciones al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40 o 50 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, tiene menos de 200, 100 o 60 nucleótidos de longitud.

Los compuestos de ARNip en horquilla tendrán una región dúplex igual o superior a 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos. La región dúplex puede tener una longitud igual o inferior a 200, 100 o 50. En ciertas realizaciones, los intervalos para la región dúplex son 15-30, 17 a 23, 19 a 23 y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud. La horquilla puede tener un saliente de una sola hebra o una región desemparejada terminal. En ciertas realizaciones, los salientes tienen una longitud de 2-3 nucleótidos. En algunas realizaciones, el saliente se encuentra en el lado efector de la horquilla y, en algunas realizaciones, en el lado antisentido de la horquilla.

Un "compuesto de ARNip de doble hebra" según se utiliza en la presente memoria, es un compuesto ARNip que incluye más de una, y en algunos casos dos, hebras en las que la hibridación intercatenaria puede formar una región de estructura dúplex.

La hebra antisentido de un compuesto de ARNip de doble hebra puede tener una longitud igual o superior a 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40 o 60 nucleótidos. Puede ser igual o inferior a 200, 100 o 50 nucleótidos de longitud. Los intervalos pueden ser de 17 a 25, de 19 a 23 y de 19 a 21 nucleótidos de longitud. Según se utiliza en la presente memoria, el término "hebra antisentido" significa la hebra de un compuesto de ARNip que es suficientemente complementaria a una molécula diana, p.ej. un ARN diana.

La hebra efectora de un compuesto de ARNip de doble hebra puede tener una longitud igual o superior a 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40 o 60 nucleótidos. Puede tener una longitud igual o inferior a 200, 100 o 50 nucleótidos. Los intervalos pueden ser de 17 a 25, de 19 a 23 y de 19 a 21 nucleótidos de longitud.

La porción de doble hebra de un compuesto de ARNip de doble hebra puede tener una longitud igual o superior a 14, 15, 16 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 o 60 pares de nucleótidos. Puede tener una longitud igual o inferior a 200, 100 o 50, pares de nucleótidos. Los intervalos pueden tener una longitud de 15-30, 17 a 23, 19 a 23 y 19 a 21 nucleótidos.

En muchas realizaciones, el compuesto de ARNip es suficientemente grande para que pueda ser escindido por una molécula endógena, p.ej., por Dicer, para producir compuestos de ARNip más pequeños, p.ej., agentes ARNip.

Las hebras efectora y antisentido se pueden elegir de manera que el compuesto de ARNip de doble hebra incluya una sola hebra o región no emparejada en uno o ambos extremos de la molécula. Por lo tanto, un compuesto de ARNip de doble hebra puede contener cadenas efectoras y antisentido, emparejadas para que contengan un saliente, p.ej., uno o dos salientes 5' o 3', o un saliente 3' de 1 - 3 nucleótidos. Los salientes pueden ser el resultado de una hebra que es más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud que se escalonan. Algunas realizaciones tendrán al menos un saliente 3'. En una realización, ambos extremos de una molécula de ARNip tendrán un saliente 3'. En algunas realizaciones, el saliente es de 2 nucleótidos.

En ciertas realizaciones, la longitud para la región dúplex es de entre 15 y 30, o de 18, 19, 20, 21, 22 y 23 nucleótidos de longitud, p.ej., en el intervalo del compuesto ARNihs comentado anteriormente. Los compuestos de ARNihs se pueden asemejar en longitud y estructura a los productos procesados con Dicer naturales a partir de ARNihs largos. También se incluyen las realizaciones en las que las dos hebras del compuesto de ARNihs están unidas, p.ej., unidas covalentemente. También se describen en la presente memoria horquillas, u otras estructuras de hebra sencilla que proporcionan la región de doble hebra requerida, y un saliente 3'.

Los compuestos de ARNip descritos en la presente memoria, que incluyen compuestos de ARNip de doble hebra y los compuestos de ARNip de hebra sencilla, pueden mediar en el silenciamiento de un ARN diana, p.ej., ARNm, p.ej., un transcrito de un gen que codifica una proteína. Por conveniencia, dicho ARNm también se denomina en la presente memoria ARNm que va a ser silenciado. Tal gen también se denomina gen diana. En general, el ARN que va a ser silenciado es un gen endógeno o un gen patógeno. Además, también se pueden elegir como diana ARN distintos del ARNm, p.ej., ARNt, y ARN virales.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "media la ARNi" se refiere a la capacidad de silenciar, de una manera específica de la secuencia, un ARN diana. Si bien no desea estar limitado por la teoría, se cree que el silenciamiento utiliza la maquinaria o el proceso de ARNi y un ARN guía, p.ej., un compuesto de ARNihs de 21 a 23 nucleótidos.

En una realización, un compuesto de ARNip es "suficientemente complementario" a un ARN diana, p.ej., un ARNm diana, de modo que el compuesto de ARNip silencia la producción de proteína codificada por el ARNm diana. En otra realización, el compuesto de ARNip es "exactamente complementario" a un ARN diana, p.ej., el ARN diana y el compuesto de ARNip se reasocian, por ejemplo para formar un híbrido hecho exclusivamente de pares de bases de Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un ARN diana "suficientemente complementario" puede incluir una región interna (p.ej., de al menos 10 nucleótidos) que es exactamente complementaria a un ARN diana. Además, en ciertas realizaciones, el compuesto de ARNip discrimina específicamente una diferencia de un solo nucleótido. En este caso, el compuesto de ARNip solo media la ARNi si encuentra una complementariedad exacta en la región (p.ej., a 7 nucleótidos de) de la diferencia de un solo nucleótido.

MicroARN

Los microARN (miARN) son una clase muy conservada de pequeñas moléculas de ARN que se transcriben a partir del ADN en los genomas de plantas y animales, pero no se traducen a proteínas. Los miARN procesados son moléculas de RNA de hebra sencilla de ~17-25 nucleótidos (nt) que se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y se han identificado como reguladores clave del desarrollo, la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación. Se cree que juegan un papel en la regulación de la expresión génica uniéndose a la región 3' no traducida de ARNm específicos. RISC media la regulación a la baja de la expresión génica a través de la inhibición de la traducción, la escisión del transcrito, o ambos. RISC también está implicado en el silenciamiento transcripcional en el núcleo de una amplia gama de eucariotas.

El número de secuencias de miARN identificadas hasta la fecha es grande y está creciendo, ejemplos ilustrativos de los cuales se pueden encontrar, por ejemplo, en: "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature" Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Apartado de la base de datos, D140-D144; "The microRNA Registry" Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, Apartado de Datos, D109-D111; y también en <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.

Oligonucleótidos antisentido

En una realización, un ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido dirigido a un polinucleótido diana. Se pretende que el término "oligonucleótido antisentido" o simplemente "antisentido" incluya oligonucleótidos que son complementarios de una secuencia de polinucleótidos diana. Los oligonucleótidos antisentido son hebras sencillas de ADN o ARN que son complementarias a una secuencia elegida, p.ej. un ARNm de un gen diana. Se piensa que los oligonucleótidos antisentido inhiben la expresión del gen uniéndose a un ARNm complementario. La unión al ARNm diana puede conducir a la inhibición de la expresión génica evitando la traducción de hebras de ARNm complementarias uniéndose a ella o conduciendo a la degradación del ARNm diana. El ADN antisentido se puede utilizar para dirigirlo a un ARN específico complementario (codificante o no codificante). Si la unión tiene lugar, este híbrido de ADN/ARN se puede degradar mediante la enzima ARNasa H. En una realización concreta, los oligonucleótidos antisentido contienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. El término también abarca oligonucleótidos antisentido que pueden no ser exactamente complementarios al gen diana deseado. Por lo tanto, la descripción puede utilizarse en casos en los que se encuentran actividades no específicas de la diana con molécula antisentido, o cuando una secuencia antisentido que contiene uno o más emparejamientos erróneos con la secuencia diana es la más preferida para un uso particular.

Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido son inhibidores eficaces y específicos de la síntesis de proteínas, y, en consecuencia, se pueden utilizar para inhibir específicamente la síntesis de proteínas mediante un gen dirigido. La eficacia de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la síntesis de proteínas está bien establecida. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y el receptor de acetilcolina de tipo 2 de la muscarina se inhiben por medio de oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus respectivas secuencias de ARNm (Patente de los Estados Unidos 5.739.119 y Patente de los Estados Unidos 5.759.829). Adicionalmente, se han demostrado ejemplos de inhibición antisentido con la proteína nuclear ciclina, el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor GABA estriatal_A y EGF humano (Jaskulski et al., Science. 10 de junio de 1988; 240

(4858):1544-6; Vasanthakumar y Ahmed, Cancer Commun. 1989; 1(4):225-32; Peris et al., Brain Res Mol Brain Res. 15 de junio de 1998; 57(2):310-20; Patente de los Estados Unidos 5.801.154; Patente de los Estados Unidos 5.789.573; Patente de los Estados Unidos 5.718.709 y Patente de los Estados Unidos 5.610.288). Además, también se han descrito construcciones antisentido que inhiben y pueden ser utilizadas para tratar una variedad de proliferaciones celulares anormales, p.ej. el cáncer (Patente de los Estados Unidos 5.747.470; Patente de los Estados Unidos 5.591.317 y Patente de los Estados Unidos 5.783.683).

Los métodos para producir oligonucleótidos antisentido son conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para producir un oligonucleótido antisentido que se dirige a cualquier secuencia de polinucleótidos. La selección de secuencias de oligonucleótidos antisentido específicas para una secuencia diana dada se basa en el análisis de la secuencia diana elegida y la determinación de la estructura secundaria, la T_m , la energía de enlace y la estabilidad relativa. Los oligonucleótidos antisentido se pueden seleccionar basándose en su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm diana en una célula anfitriona. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' del ARNm. Estos análisis de estructura secundaria y las consideraciones de selección del sitio objetivo se pueden realizar, por ejemplo, utilizando v.4 del soporte lógico de análisis de cebadores OLIGO (Molecular Biology Insights) y/o el soporte lógico del algoritmo BLASTN 2,0,5 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402).

Antagomir

Los antagomir son oligonucleótidos de tipo ARN que albergan diversas modificaciones para la protección frente a la ARNasa y propiedades farmacológicas, tales como la absorción mejorada de tejidos y células. Se diferencian del ARN normal, por ejemplo, por una 2'-O-metilación completa de azúcares, cadenas principales de fosforotioato y, por ejemplo, un radical de colesterol en el extremo 3'. Los antagomir se pueden utilizar para silenciar eficazmente miARN endógenos formando dúplex que comprenden el antagomir y miARN endógeno, evitando de ese modo el silenciamiento génico inducido por miARN. Un ejemplo de silenciamiento de miARN mediado por antagomir es el silenciamiento de miR-122, descrito en Krutzfeldt et al., Nature, 2005, 438:685-689. Los ARN de antagomir se pueden sintetizar utilizando protocolos convencionales de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Véanse las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núm. 11/502.158 y 11/657.341.

Un antagomir puede incluir subunidades monoméricas conjugadas con ligando y monómeros para la síntesis de oligonucleótidos. Los monómeros ilustrativos se describen en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. 10/916.185, presentada el 10 de Agosto de 2004. Un antagomir puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en la Solicitud PCT Núm. PCT/US2004/07070 presentada el 8 de Marzo de 2004. Un antagomir puede formar complejo con un radical anfipático. Los radicales anfipáticos ilustrativos para su uso con agentes oligonucleotídicos se describen en la Solicitud PCT Núm. PCT/US2004/07070, presentada el 8 de Marzo de 2004.

Aptámeros

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico o péptido que se unen a una molécula particular de interés con alta afinidad y especificidad (Tuerk y Gold, Science 249:505 (1990); Ellington y Szostak, Nature 346:818 (1990)). Se han producido satisfactoriamente aptámeros de ADN o ARN que se unen a muchas entidades diferentes, desde proteínas grandes hasta moléculas orgánicas pequeñas. Véanse Eaton, Curr. Opin. Chem. Biol. 1:10-16 (1997), Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9:324-9 (1999), y Hermann y Patel, Science 287:820-5 (2000). Los aptámeros pueden estar basados en ARN o ADN, y pueden incluir un riboswitch. Un riboswitch es una parte de una molécula de ARNm que puede unirse directamente a una pequeña molécula diana, y cuya unión de la diana afecta a la actividad del gen. Por lo tanto, un ARNm que contiene un riboswitch está directamente involucrado en la regulación de su propia actividad, dependiendo de la presencia o ausencia de su molécula diana. En general, los aptámeros se modifican a través de rondas repetidas de selección *in vitro* o análogamente, SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para unirse a varias dianas moleculares tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. El aptámero se puede preparar por cualquier método conocido, incluyendo métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y se puede utilizar solo o combinado con otros aptámeros específicos para la misma diana. Adicionalmente, como se describe más completamente en la presente memoria, el término "aptámero" incluye específicamente "aptámeros secundarios" que contienen una secuencia consenso derivada de la comparación de dos o más aptámeros conocidos para una diana dada.

Ribozimas

De acuerdo con otra realización descrita en la presente memoria, las partículas de ácido nucleico - lípido están asociadas con ribozimas. Las ribozimas son complejos de moléculas de ARN que tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad de endonucleasa (Kim y Cech, Proc Natl Acad Sci U S A. Dic 1987;84(24):8788-92; Forster y Symons, Cell. 24 de Abril de 1987;49(2):211-20). Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran

las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, a menudo escindiendo solo uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótido (Cech et al., Cell. Dic 1981; 27(3 Pt 2):487-96; Michel y Westhof, J Mol Biol. 5 de Dic de 1990; 216(3):585-610; Reinhold-Hurek y Shub, Nature. 14 de Mayo de 1992;357 (6374):173-6). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una a través de interacciones de emparejamiento de bases específicas a la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

Actualmente se conocen al menos seis variedades básicas de ARN enzimáticos de origen natural. Cada uno puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN *en trans* (y por lo tanto puede escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la porción de unión a la diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene cerca de una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático primero reconoce y después se une a un ARN diana a través del emparejamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido y haya escindido su diana de ARN, se libera de ese ARN para buscar otra diana y se puede unir y escindir repetidamente nuevas dianas.

La molécula de ácido nucleico enzimática puede formar una cabeza de martillo, una horquilla, un virus de hepatitis δ , un intrón del grupo I o un ARN de ARNasaP (asociado con una secuencia de guía de ARN) o un motivo de ARN de Neurospora VS, por ejemplo. Los ejemplos específicos de motivos cabeza de martillo son descritos por Rossi et al. Nucleic Acids Res. 11 de Sep de 1992;20(17): 4559-65. Hampel et al., describen ejemplos de motivos en horquilla (Publicación de la Solicitud de Patente Europea Núm. EP 0360257), Hampel y Tritz, Biochemistry 13 de Junio de 1989;28(12):4929-33; Hampel et al., Nucleic Acids Res. 25 de Enero de 1990; 18(2): 299-304 y Patente de los Estados Unidos 5.631.359. Un ejemplo del motivo del virus de la hepatitis δ es descrito por Perrotta y Been, Biochemistry. 1 de Dic de 1992; 31(47):11843-52; un ejemplo del motivo de ARNasaP es descrito por Guerrier-Takada et al., Cell. Dic 1983; 35(3 Pt 2):849-57; El motivo de ribozima de ARN de Neurospora VS es descrito por Collins (Saville y Collins, Cell. 18 de Mayo de 1990; 61(4):685-96; Saville y Collins, Proc Natl Acad Sci USA. 1 de Octubre de 1991; 88(19):8826-30; Collins y Olive, Biochemistry. 23 de Marzo de 1993; 32(11): 2795-9); y un ejemplo del intrón del Grupo I se describe en la Patente de los Estados Unidos 4.987.071. Las características importantes de las moléculas de ácido nucleico enzimático utilizadas de acuerdo con la descripción son que tienen un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones de ADN o ARN del gen diana, y que tienen secuencias de nucleótidos dentro o alrededor de ese sitio de unión al sustrato que confieren una actividad de escisión de ARN a la molécula. Por lo tanto, no es necesario que las construcciones de ribozima se limiten a los motivos específicos mencionados en la presente memoria.

Los métodos para producir una ribozima dirigida a cualquier secuencia de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Las ribozimas se pueden modificar como se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 93/23569 y Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 94/02595 y se pueden sintetizar para someterlas a prueba *in vitro* e *in vivo*, como se describe allí.

La actividad de la ribozima se puede optimizar alterando la longitud de los brazos de unión de la ribozima o sintetizando químicamente ribozimas con modificaciones que eviten su degradación por las ribonucleasas séricas (véanse p.ej., Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 92/07065; Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 93/15187; Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 91/03162; Publicación de la Solicitud de Patente Europea Núm. 92110298,4; Patente de los Estados Unidos 5.334.711; e Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 94/13688, que describen diversas modificaciones químicas que se pueden realizar en los radicales de azúcar de las moléculas de ARN enzimático), modificaciones que mejoran su eficacia en las células, y eliminación de las bases del tallo II para acortar los tiempos de síntesis del ARN y reducir los requisitos químicos.

Oligonucleótidos inmunoestimuladores

Los ácidos nucleicos asociados con las partículas lipídicas descritas en la presente memoria pueden ser inmunoestimuladores, incluyendo los oligonucleótidos inmunoestimuladores (ISS, de hebra sencilla o doble) capaces de inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a un sujeto, que puede ser un mamífero u otro paciente. ISS incluye, p.ej., ciertos palíndromos que conducen a estructuras secundarias en horquilla (véase Yamamoto S., et al. (1992) J. Immunol. 148: 4072-4076), o motivos CpG, así como otras características ISS conocidas (como dominios multi-G, véase el documento WO 96/11266).

La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria innata o adaptativa. El sistema inmunitario se divide en un sistema inmunitario más innato y un sistema inmunitario adaptativo adquirido de vertebrados, el último de los cuales se divide en componentes celulares humorales. En realizaciones concretas, la respuesta inmunitaria puede ser de las mucosas.

En realizaciones concretas, un ácido nucleico inmunoestimulador es solo inmunoestimulador cuando se administra combinado con una partícula lipídica, y no es inmunoestimulador cuando se administra en su "forma libre". De acuerdo con la presente descripción, dicho oligonucleótido se considera inmunoestimulador.

5 Los ácidos nucleicos inmunoestimuladores se consideran no específicos de la secuencia cuando no se requiere que se unan específicamente y reduzcan la expresión de un polinucleótido diana con el fin de provocar una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, ciertos ácidos nucleicos inmunoestimuladores pueden comprender una secuencia correspondiente a una región de un gen o ARNm de origen natural, pero aún pueden considerarse ácidos nucleicos inmunoestimuladores no específicos de la secuencia.

10 En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido inmunoestimuladores comprenden al menos un dinucleótido CpG. El oligonucleótido o dinucleótido CpG pueden estar sin metilar o metilados. En otra realización, el ácido nucleico inmunoestimulador comprende al menos un dinucleótido CpG que tiene una citosina metilada. En una realización, el ácido nucleico comprende un único dinucleótido CpG, en donde la citosina en dicho dinucleótido CpG está metilada. En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5 'TAACGTTGAGGGGCAT 3'. En una realización alternativa, el ácido nucleico comprende al menos dos dinucleótidos CpG, en donde al menos una citosina en los dinucleótidos CpG está metilada. En una realización adicional, cada citosina en los dinucleótidos CpG presentes en la secuencia está metilada. En otra realización, el ácido nucleico comprende una pluralidad de dinucleótidos CpG, en donde al menos uno de dichos dinucleótidos CpG comprende una citosina metilada.

20 En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5 'TTCCATGACGTTCTGACGT 3'. En otra realización específica, la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia 5' TCCATGACGTTCTGACGT 3', en la que las dos citosinas indicadas en negrita están metiladas. En realizaciones concretas, el ODN se selecciona de un grupo de ODN que consiste en ODN Núm. 1, ODN Núm. 2, ODN Núm. 3, ODN Núm. 4, ODN Núm. 5, ODN Núm. 6, ODN Núm. 7, ODN Núm. 8 y ODN Núm. 9, como se muestra a continuación.

Tabla 3. Oligonucleótidos (ODN) inmunoestimuladores ilustrativos

NOMBRE DE ODN	SEQ ID	SECUENCIA ODN (5'-3').
ODN 1 humano c-myc		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
*ODN 1m		5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2		5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3
*ODN 2m		5'-TCCATGAZGTTCTGAZGTT-3
ODN 3		5'-TAAGCATAACGGGGTGT-3
ODN 5		5'-AACGTT-3
ODN 6		5'-GATGCTGTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'
ODN 7		5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'
ODN 7m		5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3'
ODN 8		5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'
ODN 9		5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'
ODN 10 Molécula de Adhesión Intracelular murina-1		5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3
ODN 11 Molécula de Adhesión Intracelular humana-1		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 12 Molécula de Adhesión Intracelular humana-1		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 13 erb-B-2 humano		5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
ODN 14 c-myc humano		5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 15 c-myc humano		

NOMBRE DE ODN	SEQ ID	SECUENCIA ODN (5'-3').
		5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3'
ODN 16		5'-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3'
ODN 17 Factor 1 de Crecimiento Insulínico humano - Receptor		5'-GGACCTCCTCCGGAGCC-3'
ODN 18 Factor 1 de Crecimiento Insulínico humano - Receptor		5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
ODN 19 Factor de Crecimiento epidérmico humano - Receptor		5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 20 Factor de Crecimiento epidérmico - Receptor		5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
ODN 21 Factor de Crecimiento Endotelial Vascular humano		5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'
ODN 22 Fosfoquinasa C - alfa murina		5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3'
ODN 23		5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
ODN 24 Bcl-2 humano		5'-TCT CCCAGCGTGCCCAT-3'
ODN 25 C-Raf humanos		5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
Receptor de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular Humano ODN Núm. 26		5'-GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGG-CCGAAAGUCUG-3'
ODN Núm.27		5'-RRCGY-3'
ODN Núm. 28		5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ODN Núm.29		5'-CAACGTTATGGGGAGA-3'
ODN Núm. 30 humano c-myc		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'
"Z" representa un residuo de citosina metilada. El ODN 14 es un oligonucleótido de 15 unidades y el ODN 1 es el mismo oligonucleótido que tiene una timidina añadida al extremo 5' que hace que el ODN 1 llegue a 16 unidades. No se ha detectado ninguna diferencia en la actividad biológica entre el ODN 14 y el ODN 1 y ambos exhiben una actividad inmunoestimuladora similar (Mui <i>et al.</i> , 2001)		

Las secuencias de ácido nucleico específicas adicionales de oligonucleótidos (ODN) adecuadas para su uso en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son descritas por Raney et al., en Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298: 1185-1192 (2001). En ciertas realizaciones, los ODN utilizados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria tienen una cadena principal de fosfodiéster ("PO") o una cadena principal de fosforotioato ("PS"), y/o al menos un residuo de citosina metilado en un motivo CpG.

Oligonucleótidos señuelo

Debido a que los factores de transcripción reconocen sus secuencias de unión relativamente cortas, incluso en ausencia de ADN genómico circundante, se pueden utilizar oligonucleótidos cortos que llevan la secuencia de unión consensuado de un factor de transcripción específico como herramientas para manipular la expresión génica en células vivas. Esta estrategia implica la administración intracelular de tales "oligonucleótidos señuelo", que a continuación son reconocidos y unidos por el factor diana. La ocupación del sitio de unión al ADN del factor de transcripción por el señuelo hace que el factor de transcripción sea incapaz de unirse posteriormente a las regiones promotoras de

genes diana. Los señuelos se pueden utilizar como agentes terapéuticos, ya sea para inhibir la expresión de genes que se activan por un factor de transcripción, o para regular al alza los genes que se suprimen por la unión de un factor de transcripción. Se pueden encontrar ejemplos de la utilización de oligonucleótidos señuelo en J. Clin. Invest., 2000, 106: 1071-1075 de Mann et al.

5

Supermir

Un supermir se refiere a un oligómero de hebra sencilla, de doble hebra o parcialmente de doble hebra de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o ambos o modificaciones de los mismos, que tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a un miARN y que es antisentido con respecto a su diana. Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (cadena principal) y que contienen al menos una porción no natural que funciona de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, potenciación de la captación celular, potenciación de la afinidad por la diana de ácido nucleico y aumento de estabilidad en presencia de nucleasas. En una realización preferida, el supermir no incluye una cadena efectora, y en otra realización preferida, el supermir no se hibrida automáticamente en un grado significativo. Un supermir presentado en la presente memoria puede tener una estructura secundaria, pero es sustancialmente de hebra sencilla en condiciones fisiológicas. Un supermir que es sustancialmente de hebra sencilla es de hebra sencilla en la medida en que menos de aproximadamente 50% (p.ej., menos de aproximadamente 40%, 30%, 20%, 10% o 5%) del supermir está formando dúplex consigo mismo. El supermir puede incluir un segmento en horquilla, p.ej., la secuencia, preferiblemente en el extremo 3' puede autohibridarse y formar una región dúplex, por ejemplo, una región dúplex de al menos 1, 2, 3 o 4 y preferiblemente menos de 8, 7, 6 o n nucleótidos, p.ej., 5 nucleótidos. La región dúplex se puede conectar mediante un conector, por ejemplo, un conector de nucleótidos, por ejemplo, 3, 4, 5 o 6 dT, p.ej., dT modificados. En otra realización, el supermir está formando dúplex con un oligo más corto, por ejemplo, de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud, p.ej., en uno o ambos extremos 3' y 5' o en un extremo y en una porción no terminal o media del supermir.

10

15

20

25

Miméticos de miARN

Los miméticos de miARN representan una clase de moléculas que pueden utilizarse para imitar la capacidad de silenciamiento génico de uno o más miARN. Por tanto, el término "mimético de microARN" se refiere a ARN no codificantes sintéticos (es decir, el miARN no se obtiene por purificación a partir de una fuente del miARN endógeno) que son capaces de entrar en la ruta del ARNi y regular la expresión génica. Los miméticos de miARN pueden diseñarse como moléculas maduras (p.ej., de hebra sencilla) o precursores miméticos (p.ej., pri- o pre-miARN). Los miméticos de miARN pueden estar compuestos por ácido nucleico (ácidos nucleicos no modificados o modificados) que incluyen oligonucleótidos que comprenden, sin limitación, ARN, ARN modificado, ADN, ADN modificado, ácidos nucleicos bloqueados o ácidos nucleicos con puente de 2'-O,4'-C-etileno (ENA), o cualquier combinación de los anteriores (incluyendo híbridos de ADN-ARN). Además, los miméticos de miARN pueden comprender productos conjugados que pueden afectar el suministro, la compartimentalización intracelular, la estabilidad, la especificidad, la funcionalidad, el uso de hebras y/o la potencia. En un diseño, los miméticos de miARN son moléculas de doble hebra (p.ej., con una región dúplex de entre aproximadamente 16 y aproximadamente 31 nucleótidos de longitud) y contienen una o más secuencias que tienen identidad con la cadena madura de un miARN dado. Las modificaciones pueden comprender modificaciones 2' (incluyendo modificaciones 2'-O-metilo y modificaciones 2' F) en una o ambas hebras de la molécula y modificaciones internucleotídicas (p.ej., modificaciones fosforotioato) que potencian la estabilidad y/o especificidad del ácido nucleico. Además, los miméticos de miARN pueden incluir salientes. Los salientes pueden consistir en 1-6 nucleótidos en cualquiera de los extremos 3' o 5' de cualquier hebra y pueden modificarse para mejorar la estabilidad o la funcionalidad. En una realización, un mimético de miARN comprende una región dúplex de entre 16 y 31 nucleótidos y uno o más de los siguientes patrones de modificación química: la cadena efectora contiene modificaciones 2'-O-metilo de los nucleótidos 1 y 2 (contando desde el 5' final del oligonucleótido efector), y todos los Cs y Nosotros; las modificaciones de la cadena antisentido pueden comprender la modificación en 2' F de todas las C y los U, la fosforilación del extremo 5' del oligonucleótido y los enlaces internucleotídicos estabilizados asociados con un saliente 3' de 2 nucleótidos.

30

35

40

45

50

Antimir o inhibidor de miARN

Los términos "antimir", "inhibidor de microARN", "inhibidor de miR" o "inhibidor" son sinónimos y se refieren a oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados que interfieren en la capacidad de miARN específicos. En general, los inhibidores son ácidos nucleicos o ácidos nucleicos modificados en la naturaleza que incluyen oligonucleótidos que comprenden ARN, ARN modificado, ADN, ADN modificado, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o cualquier combinación de los anteriores. Las modificaciones incluyen modificaciones 2' (incluyendo modificaciones al 2'-O-alquil y modificaciones 2' F) y modificaciones internucleotídicas (p.ej., modificaciones fosforotioato) que pueden afectar el suministro, la estabilidad, la especificidad, la compartimentalización intracelular o la potencia. Además, los inhibidores de miARN pueden comprender productos conjugados que pueden afectar el suministro, la compartimentalización intracelular, la estabilidad y/o la potencia. Los inhibidores pueden adoptar una variedad de configuraciones que incluyen hebras sencillas, dobles hebras (dúplex de ARN/ARN o ARN/ADN) y diseños en

55

60

65

horquilla, en general, los inhibidores de microARN comprenden una o más secuencias o porciones de secuencias que son complementarias o parcialmente complementarias a la hebra (o hebras) maduras del miARN que se debe digerir, además, el inhibidor de miARN también puede comprender secuencias adicionales ubicadas en 5' y 3' a la secuencia que es el complemento inverso del miARN maduro. Las secuencias adicionales pueden ser los complementos inversos de las secuencias que son adyacentes al miARN maduro en el pri-miARN del que deriva el miARN maduro, o las secuencias adicionales pueden ser secuencias arbitrarias (que tienen una mezcla de A, G, C, o U). En algunas realizaciones, una o ambas de las secuencias adicionales son secuencias arbitrarias capaces de formar horquillas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia que es el complemento inverso del miARN está flanqueada en el lado 5' y en el lado 3' por estructuras en horquilla. Los inhibidores de micro-ARN, cuando son de doble hebra, pueden incluir emparejamientos erróneos entre nucleótidos en cadenas opuestas. Además, los inhibidores de micro-ARN se pueden unir a radicales conjugados para facilitar la absorción del inhibidor en una célula. Por ejemplo, un inhibidor de micro-ARN se puede unir a 5-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3-hidroxipentilcarbamato de colesterilo que permite la absorción pasiva de un inhibidor de micro-ARN en una célula. Los inhibidores de micro-ARN, incluyendo los inhibidores de miARN en horquilla, son descritos en detalle por Vermeulen et al., "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function," RNA 13: 723-730 (2007) y en el documento WO2007/095387 y el documento WO 2008/036825. Un experto con un conocimiento práctico normal de la técnica puede seleccionar una secuencia de la base de datos para un miARN deseado y diseñar un inhibidor útil para los métodos descritos en la presente memoria.

Adaptador U1

El adaptador U1 inhibe los sitios poliA y son oligonucleótidos bifuncionales con un dominio diana complementario a un sitio en el exón terminal del gen diana y un "dominio U1" que se une al componente de ARN nuclear más pequeño U1 de la RNPp U1 (Goracznjak, et al., 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263). La snRNP U1 es un complejo de ribonucleoproteína que funciona principalmente para dirigir las primeras etapas en la formación de espliceosomas uniéndose al límite del exon-intrón pre-ARNm (Brown y Simpson, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 77-95). Los nucleótidos 2-11 del extremo 5' del par de bases del ARNp U1 se unen con los 5' ss del pre ARNm. En una realización, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria son adaptadores U1. En una realización, el adaptador U1 se puede administrar combinado con al menos otro agente de ARNi.

Modificaciones de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos no modificados pueden ser menos que óptimos en algunas aplicaciones, p.ej., los oligonucleótidos no modificados pueden ser propensos a la degradación p.ej., por nucleasas celulares. Las nucleasas pueden hidrolizar enlaces de fosfodiéster de ácido nucleico. Sin embargo, las modificaciones químicas de los oligonucleótidos pueden conferir propiedades mejoradas, y, p.ej., pueden hacer que los oligonucleótidos sean más estables a las nucleasas.

Como los oligonucleótidos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones que se describen a continuación ocurren en una posición que se repite dentro de un oligonucleótido, p.ej., una modificación de una base, un azúcar, un radical fosfato, o el oxígeno que no forma puentes de un radical fosfato. No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado se modifiquen uniformemente, y de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente se pueden incorporar en un único oligonucleótido o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido.

En algunos casos, la modificación ocurrirá en todas las posiciones sujeto en el oligonucleótido, pero en muchos, y de hecho en la mayoría de los casos, no ocurrirá. A modo de ejemplo, una modificación puede ocurrir solamente en una posición terminal 3' o 5', puede ocurrir solamente en la región interna, puede ocurrir solamente en una región terminal, p.ej. en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de un oligonucleótido. Puede producirse una modificación en una región de doble hebra, una región de hebra sencilla o en ambas. Puede producirse una modificación solamente en la región de doble hebra de un oligonucleótido de doble hebra o puede tener lugar solamente en una región de hebra sencilla de un oligonucleótido de doble hebra. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición de oxígeno que no forma puentes puede ocurrir solamente en uno o en ambos extremos, puede ocurrir solamente en una región terminal, p.ej., en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, ó 10 nucleótidos de una hebra, o puede ocurrir en regiones de doble hebra y de hebra sencilla, particularmente en los extremos. El extremo o los extremos 5' se pueden fosforilar.

Una modificación descrita en la presente memoria puede ser la única modificación, o el único tipo de modificación incluido en múltiples nucleótidos, o se puede combinar una modificación con una o más modificaciones adicionales descritas en la presente memoria. Las modificaciones descritas en la presente memoria también se pueden combinar en un oligonucleótido, p.ej. diferentes nucleótidos de un oligonucleótido tienen diferentes modificaciones descritas en la presente memoria.

En algunas realizaciones, es particularmente preferido p.ej., mejorar la estabilidad, para incluir nucleobases particulares en salientes, o para incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos, en salientes de una sola

hebra, p.ej., en un saliente 5' o 3', o en ambos. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en los salientes. En algunas realizaciones, todas o algunas de las bases de un saliente 3' o 5' serán modificadas, p.ej., con una modificación descrita en la presente memoria. Las modificaciones pueden incluir, p.ej., el uso de modificaciones en el grupo 2' OH del azúcar de ribosa, p.ej., el uso de desoxirribonucleótidos, p.ej., desoxitimidina, en lugar de ribonucleótidos, y modificaciones en el grupo fosfato, p.ej., modificaciones de fosforioato. No es necesario que los salientes sean homólogos a la secuencia diana.

Las modificaciones específicas se comentan con más detalle a continuación.

Grupo fosfato

El grupo fosfato es una especie con carga negativa. La carga se distribuye por igual sobre los dos átomos de oxígeno que no forman puentes. Sin embargo, el grupo fosfato se puede modificar reemplazando uno de los oxígenos por un sustituyente diferente. Un resultado de esta modificación para las cadenas principales de fosfato del ARN puede ser una mayor resistencia del oligorribonucleótido a la rotura nucleolítica. Por lo tanto, aunque no se desea estar limitado por la teoría, puede ser deseable en algunas realizaciones introducir alteraciones que den como resultado un conector no cargado o un conector cargado con una distribución de carga asimétrica.

Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosforioato, fosforoselenato, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, hidrógeno fosfonatos, fosforoamidatos, alquil- o aril-fosfonatos y fosfotriésteres. En ciertas realizaciones, uno de los átomos de oxígeno del fosfato que no forman puentes en el radical de la cadena principal del fosfato se puede reemplazar por cualquiera de los siguientes: S, Se, BR₃ (R es hidrógeno, alquilo, arilo), C (es decir, un grupo alquilo, un grupo arilo, etc.), H, NR₂ (R es hidrógeno, alquilo, arilo) u OR (R es alquilo o arilo). El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es aquiral. Sin embargo, la sustitución de uno de los oxígenos que no forman puentes por uno de los átomos o grupos de átomos anteriores hace que el átomo de fósforo sea quiral; en otras palabras, un átomo de fósforo en un grupo fosfato modificado de esta manera es un centro estereogénico. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer la configuración "R" (en la presente memoria Rp) o la configuración "S" (en la presente memoria Sp).

Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos que no forman puentes reemplazados por azufre. El centro de fósforo en los fosforoditioatos es aquiral lo que impide la formación de diastereómeros de oligorribonucleótidos. Por lo tanto, aunque no se desea estar limitado por la teoría, las modificaciones en ambos oxígenos que no forman puentes, que eliminan el centro quiral, p.ej. la formación de fosforoditioato, puede ser deseable ya que no pueden producir mezclas de diastereómeros. Por lo tanto, los oxígenos que no forman puentes pueden ser independientemente cualquiera de S, Se, B, C, H, N o OR (R es alquilo o arilo).

El conector de fosfato también se puede modificar reemplazando el oxígeno que forma puentes (es decir, el oxígeno que une el fosfato con el nucleósido), por nitrógeno (fosforoamidatos unidos por puentes), azufre (fosforotioatos unidos por puentes) y carbono (metilfosfonatos unidos por puentes). El reemplazo puede ocurrir en el oxígeno de la unión o en ambos oxígenos de la unión. Cuando el oxígeno que forma puentes es el oxígeno 3' de un nucleósido, se prefiere el reemplazo por carbono. Cuando el oxígeno que forma puentes es el oxígeno 5' de un nucleósido, se prefiere el reemplazo por nitrógeno.

Reemplazo del grupo fosfato

El grupo fosfato se puede reemplazar por conectores que no contengan fósforo. Aunque sin desear quedar limitado por la teoría, se cree que dado que el grupo fosfodiéster cargado es el centro de reacción en la degradación nucleolítica, su remplazo por miméticos estructurales neutros debería conferir una mayor estabilidad frente a la nucleasa. De nuevo, aunque no se desea estar limitado por la teoría, puede ser deseable, en alguna realización, introducir alteraciones en las que el grupo fosfato cargado esté reemplazado por un radical neutro.

Los ejemplos de radicales que pueden reemplazar al grupo fosfato incluyen metilfosfonato, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazona y metilnoximetilimino. Los reemplazos preferidos incluyen los grupos metilencarbonilamino y metilmetilimino.

Las uniones de fosfato modificados en los que al menos uno de los oxígenos unidos al fosfato se ha reemplazado o el grupo fosfato se ha reemplazado por un grupo no fosforado, también se denominan "uniones de cadena principal distintas de fosfodiéster".

Reemplazo de la cadena principal de ribofosfato

También se pueden construir armazones que imitan oligonucleótidos en los que el conector de fosfato y el azúcar de ribosa se reemplazan por nucleótidos o nucleótidos resistentes a nucleasas. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se cree que la ausencia de una cadena principal cargada repetitivamente disminuye la unión a proteínas que

reconocen polianiones (p.ej. nucleasas). De nuevo, aunque no se desea estar limitado por la teoría, puede ser deseable en alguna realización, introducir alteraciones en las que las bases estén trabadas por una cadena principal sustituta neutra. Los ejemplos incluyen los sustitutos de morfolino, ciclobutilo, pirrolidina y nucleósidos de ácido péptido nucleico (PNA). Un sustituto preferido es un sustituto de PNA.

Modificaciones de azúcar

Un ARN modificado puede incluir la modificación de todos o algunos de los grupos de azúcar del ácido ribonucleico. Por ejemplo, el grupo 2' hidroxilo (OH) se puede modificar o reemplazar por numerosos sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se espera una mayor estabilidad ya que el hidroxilo ya no puede ser desprotonado para formar un ion alcóxido 2'. El 2'-alcóxido puede catalizar la degradación por ataque nucleofílico intramolecular en el átomo de fósforo conector. De nuevo, aunque no se desea estar limitado por la teoría, puede ser deseable para algunas realizaciones introducir alteraciones en las que la formación de alcóxido en la posición 2' no sea posible.

Los ejemplos de modificaciones del grupo "oxi"-2' hidroxilo incluyen alcoxi o ariloxi (OR, p.ej., R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O$; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los que el 2' hidroxilo está conectado, p.ej., mediante un puente de metileno, al carbono 4' del mismo azúcar de ribosa; O-AMINA (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) y aminoalcoxi, $O(CH_2)_nAMINA$, (p.ej., AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino). Es digno de mención que los oligonucleótidos que contienen solamente el grupo metoxietilo (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, un derivado de PEG), exhiben estabilidades frente a las nucleasas comparables a las modificadas con la modificación robusta de fosforotioato.

Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno (es decir azúcares de desoxirribosa, que son de particular relevancia para las porciones salientes del ARN parcialmente dh); halo (p.ej., flúor); amino (p.ej. NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINA$ (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino), $-NHC(O)R$ (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos p.ej., con una funcionalidad amino. Los sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'-OCH₃, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo y 2'-flúor.

El grupo azúcar también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por lo tanto, un oligonucleótido puede incluir nucleótidos que contienen p.ej., arabinosa, como azúcar. El monómero puede tener una unión alfa en la posición 1' del azúcar, por ejemplo, nucleósidos alfa. Los oligonucleótidos también pueden incluir azúcares "abásicos", que carecen de una base nitrogenada en C-1'. Estos azúcares abásicos también pueden contener modificaciones en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes. Los oligonucleótidos también pueden contener uno o más azúcares que están en forma L, p.ej. L-nucleósidos.

Modificaciones terminales

Los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido se pueden modificar. Tales modificaciones pueden ser en el extremo 3', en el extremo 5' o en ambos extremos de la molécula. Pueden incluir la modificación o el reemplazo de un fosfato terminal completo o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. Por ejemplo, los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido se pueden conjugar con otras entidades moleculares funcionales tales como radicales marcadores, p.ej., fluoróforos (p.ej., colorantes de pireno, TAMRA, fluoresceína, colorantes Cy3 o Cy5) o grupos protectores (basados p.ej., en azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales se pueden anclar al azúcar a través de un grupo fosfato y/o un conector. El átomo terminal del conector se puede conectar con o reemplazar el átomo de unión del grupo fosfato o el grupo C-3' o C-5' O, N, S o C del azúcar. Alternativamente, el conector se puede conectar con o reemplazar el átomo terminal de un sustituto de nucleótido (p.ej., PNA).

Cuando una matriz de conector/fosfato-entidad molecular funcional-conector/fosfato se interpone entre dos hebras de un ARNdh, esta matriz puede sustituir a un bucle de RNA en horquilla en un agente de ARN de tipo horquilla.

Las modificaciones terminales útiles para la actividad de modulación incluyen la modificación del extremo 5' con fosfato o análogos de fosfato. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, las hebras antisentido de los ARNdh, están fosforiladas en 5' o incluyen un análogo de fosforilo en el extremo 5' primario. Las modificaciones de 5'-fosfato incluyen aquellas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); protección terminal 5'-guanosina (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); Protección terminal 5'-adenosina (Appp), y cualquier estructura de protección terminal de nucleótido modificada o no modificada (NO-5'-(HO)(O)PO-(HO)(O)P-OP(HO)(O)-O-5'); 5'-

monotiofosfato (fosforotioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato difosfato y trifosfato remplazado por oxígeno/azufre, (p.ej. 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)PO-5'), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc. p.ej. RP(OH)(O)-O-5', (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-alquiléterfosfonatos (R = alquiléter = metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., p.ej. RP(OH)(O)-O-5'-).

Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para controlar la distribución, y en tales casos los grupos preferidos que se va a agregar incluyen fluoróforos, p.ej., fluoresceína o un colorante Alexa, p.ej., Alexa 488. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para mejorar la absorción, modificaciones útiles para esto incluyen el colesterol. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para el entrecruzamiento de un agente de ARN a otro radical; modificaciones útiles para esto incluyen mitomicina C.

Nucleobases

La adenina, la guanina, la citosina y el uracilo son las bases más comunes que se encuentran en el ARN. Estas bases se pueden modificar o reemplazar para proporcionar ARN que tenga propiedades mejoradas. Por ejemplo, los oligorribonucleótidos resistentes a nucleasas se pueden preparar con estas bases o con nucleobases sintéticas y naturales (p.ej., inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina o tubercidina) y cualquiera de las modificaciones anteriores. Alternativamente, se pueden emplear análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases anteriores, p.ej., "bases inusuales", "bases modificadas", "bases no naturales" y "bases universales" descritas en la presente memoria. Los ejemplos incluyen, sin limitación, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil-uracilo y citosina, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-aminoalil-uracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos e la posición 5, 7-metilguanina, pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-desaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquil citosina, 7-desazadenina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-aminoalil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracilo-5-oxiacético, 5-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁴-acetil citosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metil-N6-isopentiladenina, N-metilguaninas o bases O-alquiladas. Otras purinas y pirimidinas incluyen las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 3.687.808, las descritas en Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613.

Grupos catiónicos

Las modificaciones de los oligonucleótidos también pueden incluir el anclaje de uno o más grupos catiónicos al azúcar, la base y/o el átomo de fósforo de un radical fosfato o de la cadena principal de fosfato modificada. Un grupo catiónico se puede unir a cualquier átomo susceptible de sustitución en una base natural, inusual o universal. Una posición preferida es aquella que no interfiere en la hibridación, es decir, que no interfiere en las interacciones de enlace de hidrógeno necesarias para el emparejamiento de bases. Un grupo catiónico se puede anclar, por ejemplo, a través de la posición C2' de un azúcar o una posición análoga en un sustituto de azúcar cíclico o acíclico. Los grupos catiónicos pueden incluir, p.ej., grupos amino protonados, derivados, p.ej., de O-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino o diheteroaril amino, etilendiamina, poliamino); aminoalcoxi, p.ej., O(CH₂)_nAMINA, (p.ej., AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino o diheteroaril amino, etilendiamina, poliamino); amino (p.ej. NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); o NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diaril amino, heteroarilamino o diheteroaril amino).

Colocación dentro de un oligonucleótido

Se pueden incluir preferiblemente algunas modificaciones en un oligonucleótido en una ubicación particular, p.ej., en una posición interna de una hebra, o en el extremo 5' o 3' de un oligonucleótido. Una ubicación preferida de una modificación en un oligonucleótido, puede conferir propiedades preferidas al agente. Por ejemplo, las ubicaciones preferidas de modificaciones particulares pueden conferir propiedades de silenciamiento génico óptimas, o mayor resistencia a la actividad de endonucleasas o exonucleasas.

Uno o más nucleótidos de un oligonucleótido pueden tener una unión 2'-5'. Uno o más nucleótidos de un oligonucleótido pueden tener uniones invertidas, p.ej. 3'-3', 5'-5', 2'-2' o 2'-3'.

Un oligonucleótido de doble hebra puede incluir al menos un dinucleótido de 5'-uridina-adenina-3'(5'-UA-3') en donde

la uridina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido de 5'-uridina-guanina-3' (5'-UG-3') terminal, en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido de 5'-citidina-adenina-3' (5'-CA-3') terminal, en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido de 5'-uridina-uridina-3' (5'-UU-3') terminal, en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido de 5'-citidina-citidina-3' (5'-CC-3') terminal, en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido de 5'-citidina-uridina-3' (5'-CU-3') terminal, en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido de 5'-uridina-citidina-3' (5'-UC-3') terminal, en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'. Los oligonucleótidos de doble hebra que incluyen estas modificaciones están particularmente estabilizados frente a la actividad de la endonucleasa.

10 **Referencias generales**

Los oligorribonucleótidos y oligorribonucleósidos utilizados de acuerdo con esta descripción se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida, véase por ejemplo "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (especialmente Capítulo 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Capítulo 2, Oligoribonucleotide synthesis, Capítulo 3, 2'-O-Methyloligoribonucleotide- s: synthesis and applications, Capítulo 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Capítulo 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Capítulo 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, y. Capítulo 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases. Otros procedimientos sintéticos particularmente útiles, reactivos, grupos bloqueadores y condiciones de reacción son descritos por Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. e Iyer, R. P., Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311 y Beaucage, S. L. e Iyer, R. P., Tetrahedron, 1993, 49, 6123-6194., o referencias a las que se hace referencia en los mismos. Se puede utilizar en la presente memoria la modificación descrita en los documentos WO 00/44895, WO01/75164, o WO02/44321.

25 **Referencias de grupos fosfato**

La preparación de oligorribonucleótidos fosfinato se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.508.270. La preparación de oligorribonucleótidos alquilfosfonato se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.469.863. La preparación de oligorribonucleótidos fosforamidita se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.256.775 o en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.366.878. La preparación de oligonucleótidos fosfotriéster se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.023.243. La preparación de oligorribonucleótidos fosfato de borano se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.130.302 y 5.177.198. La preparación de oligorribonucleótidos 3'-desoxi-3'-amino fosforamidato se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.476.925. Los oligorribonucleótidos 3'-desoxi-3'-metileno fosfonato la describen An, H, et al., en J. Org. Chem. 2001, 66, 2789-2801. La preparación de nucleótidos con puentes de azufre la describen Sproat et al. en Nucleosides Nucleotides 1988, 7,651 y Crosstick et al. en Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4693.

35 **Referencias de grupos azúcar**

Las modificaciones de las modificaciones 2' se pueden encontrar en Verma, S. et al., Annu. Rev. Biochem. 1998, 67, 99-134 y todas las referencias de la misma. Se pueden encontrar modificaciones específicas de la ribosa en las siguientes referencias: 2'-fluoro (Kawasaki et. al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841), 2'-MOE (Martin, P. Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, J. Acc. Chem. Res. 1999, 32, 301-310).

45 **Referencias de reemplazo del grupo fosfato**

Oligorribonucleósidos unidos a metileno metilimino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a MMI, los oligorribonucleósidos unidos a metilendimetilhidrazo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a MDH, y los oligonucleósidos unidos a metilencarbonilamino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a amida-3, y los oligonucleósidos unidos a metilenoaminocarbonilo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a amida-4 así como compuestos de cadena principal mixta que tienen, por ejemplo, alternancia de uniones MMI y PO o PS, se pueden preparar como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.378.825, 5.386.023, 5.489.677 y en las solicitudes PCT publicadas PCT/US92/04294 y PCT/US92/04305 (publicadas como WO 92/20822 WO and 92/20823, respectivamente). Los oligorribonucleósidos unidos a formacetales y tioformacetales se pueden preparar como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.264.562 y 5.264.564. Los oligorribonucleósidos unidos a óxido de etileno se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.618. Los reemplazos de siloxano son descritos por Cormier, J.F. et al., en Nucleic Acids Res. 1988, 16, 4583. Los reemplazos de carbonato son descritos por Tittensor, J.R. J. Chem. Soc. C 1971, 1933. Los reemplazos de carboximetilo son descritos por Edge, M.D. et al. en J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 1972, 1991. Los reemplazos de carbamato son descritos por Stirchak, E.P. en Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6129.

65 **Referencias del reemplazo de la cadena principal de fosfato-ribosa**

Los compuestos sustitutos del azúcar ciclobutílico se pueden preparar como se describe en la Patente de los

Estados Unidos Núm. 5.359.044. El sustituto del azúcar pirrolidínico se puede preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.519.134. Los sustitutos del azúcar morfolínico se pueden preparar como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.142.047 y 5.235.033 y otras descripciones de patentes relacionadas. Los ácidos péptido nucleicos (PNA) son conocidos per se y se pueden preparar de acuerdo con cualquiera de los diversos procedimientos mencionados en Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23. También se pueden preparar de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.539.083.

Referencias de la modificación terminal

Las modificaciones terminales son descritos por Manoharan, M. et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12, 103-128 (2002) y referencias de la misma.

Referencias de Nucleobases

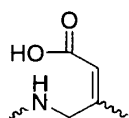
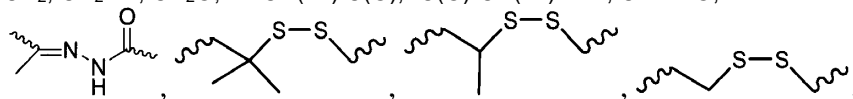
Las nucleósido amiditas de purina N-2 sustituidas se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.459.255. Las nucleósido amiditas de 3-desaza purina se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.457.191. Las nucleósido amiditas de pirimidina 5,6- sustituidas se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.614.617. Las nucleósido amiditas de 5-propinil pirimidina se pueden preparar como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.484.908.

Conectores

El término "conector" significa un radical orgánico que conecta dos partes de un compuesto. Los conectores típicamente comprenden un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad tal como NR^1 , $\text{C}(\text{O})$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$, SO , SO_2 , SO_2NH o una cadena de átomos, tal como alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heterocicilalquilo, heterocicilalquenilo, heterocicilalquinilo, arilo, heteroarilo, heterocicilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, alquilarilalquinilo, alquenilarilalquilo, alquenilarilalquenilo, alquenilarilalquinilo, alquinilarilalquilo, alquinilarilalquenilo, alquinilarilalquinilo, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalquenilo, alquilheteroarilalquinilo, alquenilheteroarilalquilo, alquenilheteroarilalquenilo, alquenilheteroarilalquinilo, alquinilheteroarilalquilo, alquinilheteroarilalquenilo, alquinilheteroarilalquinilo, alquilheterocicilalquilo, alquilheterocicilalquenilo, alquilheterocicilalquinilo, alquenilheterocicilalquilo, alquenilheterocicilalquenilo, alquenilheterocicilalquinilo, alquinilheterocicilalquilo, alquinilheterocicilalquenilo, alquinilheterocicilalquinilo, alquilarilo, alquenilarilo, alquinilarilo, alquilheteroarilo, alquenilheteroarilo, alquinilheteroarilo, donde uno o más metilenos pueden ser interrumpidos o finalizados por O, S, S(O), SO_2 , $\text{N}(\text{R}^1)_2$, $\text{C}(\text{O})$, un grupo de unión escindible, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocíclico sustituido o no sustituido; donde R^1 es hidrógeno, acilo, alifático o alifático sustituido.

En una realización, el conector es $-\text{[(P-Q-R)}_q\text{-X-(P'-Q'-R')}]_{q'}\text{-T-}$, en donde:

P, R, T, P', R' y T son cada uno independientemente para cada caso ausente, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2 , CH_2NH , CH_2O ; $\text{NHCH}(\text{R}^a)$ $\text{C}(\text{O})$, $-\text{C}(\text{O})\text{-CH}(\text{R}^a)\text{-NH-}$, CH=N-O ,



o heterocicilo;

Q y Q' son cada uno independientemente para cada caso ausente, $-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2)(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{R}^1)(\text{R}^2)-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2-$, o $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$;

X está ausente o es un grupo de unión escindible;

R^a es H o una cadena lateral de aminoácido;

R^1 y R^2 son cada uno independientemente para cada caso H, CH_3 , OH, SH o $\text{N}(\text{R}^N)_2$;

R^N es independientemente para cada caso H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o bencilo;

q, q' y q'' son cada uno independientemente para cada caso 0-20 y en donde la unidad repetitiva puede ser la misma o diferente;

n es independientemente para cada caso 1-20; y

m es independientemente para cada caso 0-50.

En una realización, el conector comprende al menos un grupo de unión escindible.

En ciertas realizaciones, el conector es un conector ramificado. El punto de ramificación del conector ramificado puede ser al menos trivalente, pero puede ser un átomo tetravalente, pentavalente o hexavalente, o un grupo que presenta tales valencias múltiples. En ciertas realizaciones, el punto de ramificación es, -N, -N(Q)-C, -OC, -SC, -SS-C, -C(O)N(Q)-C, -OC(O)N(Q)-C, -N(Q)C(O)-C, o -N(Q)C(O)OC; en donde Q es independientemente para cada caso H o alquilo opcionalmente sustituido. En otra realización, el punto de ramificación es glicerol o un derivado de glicerol.

Grupos de unión escindibles

Un grupo de unión escindible es uno que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que al entrar en una célula diana se escinde para liberar las dos partes que el conector mantiene juntas. En una realización preferida, el grupo de unión escindible se escinde al menos 10 veces o más, preferiblemente al menos 100 veces más rápido en la célula diana o en una primera condición de referencia (que se puede seleccionar, p.ej. para imitar o representar condiciones intracelulares) que en la sangre de un sujeto, o bajo una segunda condición de referencia (que puede ser, p.ej., seleccionada para imitar o representar condiciones que se encuentran en la sangre o el suero). Los grupos de unión escindibles son susceptibles a agentes de escisión, por ejemplo, el pH, el potencial redox o la presencia de moléculas degradativas. En general, los agentes de escisión son más prevalentes o se encuentran a niveles o actividades más altos dentro de las células que en el suero o la sangre. Los ejemplos de tales agentes degradativos incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad de sustrato, incluyendo, p.ej., enzimas reductoras o oxidantes o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo de unión escindible redox por reducción; esterasas; endosomas o agentes que pueden crear un entorno ácido, p.ej., aquellos que dan como resultado un pH de cinco o menos; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo de unión escindible por ácido actuando como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas del sustrato) y fosfatasas.

Un grupo de unión escindible, tal como un enlace disulfuro, puede ser susceptible al pH. El pH del suero humano es 7,4, mientras que el pH intracelular promedio es ligeramente menor, oscilando entre aproximadamente 7,1-7,3. Los endosomas tienen un pH más ácido, en el intervalo de 5,5-6,0, y los lisosomas tienen un pH aún más ácido en torno a 5,0. Algunos conectores tendrán un grupo de unión escindible que se escinde a un pH preferido, liberando así el lípido catiónico del ligando dentro de la célula, o en el compartimiento deseado de la célula.

Un conector puede incluir un grupo de unión escindible que es escindible por una enzima particular. El tipo de grupo de unión escindible incorporado a un conector puede depender de la célula que se vaya a elegir como diana. Por ejemplo, los ligandos que se dirigen al hígado se pueden unir a los lípidos catiónicos a través de un conector que incluye un grupo éster. Las células hepáticas son ricas en esterasas y, por lo tanto, el conector se escindirá más eficazmente en las células hepáticas que en los tipos celulares que no son ricos en esterasa. Otros tipos celulares ricos en esterasas incluyen las células del pulmón, la corteza renal y los testículos.

Los conectores que contienen enlaces peptídicos se pueden utilizar cuando se dirigen a tipos celulares ricos en peptidasas, tales como células hepáticas y sinoviocitos.

En general, la idoneidad de un grupo de unión escindible candidato se puede evaluar sometiendo a ensayo la capacidad de un agente (o afección) degradativo para escindir el grupo de unión candidato. Asimismo será deseable someter a ensayo también el grupo de unión escindible candidato para determinar la capacidad de resistir a la escisión en la sangre o cuando esté en contacto con otro tejido no diana. De este modo, se puede determinar la susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera y una segunda condición, donde la primera se selecciona para que sea indicativa de escisión en una célula diana y la segunda se selecciona para que indique la escisión en otros tejidos o fluidos biológicos, p.ej., sangre o suero. Las evaluaciones se pueden llevar a cabo en sistemas libres de células, en células, en cultivos celulares, en cultivos de órganos o tejidos, o en animales completos. Puede ser útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones de cultivo o sin células y confirmar mediante evaluaciones adicionales en animales completos. En realizaciones preferidas, los compuestos candidatos útiles se escinden al menos 2, 4, 10 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar condiciones extracelulares).

Grupos de unión escindibles redox

Una clase de grupos de unión escindibles son los grupos de unión escindibles redox que se escinden tras la reducción o la oxidación. Un ejemplo de grupo de unión escindible por reducción es un grupo de unión disulfuro (-S-S-). Para determinar si un grupo de unión escindible candidato es un "grupo de unión escindible por reducción" adecuado, o por ejemplo es adecuado para su uso con un radical de ARNi particular y un agente de direccionamiento particular, se pueden observar los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede un candidato mediante incubación con ditioneitol (DTT) u otro agente reductor utilizando reactivos conocidos en la técnica, que imitan la velocidad de escisión que se observaría en una célula, p.ej., una célula diana. Los

candidatos también se pueden evaluar en condiciones que se seleccionan para imitar las condiciones de la sangre o el suero. En una realización preferida, los compuestos candidato se escinden a lo sumo 10% en la sangre. En realizaciones preferidas, los compuestos candidatos útiles se degradan al menos 2, 4, 10 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares). La velocidad de escisión de los compuestos candidato se puede determinar utilizando análisis de cinética enzimática convencionales en condiciones elegidas para imitar los medios intracelulares y en comparación con las condiciones elegidas para imitar los medios extracelulares.

10 **Grupos de unión escindibles basados en fosfato**

Los grupos de unión escindibles basados en fosfato se escinden mediante agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de un agente que escinde los grupos fosfato en las células son enzimas tales como las fosfatasa en las células. Los ejemplos de grupos de unión basados en fosfato son -OP(O)(ORk)-O-, -OP(S)(ORk)-O-, -OP(S)(SRk)-O-, -SP(O)(ORk)-O-, -OP(O)(ORk)-S-, -SP(O)(ORk)-S-, -OP(S)(ORk)-S-, -SP(S)(ORk)-O-, -OP(O)(Rk)-O-, -OP(S)(Rk)-O-, -SP(O)(Rk)-O-, -SP(S)(Rk)-O-, -SP(O)(Rk)-S-, -OP(S)(Rk)-S-. Las realizaciones preferidas son -OP(O)(OH)-O-, -OP(S)(OH)-O-, -OP(S)(SH)-O-, -SP(O)(OH)-O-, -OP(O)(OH)-S-, -SP(O)(OH)-S-, -OP(S)(OH)-S-, -SP(S)(OH)-O-, -OP(O)(H)-O-, -OP(S)(H)-O-, -SP(O)(H)-O-, -SP(S)(H)-O-, -SP(O)(H)-S-, -OP(S)(H)-S-. Una realización preferida es -O-P (O) (OH) -O-. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

20 **Grupos de unión escindibles por ácido**

Los grupos de unión escindibles por ácido son grupos de unión que se escinden en condiciones ácidas. En realizaciones preferidas, los grupos de unión escindibles por ácido se escinden en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o inferior (p.ej., aproximadamente 6,0, 5,5, 5,0 o inferior) o mediante agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En una célula, los orgánulos específicos de pH bajo, tales como los endosomas y los lisosomas, pueden proporcionar un entorno de escisión para los grupos de unión escindibles por ácido. Los ejemplos de grupos de unión escindibles por ácido incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos. Los grupos escindibles por ácido pueden tener la fórmula general -C=NN-, C(O)O, o -OC(O). Una realización preferida es cuando el carbono anclado al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, un grupo alquilo sustituido o un grupo alquilo terciario tal como dimetilpentilo o t-butilo. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

35 **Grupos de unión basados en éster**

Los grupos de unión escindibles basados en éster se escinden mediante enzimas tales como esterases y amidasas en las células. Los ejemplos de los grupos de unión escindibles basados en éster incluyen, pero no se limitan a, ésteres de grupos alqueno, alquenoileno y alquinoileno. Los grupos de unión escindibles por éster tienen la fórmula general -C(O)O-, o -OC(O)-. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

40 **Grupos de escisión basados en péptidos**

Los grupos de unión escindibles basados en péptidos se escinden mediante enzimas tales como peptidasas y proteasas en las células. Los grupos de unión escindibles basados en péptidos son enlaces peptídicos formados entre aminoácidos para producir oligopéptidos (p.ej. dipéptidos, tripéptidos, etc.) y polipéptidos. Los grupos escindibles basados en péptidos no incluyen el grupo amida (-C(O)NH-). El grupo amida se puede formar entre cualquier alqueno, alquenoileno o alquinoileno. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace amida formado entre aminoácidos para producir péptidos y proteínas. El grupo de escisión basado en péptidos generalmente se limita al enlace peptídico (es decir, el enlace amida) formado entre los aminoácidos que producen péptidos y proteínas y no incluye el grupo funcional amida completo. Los grupos de unión escindibles basados en péptidos tienen la fórmula general -NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)-, donde R^A y R^B son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

55 **Ligandos**

Una amplia variedad de entidades se puede acoplar a los oligonucleótidos y lípidos descritos en la presente memoria. Los radicales preferidos son ligandos, que se acoplan, preferiblemente de manera covalente, ya sea directa o indirectamente a través de una fijación intermedia.

En realizaciones preferidas, un ligando altera la distribución, el direccionamiento o el tiempo de vida de la molécula a la que se incorpora. En realizaciones preferidas, un ligando proporciona una mejor afinidad para una diana seleccionada, p.ej., molécula, célula o tipo de célula, compartimento, p.ej., un compartimento celular o de un órgano, tejido, órgano o región del organismo, p. ej., en comparación con una especie que carece de dicho ligando. Los ligandos que proporcionan una mejor afinidad para una diana seleccionada también se denominan ligandos de

direccionamiento. Los ligandos preferidos para la conjugación con los lípidos descritos en la presente memoria son ligandos de direccionamiento.

5 Algunos ligandos pueden tener propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos promueven la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición descrita en la presente memoria, o sus componentes, desde el endosoma hasta el citoplasma de la célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido polianiónico o peptidomimético que muestra actividad de membrana y fusogenicidad dependientes del pH. En ciertas realizaciones, el ligando endosomolítico asume su conformación activa al pH endosomal. La conformación "activa" es aquella conformación en la que el ligando endosomolítico promueve la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición descrita en la presente memoria, o sus componentes, desde el endosoma hasta el citoplasma de la célula. Los ligandos endosomolíticos ilustrativos incluyen el péptido GALA (Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972), el péptido EALA (Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586) y sus derivados (Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56-68). En ciertas realizaciones, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (p.ej., un aminoácido) que experimentará un cambio en la carga o protonación en respuesta a un cambio en el pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado. Las secuencias primarias ilustrativas de ligandos endosomolíticos basados en péptidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Lista de péptidos con actividad endosomolítica.

Nombre	Secuencia (N a C)	Ref.
GALA	AALEALAEALEALAEALAEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALAEALAAGGSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K	4
	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG	
<i>n, norleucina</i>		

20 Referencias

1. Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972.
2. Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586
3. Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. Biochim. Biophys. Acta 1559, 56-68.
4. Plank, C. Oberhauser, B. Mechtler, K. Koch, C. Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems, J. Biol. Chem. 269 12918-12924.
5. Mastrobattista, E., Koning, G. A. et al. (2002). Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. J Biol. Chem. 277, 27135-43.
6. Oberhauser, B., Plank, C. et al. (1995). Enhancing endosomal exit of nucleic acids using pH-sensitive viral fusion peptides. Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther. 247-66.

35 Los ligandos preferidos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad y también pueden mejorar la resistencia a nucleasa del oligorribonucleótido natural o modificado resultante, o una molécula polimérica que comprende cualquier combinación de monómeros descritos en la presente memoria y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

40 Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, p.ej., para potenciar la captación; compuestos de diagnóstico o grupos informadores, p.ej., para controlar la distribución; agentes de entrecruzamiento; y radicales que confieren resistencia a nucleasas. Los ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares,

proteínas, péptidos, poliaminas y miméticos de péptidos.

Los ligandos pueden incluir una sustancia natural, tal como una proteína (p.ej., albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) o globulina); un carbohidrato (p.ej., un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, p.ej., un poliaminoácido sintético, un oligonucleótido (p.ej., un aptámero). Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen un poliaminoácido que es una polilisina (PLL), ácido poli-L-aspártico, ácido poli-L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Los ejemplo de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptido de poliamina, poliamina peptidomimética, dendrímero de poliamina, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o péptido alfa helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, p.ej., un agente dirigido a células o tejidos, p.ej., una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, p.ej., un anticuerpo, que se une a un tipo celular específico tal como una célula renal. Un grupo de direccionamiento puede ser una tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína A tensioactiva, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente N-acetil-gulucosamina, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, ácido fólico, vitamina B12, biotina, un péptido RGD, un mimético de péptido RGD o un aptámero. La Tabla 5 muestra algunos ejemplos de ligandos de direccionamiento y sus receptores asociados.

Tabla 5: Ligandos de direccionamiento y sus receptores asociados

<u>Celulas hepáticas</u>	<u>Ligando</u>	<u>Receptor</u>
1) Célula parenquimatosa (PC) (Hepatocitos)	Galactosa	ASGP-R (receptor de Asiologlicoproteína)
	Gal NAc (n-acetil-galactosamina)	Receptor ASPG-R Gal NAc
	Lactosa	
	Asialofetuina	ASPG-r
2) Célula endotelial sinusoidal (SEC)	Hialuronano	Receptor de Hialuronano
	Procolágeno	Receptor de procolágeno
	Moléculas negativamente cargadas	Receptores de barrido "Scavenger"
	Manosa	Receptores de manosa
	N-acetil glucosamina	Receptores de barrido "Scavenger"
	Inmunoglobulinas	Receptor Fc
	LPS	Receptor CD 14
	Insulina	Transcitosis mediada por receptor
	Transferrina	Transcitosis mediada por receptor
	Albúminas	No específico
	Productos conjugados de azúcar-albúmina	
	Manosa-6-fosfato	Receptor de manosa-6-fosfato
3) Célula de Kupffer (KC)	Manosa	Receptores de manosa
	Fucosa	Receptores de Fucosa

<u>Celulas hepáticas</u>	<u>Ligando</u>	<u>Receptor</u>
	Albúminas	No específico
	Productos conjugados de manosa-albúmina	

5 Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercalantes (p.ej., acridinas), agentes de entrecruzamiento (p.ej. psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Saffirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p.ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (p.ej. EDTA), moléculas lipófilas, p.ej., colesterol, ácido cólico, adamantano, ácido acético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3- propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litolcólico, ácido O3-(oleoil)colenico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y productos conjugados de péptidos (p.ej., péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (p.ej., PEG-10 40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radioetiquetados, enzimas, haptenos (p.ej. biotina), facilitadores de transporte/absorción (p.ej., aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (p.ej., imidazol, bisimidazol, histamina, cúmulos de imidazol, productos conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu3 + de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

15 Los ligandos pueden ser proteínas, p.ej., glicoproteínas o péptidos, p.ej., moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos p.ej., un anticuerpo, que se une a un tipo de célula especificada, tal como una célula cancerosa, una célula endotelial o una célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, 20 vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-gulucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, p.ej., un lipopolisacárido, un activador de MAP quinasa p38 o un activador de NF-κB.

25 El ligando puede ser una sustancia, p.ej., un fármaco, que puede aumentar la captación del agente de ARNi en la célula, p.ej., alterando el citoesqueleto de la célula, p.ej., alterando los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, p.ej., taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholido A, indanocina o mioservina.

30 El ligando puede aumentar la absorción del agente de ARNi en la célula activando una respuesta inflamatoria, por ejemplo. Los ligandos ilustrativos que tendrían tal efecto incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), la interleucina-1 beta o el interferón gamma.

35 En un aspecto, el ligando es una molécula lipídica o basada en lípidos. Dicha molécula lipídica o basada en lípidos se une preferiblemente a una proteína sérica, p.ej., albúmina de suero humano (HSA). Un ligando que se une a HSA permite la distribución del producto conjugado a un tejido diana, p.ej., un tejido diana no renal del organismo. Por ejemplo, el tejido objetivo puede ser el hígado, incluyendo las células parenquimatosas del hígado. Otras moléculas que se pueden unir a HSA también se pueden utilizar como ligandos. Por ejemplo, se puede utilizar neproxina o aspirina. Un ligando lipídico o basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del producto conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o transporte a una célula diana o membrana celular, y/o (c) se puede utilizar para ajustar la unión a una proteína sérica, p.ej., HSA.

40 Se puede utilizar un ligando basado en lípidos para modular, p.ej., controlar la unión del producto conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un lípidos o ligando basado en lípidos que se une a HSA con mayor fuerza tendrá menos probabilidades de dirigirse al riñón y, por lo tanto, es menos probable que sea eliminado del cuerpo. Se puede utilizar un ligando lipídico o basado en lípidos que se une a HSA con menos fuerza para dirigir el producto conjugado al riñón.

45 En una realización preferida, el ligando basado en lípidos se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente para que el producto conjugado se distribuya preferiblemente a un tejido no renal. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte como para que la unión de HSA-ligando no pueda revertirse.

50 En otra realización preferida, el ligando basado en lípidos se une a HSA débilmente o no lo hace en absoluto, de modo que el producto conjugado se distribuirá preferiblemente al riñón. También se pueden utilizar otros radicales que se dirigen a células renales en lugar o además del ligando basado en lípidos.

55 En otro aspecto, el ligando es un radical, p.ej., una vitamina, que es absorbida por una célula diana, p.ej., una célula en proliferación. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada, p.ej., del tipo maligno o no maligno, p.ej., células cancerosas. Las vitaminas ilustrativas incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas ilustrativas incluyen vitamina B, p.ej., ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerosas. También se incluyen HAS, lipoproteína de baja

densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL).

En otro aspecto, el ligando es un agente de penetración celular, preferiblemente un agente de penetración celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente ilustrativo es un péptido tal como tat o antennapedia. Si el agente es un péptido, puede modificarse, incluyendo un enlace peptidilimimético, invertómeros, uniones no peptídicas o pseudopeptídicas, y uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipófila y una lipófoba.

El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también referido en la presente memoria como oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse a una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El radical peptídico o peptidomimético puede tener aproximadamente 5-50 aminoácidos de longitud, p.ej., aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud (véase la Tabla 6, por ejemplo).

Tabla 6. Péptidos de penetración celular ilustrativos.

Péptido de penetración celular	Secuencia de aminoácidos	Referencia
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi et al., J. Biol. Chem. 269: 10444, 1994
Fragmento Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives et al., J. Biol. Chem., 272: 16010, 1997
Péptido basado en secuencia de señal	GALFLGWLGAAGSTMGAWSPKPKKR KV	Chaloin et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 243: 601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Elmquist et al., Exp. Cell Res., 269: 237, 2001
Transportano	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga et al., FASEB J., 12:67, 1998
Péptido modelo anfífilo	KLALKLALKALKAAKLA	Oehlke et al., Mol. Ther., 2: 339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell et al., J. Pept. Res., 56: 318, 2000
Penetración de la pared celular bacteriana	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFL RNLVPRTE	
Cecropina P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQG GPR	
α-defensina	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQRLWA FCC	
b-defensina	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTC YRGKAKCCK	
Bactenecina	RKCRIVVIRVCR	

Péptido de penetración celular	Secuencia de aminoácidos	Referencia
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFPFPPRLPPRIPPGF PPRFPPRFPGKR-NH ₂	
Indolicidina	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	

Un péptido o peptidomimético puede ser, p.ej., un péptido de penetración celular, un péptido catiónico, un péptido anfipático o un péptido hidrófobo (p.ej., que consiste principalmente en Tyr, Trp o Phe). El radical peptídico puede ser un péptido dendrímico, un péptido con impedimento estérico o un péptido entrecruzado. En otra alternativa, el radical peptídico puede incluir una secuencia hidrófoba de translocación de membrana (MTS). Un péptido hidrófobo que contiene MTS ilustrativo es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP. Un análogo de RFGF (p.ej., la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP) que contiene una MTS hidrófoba también puede ser un radical de direccionamiento. El radical peptídico puede ser un péptido de "suministro", que puede transportar moléculas polares grandes que incluyen péptidos, oligonucleótidos y proteínas a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha encontrado que las secuencias de la proteína Tat de VIH (GRKKRRQRRRPPQ) y la proteína Antennapedia de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK) son capaces de funcionar como péptidos de suministro. Un péptido o peptidomimético puede codificarse mediante una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de presentación en fagos, o una biblioteca combinatoria de una esfera-un compuesto ("one-bead-one-compound" OBOC) (Lam et al., *Nature*, 354:82-84, 1991). Preferiblemente, el péptido o peptidomimético fijado a un agente de ARNi a través de una unidad monomérica incorporada es un péptido dirigido a células tal como un péptido de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), o mimético de RGD. La longitud de un radical peptídico puede variar de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos. Los radicales peptídicos pueden tener una modificación estructural, por ejemplo para aumentar la estabilidad o las propiedades conformacionales directas. Se puede utilizar cualquiera de las modificaciones estructurales que se describen a continuación.

Se puede utilizar un radical peptídico RGD para dirigirse a una célula tumoral, tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann et al., *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento de un agente de ARNi a tumores de una variedad de otros tejidos, incluyendo el pulmón, el riñón, el bazo o el hígado (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Preferiblemente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente de ARNi al riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico, y se puede modificar, p.ej., glicosilar o metilar para facilitar el direccionamiento a tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glicosilado puede suministrar un agente de ARNi a una célula tumoral que expresa $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001).

Se pueden utilizar péptidos que se dirigen a marcadores enriquecidos en células en proliferación. p.ej., los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD pueden dirigirse a células cancerosas, en particular a células que exhiben una integrina $\alpha_v\beta_3$. Por lo tanto, se podrían utilizar péptidos RGD, péptidos cíclicos que contienen RGD, péptidos RGD que incluyen D-aminoácidos, así como miméticos de RGD sintéticos. Además de RGD, se pueden utilizar otros radicales que se dirigen al ligando de integrina $\alpha_v\beta_3$. En general, tales ligandos se pueden utilizar para controlar las células en proliferación y la angiogénesis. Los productos conjugados preferidos de este tipo de ligandos que se dirigen a PECAM-1, VEGF u otro gen canceroso, p.ej., un gen canceroso descrito en la presente memoria.

Un "péptido de penetración celular" es capaz de atravesar una célula, p.ej., una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido que permeabiliza las células microbianas puede ser, p.ej., un péptido lineal α -helicoidal (p.ej., LL-37 o Cecropin PI), un péptido que contiene un enlace disulfuro (p.ej., α -defensina, β -defensina o bactenecina), o un péptido que contiene solo uno o dos aminoácidos dominantes (p.ej., PR-39 o indolicidina). Un péptido de penetración celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de penetración celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que deriva del dominio peptídico de fusión de HIV-1 gp41 y la NLS del antígeno T grande de SV40 (Simeoni et al., *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

En una realización, un péptido diana unido a un agente de ARNi y/o el oligómero transportador puede ser un péptido anfipático α -helicoidal. Los péptidos α -helicoidales anfipáticos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, cecropinas, licotoxinas, paraxinas, buforina, CPF, péptido similar a bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos de *S. clava*, péptidos antimicrobianos intestinales de pez payaso (HFIAP), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H₂A, péptidos de *Xenopus*, esculentinis-1 y caerinas. Preferiblemente se considerarán varios factores para mantener la integridad de la estabilidad de la hélice. Por ejemplo, se utilizará un número máximo de residuos de estabilización de hélice (p.ej., leu, ala o lys), y se utilizarán un número mínimo de

residuos de desestabilización de la hélice (p.ej., prolina o unidades monoméricas cíclicas. Se considerará el residuo de protección (p.ej., Gly es un residuo de protección terminal de N ilustrativo y/o se puede utilizar amidación C-terminal para proporcionar un enlace H adicional para estabilizar la hélice. La formación de puentes de sal entre residuos con cargas opuestas, separados por $i \pm 3$, o $i \pm 4$ posiciones puede proporcionar estabilidad. Por ejemplo, residuos catiónicos tales como lisina, arginina, homoarginina, ornitina o histidina pueden formar puentes salinos con los residuos aniónicos de glutamato o aspartato.

Los ligandos peptídicos y peptidomiméticos incluyen aquellos que tienen péptidos naturales o modificados, p.ej., péptidos D o L; péptidos α , β o γ ; N-metilpéptidos; azapéptidos; péptidos que tienen uno o más enlaces amida, es decir, peptídico, reemplazados por uno o más enlaces urea, tiourea, carbamato o sulfonilurea; o péptidos cíclicos.

El ligando de direccionamiento puede ser cualquier ligando que sea capaz de dirigirse a un receptor específico. Los ejemplos son: folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, cúmulos de azúcares tales como el cúmulo GalNAc, cúmulo de manosa, cúmulo de galactosa o un aptamero. Un grupo es una combinación de dos o más unidades azúcar. Los ligandos de direccionamiento también incluyen ligandos de receptores de integrina, ligandos de receptores de quimiocinas, transferrina, biotina, ligandos de receptores de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligandos de LDL y HDL. Los ligandos también pueden estar basados en ácido nucleico, p.ej., un aptámero. El aptámero puede no estar modificado o tener cualquier combinación de modificaciones descritas en la presente memoria.

Los agentes de liberación endosomal incluyen imidazoles, poli u oligoimidazoles, PEI, péptidos, péptidos fusogénicos, policarboxilatos, policationes, oligo- o policationes o aniones enmascarados, acetales, poliacetales, cetales/policetales, ortoésteres, polímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas, dendrímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas.

El modulador PK significa modulador farmacocinético. El modulador PK incluye compuestos lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas, etc. El modulador de PK ilustrativo incluye, pero no se limita a, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. También se sabe que los oligonucleótidos que comprenden una serie de enlaces fosforotioato se unen a la proteína sérica, por lo tanto, también son susceptibles de ser ligandos (p.ej., como ligandos moduladores de PK) oligonucleótidos cortos, por ejemplo oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples enlaces de fosforotioato en la cadena principal.

Además, los aptámeros que se unen a los componentes del suero (p.ej., proteínas séricas) también son susceptibles como ligandos moduladores PK.

Otros ligandos susceptibles de ser incluidos en la presente memoria descriptiva se describen en las solicitudes co-pendientes USSN: 10/916.185, presentada el 10 de agosto de 2004; USSN: 10/946.873, presentada el 21 de septiembre de 2004; USSN: 10/833.934, presentada el 3 de agosto de 2007; USSN: 11/115.989 presentada el 27 de abril de 2005 y USSN: 11/944.227 presentada el 21 de noviembre de 2007.

Cuando están presentes dos o más ligandos, los ligandos pueden tener todas las mismas propiedades, tener todos diferentes propiedades o algunos ligandos tener las mismas propiedades mientras que otros tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades de direccionamiento, tener actividad endosomolítica o tener propiedades moduladoras PK. En una realización preferida, todos los ligandos tienen propiedades diferentes.

Los ligandos se pueden acoplar a los oligonucleótidos en diversos lugares, p.ej., el extremo 3', el extremo 5' y/o en una posición interna. En realizaciones preferidas, el ligando se une a los oligonucleótidos a través de una fijación intermedia. El ligando o ligando fijado puede estar presente en un monómero cuando dicho monómero se incorpora a la hebra en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando se puede incorporar mediante acoplamiento a un monómero "precursor" después de que dicho monómero "precursor" se haya incorporado a la cadena en crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tiene, p.ej., una fijación con terminación amino (es decir, que no tiene ligando asociado), p.ej., TAP-(CH₂)_nNH₂ puede incorporarse a una hebra efectora o antisentido en crecimiento. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor a la cadena, un ligando que tiene un grupo electrofílico, p.ej., un éster pentafluorofenílico o un grupo aldehído, puede unirse posteriormente al monómero precursor mediante el acoplamiento del grupo electrofílico del ligando con el grupo nucleófilo terminal de la fijación del monómero precursor.

Para los oligonucleótidos bicatenarios, los ligandos se pueden unir a una o a ambas hebras. En algunas realizaciones, un agente de ARNi bicatenario contiene un ligando conjugado con la hebra efectora. En otras realizaciones, un agente de ARNi bicatenario contiene un ligando conjugado con la hebra antisentido.

En algunas realizaciones, el ligando se puede conjugar con nucleobases, radicales azúcar o enlaces internucleosídicos de moléculas de ácido nucleico. La conjugación con nucleobases de purina o sus derivados se

puede producir en cualquier posición, incluyendo los átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 6, 7 u 8 de una nucleobase de purina están ancladas a un radical conjugado. La conjugación a nucleobases de pirimidina o sus derivados también se puede producir en cualquier posición. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 5 y 6 de una nucleobase de pirimidina pueden sustituirse con un radical conjugado.

5 La conjugación a radicales azúcar de nucleósidos puede ocurrir en cualquier átomo de carbono. Los ejemplos de átomos de carbono de un radical azúcar que pueden unirse a un radical conjugado incluyen los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1' también se puede unir a un radical conjugado, tal como en un radical alcalino. Los enlaces internucleosídicos también pueden tener radicales conjugados. Para enlaces que contienen fósforo (p.ej., fosfodiéster, fosforotioato, fosforodiotinato, fosforoamidato y similares), el radical conjugado se puede anclar

10 directamente al átomo de fósforo o a un átomo de O, N o S unido al átomo de fósforo. Para enlaces internucleosídicos que contienen amina o amida (p.ej., PNA), el resto conjugado se puede anclar al átomo de nitrógeno de la amina o amida o a un átomo de carbono adyacente.

Existen numerosos métodos para preparar conjugados de compuestos oligoméricos. Generalmente, un compuesto oligomérico se une a un radical conjugado poniendo en contacto un grupo reactivo (p.ej., OH, SH, amina, carboxilo, aldehído y similares) en el compuesto oligomérico con un grupo reactivo en el radical conjugado. En algunas realizaciones, un grupo reactivo es electrofílico y el otro es nucleofílico.

Por ejemplo, un grupo electrofílico puede ser una funcionalidad que contiene carbonilo y un grupo nucleofílico puede ser una amina o tiol. Los métodos para la conjugación de ácidos nucleicos y compuestos oligoméricos relacionados con y sin grupos conectores están bien descritos en la bibliografía tal como, p.ej., en Manoharan in Antisense Research and Applications, Crooke and LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Capítulo 17.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que ilustran la preparación de productos conjugados de oligonucleótidos incluyen, entre otras, las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717.5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.149.782; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241.5.391.723; 5.416.203.5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.672.662; 5.688.941; 5.714.166; 6.153.737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395.437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031; 6.528.631; 6.559.279.

Característica de las partículas de ácido nucleico-lípido

En ciertas realizaciones, se describen en la presente memoria métodos y composiciones para producir partículas de ácido nucleico encapsuladas en lípidos en las que los ácidos nucleicos están encapsulados dentro de una capa lipídica. Tales partículas de ácido nucleico-lípido, que incorporan oligonucleótidos de ARNip, se caracterizan utilizando una variedad de parámetros biofísicos que incluyen: (1) razón de fármaco a lípido; (2) eficacia de encapsulación; y (3) tamaño de partícula. Son deseables altas razones de fármaco a lípido, alta eficacia de encapsulación, buena resistencia a la nucleasa y estabilidad en suero y tamaño de partícula controlable, generalmente menos de 200 nm de diámetro. Además, la naturaleza del polímero de ácido nucleico es significativa, ya que la modificación de los ácidos nucleicos en un esfuerzo por conferir resistencia a las nucleasas aumenta el coste de los agentes terapéuticos mientras que en muchos casos proporciona solo una resistencia limitada. A menos que se indique lo contrario, estos criterios se calculan en esta memoria descriptiva de la siguiente manera:

La razón de ácido nucleico a lípido es la cantidad de ácido nucleico en un volumen definido de preparación dividida por la cantidad de lípido en el mismo volumen. Esto puede ser en mol por mol o en peso por peso, o en peso por mol. Para las formulaciones finales listas para su administración, la razón de ácido nucleico:lípido se calcula después de haber empleado diálisis, cromatografía y/o digestión con enzima (p.ej., nucleasa) para eliminar tanto ácido nucleico externo como sea posible;

La eficacia de encapsulación se refiere a la razón de fármaco a lípido de la mezcla de partida dividida por la razón de fármaco a lípido de la formulación final competente de administración. Esta es una medida de eficiencia relativa. Para una medida de eficacia absoluta, también se puede calcular la cantidad total de ácido nucleico añadida a la mezcla de partida que termina en la formulación competente de administración. También se puede calcular la cantidad de lípidos perdida durante el procedimiento de formulación. La eficacia es una medida del desperdicio y el gasto de la formulación; y

El tamaño indica el tamaño (diámetro) de las partículas formadas. La distribución del tamaño se puede determinar utilizando dispersión de luz cuasi-elástica (QELS) en un clasificador de partículas submicrométricas Nicomp Modelo 370. Se prefieren partículas por debajo de 200 nm para su distribución a tejidos neovascularizados (con fugas), tales como neoplasmas y sitios de inflamación.

Composiciones farmacéuticas

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, particularmente cuando están asociadas con un agente

terapéutico, pueden formularse como una composición farmacéutica, p.ej., que comprende adicionalmente un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica o tampón de fosfato, seleccionado de acuerdo con la vía de administración y práctica farmacéutica convencional.

5 En realizaciones concretas, las composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas de lípido-ácido nucleico descritas en la presente memoria se preparan de acuerdo con técnicas convencionales y adicionalmente comprenden un portador farmacéuticamente aceptable. En general, se empleará solución salina normal como portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados incluyen, p.ej., agua, agua tamponada, solución salina al 0,9%, glicina al 0,3% y similares, incluyendo glicoproteínas para una mejor estabilidad, tales como
10 albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En composiciones que comprenden solución salina u otros portadores que contienen sal, el portador se añade preferiblemente después de la formación de las partículas lipídicas. Por lo tanto, después de que se forman las composiciones de lípido-ácido nucleico, las composiciones se pueden diluir en portadores farmacéuticamente aceptables tales como solución salina normal.

15 Las preparaciones farmacéuticas resultantes se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales y bien conocidas. Las soluciones acuosas pueden a continuación envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH,
20 agentes de ajuste de la tonicidad y similares, p.ej., acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Además, la suspensión lipídica puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra los radicales libres y los daños peroxidativos de los lípidos durante el almacenamiento. Son adecuados los inhibidores lipófilos de radicales libres, tales como α -tocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina.

25 La concentración de partículas lipídicas o partículas lipídicas y ácidos nucleicos en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,01%, habitualmente a o al menos aproximadamente 0,05-5% hasta tanto como 10 a 30% en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser
30 particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardíaca congestiva asociada a aterosclerosis o hipertensión severa. Alternativamente, los complejos compuestos de lípidos irritantes se pueden diluir a bajas concentraciones para disminuir la inflamación en el sitio de administración. En un grupo de realizaciones, el ácido nucleico tendrá una etiqueta unida y se utilizará para el diagnóstico (indicando la presencia de ácido nucleico complementario). En este caso, la cantidad de complejos administrados dependerá de la etiqueta particular utilizada,
35 el estado de enfermedad que se diagnostica y el criterio del médico, pero generalmente estará entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.

40 Como se indicó anteriormente, el agente lipídico terapéutico (p.ej., partículas de ácido nucleico) descritas en la presente memoria pueden incluir fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida o gangliósido lípidos modificados con G_{M1} u otros lípidos eficaces para prevenir o limitar la agregación. La adición de dichos componentes no solo evita la agregación compleja. Por el contrario, también puede proporcionar un medio para aumentar el tiempo de vida en circulación y aumentar la administración de la composición de lípido-ácido nucleico a los tejidos diana.
45

También se describen en la presente memoria composiciones de agentes lipídicos terapéuticos en forma de kit. El kit típicamente estará compuesto por un contenedor que está compartimentado para contener los diversos elementos del kit. El kit contendrá las partículas o composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, preferiblemente en forma deshidratada o concentrada, con instrucciones para su rehidratación o dilución y
50 administración. En ciertas realizaciones, las partículas comprenden el agente activo, mientras que en otras realizaciones, no lo comprenden.

Métodos de fabricación

55 Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria hacen uso de ciertos lípidos catiónicos, cuya síntesis, preparación y caracterización se describe a continuación y en los Ejemplos adjuntos. Además, se describen métodos para preparar partículas lipídicas, incluidos las asociadas con un agente terapéutico, p.ej., un ácido nucleico. En los métodos descritos en la presente memoria, se combina una mezcla de lípidos con una solución acuosa tamponada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado
60 en partículas lipídicas en donde los ácidos nucleicos encapsulados están presentes a una razón de ácido nucleico/lípido de aproximadamente 3% en peso a aproximadamente 25% en peso, preferiblemente de 5 a 15% en peso. La mezcla intermedia puede dimensionarse opcionalmente para obtener partículas de ácido nucleico encapsuladas en lípidos en donde las porciones lipídicas son vesículas unilamelares, que preferiblemente tienen un diámetro de 30 a 150 nm, más preferiblemente de aproximadamente 40 a 90 nm. El pH se eleva a continuación para neutralizar al menos una parte de las cargas superficiales en las partículas de lípido-ácido nucleico, proporcionando
65

así una composición de ácido nucleico encapsulada en lípidos neutralizada superficialmente al menos parcialmente.

Como se describió anteriormente, algunos de estos lípidos catiónicos son aminolípidos que se cargan a un pH por debajo del pK_a del grupo amino y sustancialmente neutro a un pH por encima del pK_a . Estos lípidos catiónicos se denominan lípidos catiónicos titulables y se pueden utilizar en las formulaciones descritas en la presente memoria utilizando un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, las vesículas lipídicas se pueden formar a pH más bajo con lípidos catiónicos y otros componentes vesiculares titulables en presencia de ácidos nucleicos. De esta manera, las vesículas encapsularán y atraparán los ácidos nucleicos. En segundo lugar, la carga superficial de las vesículas recién formadas se puede neutralizar aumentando el pH del medio a un nivel por encima del pK_a de los lípidos catiónicos titulables presentes, es decir, a pH fisiológico o superior. Los aspectos particularmente ventajosos de este procedimiento incluyen la eliminación fácil de cualquier ácido nucleico adsorbido en la superficie y un vehículo de suministro de ácido nucleico resultante que tiene una superficie neutra. Se espera que los liposomas o partículas lipídicas que tienen una superficie neutra eviten una eliminación rápida de la circulación y eviten ciertas toxicidades que están asociadas con las preparaciones de liposomas catiónicos. Detalles adicionales sobre estos usos de tales lípidos catiónicos titulables en la formulación de partículas de ácido nucleico-lípido se proporcionan en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.287.591 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.858.225.

Se observa adicionalmente que las vesículas formadas de esta manera proporcionan formulaciones de tamaño de vesícula uniforme con alto contenido de ácidos nucleicos. Adicionalmente, las vesículas tienen un intervalo de tamaño de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 nm, más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 nm.

Sin desear estar limitados por ninguna teoría concreta, se cree que la muy alta eficacia de la encapsulación de ácidos nucleicos es el resultado de la interacción electrostática a pH bajo. A pH ácido (p.ej., pH 4,0) la superficie de la vesícula se carga y se une a una porción de los ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas. Cuando el tampón ácido externo se intercambia por un tampón más neutro (p.ej., pH 7,5) la superficie de la partícula lipídica o liposoma se neutraliza, permitiendo que se elimine cualquier ácido nucleico externo. Se proporciona información más detallada sobre el proceso de formulación en diversas publicaciones (p.ej., Patente de Estados Unidos Núm. 6.287.591 y Patente de Estados Unidos Núm. 6.858.225).

En vista de lo anterior, en la presente memoria se describen métodos para preparar formulaciones de lípidos/ácidos nucleicos. En los métodos descritos en la presente memoria, se combina una mezcla de lípidos con una solución acuosa tamponada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado en partículas lipídicas, p.ej., en la que los ácidos nucleicos encapsulados están presentes a una razón de ácido nucleico/lípido de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 20% en peso. La mezcla intermedia puede dimensionarse opcionalmente para obtener partículas de ácido nucleico encapsuladas en lípidos en donde las porciones lipídicas son vesículas unilamelares, que preferiblemente tienen un diámetro de 30 a 150 nm, más preferiblemente de aproximadamente 40 a 90 nm. El pH se eleva después para neutralizar al menos una parte de las cargas superficiales en las partículas de lípido-ácido nucleico, proporcionando así una composición de ácido nucleico encapsulada en lípidos neutralizada superficialmente al menos parcialmente.

En ciertas realizaciones, la mezcla de lípidos incluye al menos dos componentes lipídicos: un primer componente lipídico descrito en la presente memoria que se selecciona entre lípidos que tienen un pK_a tal que el lípido es catiónico a pH por debajo del pK_a y neutro a pH por encima del pK_a , y un segundo componente lipídico que se selecciona de entre lípidos que evitan la agregación de partículas durante la formación de partículas de lípido-ácido nucleico. En realizaciones concretas, el aminolípido es un nuevo lípido catiónico descrito en la presente memoria.

Al preparar las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria, la mezcla de lípidos es típicamente una solución de lípidos en un disolvente orgánico. Esta mezcla de lípidos puede a continuación secarse para formar una película delgada o liofilizarse para formar un polvo antes de hidratarse con un tampón acuoso para formar liposomas. Alternativamente, en un método preferido, la mezcla de lípidos puede solubilizarse en un alcohol miscible con agua, tal como etanol, y esta solución etanólica se puede agregar a un tampón acuoso dando como resultado la formación espontánea de liposomas. En la mayoría de las realizaciones, el alcohol se usa en la forma en que está disponible comercialmente. Por ejemplo, el etanol se puede utilizar como etanol absoluto (100%) o como etanol del 95%, siendo el resto agua. Este método se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.976.567).

En una realización ilustrativa, la mezcla de lípidos es una mezcla de lípidos catiónicos, lípidos neutros (distintos de un lípido catiónico), un esteroil (p.ej., colesterol) y un lípido modificado con PEG (p.ej., un PEG-DMG o PEG-DMA) en un disolvente alcohólico. En realizaciones preferidas, la mezcla de lípidos consiste esencialmente en un lípido catiónico, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG en alcohol, más preferiblemente etanol. En realizaciones preferidas adicionales, la primera solución consiste en la mezcla de lípidos anterior a razones molares de aproximadamente 20-70% de lípido catiónico: 5-45% de lípido neutro: 20-55% de colesterol: 0,5-15% de lípido modificado con PEG. En otras realizaciones preferidas adicionales, la primera solución consiste esencialmente en un lípido elegido de la Tabla 1, DSPC, Col. y PEG-DMG o PEG-DMA, más preferiblemente a una razón molar de

aproximadamente 20-60% de lípido catiónico: 5-25% DSPC: 25-55% de Col.: 0,5-15% de PEG-DMG o PEG-DMA. En realizaciones concretas, la razón de lípidos molares es aproximadamente 40/10/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC)/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones preferidas, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza por POPC, DPPC, DOPE o SM.

De acuerdo con la descripción, la mezcla de lípidos se combina con una solución acuosa tamponada que puede contener los ácidos nucleicos. La solución acuosa tamponada típicamente es una solución en la que el tampón tiene un pH inferior al pK_a del lípido protonable en la mezcla de lípidos. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen citrato, fosfato, acetato y MES. Un tampón particularmente preferido es el tampón de citrato. Los tampones preferidos estarán en el intervalo de 1-1000 mM del anión, dependiendo de la química del ácido nucleico que se está encapsulando, y la optimización de la concentración del tampón puede ser significativa para lograr altos niveles de carga (véanse, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 6.287.591 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.858.225). Alternativamente, puede ser útil el agua pura acidulada a pH 5-6 con cloruro, sulfato o similares. En este caso, puede ser adecuado añadir glucosa al 5% u otro soluto no iónico que equilibrará el potencial osmótico a través de la membrana de la partícula cuando las partículas se someten a diálisis para eliminar el etanol, aumentar el pH o mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable tal como solución salina normal. La cantidad de ácido nucleico en el tampón puede variar, pero típicamente será de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL.

La mezcla de lípidos y la solución acuosa tamponada de ácidos nucleicos terapéuticos se combinan para proporcionar una mezcla intermedia. La mezcla intermedia es típicamente una mezcla de partículas lipídicas que tienen ácidos nucleicos encapsulados. Además, la mezcla intermedia también puede contener una porción de ácidos nucleicos que están unidos a la superficie de las partículas lipídicas (liposomas o vesículas lipídicas) debido a la atracción iónica de los ácidos nucleicos cargados negativamente y los lípidos cargados positivamente en la superficie de la partícula lipídica (los aminolípidos u otros lípidos que forman el primer componente lipídico protonable están cargados positivamente en un tampón que tiene un pH inferior a pK_a del grupo protonable en el lípido). En un grupo de realizaciones preferidas, la mezcla de lípidos es una solución alcohólica de lípidos y los volúmenes de cada una de las soluciones se ajustan de manera que tras la combinación, el contenido de alcohol resultante sea de aproximadamente 20% en volumen a aproximadamente 45% en volumen. El método de combinar las mezclas puede incluir cualquiera de una variedad de procedimientos, que a menudo dependen de la escala de formulación producida. Por ejemplo, cuando el volumen total es de aproximadamente 10-20 mL o menos, las soluciones se pueden combinar en un tubo de ensayo y agitar juntas utilizando un mezclador vortex. Los procedimientos a gran escala se pueden llevar a cabo en el material de vidrio de escala de producción adecuada.

Opcionalmente, el agente terapéutico encapsulado en lípidos (p.ej., los complejos de ácido nucleico) que se producen combinando la mezcla lipídica y la solución acuosa tamponada de agentes terapéuticos (ácidos nucleicos) se pueden dimensionar para lograr un intervalo de tamaño deseado y una distribución relativamente estrecha de los tamaños de partículas lipídicas. Preferiblemente, las composiciones proporcionadas en la presente memoria se dimensionarán a un diámetro medio de aproximadamente 70 a aproximadamente 200 nm, más preferiblemente de aproximadamente 90 a aproximadamente 130 nm. Están disponibles varias técnicas para dimensionar liposomas a un tamaño deseado. Un método de dimensionamiento se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas mediante sonicación en baño o con sonda produce una reducción progresiva del tamaño hasta vesículas unilamelares pequeñas (SUV) de tamaño inferior a aproximadamente 0,05 micrómetros. La homogeneización es otro método que depende de la energía de cizallamiento para fragmentar los liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las vesículas multilamelares se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula puede controlarse mediante determinación del tamaño de partícula del haz láser convencional. Para ciertos métodos en la presente memoria, se utiliza extrusión para obtener un tamaño de vesícula uniforme.

La extrusión de composiciones de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica da como resultado una distribución de tamaños relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se alcanza la distribución deseada del tamaño del complejo liposómico. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de poro sucesivamente más pequeñas, para lograr una reducción gradual en el tamaño de los liposomas. En algunos casos, las composiciones de lípido-ácido nucleico que se forman se pueden utilizar sin dimensionamiento.

En realizaciones concretas, los métodos descritos en la presente memoria comprenden adicionalmente una etapa de neutralización de al menos algunas de las cargas superficiales en las porciones lipídicas de las composiciones de lípido-ácido nucleico. Al neutralizar al menos parcialmente las cargas superficiales, el ácido nucleico no encapsulado se libera de la superficie de la partícula lipídica y se puede eliminar de la composición utilizando técnicas convencionales. Preferiblemente, los ácidos nucleicos no encapsulados y adsorbidos en la superficie se eliminan de las composiciones resultantes mediante el intercambio de soluciones tampón. Por ejemplo, la sustitución de un

tampón de citrato (pH de aproximadamente 4,0, utilizado para formar las composiciones) por una solución salina tamponada con HEPES (HBS de pH aproximadamente 7,5) da como resultado la neutralización de la superficie de los liposomas y la liberación de ácido nucleico de la superficie. El ácido nucleico liberado puede a continuación eliminarse mediante cromatografía utilizando métodos convencionales, y a continuación cambiarse a un tampón con un pH por encima del pKa del lípido utilizado.

Opcionalmente las vesículas lipídicas (es decir, las partículas lipídicas) se puede formar por hidratación en un tampón acuoso y se puede dimensionar utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente antes de la adición del ácido nucleico. Como se describió anteriormente, el tampón acuoso debería tener un pH por debajo del pKa del aminolípido. A continuación se puede añadir una solución de ácidos nucleicos a estas vesículas formadas y preformadas. Para permitir la encapsulación de ácidos nucleicos en tales vesículas "preformadas", la mezcla debe contener un alcohol, tal como etanol. En el caso del etanol, éste debe estar presente a una concentración de aproximadamente 20% (p/p) a aproximadamente 45% (p/p). Además, puede ser necesario calentar la mezcla de vesículas preformadas y ácido nucleico en la mezcla acuosa de tampón-etanol a una temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 50°C, dependiendo de la composición de las vesículas lipídicas y de la naturaleza del ácido nucleico. Resultará evidente para un experto en la técnica que la optimización del procedimiento de encapsulación para lograr un nivel deseado de ácido nucleico en las vesículas lipídicas requerirá la manipulación de variables tales como la concentración y la temperatura del etanol. En los Ejemplos se proporcionan ejemplos de condiciones adecuadas para la encapsulación de ácidos nucleicos. Una vez que los ácidos nucleicos se encapsulan dentro de las vesículas preformadas, el pH externo puede aumentarse para neutralizar al menos parcialmente la carga superficial. Los ácidos nucleicos no encapsulados y adsorbidos en la superficie pueden eliminarse a continuación como se describió anteriormente.

Método de uso

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria pueden utilizarse para administrar un agente terapéutico a una célula, *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones concretas, el agente terapéutico es un ácido nucleico, que se administra a una célula utilizando una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en la presente memoria. Aunque la siguiente descripción de diversos métodos para utilizar las partículas lipídicas y las composiciones farmacéuticas relacionadas descritas en la presente memoria se ilustran mediante la descripción relacionada con partículas de ácido nucleico-lípido, se entiende que estos métodos y composiciones pueden adaptarse fácilmente para la administración de cualquier agente terapéutico para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que se beneficie de dicho tratamiento.

En ciertas realizaciones, los descritos en la presente memoria son métodos para introducir un ácido nucleico en una célula. Los ácidos nucleicos preferidos para la introducción en las células son ARNip, oligonucleótidos inmunoestimuladores, plásmidos, meléculas antisentido y ribozimas. Estos métodos pueden llevarse a cabo poniendo en contacto las partículas o composiciones descritas en la presente memoria con las células durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la administración intracelular.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden adsorberse en casi cualquier tipo de célula. Una vez adsorbidas, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden ser endocitadas por una porción de las células, intercambiando lípidos con membranas celulares o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la porción de ácido nucleico del complejo puede tener lugar a través de cualquiera de estas rutas. Sin pretender limitarse, se cree que, en el caso de partículas captadas por endocitosis en la célula, las partículas interactúan con la membrana endosomal, lo que provoca la desestabilización de la membrana endosomal, posiblemente por la formación de fases no bicapa, lo que da como resultado la introducción del ácido nucleico encapsulado en el citoplasma de la célula. De manera similar, en el caso de fusión directa de las partículas con la membrana plasmática celular, cuando tiene lugar la fusión, la membrana del liposoma se integra en la membrana celular y el contenido del liposoma se combina con el fluido intracelular. El contacto entre las células y las composiciones de lípido-ácido nucleico, cuando se lleva a cabo *in vitro*, tendrá lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de composiciones puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación concreta, pero generalmente está entre aproximadamente 1 μmol y aproximadamente 10 mmoles. En ciertas realizaciones, el tratamiento de las células con las composiciones de lípido-ácido nucleico generalmente se llevará a cabo a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37°C) durante períodos de tiempo de aproximadamente 1 a 24 horas, preferiblemente de aproximadamente 2 a 8 horas. Para aplicaciones *in vitro*, el suministro de ácidos nucleicos puede ser a cualquier célula desarrollada en cultivo, ya sea de origen vegetal o animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas, las células serán células animales, más preferiblemente células de mamífero, y lo más preferiblemente células humanas.

En un grupo de realizaciones, se añade una suspensión de partículas de ácido lipídico-nucleico a 60-80% de células cultivadas en placa confluentes que tienen una densidad celular de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/mL, más preferiblemente aproximadamente 2×10^4 células/mL. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 20 $\mu\text{g/mL}$, más preferiblemente aproximadamente 1 $\mu\text{g/mL}$.

En otra realización, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria pueden utilizarse para administrar un ácido nucleico a una célula o línea celular (p.ej., una línea celular tumoral). Los ejemplos no limitantes de tales líneas celulares incluyen: HELA (ATCC Núm. Cat.: CCL-2), KB (ATCC Núm. Cat.: CCL-17), HEP3B (ATCC Núm. Cat.: HB-8064), SKOV-3 (ATCC Núm. Cat.: HTB-77), HCT-116 (ATCC Núm. Cat.: CCL-247), HT-29 (ATCC Núm. Cat.: HTB-38), PC-3 (ATCC Núm. Cat.: CRL-1435), A549 (ATCC Núm. Cat.: CCL-185), MDA-MB-231 (ATCC Núm. Cat.: HTB-26).

Las aplicaciones típicas incluyen el uso de procedimientos bien conocidos para proporcionar la administración intracelular de ARNip para destruir o silenciar dianas celulares específicas. Alternativamente, las aplicaciones incluyen la administración de secuencias de ADN o ARNm que codifican polipéptidos terapéuticamente útiles. De esta manera, se proporciona terapia para enfermedades genéticas suministrando productos genéticos deficientes o ausentes (es decir, para la distrofia de Duchenne, véase Kunkel, et al., Brit. Medicina. Toro. 45(3):630-643 (1989)), y para la fibrosis quística, véase Goodfellow, Nature 341:102-103 (1989)). Otros usos para las composiciones descritas en la presente memoria incluyen la introducción de oligonucleótidos antisentido en células (véase, Bennett, et al., Mol. Pharm. 41:1023-1033 (1992)).

Alternativamente, las composiciones descritas en la presente memoria también pueden utilizarse para el suministro de ácidos nucleicos a células *in vivo*, utilizando métodos que son conocidos por los expertos en la técnica. Con respecto al suministro de secuencias de ADN o ARNm, Zhu, et al., Science 261: 209 - 211 (1993), describen la administración intravenosa del plásmido de expresión de citomegalovirus (CMV)-cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) utilizando complejos DOTMA-DOPE. Hyde, et al., Nature 362:250-256 (1993), describen la administración del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) al epitelio de las vías respiratorias y a los alvéolos en el pulmón de ratones, utilizando liposomas. Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278-281 (1989), describen la transfección *in vivo* de pulmones de ratones con un gen procariótico funcional que codifica la enzima intracelular, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente memoria pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Para la administración *in vivo*, las composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente por vía parenteral, es decir, intraarticularmente, intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente o intramuscularmente. En realizaciones concretas, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en embolada. Para un ejemplo, véase Stadler, et al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.286.634. La administración de ácido nucleico intracelular también ha sido comentada por Straubinger, et al., en METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, Nueva York. 101:512-527 (1983); Mannino, et al., Biotechniques 6:682-690 (1988); Nicolau, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6:239-271 (1989), y Behr, Acc. Chem. Res. 26:274-278 (1993). Todavía métodos de administración adicionales de terapias basadas en lípidos son descritos, p.ej., por Rahman et al., en la Patente de Estados Unidos Núm. 3.993.754; Sears, Patente de Estados Unidos Núm. 4.145.410; Papahadjopoulos et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.235.871; Schneider, Patente de Estados Unidos Núm. 4.224.179; Lenk et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.522.803; y Fountain et al., Patente de Estados Unidos Núm. 4.588.578.

En otros métodos, las preparaciones farmacéuticas pueden ponerse en contacto con el tejido diana mediante la aplicación directa de la preparación al tejido. La aplicación puede realizarse por procedimientos tópicos, "abiertos" o "cerrados". Por "tópico" se entiende la aplicación directa de la preparación farmacéutica a un tejido expuesto al entorno, tal como la piel, la orofaringe, el canal auditivo externo y similares. Los procedimientos "abiertos" son aquellos procedimientos que incluyen incisión en la piel de un paciente y visualización directa del tejido subyacente al que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Esto generalmente se logra mediante un procedimiento quirúrgico, tal como una toracotomía para acceder a los pulmones, laparotomía abdominal para acceder a las vísceras abdominales u otro abordaje quirúrgico directo del tejido diana. Los procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos diana internos no se visualizan directamente, pero se accede a ellos mediante la inserción de aparatos a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden administrarse al peritoneo mediante lavado con aguja. Asimismo, las preparaciones farmacéuticas se pueden administrar a las meninges o a la médula espinal mediante infusión durante una punción lumbar seguida de un posicionamiento apropiado del paciente como se practica comúnmente para la anestesia raquídea o la obtención de imágenes con metrazamida de la médula espinal. Alternativamente, las preparaciones pueden administrarse a través de dispositivos endoscópicos.

Las composiciones de lípido-ácido nucleico también se pueden administrar en un aerosol inhalado a los pulmones (véase, Brigham, et al., Am. J. Sci. 298 (4):278-281 (1989)) o mediante inyección directa en el sitio de la enfermedad (Culver, Human Gene Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Editores, Nueva York. pág. 70-71 (1994)).

Los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a la práctica en una variedad de anfitriones. Los anfitriones preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ganado, caballos, ovejas y similares.

Las dosificaciones para las partículas de lípido-agente terapéutico descritas en la presente memoria dependerán de la razón de agente terapéutico a lípido y la opinión del médico que lo administre en función de la edad, el peso y el estado del paciente.

5 En una realización, se describe en la presente memoria un método para modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Estos métodos generalmente comprenden poner en contacto una célula con una partícula lipídica descrita en la presente memoria que está asociada con un ácido nucleico capaz de modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Según se utiliza en la presente memoria, el término "modulación" se refiere a la alteración de la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. En diferentes realizaciones, la modulación puede significar aumentar o potenciar, o puede significar disminuir o reducir. Los métodos para medir el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana son conocidos y están disponibles en la técnica e incluyen, p.ej., métodos que emplean la reacción en cadena de la polimerasa mediante transcripción inversa (RT-PCR) y técnicas inmunohistoquímicas. En realizaciones concretas, el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana se aumenta o reduce en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más de 50% en comparación con un valor de control apropiado.

Por ejemplo, si se desea un aumento expresión de un polipéptido, el ácido nucleico puede ser un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. Por otro lado, si se desea una reducción de la expresión de un polinucleótido o polipéptido, el ácido nucleico puede ser: p.ej., un oligonucleótido antisentido, ARNip o microARN que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida específicamente con un polinucleótido que codifica el polipéptido diana, interrumpiendo de este modo la expresión del polinucleótido o polipéptido diana. Alternativamente, el ácido nucleico puede ser un plásmido que expresa dicho oligonucleótido antisentido, ARNip o microARN.

25 En una realización concreta, se describe un método para modular la expresión de un polipéptido por una célula, que comprende proporcionar a una célula una partícula lipídica que consiste en o consiste esencialmente en un lípido elegido de la Tabla 1, DSPC, Col y PEG-DMG o PEG-DMA, p.ej., a una razón molar de aproximadamente 20-60% de lípido catiónico: 5-25% de DSPC: 25-55% de Col: 0,5-15% de PEG-DMG o PEG-DMA, en donde la partícula lipídica está asociada con un ácido nucleico capaz de modular la expresión del polipéptido. En realizaciones concretas, la razón de lípidos molares es aproximadamente 40/10/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC)/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza por POPC, DPPC, DOPE o SM.

35 En realizaciones concretas, el agente terapéutico se selecciona entre un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microRNA o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNip, microRNA o RNA antisentido comprenden un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo, de manera que se reduce la expresión del polipéptido.

40 En otras realizaciones, el ácido nucleico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, de manera que aumenta la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento del mismo.

45 En realizaciones relacionadas, se describe en la presente memoria un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizados por la expresión anormalmente alta de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en donde el agente terapéutico se selecciona entre un ARNip, un microARN, oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNip, ARNm o ARN antisentido comprenden un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

55 En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula lipídica que consiste en o consiste esencialmente en un lípido elegido de la Tabla 1, DSPC, Col y PEG-DMG o PEG-DMA, p.ej., a una razón molar de aproximadamente 20-60% de lípido catiónico: 5-25% de DSPC: 25-55% de col: 0,5-15% de PEG-DMG o PEG-DMA, en donde la partícula de lípido está asociada con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones concretas, la razón de lípidos molares es aproximadamente 40/10/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC)/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza por POPC, DPPC, DOPE o SM.

60 En otra realización relacionada, se describe en la presente memoria un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizados por la expresión anormalmente baja de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o variante funcional o fragmento del mismo.

65

En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula lipídica que consiste en o consiste esencialmente en un lípido elegido de la Tabla 1, DSPC, Col y PEG-DMG o PEG-DMA, p.ej., a una razón molar de aproximadamente 20-60% de lípido catiónico: 5-25% de DSPC: 25-55% de Col: 0,5-15% de PEG-DMG o PEG-DMA, en donde la partícula lipídica está asociada con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones concretas, la razón de lípidos molares es aproximadamente 40/10/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC)/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza por POPC, DPPC, DOPE o SM.

En la presente memoria se describe adicionalmente un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto la composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en donde el agente terapéutico es un oligonucleótido inmunoestimulador. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral o de mucosas. En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula lipídica que consiste en o consiste esencialmente en un lípido elegido de la Tabla 1, DSPC, Col y PEG-DMG o PEG-DMA, p.ej., a una razón molar de aproximadamente 20-60% de lípido catiónico: 5-25% de DSPC: 25-55% de Col: 0,5-15% de PEG-DMG o PEG-DMA, en donde la partícula lipídica está asociada con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones concretas, la razón de lípidos molares es aproximadamente 40/10/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA), 35/15/40/10 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC)/Col/PEG-DMG o PEG-DMA) o 52/13/30/5 (% en moles de lípidos catiónicos/DSPC/Col/PEG-DMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza por POPC, DPPC, DOPE o SM.

En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica se proporciona al sujeto combinada con una vacuna o antígeno. Por lo tanto, en la presente memoria se describen vacunas que comprenden una partícula lipídica descrita en la presente memoria, que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador, y también está asociada con un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria. En realizaciones concretas, el antígeno es un antígeno tumoral o está asociado con un agente infeccioso, tal como p.ej., un virus, bacteria o parásito.

Una variedad de antígenos tumorales, antígenos de agentes de infección y antígenos asociados con otras enfermedades son bien conocidos en la técnica y ejemplos de estos se describen en las referencias citadas en la presente memoria. Los ejemplos de antígenos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos polipeptídicos y antígenos de ADN. Los ejemplos específicos de antígenos son antígenos de hepatitis A, hepatitis B, viruela, polio, ántrax, gripe, tifus, tétanos, sarampión, rotavirus, difteria, tos ferina, tuberculosis y rubéola. En una realización preferida, el antígeno es un antígeno recombinante de Hepatitis B. En otros aspectos, el antígeno es un antígeno recombinante de la Hepatitis A. En otro aspecto, el antígeno es un antígeno tumoral. Los ejemplos de dichos antígenos asociados a tumores son MUC-1, antígeno EBV y antígenos asociados con el linfoma de Burkitt. En un aspecto adicional, el antígeno es un antígeno recombinante de antígeno tumoral proteico relacionado con tirosinasa. Los expertos en la técnica conocerán otros antígenos adecuados para su uso en la presente invención.

Los antígenos asociados a tumores adecuados para su uso en la presente invención incluyen tanto moléculas mutadas como no mutadas que pueden ser indicativas de un único tipo de tumor, compartidas entre varios tipos de tumores, y/o expresadas o expresadas de manera anormalmente alta exclusivamente en células tumorales en comparación con células normales. Además de proteínas y glicoproteínas, también se han documentado patrones de expresión de carbohidratos, gangliósidos, glicolípidos y mucinas específicos de tumores. Los antígenos asociados a tumores ilustrativos para su uso en las vacunas de cáncer incluyen productos proteicos de oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes con mutaciones o reordenamientos únicos de células tumorales, productos de genes embrionarios reactivados, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación específicos de tejido (pero no específicos de tumores), receptores del factor de crecimiento, residuos de carbohidratos en la superficie celular, proteínas víricas extrañas y otras diversas proteínas propias.

Las realizaciones específicas de antígenos asociados a tumores incluyen, p.ej., antígenos mutados tales como los productos proteicos de los protooncogenes Ras p21, supresores tumorales p53 y oncogenes BCR-abl, así como CDK4, MUM1, Caspasa 8 y beta-catenina; antígenos expresados de manera anormalmente alta tales como galectina 4, galectina 9, anhidrasa carbónica, aldolasa A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 y KSA, antígenos oncofetales tales como alfafetoproteína (AFP), gonadotropina coriónica humana (hCG); antígenos propios tales como antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígenos de diferenciación de melanocitos tales como Mart 1/Melan A, gp100, gp75, Tirosinasa, TRP1 y TRP2; antígenos asociados a la próstata tales como PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 y PSM-P2; productos de genes embrionarios reactivados tales como MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE y otros antígenos de cáncer de testículo tales como NY-ESO1, SSSX2 y SCP1; mucinas tales como Muc-1 y Muc-2; gangliósidos tales como GM2, GD2 y GD3, glicolípidos neutros y glicoproteínas tales como Lewis (y) y globo-H; y glicoproteínas tales como Tn, antígeno de Thompson-Freidenreich (TF) y sTn. También se incluyen como antígenos asociados a tumores en la presente memoria los productos lisados de células enteras y de células tumorales, así como las porciones inmunogénicas de los mismos, así como idiotipos de inmunoglobulina expresados en proliferaciones monoclonales de linfocitos B para uso contra linfomas de células B.

Los patógenos incluyen, pero no están limitados a, agentes infecciosos, p.ej., virus, que infectan a los mamíferos, y más concretamente a seres humanos. Los ejemplos de virus infecciosos incluyen, pero no están limitados a: Retroviridae (p.ej., virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o VIH-III, y otros productos aislados, tales como HIV-LP; Picornaviridae (p.ej., virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); Calciviridae (p.ej., cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (p.ej., virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviridae (p.ej., virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (p.ej., coronavirus); Rhabdoviridae (p.ej., virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Coronaviridae (p.ej., coronavirus); Rhabdoviridae (p.ej., virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (p.ej., virus del Ébola); Paramyxoviridae (p.ej., virus parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (p.ej., virus de influenza); Bungaviridae (p.ej., Hantaanvirus, bungavirus, flebovirus y Nairovirus); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (p.ej., reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la Hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae, virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; Poxviridae (virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e Iridoviridae (p.ej., Virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (p.ej., los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1=transmitida internamente; clase 2=transmitida por vía parenteral (es decir, Hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

Además, las bacterias gram negativas y gram positivas sirven como antígenos en animales vertebrados. Tales bacterias gram positivas incluyen, pero no se limitan a especies de Pasteurella, especies de Staphylococci y especies de Streptococcus. Las bacterias Gram negativas incluyen, pero no se limitan a, Escherichia coli, especies de Pseudomonas y especies de Salmonella. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: Helicobacter pyloris, Borelia burgdorferi, Legionella pneumophilia, Mycobacteria sps (p.ej., M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. kansaii, M. gordonae), Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes (Streptococcus del Grupo A), Streptococcus agalactiae (Streptococcus del Grupo B), Streptococcus (grupo viridans), Streptococcus faecalis, Streptococcus bovis, Streptococcus (spp. anaerobios), Streptococcus pneumoniae, Campylobacter sp. patógeno, Enterococcus sp., Haemophilus influenzae, Bacillus anthracis, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium sp., Erysipelothrix rhusiopathiae, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pasturella multocida, Bacteroides sp., Fusobacterium nucleatum, Streptobacillus moniliformis, Treponema pallidum, Treponema pertenue, Leptospira, Rickettsia y Actinomyces israelii.

Los ejemplos adicionales de patógenos incluyen, pero no se limitan a, hongos infecciosos que infectan mamíferos, y más particularmente seres humanos. Los ejemplos de hongos infecciosos incluyen, pero no se limitan a: Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Chlamydia trachomatis, Candida albicans. Los ejemplos de parásitos infecciosos incluyen Plasmodium tales como Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale y Plasmodium vivax. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen Toxoplasma gondii.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria pueden utilizarse para silenciar o modular un gen diana tal como, pero sin limitarse a, FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen ErbB, gen Src., gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA (p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen de Ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen de Ciclina A, gen de Ciclina E, gen WNT-1, gen de beta-catenina, gen c-MET, gen PKC, gen NFkB, gen STAT3, gen de survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen de topoisomerasa I, gen de topoisomerasa II alfa, gen p73, gen p21 (WAF1/CIP1), gen p27 (KIP1), gen PPM1D, gen RAS, gen de caveolina I, gen MIB I, gen MTA1, gen M68, genes supresores tumorales, gen supresor tumoral p53, gen supresor tumoral pRb DN-p63, gen supresor tumoral APR1, gen supresor tumoral APC1, gen supresor tumoral BRCA1, gen supresor tumoral PTEN, gen de fusión mLL, gen de fusión BCR/ABL, gen de fusión TEL/AML1, gen de fusión SAT/FLI1, gen de fusión TLS/FUS1, gen de fusión PAX3/FKHR, gen de fusión AML1/ETO, gen de alfa v-integrina, gen del receptor Flt-1, gen de tubulina, gen del Virus del Papiloma Humano, un gen requerido para la replicación del Virus del Papiloma Humano, gen del Virus de la Inmunodeficiencia Humana, un gen requerido para la replicación del virus de inmunodeficiencia humana, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis A, gen del virus de la hepatitis B, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis B, gen del virus de la hepatitis C, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis C, gen del virus de la hepatitis D, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis D, gen del virus de la hepatitis E, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis E, gen del virus de la hepatitis F, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis F, gen del virus de la hepatitis G, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis G, gen del virus de la hepatitis H, un gen requerido para la replicación del virus de la hepatitis H, gen del virus sincitial respiratorio, un gen que se requiere para la replicación del Virus Sincitial Respiratorio, gen del Virus Herpes Simplex, un gen que se requiere para la replicación del virus Herpes Simplex, gen herpes citomegalovirus, un gen que se requiere para la replicación del herpes citomegalovirus, gen del virus herpes Epstein Barr, un gen necesario para la replicación del virus herpes Epstein Barr, gen del virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi, un

gen que se requiere para la replicación del virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi, gen del Virus JC, gen humano que se requiere para la replicación del virus JC, gen de myxovirus, un gen necesario para la replicación del gen myxovirus, gen rinovirus, gen que se requiere para la replicación de rinovirus, gen coronavirus, un gen que se requiere para la replicación de coronavirus, gen del Virus del Nilo Occidental, un gen requerido para la replicación del Virus del Nilo Occidental, gen de la Encefalitis de St. Louis, un gen requerido para la replicación de la encefalitis de St. Louis, gen del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, un gen que se requiere para la replicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, gen del virus de la encefalitis de Murray Valley, un gen que se requiere para la replicación del virus de la encefalitis de Murray Valley, gen del virus del dengue, un gen necesario para la replicación del gen del virus del dengue, gen del virus de Simio 40, un gen necesario para la replicación del virus de Simio 40, gen del virus linfotrópico de células T humanas, gen que se requiere para la replicación del virus linfotrópico de células T humanas, el gen del virus de la leucemia de Murina de Moloney, un gen requerido para la replicación del virus de la leucemia Murina de Moloney, gen del virus de la encefalomiocarditis, un gen requerido para la replicación del virus de la encefalomiocarditis, gen del virus del sarampión, un gen necesario para la replicación del virus del sarampión, gen del virus Vericella zoster, un gen necesario para la replicación del virus Vericella zoster, gen del adenovirus, un gen necesario para la replicación de adenovirus, gen del virus de la fiebre amarilla, un gen que se requiere para el amarillo replicación del virus de la fiebre, gen de poliovirus, un gen que se requiere para la replicación de poliovirus, gen de poxvirus, un gen que se requiere para la replicación de poxvirus, gen del plasmodium, un gen que se requiere para la replicación del gen de plasmodium, gen de Mycobacterium ulcerans, un gen que se requiere para la replicación de Mycobacterium ulcerans, gen de Mycobacterium tuberculosis, un gen que se requiere para la replicación de Mycobacterium tuberculosis, gen de Mycobacterium leprae, un gen que se requiere para la replicación de Mycobacterium leprae, gen de Staphylococcus aureus, un gen que se requiere para la replicación de Staphylococcus aureus, gen de Streptococcus pneumoniae, un gen que se requiere para la replicación de Streptococcus pneumoniae, gen de Streptococcus pyogenes, un gen que se requiere para la replicación de Streptococcus pyogenes, gen de Chlamydia pneumoniae, un gen que se requiere para la replicación de Chlamydia pneumoniae, gen de Mycoplasma pneumoniae, un gen que se requiere para la replicación de Mycoplasma pneumoniae, un gen de integrina, un gen de selectina, gen del sistema del complemento, gen de quimiocina, gen del receptor de quimiocina, gen GCSF, gen Gro1, gen Gro2, gen Gro3, gen PF4, gen MIG, gen de Proteína Básica Pro-Plaquetas, gen MIP-1I, gen MIP-1J, gen RANTES, gen MCP-1, gen MCP-2, gen MCP-3, gen CMBKR1, gen CMBKR2, gen CMBKR3, gen CMBKR5, gen AIF-1, gen I-309, un gen para un componente de un canal de iones, un gen para un receptor de neurotransmisores, un gen para un ligando de neurotransmisores, gen de la familia del amiloide, gen de presenilina, gen HD, gen DRPLA, gen SCA1, gen SCA2, gen MJD1, gen CACNL1A4, gen SCA7, gen SCA8, gen del alelo encontrado en las células LOH, o un gen del alelo de un gen polimórfico.

35 **DEFINICIONES**

"Alquilo" significa un hidrocarburo alifático saturado no cíclico o cíclico de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares.

"Alquenilo" significa un alquilo, como se definió anteriormente, que contiene al menos un doble enlace entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenos incluyen isómeros *cis* y *trans*. Los alquenos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetilo -2-butenilo, y similares.

"Alquinilo" significa cualquier alquilo o alquenilo, como se definió anteriormente, que adicionalmente contiene al menos un triple enlace entre carbonos adyacentes. Los alquinos lineales y ramificados representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo y similares.

El término "acilo" se refiere a grupos carbonilo sustituidos con hidrógeno, alquilo, cicloalquilo parcialmente saturado o completamente saturado, heterociclo parcialmente saturado o completamente saturado, arilo y heteroarilo. Por ejemplo, acilo incluye grupos tales como alcanilo (C1-C20) (p.ej., formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caproilo, *t*-butilacetilo, etc.), cicloalquilcarbonilo (C3-C20) (p.ej., ciclopropilcarbonilo, ciclobutilcarbonilo, ciclohexilcarbonilo, ciclohexilcarbonilo, etc.), carbonilo heterocíclico (p.ej., pirrolidinilcarbonilo, pirrolid-2-ona-5-carbonilo, piperidinilcarbonilo, piperazinilcarbonilo, tetrahidrofuranylcarbonilo, etc.), aroilo (p.ej., benzoilo) y heteroarilo (p.ej., tiofenilo-2-carbonilo, tiofenil-3-carbonilo, furanil-2-carbonilo, furanil-3-carbonilo, 1H-pirrol-2-carbonilo, 1H-pirrol-3-carbonilo, benzo[b]tiofenil-2-carbonilo, etc.).

El término "arilo" se refiere a un sistema anular hidrocarbonado aromático monocíclico, bicíclico o tricíclico, en donde cualquier átomo del anillo puede estar sustituido. Los ejemplos de radicales arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, antraceno y pirenilo.

65

- "Heterociclo" significa un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros, o de 7 a 10 miembros, bicíclico, que es saturado, insaturado o aromático y que contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriores está fusionado a un anillo de benceno. El heterociclo se puede unir a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos como los definidos a continuación. Los heterociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.
- El término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos seleccionados entre O, N o S (p.ej., átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de N, O o S si son monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, respectivamente), en donde cualquier átomo del anillo puede estar sustituido. Los grupos heteroarilo descritos en la presente memoria también pueden contener anillos fusionados que comparten un enlace carbono-carbono común. El término "alquilheterociclo" se refiere a un heteroarilo en donde al menos uno de los átomos del anillo está sustituido con alquilo, alquenilo o alquinilo
- El término "sustituido" se refiere al remplazo de uno o más radicales de hidrógeno en una estructura dada por el radical de un sustituyente específico que incluye, pero no se limita a: halo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heterociclilo, tiol, alquiltio, oxo, tioxi, ariltio, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, haloalquilo, amino, trifluorometilo, ciano, nitro, alquilamino, arilamino, alquilaminoalquilo, arilaminoalquilo, aminoalquilamino, hidroxil, alcoxialquilo, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminocarbonilalquilo, acilo, aralcoxycarbonilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfonilo, ácido fosfónico, arilo, heteroarilo, heterocíclico y alifático. Se entiende que el sustituyente puede estar sustituido adicionalmente. Los sustituyentes ilustrativos incluyen amino, alquilamino, dialquilamino y compuestos amino cíclicos.
- "Halógeno" significa flúor, cloro, bromo y yodo.
- Los términos "alquilamina" y "dialquilamina" se refieren a radicales -NH(alquilo) y -N(alquilo)₂ respectivamente.
- El término "alquilfosfato" se refiere a -O-P(Q')(Q'')-O-R, en donde Q' y Q'' son cada uno independientemente O, S, N (R)₂, alquilo o alcoxi opcionalmente sustituido; y R es alquilo, ω-aminoalquilo opcionalmente sustituido o ω-(sustituido)aminoalquilo.
- El término "alquilfosforotioato" se refiere a un alquilfosfato en el que al menos uno de Q' o Q'' es S.
- El término "alquilfosfonato" se refiere a un alquilfosfato en el que al menos uno de Q' o Q'' es alquilo.
- El término "hidroxialquilo" significa una radical -O-alquilo.
- El término "alquilheterociclo" se refiere a un alquilo en el que al menos un metileno ha sido reemplazado por un heterociclo.
- El término "ω-aminoalquilo" se refiere a radical -alquil-NH₂. Y el término "ω-(sustituido)aminoalquilo" se refiere a un ω-aminoalquilo en el que al menos uno de los H en N ha sido reemplazado por alquilo.
- El término "ω-fosfoalquilo" se refiere a -alquil-O-P(Q')(Q'')-O-R, en donde Q' y Q'' son cada uno independientemente O o S y R alquilo opcionalmente sustituido.
- El término "ω-tiofosfoalquilo" se refiere a ω-fosfoalquilo en donde al menos uno de Q' o Q'' es S.
- En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden requerir el uso de grupos protectores. La metodología del grupo protector es bien conocida por los expertos en la técnica (véanse, p.ej., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. et. al., Wiley-Interscience, Nueva York, 1999) Brevemente, los grupos protectores dentro del contexto de esta descripción son cualquier grupo que reduce o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional. Se puede agregar un grupo protector a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante ciertas reacciones y a continuación eliminarlo para revelar el grupo funcional original. En algunas realizaciones, se utiliza un "grupo protector de alcohol". Un "grupo protector de alcohol" es cualquier grupo que disminuye o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional alcohólico. Los grupos protectores se pueden agregar y eliminar utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica.
- Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden preparar mediante técnicas de síntesis orgánica

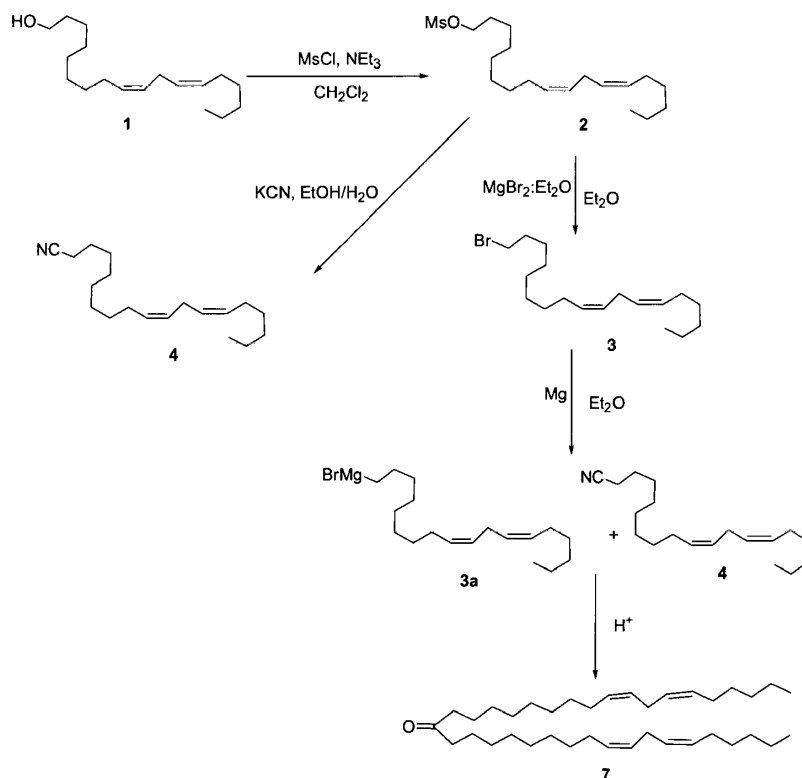
conocidas, que incluyen los métodos descritos con más detalle en los Ejemplos.

Ejemplos

5 Ejemplo 1:

Síntesis de éster octadeca-9,12-dienílico de ácido metanosulfónico 2

Esquema 1



10 A una solución del alcohol **1** (26,6 g, 100 mmoles) en diclorometano (100 mL), se le añadió trietilamina (13,13 g, 130 mmoles) y esta solución se enfrió en un baño de hielo. A esta solución fría, se le añadió gota a gota una solución de cloruro de mesilo (12,6 g, 110 mmoles) en diclorometano (60 mL) y, una vez completada la adición, se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La TLC de la mezcla de reacción mostró la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (200 mL), se lavó con agua (200 mL), NaHCO_3 sat. (200 mL), salmuera (100 mL) y se secó (NaSO_4). La capa orgánica se concentró para obtener el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice) utilizando Et_2O al 0-10% en hexanos. Las fracciones de producto puro se combinaron y se concentraron para obtener el producto puro **2** en forma de aceite incoloro (30,6 g, 89%). RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ =5,42-5,21 (m, 4H), 4,20 (t, 2H), 3,06 (s, 3H), 2,79 (t, 2H), 2,19-2,00 (m, 4H), 1,90-1,70 (m, 2H), 1,06-1,18 (m, 18H), 0,88 (t, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ =130,76, 130,54, 128,6, 128,4, 70,67, 37,9, 32,05, 30,12, 29,87, 29,85, 29,68, 29,65, 29,53, 27,72, 27,71, 26,15, 25,94, 23,09, 14,60. EM. Peso molecular calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{S}$, Calc. 344,53, Encontrado 343,52 (M-H).

Síntesis de 18-Bromo-octadeca-6,9-dieno **3**

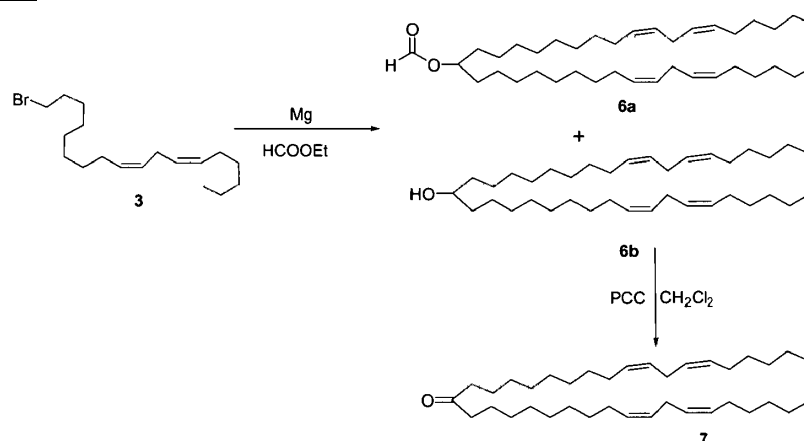
25 El mesilato **2** (13,44 g, 39 mmoles) se disolvió en éter anhidro (500 mL) y al mismo se le añadió el complejo de $\text{MgBr} \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (30,7 g, 118 mmoles) en atmósfera de argón y la mezcla se calentó a reflujo en atmósfera de argón durante 26 h, después de lo cual la TLC mostró la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con éter (200 mL) y se añadió agua helada (200 mL) a esta mezcla y las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con K_2CO_3 acuoso al 1% (100 mL), salmuera (100 mL) y se secó (Na_2SO_4). La concentración de la capa orgánica proporcionó el producto bruto que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice) utilizando Et_2O al 0-1% en hexanos para aislar el bromuro **3** (12,6 g, 94%) en forma de un aceite incoloro. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ =5,41-5,29 (m, 4H), 4,20 (d, 2H), 3,40 (t, $J=7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J=6,6$ Hz, 2H), 2,09-2,02 (m, 4H), 1,88-1,00 (m, 2H), 1,46-1,27 (m, 18H), 0,88 (t, $J=3,9$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (CDCl_3) δ =130,41, 130,25, 128,26, 128,12, 34,17, 33,05, 31,75, 29,82, 29,57, 29,54, 29,39, 28,95, 28,38, 27,42, 27,40, 25,84, 22,79, 14,28.

Síntesis de 18-Ciano-octadeca-6,9-dieno 4

5 A una solución del mesitato (3,44 g, 10 mmoles) en etanol (90 mL), se le añadió una solución de KCN (1,32 g, 20 mmoles) en agua (10 mL) y la mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos. después de lo cual, la TLC de la mezcla de reacción mostró la finalización de la reacción, después de lo cual se añadió éter (200 mL) a la mezcla de reacción seguido de la adición de agua. La mezcla de reacción se extrajo con éter y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 mL), salmuera (200 mL) y se secaron. La concentración de la capa orgánica proporcionó el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna (Et₂O al 0-10% en hexanos). El producto puro **4** se aisló en forma de un aceite incoloro (2 g, 74%). RMN H¹ (CDCl₃, 400 MHz) δ=5,33-5,22 (m, 4H), 2,70 (t, 2H), 2,27-2,23 (m, 2H), 2,00-1,95 (m, 4H), 1,61-1,54 (m, 2H), 1,39-1,20 (m, 18H), 0,82 (t, 3H). RMN C¹³ (CDCl₃) δ=130,20, 129,96, 128,08, 127,87, 119,78, 70,76, 66,02, 32,52, 29,82, 29,57, 29,33, 29,24, 29,19, 29,12, 28,73, 28,65, 27,20, 27,16, 25,62, 25,37, 22,56, 17,10, 14,06. EM. Peso molecular calculado para C₁₉H₃₃N, Calc. 275,47, Encontrado 276,6 (M=H⁺).

Síntesis de Heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ona 7

20 A un matraz 2NRB de 500 mL secado a la llama, se le añadieron virutas de Mg recién activadas (0,144 g, 6 mmoles) y el matraz se equipó con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo. Esta estructura se desgasificó, se enjuagó con argón y se añadieron 10 mL de éter anhidro al matraz mediante una jeringa. El bromuro **3** (1,65 g, 5 mmoles) se disolvió en éter anhidro (10 mL) y se añadió gota a gota mediante una jeringa al matraz. Se observó una reacción exotérmica (para confirmar/acelerar la formación del reactivo de Grignard, se añadieron 2 mg de yodo y se observó una decoloración inmediata que confirmaba la formación del reactivo de Grignard) y el éter comenzó a calentarse a reflujo. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a 35°C durante 1 hora y a continuación se enfrió en un baño de hielo. El cianuro **4** (1,38 g, 5 mmoles) se disolvió en éter anhidro (20 mL) y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción con agitación. Se observó una reacción exotérmica y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 10 mL de acetona gota a gota seguido de agua helada (60 mL). La mezcla de reacción se trató con H₂SO₄ ac. (10% en volumen, 200 mL) hasta que la solución se volvió homogénea y las capas se separaron. La fase ac. se extrajo con éter (2x100 mL). Las capas de éter combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron para obtener el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, éter al 0-10% en hexanos). Las fracciones del producto puro se evaporaron para proporcionar la cetona pura **7** en forma de un aceite incoloro (2 g, 74%). RMN H¹ (CDCl₃, 400 MHz) δ=5,33-5,21 (m, 8H), 2,69 (t, 4H), 2,30 (t, 4H), 2,05-1,95 (m, 8H), 1,55-1,45 (m, 2H), 1,35-1,15 (m, 18 H), 0,82 (t, 3 H). RMN C¹³ (CDCl₃) δ=211,90, 130,63, 130,54, 128,47, 128,41, 43,27, 33,04, 32,01, 30,93, 29,89, 29,86, 29,75, 29,74, 27,69, 26,11, 24,35, 23,06, 14,05. EM. Peso molecular calculado para C₃₇H₆₆O, Calc. 526,92, Encontrado 528,02 (M + H⁺).

Ejemplo 2. Síntesis alternativa de la cetona 7**Esquema 2****Síntesis de compuesto 6b**

45 A un matraz RB de 500 mL secado a la llama, se le añadieron virutas de Mg recién activadas (2,4 g, 100 mmoles) y el matraz se equipó con una barra de agitación magnética, un embudo de adición y un condensador de reflujo. Esta estructura se desgasificó y se purgó con argón y se añadieron 10 mL de éter anhidro al matraz mediante una jeringa. El bromuro **3** (26,5 g, 80,47 mmoles) se disolvió en éter anhidro (50 mL) y se añadió al embudo de adición. Se añadieron aproximadamente 5 mL de esta solución de éter a las virutas de Mg mientras se agitaba vigorosamente. Se observó una reacción exotérmica (para confirmar/acelerar la formación del reactivo de Grignard, se añadieron 5 mg de yodo y se observó una decoloración inmediata que confirmaba la formación del reactivo de Grignard) y el éter

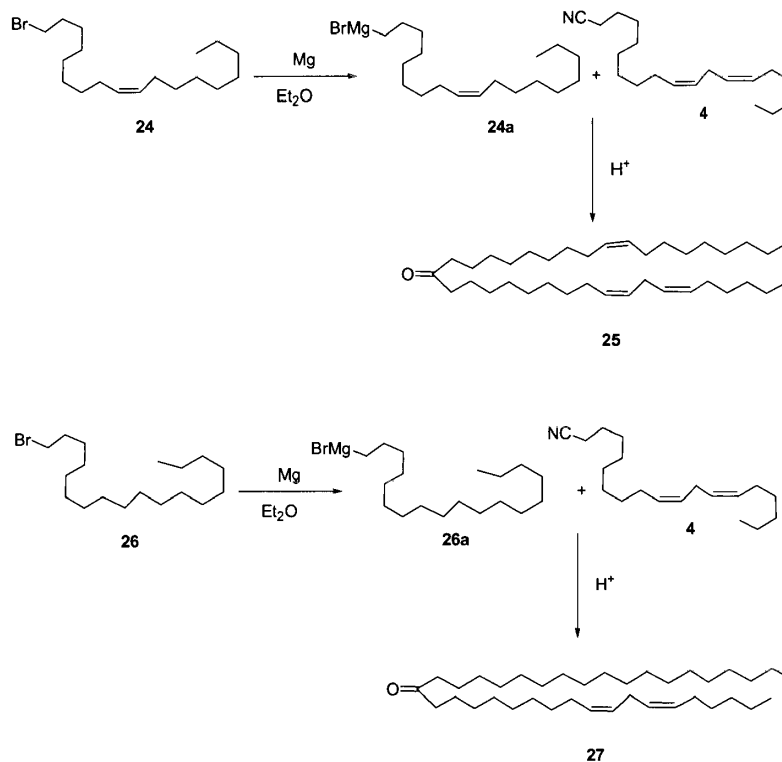
comenzó a calentarse a reflujo. El resto de la solución del bromuro se añadió gota a gota mientras se mantenía la reacción a reflujo suave enfriando el matraz en agua. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a 35°C durante 1 hora y a continuación se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió formiato de etilo (2,68 g, 36,2 mmoles) en éter anhidro (40 mL) y se transfirió al embudo de adición y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción con agitación. Se observó una reacción exotérmica y la mezcla de reacción comenzó a calentarse a reflujo. Después del inicio de la reacción, el resto de la solución etérica de formiato se añadió rápidamente como una corriente y la mezcla de reacción se agitó durante un período adicional de 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 10 mL de acetona gota a gota seguido de agua helada (60 mL). La mezcla de reacción se trató con H₂SO₄ ac. (10 % en volumen, 300 mL) hasta que la solución se volvió homogénea y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con éter (2x100 mL). Las capas de éter combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron para obtener el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, éter al 0-10% en hexanos). Las fracciones ligeramente menos polares se concentraron para obtener el formiato **6a** (1,9 g) y las fracciones del producto puro se evaporaron para proporcionar el producto puro **6b** en forma de un aceite incoloro (14,6 g, 78%).

Síntesis de compuesto 7

A una solución del alcohol **6b** (3 g, 5,68 mmoles) en CH₂Cl₂ (60 mL), se le añadieron tamices moleculares 4 A recientemente activados (50 g) y a esta solución se le añadió PCC en polvo (4,9 g, 22,7 mmoles) en porciones durante un período de 20 minutos y la mezcla se agitó adicionalmente durante 1 hora (**Nota:** la supervisión cuidadosa de la reacción es necesaria para obtener buenos rendimientos ya que los tiempos de reacción prolongados conducen a rendimientos más bajos) y la TLC de la mezcla de reacción se siguió cada 10 minutos (éter al 5% en hexanos) Después de completar la reacción, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de gel de sílice y el residuo se lavó con CH₂Cl₂ (400 mL). El producto filtrado se concentró y el producto bruto así obtenido se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice, Et₂O al 1%, en hexanos) para aislar el producto puro **7** (2,9 g, 97%) en forma de un aceite incoloro. RMN H¹ (CDCl₃, 400 MHz) δ=5,33-5,21 (m, 8H), 2,69 (t, 4H), 2,30 (t, 4H), 2,05-1,95 (m, 8H), 1,55-1,45 (m, 2H), 1,35-1,15 (m, 18 H), 0,82 (t, 3 H). RMN C¹³ (CDCl₃) δ=211,90, 130,63, 130,54, 128,47, 128,41, 43,27, 33,04, 32,01, 30,93, 29,89, 29,86, 29,75, 29,74, 27,69, 26,11, 24,35, 23,06, 14,05. EM. Peso molecular calculado para C₃₇H₆₆O, Calc. 526,92, Encontrado 528,02 (M + H⁺).

Ejemplo 3. Síntesis de cetonas asimétricas 25 y 27.

Esquema 3



35 Síntesis de heptatriaconta-6,9,28-trien-19-ona 25

A un matraz seco 2NRB de 50 mL, se le añadieron unas virutas de Mg recién activadas (132 mg, 0,0054 moles) y el

matraz se equipó con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo. Esta configuración se desgasificó y se purgó con nitrógeno y se añadieron 10 mL de éter anhidro al matraz mediante una jeringa. El bromuro **24** (1,8 g, 0,0054 moles) se disolvió en éter anhidro (10 mL) y se añadió gota a gota mediante una jeringa al matraz. Se observó una reacción exotérmica (reacción iniciada con dibromoetano) y el éter comenzó a calentarse a reflujo. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a 35°C durante 1 h y a continuación se enfrió en un baño de hielo a 10-15°C. El cianuro **4** (0,5 g, 0,0018 moles) se disolvió en THF seco (5 mL) y se añadió gota a gota a la reacción con agitación. Se observó una reacción exotérmica y la mezcla de reacción se calentó a reflujo (a 70°C) durante 12 h y se inactivó con solución de cloruro de amonio. A continuación se trató con una solución de HCl al 25% hasta que la solución se volvió homogénea y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con éter. Las capas de éter combinadas se secaron y se concentraron para obtener el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna. Las fracciones del producto puro se evaporaron para proporcionar la cetona pura **25** en forma de aceite incoloro.

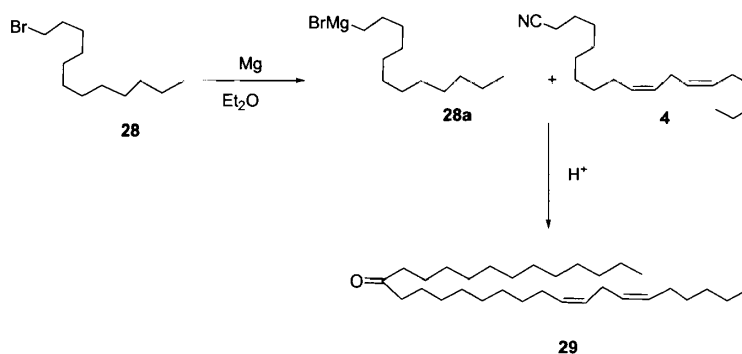
Rendimiento: 0,230 g (24%). RMN H^1 (CDCl₃, 400MHz): δ =5,37-5,30 (m, 6 H), 2,77-2,74 (t, 2 H), 2,38-2,34 (t, 4 H), 2,05-1,95 (m, 8 H), 1,56-1,52 (m, 4H), 1,35-1,25 (m, protones alifáticos), 0,89-0,85 (t, 6H). IR (cm⁻¹): 2924, 2854, 1717, 1465, 1049, 721.

Síntesis de heptatriaconta-6,9-dien-19-ona **27**

A un matraz 2NRB de 500 mL secado a la llama, se le añaden virutas de Mg recién activadas (0,144 g, 6 mmoles) y el matraz se equipa con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo. Esta configuración se desgasifica y se lava con argón y se añaden 10 mL de éter anhidro al matraz mediante una jeringa. El bromuro disponible comercialmente **26** (2,65 g, 5 mmoles) se disuelve en éter anhidro (10 mL) y se añade gota a gota mediante una jeringa al matraz. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se mantiene a 35°C durante 1 h y a continuación se enfría en un baño de hielo. El cianuro **4** (1,38 g, 5 mmoles) se disuelve en éter anhidro (20 mL) y se añade gota a gota a la mezcla de reacción con agitación. Se observa una reacción exotérmica y la mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo 10 mL de acetona gota a gota seguido de agua helada (60 mL). La mezcla de reacción se trata con H₂SO₄ ac. (10 % en volumen, 200 mL) hasta que la solución se vuelve homogénea y las capas se separan. La fase acuosa se extrae con éter (2x100 mL). Las capas de éter combinadas se secan (Na₂SO₄) y se concentran para obtener el producto bruto que se purifica mediante cromatografía en columna para proporcionar la cetona pura **27** en forma de un aceite incoloro. RMN H^1 (CDCl₃, 400MHz): δ =5,42-5,30 (m, 4H), 2,79-2,78 (t, 2H), 2,40-2,37 (t, 4H), 2,08-2,03 (m, 4H), 1,58-1,54 (m, 4H), 1,36 - 1,26 (br m, protones alifáticos), 0,91 - 0,87 (t, 6H). IR (cm⁻¹): 2924, 2854, 1716, 1465, 1375, 721.

Ejemplo 4. Síntesis de cetonas asimétricas con hebra C₁₂

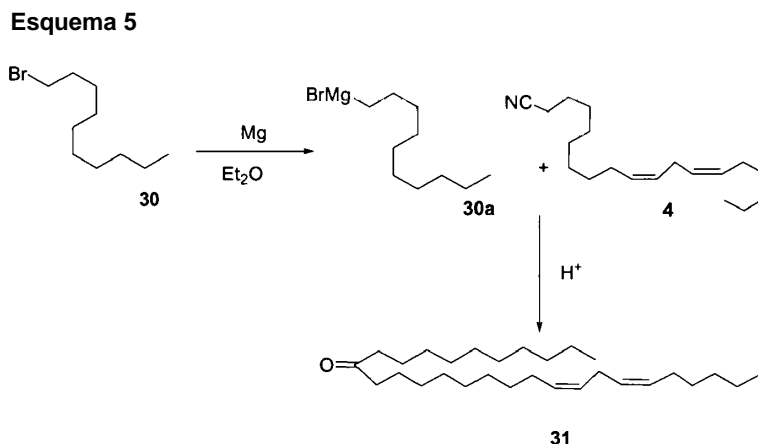
Esquema 4



A un matraz 2NRB de 50 mL seco, se le añadieron unas virutas de Mg recién activadas (175 mg, 0,0072 moles) y el matraz se equipó con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo. Esta configuración se desgasificó y se inundó con nitrógeno y se añadieron 10 mL de éter anhidro al matraz mediante una jeringa. El bromuro **28** (1,5g, 0,006 moles) se disolvió en éter anhidro (7 mL) y se añadió gota a gota mediante una jeringa al matraz. Se observó una reacción exotérmica (reacción iniciada con dibromoetano) y el éter comenzó a calentarse a reflujo. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a 35°C durante 1 h y a continuación se enfrió en un baño de hielo a 10-15°C. El cianuro **4** (1g, 0,0036 moles) se disolvió en éter anhidro (7 mL) y se añadió gota a gota a la reacción con agitación. Se observó una reacción exotérmica y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 12 h y se inactivó con solución de cloruro de amonio. A continuación se trató con una solución de HCl al 25% hasta que la solución se volvió homogénea y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con éter. Las capas de éter combinadas se secaron y se concentraron para obtener el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna. Las fracciones del producto puro se evaporaron para proporcionar la cetona pura **29** en forma de aceite incoloro. Rendimiento: 0,65 g (26%). RMN H^1 (δ ppm): 5,388-5,302 (m, 4 H), 2,77 - 2,74 (t, 2 H), 2,38 - 2,34 (t, 4 H), 2,04 - 2,01 (m, 4 H), 1,34 - 1,18 (m, 36 H), 0,89 - 0,85 (m 6 H). IR (cm⁻¹): 3009, 2920, 2851, 1711 (C=O), 1466, 1376, 1261.

Ejemplo 5. Síntesis de cetonas asimétricas con hebra C₁₀ 31

5



10 A un matraz 2NRB seco de 50 mL, se le añadieron unas virutas de Mg recién activadas (266 mg, 0,0109 moles) y el matraz se equipó con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo. Esta configuración se desgasificó y se lavó con un chorro de nitrógeno y se añadieron 10 mL de éter anhidro al matraz mediante una jeringa. El bromuro (2,43 g, 0,0109 moles) se disolvió en éter anhidro (7 mL) y se añadió gota a gota mediante una jeringa al matraz. Se observó una reacción exotérmica (reacción iniciada con dibromoetano) y el éter comenzó a calentarse a reflujo. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo a 35°C durante 1 hora y a

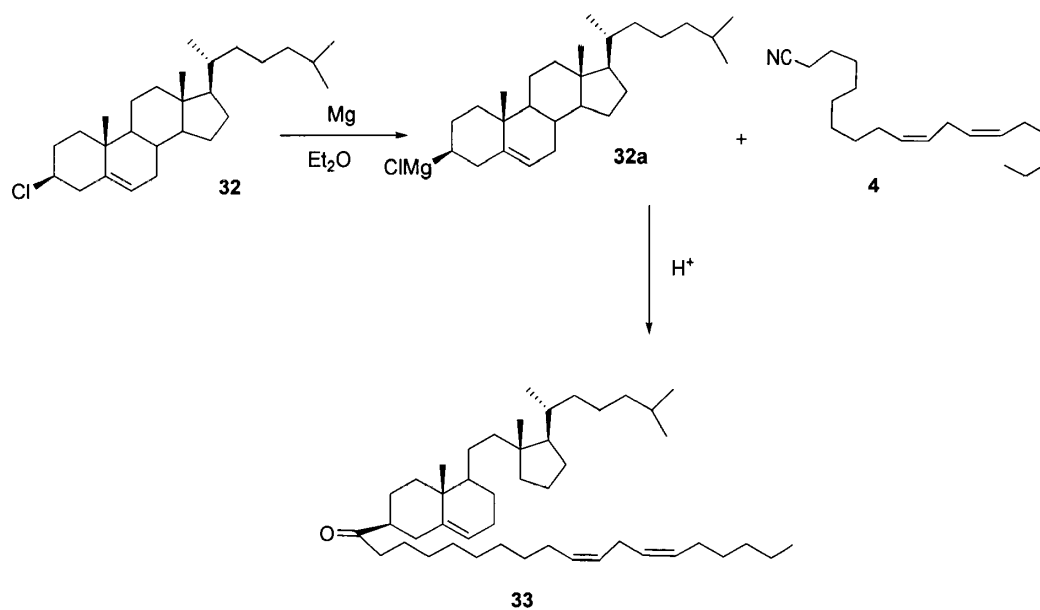
15 continuación se enfrió en un baño de hielo a 10-15°C. El cianuro (1 g, 0,0036 moles) se disolvió en éter anhidro (7 mL) y se añadió gota a gota a la reacción con agitación. Se observó una reacción exotérmica y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió THF (4 mL) a la mezcla de reacción y se calentó a 45-50°C durante 4 horas hasta que el cianoderivado se consumió por completo. La reacción se detuvo añadiendo 3 mL de acetona gota a gota seguido de agua helada. La mezcla de reacción se trató con una solución de HCl al 25% hasta que la solución se volvió homogénea y las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con éter. Las capas de éter combinadas se secaron y se concentraron para obtener el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna. Las fracciones del producto puro se evaporaron para proporcionar la cetona pura en forma de un aceite incoloro.

20 Rendimiento: 0,93 g (61%). RMN H¹ (δ ppm): 5,37-5,302 (m, 4 H), 2,77 - 2,74 (t, 2 H), 2,38 - 2,34 (t, 4 H), 2,05-2,00 (m, 4 H), 1,55 - 1,52 (m, 2H), 1,35 - 1,24 (m, 34H), 0,89 - 0,84 (m 6H). IR (cm⁻¹): 3009, 2925, 2854, 1717 (C=O), 1465, 1376.

Ejemplo 6. Síntesis de cetonas asimétricas con colesterol 33

30

Esquema 6

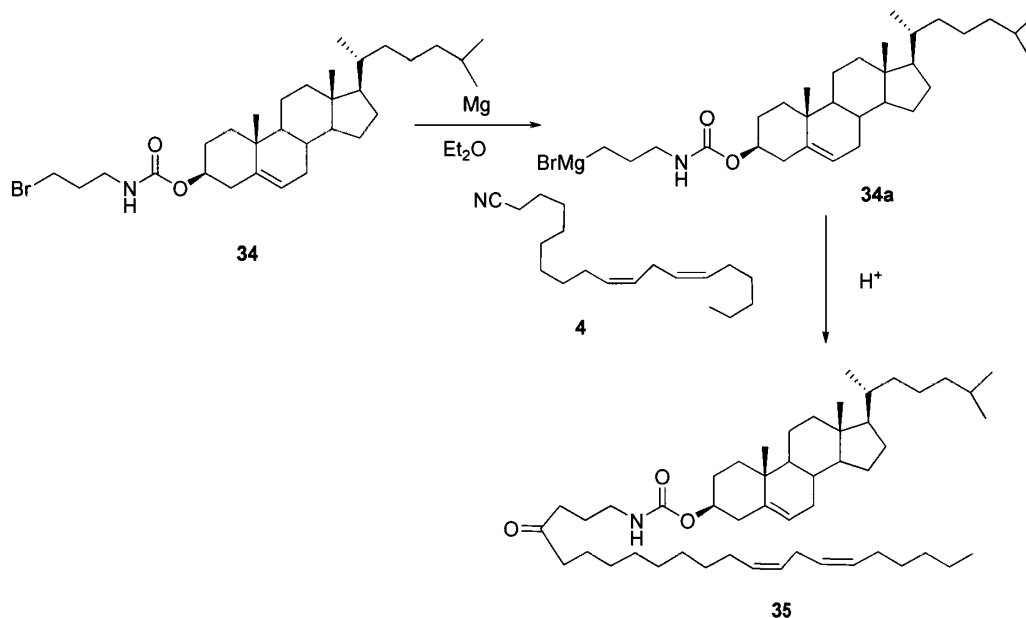


Utilizando un procedimiento similar al utilizado para la síntesis de cetona **31**, el cloruro de colesterol en la conversión al cloruro de magnesio correspondiente seguido de la adición al cianuro de linoleilo proporcionó la cetona **33**.

5

Ejemplo 7. Síntesis de cetonas asimétricas con colesterol **35**

Esquema 7

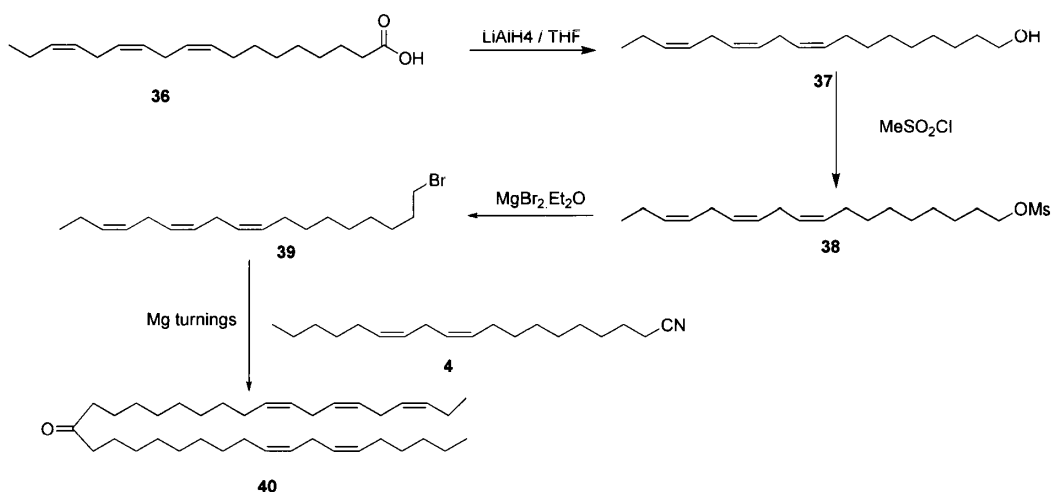


10 El tratamiento del cloroformiato de colesterol con 3-bromopropilamina proporcionó el bromuro **34** que se convirtió en el reactivo de Grignard correspondiente **34a** que durante el tratamiento con el cianuro de linoleilo proporcionó la cetona asimétrica correspondiente **35** con buen rendimiento.

Ejemplo 8. Síntesis de cetona asimétrica **40**

15

Esquema 8



Síntesis de Compuesto 37

5 A un RBF de dos cuellos de 500 mL que contenía LiAlH_4 (1,02g, 0,0269 moles) se le añadió THF anhidro (20 mL) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La suspensión se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a 0°C . A esta mezcla se le añadió una solución de compuesto 1 (5 g, 0,01798 moles) en THF anhidro (50 mL) manteniendo lentamente la temperatura en el interior a 0°C . Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla se enfrió a 0°C y se inactivó con solución sat. de Na_2SO_4 ac. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos y el sólido formado se filtró a través de un lecho de celite y se lavó con acetato de etilo (100 mL). El producto filtrado y los lavados se combinaron y se evaporaron en el evaporador rotativo para proporcionar el compuesto 37 en forma de un líquido incoloro, que se tomó como tal para la siguiente etapa sin ninguna purificación. Rendimiento: (4,5 g, 95%); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta=5,39-5,28$ (m, 6H), 3,64-3,61 (t, 2H), 2,81-2,78 (t, 4H), 2,10-2,01 (m, 4H), 1,59-1,51 (m, 2H), 1,29-1,22 (m, protones alifáticos), 0,98-0,94 (t, 3H).

Síntesis de Compuesto 38

20 El Compuesto 37 (14 g, 0,0530 moles) se disolvió en DCM (300 mL) en un RBF de dos cuellos de 500 mL y se enfrió a 0°C . A esta solución se le añadió trietilamina (29,5 mL, 0,2121 moles) lentamente en atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agitó después durante 10-15 minutos y se le añadió lentamente cloruro de mesilo (6,17 mL, 0,0795 moles). Después de completar la adición, se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 20 h. La reacción se controló mediante TLC. Al finalizar, la mezcla de reacción se diluyó con agua (200 mL) y se agitó durante algunos minutos y la capa orgánica se separó. La fase orgánica se lavó adicionalmente con salmuera (1 x 70 mL), se secó sobre Na_2SO_4 y se eliminó el solvente en el evaporador rotatorio para obtener el compuesto bruto 38 en forma de aceite marrón que se utilizó tan cual para la siguiente reacción. Rendimiento: (17 g, 93%) RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta=5,39-5,31$ (m, 6H), 4,22-4,19 (t, 2H), 2,99 (s, 3H), 2,81-2,78 (m, 4H), 2,08-2,01 (m, 4H), 1,75,1,69 (m, 2H), 1,39-1,29 (m, protones alifáticos), 0,98-0,94 (t, 3H).

Síntesis de Compuesto 39

35 El mesilato 38 (10 g, 0,2923 moles) se disolvió en (300 mL) éter anhidro en un RBF de dos cuellos de 1000 mL y se añadió complejo de $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (22,63 g, 0,0877 moles) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se calentó después a reflujo durante 26 h. Una vez completada la reacción (mediante TLC), la mezcla de reacción se diluyó con éter (300 mL) y agua helada (200 mL) y se separó la capa de éter. La capa orgánica se lavó a continuación con K_2CO_3 ac. al 1%. (100 mL) seguido de salmuera (80 mL). La fase orgánica se secó a continuación sobre Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó a vacío para proporcionar la sustancia bruta que se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (malla 60-120) utilizando acetato de etilo al 0-1% en hexano como sistema de elución para producir el compuesto deseado 39 en forma de un aceite. Rendimiento: (7g, 73%) RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta=5,39-5,31$ (m, 6H), 3,41-3,37 (t, 2H), 2,81-2,78 (m, 4H), 2,08-2,02 (m, 4H), 1,86-1,80 (m, 2H), 1,42-1,29 (m, protones alifáticos), 0,98-0,94 (t, 3H).

Síntesis de cetona asimétrica 40

45

A un RBF de dos bocas de 500 mL secado a la llama, equipado con barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se le añadieron virutas de Mg recién activadas (0,88 g, 0,03636 moles). Esta configuración se desgasificó, se enjuagó con argón y se le añadió éter (150 mL). Se añadieron al comienzo algunas gotas de compuesto de bromo **4** (11,89 g, 0,03636 moles) en 50 mL de éter para iniciar la reacción (*nota: también se añadió una cantidad catalítica de 1,2-dibromoetano para acelerar la formación del reactivo de Grignard*). Tras la iniciación, se añadió lentamente la solución restante de compuesto de bromo a la solución etérica a reflujo. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo a 40°C durante 1,5 h. A continuación se enfrió a 10°C y se añadió gota a gota el cianuro de linoleilo **4** (5 g, 0,01818 moles) en 30 mL de éter seco y la mezcla resultante se calentó después a reflujo durante 20 h a 40°C. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Después del consumo completo del cianoderivado **40** (mediante TLC), la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con 30 mL de acetona seguido de (50 mL) de agua helada. Esta solución se aciduló adicionalmente con una solución de HCl al 10% y se separó la capa de éter. La fase acuosa se extrajo adicionalmente con éter dietílico (2 x 100 mL). La eliminación del disolvente después del secado sobre Na₂SO₄ anhidro proporcionó la cetona bruta que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (malla 100-200) utilizando éter al 0-5% en hexano como sistema de elución para proporcionar el compuesto del título. **40** en forma de aceite de color amarillo pálido. Rendimiento: (4,8 g, 50,5%) RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ=5,38-5,28 (m, 10H), 2,80-2,74 (m, 6H), 2,38-2,34 (t, 4H), 2,08-2,00 (m, 8H), 1,55-1,52 (m, 4H), 1,35- 1,26 (m, protones alifáticos), 0,98-0,94 (t, 3H), 0,89-0,85 (t, 3H). HPLC - 98,04%.

Ejemplo 9. Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador AKTAoligopilot. Soporte sólido de vidrio de poro controlado disponible comercialmente (dT-CPG, 500, Prime Synthesis) y fosforamiditas de ARN con grupos protectores convencionales, 5'-O-dimetoxitritil-N6-benzoil-2'-*t*-butildimetilsilil-adenosin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-*t*-butildimetilsilil-citidin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-N2-isobutil-2'-*t*-butildimetilsilil-guanosin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, y 5'-O-dimetoxitritil-2'-*t*-butildimetilsilil-uridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita (Pierce Nucleic Acids Technologies) se utilizaron para la síntesis de oligonucleótidos. Las 2'-F fosforamiditas, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-fluro-citidin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita y 5'-O-dimetoxitritil-2'-fluro-uridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita se adquirieron en (Promega). Todas las fosforamiditas se utilizaron a una concentración 0,2 M en acetonitrilo (CH₃CN) excepto la guanosina que se utilizó a una concentración de 0,2 M en THF al 10%/ANC (v/v). Se utilizó un tiempo de acoplamiento/reciclado de 16 minutos. El activador fue 5-etiltiotetrazol (0,75 M, American International Chemicals), para la oxidación PO se utilizó Yodo/Agua/Piridina y la oxidación PS se utilizó PADS (2%) en 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v).

Las hebras conjugadas con el ligando 3' se sintetizaron utilizando un soporte sólido que contenía el ligando correspondiente. Por ejemplo, la introducción de la unidad de colesterol en la secuencia se realizó a partir de una hidroxiprolinol-colesterol fosforamidita. El colesterol se fijó a *trans*-4-hidroxiprolinol a través de una unión 6-aminohexanoato para obtener un radical hidroxiprolinol-colesterol. Se sintetizaron ARNip marcados en el extremo 5' con Cy-3 y Cy-5.5 (fluoróforo) a partir de la correspondiente fosforamidita Quasar-570 (Cy-3) adquirida de Biosearch Technologies. La conjugación de los ligandos al extremo 5' y/o a la posición interna se logra utilizando un elemento fundamental de ligando de tipo fosforamidita apropiadamente protegido. Un acoplamiento prolongado de 15 min de solución de fosforamidita 0,1 M en CH₃CN anhidro en presencia de activador de 5-(etiltilio)=1*H*-tetrazol a un sólido unió un oligonucleótido. La oxidación del fosfito internucleotídico a fosfato se llevó a cabo utilizando agua con yodo convencional como se informó (1) o mediante el tratamiento con hidroperóxido de *terc*-butilo/acetónitrilo/agua (10:87:3) con oligonucleótido conjugado con tiempo de espera de 10 minutos de oxidación. El fosforotioato se introdujo por oxidación de fosfito a fosforotioato utilizando un reactivo de transferencia de azufre tal como DDTT (adquirido de AM Chemicals), PADS y/o reactivo de Beaucage. La colesterol fosforamidita se sintetizó internamente y se utilizó a una concentración de 0,1 M en diclorometano. El tiempo de acoplamiento para la colesterol fosforamidita fue de 16 minutos.

Una vez completada la síntesis, el soporte se transfirió a una botella de vidrio de 100 mL (VWR). El oligonucleótido se escindió del soporte con desprotección simultánea de grupos alcalinos y fosfato con 80 mL de una mezcla de amoníaco etanólico [amoníaco:etanol (3:1)] durante 6,5 h a 55°C. La botella se enfrió brevemente en hielo y a continuación la mezcla de amoníaco etanólico se filtró en una nueva botella de 250 mL. El CPG se lavó con porciones de 2 x 40 mL de etanol/agua (1:1 v/v). El volumen de la mezcla se redujo a ~ 30 mL mediante un rotavapot. La mezcla se congeló a continuación en dynce y se secó a vacío en un concentrador Speed Vac.

El residuo seco se resuspendió en 26 mL de trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF) o piridina-HF y DMSO (3:4:6) y se calentó a 60°C durante 90 minutos para eliminar el grupos *terc*-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. La reacción se inactivó después con 50 mL de acetato de sodio 20 mM y se ajustó el pH a 6,5, y se almacenó en el congelador hasta la purificación.

Los oligonucleótidos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) antes de la purificación y la selección del tampón y la columna depende de la naturaleza de la secuencia y/o del ligando conjugado.

Los oligonucleótidos conjugados con ligando se purificaron mediante HPLC preparativa de fase inversa. Los oligonucleótidos no conjugados se purificaron mediante HPLC de intercambio aniónico en una columna de gel TSK empaquetada internamente. Los tampones fueron fosfato de sodio 20 mM (pH 8,5) en CH₃CN al 10% (tampón A) y fosfato de sodio 20 mM (pH 8,5) en CH₃CN al 10%, NaBr 1M (tampón B). Las fracciones que contenían oligonucleótidos completos se reunieron, se desalaron y se liofilizaron. Aproximadamente 0,15 OD de oligonucleótidos desalados se diluyeron en agua hasta 150 µl y a continuación se pipetearon en viales especiales para análisis CGE y LC/MS. Los compuestos finalmente se analizaron mediante LC-ESMS y CGE.

5

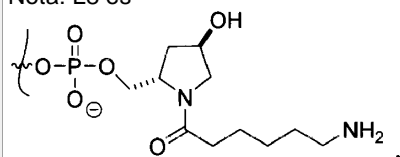
10

Para la preparación de ARNip, se calentaron cantidades equimolares de la hebra efectora y antisentido en 1xPBS a 95°C durante 5 min y se enfriaron lentamente a temperatura ambiente. La integridad del dúplex se confirmó mediante análisis de HPLC

Tabla 7. Dúplex de ARNip para la elección como diana de Luc y FVII.

Dúplex	Sentido/Antisentido	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO:	Objetivo
	1000/2434	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT U*CG AAG FUAC UCA GCG fUAA GdT*dT		Luc
	2433/1001	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTT		Luc
	2433/2434	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT U*CG AAG FUAC UCA GCG fUAA GdT*dT		Luc
	1000/1001	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTT		Luc
AD-1596		GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdT GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT		FVII
AD-1661		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT*dT		FVII

Nota: L8 es



minúscula es nucleótido modificado con 2'-O-metilo, * son las conexiones de hebra principal fosforotioato, fN es un 2'-fluoro nucleótido, dN es 2'-desoxi nucleótido.

15 Ejemplo 10: Ensayo de estabilidad en suero para ARNip

Se realizó un ensayo de rendimiento medio para la selección de estabilidad basada en la secuencia inicial mediante el enfoque de "todas las manchas". Para realizar el ensayo, se incubó un dúplex de ARNip en suero humano al 90% a 37°C. Las muestras de la mezcla de reacción se inactivaron en diversos momentos (a 0 min., 15, 30, 60, 120 y 240 min.) y se sometieron a análisis electroforético (Figura 1). La escisión del ARN a lo largo del curso temporal proporcionó información con respecto a la susceptibilidad del dúplex de ARNip a la degradación de la nucleasa sérica.

20

25

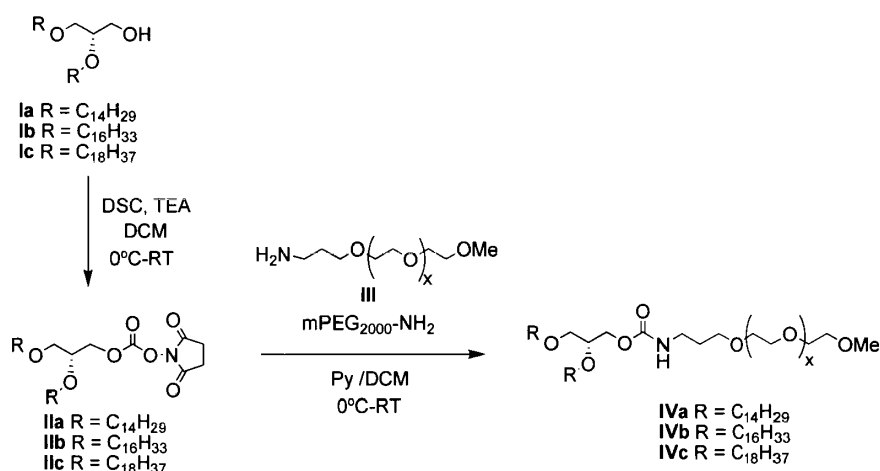
Se utilizó un ARNdh radiomarcado y un ensayo de estabilidad en suero para caracterizar adicionalmente los eventos de escisión de ARNip. En primer lugar, un dúplex de ARNip se marcó en el extremo 5' con ³²P en la hebra efectora o antisentido. El dúplex de ARNip marcado se incubó con suero humano al 90% a 37°C, y se retiró una muestra de la

solución y se sofocó en puntos temporales crecientes. Las muestras se analizaron mediante electroforesis.

Ejemplo 11: Evaluación *in vivo* de FVII utilizando los liposomas derivados de lípidos catiónicos Experimentos de silenciamiento de Factor VII y *ApoB* de roedor *in vivo*.

Ratones C57BL/6 (Charles River Labs, MA) y ratas Sprague-Dawley (Charles River Labs, MA) recibieron solución salina o ARNip en las formulaciones deseadas mediante inyección en la vena de la cola a un volumen de 0,01 mL/g. En varios puntos temporales posteriores a la administración, los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano y la sangre se recogió en tubos de separación de suero por sangrado retroorbital. Los niveles séricos de proteína del Factor VII se determinaron en las muestras utilizando un ensayo cromogénico (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, OH o Biophen FVII, Anira Corporation, OH) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se generó una curva patrón utilizando suero recogido de animales tratados con solución salina. En experimentos en los que se evaluaron los niveles de ARNm hepático, en diversos puntos temporales posteriores a la administración, los animales se sacrificaron y los hígados se recogieron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. El tejido hepático congelado se molió hasta convertirse en polvo. Se prepararon productos lisados tisulares y se determinaron los niveles de ARNm hepático de Factor VII y *apoB* utilizando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

Ejemplo 12. Preparación de 1,2-di-O-alkuil-sn3-carbamoilglicérido (PEG-DMG)



Preparación de IVa

El 1,2-di-O-tetradecil-*sn*-glicérido **Ia** (30 g, 61,80 mmoles) y carbonato de *N,N'*-succinimidilo (DSC, 23,76 g, 1,5 eq) se recogieron en diclorometano (DCM, 500 mL) y se agitaron sobre una mezcla de agua helada. Se añadió trietilamina (TEA, 25,30 mL, 3 eq) a la solución en agitación y posteriormente la mezcla de reacción se dejó agitando durante la noche a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (400 mL) y la capa orgánica se lavó con agua (2 x 500 mL), una solución acuosa de NaHCO₃ (500 mL) seguido de tratamiento convencional. El residuo obtenido se secó a temperatura ambiente a alto vacío durante la noche. Después de secar el carbonato bruto **IIa** así obtenido se disolvió en diclorometano (500 mL) y se agitó sobre un baño de hielo. A la solución en agitación se le añadieron mPEG₂₀₀₀-NH₂ (**III**, 103,00 g, 47,20 mmoles, adquirido de NOF Corporation, Japón) y piridina anhidra (Py, 80 mL, en exceso) en argón. La mezcla de reacción se dejó a continuación agitando a temperatura ambiente durante la noche. Los disolventes y compuestos volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se disolvió en DCM (200 mL) y se cargó en una columna de gel de sílice cargada en acetato de etilo. La columna se eluyó inicialmente con acetato de etilo y posteriormente con un gradiente de metanol al 5-10% en diclorometano para proporcionar el PEG-Lípido **IVa** deseado en forma de un sólido de color blanco (105,30 g, 83%). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ =5,20-5,12 (m, 1 H), 4,18-4,01 (m, 2 H), 3,80 - 3,70 (m, 2 H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,10 - 2,01 (m, 2H), 1,70 - 1,60 (m, 2H), 1,56 - 1,45 (m, 4H), 1,31 - 1,15 (m, 48H), 0,84 (t, J=6,5Hz, 6H). Intervalo de MS encontrado: 2660-2836.

Preparación de IVb

El 1,2-di-O-hexadecil-*sn*-glicérido **Ib** (1,00 g, 1,848 mmoles) y DSC (0,710 g, 1,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (20 mL) y se enfriaron a 0°C en una mezcla de agua con hielo. Se añadió trietilamina (1,00 mL, 3 eq) y la reacción se agitó durante la noche. La reacción estuvo seguida de TLC, se diluyó con DCM, se lavó con agua (2 veces), solución de NaHCO₃ y se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo resultante de **IIb** se mantuvo a alto vacío durante la noche. Este compuesto se utilizó directamente para la siguiente reacción sin purificación adicional. El MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50 g, 0,687 mmoles, adquirido de NOF

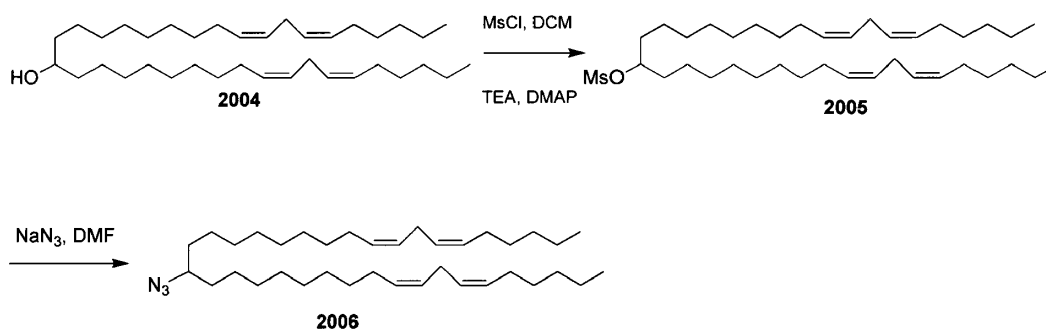
Corporation, Japón) y **IIb** (0,702 g, 1,5 eq) se disolvieron en diclorometano (20 mL) bajo argón. La reacción se enfrió a 0°C. Se añadió piridina (1 mL, exceso) y la reacción se agitó durante la noche. La reacción se controló mediante TLC. Los disolventes y compuestos volátiles se eliminaron a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía (primero acetato de etilo seguido de MeOH al 5-10%/DCM como una elución en gradiente) para obtener el compuesto requerido **IVb** en forma de un sólido de color blanco (1,46 g, 76%). RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ =5,17 (t, J=5,5 Hz, 1 H), 4,13 (dd, J=4,00 Hz, 11,00 Hz, 1 H), 4,05 (dd, J=5,00 Hz, 11,00 Hz, 1 H), 3,82- 3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,05 - 1,90 (m, 2 H), 1,80 - 1,70 (m, 2 H), 1,61 - 1,45 (m, 6 H), 1,35 - 1,17 (m, 56 H), 0,85 (t, J=6,5 Hz, 6 H). Intervalo de MS encontrado: 2716-2892.

10 Preparación de IVc

El 1,2-di-O-octadecil-*sn*-glicérido **Ic** (4,00 g, 6,70 mmoles) y DSC (2,58 g, 1,5 eq) se recogieron juntos en diclorometano (60 mL) y se enfriaron a 0°C en una mezcla de agua con hielo. Se añadió trietilamina (2,75 mL, 3 eq) y la reacción se agitó durante la noche. La reacción estuvo seguida de TLC, se diluyó con DCM, se lavó con agua (2 veces), solución de NaHCO₃, y se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se mantuvo a alto vacío durante la noche. Este compuesto se utilizó directamente para la siguiente reacción sin purificación adicional. El MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50g, 0,687 mmoles, adquirido de NOF Corporation, Japón) y **Iic** (0,760g, 1,5 eq) se disolvieron en diclorometano (20 mL) bajo argón. La reacción se enfrió a 0°C. Se añadió piridina (1 mL, exceso) y la reacción se agitó durante la noche. La reacción se controló mediante TLC. Los disolventes y los compuestos volátiles se eliminaron a vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía (acetato de etilo seguido de MeOH al 5-10%/DCM como una elución en gradiente) para obtener el compuesto deseado **IVc** en forma de un sólido de color blanco (0,92 g, 48%). RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ =5,22-5,15 (m, 1H), 4,16 (dd, J=4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,06 (dd, J=5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,81-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 1,80 - 1,70 (m, 2 H), 1,60 - 1,48 (m, 4 H), 1,31 - 1,15 (m, 64 H), 0,85 (t, J=6,5 Hz, 6 H). Intervalo de MS encontrado: 2774-2948.

25

Ejemplo 13:



30 Síntesis de **2005**: A una solución de 2004 (50 g, 95 mmoles) en DCM (400 mL) en atmósfera de Ar, se le añadieron TEA (53 mL, 378 mmoles) y DMAP (1,2 g, 9,5 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de Ar. La masa de reacción se enfrió a -5°C y se añadió lentamente la solución de cloruro de mesilo (15 mL, 190 mmoles) en DCM (100 mL) a una temperatura inferior a -5°C y se dejó que se calentara a TA después de la adición. Después de 30 minutos (TLC), la masa de reacción se sofocó con agua helada (20 mL). La capa orgánica se separó, se lavó con HCl 1N (30 mL), agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida para obtener el producto puro (55 g, 95,5%) en forma de un líquido de color amarillo. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 0,89 (t, 6H, J=6,8), 1,2-1,5 (m, 36H), 1,67 (m, 4H), 2,05 (q, 8H, J1=6,8, J2=6,8), 2,77 (t, 4H, J=6,4), 2,99 (s, 3H), 4,71 (m, 1H) y 5,36 (m, 8H).

40 Síntesis **2006**: A una solución de **2005** (50 g, 82 mmoles) en DMF (500 mL) en atmósfera de argón, se le añadió NaN₃ (27 g, 410 mmoles) y se calentó a 70°C y mantuvo la temperatura durante cuatro horas (TLC). La mezcla se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (3x250 mL). La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice utilizando hexano/éter como eluyente. El producto se eluyó con éter-hexano al 2% para obtener 2006 (36 g, 86%) en forma de un líquido de color amarillo pálido. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (t, 8H), 1,30 (m, 36H), 1,49 (t, 4H, J=6,4 Hz) 2,04 (q, 8H, J1=7,6, J2=14Hz), 2,77 (t, 4H, J=6,4 Hz), 3,22 (m, 1 H), 5,34 (m, 8 H). RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3): δ 14,1, 22,5, 25,6, 26,1, 27,2, 29,2, 29,3, 29,45, 29,65, 31,5, 34,1, 63,1, 127,9 y 130,1. IR (KBr): 2098.

50 Ejemplo 14: Formulación de ARNip utilizando vesículas preformadas

Las partículas que contienen lípidos catiónicos se prepararon utilizando el método de vesículas preformadas. El lípido catiónico, DSPC, colesterol y lípido de PEG se solubilizaron en etanol a una razón molar de 40/10/40/10, respectivamente. La mezcla de lípidos se añadió a un tampón acuoso (citrato 50 mM, pH 4) mezclando hasta una

concentración final de etanol y lípidos de 30% (vol/vol) y 6,1 mg/mL respectivamente y se dejó que se equilibrara a temperatura ambiente durante 2 minutos antes de su extrusión. Los lípidos hidratados se extruyeron a través de dos filtros de tamaño de poro de 80 nm superpuestos (Nuclepore) a 22°C utilizando un extrusor Lipex (Northern Lipids, Vancouver, BC) hasta un diámetro de vesícula de 70-90 nm, según se determinó mediante análisis Nicomp. Esto generalmente requiere 1-3 pases. Para algunas mezclas de lípidos catiónicos que no formaban vesículas pequeñas la hidratación de la mezcla de lípidos con un tampón de pH inferior (citrato 50 mM, pH 3) para protonar el grupo

fosfato en el grupo de cabeza DSPC ayudó a formar vesículas estables de 70-90 nm. El ARNip de FVII (solubilizado en una solución acuosa de citrato 50 mM, solución acuosa de pH 4 que contiene etanol al 30%) se añadió a las vesículas, se equilibró previamente a 35°C, a una velocidad de ~5 mL/min con mezcla. Después de alcanzar una razón final de ARNip/lípido objetivo de 0,06 (p/p), la mezcla se incubó durante 30 min adicionales a 35°C para permitir la reorganización de vesículas y la encapsulación del ARNip de FVII. El etanol se eliminó a continuación y el tampón externo se reemplazó por PBS (NaCl 155 mM, Na₂HPO₄ 3 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,5) mediante diálisis o diafiltración de flujo tangencial. La razón final de ARNip encapsulado a lípido se determinó después de la eliminación de ARNip no encapsulado utilizando columnas de centrifugación de exclusión por tamaño o columnas de centrifugación de intercambio iónico.

Ejemplo 15: Determinación in vivo de la eficacia de nuevas formulaciones de lípidos

Las formulaciones de ensayo se evaluaron inicialmente para determinar su reducción de la expresión "knockdown" de FVII en ratones hembra C57B1/6 de 7-9 semanas de edad, 15-25 g, a 0,1, 0,3, 1,0 y 5,0 mg/kg con 3 ratones por grupo de tratamiento. Todos los estudios incluyeron animales que recibieron solución salina tamponada con fosfato (PBS, grupo control) o una formulación de referencia. Las formulaciones se diluyeron a la concentración apropiada en PBS inmediatamente antes del ensayo. Los ratones se pesaron y se calcularon los volúmenes de dosificación apropiados (10 µl/g de peso corporal). Las formulaciones de ensayo y de referencia, así como PBS (para animales de control) se administraron por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Los animales se anestesiaron 24 h más tarde con una inyección intraperitoneal de Ketamina/Xilazina y se recogieron 500-700 µl de sangre mediante punción cardíaca en tubos separadores de suero (BD Microtainer). La sangre se centrifugó a 2.000 x g durante 10 minutos a 15°C y el suero se recogió y almacenó a -70°C hasta su análisis. Las muestras de suero se descongelaron a 37°C durante 30 minutos, se diluyeron en PBS y se tomaron alícuotas en placas de ensayo de 96 pocillos. Los niveles de Factor VII se evaluaron utilizando un ensayo cromogénico (kit Biophen FVII, Hyphen BioMed) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la absorbancia medida en un lector de microplacas equipado con un filtro de longitud de onda de 405 nm. Los niveles de FVII en plasma se cuantificaron y se calcularon las DE50 (dosis que da como resultado una reducción del 50% en los niveles plasmáticos de FVII en comparación con los animales control) utilizando una curva patrón generada a partir de una muestra combinada de suero de animales de control. Aquellas formulaciones de interés que muestran altos niveles de inhibición de FVII (DE50 << 0,1 mg/kg) se volvieron a analizar en estudios independientes a un intervalo de dosis inferior para confirmar la potencia y establecer la DE50.

La Figura 3 proporciona una Tabla que representa la CE50 de compuestos ilustrativos sometidos a ensayo utilizando este método.

Ejemplo 15A: Determinación de pKa de lípidos formulados

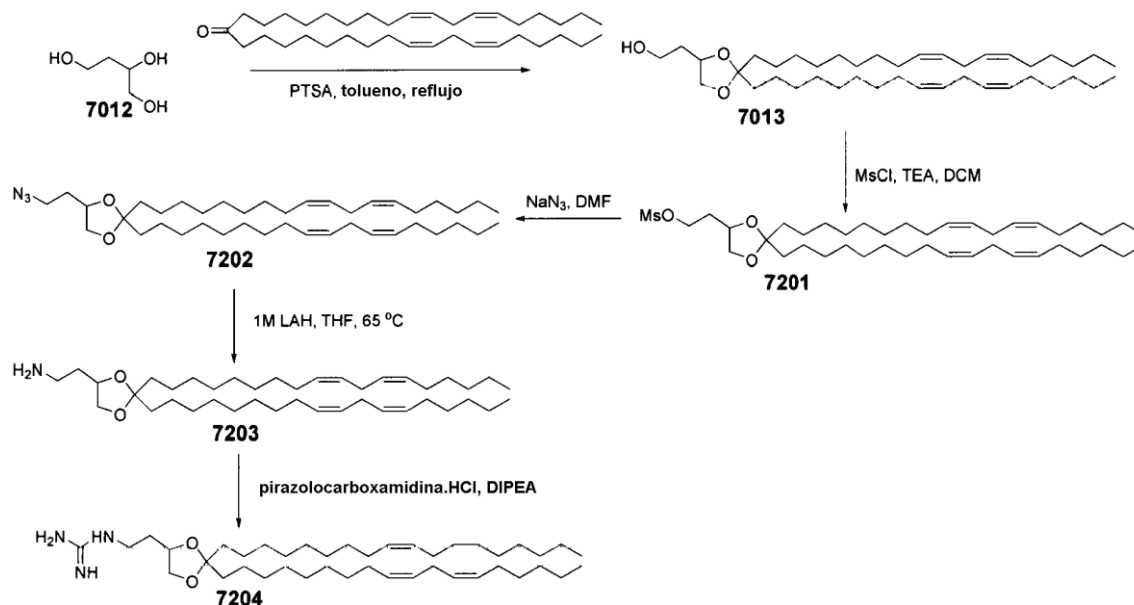
Los pKa de los diferentes lípidos catiónicos ionizables se determinaron esencialmente como se ha descrito (Eastman et al 1992 Biochemistry 31:4262-4268) utilizando la sonda fluorescente de ácido 2-(p-toluidino)-6-naftalenosulfónico (TNS), que no es fluorescente en agua pero se vuelve apreciablemente fluorescente cuando se une a las membranas. Las vesículas compuestas de lípido catiónico/DSPC/CH/PEG-c-DOMG (razón molar 40:10:40:10) se diluyeron a 0,1 mM en tampones (NaCl 130 mM, CH₃COONH₄ 10 mM, MES 10 mM, HEPES 10 mM) de diversos pH, que varían de 2 a 11. Se añadió una alícuota de la solución acuosa de TNS (1 µM final) a las vesículas diluidas y después de un período de equilibrado de 30 segundos la fluorescencia de la solución que contiene TNS se midió a longitudes de onda de excitación y emisión de 321 nm y 445 nm, respectivamente. El pKa de las vesículas que contienen lípidos catiónicos se determinó trazando la fluorescencia medida frente al pH de las soluciones y ajustando los datos a una curva Sigmoidea utilizando el programa comercial de gráficos IgorPro.

La figura 3 proporciona una Tabla que representa el pKa de compuestos ilustrativos sometidos a ensayo utilizando este método.

Ejemplo 16: Síntesis de lípidos unidos a guanidinio

Análogos de guanidinio

Preparación del Compuesto 7204:



Preparación del compuesto 7013: Una mezcla de 1,2,4-butanotriol (**7012**, 21,2 g, 200 mmoles, 5,0 eq), dilinoleil cetona (21,0 g, 40,0 mmoles, 1,0 eq) y ácido p-toluenosulfónico (0,76 g, 4,0 mmoles, 0,1 eq) en tolueno se calentó a reflujo en condiciones de Dean-Stark durante la noche. Una vez completada la reacción, se enfrió, se evaporó el disolvente y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando hexano y acetato de etilo (15%) a medida que los gradientes proporcionaron el cetal deseado (**7013**) con un rendimiento de 47% en forma de un aceite. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,48 - 5,24 (m, 8 H), 4,32 - 4,17 (m, 1 H), 4,08 (dd, $J=7,8, 6,1$, 1H), 3,86 - 3,74 (m, 2H), 3,53 (t, $J=8,0$, 1H), 2,77 (t, $J=6,4$, 4H), 2,30 - 2,19 (m, 1H), 2,05 (q, $J=6,8$, 8H), 1,88 - 1,75 (m, 2H), 1,69 - 1,51 (m, 4H), 1,42 - 1,19 (m, 36H), 0,89 (t, $J=6,8$, 6H). La masa calc. para $C_{41}H_{74}O_3$ es 614,5; encontrada 637,3 (+Na).

Síntesis de compuesto 7201: A una solución de compuesto **7013** (11,6 g, 18,9 mmoles, 1,0 eq) y trietilamina (5,45 mL, 37,7 mmoles, 2,0 eq) en diclorometano a 0°C se añadió gota a gota una solución de cloruro de metanosulfonilo (1,74 mL, 22,67 mmoles, 1,2 eq), y la reacción se continuó a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez completada la reacción, se lavó con agua, salmuera y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre $MgSO_4$. La mezcla concentrada se purificó mediante cromatografía en columna utilizando hexano y acetato de etilo (20%) como gradientes para obtener el derivado mesilado puro (**7201**) en forma de un aceite con un rendimiento de 93%. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,48 - 5,22 (m, 8 H), 4,35 (qd, $J=10,0, 4,9$, 2H), 4,25 - 4,14 (m, 1H), 4,13 - 4,03 (m, 1H), 3,53 (t, $J=7,6$, 1H), 3,02 (s, 3H), 2,77 (t, $J=6,4$, 4H), 2,13 - 1,85 (m, 10H), 1,57 (dd, $J=18,2, 9,2$, 4H), 1,44 - 1,15 (m, 36H), 0,89 (t, $J=6,7$, 6H). La masa calc. para $C_{42}H_{76}O_5S$ es 693,1; encontrada 693,2.

Síntesis de compuesto 7202: A una solución del compuesto **7201** (2,0 g, 3,0 mmoles, 1,0 eq) en DMF se le añadió NaN_3 sólido (0,98 g, 15,0 mmoles, 5,0 eq) a temperatura ambiente y la reacción se continuó a 65°C hasta la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se vertió en agua helada, se extrajo en acetato de etilo, los extractos orgánicos combinados se secaron en Na_2SO_4 , se concentraron, se purificaron mediante cromatografía en columna utilizando hexano y acetato de etilo (5%) como gradientes para obtener azida pura (**7202**) derivado en 89% de rendimiento. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,53 - 5,19 (m, 8 H), 4,21 - 3,97 (m, 2 H), 3,57 - 3,29 (m, 3 H), 2,76 (t, $J=6,4$, 4H), 2,04 (q, $J=6,8$, 8H), 1,80 (m, 2H), 1,66 - 1,43 (m, 4H), 1,40 - 1,07 (m, 36H), 0,88 (t, $J=6,8$, 6H). La masa calc. para $C_{41}H_{73}N_3O_2$ es 640,0; encontrada 612,5 ($-N_2$).

Síntesis de compuesto 7203: A una solución de compuesto **7202** (1,7 g, 2,65 mmoles, 1,0 eq) en tetrahidrofurano anhidro, se le añadió gota a gota una solución 1M de LAH (3,98 mL, 3,98 mmoles, 1,5 eq) a 0°C. La reacción se continuó a temperatura ambiente, después de completarse la reacción se sofocó con una solución saturada de Na_2SO_4 lentamente a 0°C. El compuesto se extrajo en una cantidad en exceso de acetato de etilo, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró y se secó adicionalmente a vacío para obtener la amina pura (**7203**) con un rendimiento de 90%, y esto se utilizó directamente sin purificación adicional. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,51 - 5,16 (m, 8 H), 4,13 (dd, $J=9,3, 3,6$, 1H), 4,03 (dd, $J=7,5, 6,1$, 1H), 3,46 (t, $J=7,8$, 1H), 2,96 - 2,67 (m, 6H), 2,20 - 1,92 (m, 8H), 1,82 - 1,49 (m, 6H), 1,46 - 1,12 (m, 38H), 0,88 (t, $J=6,8$, 6H). La masa calc. para el $C_{41}H_{75}NO_2$ es 614,0; encontrada 614,5.

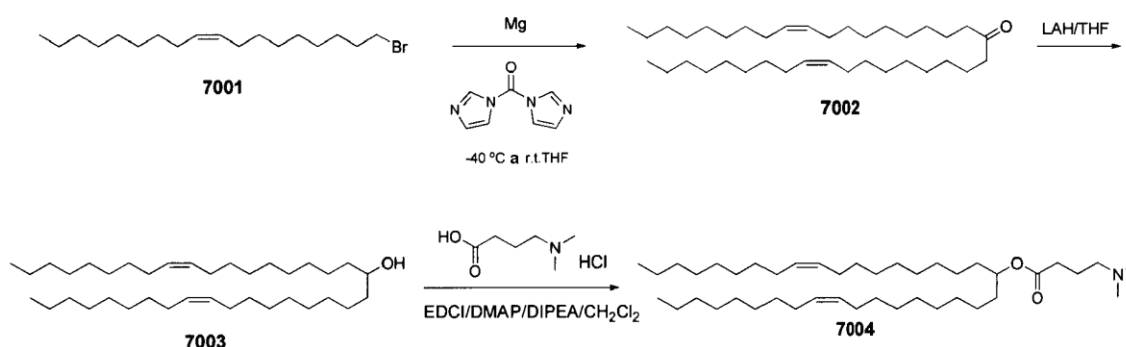
Síntesis de compuesto 7204 (ALNY-232): A una solución de la amina **7203** (0,61 g, 1,0 mmoles, 1,0 eq) y DIPEA (1,84 mL, 10,0 mmoles, 10,0 eq) en una mezcla disolvente (DCM:DMF) se le añadió hidrócloruro de 1H-pirazol-1-carboxamidina (1,46 g, 10,0 mmoles, 10,0 eq) en porciones a temperatura ambiente, en atmósfera de argón. La reacción se continuó durante la noche, después de completarse la reacción, se vertió en hielo y se extrajo con

acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se purificaron mediante cromatografía preparativa para obtener 0,16 g puros (25%) del derivado de guanidina (**7204**) $\text{RMN}^1 \text{H}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 11,76 (s, 1 H), 7,99 (t, $J=6,3$, 1 H), 7,44 (s, 2 H), 5,48 - 5,20 (m, 8 H), 4,24 - 4,00 (m, 2 H), 3,54 (dd, $J=7,3$, 6,2, 1H), 3,32 (d, $J=3,0$, 2H), 3,09 (dt, $J=10,5$, 5,3, 1H), 2,76 (t, $J=6,5$, 4H), 2,03 (q, $J=6,8$, 8 H), 1,90 - 1,77 (m, 1 H), 1,76 - 1,49 (m, 6 H), 1,48 - 1,05 (m, 34 H), 0,87 (dd, $J=6,8$, 6 H). $\text{RMN}^{13} \text{C}$ (101 MHz, cdcl_3) δ 158,96, 130,41, 130,36, 130,33, 128,18, 128,14, 113,52, 77,54, 77,22, 76,90, 76,60, 72,36, 69,54, 46,09, 38,39, 37,68, 37,01, 34,09, 31,74, 30,10, 29,92, 29,78, 29,76, 29,56, 29,55, 29,53, 27,47, 27,46, 27,41, 25,84, 24,37, 24,12, 22,79, 14,31, 8,86. La masa calc. para el $\text{C}_{42}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_2$ es 656,0; encontrada 656,2.

10 Ejemplo 17: Síntesis de lípidos unidos a éster

Análogos de éster

Esquema 1



15

Experimentación

Compuesto 7002: Se colocó magnesio (711 mg, 29,25 mmoles) en un matraz de fondo redondo. THF (30 mL) y se añadieron 2-3 mg de I_2 . La mezcla se calentó a 50°C y se añadió bromuro de oleilo (**7001**, 6,46 g, 19,50 mmoles) lentamente. Cuando se añadió ~ 1 mL de bromuro de oleilo, se inició la formación del reactivo de Grignard. Después de la adición de la fracción de bromuro de oleilo, el reactivo de Grignard se agitó a temperatura ambiente durante 60 min y a continuación se añadió lentamente a una solución de 1,1'-carbonyldiimidazol (1,54 g, 9,51 mmoles) en THF (100 mL) a -50°C. La mezcla de reacción se mantuvo agitando a -50°C durante 30 min y a continuación a temperatura ambiente durante 60 min. La reacción se sofocó con 40 mL de NH_4Cl ac. saturado y la mezcla se extrajo con Et_2O y H_2O . La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Et_2O al 0-5% en Hexano) para proporcionar el compuesto **7002** (2,70 g, 5,09 mmoles, 53%, $R_F=0,48$ desarrollado con EtOAc al 5% en hexano). Peso molecular para $\text{C}_{37}\text{H}_{71}\text{O}$ $(\text{M}+\text{H})^+$ Calc. 531,55, Encontrado 531,5.

30

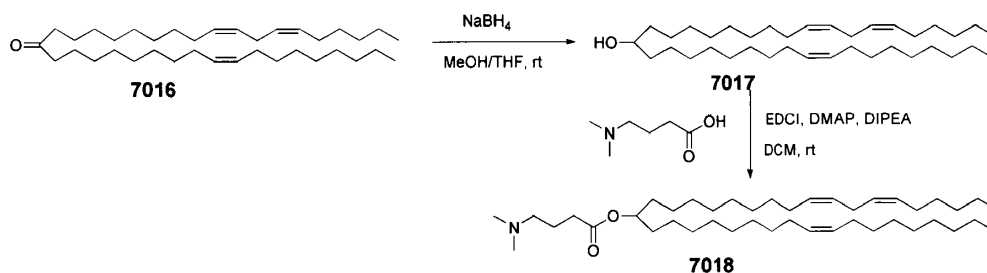
Compuesto 7003: A una solución de compuesto **7002** (1,36 g, 2,56 mmoles) en THF (25 mL), se le añadió hidruro de litio y aluminio 1 M en THF (5,12 mL, 5,12 mmoles) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se sofocó con Na_2SO_4 ac. saturado (20 mL), a continuación se extrajo con Et_2O y H_2O . La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Et_2O al 0-5% en Hexano) para proporcionar el compuesto **7003** (942 mg, 1,77 mmoles, 69%, $R_F=0,26$ desarrollado con EtOAc al 5% en hexano).

35

Compuesto 7004: A una solución de compuesto **7003** (940 mg, 1,76 mmoles) e hidrocloreuro de ácido 4-(dimetilamino)butírico (355 mg, 2,12 mmoles) en CH_2Cl_2 (15 mL), se le añadieron diisopropiletamina (0,920 mL, 5,28 mmoles), hidrocloreuro de *N*-(3-dimetilaminopropilo)-*N'*-etilcarbodiimida (406 mg, 2,12 mmoles) y DMAP (43 mg, 0,352 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con NaHCO_3 ac. saturado (50 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (MeOH al 0-5% en CH_2Cl_2) para proporcionar compuesto **7004** (817 mg, 1,26 mmoles, 72%, $R_F=0,29$ desarrollado con MeOH al 5% en CH_2Cl_2). Peso molecular para $\text{C}_{43}\text{H}_{84}\text{NO}_2$ $(\text{M}+\text{H})^+$ Calc. 646,65, Encontrado 646,5.

45

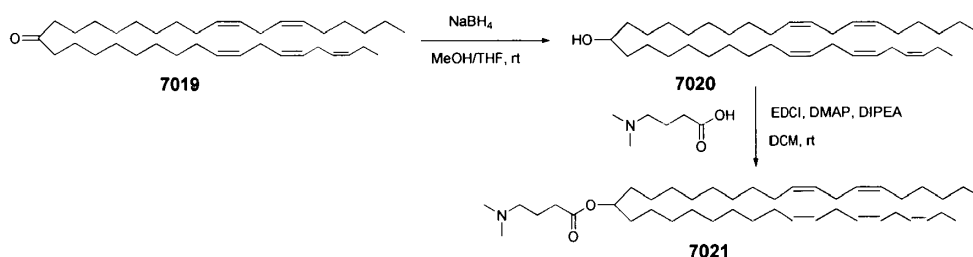
Esquema 4



Compuesto 7017: A una solución agitada de la cetona **7016** (1,5 g, 2,84 mmoles, 1,0 eq) en metanol y THF (2:1) se le añadió NaBH_4 (0,16 g, 4,26 mmoles, 1,5 eq) a 0°C en porciones y se continuó la reacción a temperatura ambiente hasta la finalización de la reacción. La reacción se sofocó con la adición gota a gota de una solución de HCl 2 N a temperatura de hielo, el disolvente orgánico se evaporó y se redisolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, salmuera, los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO_4 , se concentraron y purificaron mediante cromatografía en columna utilizando hexano:acetato de etilo (20%) como gradientes para obtener el alcohol puro **7017** con rendimientos de 94% (1,42 g) rendimientos. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,49 - 5,20 (m, 6 H), 3,57 (s, 1 H), 2,76 (t, $J=6,4$, 2H), 2,13 - 1,88 (m, 9H), 1,51 - 1,12 (m, 53H), 0,95 - 0,75 (m, 6H). Masa calc. para $\text{C}_{37}\text{H}_{70}\text{O}$: 530,5; encontrada 531,5.

Compuesto 7018: Preparado mediante condiciones experimentales similares a las utilizadas para el compuesto **7010**, utilizando el alcohol **7017** (1,42 g, 2,68 mmoles, 1,0 eq), hidrocloreuro de ácido *N,N*-dimetilaminobutírico (0,53 g, 3,21 mmoles, 1,2 eq), DIPEA (1,48 mL, 8,0 mmoles, 3,0 eq), EDCI (0,56 g, 2,94 mmoles, 1,1 eq), DMAP (0,065 g, 0,53 mmoles, 0,1 eq) en DCM proporcionó 1,34 g (78%) del producto puro **7018**. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,47 - 5,20 (m, 8 H), 4,92 - 4,77 (m, 1 H), 2,76 (t, $J=6,3$, 2H), 2,28 (dt, $J=16,6$, 7,5, 4H), 2,20 (s, 6H), 2,08 - 1,89 (m, 8H), 1,83 - 1,70 (m, 2H), 1,48 (d, $J=5,2$, 4H), 1,38 - 1,16 (m, 40 H), 0,91 - 0,80 (m, 6 H). RMN ^{13}C (101 MHz, cdcl_3) δ 173,61, 130,51, 130,40, 130,35, 130,13, 130,05, 128,16, 128,13, 77,55, 77,23, 76,91, 74,46, 59,18, 45,68, 34,36, 32,84, 32,69, 32,13, 31,75, 29,99, 29,92, 29,89, 29,78, 29,76, 29,72, 29,67, 29,58, 29,54, 29,52, 29,40, 29,36, 27,45, 27,43, 25,84, 25,57, 23,39, 22,91, 22,80, 14,36, 14,31. Masa calc. para $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{NO}_2$: 643,6; encontrada 644,5.

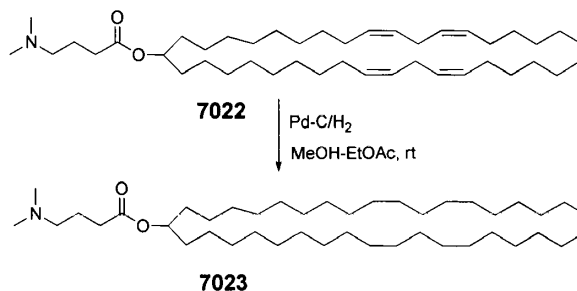
Esquema 5



Compuesto 7020: Preparado mediante condiciones experimentales similares a las utilizadas para el compuesto **7017**, utilizando la cetona **57** (0,75 g, 1,43 mmoles, 1,0 eq) en metanol y THF (2:1) se añadió NaBH_4 (0,08 g, 2,14 mmoles, 1,5 eq) en metanol:THF, proporcionó 0,63 g (84%) del alcohol puro **7020**. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,48 - 5,20 (m, 10 H), 3,57 (s, 1 H), 2,88 - 2,65 (m, 6 H), 2,06 (dq, $J=14,0$, 7,1, 8H), 1,50 - 1,18 (m, 35H), 0,96 (t, $J=7,5$, 3H), 0,88 (dd, $J=12,8$, 6,2, 3H). Masa calc. para $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}$: 526,5; encontrada 527,5.

Preparación del compuesto 7021: Preparado mediante condiciones experimentales similares a las utilizadas para el compuesto **7010**, utilizando alcohol **7020** (0,62 g, 1,18 mmoles, 1,0 eq), hidrocloreuro de ácido *N,N*-dimetilaminobutírico (0,23 g, 1,41 mmoles, 1,2 eq), DIPEA (0,65 mL, 3,54 mmoles, 3,0 eq), EDCI (0,24 g, 1,3 mmoles, 1,1 eq), DMAP (0,028 g, 0,23 mmoles, 0,1 eq) en DCM proporcionó 0,63 g (84%) del producto puro **7021**. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,46 - 5,19 (m, 8 H), 4,91 - 4,78 (m, 1 H), 2,85 - 2,68 (m, 6 H), 2,29 (dt, $J=15,2$, 7,5, 4H), 2,20 (s, 6H), 2,11 - 1,95 (m, 8H), 1,78 (dd, $J=14,8$, 7,5, 2H), 1,49 (d, $J=5,5$, 4H), 1,40 - 1,17 (m, 32H), 0,96 (t, $J=7,5$, 3H), 0,87 (t, $J=6,8$, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 168,17, 126,73, 125,15, 124,98, 124,93, 123,06, 123,04, 122,75, 122,72, 122,43, 121,91, 72,13, 71,81, 71,49, 69,04, 53,75, 40,25, 28,95, 27,27, 26,33, 24,47, 24,45, 24,36, 24,33, 24,29, 24,15, 24,10, 22,05, 22,04, 22,00, 20,42, 20,41, 20,32, 20,15, 17,96, 17,38, 15,35, 9,08, 8,88. Masa calc. para $\text{C}_{43}\text{H}_{77}\text{NO}_2$: 639,6; encontrada 640,5.

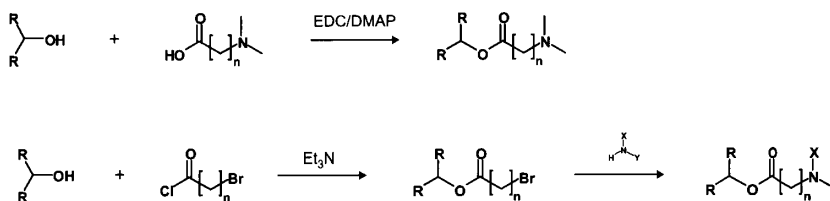
Esquema 6



Compuesto 7023: A una solución del compuesto **7022** en metanol:mezcla disolvente de acetato de etilo (2:1) se le añadió Pd/C al 10%, se eliminó el aire mediante vacío, se purgó con argón, se repitió el ciclo (2x), finalmente se purgó con H₂ y se continuó la reacción bajo H₂ a temperatura ambiente durante la noche. Una vez completada la reacción, se filtró a través de una pequeña capa de celite, se lavó con acetato de etilo, se evaporó el disolvente y se purificó mediante cromatografía en columna utilizando diclorometano:metanol (5%) como gradientes para obtener una forma sólida de color blanco puro del compuesto **7023** con un rendimiento de 64% (0,64 g). RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ 5,37 (s, 0 H), 4,85 (p, J=6,2, 1H), 2,29 (dt, J=14,8, 7,5, 4H), 2,21 (s, 6H), 1,84 - 1,71 (m, 2H), 1,49 (d, J=5,4, 4H), 1,36 - 1,13 (m, 64H), 0,87 (t, J=6,8, 6H). RMN C¹³ (101 MHz, cdcl₃) δ 173,58, 77,54, 77,22, 76,91, 74,49, 59,17, 45,64, 34,36, 32,83, 32,70, 32,15, 29,92, 29,88, 29,81, 29,78, 29,58, 25,55, 23,36, 22,91, 14,33. Masa calc. para C₄₃H₈₇NO₂: 649,6; encontrada 650,8.

Ejemplo 18: Síntesis de ésteres.

Esquema 1: Síntesis de la serie M (ésteres)

**DLin-M-C1-DMA**

DLin-M-C1-DMA. Una solución de dilinolenilmetanol (0,50 g), N,N-dimetilglicina (0,53 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0,60 g) e hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,50 g) en cloruro de metileno (5 mL) se agitó a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante TLC. Cuando se hubo convertido todo el dilinolenilmetanol, la mezcla de reacción se lavó con ácido clorhídrico diluido, seguido de una solución diluida de bicarbonato sódico. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se retiró el disolvente. El residuo se pasó a una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de elución de metanol al 0-3%/cloruro de metileno, produciendo DLin-M-C1-DMA (0,35 g) en forma de un aceite incoloro.

RMN H¹: (CDCl₃) δ 0,91 (t, J=6,8 Hz; 6H); 2,07 (m; 8 H); 2,42 (s; 6 H); 2,79 (t; J=6,5 Hz; 4H); 3,21 (s; 2H); 4,97 (m; 1 H); 5,37 (m; 8 H)

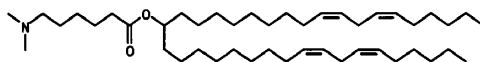
DLin-M-C4-DMA

Ácido N,N-dimetil-5-aminopentanoico. Se disolvió ácido bromovalérico (2 g) en una solución acuosa de dimetilamina y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó en un rotavapor y el residuo se trató con una solución acuosa que contenía un equivalente de bicarbonato de sodio. El disolvente se eliminó, el residuo se suspendió en etanol y se filtró. El disolvente se eliminó del producto filtrado y el residuo se suspendió en cloruro de metileno y se suspendió de nuevo. Después de la filtración, la eliminación del disolvente del producto filtrado produjo un aceite (1,3 g) que cristalizó lentamente durante el almacenamiento.

DLin-M-C4-DMA; como se describe para DLin-M-C1-DMA utilizando ácido N,N-dimetil-5-aminopentanoico.

RMN H¹: (CDCl₃) δ 0,91 (t, J=6,9 Hz; 6H); 1,67 (m; 2H); 2,07 (m; 8 H); 2,32 (s; 6H); 2,37 (m; 4H); 2,79 (t; J=6,5 Hz; 4H); 4,88 (m; 1H); 5,37 (m; 8 H)

DLin-M-C5-DMA

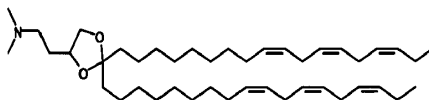


5 Ácido N,N-dimetil-6-aminobutanoico; como se describe para el ácido N,N-dimetil-5-aminopentanoico utilizando ácido 6-bromobutanoico.

DLin-M-C5-DMA; como se describe para DLin-M-C1-DMA utilizando ácido N,N-dimetil-6-aminobutanoico.

RMN H1: (CDCl₃) δ 0,91 (t, J=6,9 Hz; 6H); 1,66 (m); 2,07 (m; 8 H); 2,31 (t; J=7,5 Hz; 2H); 2,39 (s; 6 H); 2,47 (m ancho; 2H); 4,88 (m; 1H); 5,37 (m; 8 H)

10 **DLen-K5-C2-DMA**



15 Len-Br. Una solución de mesilato de linolenilo (2,2 g) y bromuro de litio (2,5 g) en acetona (25 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió cloruro de metileno y la solución se lavó dos veces con agua. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de elución de acetato de etilo al 0-2%/hexano, produciendo Len-Br (2,1 g) en forma de un aceite incoloro.

20 DLen-M-formiato. Una solución de Len-Br (2,1 g) en éter dietílico anhidro (60 mL) se trató con limaduras de magnesio (180 mg) a reflujo durante la noche. La solución se dejó enfriar y se añadió formiato de etilo (0,5 mL) gota a gota. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante tres horas. Se añadió ácido sulfúrico acuoso (5%, 40 mL) y la solución se extrajo con éter dietílico. La fracción orgánica se lavó con solución salina, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de elución de acetato de etilo al 0-3%/hexano, produciendo DLen-M-formiato bruto en forma de un aceite incoloro.

30 DLen-M. El DLen-M-formiato bruto preparado anteriormente se trató con una solución al 5% de hidróxido de sodio en agua/etanol (10 mL, 10:90 v/v) durante 30 minutos. La solución se diluyó con agua y se extrajo con cloruro de metileno. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se retiró. El residuo se pasó a una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de elución de acetato de etilo al 0-10%/hexano, produciendo DLen-M en forma de un aceite incoloro.

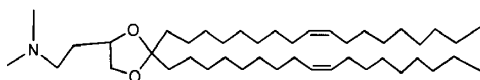
35 DLen-cetona. Una solución de DLEN-M (preparada anteriormente) en cloruro de metileno (20 mL) se trató con clorocromato de piridinio (1 g) a temperatura ambiente durante dos horas. Se añadió éter dietílico (50 mL) y la suspensión resultante se lavó a través de un lecho de gel de sílice (2x). El disolvente se eliminó y el residuo se pasó a una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de acetato de etilo al 0-2%/hexano, produciendo DLen-cetona (0,57 g) en forma de un aceite incoloro.

40 DLen-K5-C2-OH. Una solución de DLen-cetona (0,57 g), p-toluenosulfonato de piridinio (0,10 g) y butan-1,2,4-triol (0,50 g) en tolueno (100 mL) se sometió a reflujo en un aparato Dean-Stark durante la noche. La mezcla de reacción se repartió entre cloruro de metileno y salmuera. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se retiró. El residuo se hizo pasar a una columna de gel de sílice utilizando cloruro de metileno, produciendo DLen-K5-C2-OH (0,52 g) en forma de un aceite incoloro.

45 Procedimiento 09-028 (17 de abril de 2009): DLen-K5-C2-OMs. Una solución de DLen-K5-C2-OH (0,52 g) en cloruro de metileno (20 mL) se trató con anhídrido metanosulfónico (0,40 g) y trietilamina (0,7 mL) a temperatura ambiente durante la noche. La fracción orgánica se lavó con solución salina, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se utilizó en reacciones posteriores sin purificación adicional. DLen-K5-C2-DMA. Una solución de DLen-K5-C2-OM bruto en dimetilamina 2,0 M en THF (15 mL) se agitó a temperatura ambiente durante dos días. El disolvente se eliminó en un rotavapor y el residuo se hizo pasar por gel de sílice utilizando un gradiente de metanol al 0-6%/cloruro de metileno, produciendo DLen-K5-C2-DMA (0,34 g) en forma de un aceite incoloro.

50 RMN H1: (CDCl₃) δ 0,95 (t, J=7,5 Hz; 6 H); 1,56 (m; 4H); 1,70 (m; 1H); 1,81 (m; 1H); 2,05 (m; 8 H); 2,27 (s; 6 H); 2,36 (m; 1 H); 2,46 (m; 1H); 2,79 (t, J=6,0 Hz; 8 H); 3,27 (t; J=7,2 Hz; 1H); 4,06 (m; 2H); 5,34 (m; 12 H)

55 **DO-K5-C2-DMA**



O-Br; como se describe para Len-Br utilizando mesilato de oleilo.

DO-M-formiato; como se describe para el formiato DLen-M utilizando O-Br.

DO-M; como se describe para DLen-M utilizando DO-M-formiato.

DO-cetona; como se describe para DLen-cetona utilizando DO-M.

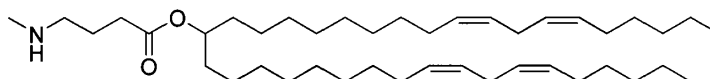
5 DO-K5-C2-OH; como se describe para DLen-K5-C2-OH utilizando DO-cetona.

DO-K5-C2-OMs; como se describe para DLen-K5-C2-OM utilizando DO-K5-C2-OH.

DO-K5-C2-DMA; como se describe para DLen-K5-C2-DMA utilizando DO-K5-C2-OM.

10 RMN H1: (CDCl₃) δ 0,86 (t, J=6,8 Hz; 6H); 1,55 (m; 4H); 1,64 (m; 1H); 1,79 (ddd; J=12,6 Hz, J' = 11,2 Hz, J'' = 6,2 Hz; 1H); 1,99 (m; 8H); 2,20 (s; 6 H); 2,26 (ddd; J=12,2 Hz, J'=9,5Hz; J'' = 5,9Hz; 1H); 2,38 (ddd; J=11,9Hz, J' = 9,7Hz, J'' = 5,6Hz; 1H); 3,46 (t; J=7,3Hz; 1H); 4,05 (m; 2H); 5,32 (m; 4H)

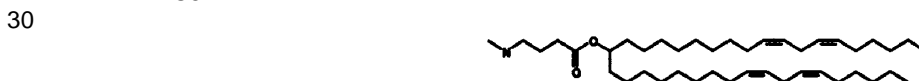
DLin-M-C3-A



15 Procedimiento 09-071 (14 de julio de 2009): DLin-M-C3-A. Una solución de dilinolenilmetanol (0,51 g), ácido N-BOC-4-aminobutírico (0,53 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0,39 g) e hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,30 g) en cloruro de metileno (5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se lavó con ácido clorhídrico diluido. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se retiró. El residuo se trató con ácido trifluoroacético (2 mL) a temperatura ambiente durante una hora. La solución se diluyó con cloruro de metileno, se lavó con agua y a continuación se lavó con bicarbonato sódico acuoso. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se retiró. El residuo se pasó a una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de elución de metanol al 0-10%/cloruro de metileno, produciendo DLin-M-C3-A (0,45 g) en forma de un aceite incoloro.

20 RMN H1: (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,8 Hz; 6H); 1,75 (p; J=7,3 Hz; 2H); 2,03 (m; 8 H); 2,32 (t; J=7,4 Hz; 2H); 2,75 (m; 6 H); 4,84 (p; J=6,2 Hz; 1H); 5,35 (m; 8 H)

DLin-M-C3-MA

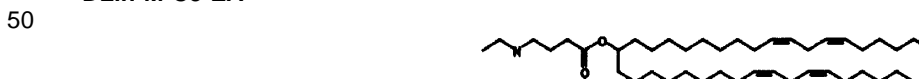


30 DLin-M-C3-Br. Una solución de dilinolenilmetanol (0,5 g) en cloruro de metileno (20 mL) se trató con cloruro de 4-bromobutirilo (1 mL) y trietilamina (1 mL) con agitación a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con agua, se aciduló con ácido clorhídrico y se extrajo con cloruro de metileno. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se retiró. El DLin-M-C3-Br bruto se utilizó en reacciones posteriores sin purificación adicional.

35 Procedimiento 09-061 (16 de junio de 2009): DLin-M-C3-MA. Una solución de DLin-M-C3-Br (0,51 g) se trató con una solución de metilamina en THF/cloruro de metileno (50 mL; 20/30 v/v) a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante TLC. Cuando se completó la reacción, el disolvente se retiró en un rotavapor. El residuo se repartió entre cloruro de metileno y ácido clorhídrico diluido. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa diluida de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y el disolvente se retiró. El residuo se pasó a una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de elución de metanol al 0-4%/cloruro de metileno, produciendo DLin-M-C3-MA (0,31 g) en forma de un aceite incoloro.

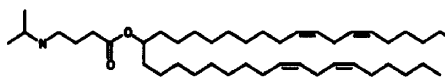
40 RMN H1: (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,9 Hz; 6H); 1,82 (m; 2H); 2,03 (m; 8 H); 2,33 (t, J=7,4 Hz; 2 H); 2,43 (s; 3H); 2,62 (t; J=7,1 Hz; 2H); 2,75 (t; J=6,4 Hz; 4H); 4,84 (p; J=6,3 Hz; 1H); 5,35 (m; 8 H)

DLin-M-C3-EA



45 DLin-M-C3-EA; como se describe para DLin-M-C3-MA utilizando etilamina.
RMN H1: (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,8 Hz; 6H); 1,10 (t; J=7,1 Hz; 3H); 1,82 (p; J=7,3 Hz; 2H); 2,03 (m; 8 H); 2,33 (t, J=7,4 Hz; 2 H); 2,65 (q; J=7,0 Hz; 4H); 2,62 (t; J=7,1 Hz; 2H); 2,75 (t; J=6,4 Hz; 4H); 4,84 (p; J=6,3 Hz; 1H); 5,33 (m; 8 H)

DLin-M-C3-IPA



60 DLin-M-C3-IPA; como se describe para DLin-M-C3-MA utilizando isopropilamina.

RMN H1: (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,8 Hz; 6H); 1,03 (d, J=6,2 Hz; 6 H); 1,78 (p; J=7,3 Hz; 2H); 2,03 (m; 8 H); 2,32 (t; J=7,4 Hz; 2H); 2,60 (t, J=7,3 Hz; 2H); 2,77 (m; 5H); 4,84 (p; J=6,2 Hz; 1H); 5,34 (m; 8 H)

DLin-M-C3-DEA (DE50=0,3)

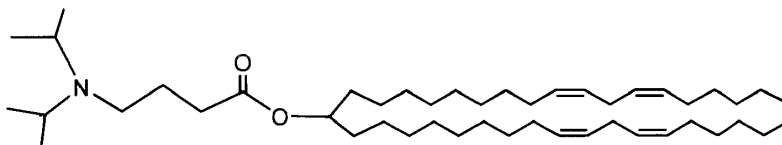
5



DLin-M-C3-DEA; como se describe para DLin-M-C3-MA utilizando dietilamina.

DLin-M-C3-DIPA (DE50=4,5)

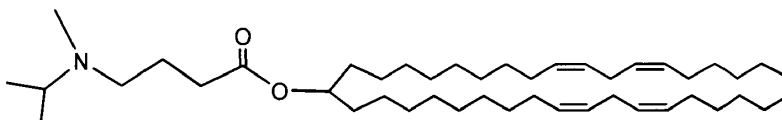
10



DLin-M-C3-DIPA; como se describe para DLin-M-C3-MA utilizando diisopropilamina.

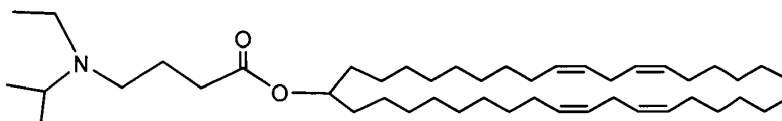
15

DLin-M-C3-MIPA



DLin-M-C3-MIPA; como se describe para DLin-M-C3-MA utilizando metilisopropilamina.

DLin-M-C3-EIPA



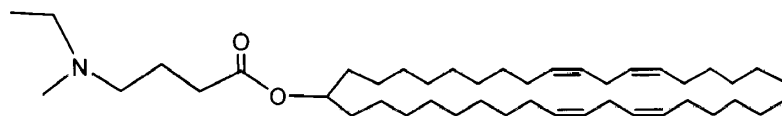
25

DLin-M-C3-EIPA; como se describe para DLin-M-C3-MA utilizando etilisopropilamina.

RMN H1: (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,8 Hz; 6H); 0,94 (d, J=6,2 Hz; 6 H); 0,99 (t; J=7,1 Hz; 3H); 1,71 (m; 2H); 2,03 (m; 8 H); 2,30 (t, J=7,3 Hz; 2 H); 2,37 (m; 2H); 2,43 (q; J=7,1 Hz; 2H); 2,75 (t; J=6,4 Hz; 4H); 2,90 (m; 1 H); 4,84 (m; 1H); 5,34 (m; 8 H)

30

DLin-M-C3-MEA

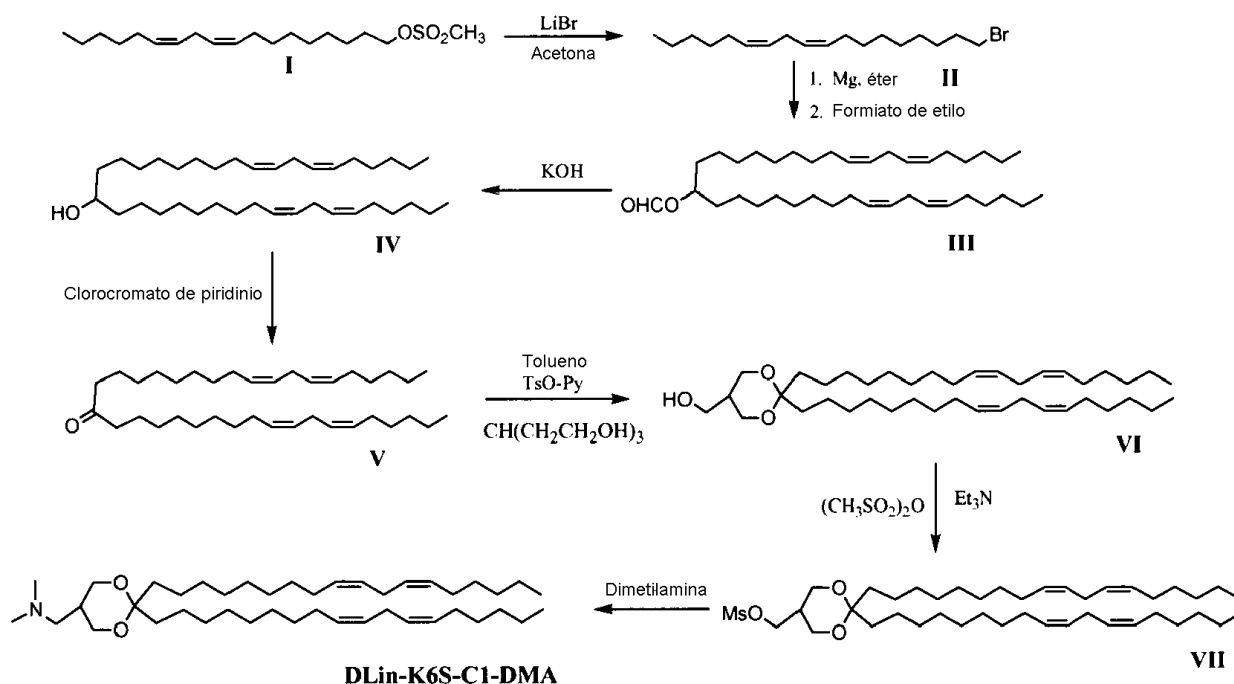


DLin-M-C3-MEA; como se describe para DLin-M-C3-MA utilizando metiletilamina.

RMN H1: (CDCl₃) δ 0,87 (t, J=6,9 Hz; 6H); 1,02 (t, J=7,2 Hz; 3H); 1,77 (m; 2H); 2,03 (m; 8 H); 2,19 (s; 3H); 2,30 (m; 4H); 2,39 (q; J=7,2 Hz; 2H); 2,75 (t, J=6,5 Hz; 4H); 4,84 (m; 1H); 5,34 (m; 8 H)

40

Ejemplo 19: Síntesis de 2,2-Dilinoleil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C1-DMA);



1. Síntesis de bromuro de linoleilo (II)

5 Una mezcla de metanosulfonato de linoleilo (26,6 g, 77,2 mmoles) y bromuro de litio (30,5 g, 350 mmoles) en acetona (350 mL) se agitó en nitrógeno durante dos días. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con acetona. El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se trató con agua (300 mL). La fase acuosa se extrajo con éter (3 x 150 mL). La fase de éter combinada se lavó con agua (200 mL), salmuera (200 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 29,8 g de un aceite de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 700 mL) eluyendo con hexanos. Esto proporcionó 20,8 g (82%) de bromuro de linoleilo (II).

2. Síntesis de formiato de dilinoleilmetilo (III)

15 A una suspensión de virutas de Mg (1,64 g, 67,4 mmoles) con un cristal de yodo en 500 mL de éter anhidro en nitrógeno se le añadió una solución de bromuro de linoleilo (II, 18,5 g, 56,1 mmoles) en 250 mL de éter anhidro a temperatura ambiente. La mezcla resultante se sometió a reflujo bajo nitrógeno durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla turbia bajo nitrógeno se le añadió gota a gota formiato de etilo (4,24 g, 57,2 mmoles). Después de la adición, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se trató con una solución acuosa de H_2SO_4 10% (250 mL). La fase de éter se separó y la fase acuosa se extrajo con éter (150 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (400 mL), salmuera (300 mL), y a continuación se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del solvente proporcionó 17,8 g de aceite amarillento en forma de un producto bruto (III). El producto bruto se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

3. Síntesis de dilinoleil metanol (IV)

25 El formiato de dilinoleilmetil bruto anterior (III, 17,8g) y KOH (3,75 g) se agitaron en EtOH al 85% a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Una vez completada la reacción, la mayor parte del disolvente se evaporó. La mezcla resultante se vertió en 150 mL de solución de HCl al 5%. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 150 mL). El extracto de éter combinado se lavó con agua (2 x 100 mL), salmuera (100 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó 20,0 de dilinoleilmetanol (IV) en forma de un aceite de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 700 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-5% en hexanos. Esto proporcionó 9,6 g de dilinoleil metanol (IV).

4. Síntesis de dilinoleil cetona (V)

35 A una mezcla de dilinoleil metanol (4,0 g, 7,2 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (0,4 g) en 100 mL de CH_2Cl_2 se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 4,0 g, 19 mmoles). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. a continuación se añadió éter (300 mL) a la mezcla, y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice (150 mL). El lecho de gel de sílice se lavó adicionalmente con

éter (3 x 75 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 5,1 g de un residuo oleoso en forma de un producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 200 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0-4% en hexanos. Esto proporcionó 3,0 g (79%) de la dilinoleil cetona (V).

5. Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-hidroximetil-[1,3]-dioxano (VI)

Una mezcla de dilinoleil cetona (V, 1,05 g, 2,0 mmoles), 2-hidroximetil-1,3-propanodiol (490 mg, 4,2 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (100 mg, 0,4 mmoles) en 150 mL de tolueno se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 100 mL), salmuera (100 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un aceite pálido (1,2 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 100 mL) con un gradiente de metanol al 0-5% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,93 g de VI puro en forma de aceite pálido.

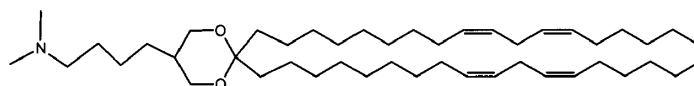
6. Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-metanosulfonilmetil-[1,3]-dioxano (VII)

A una solución de 2,2-dilinoleil-5-hidroximetil-[1,3]-dioxano (VI, 0,93 g, 1,5 mmoles) y trietilamina seca (290 mg, 2,9 mmoles) en 50 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (400 mg, 2,3 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 75 mL), salmuera (75 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 1,0 g de aceite pálido. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

7. Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C1-DMA)

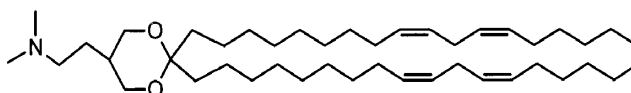
A la sustancia bruta anterior (VII, 1,0 g) bajo nitrógeno se le añadieron 20 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 100 mL) con un gradiente de metanol al 0-3% en cloroformo como eluyente dio como resultado 150 mg del producto. DLin-K6S-C1-DMA en forma de aceite pálido. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,24-5,51 (8, m, 4x CH=CH), 4,04 (2H, dd, 2 x OCH), 3,75 (2H, dd OCH), 2,7-2,9 (2H, ancho, NCH₂), 2,78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,57 (6H, s, 2 x NCH₃), 1,95-2,17 (9H, q, 4 x CH₂ alílico y CH), 1,67-1,95 (2H, m, CH₂), 1,54-1,65 (4H, m, 2 x CH₂), 1,22-1,45 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 20: Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-dimetilaminobutil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C4-DMA)



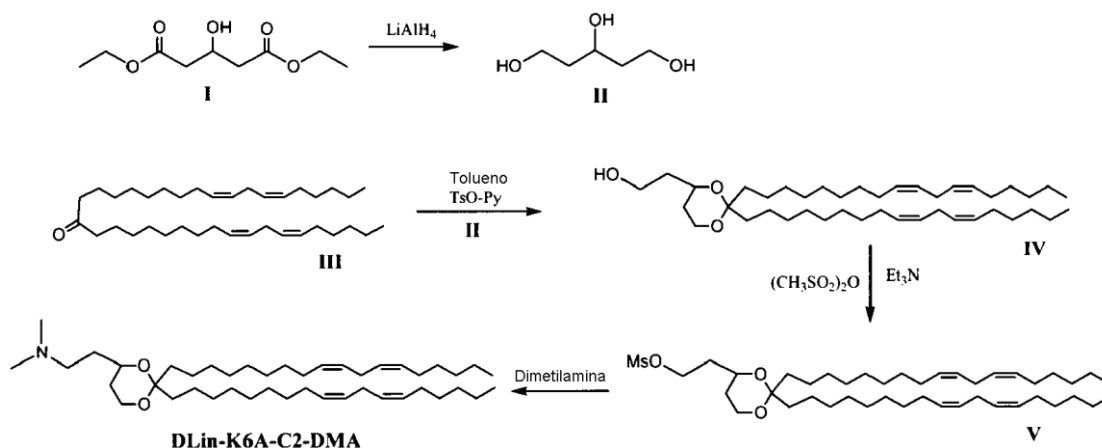
Este compuesto se sintetizó en forma de aceite pálido de manera similar a la de **Ejemplo 19**, donde el 2-hidroximetil-1,3-propanodiol se reemplazó por 2-hidroxibutil-1,3-propanodiol. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,24-5,45 (8, m, 4x CH=CH), 3,79 (2H, dd, 2 x OCH), 3,50 (2H, dd OCH), 2,76 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,37 (2H, t, NCH₂), 2,31 (6 H, s, 2 x NCH₃), 2,04 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,63-1,90 (3H, m,), 1,45-1,62 (4H, m, 2 x CH₂), 1,22-1,45 (36H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 21: Síntesis de 2,2-Dilinoleil-5-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C2-DMA)



Este compuesto se sintetizó en forma de aceite pálido de manera similar a la de **Ejemplo 19**, donde el 2-hidroximetil-1,3-propanodiol se reemplazó por 2-hidroxietil-1,3-propanodiol. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,25-5,45 (8, m, 4x CH=CH), 3,87 (2H, dd, 2 x OCH), 3,55 (2H, dd OCH), 2,75 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,45-2,60 (2H, ancho, NCH₂), 2,40 (6H, s, 2 x NCH₃), 2,03 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,73-1,86 (1H, m), 1,56-1,72 (6H, m, 2 x CH₂), 1,22-1,45 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 22: Síntesis de 2,2-Dilinoleil-4- (2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C2-DMA)



1. Síntesis de 1,3,5-pentanotriol (II)

5 Se añadió gota a gota 3-hidroxioglutarato de dietilo (**I**, 1,0 g, 4,9 mmoles) en THF anhidro (10 mL) a una suspensión de LiAlH_4 en THF anhidro (110 mL) en nitrógeno con un baño de agua fría. Después de la adición, el baño se retiró y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla resultante se sofocó añadiendo 13 mL de salmuera muy lentamente con un baño de agua helada. Se obtuvo una suspensión de color blanco, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se filtró y se lavó con THF. El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó para proporcionar 0,70 g de aceite pálido. La cromatografía en columna del producto crudo (SiO_2 malla 230-400, 100 mL, gradiente de metanol al 0-12% en clorofórmico) proporcionó 0,54 g de **II** en forma de aceite incoloro.

2. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxano (IV)

15 Una mezcla de dilinoleil cetona (**III**, 0,80 g, 1,5 mmoles), 1,3,5-pentanotriol (**II**, 0,54 g, 4,5 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (60 mg, 0,24 mmoles) en 150 mL de tolueno se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 75 mL), salmuera (75 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un aceite pálido (1,1 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 75 mL) con un gradiente de metanol al 0-3% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,75 g (79%) de **IV** puro en forma de aceite incoloro.

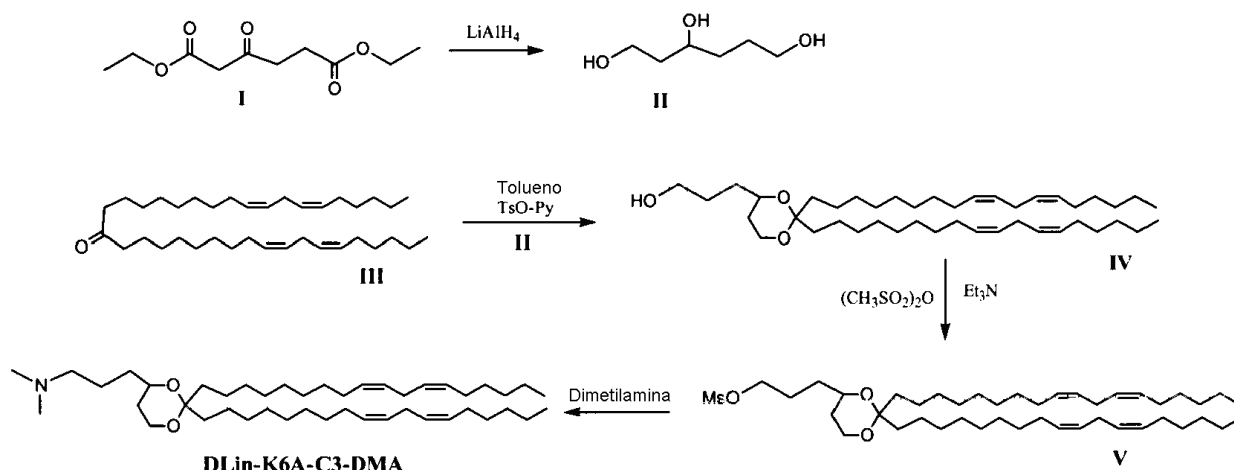
3. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(2-metanosulfoniletil)-[1,3]-dioxano (V)

25 A una solución de 2,2-dilinoleil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxano (**IV**, 0,75 g, 1,2 mmoles) y trietilamina seca (0,58 g, 5,7 mmoles) en 40 mL de CH_2Cl_2 anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,50 g, 2,9 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 0,80 g de aceite pálido como un producto bruto. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

4. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C2-DMA)

35 Al material crudo anterior (**V**, 0,80 g) bajo nitrógeno se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. El sólido se filtró. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 100 mL) con un gradiente de metanol al 0-6% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,70 g del producto. **DLin-K6A-C2-DMA** en forma de aceite pálido. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,28-5,45 (8, m, 4x CH=CH), 3,85-4,0 (2H, m, 2 x OCH), 3,78 (1H, dd, OCH), 2,78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,55-2,90 (2H, ancho, NCH₂), 2,47 (6H, s, 2 x NCH₃), 2,05 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,65-1,90 (4H, m, CH₂), 1,47-1,65 (4H, m, CH₂), 1,1-1,65 (36H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 23: Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C3-DMA)



1. Síntesis de 1,3,6-hexanotriol (II)

5 Se añadió gota a gota β -cetoadiopato de dietilo (**I**, 1,86 g, 8,6 mmoles) a una suspensión de LiAlH_4 en THF anhidro (90 mL) bajo argón con un baño de agua helada. Después de la adición, el baño se retiró y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante se sofocó añadiendo 10 mL de salmuera muy lentamente con un baño de agua helada. Se obtuvo una suspensión de color blanco, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se filtró y se lavó con THF seguido de EtOH (2 x 50 mL). El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó para proporcionar 0,90 g de aceite pálido. La cromatografía en columna del producto crudo (100 mL de SiO_2 de malla 230-400, gradiente de metanol de 0-10% en diclorometano) proporcionó 0,70 g de **II** en forma de aceite incoloro.

2. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(3-hidroxiopropil)-[1,3]-dioxano (IV)

15 Una mezcla de dilinoleil cetona (**III**, 1,80 g, 3,4 mmoles), 1,3,6-hexanotriol (**II**, 0,50 g, 3,7 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (100 mg, 0,40 mmoles) en 120 mL de tolueno se sometió a reflujo bajo argón durante 3 horas con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un aceite pálido (2,0 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) con un gradiente de metanol al 0-3% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,90 g (41%) de **IV** puro en forma de aceite incoloro.

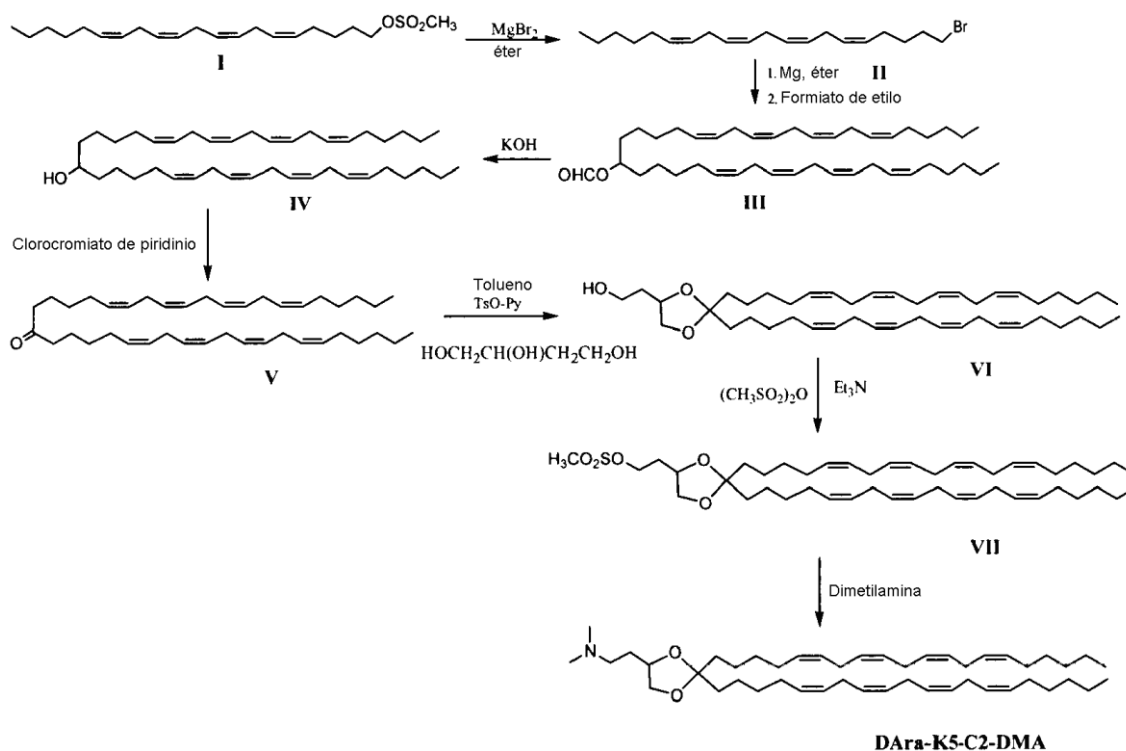
3. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(3-metanosulfonilpropil)-[1,3]-dioxano (V)

25 A una solución de 2,2-dilinoleil-4-(3-hidroxiopropil)-[1,3]-dioxano (**IV**, 0,97 g, 1,5 mmoles) y trietilamina seca (0,44 g, 4,3 mmoles) en 60 mL de CH_2Cl_2 anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,60 g, 3,5 mmoles) en argón. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL) y salmuera (30 mL) y se secó sobre MgSO_4 anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 1,1 g de aceite pálido en forma de un producto bruto. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

4. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C3-DMA)

35 A la sustancia bruta anterior (**V**, 1,1 g) bajo argón se le añadieron 20 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. El sólido se filtró. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con un gradiente de metanol al 0-7% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,85 g del producto. **DLin-K6A-C3-DMA** en forma de aceite pálido. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,25-5,45 (8, m, 4 x $\text{CH}=\text{CH}$), 3,7-4,0 (3H, m, 3 x OCH), 2,77 (4H, t, 2 x $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$), 2,5-2,8 (2H, ancho, NCH_2), 2,5 (6 H, s, 2 x NCH_3), 2,05 (8H, q, 4 x CH alílico), 1,65-1,90 (4H, m, 2 x CH_2), 1,40-1,65 (4H, m, 2 x CH_2), 1,1-1,65 (38H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

Ejemplo 24: Síntesis de 2,2-diaraquidonil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DARA-K5-C2-DMA)



1. Síntesis de bromuro de araquidonilo (II)

5 Una mezcla de metanosulfonato de araquidonilo (1,0 g, 2,7 mmoles) y bromuro de magnesio (2,2 g, 12 mmoles) en éter anhidro (40 mL) se agitó bajo argón durante dos días. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con éter (2 x 10 mL). El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se trató con hexanos (50 mL). El sólido se filtró y el disolvente se evaporó dando como resultado un residuo oleoso. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 30 mL) eluyendo con hexanos. Esto proporcionó 1 g de bromuro de araquidonilo (II) en forma de aceite incoloro.

2. Síntesis de formiato de diaraquidonilmetilo (III)

15 A una solución de bromuro de araquidonilo (II, 1 g, 3 mmoles) en éter anhidro (30 mL) se le añadieron virutas de Mg (78 mg, 3,2 mmoles) seguido de un cristal de yodo. La mezcla resultante se calentó a reflujo en nitrógeno durante 10 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla turbia en atmósfera de nitrógeno se le añadió formiato de etilo (0,25 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla se le añadieron 20 mL de una solución acuosa al 10% de H₂SO₄. La fase de éter se separó y la fase acuosa se extrajo con éter (30 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y a continuación se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del solvente proporcionó 1,1 g de aceite pálido en forma de un producto bruto (III). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-3% en hexanos. Esto proporcionó 0,43 g (40%) de formiato de diaraquidonilmetilo (III) en forma de aceite pálido.

3. Síntesis de diaraquidonil metanol (IV)

25 El formiato de diaraquidonilmetil anterior (III, 0,43 g, 0,71 mmoles) y KOH (100 mg) se agitaron en EtOH al 95% (20 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Una vez completada la reacción, la mayor parte del disolvente se evaporó. La mezcla resultante se trató con 20 mL de solución 2M de HCl. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 30 mL). El extracto de éter combinado se lavó con agua (2 x 25 mL) y salmuera (25 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó 0,44 g de IV en forma de aceite pálido. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-5% en hexanos. Esto proporcionó 0,41 g de diaraquidonilmetanol (IV) en forma de aceite incoloro.

4. Síntesis de diaraquidonil cetona (V)

35 A una mezcla de diaraquidonil metanol (IV, 0,41 g, 0,71 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (0,05 g) en 10 mL de CH₂Cl₂ se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 0,50 g, 2,3 mmoles). La suspensión resultante se agitó a

temperatura ambiente durante 90 minutos. a continuación se añadió éter (50 mL) a la mezcla, y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de floresil (30 mL). El lecho se lavó adicionalmente con éter (3 x 30 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 0,40 g de un residuo oleoso como producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 10 mL) eluyendo con éter al 0-3% en hexanos. Esto proporcionó 0,30 g (75%) de diaraquinonil cetona (**V**). RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,3-5,5 (16H, m, 8 x CH=CH), 2,82 (12H, t, 6 x C=C-CH₂-C=C), 2,40 (4H, t, 2 x CO-CH₂), 2,08 (8 H, m, 4 x CH₂ alílico), 1,25-1,65 (20H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

5. Síntesis de 2,2-diaraquidonil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxolano (**VI**)

Una mezcla de diaraquidonil cetona (**V**, 0,30 g, 0,52 mmoles), 1,2,4-butanotriol (0,25 g, 2,4 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (20 mg) en 60 mL de tolueno se sometió a reflujo en argón durante la noche con un tubo Dean-Stark. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL), salmuera (30 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un residuo oleoso de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con metanol al 0-2% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,29 g (84%) de **VI** puro en forma de aceite pálido.

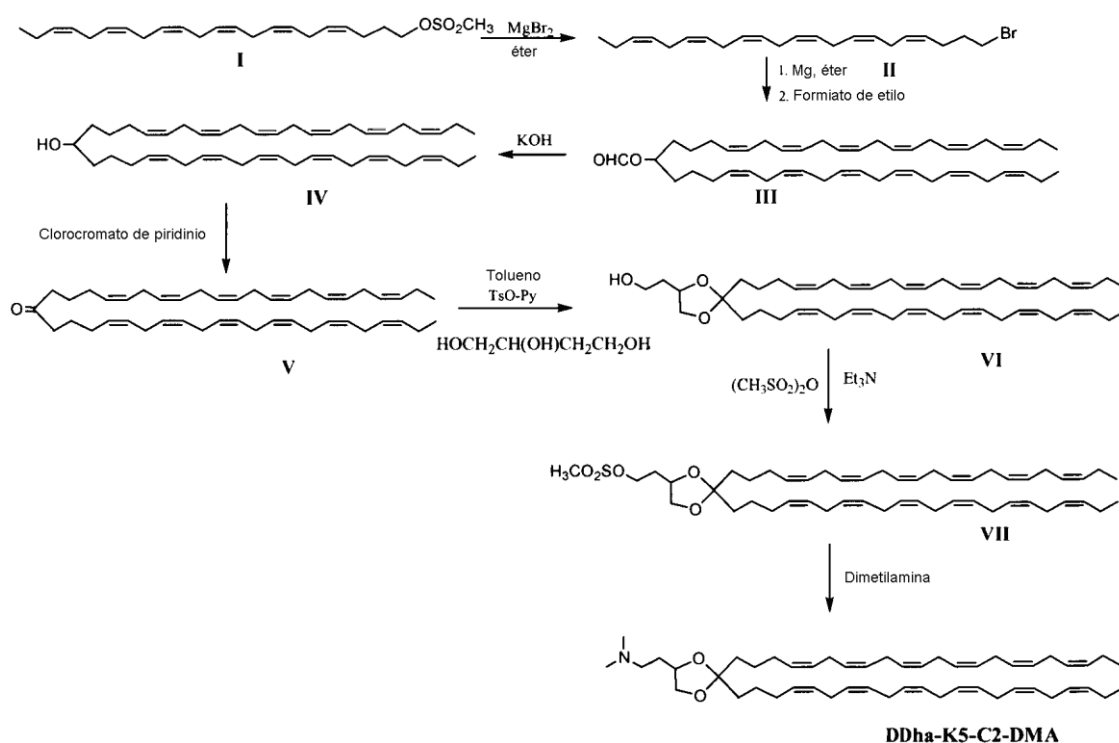
6. Síntesis de 2,2-diaraquidonil-4-(2-metanosulfonietil)-[1,3]-dioxolano (**VII**)

A una solución de 2,2-diaraquidonil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxolano (**VI**, 0,29 g, 0,43 mmoles) y trietilamina seca (254 mg, 2,5 mmoles) en 20 mL de CH_2Cl_2 anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,20 g, 1,1 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con 30 mL de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y se secó sobre $MgSO_4$ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 0,30 g de aceite pálido. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

7. Síntesis de 2,2-diaraquidonil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (**DAra-K5-C2 - DMA**)

A la sustancia bruta anterior (**VII**, 0,30 g) bajo argón se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con un gradiente de metanol al 0-5% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,18 g del producto. **DAra-K5-C2-DMA** en forma de aceite pálido. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,3-5,5 (16H, m, 8 x CH=CH), 4,0-4,17 (2H, m, 2 x OCH), 3,49 (1H, t, OCH), 2,65-2,85 (14H, m, 6 x C=C-CH₂-C=C, NCH₂), 2,55 (6H, s, ancho, 2 x NCH₃), 2,06 (8 H, m, 4 x CH alílico), 1,80-1,92 (2H, m, CH₂), 1,4-1,75 (4H, m, 2 x CH₂), 1,22-1,45 (20H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 25: Síntesis de 2,2-didocosaheptaenoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (**DDha-K5-C2-DMA**)



1. Síntesis de bromuro de docosahexaenoilo (II)

5 Una mezcla de docosahexaenoil metanosulfonato (2,0 g, 5,1 mmoles) y bromuro de magnesio (4,3 g, 23 mmoles) en éter anhidro (100 mL) se agitó en atmósfera de argón durante la noche. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con éter (2 x 30 mL). El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 40 mL) eluyendo con hexanos. Esto proporcionó 2,2 g de bromuro de docosahexaenoilo (II) en forma de aceite incoloro.

10

2. Síntesis de formiato de didocosahexaenoilmetilo (III)

15 A una solución de bromuro de docosahexaenoilo (II, 2,2 g, 6,0 mmoles) en éter anhidro (60 mL) se le añadieron virutas de Mg (145 mg, 6,0 mmoles) seguido de un cristal de yodo. La mezcla resultante se sometió a reflujo bajo argón durante 5 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla turbia en atmósfera de argón se le añadió formiato de etilo (0,50 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla se le añadieron 40 mL de una solución acuosa al 5% de H₂SO₄. La fase de éter se separó y la fase acuosa se extrajo con éter (50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y a continuación se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del solvente proporcionó 2,3 g de aceite de color amarillento en forma de un producto bruto (III). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-7% en hexanos. Esto proporcionó 1,38 g (65%) de formiato de didocosahexaenoilmetilo (III) en forma de aceite pálido.

20

3. Síntesis de didocosahexaenoil metanol (IV)

25 El anterior formiato de didocosahexaenoilmetil (III, 1,38 g, 2,1 mmoles) y KOH (300 mg) se agitaron en EtOH al 90% (70 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 90 minutos. Una vez completada la reacción, la mayor parte del disolvente se evaporó. La mezcla resultante se trató con 60 mL de solución de HCl 2M. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 75 mL). El extracto de éter combinado se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó 1,18 g de IV bruto en forma de un aceite de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-6% en hexanos. Esto proporcionó 1,0 g de didocosahexaenoilmetanol (IV) en forma de aceite incoloro.

30

4. Síntesis de didocosahexaenoil cetona (V)

35 A una mezcla de didocosahexaenoilmetanol (IV, 1,2 g, 1,9 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (0,1 g) en 30 mL de CH₂Cl₂ se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 1,05 g, 4,8 mmoles). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se añadió éter (120 mL) a la mezcla, y la suspensión de color

pardo resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice (75 mL). El lecho se lavó adicionalmente con éter (3 x 75 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 1,3 g de un residuo oleoso como producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0-3% en hexanos. Esto proporcionó 0,83 g (69%) de didocosahexaenoil cetona (V).

5. Síntesis de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxolano (VI)

Una mezcla de diaraquidonil cetona (V, 0,43 g, 0,69 mmoles), 1,2,4-butanotriol (0,35 g, 3,3 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (50 mg) en 75 mL de tolueno se sometieron a reflujo bajo argón durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL) y salmuera (30 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un residuo oleoso de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con metanol al 0-2% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,43 g (95%) de pureza VI en forma de aceite pálido.

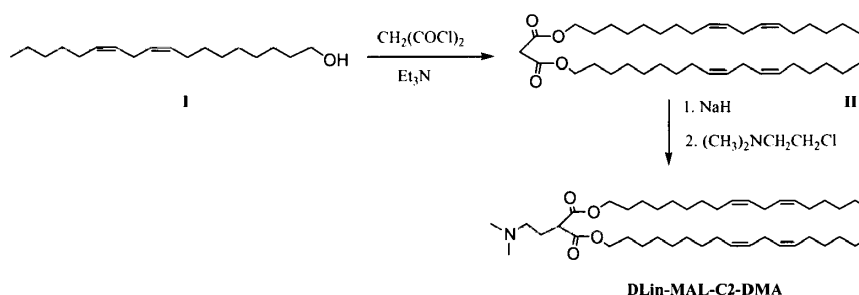
6. Síntesis de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-metanosulfoniletil)-[1,3]-dioxolano (VII)

A una solución de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxolano (VI, 0,42 g, 0,59 mmoles) y trietilamina seca (300 mg, 2,9 mmoles) en 50 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,25 g, 1,4 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 0,43 g de aceite pálido. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

7. Síntesis de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DDha-K5-C2-DMA)

A la sustancia bruta anterior (VII, 0,43 g) bajo argón se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con un gradiente de metanol al 0-5% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,31 g del producto. DDha-K5-C2-DMA en forma de un aceite de color amarillento. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,25-5,45 (24H, m, 12 x CH=CH), 4,05-4,17 (2H, m, 2 x OCH), 3,50 (1H, t, OCH), 2,87-3,15 (2H, ancho, NCH₂) 2,73-2,87 (20H, m, 10 x C=C-CH₂-C=C), 2,65 (6H, s, ancho, 2 x NCH₃), 2,06 (8 H, m, 4 x CH₂ alílico), 2,0-2,2 (2H, m, CH₂), 1,75-1,95 (2H, m, CH₂), 1,3-1,65 (8H, m, 4 x CH₂), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 26: Síntesis de 2-(2-dimetilaminoetil)-malonato de dilinoleilo (DLin-MAL-C2-DMA)



1. Síntesis de malonato de dilinoleilo (II)

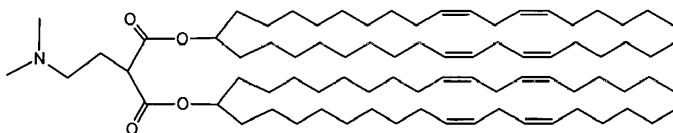
A una solución de alcohol linoleílico (I, 5,0 g, 19 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (70 mL) se le añadió gota a gota dicloruro de malonilo (1,36 g, 9,3 mmoles) en argón a 0-5°C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla se diluyó con 50 mL de CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con agua (3 x 75 mL), salmuera (75 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó un residuo oleoso de color parduzco (5,8 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 200 mL) con un gradiente de acetato de etilo al 0-4% en hexanos como eluyente. Esto proporcionó 3,1 g (55%) de II puro en forma de aceite incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,25-5,45 (8, m, 4x CH=CH), 4,13 (4H, t, 2 x OCH₂), 3,35 (2H, s, CO-CH₂-CO), 2,78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,05 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,55-1,65 (4H, m, CH₂), 1,2-1,4 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

2. Síntesis de 2-(2-dimetilaminoetil)-malonato de dilinoleilo (DLin-MAL-C2-DMA)

A una suspensión de NaH (0,17 g, 60%, 4,1 mmoles) en benceno anhidro (40 mL) se le añadió malonato de dilinoleilo (II, 0,50 g, 0,83 mmoles) bajo argón. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos. A la mezcla resultante se le añadió hidrocloreuro de cloruro de N,N-dimetilaminoetil (0,12 g, 0,83 mmoles) en

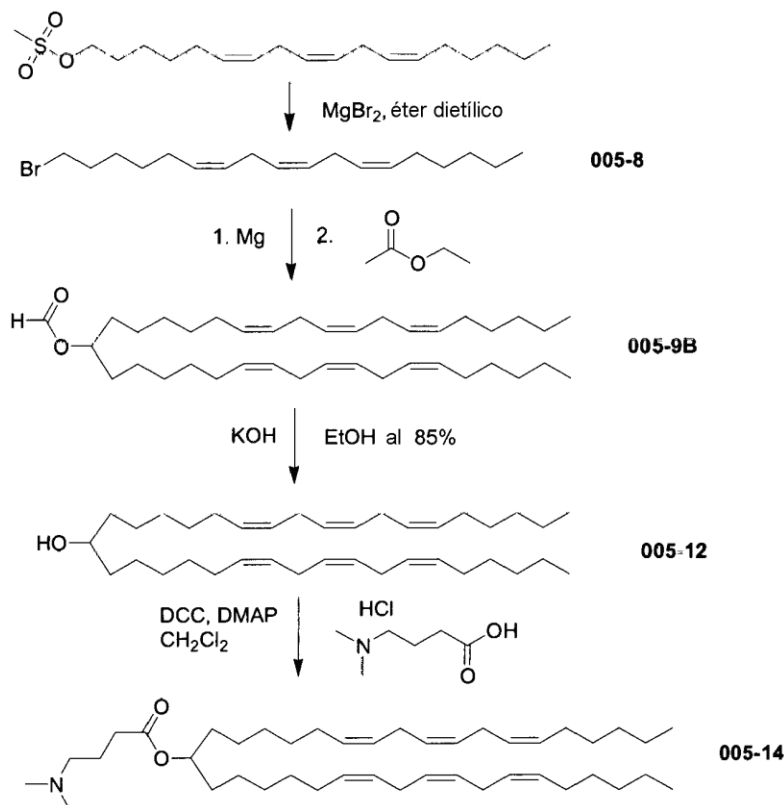
una porción, y la mezcla resultante se sometió a reflujo bajo argón durante 2 días. La fase orgánica se lavó con agua (3 x 20 mL), salmuera (2 x 25 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó un residuo oleoso pálido (0,50 g). La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con metanol al 0-4% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,13 g del producto. **DLin-MAL-C2-DMA** en forma de aceite pálido. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,25-5,40 (8, m, 4 x CH=CH), 4,05-4,20 (4H, m, 2 x OCH₂), 3,47 (1H, t, CO-CH-CO), 2,75 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,35-2,9 (6H, ancho, 2 x NCH₃), 2,15-2,35 (2H, ancho, NCH₂), 2,05 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,55-1,65 (4H, m, CH₂), 1,2-1,45 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 27: Síntesis de 2-(2-dimetilaminoetil)-malonato de dilinoleilo (TetraLin-MAL-C2-DMA)



Este compuesto se sintetizó en forma de aceite pálido de manera similar a la de **Ejemplo 26**, donde el alcohol linoleílico reemplazado por dilinoleilmetanol. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,15-5,50 (16, m, 8 x CH=CH), 4,89 (2H, quinteto), 3,46 (1H, t, CO-CH-CO), 3,08-3,2 (2H, m), 2,8-2,85 (6 H, 2 s), 2,78 (8 H, t, 4 x C=C-CH₂-C=C), 2,35-2,48 (2H, ancho, NCH₂), 2,05 (16 H, q, 8 x CH₂ alílico), 1,45-1,65 (8H, m, CH₂), 1,2-1,45 (64H, m), 0,90 (12H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 28: Síntesis de éster 4-dimetilamino-butírico 1-octadeca-6,9,12-trienil-nonadeca-7,10,13-trienílico (005-14)

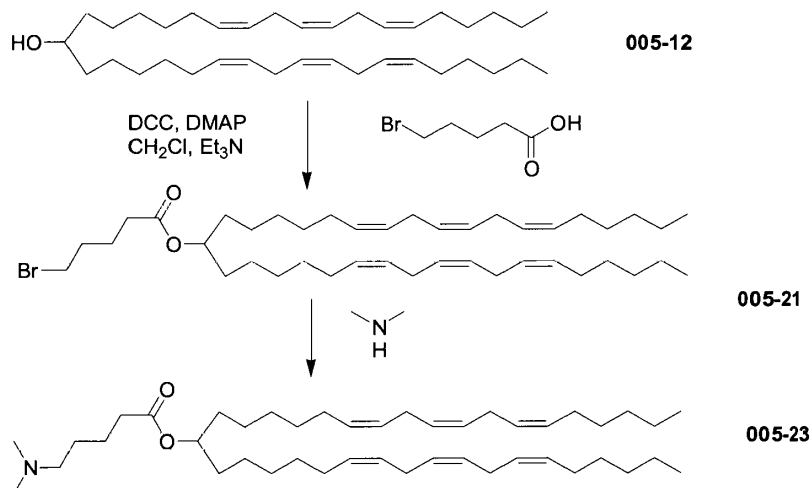


Los compuestos 005-8 a 005-12 se sintetizaron de una manera similar a la de **Ejemplo 19**.

Bajo una atmósfera de argón, a un matraz de fondo redondo cargado con DLen(y)-MeOH (**005-12**, 262 mg, 0,5 mmoles), hidrocloreto de ácido 4-dimetilaminobutírico (101 mg, 0,6 mmoles) y 4-(dimetilamino) piridina (13 mg) en diclorometano (5 mL) se añadió dicitohexilcarbodiimida (134 mg). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el residuo se recogió en éter dietílico. El precipitado de color blanco se descartó mediante filtración. El producto filtrado se concentró hasta sequedad (0,4 g de aceite). El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con metanol en diclorometano al 2% a 3%. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. El residuo se hizo pasar a través de una capa de gel de sílice (2 mm) y se lavó con hexanos (6 mL). El producto filtrado

se concentró a continuación y se secó a alto vacío durante 1 h. Esto proporcionó 166 mg (0,26 mmoles, 53%) de **005-14** en forma de aceite de color amarillo ligeramente transparente. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,41-5,26 (m, 12H, CH=CH), 4,83 (quinteto, J=6 Hz, 1H), 2,77 (tipo t, J=5,2 Hz, 8H), 2,29 (t, J=7,6 Hz, 2H), 2,25 (t, J=7,6, 2H), 2,18 (s, 6H), 2,02 (tipo q, J=6,8 Hz, 8H), 1,75 (tipo quinteto, J=7,6 Hz, 2H), 1,48 (m, 4 H), 1,37 - 1,20 (m, 24 H), 0,86 (t, J=6,8 Hz, 6 H) ppm.

Ejemplo 29: Síntesis de éster 1-octadeca-6,9,12-trienil-nonadeca-7,10,13-trienílico de ácido 5-dimetilamino-pentanoico (005-23)



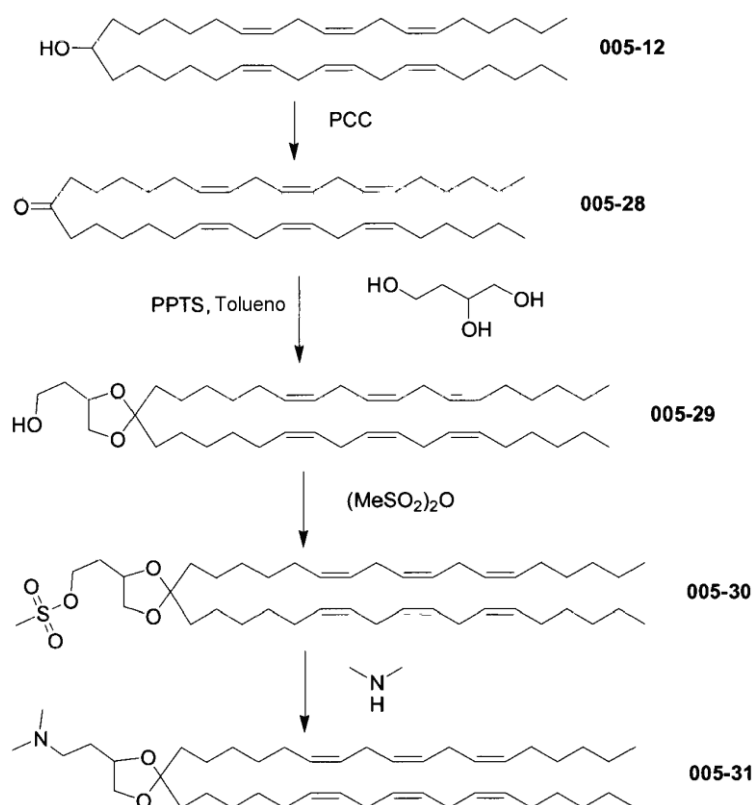
Etapa 1, 005-21:

Bajo una atmósfera de argón, a un matraz de fondo redondo cargado con DLen(y)-MeOH (**005-12**, 262 mg, 0,5 mmoles), ácido 5-bromovalérico (181 mg, 1,0 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (30 mg) en diclorometano (10 mL) se añadió dicitlohexilcarbodiimida (227 mg). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el residuo se recogió en hexanos. El precipitado de color blanco se descartó mediante filtración. El producto filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con acetato en hexanos (0-2%). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. Esto proporcionó 290 mg (0,42 mmoles, 84%) de **005-21** en forma de aceite de color ligeramente amarillo.

Etapa 2, 005-23:

A **005-21** (290 mg) se le añadió dimetilamina (2 M en THF, 10 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. El exceso de amina y disolvente se evaporó. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) con metanol en diclorometano (1 a 3%). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron. El aceite residual se pasó a través de una capa de celite y se lavó con hexanos (6 mL). El producto filtrado se concentró a continuación y se secó a alto vacío durante 2 h. Esto proporcionó 204 mg (0,31 mmoles, 74%) de **005-23** en forma de aceite de color ligeramente amarillo. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,43-5,30 (m, 12H, CH=CH), 4,84 (quinteto, J=6 Hz, 1H), 2,77 (tipo t, J=5,2 Hz, 8H), 2,39-2,28 (m, 4H), 2,28 (s, 6H), 2,06 (tipo q, J=6,8 Hz, 8H), 1,66 (tipo quinteto, J=7,2 Hz, 2H), 1,60-1,48 (m, 6H), 1,41-1,24 (m, 24H), 0,90 (t, 6 H, J=6,8 Hz) ppm.

Ejemplo 30: Síntesis de [2-(2,2-di-octadeca-6,9,12-trienil-[1,3] dioxolan-4-il)-etil]-dimetilamina (005-31)

**Etapas 1, 005-28:**

5 A una mezcla de dilinolenil(y)metanol (**005-12**, 550 mg, 1,05 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (58 mg) en 25 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 566 mg, 2,63 mmoles, 2,5 equivalentes). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. a continuación se añadió éter (100 mL) a la mezcla, y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice (150 mL). El lecho de gel de sílice se lavó adicionalmente con éter (3 x 50 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 510 mg de un residuo oleoso en forma de un producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0-3% en hexanos. Esto proporcionó 344 g (63%) del producto del título (**005-28**).

Etapas 2, 005-29:

15 Una mezcla de **005-28** (344 mg, 0,66 mmoles), 1,2,4-butanotriol (349 mg, 3,2 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (30 mg) en 50 mL de tolueno se calentó a reflujo bajo argón durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (30 mL) (el butanotriol no es soluble en tolueno, por lo que se decantó la solución y se dejó el triol), salmuera (30 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un residuo oleoso de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con acetato de etilo al 4% en hexanos. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. Esto proporcionó 337 mg (83%) de **005-29** puro en forma de aceite incoloro.

Etapas 3, 005-30:

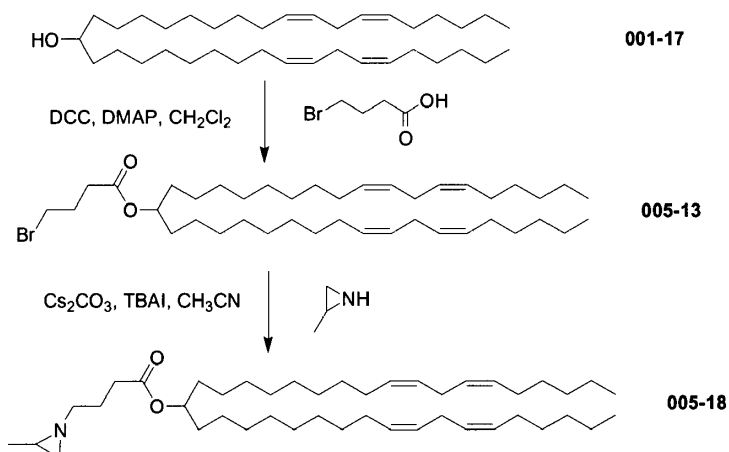
25 A una solución de **005-29** (337 mg, 0,55 mmoles) y trietilamina seca (0,28 mL, 2 mmoles) en 30 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (310 mg, 1,78 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con 30 mL de CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 377 g del producto deseado en forma de un aceite transparente incoloro (99%). El producto era lo suficientemente puro y se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapas 4, 005-31:

35 A **005-30** (377 mg) bajo argón se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La

5 cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 40 mL) se eluyó con metanol al 3% en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron para proporcionar 314 mg del producto del título (**005-31**) en forma de un aceite pálido transparente. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,41-5,26 (m, 12H, CH=CH), 4,06 (m, 1H), 4,01 (dd, 1H, $J=7,5, 7,5$ Hz), 3,45 (dd, 1H, $J=7,5, 7,5$ Hz), 2,77 (tipo t, $J=5,6$ Hz, 8H), 2,36 (m, 1H), 2,26 (m, 1H), 2,19 (s, 6H), 2,02 (tipo q, $J=6,8$ Hz, 8H), 1,78 (m, 1 H), 1,67 (m, 1 H), 1,60 - 1,51 (m, 4 H), 1,38 - 1,21 (m, 24 H), 0,86 (t, 6 H, $J=6,8$ Hz) ppm.

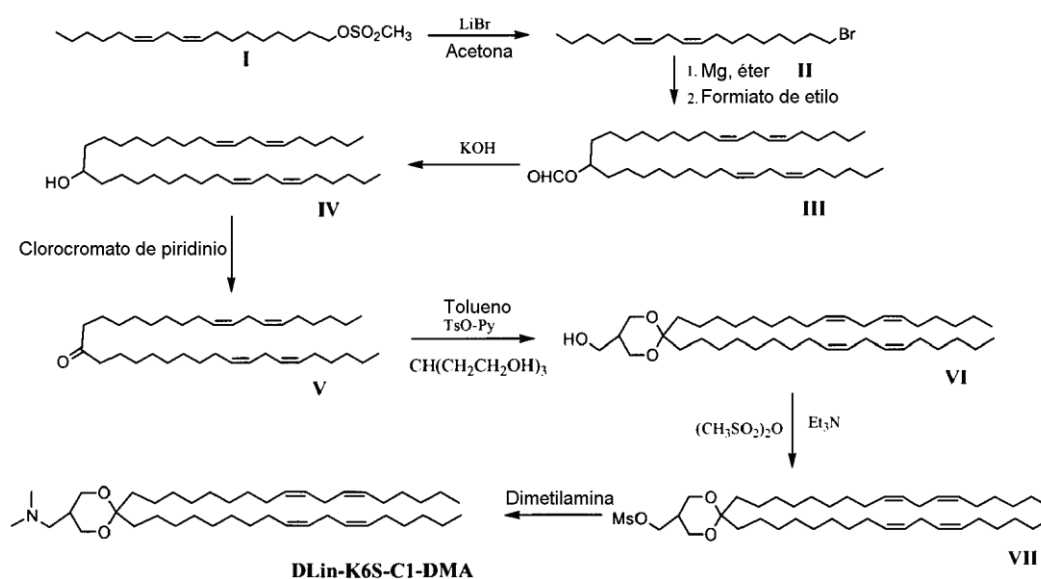
10 **Ejemplo 31: Síntesis de éster 1-octadeca-9,12-dienil-nonadeca-10,13-dienílico de ácido 4-(2-metil-aziridin-1-il)-butírico (005-18)**



15 **Etapa 1, 005-13:** Bajo una atmósfera de argón, a un matraz de fondo redondo cargado con DLin-MeOH (**001-17**, 528,9 mg), ácido 4-bromobutírico (200 mg) y 4-(dimetilamino)piridina (25 mg) en diclorometano (10 mL) se le añadió dicitlohexilcarbodiimida (268 mg). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el residuo se recogió en éter dietílico. El precipitado de color blanco (DCU) se descartó mediante filtración. El producto filtrado se concentró y el aceite residual resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0 a 1% en hexanos. Esto proporcionó 0,44 g (65%) de **005-13** en forma de aceite incoloro.

20 **Etapa 2, 005-18:** Una mezcla de **005-13** (0,44 g, 0,65 mmoles), 2-metilaziridina (148 mg, 2,6 mmoles, tec. 90%), Cs_2CO_3 (2,6 mmoles) y TBAI (2,4 mmoles) en acetonitrilo (10 mL) se agitó en atmósfera de Ar durante 4 días. Después de eliminar el disolvente, al residuo se le añadieron hexanos y agua. Las dos fases se separaron, seguido de la extracción de la fase acuosa con hexanos (X 2). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad. El aceite residual resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con metanol al 1% a 3% en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron (200 mg de aceite). Esto se purificó de nuevo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con gradiente de acetato de etilo en hexanos (5% - 20%). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. Esto proporcionó 96 mg (33%) de **005-18** en forma de aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,43-5,30 (m, 8H, CH=CH), 4,87 (quinteto, $J=6$ Hz, 1H), 2,78 (tipo t, $J=6$ Hz, 4H), 2,39 (tipo t, $J=7,8$ Hz, 2H), 2,26 (tipo t, 2H), 2,06 (tipo q, $J=6,8$ Hz, 8H), 1,89 (tipo un quinteto, $J=7,2$ Hz, 2H), 1,56-1,48 (m, 5H), 1,41-1,24 (m, 38H), 1,18 (d, $J=5,2$ Hz, 3H), 0,90 (t, 6H, $J=6,8$ Hz) ppm.

35 **Ejemplo 32: Síntesis de 2,2-dilinoil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C1-DMA)**



8. Síntesis de bromuro de linoleilo (II)

5 Una mezcla de metanosulfonato de linoleilo (26,6 g, 77,2 mmoles) y bromuro de litio (30,5 g, 350 mmoles) en acetona (350 mL) se agitó en nitrógeno durante dos días. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con acetona. El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se trató con agua (300 mL). La fase acuosa se extrajo con éter (3 x 150 mL). La fase de éter combinada se lavó con agua (200 mL), salmuera (200 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 29,8 g de un aceite de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 700 mL) eluyendo con hexanos. Esto proporcionó 20,8 g (82%) de bromuro de linoleilo (II).

9. Síntesis de formiato de dilinoleilmetilo (III)

15 A una suspensión de virutas de Mg (1,64 g, 67,4 mmoles) con un cristal de yodo en 500 mL de éter anhidro en nitrógeno se le añadió una solución de bromuro de linoleilo (II, 18,5 g, 56,1 mmoles) en 250 mL de éter anhidro a temperatura ambiente. La mezcla resultante se sometió a reflujo bajo nitrógeno durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla turbia bajo nitrógeno se le añadió gota a gota formiato de etilo (4,24 g, 57,2 mmoles). Después de la adición, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se trató con una solución acuosa al 10% de H_2SO_4 (250 mL). La fase de éter se separó y la fase acuosa se extrajo con éter (150 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (400 mL), salmuera (300 mL), y a continuación se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del solvente proporcionó 17,8 g de aceite de color amarillento en forma de un producto bruto (III). El producto bruto se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

10. Síntesis de dilinoleil metanol (IV)

25 El formiato de dilinoleilmetil bruto anterior (III, 17,8 g) y KOH (3,75 g) se agitaron en EtOH al 85% a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Una vez completada la reacción, la mayor parte del disolvente se evaporó. La mezcla resultante se vertió en 150 mL de solución de HCl al 5%. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 150 mL). El extracto de éter combinado se lavó con agua (2 x 100 mL), salmuera (100 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó 20,0 g de dilinoleilmetanol (IV) en forma de un aceite de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 700 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-5% en hexanos. Esto proporcionó 9,6 g de dilinoleil metanol (IV).

11. Síntesis de dilinoleil cetona (V)

35 A una mezcla de dilinoleil metanol (4,0 g, 7,2 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (0,4 g) en 100 mL de CH_2Cl_2 se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 4,0 g, 19 mmoles). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se añadió éter (300 mL) a la mezcla, y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice (150 mL). El lecho de gel de sílice se lavó adicionalmente con éter (3 x 75 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 5,1 g de un residuo oleoso en forma de un producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 200 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0-4% en hexanos. Esto proporcionó 3,0 g (79%) de la dilinoleil cetona (V).

12. Síntesis de 2,2-dilinoileil-5-hidroximetil-[1,3]-dioxano (VI)

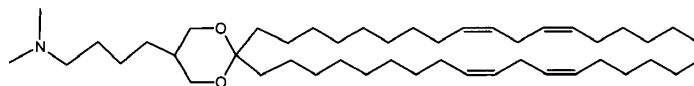
Una mezcla de dilinoileil cetona (V, 1,05 g, 2,0 mmoles), 2-hidroximetil-1,3-propanodiol (490 mg, 4,2 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (100 mg, 0,4 mmoles) en 150 mL de tolueno se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 100 mL), salmuera (100 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un aceite pálido (1,2 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 100 mL) con un gradiente de metanol al 0-5% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,93 g de VI puro en forma de aceite pálido.

13. Síntesis de 2,2-dilinoileil-5-metanosulfonilmetil-[1,3]-dioxano (VII)

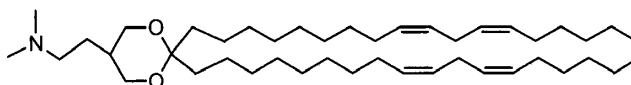
A una solución de 2,2-dilinoileil-5-hidroximetil-[1,3]-dioxano (VI, 0,93 g, 1,5 mmoles) y trietilamina seca (290 mg, 2,9 mmoles) en 50 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (400 mg, 2,3 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 75 mL), salmuera (75 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 1,0 g de aceite pálido. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

14. Síntesis de 2,2-dilinoileil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C1-DMA)

A la sustancia bruta anterior (VII, 1,0 g) en atmósfera de nitrógeno se le añadieron 20 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 100 mL) con un gradiente de metanol al 0-3% en cloroformo como eluyente dio como resultado 150 mg del producto. **DLin-K6S-C1-DMA** en forma de aceite pálido. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,24-5,51 (8, m, 4x CH=CH), 4,04 (2H, dd, 2 x OCH), 3,75 (2H, dd OCH), 2,7-2,9 (2H, ancho, NCH₂), 2,78 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,57 (6H, s, 2 x NCH₃), 1,95-2,17 (9H, q, 4 x CH₂ y CH alílicos), 1,67-1,95 (2H, m, CH₂), 1,54-1,65 (4H, m, 2 x CH₂), 1,22-1,45 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

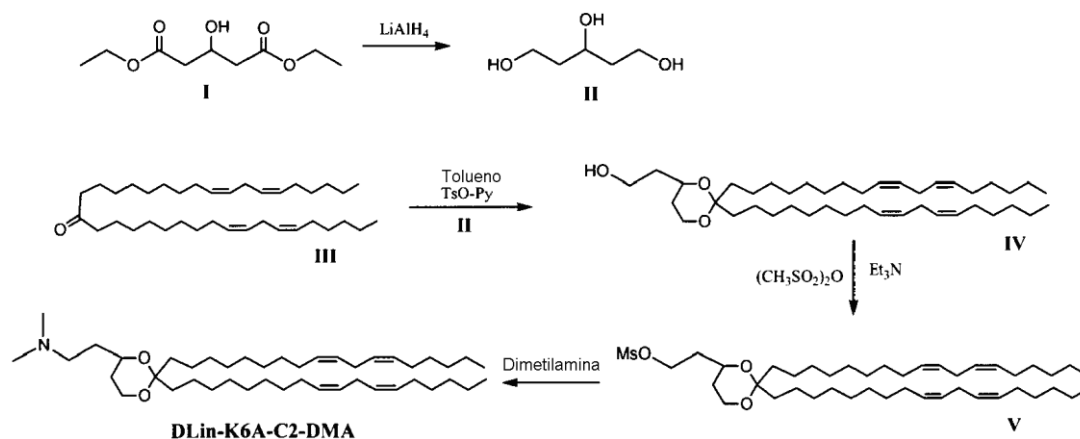
Ejemplo 33: Síntesis de 2,2-dilinoileil-5-dimetilaminobutil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C4-DMA)

Este compuesto se sintetizó en forma de aceite pálido de manera similar a la del **Ejemplo 32**, donde el 2-hidroximetil-1,3-propanodiol se reemplazó por 2-hidroxiobutil-1,3-propanodiol. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,24-5,45 (8, m, 4x CH=CH), 3,79 (2H, dd, 2 x OCH), 3,50 (2H, dd OCH), 2,76 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,37 (2H, t, NCH₂), 2,31 (6 H, s, 2 x NCH₃), 2,04 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,63-1,90 (3H, m), 1,45-1,62 (4H, m, 2 x CH₂), 1,22-1,45 (36H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 34: Síntesis de 2,2-dilinoileil-5-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxano (DLin-K6S-C2-DMA)

Este compuesto se sintetizó en forma de aceite pálido de manera similar a la de **Ejemplo 32**, donde el 2-hidroximetil-1,3-propanodiol se reemplazó por 2-hidroxi-etil-1,3-propanodiol. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,25-5,45 (8, m, 4x CH=CH), 3,87 (2H, dd, 2 x OCH), 3,55 (2H, dd OCH), 2,75 (4H, t, 2 x C=C-CH₂-C=C), 2,45-2,60 (2H, ancho, NCH₂), 2,40 (6H, s, 2 x NCH₃), 2,03 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,73-1,86 (1H, m), 1,56-1,72 (6H, m, 2 x CH₂), 1,22-1,45 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 35: Síntesis de 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C2-DMA)



5. Síntesis de 1,3,5-pentanotriol (II)

5 Se añadió gota a gota 3-hidroxioglutarato de dietilo (I, 1,0 g, 4,9 mmoles) en THF anhidro (10 mL) a una suspensión de LiAlH_4 en THF anhidro (110 mL) en nitrógeno con un baño de agua fría. Después de la adición, el baño se retiró y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla resultante se sofocó añadiendo 13 mL de salmuera muy lentamente con un baño de agua helada. Se obtuvo una suspensión de color blanco, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se filtró y se lavó con THF. El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó para proporcionar 0,70 g de aceite pálido. La cromatografía en columna del producto bruto (SiO_2 de malla 230-400, 100 mL, gradiente de metanol al 0-12% en cloroformo) proporcionó 0,54 g de II en forma de aceite incoloro.

6. Síntesis de 2,2-Dilinoil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxano (IV)

15 Una mezcla de dilinoil cetona (III, 0,80 g, 1,5 mmoles), 1,3,5-pentanotriol (II, 0,54 g, 4,5 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (60 mg, 0,24 mmoles) en 150 mL de tolueno se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 75 mL), salmuera (75 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un aceite pálido (1,1 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 75 mL) con un gradiente de metanol al 0-3% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,75 g (79%) de IV puro en forma de aceite incoloro.

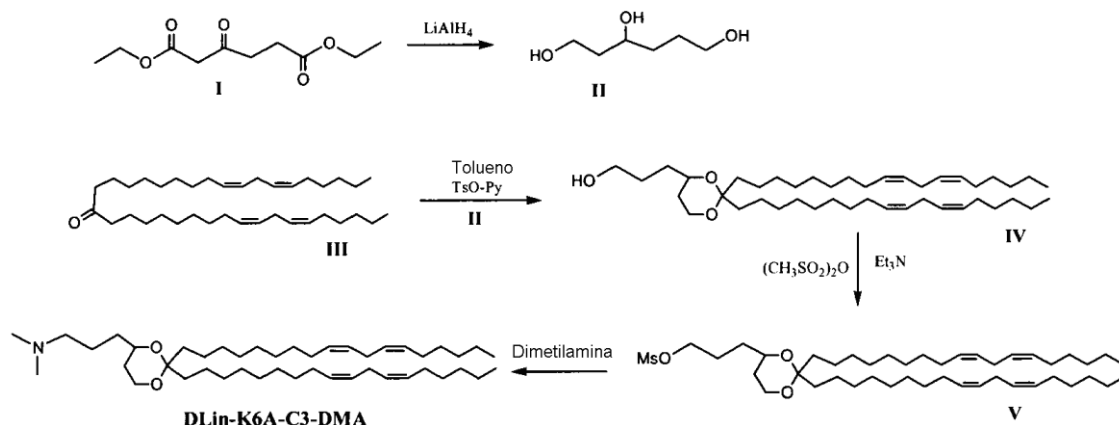
7. Síntesis de 2,2-dilinoil-4-(2-metanosulfoniletil)-[1,3]-dioxano (V)

25 A una solución de 2,2-dilinoil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxano (IV, 0,75 g, 1,2 mmoles) y trietilamina seca (0,58 g, 5,7 mmoles) en 40 mL de CH_2Cl_2 anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,50 g, 2,9 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 0,80 g de aceite pálido en forma de un producto bruto. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

8. Síntesis de 2,2-dilinoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C2-DMA)

35 A la sustancia bruta anterior (V, 0,80 g) bajo nitrógeno se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. El sólido se filtró. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 100 mL) con un gradiente de metanol al 0-6% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,70 g del producto. **DLin-K6A-C2-DMA** en forma de aceite pálido. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,28-5,45 (8, m, 4x CH=CH), 3,85-4,0 (2H, m, 2 x OCH), 3,78 (1H, dd, OCH), 2,78 (4H, t, 2 x C=C -CH₂-C=C), 2,55-2,90 (2H, ancho, NCH₂), 2,47 (6H, s, 2 x NCH₃), 2,05 (8H, q, 4 x CH₂ alílico), 1,65-1,90 (4H, m, CH₂), 1,47-1,65 (4H, m, CH₂), 1,1-1,65 (36H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

Ejemplo 36: Síntesis de 2,2-dilinoil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C3-DMA)



5. Síntesis de 1,3,6-hexanotriol (II)

5 Se añadió gota a gota β -ceto adipato de dietilo (**I**, 1,86 g, 8,6 mmoles) a una suspensión de LiAlH_4 en THF anhidro (90 mL) bajo argón con un baño de agua helada. Después de la adición, el baño se retiró y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante se sofocó añadiendo 10 mL de salmuera muy lentamente con un baño de agua helada. Se obtuvo una suspensión de color blanco, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se filtró y se lavó con THF seguido de EtOH (2 x 50 mL). El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó para proporcionar 0,90 g de aceite pálido. La cromatografía en columna del producto bruto (SiO_2 de malla 230-400, 100 mL, gradiente de metanol al 0-10% en diclorometano) proporcionó 0,70 g de **II** en forma de aceite incoloro.

6. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(3-hidroxiopropil)-[1,3]-dioxano (IV)

15 Una mezcla de dilinoleil cetona (**III**, 1,80 g, 3,4 mmoles), 1,3,6-hexanotriol (**II**, 0,50 g, 3,7 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (100 mg, 0,40 mmoles) en 120 mL de tolueno se sometió a reflujo bajo argón durante 3 horas con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un aceite pálido (2,0 g). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) con un gradiente de metanol al 0-3% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,90 g (41%) de **IV** puro en forma de aceite incoloro.

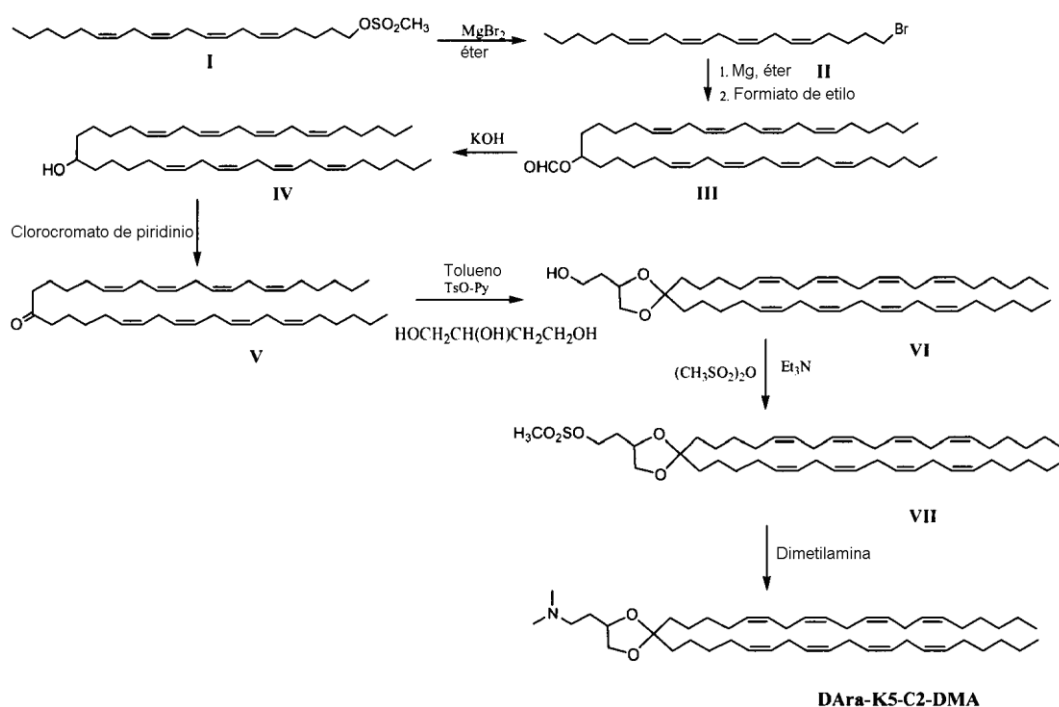
7. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(3-metanosulfonilpropil)-[1,3]-dioxano (V)

25 A una solución de 2,2-dilinoleil-4-(3-hidroxiopropil)-[1,3]-dioxano (**IV**, 0,97 g, 1,5 mmoles) y trietilamina seca (0,44 g, 4,3 mmoles) en 60 mL de CH_2Cl_2 anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,60 g, 3,5 mmoles) en argón. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL) y salmuera (30 mL) y se secó sobre MgSO_4 anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 1,1 g de aceite pálido en forma de un producto bruto. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

8. Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxano (DLin-K6A-C3-DMA)

35 A la sustancia bruta anterior (**V**, 1,1 g) bajo argón se le añadieron 20 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. El sólido se filtró. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con un gradiente de metanol al 0-7% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,85 g del producto. **DLin-K6A-C3-DMA** en forma de aceite pálido. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,25-5,45 (8, m, 4 x $\text{CH}=\text{CH}$), 3,7-4,0 (3H, m, 3 x OCH), 2,77 (4H, t, 2 x $\text{C}=\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$), 2,5-2,8 (2H, ancho, NCH_2), 2,5 (6 H, s, 2 x NCH_3), 2,05 (8H, q, 4 x CH alílico), 1,65-1,90 (4H, m, 2 x CH_2), 1,40-1,65 (4H, m, 2 x CH_2), 1,1-1,65 (38H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

Ejemplo 37: Síntesis de 2,2-diazaquidonil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (Dara-K5-C2-DMA)



8. Síntesis de bromuro de araquidonilo (II)

5 Una mezcla de metanosulfonato de araquidonilo (1,0 g, 2,7 mmoles) y bromuro de magnesio (2,2 g, 12 mmoles) en éter anhidro (40 mL) se agitó bajo argón durante dos días. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con éter (2 x 10 mL). El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se trató con hexanos (50 mL). El sólido se filtró y el disolvente se evaporó dando como resultado un residuo oleoso. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 30 mL) eluyendo con hexanos. Esto proporcionó 1 g de bromuro de araquidonilo (II) en forma de aceite incoloro.

9. Síntesis de formiato de diaraquidonilmetilo (III)

15 A una solución de bromuro de araquidonilo (II, 1 g, 3 mmoles) en éter anhidro (30 mL) se le añadieron virutas de Mg (78 mg, 3,2 mmoles) seguido de un cristal de yodo. La mezcla resultante se calentó a reflujo en nitrógeno durante 10 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla turbia en atmósfera de nitrógeno se le añadió formiato de etilo (0,25 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla se añadieron 20 mL de una solución acuosa al 10% de H₂SO₄. La fase de éter se separó y la fase acuosa se extrajo con éter (30 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y a continuación se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del solvente proporcionó 1,1 g de aceite pálido en forma de un producto bruto (III). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con un gradiente al 0-3% de acetato de etilo en hexanos. Esto proporcionó 0,43 g (40%) de formiato de diaraquidonilmetilo (III) en forma de aceite pálido.

10. Síntesis de Diaraquidonil metanol (IV)

25 El formiato de diaraquidonilmetilo anterior (III, 0,43 g, 0,71 mmoles) y KOH (100 mg) se agitaron en EtOH al 95% (20 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. Una vez completada la reacción, la mayor parte del disolvente se evaporó. La mezcla resultante se trató con 20 mL de solución de HCl 2M. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 30 mL). El extracto de éter combinado se lavó con agua (2 x 25 mL) y salmuera (25 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó 0,44 g de IV en forma de aceite pálido. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-5% en hexanos. Esto proporcionó 0,41 g de diaraquidonilmetanol (IV) en forma de aceite incoloro.

11. Síntesis de diaraquidonil cetona (V)

40 A una mezcla de diaraquidonil metanol (IV, 0,41 g, 0,71 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (0,05 g) en 10 mL de CH₂Cl₂ se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 0,50 g, 2,3 mmoles). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. A continuación se le añadió éter (50 mL) a la mezcla, y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de floresil (30 mL). El lecho se lavó adicionalmente con éter (3 x

30 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 0,40 g de un residuo oleoso como producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 10 mL) eluyendo con éter al 0-3% en hexanos. Esto proporcionó 0,30 g (75%) de diaraquinonil cetona (**V**). RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,3-5,5 (16H, m, 8 x $CH=CH$), 2,82 (12H, t, 6 x $C=C-CH_2-C=C$), 2,40 (4H, t, 2 x $CO-CH_2$), 2,08 (8 H, m, 4 x CH_2 alílico), 1,25-1,65 (20H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

12. Síntesis de 2,2-diarquinonil-4-(2-hidroxietyl)-[1,3]-dioxolano (**VI**)

Una mezcla de diaraquinonil cetona (**V**, 0,30 g, 0,52 mmoles), 1,2,4-butanotriol (0,25 g, 2,4 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (20 mg) en 60 mL de tolueno se sometió a reflujo en argón durante la noche con un tubo Dean-Stark. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL), salmuera (30 mL) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un residuo oleoso de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con metanol al 0-2% en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,29 g (84%) de **VI** puro en forma de aceite pálido.

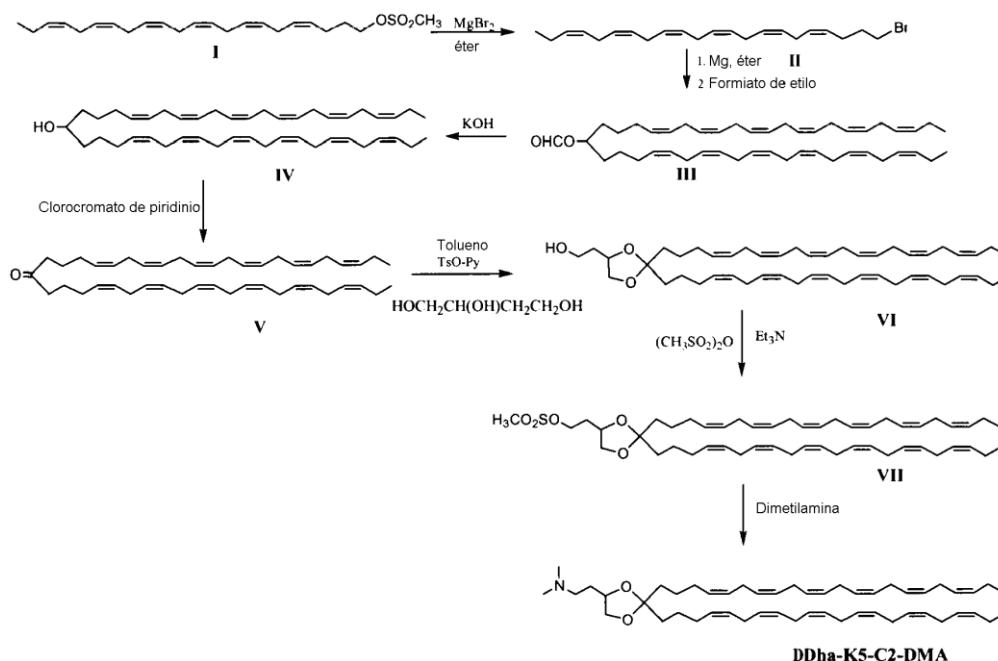
13. Síntesis de 2,2-diarquinonil-4-(2-metanosulfonyletil)-[1,3]-dioxolano (**VII**)

A una solución de 2,2-diarquinonil-4-(2-hidroxietyl)-[1,3]-dioxolano (**VI**, 0,29 g, 0,43 mmoles) y trietilamina seca (254 mg, 2,5 mmoles) en 20 mL de CH_2Cl_2 anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,20 g, 1,1 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con 30 mL de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y se secó sobre $MgSO_4$ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 0,30 g de aceite pálido. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

14. Síntesis de 2,2-diarquinonil-4-(2-dimetilaminoetyl)-[1,3]-dioxolano (**DARA-K5-C2-DMA**)

A la sustancia bruta anterior (**VII**, 0,30 g) bajo argón se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con un gradiente de metanol al 0-5% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,18 g del producto. **DARA-K5-C2-DMA** en forma de aceite pálido. RMN H^1 (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5,3-5,5 (16H, m, 8 x $CH=CH$), 4,0-4,17 (2H, m, 2 x OCH), 3,49 (1H, t, OCH), 2,65-2,85 (14H, m, 6 x $C=C-CH_2-C=C$, NCH_2), 2,55 (6H, s, ancho, 2 x NCH_3), 2,06 (8 H, m, 4 x CH alílico), 1,80-1,92 (2H, m, CH_2), 1,4-1,75 (4H, m, 2 x CH_2), 1,22-1,45 (20H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH_3) ppm.

Ejemplo 38: Síntesis de 2,2-didocosaheptaenoil-4-(2-dimetilaminoetyl)-[1,3]-dioxolano (**DDha-K5-C2-DMA**)



8. Síntesis de bromuro de docosaheptaenoilo (**II**)

Una mezcla de metanosulfonato de docosaheptaenoilo (2,0 g, 5,1 mmoles) y bromuro de magnesio (4,3 g, 23 mmoles) en éter anhidro (100 mL) se agitó en atmósfera de argón durante la noche. La suspensión resultante se

filtró y el sólido se lavó con éter (2 x 30 mL). El producto filtrado y el lavado se combinaron y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 40 mL) eluyendo con hexanos. Esto proporcionó 2,2 g de bromuro de docosahexaenoilo (II) en forma de aceite incoloro.

5 9. Síntesis de formiato de didocosahexaenoilmetilo (III)

A una solución de bromuro de docosahexaenoilo (II, 2,2 g, 6,0 mmoles) en éter anhidro (60 mL) se le añadieron virutas de Mg (145 mg, 6,0 mmoles) seguido de un cristal de yodo. La mezcla resultante se sometió a reflujo bajo argón durante 5 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla turbia en atmósfera de argón se le añadió formiato de etilo (0,50 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla se le añadieron 40 mL de una solución acuosa al 5% de H₂SO₄. La fase de éter se separó y la fase acuosa se extrajo con éter (50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y a continuación se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del solvente proporcionó 2,3 g de aceite de color amarillento en forma de un producto bruto (III). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-7% en hexanos. Esto proporcionó 1,38 g (65%) de formiato de didocosahexaenoilmetilo (III) en forma de aceite pálido.

10. Síntesis de didocosahexaenoil metanol (IV)

20 El formiato didocosahexaenoilmetil anterior (III, 1,38 g, 2,1 mmoles) y KOH (300 mg) se agitaron en EtOH al 90% (70 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 90 minutos. Una vez completada la reacción, la mayor parte del disolvente se evaporó. La mezcla resultante se trató con 60 mL de solución de HCl 2M. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 75 mL). El extracto de éter combinado se lavó con agua (2 x 50 mL), salmuera (50 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del disolvente proporcionó 1,18 g de bruto IV en forma de un aceite de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-6% en hexanos. Esto proporcionó 1,0 g de didocosahexaenoilmetanol (IV) en forma de aceite incoloro.

11. Síntesis de didocosahexaenoil cetona (V)

30 A una mezcla de didocosahexaenoilmetanol (IV, 1,2 g, 1,9 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (0,1 g) en 30 mL de CH₂Cl₂ se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 1,05 g, 4,8 mmoles). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. a continuación se añadió éter (120 mL) a la mezcla, y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice (75 mL). El lecho se lavó adicionalmente con éter (3 x 75 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 1,3 g de un residuo oleoso en forma de un producto bruto. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0-3% en hexanos. Esto proporcionó 0,83 g (69%) de didocosahexaenoil cetona (V).

40 12. Síntesis de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-hidroxietyl)-[1,3]-dioxolano (VI)

Una mezcla de diaraquidonil cetona (V, 0,43 g, 0,69 mmoles), 1,2,4-butanotriol (0,35 g, 3,3 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (50 mg) en 75 mL de tolueno se sometió a reflujo bajo argón durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL) y salmuera (30 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un residuo oleoso de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con 0-2% de metanol en diclorometano como eluyente. Esto proporcionó 0,43 g (95%) de VI puro en forma de aceite pálido.

50 13. Síntesis de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-metanosulfoniletil)-[1,3]-dioxolano (VII)

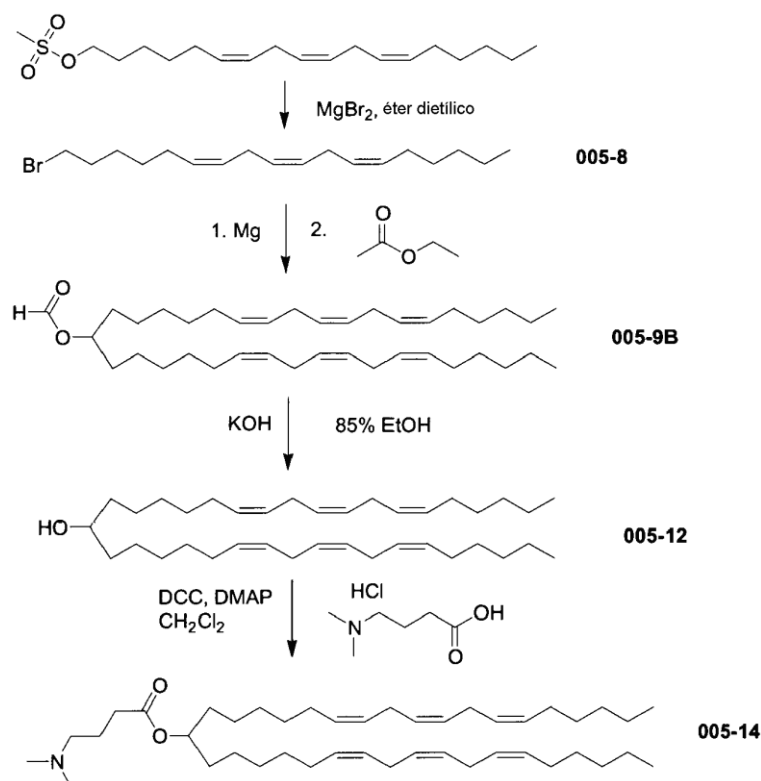
A una solución de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-hidroxietyl)-[1,3]-dioxolano (VI, 0,42 g, 0,59 mmoles) y trietilamina seca (300 mg, 2,9 mmoles) en 50 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (0,25 g, 1,4 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 0,43 g de aceite pálido. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

14. Síntesis de 2,2-didocosahexaenoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DDha-K5-C2 - DMA)

60 A la sustancia bruta anterior (VII, 0,43 g) bajo argón se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) con un gradiente de metanol al 0-5% en diclorometano como eluyente dio como resultado 0,31 g del producto. DDha-K5-C2-DMA en forma de un aceite de color amarillento. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,25-5,45 (24H, m, 12 x CH=CH), 4,05-4,17 (2H, m, 2 x OCH), 3,50 (1H, t, OCH), 2,87-3,15 (2H, ancho, NCH₂) 2,73-2,87 (20H, m, 10 x C=C-CH₂-C=C), 2,65

(6H, s, ancho, 2 x NCH₃), 2,06 (8 H, m, 4 x CH₂ alílico), 2,0-2,2 (2H, m, CH₂), 1,75-1,95 (2H, m, CH₂), 1,3-1,65 (8H, m, 4 x CH₂), 0,90 (6H, t, 2 x CH₃) ppm.

5 **Ejemplo 39: Síntesis de éster 1-octadeca-6,9,12-trienil-nonadeca-7,10,13-trienílico de ácido 4-dimetilamino-butírico (005-14)**

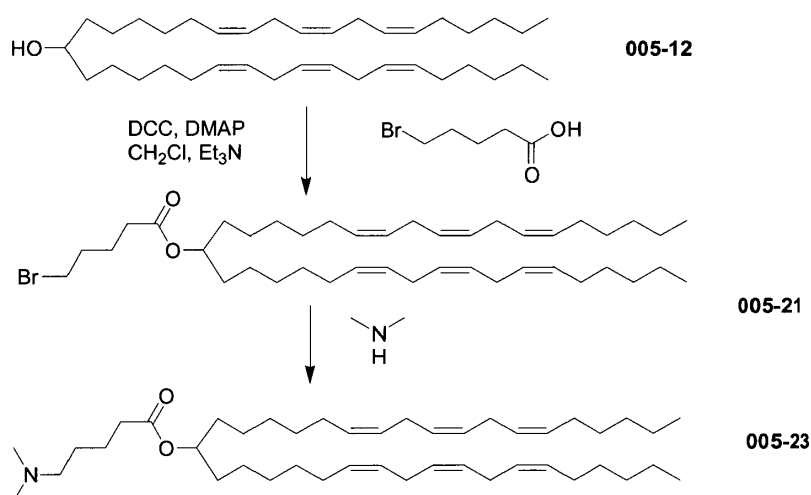


10 Bajo una atmósfera de argón, a un matraz de fondo redondo cargado con DLen(y)-MeOH (**005-12**, 262 mg, 0,5 mmoles), hidrocloreto de ácido 4-dimetilaminobutírico (101 mg, 0,6 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (13 mg) en diclorometano (5 mL) se le añadió dicitohexilcarbodiimida (134 mg). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el residuo se recogió en éter dietílico. El precipitado de color blanco se descartó mediante filtración. El producto filtrado se concentró hasta sequedad (0,4 g de aceite). El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con metanol de 2% a 3% en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. El residuo se hizo pasar a través de una capa de gel de sílice (2 mm) y se lavó con hexanos (6 mL). El producto filtrado se concentró a continuación y se secó en alto vacío durante 1 h. Esto proporcionó 166 mg (0,26 mmoles, 53%) de **005-14** en forma de aceite claro ligeramente de color amarillo. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,41-5,26 (m, 12H, CH=CH), 4,83 (quinteto, J=6 Hz, 1H), 2,77 (tipo t, J=5,2 Hz, 8H), 2,29 (t, J=7,6 Hz, 2H), 2,25 (t, J=7,6 Hz, 2H), 2,18 (s, 6H), 2,02 (tipo q, J=6,8 Hz, 8H), 1,75 (tipo quinteto, J=7,6 Hz, 2H), 1,48 (m, 4 H), 1,37 - 1,20 (m, 24 H), 0,86 (t, J=6,8 Hz, 6 H) ppm.

15

20

25 **Ejemplo 40: Síntesis de éster 1-octadeca-6,9,12-trienil-nonadeca-7,10,13-trienílico de ácido 5-dimetilamino-pentanoico (005-23)**

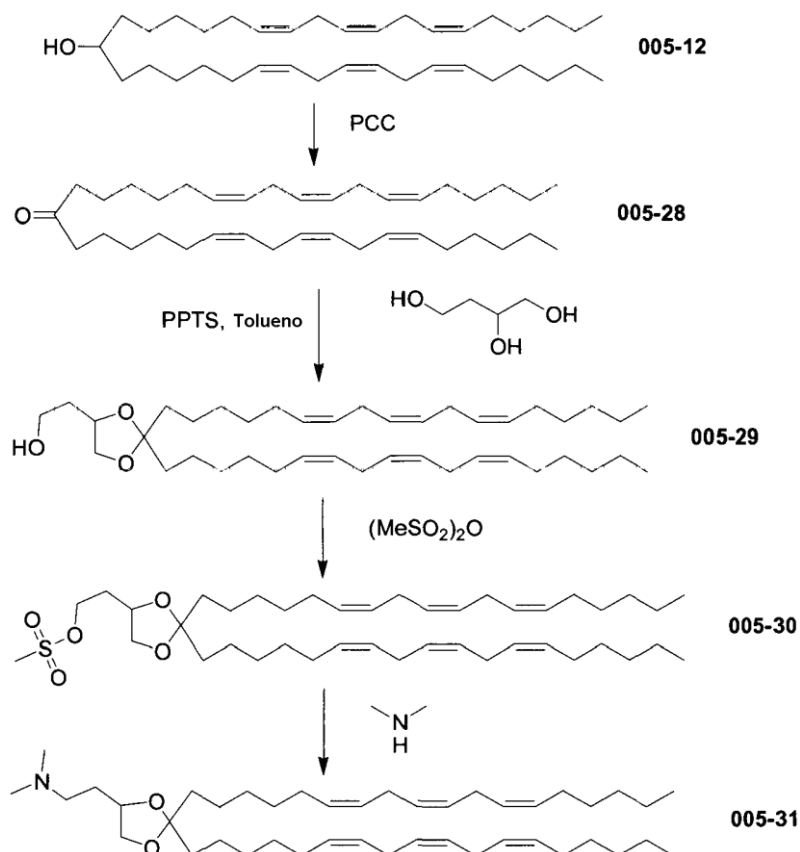
**Etapla 1,005-21:**

- 5 Bajo una atmósfera de argón, a un matraz de fondo redondo cargado con DLen(y)-MeOH (**005-12**, 262 mg, 0,5 mmoles), ácido 5-bromovalerico (181 mg, 1,0 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (30 mg) en diclorometano (10 mL) se le añadió dicitclohexilcarbodiimida (227 mg). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el residuo se recogió en hexanos. El precipitado de color blanco se descartó mediante filtración. El producto filtrado se concentró hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía
- 10 en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con acetato en hexanos (0-2%). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. Esto proporcionó 290 mg (0,42 mmoles, 84%) de **005-21** en forma de aceite de color ligeramente amarillo.

Etapla 2, 005-23:

- 15 A **005-21** (290 mg) se le añadió dimetilamina (2 M en THF, 10 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. El exceso de amina y disolvente se evaporó. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) con metanol en diclorometano (1 a 3%). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron. El aceite residual se pasó a través de una capa de celite y se lavó con hexanos (6 mL). El producto filtrado se concentró a continuación y se secó a alto vacío durante 2 h. Esto proporcionó 204 mg (0,31 mmoles, 74%) de **005-23** en forma de aceite de color ligeramente amarillo. RMN H¹ (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,43-5,30 (m, 12H, CH=CH), 4,84 (quinteto, J=6 Hz, 1H), 2,77 (tipo t, J=5,2 Hz, 8H), 2,39-2,28 (m, 4H), 2,28 (s, 6H), 2,06 (tipo q, J=6,8 Hz, 8H), 1,66 (tipo un quinteto, J=7,2 Hz, 2H), 1,60-1,48 (m, 6H), 1,41-1,24 (m, 24H), 0,90 (t, 6 H, J=6,8 Hz) ppm.
- 25

Ejemplo 41: Síntesis de [2-(2,2-Di-octadeca-6,9,12-trienil-[1,3]dioxolan-4-il)-etil]-dimetilamina (005-31)

**Etapa 1, 005-28:**

5 A una mezcla de dilinolenil(y)metanol (**005-12**, 550 mg, 1,05 mmoles) y carbonato de potasio anhidro (58 mg) en 25 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió clorocromato de piridinio (PCC, 566 mg, 2,63 mmoles, 2,5 equivalentes). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. a continuación se añadió éter (100 mL) a la mezcla, y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de gel de sílice (150 mL). El lecho de gel de sílice se lavó adicionalmente con éter (3 x 50 mL). El producto filtrado de éter y los lavados se combinaron. La evaporación del disolvente proporcionó 510 mg de un residuo oleoso en forma de un producto bruto.

10 El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0-3% en hexanos. Esto proporcionó 344 g (63%) del producto del título (**005-28**).

Etapa 2, 005-29:

15 Una mezcla de **005-28** (344 mg, 0,66 mmoles), 1,2,4-butanotriol (349 mg, 3,2 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (30 mg) en 50 mL de tolueno se calentó a reflujo bajo argón durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (30 mL) (el butanotriol no es soluble en tolueno, por lo que se decantó la solución y se dejó el triol), salmuera (30 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La evaporación del disolvente dio como resultado un residuo oleoso de color amarillento. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con acetato de etilo al 4% en hexanos. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. Esto proporcionó 337 mg (83%) de **005-29** puro en forma de aceite incoloro.

20

Etapa 3, 005-30:

25 A una solución de **005-29** (337 mg, 0,55 mmoles) y trietilamina seca (0,28 mL, 2 mmoles) en 30 mL de CH₂Cl₂ anhidro se le añadió anhídrido metanosulfónico (310 mg, 1,78 mmoles) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con 30 mL de CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 25 mL), salmuera (25 mL) y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El disolvente se evaporó para proporcionar 377 g del producto deseado en forma de un aceite transparente incoloro (99%). El producto era lo suficientemente puro y se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

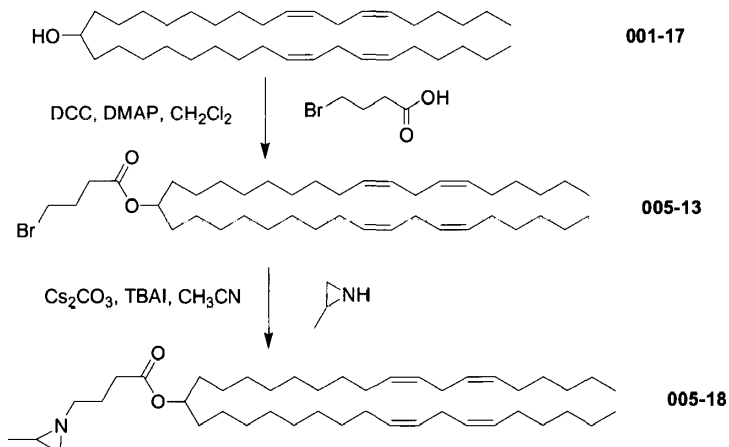
30

Etapa 4, 005-31:

35 A **005-30** (377 mg) bajo argón se le añadieron 15 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó

a temperatura ambiente durante 6 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 40 mL) se eluyó con metanol al 3% en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron para proporcionar 314 mg del producto del título (**005-31**) en forma de un aceite pálido transparente. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,41-5,26 (m, 12H, CH=CH), 4,06 (m, 1H), 4,01 (dd, 1H, $J=7,5, 7,5$ Hz), 3,45 (dd, 1H, $J=7,5, 7,5$ Hz), 2,77 (tipo t, $J=5,6$ Hz, 8H), 2,36 (m, 1H), 2,26 (m, 1H), 2,19 (s, 6H), 2,02 (tipo q, $J=6,8$ Hz, 8H), 1,78 (m, 1 H), 1,67 (m, 1 H), 1,60 - 1,51 (m, 4 H), 1,38 - 1,21 (m, 24 H), 0,86 (t, 6 H, $J=6,8$ Hz) ppm.

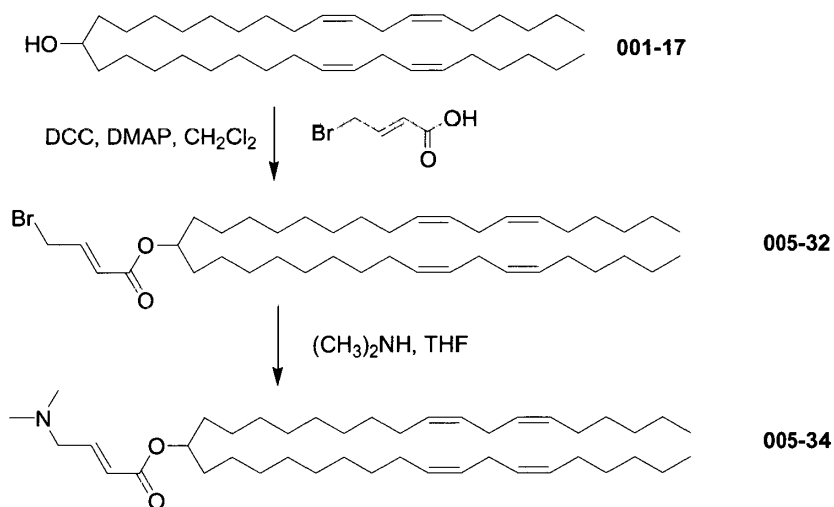
Ejemplo 42: Síntesis de éster 1-octadeca-9,12-dienil-nonadeca-10,13-dienílico de ácido 4-(2-metil-aziridin-1-il)-butírico (005-18)



Etapa 1, 005-13: Bajo una atmósfera de argón, a un matraz de fondo redondo cargado con DLin-MeOH (**001-17**, 528,9 mg), ácido 4-bromobutírico (200 mg) y 4-(dimetilamino)piridina (25 mg) en diclorometano (10 mL) se le añadió dicitohexilcarbodiimida (268 mg). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el residuo se recogió en éter dietílico. El precipitado de color blanco (DCU) se descartó mediante filtración. El producto filtrado se concentró y el aceite residual resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con acetato de etilo al 0 a 1% en hexanos. Esto proporcionó 0,44 g (65%) de **005-13** en forma de aceite incoloro.

Etapa 2, 005-18: Una mezcla de **005-13** (0,44 g, 0,65 mmoles), 2-metilaziridina (148 mg, 2,6 mmoles, tec. 90%), Cs₂CO₃ (2,6 mmoles) y TBAI (2,4 mmoles) en acetonitrilo (10 mL) se agitó en atmósfera de Ar durante 4 días. Después de eliminar el disolvente, al residuo se añadieron hexanos y agua. Las dos fases se separaron, seguido de la extracción de la fase acuosa con hexanos (X 2). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad. El aceite residual resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con metanol de 1% a 3% en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron (200 mg de aceite). Esto se purificó de nuevo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 50 mL) eluyendo con un gradiente de acetato de etilo en hexanos (5% - 20%). Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron. Esto proporcionó 96 mg (33%) de **005-18** en forma de aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,43-5,30 (m, 8H, CH=CH), 4,87 (quinteto, $J=6$ Hz, 1H), 2,78 (tipo t, $J=6$ Hz, 4H), 2,39 (tipo t, $J=7,8$ Hz, 2H), 2,26 (tipo t, 2H), 2,06 (tipo q, $J=6,8$ Hz, 8H), 1,89 (tipo un quinteto, $J=7,2$ Hz, 2H), 1,56-1,48 (m, 5H), 1,41-1,24 (m, 38H), 1,18 (d, $J=5,2$ Hz, 3H), 0,90 (t, 6H, $J=6,8$ Hz) ppm.

Ejemplo 43: Síntesis de éster 1-octadeca-9,12-dienil-nonadeca-10,13-dienílico de ácido 4-dimetilamino-but-2-enoico (005-34)

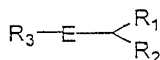


Etapa 1, 005-32: Bajo una atmósfera de argón, a un matraz de fondo redondo cargado con DLin-MeOH (**001-17**, 528,9 mg, 1 mmoles), ácido 4-bromocrotónico (330 mg, 2 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (49 mg) en diclorometano (10 mL) se le añadió dicitohexilcarbodiimida (454 mg, 2,2 mmoles). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el precipitado se eliminó mediante filtración y el sólido se lavó con diclorometano. Al producto filtrado se le añadió ácido 4-bromocrotónico (165 mg), 4-(dimetilamino)piridina (15 mg) y finalmente dicitohexilcarbodiimida (250 mg). Después de agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó y el residuo se recogió en hexanos. El precipitado de color blanco (DCU) se descartó mediante filtración. El producto filtrado se concentró y el aceite residual resultante (587 mg) se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 2, 005-34: A **005-32** bruto (587 mg) bajo argón se le añadieron 7 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un residuo oleoso y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230-400, 40 mL) eluyendo con 100 mL de diclorometano, metanol de 1% a 3% en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron para proporcionar un aceite parduzco (**XD-005-34**, 69 mg, 11% de DLin-MeOH, **001-17**). RMN H¹ (600 MHz, CDCl₃) δ: 6,92 (dt, J=6,2 Hz, 15,7 Hz, 1H), 5,97 (d, J=15,7 Hz), 5,41-5,31 (8H, m, CH=CH), 4,93 (quinteto, J=6,7 Hz, 1H), 3,07 (dd, J=1,1 Hz, 6,2 Hz, 2H), 2,78 (t, J=6,9 Hz, 4H), 2,27 (s, 6 H), 2,05 (m, 8 H), 1,58-1,52 (m, 4H), 1,39-1,24 (m, 36 H), 0,90 (t, 6 H, J=6,8 Hz) ppm.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura



(XXXIII)

5

o sus sales,
en donde:

10

R₁ y R₂ son cada uno independientemente para cada caso alquilo C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, alqueno C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, o alquino C₁₀-C₃₀ opcionalmente sustituido, en donde el término "sustituido" se refiere al remplazo de uno o más radicales hidrógeno en una estructura dada por el radical de un sustituyente específico seleccionado del grupo que consiste en halo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heterociclilo, tiol, alquiltio, oxo, tioxi, ariltio, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, haloalquilo, amino, trifluorometilo, ciano, nitro, alquilamino, arilamino, alquilaminoalquilo, arilaminoalquilo aminoalquilamino, hidroxilo, alcoxialquilo, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminocarbonilalquilo, acilo, aralcoxycarbonilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfonilo, ácido fosfónico, arilo, heteroarilo, heterocíclico y alifático, en donde el sustituyente puede estar sustituido adicionalmente con amino, alquilamino, dialquilamino, o compuestos amino cíclicos;

20

R₃ es ω-amino-*n*-butilo, o ω-(sustituido)amino-*n*-butilo, en donde un ω-(sustituido)amino-*n*-butilo es un ω-amino-*n*-butilo en el que al menos uno de los H en N ha sido reemplazado por alquilo; y E es C(O)O.

25

2. Una partícula lipídica que comprende un compuesto de la reivindicación 1.

3. La partícula lipídica de la reivindicación 2, en donde la partícula comprende adicionalmente un lípido neutro y un lípido capaz de reducir la agregación.

30

4. La partícula lipídica de la reivindicación 3, en donde la partícula lipídica consiste esencialmente en

a. un compuesto de la reivindicación 1;

b. un lípido neutro seleccionado entre DSPC, DPPC, POPC, 1,2-dioleoil-*sn*-3-fosfoetanolamina (DOPE) y esfingomielina;

35

c. estero; y

d. PEG-DMG o PEG-DMA;

a una razón molar de aproximadamente 20-60% de lípido: 5-25% de lípido neutro: 25-55% de estero: 0,5-15% de PEG-DMG o PEG-DMA.

40

5. La partícula lipídica de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente un agente terapéutico.

6. La partícula lipídica de la reivindicación 5, en donde el agente terapéutico es un ácido nucleico, seleccionado del grupo que consiste en un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulador, un ARNip, un oligonucleótido antisentido, un microARN, un antagomir, un aptámero y una ribozima.

45

7. La partícula lipídica de la reivindicación 5 o 6 para uso en la modulación de la expresión de un gen diana en una célula.

50

8. La partícula lipídica para uso de la reivindicación 7, en donde el agente terapéutico se selecciona entre un ARNip, un antagomir, un oligonucleótido antisentido, un plásmido capaz de expresar un ARNip, una ribozima, un aptámero o un oligonucleótido antisentido, y un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, tal que se aumenta la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento de la misma.

55

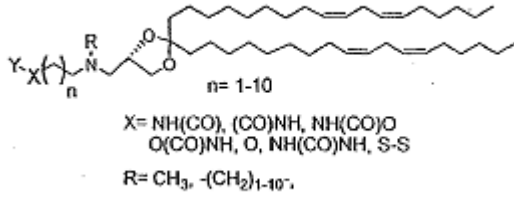
9. La partícula lipídica para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el gen diana se selecciona del grupo que consiste en Factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gen PDGF beta, gen Erb-B, gen Src, gen CRK, gen GRB2, gen RAS, gen MEKK, gen JNK, gen RAF, gen Erk1/2, gen PCNA(p21), gen MYB, gen JUN, gen FOS, gen BCL-2, gen de Ciclina D, gen VEGF, gen EGFR, gen de Ciclina A, gen de Ciclina E, gen WNT-1, gen de beta-catenina, gen c-MET, gen PKC, gen NFkB, gen STAT3, gen de survivina, gen Her2/Neu, gen SORT1, gen XBP1, gen de topoisomerasa I, gen de topoisomerasa II alfa, gen p73, gen p21(WAF1/CIP1), gen p27(KIP1), gen PPM1D, gen de caveolina I, gen MIB I, gen MTAI, gen M68, genes supresores tumorales y gen supresor tumoral

60

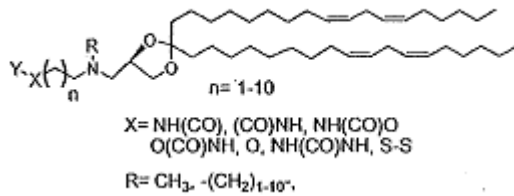
p53.

- 5 10. Una composición farmacéutica que comprende una partícula lipídica de la reivindicación 6 y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno **caracterizado por** expresión anormalmente alta de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico se selecciona entre un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un ARNmic o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNip, el microARN o el ARN antisentido comprenden un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.
- 15 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno **caracterizado por** la expresión anormalmente baja de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.
- 20 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un oligonucleótido inmunoestimulador.
14. Una vacuna que comprende la partícula lipídica de la reivindicación 6 y un antígeno asociado con una enfermedad o patógeno, en donde el ácido nucleico es un plásmido, y dicho antígeno es un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno parasitario.

Figura 1



- $Y = (\text{CH}_2)_n\text{-GalNac, Manosa, Lactosa, Glucosa, Fucosa}$
 $Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNac)}_2, (\text{Manosa})_2, (\text{Lactosa})_2, (\text{Glucosa})_2, (\text{Fucosa})_2$
 $Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNac)}_3, (\text{Manosa})_3, (\text{Lactosa})_3, (\text{Glucosa})_3, (\text{Fucosa})_3$
 $Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-GalNac, Manosa, Lactosa, Glucosa, Fucosa}$
 $Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNac)}_2, (\text{Manosa})_2, (\text{Lactosa})_2, (\text{Glucosa})_2, (\text{Fucosa})_2$
 $Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNac)}_3, (\text{Manosa})_3, (\text{Lactosa})_3, (\text{Glucosa})_3, (\text{Fucosa})_3$
 $a = 1-100$



- $Y = (\text{CH}_2)_n\text{-GalNac, Manosa, Lactosa, Glucosa, Fucosa}$
 $Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNac)}_2, (\text{Manosa})_2, (\text{Lactosa})_2, (\text{Glucosa})_2, (\text{Fucosa})_2$
 $Y = (\text{CH}_2)_n\text{-(GalNac)}_3, (\text{Manosa})_3, (\text{Lactosa})_3, (\text{Glucosa})_3, (\text{Fucosa})_3$
 $Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-GalNac, Manosa, Lactosa, Glucosa, Fucosa}$
 $Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNac)}_2, (\text{Manosa})_2, (\text{Lactosa})_2, (\text{Glucosa})_2, (\text{Fucosa})_2$
 $Y = (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_a\text{-(GalNac)}_3, (\text{Manosa})_3, (\text{Lactosa})_3, (\text{Glucosa})_3, (\text{Fucosa})_3$
 $a = 1-100$

Figura 2

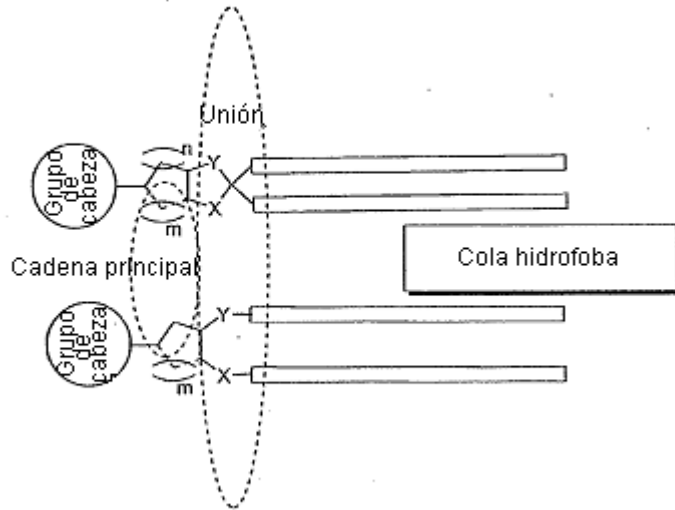


Figura 3 (1 de 2)

Compuesto	Estructura	DE50	pKa
DLin-M-C3-DMA		<0,1	6,44
DLin-M-C4-DMA		0,15	6,93
DLin-M-C3-DEA		0,3	6,17
DLin-M-C5-DMA		0,65	7,16
DLin-M-C3-DIPA		4,5	5,44
DLin-M-C3-IPA		1,0	7,31
DLin-M-C3-EA		>5,0	7,62
DLin-M-C3-MA		>5,0	8,11
DLin-K6S-C2-DMA		3,0	ND
DLin-K6S-C4-DMA		4,0	ND
DLin-K6A-C3-DMA		0,7	ND
DLin-K6S-C1-DMA		0,10	5,97
DLin-K5-C2-DMA		< 0,1	ND

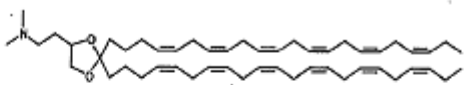
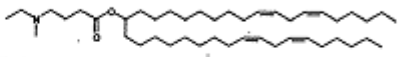
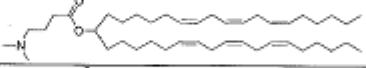

DDha-K5-C2-DMA		0,2	ND
DLin-M-C3-MEA		<0,1	ND
DLen(g)-M-C3-DMA		0,08	ND
DLen(g)-M-C4-DMA		0,5	ND

Figura 3 (2 de 2)