

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 680**

51 Int. Cl.:

<b>C07C 271/16</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/22</b>	(2006.01)
<b>C07D 333/40</b>	(2006.01)		
<b>C07C 317/44</b>	(2006.01)		
<b>C07C 321/14</b>	(2006.01)		
<b>C07C 333/04</b>	(2006.01)		
<b>C07C 235/08</b>	(2006.01)		
<b>C07C 237/08</b>	(2006.01)		
<b>C07D 207/16</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/16</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/US2013/044849**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13185116**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13729241 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2858974**

54 Título: **Lípidos para formulaciones de suministro de agente terapéutico**

30 Prioridad:

**08.06.2012 US 201261657480 P**

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

**25.01.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PAYNE, JOSEPH E.;  
GAUDETTE, JOHN, A.;  
HOU, ZHENG;  
AHMADIAN, MOHAMMAD;  
YU, LEI;  
KNOPOV, VICTOR;  
AKOPIAN, VIOLETTA;  
KARMALI, PRIYA;  
WITTE, RICHARD P.;  
SAFARZADEH, NEDA;  
YING, WENBIN y  
ZHANG, JUN**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 697 680 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

Lípidos para formulaciones de suministro de agente terapéutico

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente estadounidense provisional n.º: 61/657.480 presentada el 8 de junio de 2012.

10 **Campo técnico**

La descripción se refiere a lípidos ionizables para potenciar el suministro de agentes terapéuticos.

15 **Antecedentes**

Hay varias técnicas disponibles para suministrar un agente terapéutico, por ejemplo, ARNip, ácidos nucleicos, etc., al interior de una célula. Estas técnicas incluyen sistemas de transfección virales y no virales. Los sistemas de transfección no virales pueden incluir, por ejemplo, polímeros, lípidos, liposomas, micelas, dendrímeros y nanomateriales. Los polímeros que se han estudiado para la transfección celular incluyen polímeros catiónicos tales como, por ejemplo, poli(L-lisina) ("PLL"), polietiliminina ("PEI"), quitosano y poli(metacrilato de (2-dimetilamino)etilo) ("pDMAEMA").

Sin embargo, las técnicas de transfección virales y no virales tienen inconvenientes. Por ejemplo, los sistemas virales pueden proporcionar una alta eficiencia de transfección, pero pueden no ser totalmente seguros. Además, los sistemas virales pueden ser complicados y/o caros de preparar.

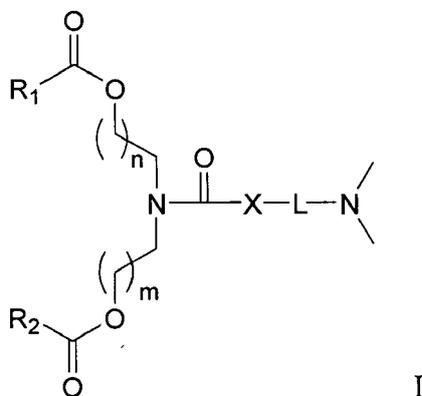
Se ha notificado que los sistemas de transfección no virales, por ejemplo, los que emplean polímeros catiónicos, transfieren ADN de plásmido al interior de células. Sin embargo, los polímeros catiónicos pueden ser inestables y pueden ser tóxicos para las células.

El documento CA 2 800 818 A divulga un lípido catiónico que se dice que facilita introducir un ácido nucleico al interior de una célula. También se divulgan: una composición que contiene el lípido catiónico y un ácido nucleico; y un método para introducir un ácido nucleico al interior de una célula, usando la composición que contiene el lípido catiónico y un ácido nucleico. El documento WO 2012/170952 A divulga compuestos relacionados así como composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen uno o ambos de estos compuestos que son útiles para el suministro de agentes terapéuticos; y métodos de uso de estas composiciones y formulaciones farmacéuticas.

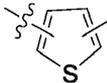
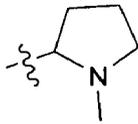
Como tal, existe una necesidad de nuevos compuestos, composiciones y métodos para usar una composición catiónica para mejorar el suministro de agentes terapéuticos a células, tejidos y organismos.

40 **Sumario**

La presente descripción se refiere a compuestos lipídicos ionizables de fórmula I



45 en la que n y m son independientemente 1, 2, 3 o 4; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente alquilo C<sub>10-18</sub> o alqueno C<sub>12-18</sub>; X es -CH<sub>2</sub>-, S, O, N o está ausente; L es alqueno C<sub>1-4</sub>; -S-alqueno C<sub>1-4</sub>; -O-alqueno C<sub>1-4</sub>; -O-C(O)-alqueno C<sub>1-4</sub>;

-S(O)<sub>2</sub>-alqueno C<sub>1-4</sub>;  alqueno C<sub>1-4</sub>; ; o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de

los mismos. También se describen composiciones, formulaciones farmacéuticas, portadores de fármaco y métodos de uso de los compuestos de fórmula I.

**Breve descripción de los dibujos**

5 La figura 1 representa la eficacia sinérgica *in vitro* de realizaciones de lípido ionizable:lípido ionizable de la presente descripción.

10 La figura 2 representa la eficacia sinérgica *in vitro* de realizaciones de lípido ionizable:lípido ionizable de la presente descripción.

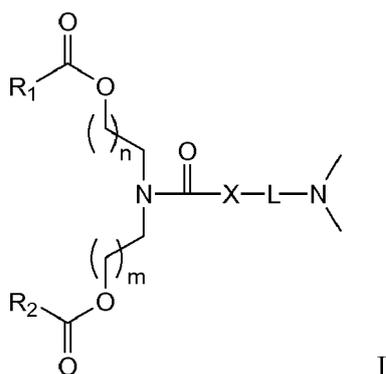
La figura 3 representa la eficacia sinérgica *in vitro* de realizaciones de lípido ionizable:lípido catiónico de la presente descripción.

15 La figura 4 representa la eficacia *in vivo* de realizaciones de lípido ionizable:lípido catiónico de la presente descripción.

**Descripción detallada de realizaciones ilustrativas**

20 La presente descripción se refiere a compuestos lipídicos ionizables, así como a sus usos en el suministro de agentes terapéuticos a células, tejidos y organismos.

Dentro del alcance de la descripción se encuentran compuestos lipídicos ionizables de fórmula I:



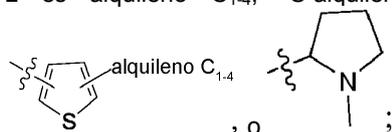
25 en la que

n y m son independientemente 1, 2, 3 o 4;

30 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente alquilo C<sub>10-18</sub> o alqueno C<sub>12-18</sub>;

X es -CH<sub>2</sub>-, S, O, N o está ausente;

35 L es alqueno C<sub>1-4</sub>; -S-alqueno C<sub>1-4</sub>; -O-alqueno C<sub>1-4</sub>; -O-C(O)-alqueno C<sub>1-4</sub>; -S(O)<sub>2</sub>-alqueno C<sub>1-4</sub>;

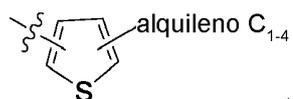


o una forma de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

40 Dentro del alcance de la descripción, n y m pueden ser iguales o diferentes. En realizaciones preferidas, n y m son iguales. Se prefieren particularmente aquellas realizaciones en las que n y m son ambos 1 o n y m son ambos 2.

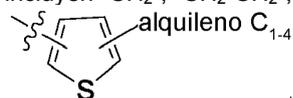
45 En algunas realizaciones de la descripción, X es un enlace. En otras realizaciones, X es -CH<sub>2</sub>-. En todavía otras realizaciones, X es S. También se prefieren realizaciones en las que X es O. Realizaciones en las que X es N también se encuentran dentro del alcance de la descripción.

En algunas realizaciones de la descripción, L es alqueno C<sub>1-4</sub>. En otras realizaciones, L es -S-alqueno C<sub>1-4</sub>. En aún otras realizaciones, L es -O-alqueno C<sub>1-4</sub>. En todavía otras realizaciones, L es -O-C(O)-alqueno C<sub>1-4</sub>. Alternativamente, L es -S(O)<sub>2</sub>-alqueno C<sub>1-4</sub>. También se encuentran dentro del alcance de la descripción

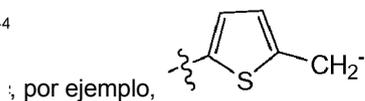


realizaciones en las que L es

En aquellas realizaciones en las que X es un enlace, L es preferiblemente alquileno C<sub>1-4</sub>. Tales ejemplos de L incluyen -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. En otras realizaciones en las que X es a enlace, L es



5



En aquellas realizaciones en las que X es -CH<sub>2</sub>-, L es preferiblemente -S-alquileno C<sub>1-4</sub>. Tales ejemplos de L incluyen -SCH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -S-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -S-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

10 En otras realizaciones en las que X es -CH<sub>2</sub>-, L es preferiblemente -S(O)<sub>2</sub>-alquileno C<sub>1-4</sub>. Tales ejemplos de L incluyen -S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- y S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.

En aún otras realizaciones en las que X es -CH<sub>2</sub>-, L es -O-alquileno C<sub>1-4</sub>. Tales ejemplos de L incluyen -O-CH<sub>2</sub>-, -OCH<sub>2</sub>- CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -O-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

15

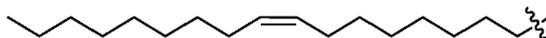
En aquellas realizaciones de la descripción en las que X es S, L es preferiblemente alquileno C<sub>1-4</sub>. Tales ejemplos de L incluyen -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

20 En aquellas realizaciones en las que X es O, L es preferiblemente alquileno C<sub>1-4</sub>. Tales ejemplos de L incluyen -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

25 Dentro del alcance de la descripción, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son iguales. Preferiblemente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son alquilo C<sub>10-18</sub>. También se prefieren realizaciones en las que el alquilo C<sub>10-18</sub> es un alquilo C<sub>10-18</sub> de cadena lineal. Se prefieren más realizaciones en las que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son alquilo C<sub>12-18</sub>. También se prefieren realizaciones en las que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son alquilo C<sub>12-15</sub>. En las realizaciones más preferidas, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos alquilo C<sub>13</sub>.

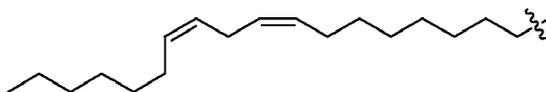
30 En otras realizaciones de la descripción, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son alquenilo C<sub>12-18</sub>. Preferiblemente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son alquenilo C<sub>13-17</sub>. Más preferiblemente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno oleilo:

30



35 En otras realizaciones de la descripción, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son alquenilo C<sub>12-18</sub>. Preferiblemente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son alquenilo C<sub>13-17</sub>. Más preferiblemente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno linoleoilo.

35



40 También se encuentran dentro del alcance de la descripción composiciones que comprenden un compuesto de fórmula I en un liposoma, en las que el liposoma comprende una bicapa de moléculas lipídicas. Aunque el compuesto de fórmula I puede comprender cualquier porcentaje en moles de las moléculas lipídicas en tales composiciones, se prefiere que el compuesto de fórmula I sea de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 50 % en moles de las moléculas lipídicas de las composiciones de la descripción.

45 Las composiciones de la descripción que comprenden un compuesto de fórmula I en un liposoma pueden contener más de un compuesto de fórmula I. En realizaciones preferidas, tales composiciones de la descripción incluyen dos compuestos de fórmula I. En esas realizaciones, se prefiere que la razón molar de los dos compuestos de fórmula I sea de aproximadamente 10:30 a aproximadamente 30:10.

50 Las composiciones de la descripción que comprenden un compuesto de fórmula I en un liposoma pueden comprender además un lípido catiónico. En tales realizaciones, el lípido catiónico es de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 40 % en moles de las moléculas lipídicas de la composición. También en estas realizaciones que comprenden un compuesto de fórmula I en un liposoma con un lípido catiónico, la razón molar del compuesto de fórmula I con respecto al lípido catiónico es de aproximadamente 5:35 a aproximadamente 35:5. Más preferiblemente, la razón es de aproximadamente 10:30 a aproximadamente 30:10.

55

Dentro del alcance de la descripción, cualquier composición de la descripción puede comprender además un medio líquido. Preferiblemente, el medio líquido es adecuado para inyección en un organismo vivo. En algunas

realizaciones, el medio líquido comprende un disolvente orgánico. Alternativamente, el medio líquido usado en determinadas realizaciones de la descripción comprende agua y un disolvente orgánico. En otras realizaciones de la descripción, el medio líquido puede comprender un medio no acuoso.

5 También dentro del alcance de la descripción, cualquier composición de la descripción puede comprender además al menos un fosfolípido.

En otras realizaciones de la descripción, cualquier composición de la descripción puede comprender además al menos un lípido conjugado con PEG.

10 También se encuentran dentro del alcance de la descripción portadores de fármaco específicos de células estrelladas. Estas realizaciones de la descripción incluyen cualquiera de las composiciones anteriormente mencionadas, así como una cantidad específica de células estrelladas de una molécula de direccionamiento que consiste en un (retinoide)<sub>n</sub>-grupo de unión-(retinoide)<sub>n</sub>, en el que n=0, 1, 2 o 3; y en el que el grupo de unión comprende un polietilenglicol (PEG) o molécula de tipo PEG.

En realizaciones preferidas, los portadores de fármaco de la descripción comprenderán además una molécula de ARNip.

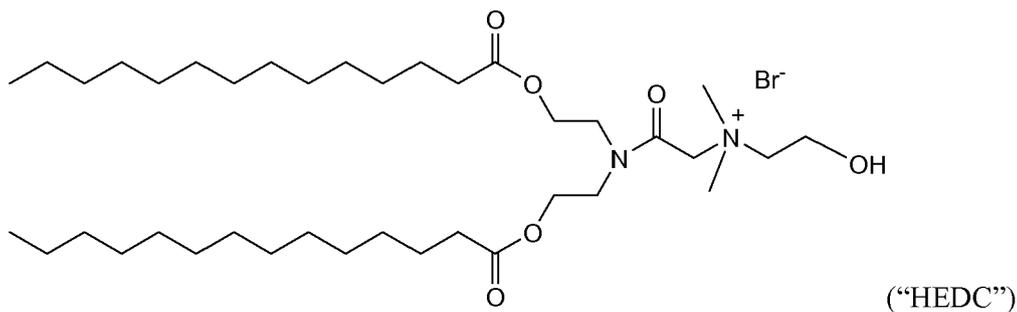
20 También se encuentran dentro del alcance de la descripción formulaciones farmacéuticas. Las formulaciones farmacéuticas dentro del alcance de la descripción incluyen cualquiera del portador de fármaco anteriormente mencionado de la descripción y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Se prefiere que en tales formulaciones el ARNip esté encapsulado por el liposoma de las composiciones de la descripción.

25 También se encuentran dentro del alcance de la descripción métodos de suministro de un fármaco a un paciente que necesita tratamiento. Estos métodos comprenden proporcionar una formulación farmacéutica dentro del alcance de la descripción y administrar la formulación farmacéutica al paciente.

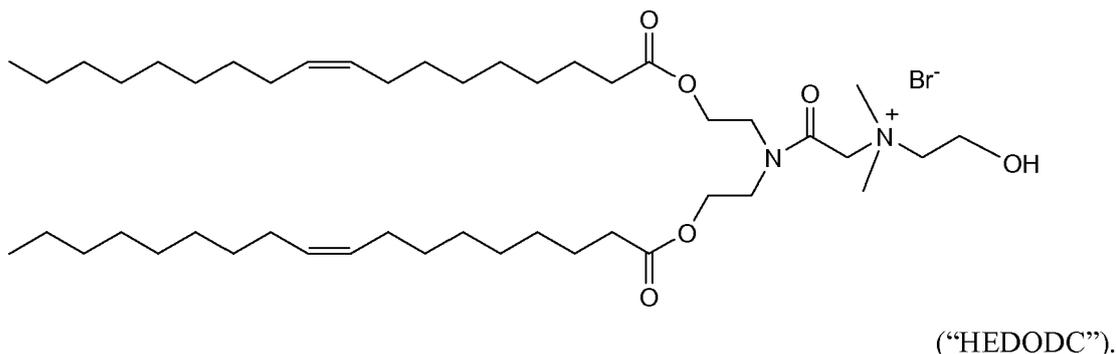
Definiciones

30 Los siguientes términos se usan a lo largo de la totalidad de esta memoria descriptiva.

Tal como se usa en el presente documento, "lípido catiónico" se refiere a un compuesto que incluye al menos un resto lipídico y un nitrógeno cuaternario con carga positiva asociado con un contraión. En la técnica se entiende que los "lípidos" están compuestos por un resto alquilo o alquenilo hidrófobo y un resto ácido o éster carboxílico. Los lípidos catiónicos preferidos para su uso en la presente descripción incluyen:



40 y



Tal como se usa en el presente documento, "lípido ionizable" se refiere a un compuesto de fórmula I dentro del

alcance de la descripción. Estos compuestos son capaces de formar especies con carga cuando entran en contacto con una especie de contraíón apropiada, por ejemplo, una especie que incluye un átomo de hidrógeno ionizable.

5 Tal como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado totalmente saturado (sin dobles ni triples enlaces), por ejemplo, un grupo que tiene la fórmula general  $-C_nH_{2n+1}$ . El grupo alquilo puede tener de 1 a 50 átomos de carbono (siempre que aparece en el presente documento, un intervalo numérico tal como "de 1 a 50" se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "de 1 a 50 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 50 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre el caso del término "alquilo" cuando no se designa ningún intervalo numérico). El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 30 átomos de carbono. El grupo alquilo también puede ser un alquilo inferior que tiene de 1 a 5 átomos de carbono. El grupo alquilo de los compuestos puede designarse como "alquilo C<sub>1-4</sub>" o designaciones similares. Únicamente a modo de ejemplo, "alquilo C<sub>1-4</sub>" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquilo, es decir, la cadena de alquilo se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero no se limitan de ningún modo a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares.

20 Tal como se usa en el presente documento, "alquileo" se refiere a un grupo funcional alcanodiilo, por ejemplo,  $-CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$  y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "alqueno" se refiere a un grupo alquilo que contiene en la cadena hidrocarbonada lineal o ramificada uno o más dobles enlaces. Oleilo es un ejemplo de un grupo alqueno de este tipo.

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

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

40 En la técnica se conocen en sí mismos "disolventes orgánicos" usados dentro del alcance de la descripción e incluyen, por ejemplo, alcoholes alquílicos C<sub>1-4</sub>, dimetilsulfóxido ("DMSO") y similares.

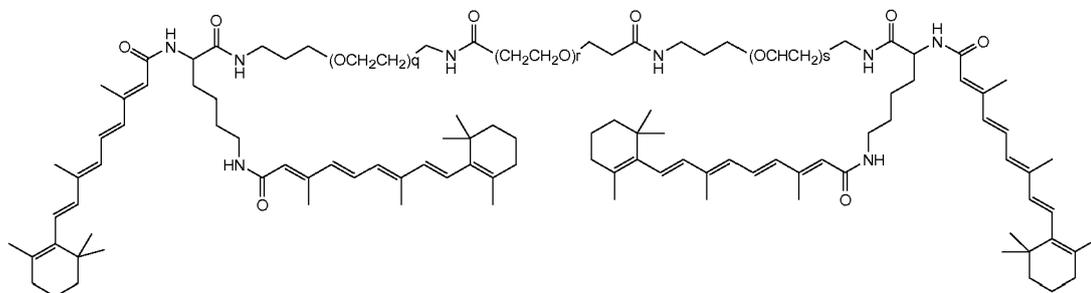
45 Tal como se usa en el presente documento, "agente terapéutico" se refiere a un compuesto que, tras la administración a un mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz, proporciona un beneficio terapéutico al mamífero. Un agente terapéutico puede denominarse en el presente documento fármaco. Los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

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

65 Tal como se usa en el presente documento, "conjugado de retinoide" se refiere a una molécula que incluye al menos un resto retinoide. En realizaciones preferidas de la descripción, el conjugado de retinoide estará presente a una concentración de aproximadamente el 0,3 a aproximadamente el 30 por ciento en peso, basándose en el peso total de la composición o formulación, lo cual es equivalente a de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % en

moles, lo cual es equivalente a una razón molar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10. Preferiblemente, el conjugado de retinoide es una molécula de retinoide-grupo de unión-lípido o una molécula de retinoide-grupo de unión-retinoide.

5 Un ejemplo de un conjugado de retinoide incluye los compuestos de fórmula II:

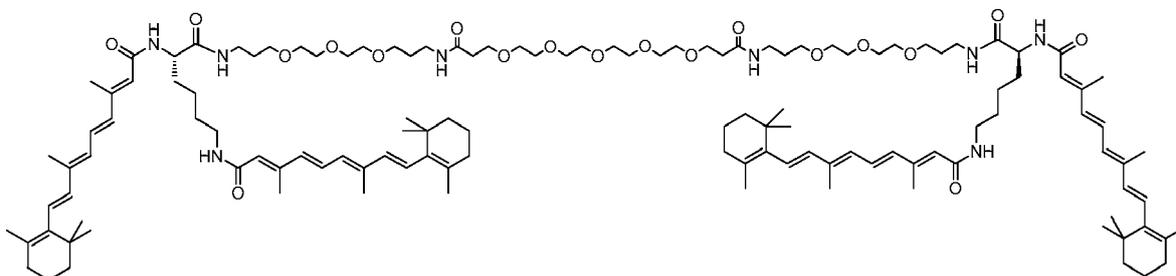


II

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

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

15



DiVA-PEG-DiVA

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

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

25

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

30 Tal como se usan en el presente documento, los términos "lípido" y "lipófilo" se usan en el presente documento con sus significados habituales tal como entienden los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de lípidos y grupos lipófilos incluyen ácidos grasos, esteroides, alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, heteroalquilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, heteroalquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, arilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, heteroarilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, heteroalquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>, carboxialquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub> y carboxiheteroalquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>. Un ácido graso es un ácido monocarboxílico de cadena larga saturado o insaturado que contiene, por ejemplo, de 12 a 24 átomos de carbono. Un lípido se caracteriza por ser esencialmente insoluble en agua, teniendo una solubilidad en agua de menos de aproximadamente el 0,01 % (base en peso). Tal como se usa en el presente documento, los términos "resto lipídico" y "resto lipófilo" se refieren a un lípido o parte del mismo que se ha unido a otro grupo. Por ejemplo, un grupo lipídico puede unirse a otro compuesto (por ejemplo, un monómero) mediante una reacción química entre un grupo funcional (tal como un grupo ácido carboxílico) del lípido y un grupo funcional apropiado del monómero.

40

Tal como se usa en el presente documento, "célula estrellada" se refiere a neuronas con varias dendritas que radian a partir del cuerpo de la célula. Ejemplos de células estrelladas son interneuronas inhibitorias.

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

El término "liposoma" se usa en el presente documento con su significado habitual tal como entienden los expertos en la técnica, y se refiere a una estructura de bicapa lipídica que contiene lípidos unidos a grupos polares, hidrófilos que forman una estructura sustancialmente cerrada en medios acuosos. En algunas realizaciones, el liposoma puede estar operativamente asociado con uno o más compuestos, tales como un agente terapéutico y un retinoide. Un liposoma puede estar compuesto por una única bicapa lipídica (es decir, unilamelar) o puede estar compuesto por dos o más bicapas lipídicas (es decir, multilamelar). Aunque el interior de un liposoma puede consistir en una variedad de compuestos, el exterior del liposoma es accesible para la formulación acuosa que comprende el liposoma. Un liposoma puede tener una forma aproximadamente esférica o elipsoidal.

En algunas realizaciones, el ARNip estará encapsulado por el liposoma de modo que el ARNip está inaccesible para el medio acuoso. Cuando se encapsula el ARNip, el liposoma tendrá un núcleo macizo; tales liposomas que encapsulan ARNip y que tienen un núcleo macizo se denominan "nanopartículas lipídicas" en el presente documento. En otras realizaciones, el ARNip no estará encapsulado por el liposoma. En tales realizaciones, el ARNip puede complejarse en la superficie exterior del liposoma mezclando liposomas previamente formados con ARN en una disolución acuosa. En estas realizaciones, el ARNip es accesible para el medio acuoso. Los liposomas que tienen ARNip unido únicamente a su superficie exterior se denominan "lipoplejos" en el presente documento.

Las formulaciones de la descripción también pueden incluir lípidos conjugados con PEG. Los lípidos conjugados con PEG dentro del alcance de la descripción se conocen en la técnica en sí mismos. Los PEG-lípidos adecuados incluyen PEG-fosfolípidos y PEG-ceramidas tales como, por ejemplo, PEG2000-DSPE, PEG2000-DPPE, PEG2000-DMPE, PEG2000-DOPE, PEG1000-DSPE, PEG1000-DPPE, PEG1000-DMPE, PEG1000-DOPE, PEG550-DSPE, PEG550-DPPE, PEG-550DMPE, PEG-1000DOPE, PEG-BML, PEG-colesterol. PEG2000-ceramida, PEG1000-ceramida, PEG750-ceramida, PEG550-ceramida.

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

También se encuentran dentro del alcance de la descripción formulaciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de las composiciones anteriormente mencionadas además de un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de la descripción incluirán al menos un agente terapéutico. Preferiblemente, el agente terapéutico es un ARNip. Se prevé que cualquier molécula de ARNip puede usarse dentro del alcance de la descripción. Por ejemplo, ARNip puede incluir:

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

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

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

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

En formulaciones preferidas de la descripción que incluyen ARNip, el ARNip está encapsulado por el liposoma. En otras realizaciones, el ARNip puede estar fuera del liposoma. En esas realizaciones, el ARNip puede complejarse con el exterior del liposoma.

También se encuentran dentro del alcance de la descripción métodos de suministro de un agente terapéutico a un paciente. Estos métodos comprenden proporcionar una formulación farmacéutica que incluye cualquiera de las composiciones anteriores y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable; y administrar la formulación farmacéutica al paciente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una formulación farmacéutica que comprende uno o más agentes tensioactivos fisiológicamente aceptables, portadores farmacéuticos, diluyentes, excipientes y agentes de suspensión, o una combinación de los mismos; y una formulación (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) divulgada en el presente documento. Los diluyentes o portadores farmacéuticos adicionales aceptables para su uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, colorantes y similares en la formulación farmacéutica. Por ejemplo, pueden añadirse benzoato de sodio, ácido ascórbico y

ésteres de ácido p-hidroxibenzoico como conservantes. Además, pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión. En diversas realizaciones, pueden usarse alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y similares como agentes tensioactivos; pueden usarse sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhídrido ligero, aluminato de magnesio, metasilicato-aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrogenofosfato de calcio, carboximetilcelulosa de calcio y similares como excipientes; pueden usarse aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, soja como agentes de suspensión o lubricantes; pueden usarse acetato-ftalato de celulosa como derivado de un hidrato de carbono tal como celulosa o azúcar, o copolímero de acetato-metacrilato de metilo copolímero como derivado de polivinilo como agentes de suspensión; y pueden usarse plastificantes tales como ftalatos de éster y similares como agentes de suspensión.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente humano en sí mismas, o en formulaciones farmacéuticas en las que se mezclan con otros principios activos, tal como en terapia de combinación, o excipiente(s) o portadores farmacéuticos adecuados. Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, 18.<sup>a</sup> edición, 1990.

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

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

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

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

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

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

Las composiciones y formulaciones de la descripción también pueden formularse para su administración tópica y pueden aplicarse a la piel del sujeto usando cualquier procedimiento adecuado para la aplicación de un vehículo de administración tópica. Por ejemplo, la formulación puede aplicarse manualmente, usando un aplicador, o mediante un procedimiento que implica ambos. Tras la aplicación, puede introducirse la formulación en la piel del sujeto, por ejemplo, masajeando. La aplicación puede realizarse múltiples veces al día o una vez al día. Por ejemplo, la formulación puede aplicarse a la piel de un sujeto una vez al día, dos veces al día, o múltiples veces al día, o puede aplicarse una vez cada dos días, una vez cada tres días, o aproximadamente una vez por semana, una vez cada dos semanas, o una vez cada varias semanas.

Algunas realizaciones en el presente documento se refieren a un método de suministro de un agente terapéutico a una célula. Por ejemplo, algunas realizaciones se refieren a un método de suministro de un agente terapéutico tal como ARNip al interior de una célula. Las células adecuadas para su uso según los métodos descritos en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores, incluyendo células vegetales y animales (por ejemplo, células de mamífero). En algunas realizaciones, las células pueden ser células de fibrosarcoma humano (por ejemplo, línea celular HT1080). En otras realizaciones, las células pueden ser células estrelladas hepáticas (línea celular LX2). En otras realizaciones, las células pueden ser células cancerosas. En aún otras realizaciones, las células pueden ser células madre (línea celular pHSC). Pueden usarse líneas celulares que son sistemas modelo para cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de mama (líneas celulares MCF-7, MDA-MB-438), línea celular de glioblastoma U87, células B16F0 (melanoma), células HeLa (cáncer de cuello uterino), células A549 (cáncer de pulmón) y líneas celulares de tumor de rata GH3 y 9L. En estas realizaciones, pueden usarse las formulaciones descritas en el presente documento para transfectar una célula. Estas realizaciones pueden incluir poner en contacto la célula con una formulación descrita en el presente documento que incluye un agente terapéutico, para así suministrar un agente terapéutico a la célula.

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

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

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

Tal como resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica, la dosificación *in vivo* útil que va a administrarse y el modo de administración particular variarán dependiendo de la edad, peso y especie de mamífero tratada, los compuestos particulares empleados, y el uso específico para el que se emplean estos compuestos. La determinación de niveles de dosificación eficaces, es decir los niveles de dosificación necesarios para lograr el resultado deseado, puede lograrse por un experto en la técnica usando métodos farmacológicos de rutina. Normalmente, las aplicaciones clínicas en humanos de productos se comienzan a niveles de dosificación inferiores, aumentándose el nivel de dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Alternativamente, pueden usarse

estudios *in vitro* aceptables para establecer dosis y vías de administración útiles de las composiciones identificadas mediante los presentes métodos usando métodos farmacológicos establecidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

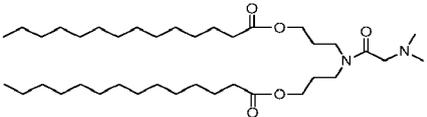
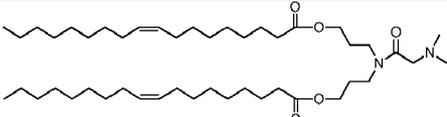
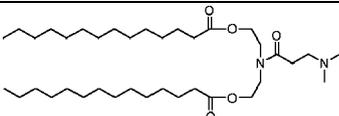
Las formulaciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, la formulación que puede incluir un compuesto, un retinoide, un segundo lípido, un agente estabilizante y/o un agente terapéutico) pueden evaluarse para determinar la eficacia y toxicidad usando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología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

Si se desea, las formulaciones pueden presentarse en un envase pack o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de plástico o metal, tal como un envase tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones de administración. El envase o dispensador también puede ir acompañado por una notificación asociada con el recipiente en forma indicada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o comercialización de productos farmacéuticos, notificación que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma del fármaco para su administración a humanos o veterinaria. Tal notificación puede ser, por ejemplo, el etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos con receta, o el prospecto aprobado. También pueden prepararse composiciones que comprenden un compuesto formulado en un portador farmacéutico compatible, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de un estado indicado.

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

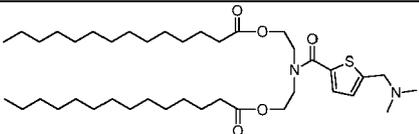
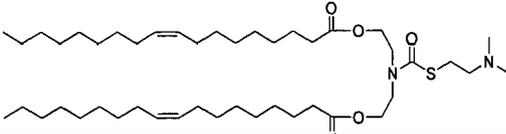
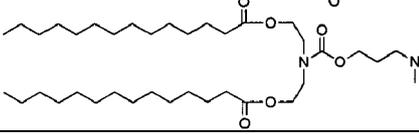
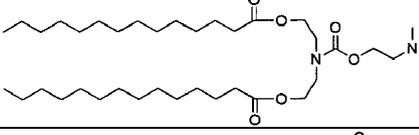
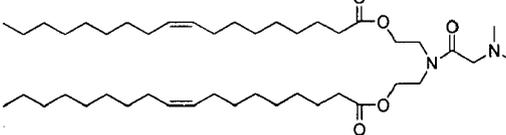
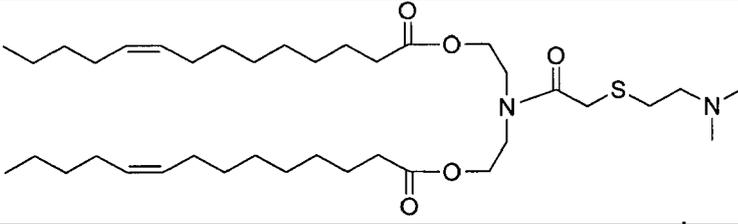
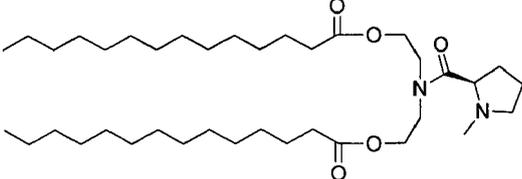
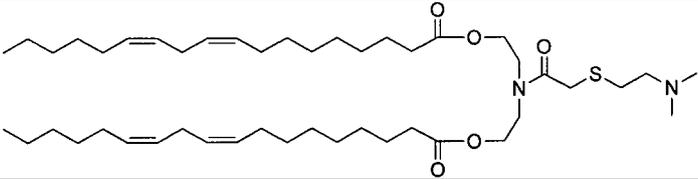
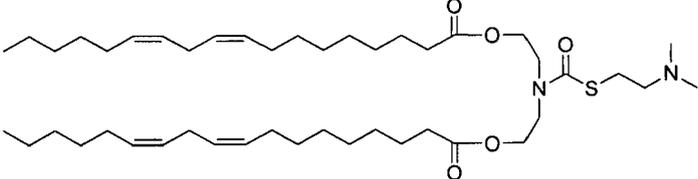
En la tabla 1 se exponen compuestos preferidos de fórmula I dentro del alcance de la descripción. En la tabla 1 también se exponen datos *in vitro* e *in vivo* (véase a continuación).

Tabla 1

Lípido	Estructura	<i>in vitro</i> (pHSC), % de KD	<i>in vivo</i> (DMNQ de rata), % de KD
i-Pr-DC		53 % a 50 nM	
i-Pr-DODC		60 % a 50 nM	
i-DC		89 % a 200 nM	
i-Et-DC (Et104)		65 % a 50 nM	

ES 2 697 680 T3

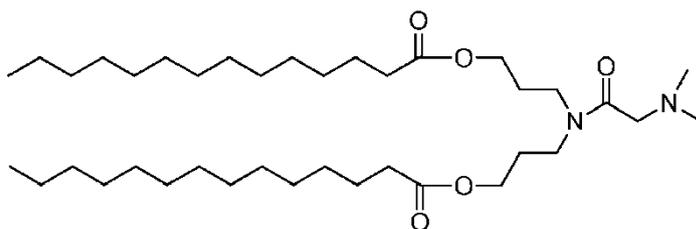
i-Et-DODC		43 % a 50 nM	
i-Prop-DC		55 % a 50 nM	
i-Prop-DODC		55 % a 50 nM	
S104		68 % a 50 nM	52 % a 0,5 mpk
S104-DO		78 % a 20 nM	65 % a 0,5 mpk
C104		53 % a 20 nM	75 % a 0,5 mpk
SO2-S104		75 % a 20 nM	18 % a 0,5 mpk
TU104		76 % a 20 nM	
O104		55 % a 20 nM	
HEDCM1		53 % a 20 nM	
C104-DO		32 % a 20 nM	
Pr104		54 % a 20 nM	
Pr104-DO		27 % a 20 nM	

T104		58 % a 20 nM	
TU104-DO		81 % a 20 nM	40 % a 0,25 mpk
CB104		42 % a 20 nM	
CA104			
INT-4		70 % a 50 nM	
S104-DMO		40 % a 10 nM	
Pro-DC			
S104-DLin			
TU104-DLin			

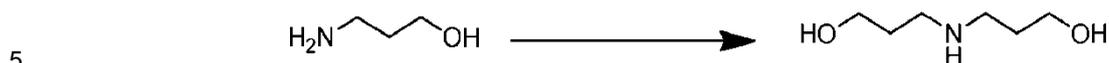
La descripción puede mostrarse adicionalmente a modo de ejemplo mediante referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que limiten la descripción.

## 5 Sección experimental

Preparación de ditetradecanoato ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiol)bis(propano-3,1-diilo) (i-Pr-DC)

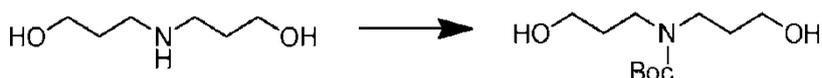


Etapa 1: Preparación del producto intermedio 1: 3,3'-azanodiil-bis(propan-1-ol)



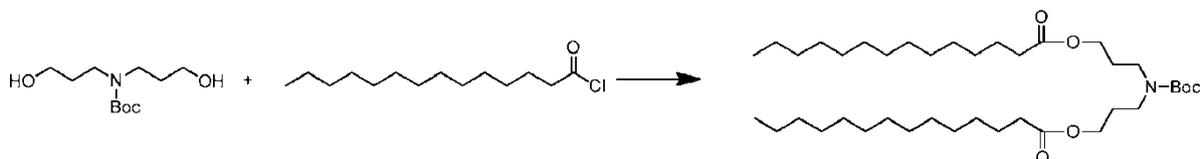
10 Se sometió a refluxo una mezcla de 3-amino-1-propanol (14,5 ml, 19,0 mmol), 1-cloro-3-hidroxiopropano (8,00 ml, 95,6 mmol) y H<sub>2</sub>O (~50 ml) a lo largo de 24 horas. Luego se añadió hidróxido de potasio (5,40 g). Tras la disolución, se evaporó toda el agua para dejar un aceite viscoso y grandes cantidades de cloruro de potasio. Se filtraron éstos y se lavaron con acetona seca y diclorometano. Se secó la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para dejar un aceite. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo 3,3'-azanodiil-bis(propan-1-ol) (12,5 g).

15 Etapa 2: Preparación del producto intermedio 2: bis(3-hidroxiopropil)carbamato de terc-butilo



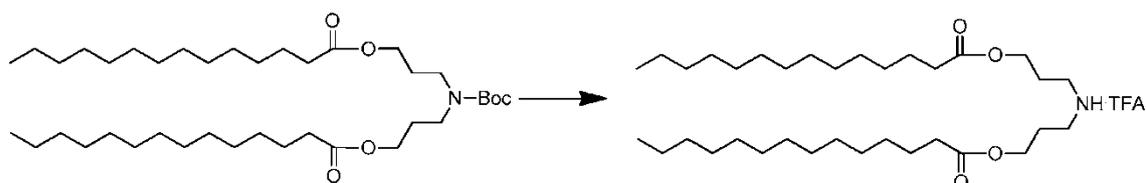
20 Se diluyó 3,3'-azanodiil-bis(propan-1-ol) (12,5 g, 95,4 mmol) en DCM (25 ml). Se añadió lentamente una disolución de dicarbonato de di-terc-butilo (26,0 g, 119 mmol) en DCM (25 ml) mientras se agitaba bajo manto de gas argón. Se permitió que la reacción se agitara durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo bis(3-hidroxiopropil)carbamato de terc-butilo.

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



30 Se disolvieron bis(3-hidroxiopropil)carbamato de terc-butilo (4,00 g, 17,3 mmol), Et<sub>3</sub>N (4,8 ml, 34,6 mmol) y DMAP (529 mg, 4,33 mmol) en cloroformo (50 ml). Se añadió, mientras se agitaba en un baño de hielo, una disolución de cloruro de miristoilo a lo largo de 15 min. Se llevó a cabo la adición de tal modo que la temperatura de la reacción no excedió de 30 °C. Se permitió que la reacción se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron al día siguiente MeOH (50 ml) y solución salina al 0,9 % (50 ml) para extinguir la reacción. Se separó la fase orgánica y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 1 M. Se secó el disolvente con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío para producir ditetradecanoato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) como un aceite con el que se continuó sin purificación adicional.

40 Etapa 4: Preparación del producto intermedio 4: sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(propano-3,1-diilo)

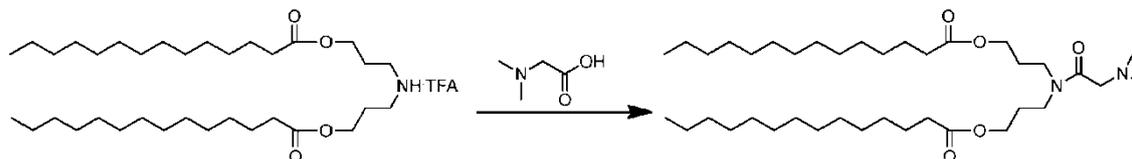


45 Se disolvió ditetradecanoato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) (11,3 g, 17,3 mmol) en TFA/CHCl<sub>3</sub> (1:1, 20 ml) y se permitió que la mezcla se agitara a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se concentró el material a vacío. Se repitió esto una segunda vez. Luego se disolvió el material en DCM y se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró a vacío y se secó totalmente durante la noche. Se concentró la mezcla de

reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiiil-bis(propano-3,1-diilo) (7,5 g).

Etapa 5: Preparación de i-Pr-DC: ditetradecanoato ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiiil)bis(propano-3,1-diilo)

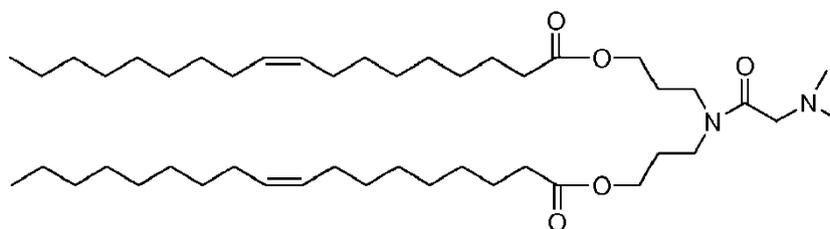
5



Se diluyó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiiil-bis(propano-3,1-diilo) (750 mg, 1,35 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla preactivada de N,N-dimetilglicina (154 mg, 1,49 mmol), HATU (616 mg, 1,62 mmol) y DIEA (495  $\mu$ l, 2,84 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el matraz con argón y se permitió que se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiiil)bis(propano-3,1-diilo) (465 mg). QTOF MS ESI+:  $m/z$  639,6 (M + H).

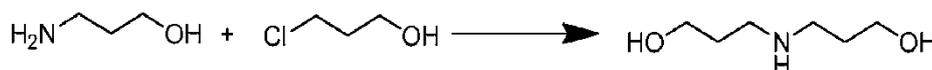
10

15 Preparación de dioleato de (Z)-((2-(dimetilamino)acetil)azanodiiil)bis(propano-3,1-diilo) (i-Pr-DODC)



Etapa 1: Preparación del producto intermedio 1: 3,3'-azanodiiil-bis(propan-1-ol)

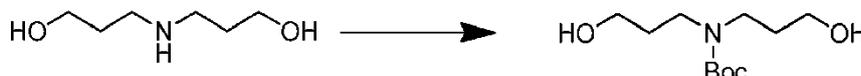
20



Se sometió a reflujo una mezcla de 3-amino-1-propanol (14,5 ml, 19,0 mmol), 1-cloro-3-hidroxiopropano (8,00 ml, 95,6 mmol) y agua (50 ml) a lo largo de 24 horas. Luego se añadió hidróxido de potasio (5,40 g). Tras la disolución, se evaporó toda el agua para dejar un aceite viscoso y grandes cantidades de cloruro de potasio. Se filtraron estos y se lavaron con acetona seca y diclorometano. La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se evaporó para dejar un aceite. Purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo 3,3'-azanodiiil-bis(propan-1-ol) (12,5 g).

25

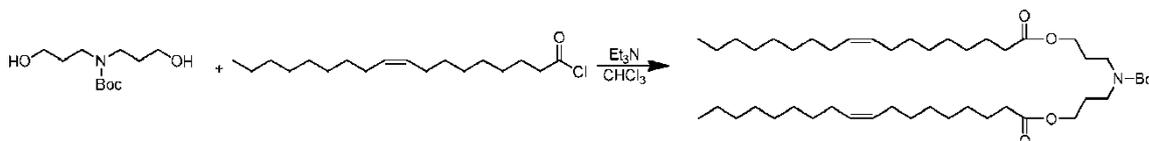
30 Etapa 2: Preparación del producto intermedio 2: bis(3-hidroxiopropil)carbamato de terc-butilo



Se diluyó 3,3'-azanodiiil-bis(propan-1-ol) (12,5 g, 95,4 mmol) en DCM (25 ml). Se añadió lentamente una disolución de dicarbonato de di-terc-butilo (26,0 g, 119 mmol) en DCM (25 ml) mientras se agitaba bajo un manto de gas Ar. Se permitió que la reacción se agitara durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo bis(3-hidroxiopropil)carbamato de terc-butilo.

35

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

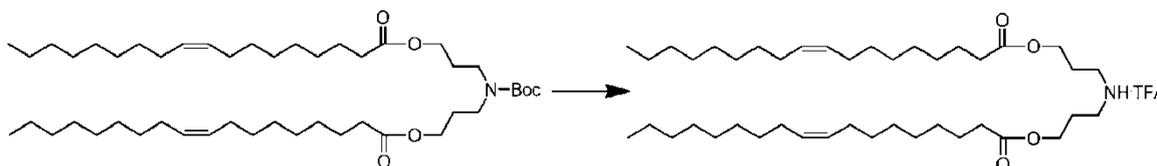


Se disolvieron bis(3-hidroxiopropil)carbamato de terc-butilo, trietilamina y DMAP en cloroformo. Se añadió, mientras se agitaba en un baño de hielo, una disolución de cloruro de oleílo a lo largo de 15 minutos. Se llevó a cabo la adición de tal modo que la temperatura de la reacción no excedió de 30 °C. Se permitió que la reacción se agitara a

45

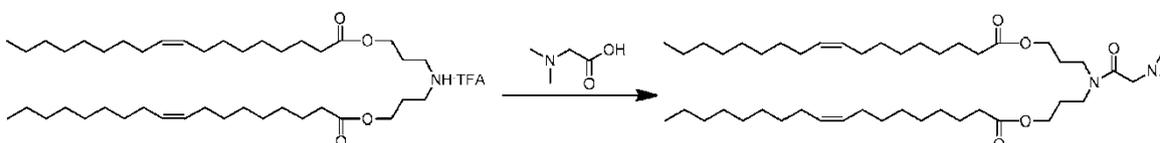
temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron, al día siguiente, MeOH (50 ml) y solución salina al 0,9 % (50 ml) para extinguir la reacción. Se separó la fase orgánica y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 1 M. Se secó el disolvente con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío para producir (Z)-dioleato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) como un aceite con el que se continuó sin purificación adicional.

5 Etapa 4: Preparación del producto intermedio 4: sal de sal de TFA de (Z)-dioleato de azanodiil-bis(propano-3,1-diilo)



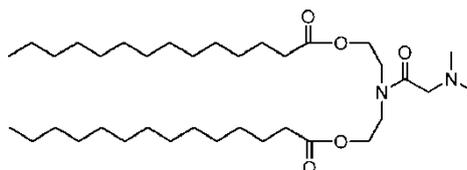
10 Se disolvió (Z)-dioleato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) (13,2 g, 17,3 mmol) en TFA/CHCl<sub>3</sub> (1:1, 20 ml) y se permitió que la mezcla se agitara a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se concentró el material a vacío. Se repitió esto una segunda vez. Luego se disolvió el material en DCM y se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a vacío. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo sal de TFA de (Z)-dioleato de azanodiil-bis(propano-3,1-diilo).

15 Etapa 5: Preparación de i-Pr-DODC: (Z)-dioleato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo)

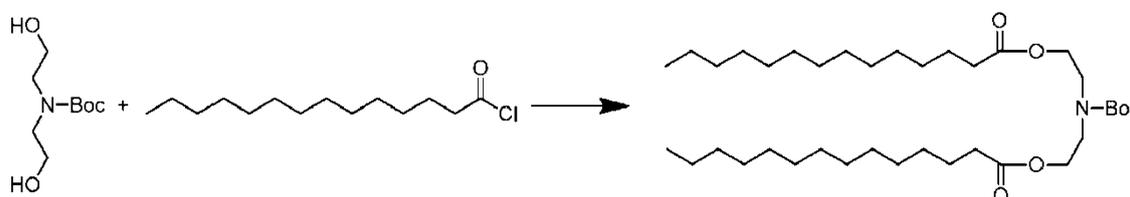


20 Se diluyó sal de TFA de (Z)-dioleato de azanodiil-bis(propano-3,1-diilo) (750 mg, 1,13 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla preactivada de N,N-dimetilglicina (128 mg, 1,24 mmol), HATU (517 mg, 1,36 mmol) y DIEA (413 ul, 2,37 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el matraz con argón y se permitió que se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH produjo (Z)-dioleato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diilo) (450 mg). QTOF MS ESI+: m/z 747,7 (M + H).

Preparación de ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo), (i-DC)

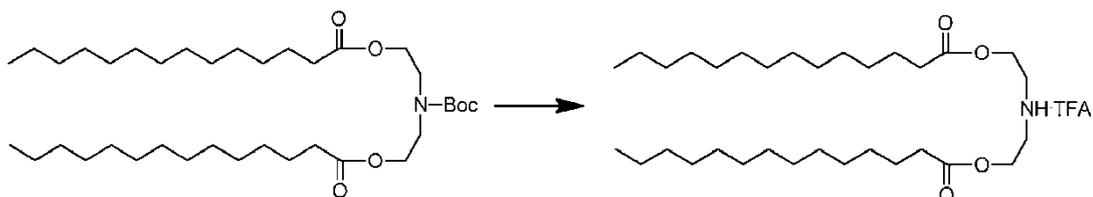


30 Etapa 1: Preparación del producto intermedio 1: ditetradecanoato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



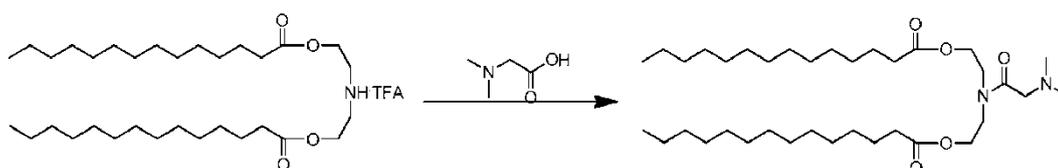
35 Se disolvieron N-Boc-dietanolamina (PM 205,25; 8,4 g, 0,041 molar), trietilamina (PM 101,19; 11,5 ml, 0,083 mol) y 4-(dimetilamino)piridina (PM 122,17; 1,3 g, 0,011 molar) en cloroformo (170 ml). Se añadió gota a gota, mientras se agitaba en un baño de agua/hielo, una disolución de cloruro de miristoilo (PM 246,82; 22 ml, 80,9 mmol) en 100 ml de cloroformo. Luego se sacó la mezcla de reacción del baño frío, y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió una mezcla de 200 ml de metanol y 200 ml de solución salina al 0,9 % para extinguir la reacción. Se detuvo la agitación y se aisló la fase orgánica. Se retiró el disolvente mediante evaporación rotatoria para proporcionar ditetradecanoato de ((terc-butoxicarbonil) azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) como un aceite incoloro (25,7 g) con el que se continuó sin purificación adicional.

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



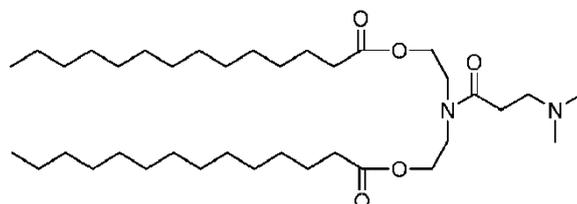
5 A una disolución de ditetradecanoato de ((*tert*-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (33,0 g, 0,053 mol) en 100 ml de cloroformo, se le añadió ácido trifluoroacético (150 ml, 2,02 mol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Después de retirar el disolvente mediante evaporación rotatoria, se recristalizó el sólido blando resultante en 80 ml de metanol para producir sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (16,6 g) como un sólido blanco.

10 Etapa 3: Preparación de i-DC: ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

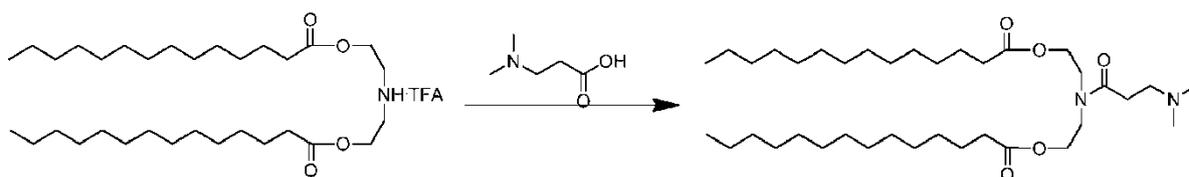


15 Se diluyó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (10 g, 16 mmol) con dimetilglicina (42,5 g, 25 mmol), DCC (4,7 g, 23 mmol) y DIEA (6,33 ml, 40 mmol) en piridina (20 ml). Se purgó el matraz de fondo redondo con gas argón y se calentó la mezcla de reacción a 55 °C durante la noche. Al día siguiente, se concentró la mezcla de reacción. Tras la purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH, se concentraron las fracciones combinadas para producir ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo).

20 Preparación de ditetradecanoato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (i-Et-DC, también denominado en el presente documento Et104)



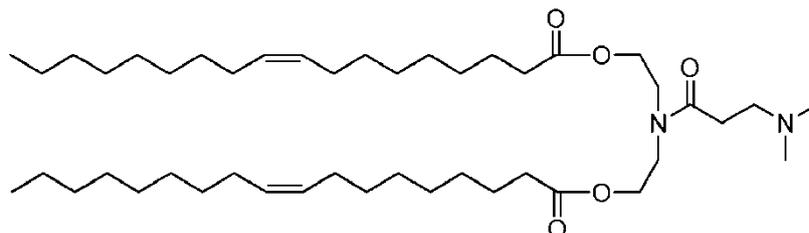
25 Preparación de i-Et-DC: ditetradecanoato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



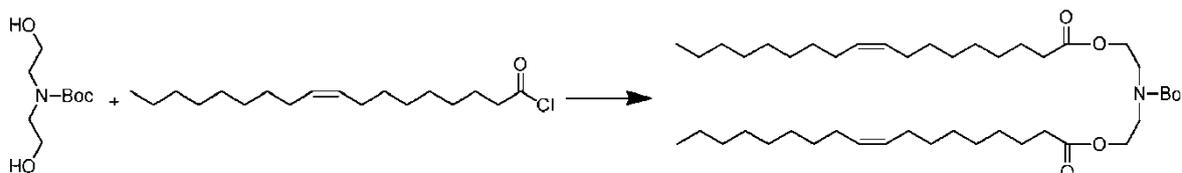
30 Síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) previamente descrita. Se diluyó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1,50 g, 2,85 mmol) con DCM (10 ml) y se añadió a una mezcla preactivada de sal de HCl de ácido 3-(dimetilamino)propiónico (482 mg, 3,14 mmol), HATU (1,30 g, 3,42 mmol) y DIEA (1,04 ml, 5,98 mmol) en DCM (10 ml). Se purgó el matraz de fondo redondo con gas argón y se permitió que la mezcla de reacción se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. Tras la purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH, se concentraron las fracciones combinadas y se agitaron en DCM (20 ml) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (20 ml) a 0-5 °C durante 30 min. Se aisló la fase orgánica y se extrajo además la fase acuosa con DCM (2 × 10 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con MgSO<sub>4</sub> durante 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron, se lavaron con DCM y se concentraron para producir ditetradecanoato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,01 g). QTOF MS ESI+: m/z 625,6 (M + H).

40 Preparación de (Z)-dioleato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

i-Et-DODC

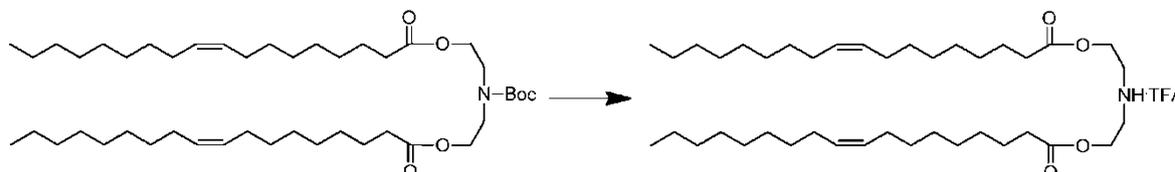


5 Etapa 1: Preparación del producto intermedio 1: (Z)-dioleato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



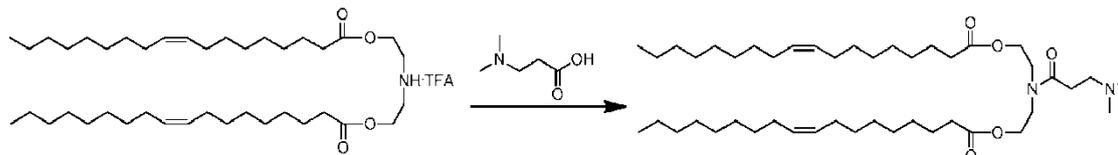
10 Se disolvieron N-Boc-dietanolamina (17,8 g, 0,087 molar), trietilamina (24,4 ml, 0,176 molar) y 4-(dimetilamino)piridina (2,76 g, 0,023 molar) en 350 ml de cloroformo. Se añadió, mientras se agitaba, una disolución de cloruro de oleílo (61,6 g, 0,174 molar) en 100 ml de cloroformo a lo largo de 10 min (alternativamente, se sumergió la disolución en cloroformo de N-Boc-dietanolamina en un baño de agua/hielo mientras se añadía cloruro de oleílo). Se llevó a cabo la adición de tal modo que la temperatura de la mezcla de reacción no excede de 50 °C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió una mezcla de 200 ml de metanol y 200 ml de salina al 0,9 % para extinguir la reacción. Se separó la fase orgánica y se lavó con 2 × 100 ml de bicarbonato de sodio acuoso diluido. Se retiró el disolvente mediante evaporación rotatoria para proporcionar (Z)-dioleato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) como un aceite amarillo pálido (59,5 g). Se usó este material para la siguiente etapa sin purificación adicional. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 0,87 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,20-1,40 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1,45 (s, 9H, tBu CH<sub>3</sub>), 1,59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)), 2,00 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CH=CH), 2,33 (t, 4H, CH<sub>2</sub>C(=O)), 3,48 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4,18 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 5,33 (m, 4H, CH=CH).

15 Etapa 2: Preparación del producto intermedio 2: sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo)



20 Se trató dos veces (Z)-dioleato de ((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (59,5 g, 0,081 molar) con 100 ml de ácido trifluoroacético (100 ml, 1,35 mol) y 100 ml de cloroformo. Cada una consistía en agitar a temperatura ambiente durante 10 min, y se retiró el disolvente mediante evaporación rotatoria al final de cada tratamiento. Se disolvió el residuo en 200 ml de cloruro de metileno y se había lavado la mezcla con 100 ml de agua dos veces. Se purificó el residuo mediante la cromatografía en gel de sílice usando una mezcla de metanol y cloruro de metileno como eluyente para producir sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (44,0 g). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 0,87 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,20-1,40 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1,59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)), 2,00 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CH=CH), 2,33 (t, 4H, CH<sub>2</sub>C(=O)), 3,31 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4,38 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 5,33 (m, 4H, CH=CH).

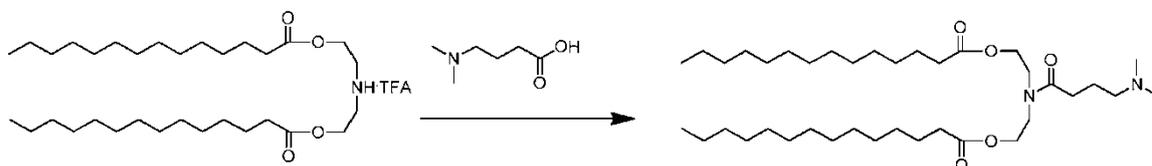
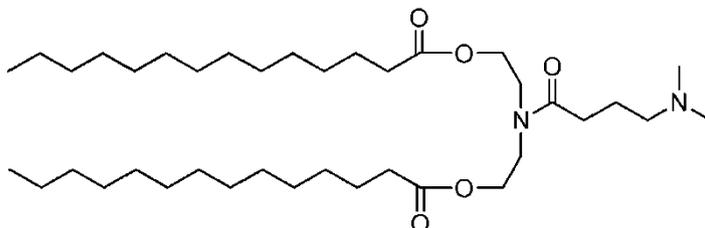
25 Etapa 3: Preparación de i-Et-DODC: (Z)-dioleato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



30 Se diluyó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1,50 g, 2,37 mmol) con DCM (10 ml) y se añadió a una mezcla preactivada de sal de HCl de ácido 3-(dimetilamino)propiónico (383 mg, 2,49 mmol), HATU (1,03 g, 2,72 mmol) y DIEA (831 ul, 4,77 mmol) en DCM (10 ml). Se purgó el matraz de fondo redondo con gas argón y se permitió que la mezcla de reacción se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. Tras la purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH, se concentraron las fracciones combinadas y se agitaron en DCM (20 ml) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (20 ml) a 0 °C-5 °C durante

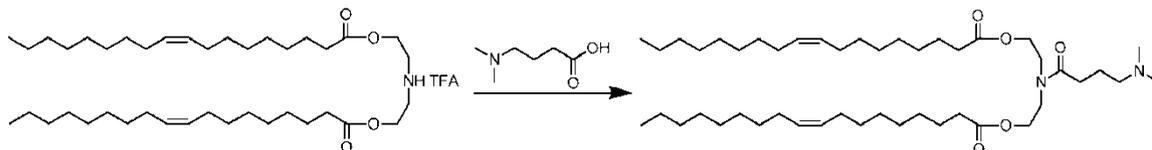
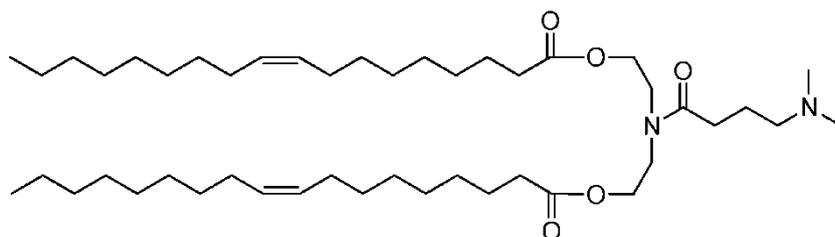
30 min. Se aisló la fase orgánica y se extrajo además la fase acuosa con DCM (2 × 10 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con MgSO<sub>4</sub> durante 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron, se lavaron con DCM y se concentraron para producir (Z)-dioleato de ((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo). QTOF MS ESI+: m/z 733,6 (M + H).

5 Preparación de ditetradecanoato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) [i-Prop-DC (también denominado en el presente documento Pr104)]



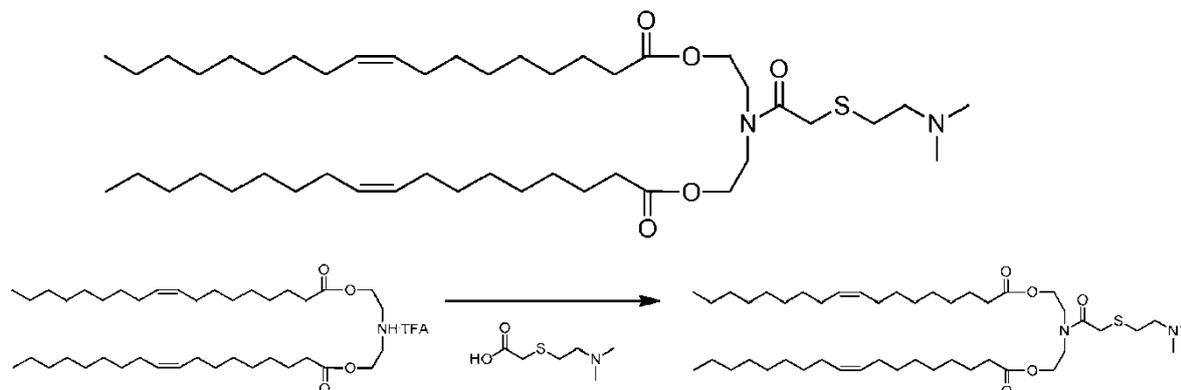
10 Síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) previamente descrita. Se diluyó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1,00 g, 1,90 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla preactivada de sal de HCl de ácido 4-(dimetilamino)butírico (382 mg, 2,28 mmol), HATU (867 mg, 2,28 mmol) y DIEA (728 ul, 4,18 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el matraz de fondo redondo con gas argón y se permitió que la mezcla de reacción se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. Tras la purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH, se concentraron las fracciones combinadas y se agitaron en DCM (20 ml) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (20 ml) a 0 °C-5 °C durante 30 min. Se aisló la fase orgánica y además se extrajo la fase acuosa con DCM (2 × 10 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con MgSO<sub>4</sub> durante 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron, se lavaron con DCM y se concentraron para producir ditetradecanoato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo). CL-EM ESI+: m/z 639,6 (M + H).

20 Preparación de (Z)-dioleato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) [i-Prop-DODC (también denominado en el presente documento Pr104-DO)]



25 Síntesis de sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) previamente descrita. Se diluyó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1,00 g, 1,58 mmol) con DCM (5 ml) y se añadió a una mezcla preactivada de sal de HCl de ácido 4-(dimetilamino)butírico (317 mg, 1,89 mmol), HATU (719 mg, 1,89 mmol) y DIEA (606 ul, 3,48 mmol) en DCM (5 ml). Se purgó el matraz de fondo redondo con gas argón y se permitió que la mezcla de reacción se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la mezcla de reacción. Tras la purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH, se concentraron las fracciones combinadas y se agitaron en DCM (20 ml) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (20 ml) a 0 °C-5 °C durante 30 min. Se aisló la fase orgánica y se extrajo además la fase acuosa con DCM (2 × 10 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con MgSO<sub>4</sub> durante 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron, se lavaron con DCM y se concentraron para producir (Z)-dioleato de ((4-(dimetilamino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo). CL-EM ESI+: m/z 747,7 (M + H).

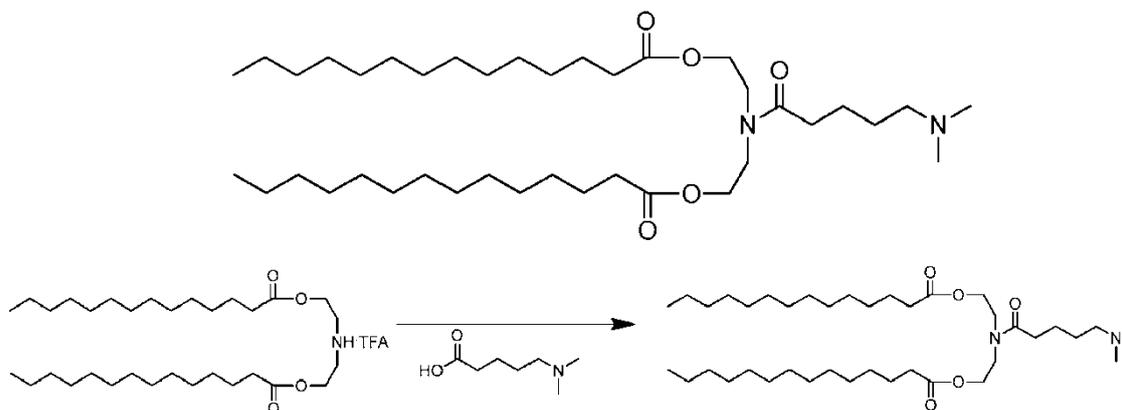
## Preparación de (Z)-dioleato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (S104-DO)



5 Síntesis de sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) anteriormente descrita. Se agitó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (4,06 g, 6,41 mmol) en DCM (60 ml) con  $K_2CO_3$  al 10 % (30 ml) a 0 °C-5 °C. Tras 30 min, se separó la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (30 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con  $MgSO_4$  durante un periodo de 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron y se lavaron con DCM (~30 ml). A los filtrados combinados se les añadieron ácido 2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acético (1,26 g, 7,70 mmol), sal de HCl de EDC (1,84 g, 9,62 mmol), DMAP (78,3 mg, 0,64 mmol) y se agitó la suspensión fina durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se añadieron  $H_2O$  (60 ml) y MeOH (30 ml) y tras la agitación durante 10 min, se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM. Se concentraron los extractos orgánicos combinados. Se filtró el material en bruto a través de un tapón de sílice y se llevó a DCM (40 ml) y se añadió PBS (pH = 11, 50 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante ~10 min. Después de eso, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa de nuevo con DCM (15 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas ( $MgSO_4$ ) durante 30 min, se filtraron, se lavaron con DCM y se concentran para producir (Z)-dioleato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (3,44 g). CL-EM ESI+: m/z 780,2 (M + H).

20

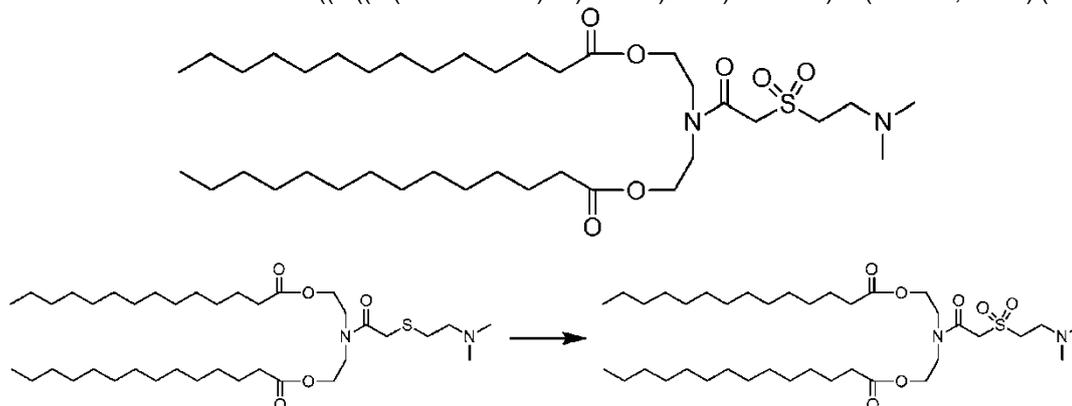
## Preparación ditetradecanoato de ((5-(dimetilamino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (C104)



25 Síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) previamente descrita. Se agitó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (730 mg, 1,14 mmol) en DCM (20 ml) con  $K_2CO_3$  al 10 % (10 ml) a 0 °C-5 °C. Se separó tras 30 min la fase orgánica y se extrajo además la fase acuosa con DCM (10 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con  $MgSO_4$  durante un periodo de 30 minutos a 0 °C-5 °C, se filtraron y se lavaron con DCM (10 ml). A los filtrados combinados se les añadieron ácido 5-(dimetilamino)pentanoico (248 mg, 1,37 mmol), sal de HCl de EDC (328 mg, 1,71 mmol), DMAP (14 mg, 0,114 mmol) y se agitó la suspensión fina durante la noche a temperatura ambiente, después de lo cual la disolución se vuelve transparente. Al día siguiente, se añadieron  $H_2O$  (20 ml) y MeOH (10 ml) y tras la agitación durante 10 min, se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM. Se concentraron los extractos orgánicos combinados. Tras la purificación mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 100 % seguido de MeOH/DCM al 10 %, se llevó el residuo purificado a DCM (25 ml) y PBS (pH = 11, 25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min. Después de eso, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa de nuevo con DCM (15 ml). Se secaron los compuestos orgánicos combinados ( $MgSO_4$ ) durante 30 min, se filtraron, se lavaron con DCM y se concentran para producir ditetradecanoato de ((5-(dimetilamino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (405 mg). CL-EM ESI+: m/z 654,1 (M + H).

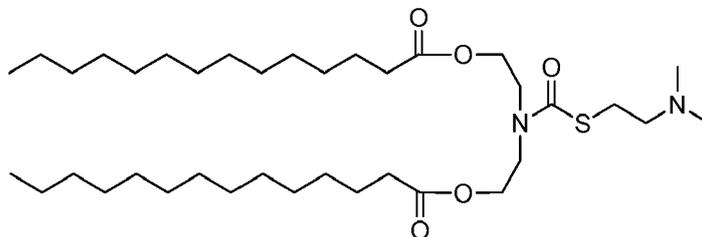
35

Preparación de ditetra-decanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)sulfonil)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (SO2-S104)



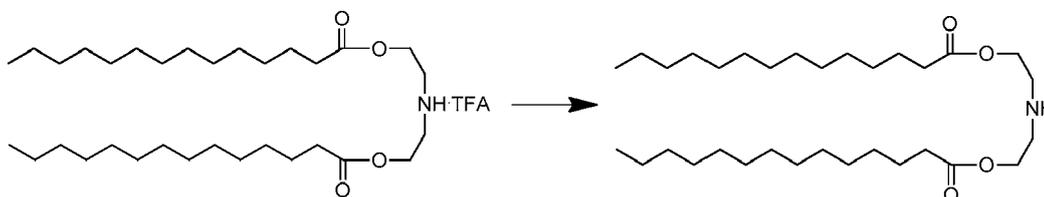
- 5 Se describió la síntesis de ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo), también conocido como S104. A ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) en un matraz de fondo redondo, purgado con argón, se añadió DCM (10 ml). Se enfrió la disolución mediante un baño de hielo. A esto, se añadió mCPBA (una disolución en DCM) lentamente a lo largo de 5 min. Se retiró el baño de hielo tras la adición y se dejó agitando la reacción durante la noche a temperatura ambiente. Tras 3,5 horas, se
- 10 añadió lentamente DMA 2 M/THF (4,55 ml) y se dejó agitando la mezcla de reacción durante la noche. Después se diluyó la mezcla de reacción con DCM hasta 75 ml. Se lavó con H<sub>2</sub>O (2 × 50 ml) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (50 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a reextracción con DCM (40 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron para producir un aceite incoloro. Se concentró la mezcla de reacción. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo/MeOH produjo
- 15 ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)sulfonil)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (540 mg). CL-EM ESI+: m/z 704,0 (M + H).

Preparación de ditetradecanoato de (((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (TU104)



20

Etapla 1: Preparación de producto intermedio 1: ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo)

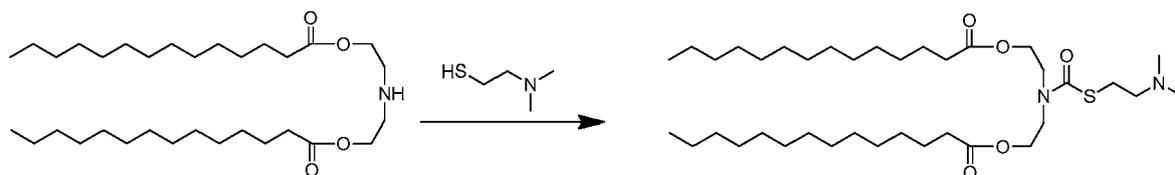


25

- Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se disolvió sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) en DCM (50 ml) y se añadió PBS (pH = 11, 50 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min. Después, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa de nuevo con DCM (25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>) durante 30 min, se
- 30 filtraron, se lavaron con DCM y se concentraron para producir ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) como base libre.

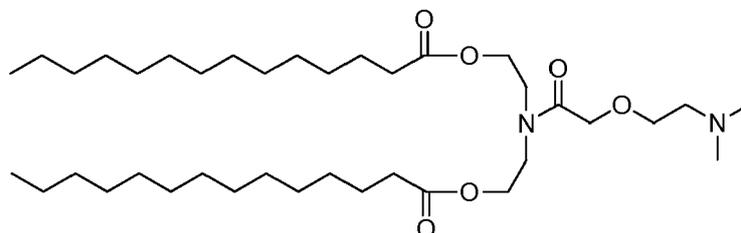
Etapla 2: Preparación de TU-104: ditetradecanoato de (((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

35

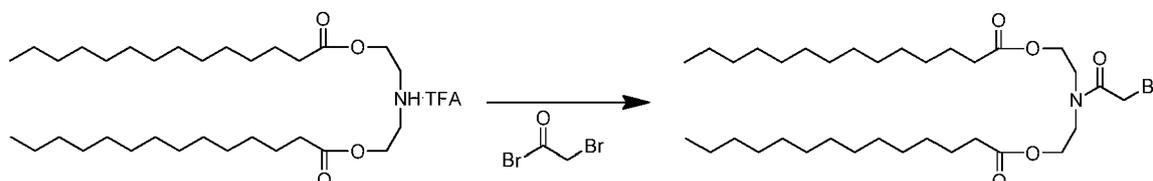


5 Se añadió cloroformiato de triclorometilo (también conocido como difosgeno) (257  $\mu$ l, 2,13 mmol) a una disolución de sal de HCl de 2-(dimetilamino)etanotiol (302 mg, 2,13 mmol) en DCM seco (20 ml) y se agitó bajo una capa de argón a temperatura ambiente durante 4 h. Después, se eliminaron a vacío DCM y difosgeno en exceso. Después se añadieron base libre de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1068 mg, 2,03 mmol), DCM (20 ml) y trietilamina (580  $\mu$ l, 4,16 mmol). Tras 16 h a temperatura ambiente se diluyó la mezcla de reacción con DCM y se lavó con HCl 1 M (75 ml), H<sub>2</sub>O (75 ml) y PBS (pH = 11, 75 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo seguido por un gradiente de DCM/MeOH produjo ditetradecanoato de (((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (120 mg). CL-EM ESI+: m/z 657,5 (M + H).

Preparación de ditetradecanoato de ((2-(2-(dimetilamino)etoxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (O104)

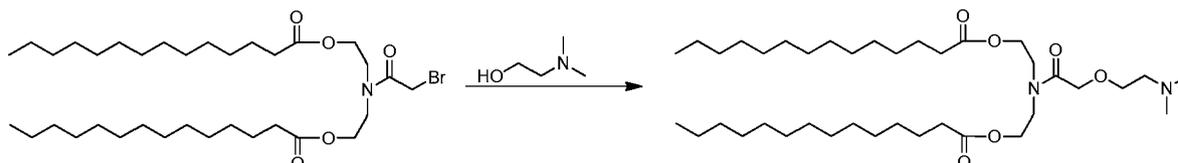


15 Etapa 1: Preparación de producto intermedio 1: ditetradecanoato de ((2-bromoacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



20 Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se disolvió sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1500 mg, 2,34 mmol) en DCM (20 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se añadió bromuro de bromoacetilo (214  $\mu$ l, 2,46 mmol) seguido por trietilamina (685  $\mu$ l, 4,91 mmol). Se retiró el baño de hielo y se dejó agitando la reacción durante la noche a temperatura ambiente bajo una capa de gas inerte. Al día siguiente, se diluyó con DCM hasta 100 ml. Se lavó con HCl 1 M (75 ml), H<sub>2</sub>O (75 ml), disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (75 ml) y disolución saturada de salmuera (75 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a reextracción con DCM (25 ml). Se secaron las fases orgánicas con MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó mediante cromatografía de gel de sílice y se eluyó con acetato de etilo al 100 %. Se combinaron y se concentraron fracciones para producir ditetradecanoato de ((2-bromoacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1220 mg).

30 Etapa 2: Preparación de O104: ditetradecanoato de ((2-(2-(dimetilamino)etoxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



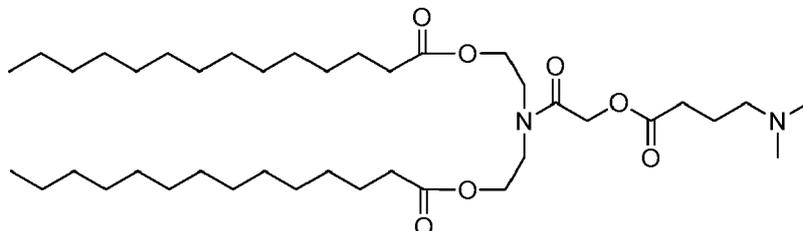
35 A un matraz de fondo redondo equipado con barra de agitación, se añadió ditetradecanoato de ((2-bromoacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,22 g, 1,87 mmol), N,N-dimetiletanolamina (197  $\mu$ l, 1,96 mmol), yoduro de potasio (6,2 mg, 0,0374 mmol) y THF seco (25 ml). Se enfrió la disolución resultante hasta -40 °C. Se añadió DBU (588  $\mu$ l, 3,93 mmol) gota a gota a lo largo de 5 min y se calentó la reacción hasta 0 °C durante 2 horas. Se concentró la mezcla de reacción. Se llevó el residuo a DCM, se añadió HCl 1 M (12 ml), y se agitó la mezcla bifásica durante 15 min. Después, se basificó usando PBS (pH = 11). Se aisló la fase orgánica, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 100 % seguido

40

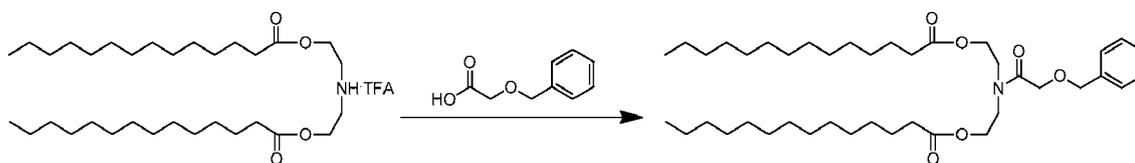
por un gradiente de DCM/MeOH produjo ditetradecanoato de ((2-(2-(dimetilamino)etoxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (53 mg). CL-EM ESI+: m/z 655,6 (M + H).

Preparación de ditetradecanoato de ((2-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (HEDC-M1)

5



Etapa 1: Preparación de producto intermedio 1: ditetradecanoato de ((2-(benciloxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



10

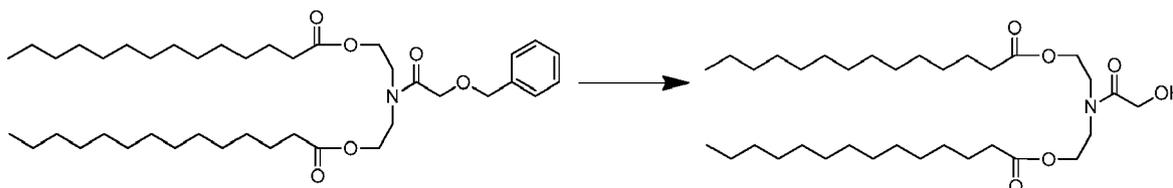
Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se agitó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) en DCM (25 ml) con  $K_2CO_3$  al 10 % (12,5 ml) a 0-5 °C. Tras 30 min, se aisló la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (12 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con  $MgSO_4$  durante 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron, se lavaron con DCM (12 ml). A los filtrados combinados se añadieron ácido benciloixacético (402  $\mu$ l, 2,81 mmol), sal de HCl de EDC (673 mg, 3,51 mmol) y DMAP (29 mg, 0,234 mmol). Se dejó agitando la suspensión a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añadieron  $H_2O$  (25 ml) y MeOH (12 ml) y tras agitar durante 10 min se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (25 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados con  $MgSO_4$ , se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de hexanos/acetato de etilo produjo ditetradecanoato de ((2-(benciloxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,28 g).

15

20

Etapa 2: Preparación de producto intermedio 2: ditetradecanoato de ((2-hidroxiacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

25

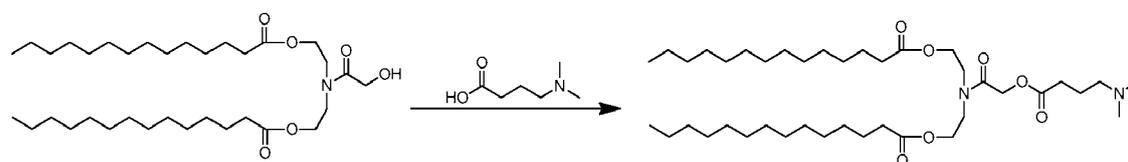


Se disolvió ditetradecanoato de ((2-(benciloxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,28 g, 1,80 mmol) en un matraz de fondo redondo con MeOH (20 ml). Se tapó el matraz y se purgó con argón. Se añadió Pd/C al 10 % (135 mg) y se purgó una vez más el matraz con argón. Se eliminó todo el aire mediante bombeo a vacío y después se añadió un globo de 8" lleno con gas  $H_2$ . Se dejó agitando la reacción de manera vigorosa a temperatura ambiente. Tras 30 min, se filtró la mezcla de reacción (Celite), se lavó con metanol, se concentró hasta obtener un residuo, se llevó a DCM (25 ml) y  $K_2CO_3$  al 10 % (25 ml). Se agitó la mezcla durante 15 min y después se aisló la fase orgánica. Se sometió el lavado acuoso a reextracción con DCM (15 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas con  $MgSO_4$ , se filtraron y se concentraron para producir ditetradecanoato de ((2-hidroxiacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (990 mg).

30

35

Etapa 3: Preparación de HEDC-M1: ditetradecanoato de ((2-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



40

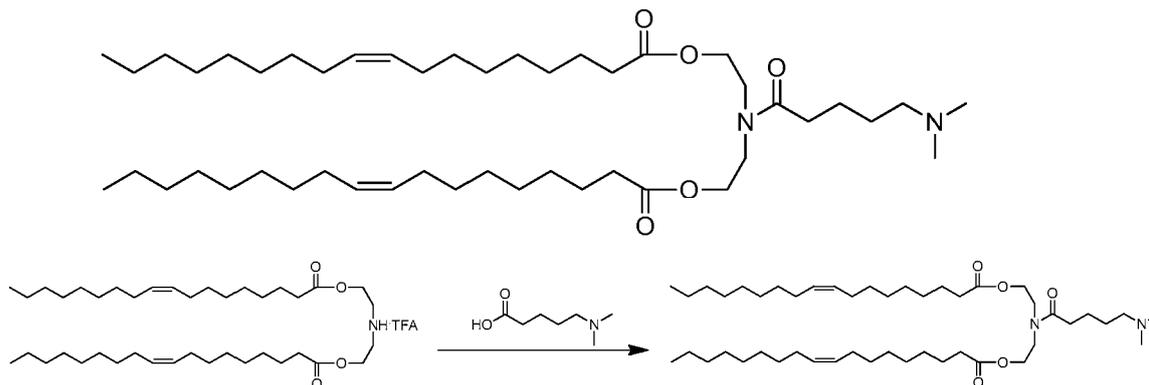
Se agitó ditetradecanoato de ((2-hidroxiacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (990 mg, 1,70 mmol) en DCM (20 ml) y se añadieron ácido 4-dimetilamino-butírico (268 mg), sal de HCl de EDC (487 mg) y DMAP (21 mg). Se dejó agitando la

suspensión a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añadieron H<sub>2</sub>O (20 ml) y MeOH (10 ml) y tras agitar durante 10 minutos se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (20 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados con MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. Se purificó el material bruto mediante cromatografía de gel de sílice con elución en un gradiente de DCM/MeOH. Se concentraron las fracciones combinadas y concentradas y se llevaron a DCM (25 ml) y PBS (pH = 11, 25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min. Después, se aisló la fase orgánica, y se extrajo la fase acuosa de nuevo con DCM (25 ml). Se secaron los compuestos orgánicos combinados (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron para producir ditetradecanoato de ((2-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (672 mg). CL-EM ESI+: m/z 697,6 (M + H).

5

10

Preparación de dioleato de (Z)-((5-(dimetilamino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (C104-DO)



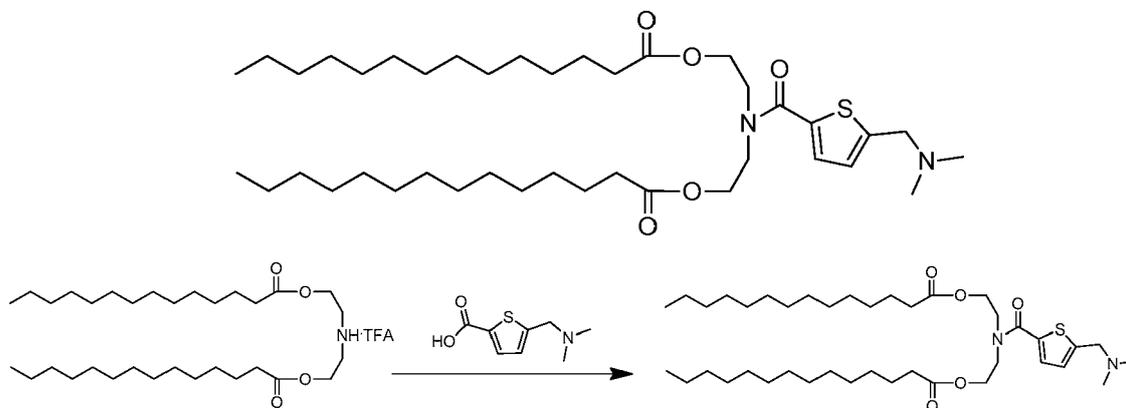
15 Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se agitó sal de TFA de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1,50 g, 2,37 mmol) en DCM (20 ml) con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (10 ml) a 0 °C-5 °C. Tras 30 min, se aisló la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (10 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con MgSO<sub>4</sub> durante un periodo de 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron y se lavaron con DCM (15 ml). A los filtrados combinados se añadieron ácido 5-(dimetilamino)pentanoico (516 mg, 2,84 mmol), sal de HCl de EDC (681 mg, 3,55 mmol), DMAP (29 mg, 0,237 mmol) y se agitó la suspensión durante la noche a temperatura ambiente, periodo de tiempo tras el cual se formó una disolución transparente. Al día siguiente, se añadieron H<sub>2</sub>O (20 ml) y MeOH (10 ml) y tras agitar durante 10 min, se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM. Se secaron los compuestos orgánicos combinados (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. Tras la purificación mediante cromatografía de gel de sílice con elución en un gradiente de DCM/MeOH, se llevaron las fracciones combinadas y concentradas a DCM (25 ml) y PBS (pH = 11, 25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante ~10 min. Después, se separó mediante aislamiento la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa de nuevo con DCM (15 ml). Se secaron los compuestos orgánicos combinados (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron, y se concentraron para producir dioleato de (Z)-((5-(dimetilamino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,10 g). CL-EM ESI+: m/z 761,7 (M + H).

20

25

30

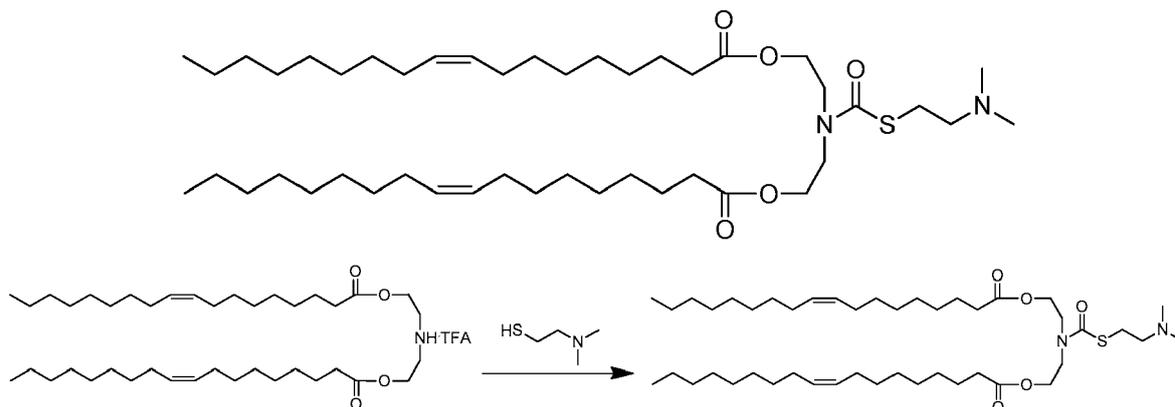
Preparación de di-tetradecanoato de ((5-((dimetilamino)metil)tiofeno-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (T104)



35 Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se agitó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1004 mg, 1,57 mmol) en DCM (20 ml) con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (20 ml) a 0 °C-5 °C. Tras 30 min, se aisló la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (10 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas con MgSO<sub>4</sub> durante 30 min a 0 °C-5 °C, se filtraron y se lavaron con DCM (10 ml). A los filtrados combinados se añadieron ácido ((dimetilamino)metil)tiofeno-2-carboxílico (350 mg,

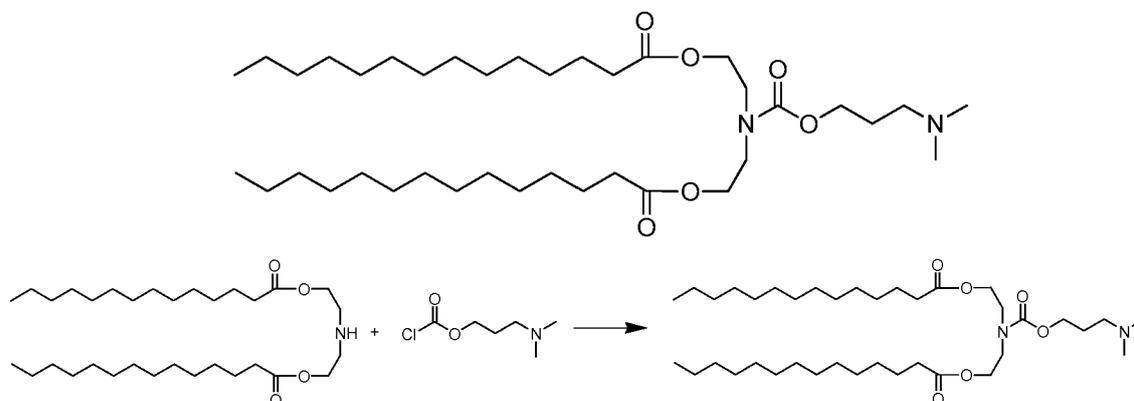
1,89 mmol), sal de HCl de EDC (452 mg, 2,36 mmol), y DMAP (19,2 mg, 0,157 mmol). Se dejó agitando la suspensión a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añadieron H<sub>2</sub>O (20 ml) y MeOH (10 ml) y tras agitar durante 10 min, se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron, y se concentraron. Tras la purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de hexanos/acetato de etilo, se llevaron las fracciones combinadas y concentradas a DCM (20 ml) y PBS (pH = 11, 20 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante ~10 min. Después, se aisló la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa de nuevo con DCM (15 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>) durante un periodo 30 min, se filtraron, se lavaron con DCM, y se concentraron para producir ditetradecanoato de ((5-((dimetilamino)metil)tiofeno-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (482 mg). CL-EM ESI+: m/z 693,6 (M + H).

Preparación de dioleato de (Z)-(((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (TU104-DO)



Anteriormente se describió la síntesis de dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo). Se disolvió dioleato de (Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (4,20 g, 5,72 mmol) en DCM (20 ml) y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Se añadió TFA (20 ml) y se dejó agitando la mezcla bajo una capa de gas inerte durante 20 min. Después, se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se repartió el residuo entre K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (20 ml) y DCM (20 ml), y se agitó en un baño de hielo durante 20 min. Se aisló la fase orgánica, se secó (MgSO<sub>4</sub>), y se filtró. Se añadió difosgeno (1,38 ml, 11,4 mmol) a material de dioleato de (Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) en DCM y se agitó bajo una capa de gas inerte a temperatura ambiente. Al día siguiente, se eliminaron DCM y difosgeno en exceso a vacío. Se llevó sal de HCl de 2-(dimetilamino)etanotiol (4,05 g, 28,6 mmol) a DCM (50 ml) y trietilamina (5,2 ml, 37,2 mmol) y se añadió a residuo de dioleato de (Z)-((clorocarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo). Se dejó agitando el material durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se diluyó con DCM y se lavó con HCl 0,3 M (75 ml), H<sub>2</sub>O (75 ml) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (75 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a reextracción con DCM (25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con gradiente de DCM/MeOH produjo dioleato de (Z)-(((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,90 g). CL-EM ESI+: m/z 765,7 (M + H).

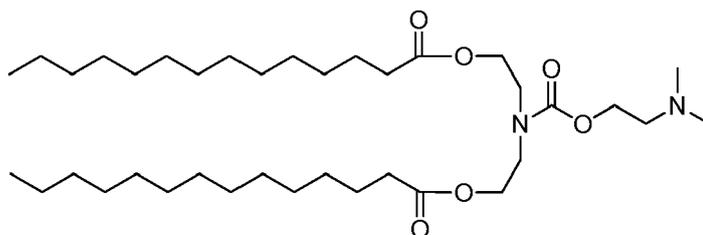
Preparación de ditetradecanoato de (((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) (CB104)



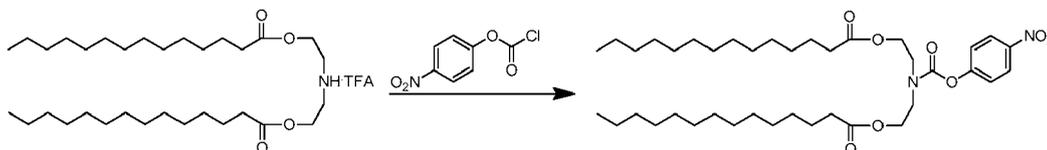
Anteriormente se describió la síntesis de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se añadió difosgeno (266 ul, 2,2 mmol) a dimetilaminopropanol (413 mg, 4,00 mmol) en DCM (10 ml) y se agitó bajo una capa de gas inerte a temperatura ambiente durante 4 h. Se eliminó el DCM y difosgeno en exceso a vacío y se añadió

ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se purgó el matraz de fondo redondo con argón y DCM (10 ml) y se añadió trietilamina (859  $\mu$ l, 6,16 mmol). Se dejó agitando el material durante la noche a temperatura ambiente. Después se diluyó la mezcla de reacción con DCM y se lavó con HCl 0,3 M (75 ml), H<sub>2</sub>O (75 ml) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (75 ml). Se sometieron todos los lavados acuosos a reextracción con DCM (25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con gradiente de DCM/MeOH produjo ditetradecanoato de (((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (87 mg). CL-EM ESI+: m/z 655,59 (M + H).

Preparación de ditetradecanoato de (((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (CA104)

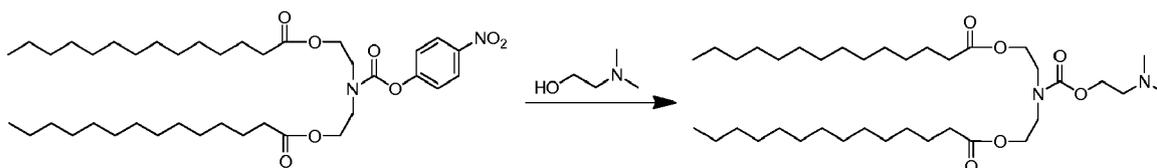


Etapa 1: Preparación de producto intermedio 1: ditetradecanoato de (((4-nitrofenoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



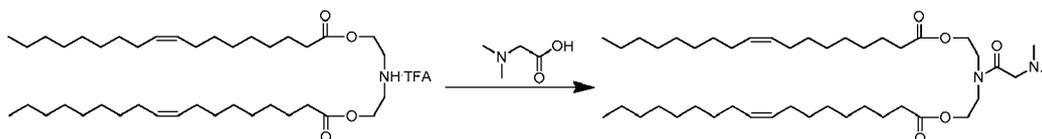
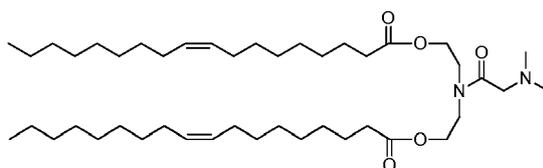
Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se disolvió sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) en DCM seco (10 ml) y se añadió trietilamina (654  $\mu$ l, 4,69 mmol). Se purgó el recipiente de reacción con gas inerte y se añadió cloruro de 4-nitrofenilo. Se dejó agitando el material a TA durante la noche. Se extinguió la mezcla de reacción con agua (50 ml) y DCM (50 ml). Se aisló la fase orgánica, y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (2  $\times$  50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con gradiente de hexanos/acetato de etilo produjo ditetradecanoato de (((4-nitrofenoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo).

Etapa 2: Preparación de CA104: ditetradecanoato de (((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



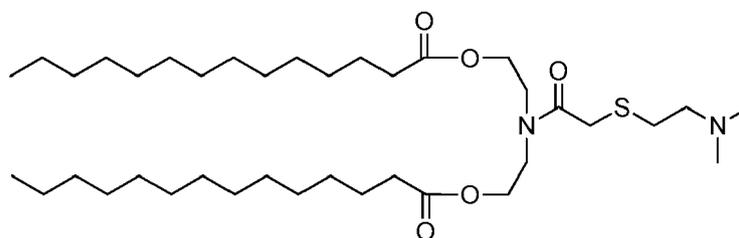
A ditetradecanoato de (((4-nitrofenoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo), se añadió 2-dimetilaminoetanol (2 ml) y se calentó hasta 140 °C con una columna de condensación durante 20 min. Después, se purificó el material bruto mediante cromatografía de gel de sílice con elución en un gradiente de DCM/MeOH para producir ditetradecanoato de (((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (38 mg). CL-EM ESI+: m/z 641,7 (M + H).

Preparación de ditetradecanoato de ((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (INT-4)

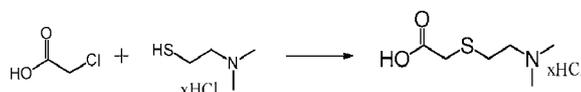


5 Se preparó la síntesis de dioleato de (Z)-((2-(dimetilamino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) de manera similar a i-Prop-DODC con la sustitución de ácido 3-(dimetilamino)propiónico por dimetilglicina. QTOF MS ESI+: m/z 720,1 (M + H).

Preparación de ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (S104)

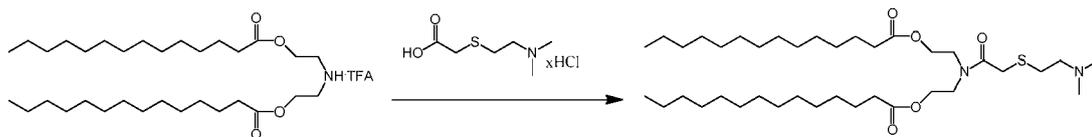


10 Etapa 1: Preparación de producto intermedio 1: clorhidrato de ácido 2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acético:



15 Se desgasificó etanol (500 ml) evacuando tres veces hasta 60 mBar durante 1-2 minutos y volviendo a presurizar con nitrógeno. Se añadió ácido cloroacético (36,9 g, 0,391 mol) y se formó una disolución transparente tras haber agitado durante 5 minutos a 17 °C-20 °C. Se añadió clorhidrato de 2-(dimetilamino)-etanotiol (52,7 g, 0,372 mol), y se formó una disolución transparente tras haber agitado durante 20 minutos a 25 °C. Se añadió hidróxido de sodio sólido (47,7 g, 1,19 mol) en porciones a lo largo de un periodo de 20 minutos con enfriamiento con el fin de mantener la temperatura por debajo de 35 °C, se observó un breve periodo a 44 °C. Se observó una precipitación casi inmediata. Finalmente se calentó la mezcla de reacción y se agitó a 40 °C durante un periodo de dos horas, momento en el cual la CCF indicó la terminación de la reacción. Se añadió Celite 545 (74 g), y se filtró la mezcla a través de una placa de vidrio sinterizado G3 a lo largo de 6 minutos, lavando con etanol (2 × 105 ml). Se evaporaron los filtrados turbios combinados a partir de un baño a 50 °C para dar 110 g de sólido blanco. Se disolvió el sólido en agua (250 ml), después se ajustó el pH desde 13,1 (temp. de 30 °C) hasta 10,5 (temp. de 31 °C), usando HCl concentrado (5,5 ml) para dar una disolución de color amarillo muy pálido. Se lavó la fase acuosa con DCM (3 × 100 ml) para eliminar la impureza de disulfuro (se requirieron los 3 lavados). Se añadió HCl concentrado a la fase acuosa (pH 10,7, temp. de 22 °C) hasta que el pH era de 1,4 (se añadieron 57,5 ml, temp. de 35 °C). Se lavó la fase acuosa con DCM (100 ml) y después se concentró hasta sequedad (temperatura del baño de 55 °C). Se añadió tolueno (250 ml), se concentró la mezcla hasta sequedad (temperatura del baño de 55 °C) y se repitió esto una vez para dar un sólido blanco húmedo (98 g). Se añadió acetonitrilo (750 ml) al sólido, se agitó la mezcla a 55 °C durante un periodo de 45 minutos, y después se filtró a través de una placa de vidrio sinterizado G3. Se añadió acetonitrilo (250 ml) a la torta de filtro, se agitó la mezcla a 55 °C durante un periodo de 25 minutos y después se filtró a través de una placa de vidrio sinterizado G3, lavando con acetonitrilo (50 ml). Se concentraron los filtrados combinados hasta 300 ml, dando como resultado un precipitado blanco pesado. Se enfrió la mezcla bajo nitrógeno y se agitó a 0 °C durante un periodo de 30 minutos. Se aisló el precipitado mediante filtración a través de una placa de vidrio sinterizado G3, y se lavó la torta de filtro con acetonitrilo frío (100 ml). Secar a presión reducida durante 3 días proporciona 47,0 g (63 %) de clorhidrato de ácido 2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acético.

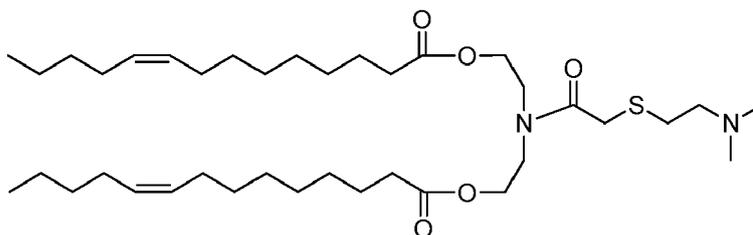
40 Etapa 2: Preparación de S104: ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



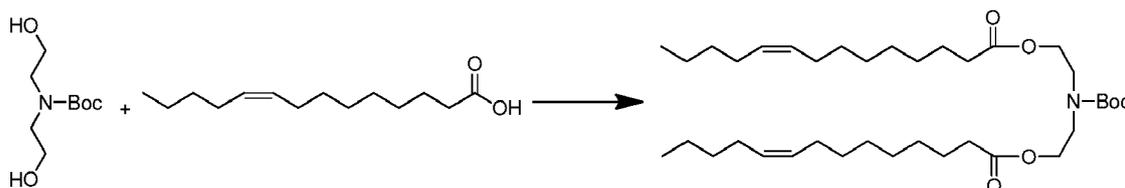
Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se agitó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (152 g, 238 mmol) con DCM (2,3 l) y bicarbonato de potasio al 10 % (1,15 l) a 0 °C-5 °C. Se separó la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (1,15 l). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con sulfato de magnesio hidratado (236 g) durante un periodo de 30 minutos a 0 °C-5 °C, se filtraron y se lavaron con DCM (1,15 l). A los filtrados combinados se añadieron clorhidrato de ácido 2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acético (57,0 g, 285 mmol), clorhidrato de EDC (68,4 g, 357 mmol) y DMAP (2,91 g, 23,8 mmol), y se agitó la suspensión fina durante la noche a temperatura ambiental, periodo de tiempo tras el cual se formó una disolución transparente. Se añadieron agua (2,3 l) y metanol (460 ml) y tras haber agitado durante un periodo de 10 minutos se separó la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia (pH 3,0) con DCM (575 ml). Se concentraron los extractos orgánicos combinados proporcionando 143 g de material bruto como sal de clorhidrato. Se transfirió el material bruto (142,6 g) a un matraz de destilación con DCM (500 ml), y se añadió acetato de etilo (1 l). Se calentó la disolución hasta destilación a presión atmosférica y se continuó la destilación a lo largo de un periodo de 70 minutos con el fin de obtener una temperatura del residuo de 76 °C. Se obtuvo un volumen total de 1,4 l mediante adición de acetato de etilo (800 ml), y se añadió etanol (70 ml). Se enfrió la disolución transparente a 50 °C hasta 37 °C y se añadieron cristales simiente. Habiendo observado el inicio de cristalización significativa a lo largo de un periodo de 10 minutos a 37 °C-35 °C, se enfrió la suspensión y se agitó a 0 °C durante la noche y se aisló el precipitado mediante filtración, y se lavó con acetato de etilo frío (210 ml). Secar hasta obtener un peso constante a temperatura ambiental a vacío con bomba de aceite a lo largo de un periodo de 4,5 horas dio 134 g de material recristalizado como sal de clorhidrato, sólido cristalino blanco.

Se añadieron fosfato de tripotasio (85 g, 0,40 mol) e hidrogenofosfato de dipotasio (226 g, 1,30 mol) a agua purificada (1,7 l), y se enfrió la disolución formada con pH 10,9 hasta 18 °C-20 °C. Se añadieron DCM (1,3 l) y clorhidrato de S104 recristalizado (133,0 g, 0,188 mol), y se agitó la mezcla durante un periodo de 10 min. Se separó una fase orgánica transparente a una tasa moderada (a lo largo de un periodo de 35 minutos), y se extrajo adicionalmente la fase acuosa turbia con DCM (650 ml). Se agitaron las fases orgánicas combinadas con sulfato de magnesio hidratado (65 g) durante un periodo de 40 minutos, y se filtró la mezcla, lavando con DCM (200 ml). Se evaporaron los filtrados combinados a partir de un baño de agua a 50 °C a presión reducida (hasta 20 mBar, presión a la que se continuó la evaporación durante una hora). La evaporación adicional a partir de un baño de agua a 15 °C-20 °C a vacío de bomba de aceite dio como resultado 126 g de aceite parcialmente solidificado. Enfriar en un baño de enfriamiento a -20 °C dio una solidificación completa, y tras secar a -20 °C a vacío durante dos días se obtuvieron 126 g de ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo), también conocido como S104. HPLC indica una pureza del 98,1 %. QTOF MS ESI+: m/z 671,6 (M + H).

Preparación de bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (S104-DMO)



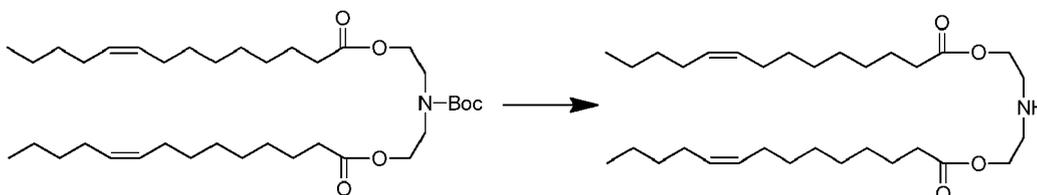
Etapa 1: Preparación de producto intermedio 1: bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



Se disolvieron N-Boc-dietanolamina (454 mg, 2,21 mmol), ácido miristoleico (1000 mg, 4,42 mmol) y DMAP (54 mg, 0,442 mmol) en DCM (25 ml) y se colocaron en un baño de agua a temperatura ambiental en un matraz de fondo redondo que se purgó con gas inerte. Se añadió sal de HCl de EDC (932 mg, 4,86 mmol) en 3 porciones a lo largo de 5 min. Se dejó agitando la reacción durante la noche a temperatura ambiente bajo una capa de gas inerte. Al día

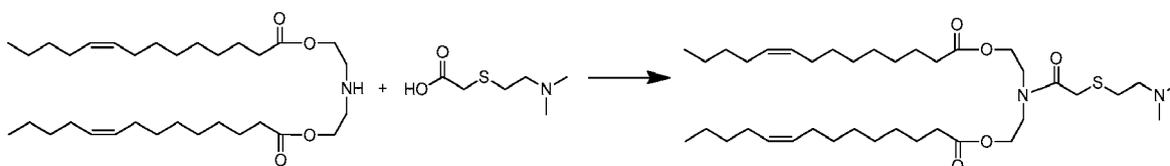
siguiente, se añadió H<sub>2</sub>O (25 ml) y se agitó durante 10 min. Se aisló la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>) durante 10 min, se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de hexano/acetato de etilo produjo bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1,10 g).

5 Etapa 2: Preparación de producto intermedio 2: bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo)



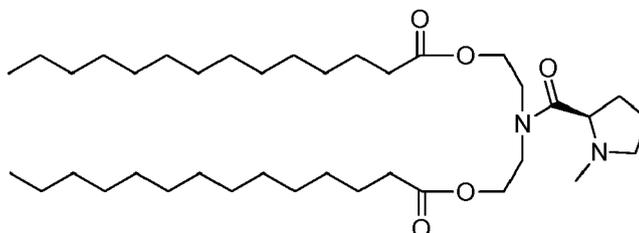
10 A bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (1100 mg, 1,77 mmol) en un matraz de fondo redondo se añadió DCM (10 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se añadió TFA (10 ml) y se dejó agitando la mezcla durante 20 min. Luego se concentró la mezcla de reacción. Se añadió tolueno al residuo para ayudar a eliminar por destilación azeotrópica el TFA en exceso. Se colocó el residuo de nuevo en el baño de hielo y se añadieron PBS (pH = 11, 25 ml) y DCM (25 ml). Se agitó la mezcla durante 15 min y después se aisló la fase orgánica. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (10 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>) a 0 °C durante 15 min, se filtraron y se concentraron para producir bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (923 mg).

20 Etapa 3: Preparación de S104-DMO: bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-((2-((2-dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

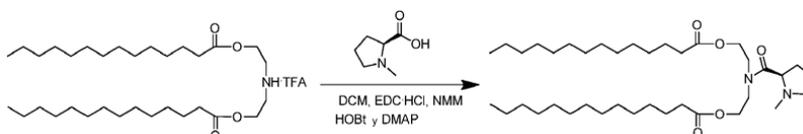


25 Se suspendió una mezcla de bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (923 mg, 1,77 mmol), ácido 2-((2-dimetilamino)etil)tioacético (346 mg, 2,12 mmol) y sal de HCl de EDC (509 mg, 2,66 mmol) en DCM (10 ml). Se añadió DMAP (21,6 mg, 0,177 mmol) y se dejó agitando la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añadieron H<sub>2</sub>O (10 ml) y MeOH (10 ml) y tras agitar durante 10 min, se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (2 × 20 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados con MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. Tras la purificación mediante cromatografía de gel de sílice con elución en DCM/MeOH, se llevaron las fracciones combinadas y concentradas a DCM (25 ml) y PBS (pH = 11, 25 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante ~10 min. Después, se aisló la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa de nuevo con DCM (2 × 15 ml). Se secó la fase orgánica combinada (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para producir bis(tetradec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-((2-((2-dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (589 mg). CL-EM ESI+: m/z 667,6 (M + H).

35 Preparación de ditetradecanoato de (R)-((1-metilpirrolidin-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (Pro-DC)

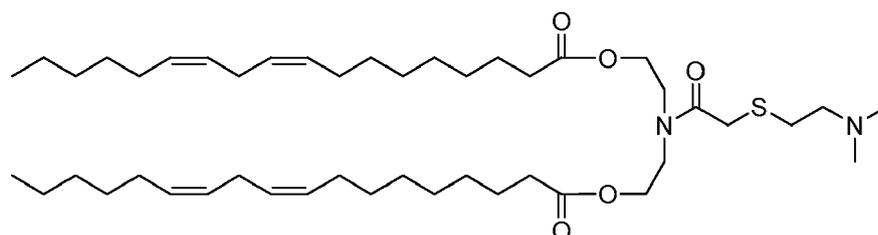


40 Etapa 1: Preparación de Pro-DC: ditetradecanoato de (R)-((1-metilpirrolidin-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)

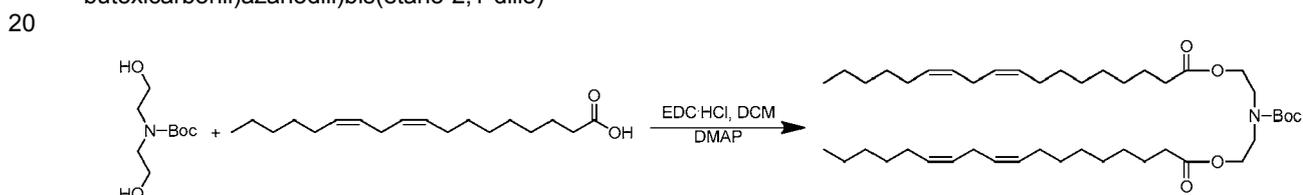


Anteriormente se describió la síntesis de sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se agitó sal de TFA de ditetradecanoato de azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (1000 mg, 1,56 mmol) con DCM (10 ml) y se añadieron N-metil-L-prolina (228 mg, 1,77 mmol), HOBt·H<sub>2</sub>O (239 mg, 1,77 mmol). Se añadió NMM (365 ul, 3,32 mmol) y la disolución se volvió principalmente transparente. Se añadió una suspensión de clorhidrato de EDC (518 mg, 2,70 mmol), NMM (257 ul, 2,34 mmol) y DMAP (19 mg, 0,156 mmol) en DCM (10 ml) y se agitó la mezcla durante aproximadamente 12 horas a temperatura ambiental, periodo de tiempo tras el cual se formó una disolución transparente. Después de eso, se diluyó la mezcla con DCM (50 ml) y se lavó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso al 10 % (60 ml). Se secaron las fases orgánicas con MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. Se purificó el compuesto resultante hasta obtener un producto bruto mediante cromatografía de gel de sílice, eluyendo con un gradiente del (0-10) % de metanol en DCM para producir ditetradecanoato de (R)-((1-metilpirrolidin-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo). CL-EM ESI+: m/z 637,6 (M + H).

Preparación de bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (S104-DLin)

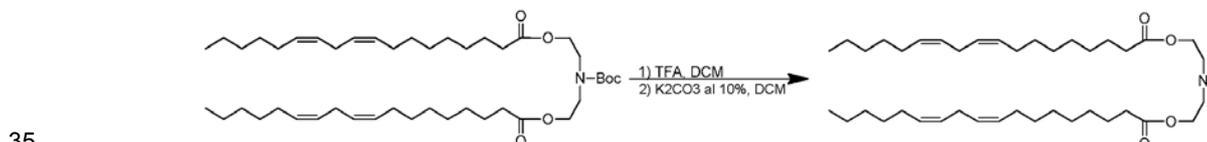


Etapa 1: Preparación de producto intermedio 1: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



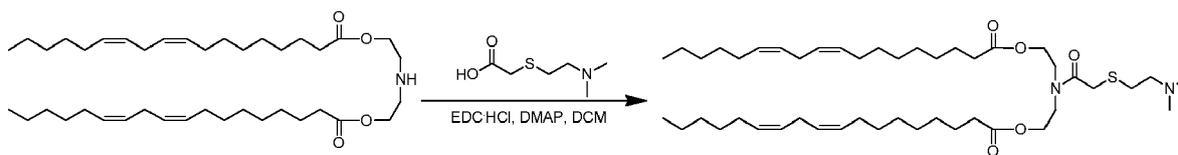
Se disolvieron N-Boc-dietanolamina (5 g, 24,4 mmol), ácido linoleico (14,4 g, 51,2 mmol) en DCM (100 ml). Se añadió sal de HCl de EDC (10,3 g, 53,7 mmol) seguido por DMAP (596 mg, 4,88 mmol). Se dejó agitando la reacción durante aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente bajo una capa de gas inerte. Después de eso, se añadieron 50 ml de agua y 50 ml de metanol, y se agitó la mezcla durante 10 min. Se aisló la fase orgánica y se extrajo adicionalmente la fase acuosa con DCM (150 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>) durante 10 min, se filtraron y se concentraron. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de hexano/acetato de etilo produjo bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (15,9 g).

Etapa 2: Preparación de producto intermedio 2: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo)



A bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((terc-butoxicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (5,33 g, 7,30 mmol) en un matraz de fondo redondo se añadió DCM (50 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se añadió TFA (50 ml) y se dejó agitando la mezcla durante 30 min. Luego se concentró la mezcla de reacción. Se añadió tolueno al residuo para ayudar a la eliminación por destilación azeotrópica de TFA en exceso. Se colocó el residuo de vuelta en el baño de hielo y se añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (50 ml) y DCM (50 ml). Se agitó la mezcla durante 15 min y se aisló la fase orgánica. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (20 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron para producir bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (cuantitativo).

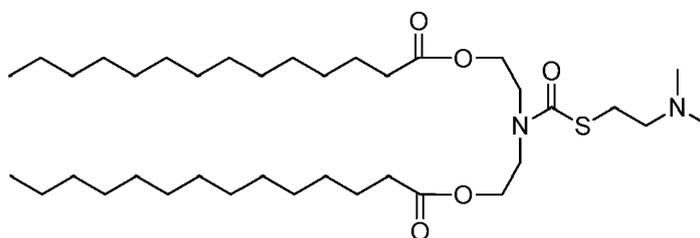
Etapa 3: Preparación de S-104-DLin: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



5 Se suspendió una mezcla de bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (4,68 g, 7,30 mmol), ácido 2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acético (1,43 g, 8,76 mmol) y sal de HCl de EDC (2,10 g, 10,95 mmol) en DCM (100 ml). Se añadió DMAP (89 mg, 0,73 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Se añadieron cincuenta ml de cada uno de agua y metanol y, tras agitar durante 10 minutos, se aisló la fase orgánica transparente. Se extrajo la fase acuosa turbia con DCM (2 × 20 ml) y se lavaron los extractos orgánicos combinados con PBS (pH = 11, 100 ml). Se secó el producto con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. La purificación se realizó mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM. Las fracciones combinadas y concentradas produjeron bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (4,3 g). CL-EM ESI+: m/z 775,9 (M + H).

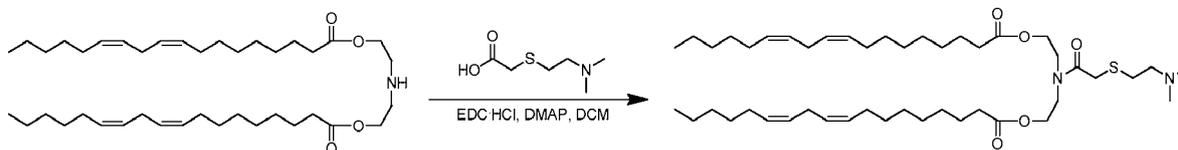
10 Preparación de bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (TU104-DLin)

15



20

Etapa 1: Preparación de TU104-Dlin: bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo)



25 Anteriormente se describió la síntesis de bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo). Se añadió cloroformiato de triclorometilo (también conocido como difosgeno) (740 ul.) a una disolución de bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiil-bis(etano-2,1-diilo) (2,6 g) en DCM seco (40 ml) y se agitó bajo una capa de argón a temperatura ambiente durante 12 horas. Se eliminaron DCM y difosgeno en exceso a vacío. Después se añadieron sal de HCl de 2-(dimetilamino)etanotiol (2,9 g), DCM (40 ml) y trietilamina (3,7 ml). Tras 16 h a temperatura ambiente se diluyó la mezcla de reacción con DCM y se lavó con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (75 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró. La purificación mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo seguido por un gradiente de DCM/MeOH produjo bis(octadeca-9,12-dienoato) de (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) (850 mg). CL-EM ESI+: m/z 761,9 (M + H).

30 Formación de liposomas que contienen ARNip distintos de diVA. Se solubilizaron lípido ionizable, DOPE, colesterol y un lípido conjugado con PEG en EtOH absoluto (200 grados) a una concentración en peso final de ~4,4 mg/ml. Se solubilizó el ARNip en tampón citrato a una concentración de ~0,26 mg/ml y se ajustó la temperatura hasta 35 °C-40 °C. Luego se añadió la mezcla de etanol/lípido al tampón que contenía ARNip mientras se agitaba para formar de manera espontánea liposomas cargados con ARNip. Se combinaron los lípidos con ARNip para alcanzar una razón final de lípido total con respecto a ARNip de 7:1 a 14:1 (p:p). Se sometieron los liposomas cargados con ARNip a diafiltración frente a 10x volúmenes de PBS para eliminar el etanol y realizar un intercambio del tampón. Se filtró el producto final a través de un filtro de 0,22 µm, de calidad esterilizante, para la reducción de la carga biológica. Este procedimiento produjo liposomas con un diámetro medio de partícula de 40-100 nm, PDI <0,2, y >85 % de eficacia de encapsulación (atrapamiento) de ARN.

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

45

Formación de liposomas que contienen ARNip con lípidos ionizables y catiónicos. Se prepararon formulaciones de ARNip-diVA-liposoma y ARNip-liposoma usando el método descrito anteriormente. Se solubilizó conjuntamente lípido catiónico en etanol absoluto con los demás lípidos (lípido ionizable, DOPE, colesterol, lípidos conjugados con PEG y diVA-PEG-diVA) antes de la adición al tampón que contenía ARNip. El contenido molar de lípido catiónico osciló entre el 5 y el 40 % en mol. Este procedimiento produjo liposomas con un diámetro medio de partícula de 40-100 nm, PDI <0,2, y >85 % de eficacia de atrapamiento.

Eficacia *in vitro* (pHSC, KD de gp46 a 20 nM)

Se incubaron pHSC en una placa de 96 pocillos con formulación que estaba compuesta por formulación de lípido ionizable C104, formulación de lípido ionizable Tu104 o formulaciones de combinación con una razón diferente de lípidos ionizables (C104:Tu104). Tras 30 minutos, se sustituyó el medio por medio de crecimiento nuevo. Cuarenta y ocho horas después, se sometieron las células a lisis y se midieron los niveles de ARNm de gp46 y GAPDH mediante ensayo de TA-PCR cuantitativo (TaqMan®), y se normalizaron los niveles de gp46 con respecto a los niveles de GAPDH. Se expresaron los niveles de gp46 normalizados como porcentaje de células de control simulado. Las barras de error indican desviaciones estándar ( $n = 3$ ). Los resultados se representan en la figura 1. Tal como demuestran los resultados, la combinación de dos lípidos ionizables de la descripción dio como resultado una reducción sinérgica observada de la expresión génica.

Se llevaron a cabo experimentos similares con otras combinaciones de lípido ionizable:lípido ionizable y lípido ionizable:lípido catiónico. Los resultados para combinaciones de S104-DO:Tu104-DO se representan en la figura 2. Los resultados para combinaciones de HEDODC:Tu104 se representan en la figura 3. Las combinaciones tanto de lípidos ionizables como de lípidos ionizables:catiónicos dieron de nuevo como resultado la reducción sinérgica de la expresión génica.

Eficacia *in vivo* (DMNQ):

Se evaluó la actividad *in vivo* de una formulación objetivo en el modelo de daño hepático a corto plazo (denominado modelo rápido o DMNQ). En este modelo, el daño hepático a corto plazo inducido por tratamiento con un agente hepatotóxico tal como dimetilnitrosamina (DMN) va acompañado por el aumento de los niveles de ARNm de gp46. Para inducir estos cambios, se inyectó por vía intraperitoneal a ratas Sprague-Dawley macho DMN en seis días consecutivos. Al final del periodo de tratamiento con DMN, se aleatorizaron los animales a grupos basándose en el peso corporal de animales individuales. Se administraron las formulaciones como una única dosis *i.v.*, una hora después de la última inyección de DMN. Veinticuatro horas después, se escindieron los lóbulos hepáticos y se determinaron los niveles de ARNm tanto de gp46 como de MRPL19 mediante ensayo de TA-PCR cuantitativo (TaqMan). Se normalizaron los niveles de ARNm para gp46 con respecto a los niveles de MRPL19. Los resultados se representan en la figura 4. Varias combinaciones de lípidos ionizables:catiónicos lograron una reducción del 50 % de la expresión génica para una única dosis de ARNip encapsulado de 0,5 mg por kg de peso corporal del animal.

Datos de toxicología *in vitro*, citotoxicidad *in vitro* (HepG2 a 200 nM)

La adición del 20 % en mol de S104 en formulaciones de la descripción mejoró la viabilidad celular en un ensayo de citotoxicidad de HepG2, que mejoró desde el 27 % hasta el 52 %.

Formulación	% de viabilidad
40:30:25:5:2 (HEDC:DOPE:colesterol:PEG-lípido:DiVA)	27 ± 5,3 %
20:20:30:25:5:2 (HEDC:S104:DOPE:colesterol:PEG-lípido:DiVA)	52 ± 10 %

Descripción del ensayo de citotoxicidad de HepG2:

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

Datos de toxicología *in vivo*

La formulación de HEDC:S104 (20:20) de la presente descripción se tolera excepcionalmente bien tal como se muestra en estudios de toxicidad. No se observó ninguna toxicidad cuando se inyectó la formulación por vía intravenosa en ratas y monos a dosis de hasta 25 mg/kg y 12 mg/kg, respectivamente, que los expertos en la técnica

consideran que es superior.

Transfección con formulaciones de la descripción:

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

TA-PCR cuantitativa (q) para medir la expresión de ARNm de HSP47

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

**Lista de secuencias**

25 <110> NITTO DENKO CORPORATION

<120> Lípidos para formulaciones de suministro de agente terapéutico

30 <130> HE178372

<140> Documento EP13729241.3

<141> 07-06-2013

35 <150> Documento US201261657480P

<151> 08-06-2012

<160> 4

40 <170> BiSSAP 1.3

<210> 1

45 <211> 21

<212> ARN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sentido

55 <400> 1

ggacaggccu cuacaacuat t 21

<210> 2

60 <211> 21

<212> ARN

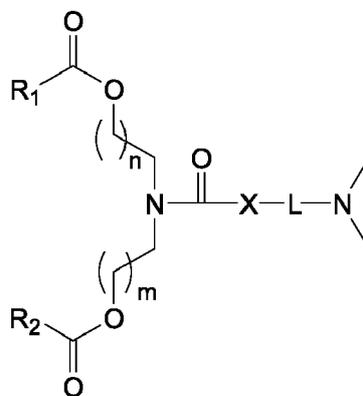
65 <213> Secuencia artificial

# ES 2 697 680 T3

<220>  
<223> Antisentido  
5 <400> 2  
ttccuguccg gagauguuga u 21  
10 <210> 3  
<211> 21  
<212> ARN  
15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Sentido  
<400> 3  
25 ggacaggccu guacaacuat t 21  
<210> 4  
<211> 21  
30 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35 <223> Antisentido  
<400> 4  
40 ttccuguccg gacauguuga u 21

REIVINDICACIONES

1. Compuesto lipídico ionizable de fórmula I:



I

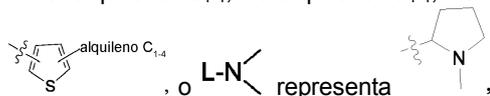
en la que

n y m son independientemente 1, 2, 3 o 4;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente alquilo C<sub>10-18</sub> o alqueno C<sub>12-18</sub>;

X es -CH<sub>2</sub>-, S, O o está ausente;

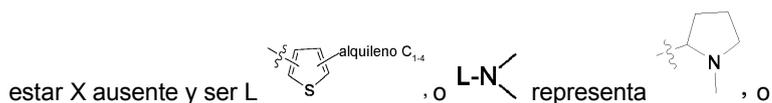
L es alquileno C<sub>1-4</sub>, -S-alquileno C<sub>1-4</sub>, -O-alquileno C<sub>1-4</sub>, -O-C(O)-alquileno C<sub>1-4</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-alquileno C<sub>1-4</sub>,



o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

caracterizado además por

ser n y m 2, o



estar X ausente y ser L -S-alquileno C<sub>1-4</sub>, -S(O)<sub>2</sub>-alquileno C<sub>1-4</sub>, u -O-C(O)-alquileno C<sub>1-4</sub>, o ser X S, o

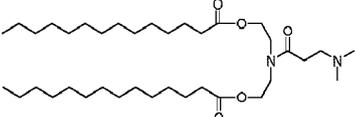
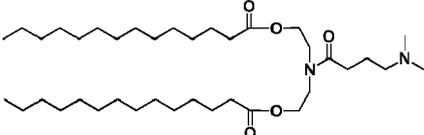
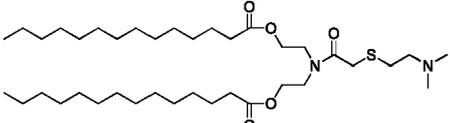
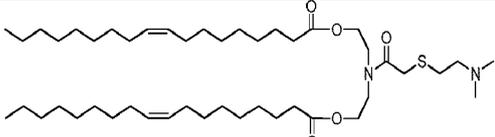
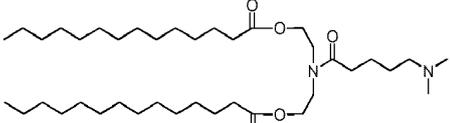
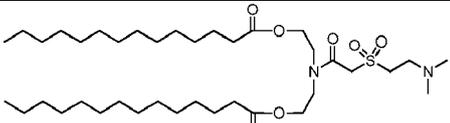
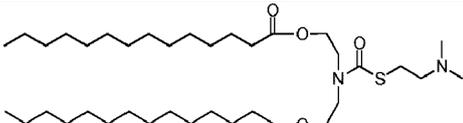
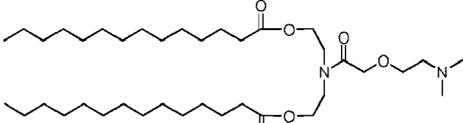
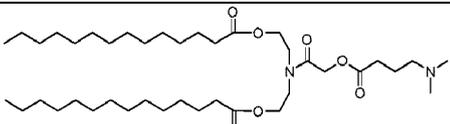
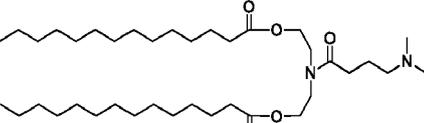
ser R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> cada uno alquilo C<sub>10-18</sub>.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que n y m son 1.

3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X es -CH<sub>2</sub>-.

4. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado del siguiente grupo:

Lípido	Estructura
i-Pr-DC	
i-Pr-DODC	

i-DC	
i-Et-DC (Et104)	
i-Prop-DC	
S104	
S104-DO	
C104	
SO2-S104	
TU104	
O104	
HEDC-M1	
Pr104	

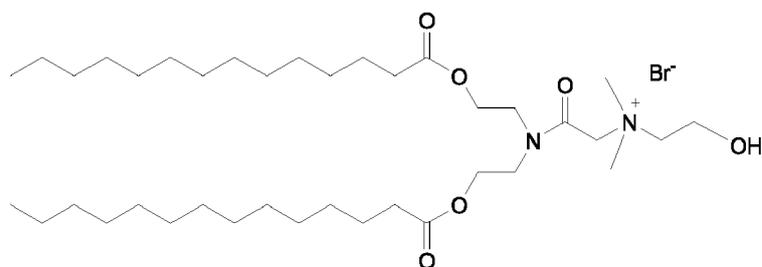
T104	
TU104-DO	
CB104	
CA104	
S104-DMO	
Pro-DC	
S104-DLin	
TU104-DLin	

5. Compuesto seleccionado del siguiente grupo:

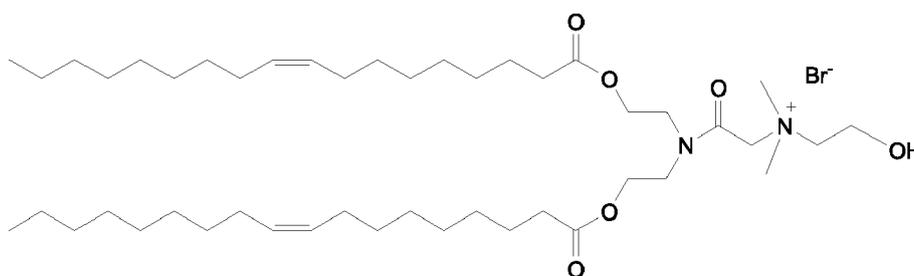
Lípido	Estructura
i-Et-DODC	
i-Prop-DODC	

C104-DO	
Pr104-DO	

6. Composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o 5 en un liposoma que comprende una bicapa de moléculas lipídicas.
- 5 7. Composición según la reivindicación 6, en la que el compuesto es del 5 al 50 % en moles de las moléculas lipídicas.
8. Composición según la reivindicación 7, que comprende además un lípido catiónico.
- 10 9. Composición según la reivindicación 8, en la que el lípido catiónico es



15 o



10. Composición según la reivindicación 8, en la que el lípido catiónico es del 5 al 40 % en moles de las moléculas lipídicas.
- 20 11. Composición según la reivindicación 6, que comprende además un medio líquido.
12. Composición según la reivindicación 6, que comprende además al menos un fosfolípido.
- 25 13. Composición según la reivindicación 6, que comprende además al menos un lípido conjugado con PEG.
14. Portador de fármaco específico de células estrelladas que comprende la composición según la reivindicación 6, y una cantidad específica de células estrelladas de una molécula de direccionamiento que consiste en la estructura (retinoide)<sub>n</sub>-grupo de unión-(retinoide)<sub>n</sub>, en la que n = 0, 1, 2 o 3; y en la que el grupo de unión comprende un polietilenglicol (PEG) o molécula de tipo PEG.
- 30 15. Portador de fármaco según la reivindicación 14, que comprende además una molécula de ARNip.
- 35 16. Formulación farmacéutica según la reivindicación 15, en la que el ARNip está encapsulado por el liposoma.

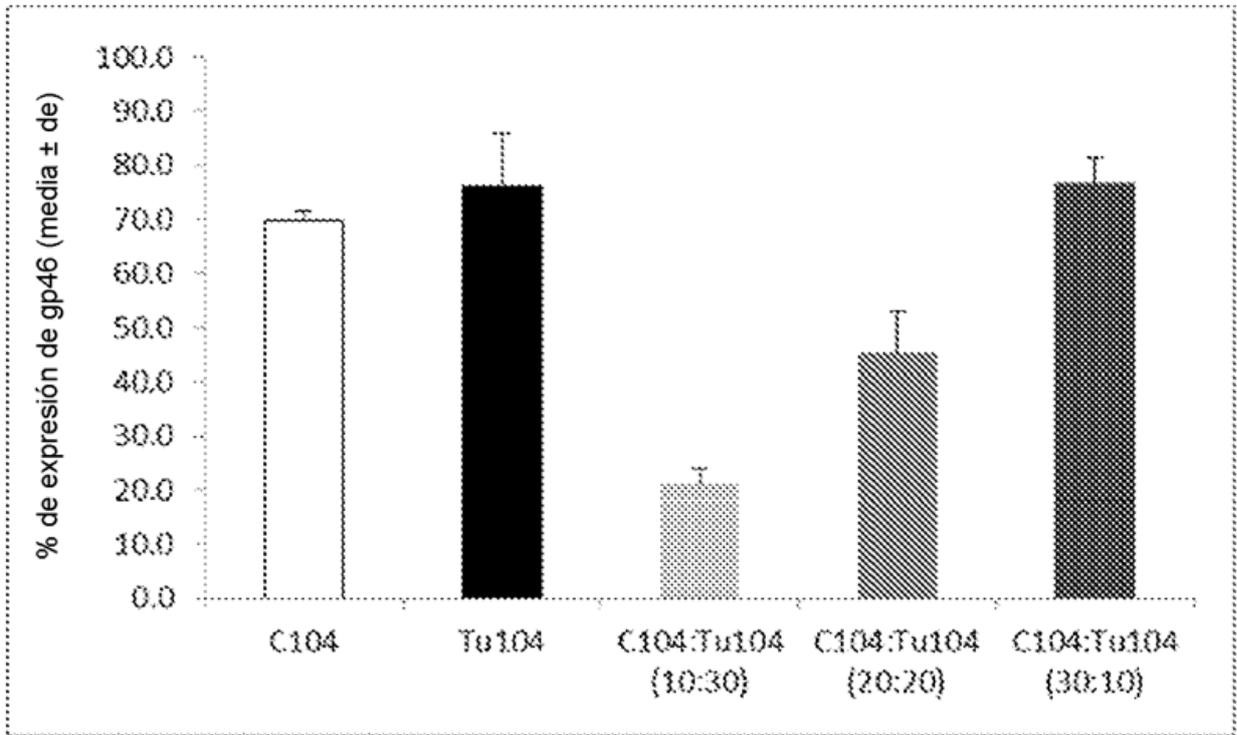


FIG. 1

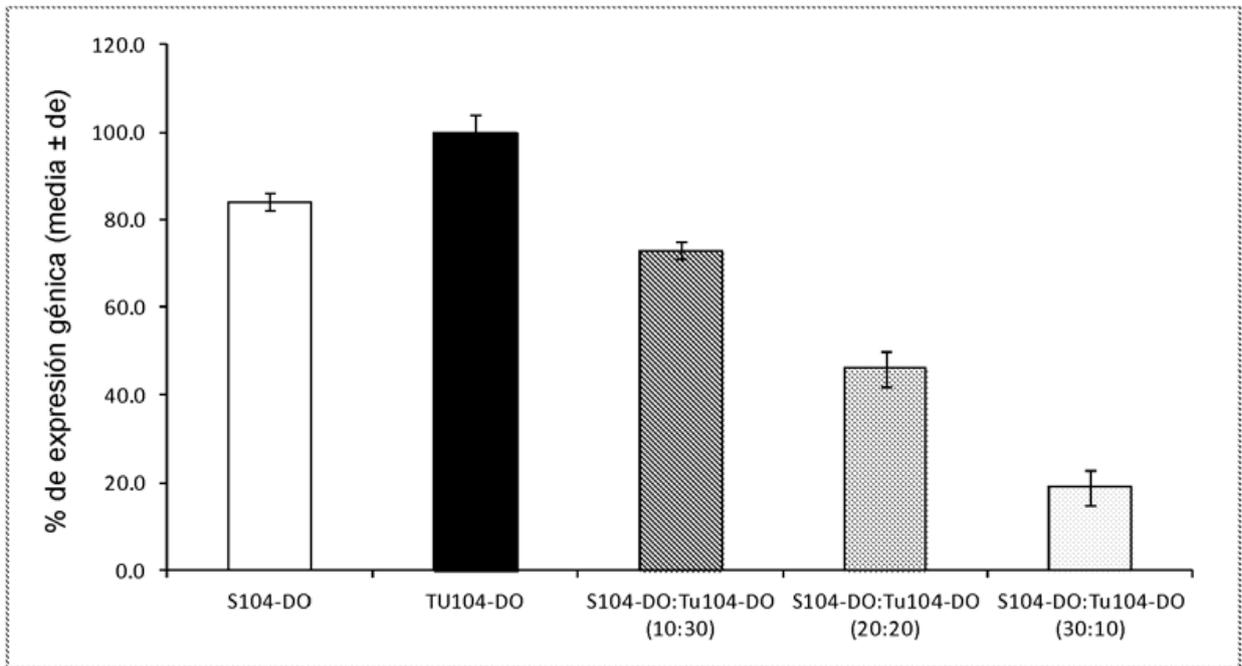


FIG. 2

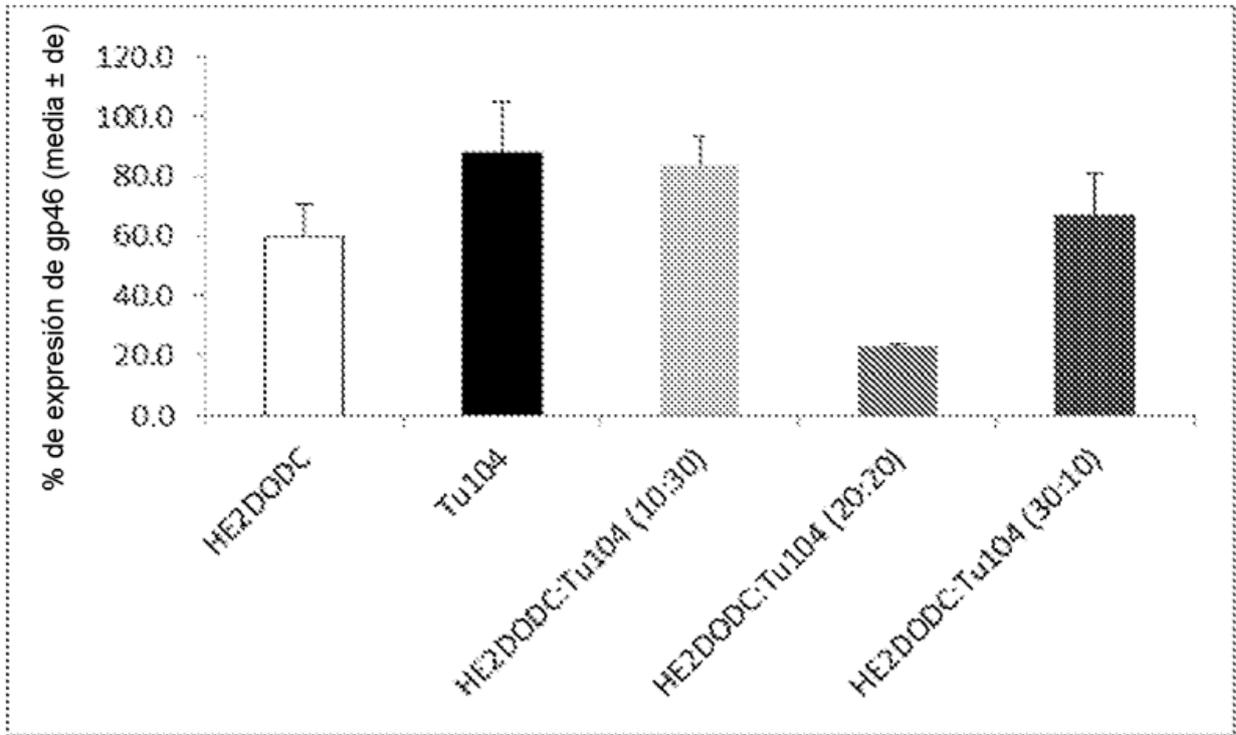


FIG. 3

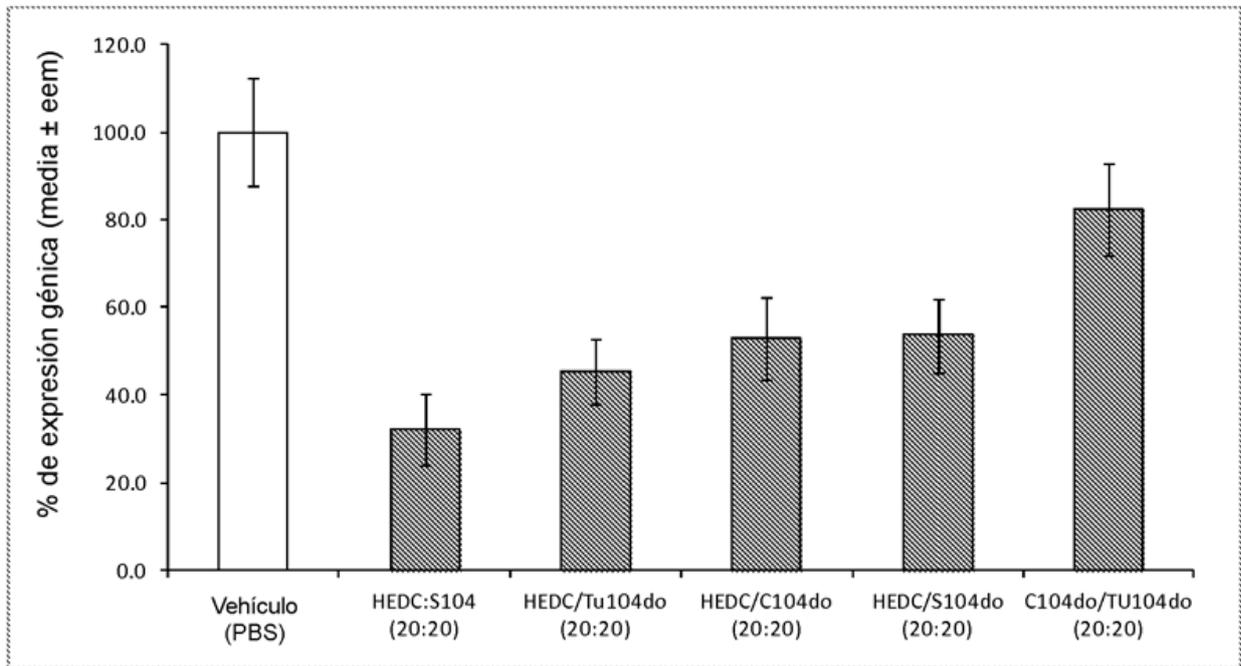


FIG. 4