

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 686**

51 Int. Cl.:

C07D 319/12 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2015 PCT/US2015/033173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15184256**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 15799261 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3148552**

54 Título: **Lípidos biodegradables para la administración de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

30.05.2014 US 201462005266 P

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

26.03.2020

73 Titular/es:

**TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)
29 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**DEROSA, FRANK y
HEARTLEIN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 750 686 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 biodegradables para la administración de ácidos nucleicos

5 ANTECEDENTES

[0001] El suministro de agentes, tales como ácidos nucleicos, se ha explorado ampliamente como una opción terapéutica potencial para ciertos estados de enfermedad. En particular, la interferencia de ARN (ARNi) ha sido objeto de importantes investigaciones y desarrollo clínico. Últimamente, la terapia con ARN mensajero (ARNm) se ha convertido en una opción cada vez más importante para el tratamiento de diversas enfermedades, en particular, para aquellas asociadas con la deficiencia de una o más proteínas. El documento WO 93/18754 A1 describe "reversible microencapsulation of drugs by certain 2,5-diketo-derivatives of piperazine". El documento US 2013/158021 A1 describe compuestos de Fórmula (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI) como se muestra en la siguiente tabla, en donde m, n, p, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁸, Z, W, Y y Z son como se definen en US 2013/158021 A1.

Número de fórmula en US 2013/158021 A1	Estructura en US 2013/158021 A1
Fórmula (I)	
Fórmula (II)	
Fórmula (III)	
Fórmula (IV)	
Fórmula (V)	
Fórmula (VI)	

RESUMEN DE LA INVENCION

[0002] La presente invención proporciona, entre otras cosas, una nueva clase de compuestos lipídicos para la administración *in vivo* mejorada de agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos. En particular, los compuestos proporcionados por la presente invención son de naturaleza biodegradable y son particularmente útiles para la administración de ARNm y otros ácidos nucleicos para usos terapéuticos. Se contempla que los compuestos proporcionados en el presente documento sean capaces de un suministro *in vivo* altamente efectivo mientras

mantiene un perfil de toxicidad favorable debido a la naturaleza biodegradable.

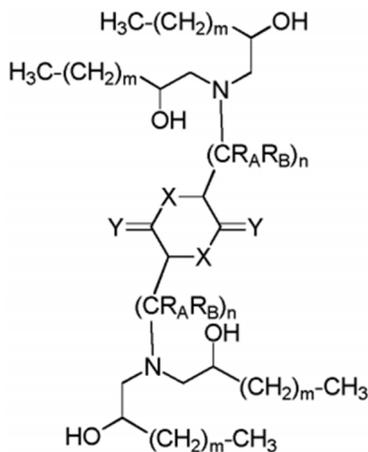
[0003] Las realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula II:

5

10

15

20



II

25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

30 cada X es independientemente O o S;

35 cada Y independientemente es O o S;

40 cada m independientemente es de 0 a 20;

45 cada n independientemente es de 1 a 6;

50 cada R_A es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14, heteroarilo de 5-14 miembros o halógeno; y

55 cada R_B es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14, heteroarilo de 5-14 miembros o halógeno.

60

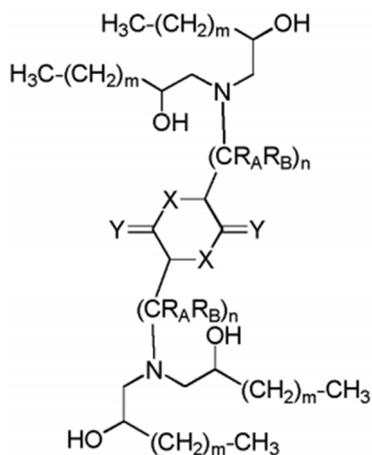
[0004] En algunas realizaciones, el compuesto es de fórmula II:

45

50

55

60



II

65 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

70 cada X es independientemente O o S;

75 cada Y independientemente es O o S;

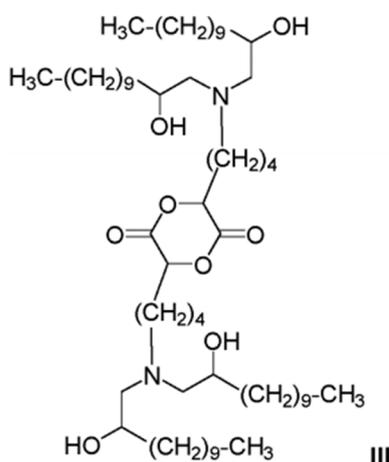
cada m independientemente es de 0 a 20;

cada n independientemente es de 1 a 6;

cada R_A es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50 opcionalmente sustituido, alqueno C2-50 opcionalmente sustituido, alquino C2-50 opcionalmente sustituido, carbociclo C3-10 opcionalmente sustituido, heterociclo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido, arilo C6-14 opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5-14 miembros opcionalmente sustituido o halógeno, y

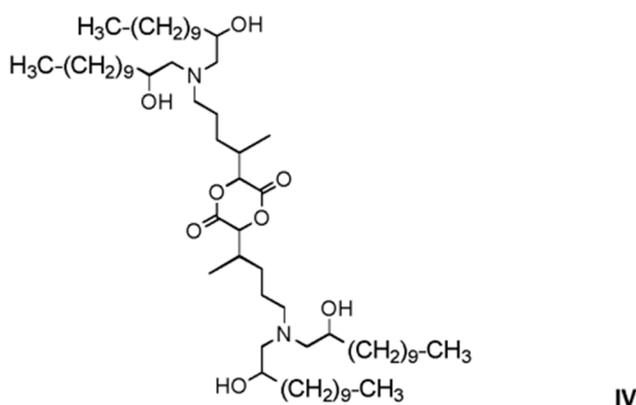
cada R_B es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50 opcionalmente sustituido, alqueno C2-50 opcionalmente sustituido, alquino C2-50 opcionalmente sustituido, C3-10 carbociclo opcionalmente sustituido, heterociclo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido, arilo C6-14 opcionalmente sustituido, heteroarilo o halógeno de 5-14 miembros opcionalmente sustituido.

[0005] En algunas realizaciones, el compuesto tiene una estructura de fórmula III (es decir, Diana 23 o T23):



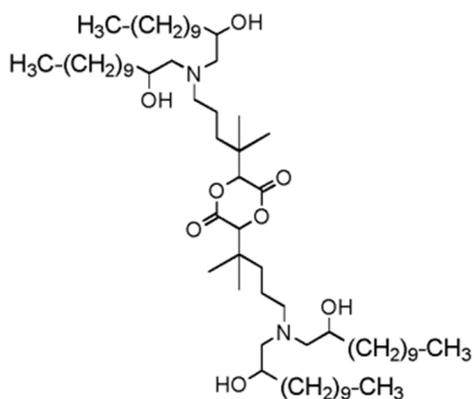
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0006] En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula IV (es decir, Diana 24 o T24):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0007] En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula V:



V

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0008] En otro aspecto, la invención proporciona una composición, tal como una nanopartícula de lípidos (por ejemplo, liposomas), que comprende uno o más de los compuestos (es decir, lípidos catiónicos) de fórmula II, fórmula III, fórmula IV, fórmula V o una subfórmula de los mismos.

[0009] En algunas realizaciones, una composición adecuada de la presente invención es un liposoma. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado comprende uno o más lípidos catiónicos de fórmula II, fórmula III, fórmula IV, fórmula V o una sub-fórmula de los mismos. En realizaciones particulares, un liposoma adecuado comprende un lípido catiónico de fórmula III. En realizaciones particulares, un liposoma adecuado comprende un lípido catiónico de fórmula IV. En realizaciones particulares, un liposoma adecuado comprende un lípido catiónico de fórmula V.

[0010] En algunas realizaciones, un liposoma adecuado adicional comprende uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos a base de colesterol y/o uno o más lípidos modificados por PEG. En algunas realizaciones, el uno o más lípidos no catiónicos se seleccionan de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-l-carboxilato de etilo (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), 16-0-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, l-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), o una mezcla de los mismos.

[0011] En algunas realizaciones, un liposoma adecuado comprende además uno o más lípidos basados en colesterol. En algunas realizaciones, el uno o más lípidos basados en colesterol se seleccionan de colesterol, colesterol PEGilado y DC-Chol (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propil)piperazina.

[0012] En algunas realizaciones, un liposoma adecuado comprende además uno o más lípidos modificados con PEG. En algunas realizaciones, el uno o más lípidos modificados con PEG comprenden una cadena de poli(etileno) glicol de hasta 5 kDa de longitud covalentemente unido a un lípido con cadena(s) de alquilo de C₆-C₂₀ longitud. En algunas realizaciones, un lípido modificado con PEG es un derivado de ceramida tal como N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(metoxipolietilenglicol)-2000]. En algunas realizaciones, un lípido modificado con PEG o PEGilado es colesterol PEGilado o Dimiristoilglicerol (DMG)-PEG-2K.

[0013] En algunas realizaciones, un liposoma adecuado comprende el compuesto de Fórmula III, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K.

[0014] En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño de menos de aproximadamente 500 nm, 450 nm, 400 nm, 350 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 125 nm, 110 nm, 100 nm, 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm o 50 nm.

[0015] En algunas realizaciones, un liposoma de acuerdo con la presente invención comprende un ARNm que codifica una proteína encapsulado en el mismo.

[0016] En otro aspecto más, la presente invención proporciona un liposoma que comprende un compuesto de la presente invención para uso en métodos terapéuticos para administrar un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARNsi, ARNm, microARN). En otro aspecto más, la presente invención proporciona un liposoma que comprende un compuesto de la presente invención para usar en métodos de tratamiento de una enfermedad o trastorno que incluye administrar a un sujeto que necesita tratamiento un liposoma que comprende un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (p. Ej., ADN, ARNsi, ARNm, microARN). Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones que

siguen. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones, aunque indican realizaciones de la presente invención, se dan solo a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017] Se ilustran en la Figura 1 los niveles de EPO humana en suero de ratón de tipo salvaje después del tratamiento mediante LNP cargados con ARNm de hEPO. El tratamiento después de 6 horas se muestra en las barras a la derecha. El tratamiento después de 24 horas se muestra en las barras a la izquierda.

10 DEFINICIONES

[0018] A fin de que la presente invención se comprenderán más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación. Las publicaciones y otros materiales de referencia a los que se hace referencia en el presente documento describen los antecedentes de la invención y proporcionan detalles adicionales con respecto a su práctica.

Definiciones químicas

[0019] Las definiciones de grupos funcionales y términos químicos específicos se describen con más detalle a continuación. Los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, la versión CAS, el Manual de Química y Física, 75.^a edición, la cubierta interior y los grupos funcionales específicos se definen generalmente como se describe en el mismo. Además, los principios generales de la química orgánica, así como los restos funcionales específicos y la reactividad, se describen en Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y March March's Advanced Organic Chemistry, quinta edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., Nueva York, 1989; and Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edición, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

[0020] Los compuestos descritos en este documento pueden comprender uno o más centros asimétricos, y por lo tanto pueden existir en diversas formas isoméricas, por ejemplo, enantiómeros y/o diastereómeros. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento pueden estar en forma de un enantiómero individual, diastereómero o isómero geométrico, o pueden estar en forma de una mezcla de estereoisómeros, incluidas mezclas racémicas y mezclas enriquecidas en uno o más estereoisómeros. Los isómeros se pueden aislar de las mezclas por métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento quiral (HPLC) y la formación y cristalización de sales quirales; o los isómeros preferidos se pueden preparar por síntesis asimétrica. Véanse, por ejemplo, Jacques et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen y col., Tetrahedron 33: 2725 (1977); Eliel, EL Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S.H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. de Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). La invención contempla adicionalmente compuestos como isómeros individuales sustancialmente libres de otros isómeros, y alternativamente, como mezclas de diversos isómeros.

[0021] Cuando se enumera un intervalo de valores, se pretende abarcar cada valor y sub-intervalo dentro del rango. Por ejemplo, "alquilo C1-6" pretende abarcar, alquilo C1, C2, C3, C4, C5, C6, C1-6, C1-5, C1-4, C1-3, C1-2, C2-6, C2-5, C2-4, C2-3, C3-6, C3-5, C3-4, C4-6, C4-5 y C5-6.

[0022] Como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarburo saturado ramificado, de cadena lineal o que tiene de 1 a 50 átomos de carbono ("alquilo C1-50"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 40 átomos de carbono ("alquilo C1-40"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 30 átomos de carbono ("alquilo C1-30"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono ("alquilo C1-20"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 10 átomos de carbono ("alquilo C1-10"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 9 átomos de carbono ("alquilo C1-9"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono ("alquilo C1-8"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 7 átomos de carbono ("alquilo C1-7"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono ("alquilo C1-6"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 5 átomos de carbono ("alquilo C1-5"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono ("alquilo C1-4"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 3 átomos de carbono ("alquilo C1-3"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 2 átomos de carbono ("alquilo C1-2"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene 1 átomo de carbono ("alquilo C1"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alquilo C2-6"). Los ejemplos de grupos alquilo C1-6 incluyen, sin limitación, metilo (C1), etilo (C2), n-propilo (C3), isopropilo (C3), n-butilo (C4), terc-butilo (C4), sec-butilo (C4), isobutilo (C4), n-pentilo (C5), 3-pentanilo (C5), amilo (C5), neopentilo (C5), 3-metil-2-butanilo (C5), amilo terciario (C5) y n-hexilo (C6). Ejemplos adicionales de grupos alquilo incluyen n-heptilo (C7), n-octilo (C8) y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo alquilo está independientemente no sustituido (un "alquilo no sustituido") o sustituido (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C1-50 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C1-50 sustituido.

[0023] Como se usa en este documento, "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se define aquí que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1 a 25, por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 heteroátomos) seleccionados de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo dentro (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena madre. En ciertas realizaciones, un grupo heteroalquilo se refiere a un grupo saturado que tiene de 1 a 50 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-50"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalquilo se refiere a un grupo saturado que tiene de 1 a 40 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-40"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalquilo se refiere a un grupo saturado que tiene de 1 a 30 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-30"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalquilo se refiere a un grupo saturado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-20"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalquilo se refiere a un grupo saturado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-10"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 9 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-9"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-8"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 7 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalquilo C1-7"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalquilo C1-6"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-5"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalquilo C1-4"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono y 1 heteroátomo dentro de la cadena principal ("heteroalquilo C1-3"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 1 a 2 átomos de carbono y 1 heteroátomo dentro de la cadena principal ("heteroalquilo C1-2"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene 1 átomo de carbono y 1 heteroátomo ("heteroalquilo C1"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquilo es un grupo saturado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalquilo C2-6"). A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo heteroalquilo está independientemente no sustituido (un "heteroalquilo no sustituido") o sustituido (un "heteroalquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo heteroalquilo es un heteroalquilo C1-50 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo heteroalquilo es un heteroalquilo C1-50 sustituido.

[0024] Como se usa en el presente documento, "alqueno" se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado ramificado de cadena lineal o que tiene de 2 a 50 átomos de carbono y uno o más dobles enlaces carbono-carbono (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 dobles enlaces) ("alqueno C2-50"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 40 átomos de carbono ("alqueno C2-40"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 30 átomos de carbono ("alqueno C2-30"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 20 átomos de carbono ("alqueno C2-20"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 10 átomos de carbono ("alqueno C2-10"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 9 átomos de carbono ("alqueno C2-9"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 8 átomos de carbono ("alqueno C2-8"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 7 átomos de carbono ("alqueno C2-7"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alqueno C2-6"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 5 átomos de carbono ("alqueno C2-5"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 4 átomos de carbono ("alqueno C2-4"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene 2 átomos de carbono ("alqueno C2-3"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene 2 átomos de carbono ("alqueno C2"). El uno o más dobles enlaces carbono-carbono pueden ser internos (como en 2-butenilo) o terminales (como en 1-butenilo). Los ejemplos de grupos alqueno C2-4 incluyen, sin limitación, etenilo (C2), 1-propenilo (C3), 2-propenilo (C3), 1-butenilo (C4), 2-butenilo (C4), butadienilo (C4), y similares. Los ejemplos de grupos alqueno C2-6 incluyen los grupos alqueno C2-4 mencionados anteriormente, así como pentenilo (C5), pentadienilo (C5), hexenilo (C6) y similares. Ejemplos adicionales de alqueno incluyen heptenilo (C7), octenilo (C8), octatrienilo (C8) y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo alqueno está independientemente sin sustituir (un "alqueno sin sustituir") o sustituido (un "alqueno sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo alqueno es un alqueno C2-50 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo alqueno es un alqueno C2-50 sustituido.

[0025] Como se usa en este documento, "heteroalqueno" se refiere a un grupo alqueno tal como se define en el presente documento que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1 a 25, por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 heteroátomos) seleccionados de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo dentro de (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena madre. En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalqueno C2-50"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 40 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-40"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 30 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-30"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos

dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-20"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, al menos un doble enlace y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-10"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 9 átomos de carbono al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalqueno C2-9").

5 En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 8 átomos de carbono, al menos un doble enlace y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-8"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 7 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-7"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalqueno C2-6").

10 En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 5 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o 2 heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-5"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 4 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y para 2 heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-4"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene 2 a 3 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 heteroátomo dentro de la cadena principal ("heteroalqueno C2-3").

15 En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un enlace doble y 1 o 2 heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-6"). A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo heteroalqueno está independientemente no sustituido (un "heteroalqueno no sustituido") o sustituido (un "heteroalqueno sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo heteroalqueno es un heteroalqueno C2-50 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo heteroalqueno es un heteroalqueno C2-50 sustituido.

20

[0026] Como se usa en el presente documento, "alqueno" se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado ramificado de cadena lineal o que tiene de 2 a 50 átomos de carbono y uno o triples enlaces más carbono-carbono (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 enlaces triples) y opcionalmente uno o más enlaces dobles (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 enlaces dobles) ("alqueno C2-50"). Un grupo alqueno que tiene uno o más enlaces triples y uno o más enlaces dobles también se denomina "ene-ina". En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 40 átomos de carbono ("alqueno C2-40"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 30 átomos de carbono ("alqueno C2-30"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 20 átomos de carbono ("alqueno C2-20"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 10 átomos de carbono ("alqueno C2-10"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 9 átomos de carbono ("alqueno C2-9"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 8 átomos de carbono ("alqueno C2-8"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 7 átomos de carbono ("alqueno C2-7"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alqueno C2-6"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 5 átomos de carbono ("alqueno C2-5"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene de 2 a 4 átomos de carbono ("alqueno C2-4"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene 2 a 3 átomos de carbono ("alqueno C2-3"). En algunas realizaciones, un grupo alqueno tiene 2 átomos de carbono ("alqueno C2"). El uno o más enlaces triples de carbono-carbono pueden ser internos (como en 2-butenilo) o terminales (como en 1-butenilo). Los ejemplos de grupos alqueno C2-4 incluyen, sin limitación, eteno (C2), 1-propeno (C3), 2-propeno (C3), 1-butenilo (C4), 2-butenilo (C4) y similares. Los ejemplos de grupos alqueno C2-6 incluyen los grupos alqueno C2-4 mencionados anteriormente, así como penteno (C5), hexeno (C6) y similares. Ejemplos adicionales de alqueno incluyen hepteno (C7), octeno (C8) y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo alqueno está independientemente sin sustituir (un "alqueno sin sustituir") o sustituido (un "alqueno sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo alqueno es un alqueno C2-50 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo alqueno es un alqueno C2-50 sustituido.

25

30

35

40

[0027] Como se usa en este documento, "heteroalqueno" se refiere a un grupo alqueno tal como se define en el presente documento que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1 a 25, por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 heteroátomos) seleccionados de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo dentro (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena madre. En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, al menos un triple enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-50"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 40 átomos de carbono, al menos un triple enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-40"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 30 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalqueno C2-30"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, al menos un triple enlace, y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalqueno C2-20"). En ciertas realizaciones, un grupo heteroalqueno se refiere a un grupo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos dentro del padre cadena ("heteroalqueno C2-10"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 9 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-9"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 8 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-8"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 7 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-7"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos dentro de la cadena madre ("heteroalqueno C2-6"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 5 átomos de carbono, al menos un triple enlace, y 1 o 2 heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroalqueno C2-5"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalqueno tiene de 2 a 4 átomos de carbono, al menos

45

50

55

60

65

un triple enlace, y para 2 heteroátomos dentro de la cadena principal ("heteroquinilo C2-4"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquinilo tiene 2 a 3 átomos de carbono, al menos un triple enlace, y 1 heteroátomo dentro de la cadena principal ("heteroquinilo C2-3"). En algunas realizaciones, un grupo heteroalquinilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o 2 heteroátomos dentro de la cadena original ("heteroalquinilo C2-6"). A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo heteroalquinilo está independientemente no sustituido (un "heteroalquinilo no sustituido") o sustituido (un "heteroalquinilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo heteroalquinilo es un heteroalquinilo C2-50 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo heteroalquinilo es un heteroalquinilo C2-50 sustituido.

[0028] Como se usa en este documento, "carbociclilo" o "carbocíclico" se refiere a un radical de un grupo no aromático cíclico de hidrocarburo que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo C3-10") y cero heteroátomos en el sistema de anillo no aromático. En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo C3-8"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene 3 a 7 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo C3-7"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene 3 a 6 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo C3-6"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene de 4 a 6 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo C4-6"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene 5 a 6 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo C5-6"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene de 5 a 10 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo C5-10"). Los ejemplos de grupos carbociclilo C3-6 incluyen, sin limitación, ciclopropilo (C3), ciclopropenilo (C3), ciclobutilo (C4), ciclobutenilo (C4), ciclopentilo (C5), ciclopentenilo (C5), ciclohexilo (C6), ciclohexenilo (C6), ciclohexadienilo (C6) y similares. Los ejemplos de grupos carbociclilo C3-8 incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo C3-6 mencionados anteriormente, así como cicloheptilo (C7), cicloheptenilo (C7), cicloheptadienilo (C7), cicloheptatrienilo (C7), ciclooctilo (C8), ciclociclo (8), biciclo[2,2,1]heptanilo (C7), biciclo[2,2,2]octanilo (C8) y similares. Los ejemplos de grupos carbociclilo C3-10 incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo C3-8 mencionados anteriormente, así como ciclononilo (C9), ciclononenilo (C9), ciclodecilo (C10), ciclodecenilo (C10), octahidro-1H-indenilo (C9), decahidronaftalenilo (C10), espiro[4,5]decanilo (C10) y similares. Como ilustran los ejemplos anteriores, en ciertas realizaciones, el grupo carbociclilo es monocíclico ("carbociclilo monocíclico") o policíclico (por ejemplo, que contiene un sistema de anillo fusionado, puenteado o espiro tal como un sistema bicíclico ("carbociclilo bicíclico") o un sistema tricíclico ("carbociclilo tricíclico")) y puede estar saturado o puede contener uno o más enlaces dobles o triples carbono-carbono. Carbociclilo también incluye sistemas de anillos en los que el anillo de carbociclilo, como se definió anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo o heteroarilo en los que el punto de unión está en el anillo de carbociclilo, y en tales casos, el número de carbonos continúa designando el número de carbonos en el sistema de anillo carbocíclico. A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo carbociclilo está independientemente no sustituido (un "carbociclilo no sustituido") o sustituido (un "carbociclilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo carbociclilo es un carbociclilo C3-10 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo carbociclilo es un carbociclilo C3-10 sustituido.

[0029] En algunas realizaciones, "cicloalquilo" o "carbocíclico" se refiere como un "cicloalquilo", es decir, un anillo monocíclico, grupo carbociclilo saturado que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo C3-10"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene 3 a 8 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo C3-8"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene 3 a 6 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo C3-6"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene 4 a 6 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo C4-6"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene 5 a 6 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo C5-6"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene 5 a 10 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo C5-10"). Los ejemplos de grupos cicloalquilo C5-6 incluyen ciclopropilo (C5) y ciclohexilo (C5). Los ejemplos de grupos cicloalquilo C3-6 incluyen los grupos cicloalquilo C5-6 mencionados anteriormente, así como ciclopropilo (C3) y ciclobutilo (C4). Los ejemplos de grupos cicloalquilo C3-8 incluyen los grupos cicloalquilo C3-6 mencionados anteriormente, así como cicloheptilo (C7) y ciclooctilo (C8). A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo cicloalquilo está independientemente sin sustituir (un "cicloalquilo sin sustituir") o sustituido (un "cicloalquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo cicloalquilo es un cicloalquilo C3-10 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo cicloalquilo es un cicloalquilo C3-10 sustituido.

[0030] Como se usa en este documento, "heterociclilo" o "heterocíclico" se refiere a un radical de un sistema de anillo no aromático de 3 a 14 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) heteroátomos en anillo, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo ("heterociclilo de 3-14 miembros"). En los grupos heterociclilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Un grupo heterociclilo puede ser monocíclico ("heterociclilo monocíclico") o policíclico (p. ej., un sistema de anillo fusionado, puenteado o espiro tal como un sistema bicíclico ("heterociclilo bicíclico") o un sistema tricíclico ("heterociclilo tricíclico")) y puede estar saturado o puede contener uno o más enlaces dobles o triples carbono-carbono. Los sistemas de anillo policíclico heterociclilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heterociclilo" también incluye sistemas de anillos en los que el anillo de heterociclilo, como se definió anteriormente, está fusionado con uno o más grupos carbociclilo en los que el punto de unión está en el anillo de carbociclilo o heterociclilo, o sistemas de anillo en los que el anillo de heterociclilo, como se definió anteriormente, se fusiona con uno o más grupos arilo o heteroarilo, en el que el punto de unión está en el anillo de heterociclilo, y en tales casos, el número de miembros del anillo continúa designando el número de miembros del anillo en el sistema de anillo de heterociclilo. A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de heterociclilo está independientemente sin sustituir (un "heterociclilo sin

sustituir") o sustituido (un "heterociclilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo heterociclilo es un heterociclilo de 3 a 14 miembros no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo de heterociclilo es un heterociclilo sustituido de 3-14 miembros.

5 **[0031]** En algunas realizaciones, un grupo heterociclilo es un sistema de anillo no aromático de 5-10 miembros que
 tiene átomos de carbono del anillo y 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) heteroátomos en el anillo, en donde cada
 heteroátomo se selecciona independientemente de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo ("heterociclilo de
 5-10 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heterociclilo es un sistema de anillo no aromático de 5-8
 10 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) heteroátomos en el anillo, en
 donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de oxígeno, azufre, nitrógeno boro, silicio y fósforo
 ("heterociclilo de 5-8 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heterociclilo es un sistema de anillo no aromático
 de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) heteroátomos en el
 anillo, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y
 15 fósforo ("heterociclilo de 5-6 miembros"). En algunas realizaciones, el heterociclilo de 5-6 miembros tiene 1 o más (por
 ejemplo, 1, 2 o 3) heteroátomos de anillo seleccionados de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo. En
 algunas realizaciones, el heterociclilo de 5-6 miembros tiene 1 o 2 heteroátomos de anillo seleccionados de oxígeno,
 azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo. En algunas realizaciones, el heterociclilo de 5 a 6 miembros tiene un
 heteroátomo de 1 anillo seleccionado entre oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo.

20 **[0032]** Los ejemplos de grupos heterociclilo de 3 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación,
 azirdinilo, oxiranilo, tiorenilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 4 miembros que contienen 1 heteroátomo
 incluyen, sin limitación, azetidino, oxetanilo y tietanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que
 contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, tetrahydrofuranilo, dihydrofuranilo, tetrahydrotiofenilo, dihydrotiofenilo,
 25 pirrolidinilo, dihydropirrolilo y pirrolil-2,5-diona. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 2
 heteroátomos incluyen, sin limitación, dioxolanilo, oxatolanilo y ditiolanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5
 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolinilo, oxadiazolinilo y tiadiazolinilo. Los
 ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piperidinilo,
 tetrahydropiranilo, dihydropiridinilo y tianilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 2
 heteroátomos incluyen, sin limitación, piperazinilo, morfolinilo, ditianilo, dioxanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo
 30 de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinanilo. Los ejemplos de grupos de
 heterociclilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepanilo, oxepanilo y tiepanilo. Los
 ejemplos de grupos heterociclilo de 8 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azocanilo,
 oxecanilo y tiocanilo. Grupos heterociclilo bicíclicos de ejemplo incluyen, sin limitación, indolinilo, isoindolinilo,
 dihydrobenzofuranilo, dihydrobenzotienilo, tetrahydrobenzofuranilo, tetrahydroindolilo,
 35 tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, decahydroisoquinolinilo, octahydrocromenilo,
 octahydroisocromenilo, decahydroafridinilo, decahydro-1,8-naftiridinilo, octahydropirrolo[3,2-b]pirrol, indolinilo,
 ftalimidilo, naftalimidilo, cromanilo, cromenilo, 1H-benzo[e][1,4]diazepinilo, 1,4,5,7-tetrahydropirano[3,4-b]pirrolilo, 5,6-
 dihydro-4H-furo[3,2-b]pirrolilo, 6,7-dihydro-5H-furo[3,2-b]piranilo, 5,7-dihydro-4H-tieno[2,3-c]piranilo, 2,3-dihydro-
 1Hpirrolo[2,3-b]piridinilo, 2,3-dihydrofuro[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahydro-1H-pirrolo-[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-
 40 tetrahydrofuro[3,2-c]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahydrotieno[3,2-b]piridinilo, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-naftiridinilo y similares.

[0033] Como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a un radical de un anillo monocíclico o policíclico (por
 ejemplo, bicíclico o tricíclico) $4n+2$ sistema de anillo aromático (por ejemplo, que tiene 6, 10, o 14 π electrones
 45 compartidos en una disposición cíclica) que tiene 6-14 átomos de carbono en el anillo y cero heteroátomos
 proporcionados en el sistema de anillo aromático ("arilo C6-14"). En algunas realizaciones, un grupo arilo tiene 6
 átomos de carbono en el anillo ("arilo C6"; por ejemplo, fenilo). En algunas realizaciones, un grupo arilo tiene 10 átomos
 de carbono en el anillo ("arilo C10"; por ejemplo, naftilo tal como 1-naftilo y 2-naftilo). En algunas realizaciones, un
 grupo arilo tiene 14 átomos de carbono en el anillo ("arilo C14"; por ejemplo, antracilo). "Arilo" también incluye sistemas
 de anillos en los que el anillo de arilo, como se definió anteriormente, está fusionado con uno o más grupos carbociclilo
 50 o heterociclilo en los que el radical o punto de unión está en el anillo de arilo, y en tales casos, el número de átomos
 de carbono continúa para designar el número de átomos de carbono en el sistema de anillo de arilo. A menos que se
 especifique lo contrario, cada instancia de un grupo arilo está independientemente no sustituido (un "arilo no
 sustituido") o sustituido (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo arilo es
 un arilo C6-14 no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo arilo es un arilo C6-14 sustituido.

55 **[0034]** Como se usa en el presente documento, "heteroarilo" se refiere a un radical de un anillo monocíclico o policíclico
 de 5-14 miembros o (por ejemplo, bicíclico o tricíclico) $4n + 2$ sistema de anillo aromático (por ejemplo, que tiene 6,
 10, o 14 π electrones compartidos en una matriz cíclica) que tiene átomos de carbono en el anillo y 1 o más (por
 ejemplo, 1, 2, 3 o 4 heteroátomos en el anillo) heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillo
 60 aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio
 y fósforo ("heteroarilo de 5-14 miembros"). En los grupos heteroarilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno,
 el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Los sistemas de anillos
 heteroaril policíclicos pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heteroarilo" incluye sistemas
 de anillo en los que el anillo de heteroarilo, como se definió anteriormente, se fusiona con uno o más grupos carbociclilo
 65 o heterociclilo en los que el punto de unión está en el anillo de heteroarilo, y en tales casos, el número de miembros
 del anillo continúa designando el número de miembros del anillo en el sistema de anillo heteroarilo. "Heteroarilo"

también incluye sistemas de anillos en los que el anillo heteroarilo, como se definió anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo en los que el punto de unión está en el anillo arilo o heteroarilo, y en tales casos, el número de miembros del anillo designa el número de miembros de anillo en el sistema de anillo policíclico fusionado (arilo/heteroarilo). Los grupos heteroarilo policíclicos en los que un anillo no contiene un heteroátomo (por ejemplo, indolilo, quinolinilo, carbazolilo y similares), el punto de unión puede estar en cualquier anillo, es decir, en el anillo que lleva un heteroátomo (por ejemplo, 2-indolilo) o el anillo que no contiene un heteroátomo (p. ej., 5-indolilo).

[0035] En algunas realizaciones, un grupo heteroarilo es un 5-10 miembros sistema de anillos aromáticos que tienen átomos de carbono en el anillo y 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillo aromático, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo ("heteroarilo de 5 a 10 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heteroarilo es un sistema de anillo aromático de 5-8 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillo aromático, en donde cada heteroátomo es independientemente seleccionado de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo ("heteroarilo de 5-8 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heteroarilo es un sistema de anillo aromático de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillo aromático, en donde cada heteroátomo es independientemente seleccionado de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo ("heteroarilo de 5-6 miembros"). En algunas realizaciones, el heteroarilo de 5 a 6 miembros tiene 1 o más heteroátomos en el anillo (por ejemplo, 1, 2 o 3) seleccionados entre oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo. En algunas realizaciones, el heteroarilo de 5 a 6 miembros tiene 1 o 2 heteroátomos de anillo seleccionados entre oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo. En algunas realizaciones, el heteroarilo de 5 a 6 miembros tiene un heteroátomo de 1 anillo seleccionado de oxígeno, azufre, nitrógeno, boro, silicio y fósforo. A menos que se especifique lo contrario, cada instancia de un grupo heteroarilo está independientemente sin sustituir (un "heteroarilo sin sustituir") o sustituido (un "heteroarilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo heteroarilo es un heteroarilo de 5 a 14 miembros no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo heteroarilo es un heteroarilo sustituido de 5-14 miembros.

[0036] Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, pirrolilo, furanilo y tiofenilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo e isotiazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolilo, oxadiazolilo y tiadiazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, tetrazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piridinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 3 o 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinilo y tetrazinilo, respectivamente. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepinilo, oxepinilo y tiepinilo. A modo de ejemplo, grupos heteroarilo 5,6-bicíclicos incluyen, sin limitación, indolilo, isoindolilo, indazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, isobenzotiofenilo, benzofuranilo, benzoisofuranilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, benzotiadiazolilo, indolizínilo, y purínilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo 6,6-bicíclicos incluyen, sin limitación, naftiridinilo, pteridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo y quinazolinilo. Los grupos heteroarilo tricíclicos ejemplares incluyen, sin limitación, fenantridinilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, acridinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo y fenazinilo.

[0037] Tal como se utiliza aquí, el término "parcialmente insaturado" se refiere a un resto de anillo que incluye al menos un doble o triple enlace. El término "parcialmente insaturado" pretende abarcar anillos que tienen múltiples sitios de insaturación, pero no pretende incluir grupos aromáticos (por ejemplo, restos arilo o heteroarilo) como se define aquí.

[0038] Tal como se utiliza aquí, el término "saturado" se refiere a un resto de anillo que no contiene un enlace doble o triple, es decir, el anillo contiene todos los enlaces simples.

[0039] La fijación del sufijo "-eno" a un grupo indica que el grupo es un resto divalente, por ejemplo, alquileo es el resto divalente de alquilo, alquenileno es el resto divalente de alquenilo, alquinileno es el resto divalente de alquinilo, heteroalquileo es el resto divalente de heteroalquilo, heteroalquenileno es el resto divalente de heteroalquenilo, heteroalquinileno es el resto divalente de heteroalquinilo, carbociclileno es el resto divalente de carbociclilo, heterociclileno es el resto divalente de heterociclilo, arileno es el resto divalente de arilo, y heteroarileno es el resto divalente de heteroarilo.

[0040] Tal como se entiende a partir de los grupos de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo, y heteroarilo, como se define aquí, están, en ciertas realizaciones, opcionalmente sustituido. Opcionalmente sustituido se refiere a un grupo que puede estar sustituido o no sustituido (por ejemplo, alquilo "sustituido" o "no sustituido", alquenilo "sustituido" o "no sustituido", alquinilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquenilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquinilo "no sustituido", carbociclilo "sustituido" o "no sustituido", heterociclilo "sustituido" o "no sustituido", arilo "sustituido" o "no sustituido" o grupo heteroarilo "sustituido" o "no sustituido". En general, el término "sustituido" significa que al menos

un hidrógeno presente en un grupo está reemplazado con un sustituyente permitido, p. ej., un sustituyente que tras la sustitución da como resultado un compuesto estable, p. ej., un compuesto que no sufre transformación espontánea, como por reordenamiento, ciclación, eliminación u otra reacción. A menos que se indique lo contrario, un grupo "sustituido" tiene un sustituyente t en una o más posiciones sustituibles del grupo, y cuando se sustituye más de una posición en cualquier estructura dada, el sustituyente es igual o diferente en cada posición. Se considera que el término "sustituido" incluye la sustitución con todos los sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos, cualquiera de los sustituyentes descritos en el presente documento que da como resultado la formación de un compuesto estable. La presente invención contempla cualquiera y todas esas combinaciones para llegar a un compuesto estable. Para los fines de esta invención, los heteroátomos tales como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente adecuado como se describe en el presente documento que satisface las valencias de los heteroátomos y da como resultado la formación de un resto estable.

[0041] Los sustituyentes de átomos de carbono ejemplares incluyen, pero sin limitación, halógeno, -CN, -NO₂, -N₃, -SO₂H, -SO₃H, -OH, -ORaa, -ON (Rbb)₂, -N(Rbb)₂, -N(Rbb)₃+X-, -N(ORcc)Rbb, -SeH, -SeRaa, -SH, -SRaa, -SSRcc, -C(=O)Raa, -CO₂H, -CHO, -C(ORcc)₂, -CO₂Raa, -OC(=O)Raa, -OCO₂Raa, -C(=O)N(Rbb)₂, -OC(=O)N(Rbb)₂, -NRbbC(=O)Raa, -NRbbCO₂Raa, -OC(=NRbb)Raa, -OC(=NRbb)ORaa, -NRbbC(=O)N(Rbb)₂, -C(=NRbb)N(Rbb)₂, -C(=NRbb)Raa, -C(=NRbb)ORaa, -OC(=NRbb)N(Rbb)₂, -NRbbC(=NRbb)N(Rbb)₂, -C(=O)NRbbSO₂Raa, -NRbbSO₂Raa, -SO₂N(Rbb)₂, -SO₂Raa, -SO₂ORaa, -OSO₂Raa, -S(=O)Raa, -OS(=O)Raa, -Si(Raa)₃-OSi(Raa)₃-C(=S)N(Rbb)₂, -C(=O)SRaa, -C(=S)SRaa, -SC(=S)SRaa, -SC(=O)SRaa, -OC(=O)SRaa, -SC(=O)ORaa, -SC(=O)Raa, -P(=O)₂Raa, -OP(=O)₂Raa, -P(=O)(Raa)₂, -OP(=O)(Raa)₂, -OP(=O)(ORcc)₂, -P(=O)₂N(Rbb)₂, -OP(=O)₂N(Rbb)₂, -P(=O)(NRbb)₂, -OP(=O)(NRbb)₂, -NRbbP(=O)(ORcc)₂, -NRbbP(=O)(NRbb)₂, -P(Rcc)₂, -P(Rcc)₃, -OP(Rcc)₂, -OP(Rcc)₃, -B(Raa)₂, -B(ORcc)₂, -BRaa(ORcc), alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-14, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14 y heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está independientemente sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos Rdd; o dos hidrógenos geminales en un átomo de carbono se reemplazan con el grupo =O, =S, =NN(Rbb)₂, =NNRbbC(=O)Raa, =NNRbbC(=O)ORaa, =NNRbbS(=O)₂Raa, =NRbb, o =NORcc;

cada instancia de Raa se selecciona independientemente de alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14 y heteroarilo de 5-14 miembros, o dos grupos Raa se unen para formar un heterociclilo de 3-14 miembros o un anillo de heteroarilo de 5-14 miembros, en el que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4, o 5 grupos de Rdd; cada instancia de Rbb se selecciona independientemente de hidrógeno, -OH, -ORaa, -N(Rcc)₂, -CN, -C(=O)Raa, -C(=O)N(Rcc)₂, -CO₂Raa, -SO₂Raa, -C(=NRcc)ORaa, -C(=NRcc)N(Rcc)₂, -SO₂N(Rcc)₂, -SO₂Rcc, -SO₂ORcc, -SORaa, -C(=S)N(Rcc)₂, -C(=O)SRcc, -C(=S)SRcc, -P(=O)₂Raa, -P(=O)(Raa)₂, -P(=O)₂N(Rcc)₂, -P(=O)(NRcc)₂, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14 y heteroarilo de 5-14 miembros, o dos grupos Rbb, junto con el heteroátomo al que están unidos, forman un anillo heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, en el que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos de Rdd; cada instancia de Rcc se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14 y heteroarilo de 5-14 miembros, o dos grupos Rcc, junto con el heteroátomo al que están unidos, forman un heterociclilo de 3-14 miembros o un anillo de heteroarilo de 5-14 miembros, en el que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituyen independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos de Rdd;

cada instancia de Rdd se selecciona independientemente de halógeno, -CN, -NO₂, -N₃, -SO₂H, -SO₃H, -OH, -ORee, -ON(Rff)₂, -N(Rff)₂, -N(Rff)₃+X-, -N(ORee)Rff, -SH, -SRee, -SSRee, -C(=O)Ree, -CO₂H, -CO₂Ree, -OC(=O)Ree, -OCO₂Ree, -C(=O)N(Rff)₂, -OC(=O)N(Rff)₂, -NRffC(=O)Ree, -NRffCO₂Ree, -NRffC(=O)N(Rff)₂, -C(=NRff)ORee, -OC(=NRff)Ree, -OC(=NRff)ORee, -C(=NRff)N(Rff)₂, -OC(=NRff)N(Rff)₂, -NRffC(=NRff)N(Rff)₂, -NRffSO₂Ree, -SO₂N(Rff)₂, -SO₂Ree, -SO₂ORee, -OSO₂Ree, -S(=O)Ree, -Si(Ree)₃, -OSi(Ree)₃, -C(=S)N(Rff)₂, -C(=O)SRee, -C(=S)SRee, -SC(=S)SRee, -P(=O)₂Ree, -P(=O)(Ree)₂, -OP(=O)(Ree)₂, -OP(=O)(ORee)₂, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-10 miembros, arilo C6-10, heteroarilo de 5-10 miembros, en el que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está independientemente sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos Rgg, o dos sustituyentes geminales de Rdd se pueden unir para formar =O o =S;

cada instancia de Ree se selecciona independientemente de alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, arilo C6-10, heterociclilo de 3-10 miembros y heteroarilo de 3-10 miembros, en donde cada uno de alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos Rgg; cada instancia de Rff se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-10 miembros, arilo C6-10 y heteroarilo de 5-10 miembros, o dos grupos Rff, junto con el heteroátomo al que están unidos, forman un heterociclilo de 3-14 miembros o un anillo de heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituyen independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos Rgg; y

cada instancia de Rgg es, independientemente, halógeno, -CN, -NO₂, -N₃, -SO₂H, -SO₃H, -OH, -OC1-50 alquilo, -ON(alquilo C1-50)₂, -N(alquilo C1-50)₂, -N(alquilo C1-50)₃+X-, -NH(alquilo C1-50)₂+X-, -NH₂(alquilo C1-50)+X-, -NH₃+X-, -N(alquilo OC1-50) (alquilo C1-50), -N(OH) (alquilo C1-50), -NH(OH), -SH, -SC1-50 alquilo, -SS (alquilo C1-50), -C(=O)(alquilo C1-50), -CO₂H, -CO₂(alquilo C1-50), -OC(=O)(alquilo C1-50), -OCO₂ (alquilo C1-50), -C(=O)NH₂, -C(=O)N(alquilo C1-50)₂, -OC(=O)NH(alquilo C1-50), -NHC(=O)(alquilo C1-50), -N(alquilo C1-50)C(=O)(alquilo C1-50), -NHCO₂(alquilo C1-50), -NHC(=O)N(alquilo C1-50)₂, -NHC(=O)NH (C1-50 alquilo), -NHC(=O)NH₂, -C(=

NH)O(alquilo C1-50), -OC(=NH)(alquilo C1-50), -OC(=NH) alquilo OC1-50, -C(=NH)N(alquilo C1-50)2, -C(=NH)NH(alquilo C1-50), -C(=NH)NH2, -OC(=NH)N(alquilo C1-50)2, -OC(NH)NH(alquilo C1-50), -OC(NH)NH2, -NHC(NH)N(alquilo C1-50)2, -NHC(=NH)NH2, -NHSO2(C1-50 alquilo), -SO2N(alquilo C1-50)2, -SO2NH(alquilo C1-50), -SO2NH2, -SO2C1-50 alquilo, -SO2OC1-50 alquilo, -OSO2C1-6 alquilo, -SOC1-6 alquilo, -Si(alquilo C1-50)3, -OSi(C1-6 a 1-C(=S)N(alquilo C1-50)2, C(=S) NH(alquilo C1-50), C(=S)NH2, -C(=O)S(alquilo C1-6), -C(=S)SC1-6 alquilo, -SC(=S)SC1-6 alquilo, -P(=O)2(C1-50 alquilo), -P(=O)(C1-50 alquilo)2, -OP(=O)(alquilo C1-50)2, -OP(=O)(alquilo OC1-50)2, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, arilo C6-10, heterociclilo de 3-10 miembros, heteroarilo de 5-10 miembros; o dos sustituyentes Rgg geminales pueden unirse para formar = O o = S; en donde X- es un contraión.

[0042] Tal como se utiliza aquí, el término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor (fluoro, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br), o yodo (yodo, -I).

[0043] Como se usa en este documento, un "contraión" es un grupo cargado negativamente asociado con una amina cuaternaria cargada positivamente con el fin de mantener la neutralidad electrónica. Los contraiones ejemplares incluyen iones haluro (p. ej., F-, Cl-, Br-, I-), NO3-, ClO4-, OH-, H2PO4-, HSO4-, iones sulfonato (p. ej., metanosulfonato, trifluorometanosulfonato, p-toluenosulfonato, benzenosulfonato, 10-alcanfor sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, naftaleno-1-sulfónico-5-sulfonato, etan-1-sulfónico-2-sulfonato y similares, e iones carboxilato (p. ej., acetato, etanoato, propanoato, benzoato, glucerato, lactato, tartrato, glicolato y similares).

[0044] Los átomos de nitrógeno pueden estar sustituidos o no sustituidos como permita la valencia, e incluyen átomos de nitrógeno primarios, secundarios, terciarios, y cuaternario. Los sustituyentes de átomos de nitrógeno ejemplares incluyen, pero no se limitan a, hidrógeno, -OH, -ORaa, -N(Rcc)2, -CN, -C(=O)Raa, -C(=O)N(Rcc)2, -CO2Raa, -SO2Raa, -C(=NRbb)Raa, -C(=NRcc)ORaa, -C(=NRcc)N(Rcc)2, -SO2N(Rcc)2, -SO2Rcc, -SO2ORcc, -SORaa, -C(=S)N(Rcc)2, -C(=O)SRcc, -C(=S)SRcc, -P(=O)2Raa, -P(=O)(Raa)2, -P(=O)2N(Rcc)2, -P(=O)(NRcc)2, alquilo C1-50, alquenilo C2-50, alquinilo C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14 y heteroarilo de 5 a 14 miembros, o dos grupos Rcc, junto con el átomo de N al que están unidos, forman un anillo de heterociclilo de 3 a 14 miembros o heteroarilo de 5 a 14 miembros, en el que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo están independientemente sustituidos con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos Rdd, y en donde Raa, Rbb, Rcc y Rdd son como se definieron anteriormente.

[0045] Los átomos de nitrógeno pueden estar sustituidos o no sustituidos como permita la valencia, e incluyen primarias, secundarias, terciarias, átomos de nitrógeno y cuaternario. Los sustituyentes de átomos de nitrógeno ejemplares incluyen, pero no se limitan a, hidrógeno, -OH, -ORaa, -N(Rcc)2, -CN, -C(=O)Raa, -C(=O)N(Rcc)2, -CO2Raa, -SO2Raa, -C(=NRbb)Raa, -C(=NRcc)ORaa, -C(=NRcc)N(Rcc)2, -SO2N(Rcc)2, -SO2Rcc, -SO2ORcc, -SORaa, -C(=S)N(Rcc)2, -C(=O)SRcc, -C(=S)SRcc, -P(=O)2Raa, -P(=O)(Raa)2, -P(=O)2N(Rcc)2, -P(=O)(NRcc)2, alquilo C1-10, perhaloalquilo C1-10, alquenilo C2-10, alquinilo C2-10, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14 y heteroarilo de 5-14 miembros, o dos grupos Rcc, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo de heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, en el que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituyen independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos Rdd, y en donde Raa, Rbb, Rcc y Rdd son como se definieron anteriormente.

[0046] En ciertas realizaciones, el sustituyente presente en un átomo de nitrógeno es un grupo protector de nitrógeno (también referido como un grupo protector de amino). Los grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, -OH, -ORaa, -N(Rcc)2, -C(=O)Raa, -C(=O)N(Rcc)2, -CO2Raa, -SO2Raa, -C(=NRcc)Raa, -C(=NRcc)ORaa, -C(=NRcc)N(Rcc)2, -SO2N(Rcc)2, -SO2Rcc, -SO2ORcc, -SORaa, -C(=S)N(Rcc)2, -C(=O)SRcc, -C(=S)SRcc, alquilo C1-10 (p. ej., aralquilo, heteroaralquilo), alquenilo C2-10, alquinilo C2-10, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14 y grupos heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, aralquilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos Rdd, y en donde Raa, Rbb, Rcc y Rdd son como se definen aquí. El nitrógeno de grupos protectores son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, TW Greene y PGM Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

[0047] Por ejemplo, grupos protectores de nitrógeno tales como amida los grupos (p. ej., -C(=O)Raa) incluyen, pero no se limitan a, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de N-benzoilfenilalanil, benzamida, -fenilbenzamida, o-nitrofenilacetamida, o-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (N'-ditiobenciloxiazolilamino)acetamida, 3-(p-hidroxifenil)propanamida, 3-(o-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(o-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(o-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, o-nitrocinnamida, derivado de N-acetilmetionina, o-nitrobenzamida y o-(benzoiloximetil)benzamida.

[0048] Grupos protectores de nitrógeno tales como grupos carbamato (por ejemplo, -C(=O)ORaa) incluyen, pero no se limitan a, carbamato de metilo, carbamato de etilo, carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), 9-(2-sulfo)fluorenilmetil carbamato, 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetil carbamato, 2,7-di-t-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metil carbamato (DBD-Tmoc), 4-metoxifenacil carbamato (Phencoc), 2,2,2-tricloroetil carbamato (Troc), 2-trimetilsililetil carbamato (Teoc), 2-carbamato de feniletilo (hZ), carbamato de 1-(1-adamanty1)-1-metiletilo

(Adpoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-haloetilo, carbamato de 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo (DB-t-BOC), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetil carbamato (TCBOC), 1-metil-1-(4-bifenil)etil carbamato (Bpoc), 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletil carbamato (t-Bumeoc), 2-(2'-y 4'-piridil)etil carbamato (Pyoc), 2-(N,N-diciclohexilcarboxamido)etil carbamato, t-butil carbamato (BOC), carbamato de 1-adamantilo (Adoc), carbamato de vinilo (Voc), carbamato de alilo (Alloc), carbamato de 1-isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de cinamilo (Coc), carbamato de 4-nitrocinamilo (Noc), carbamato de 8-quinolilo, carbamato de N-hidroxipiperidinilo, carbamato de alquilditioilo (Cbz), carbamato de p-metoxibencilo (Moz), carbamato de p-nitobencilo, carbamato de p-bromobencilo, carbamato de p-clorobencilo, carbamato de 2,4-diclorobencilo, carbamato de 4-metilsulfinilbencilo (Msz), carbamato de 9-antimetilmetilmetil, 2-metiltioetil carbamato, 2-metilsulfoniletil carbamato, 2-(p-toluenosulfonil)etil carbamato, [2-(1,3-ditianil)]metil carbamato (Dmoc), 4-metiltiofenil carbamato (Mtpc), 2,4-carbamato de dimetiltiofenilo (Bmpc), carbamato de 2-fosfonioetilo (Peoc), carbamato de 2-trifenilfosfonioisopropilo (Ppoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-cianoetilo, carbamato de m-cloro-p-aciloxibencilo, p-(dihidroxicarbonato) 5-benzisoxazolimetil carbamato, 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetil carbamato (Tcroc), m-nitrofenilo carbamato, carbamato de 3,5-dimetoxibencilo, carbamato de o-nitrobencilo, carbamato de 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo, carbamato de fenilo (o-nitrofenil) metilo, carbamato de t-amilo, tiocarbamato de S-bencilo, carbamato de p-cianobencilo, ciclobutilo carbamato, carbamato de ciclohexilo, carbamato de ciclopentilo, carbamato de ciclopropilmetilo, carbamato de p-deciloxibencilo, carbamato de 2,2-dimetoxiacilvinilvinilo, carbamato de o-(N,N-dimetilcarboxamido)bencilo, 1,1-dimetil-3-(N,N-dimetilcarboxamido)propil carbamato, 1,1-dimetilpropinil carbamato, di(2-piridil)metil carbamato, 2-furanilmetil carbamato, 2-yodoetil carbamato, isoborinil carbamato, isobutil carbamato, isonicotinil carbamato, p-(p'-metoxifenilazo)bencil carbamato, 1-metilciclobutil carbamato, 1-metilciclohexil carbamato, 1-metil-1-ciclopropilmetil carbamato, 1-metil-1(3,5-dimetoxifenil)etil carbamato, 1-metil-1-(p-fenilazofenil)etil carbamato, 1-metil-1-feniletil carbamato, 1-metil-1-(4-piridil)etil carbamato, fenil carbamato, p-(fenilazo)bencilo carbamato, carbamato de 2,4,6-tri-t-butilfenilo, carbamato de 4-(trimetilamonio)bencilo y carbamato de 2,4,6-trimetilbencilo.

[0049] Grupos protectores de nitrógeno tales como grupos sulfonamida (por ejemplo, -S(=O)₂Raa) incluyen, pero no se limitan a, ptoluenosulfonamida (Ts), bencenosulfonamida, 2,3,6-trimetil-4-metoxibencenosulfonamida (MTR), 2,4,6-trimetoxibencenosulfonamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfonamida (Mte), 4-metoxibencenosulfonamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfonamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfonamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonamida (Pmc), metanosulfonamida (Ms), β-trimetilsililetanosulfonamida (SES), 9-antracenosulfonamida, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfonamida (DNMBS), bencilsulfonamida, trifluorometilsulfonamida y fenacilsulfonamida.

[0050] Otros grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, fenotiazinil-(10)-derivado de acilo, derivado de N'-p-toluenosulfonilaminoacilo, derivado de N'-fenilaminotioacilo, derivado de N-benzoilfenilalanilo, derivado de N-acetilmetionina, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, N-ftalimida, N-ditiasuccinimida (Dts), N-2,3-difenilmaleimida, N-2,5-dimetilpirrol, aducto de N-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 3,5-dinitro-4-piridona 1-sustituida, N-metilamina, N-alilamina, N-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), N-3-acetoxipropilamina, N-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-pirrolin-3-il)amina, sales de amonio cuaternario, N-bencilamina, N-di(4-metoxifenil)metilamina, N-5-dibenzosuberilamina, N-trifenilmetilamina (Tr), N-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amina (MMTr), N-9-fenilfluorenilamina (PhF), N-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilenoamina, N-ferrocenilmetilamino (Fcm), N-2-picolilamino N'-óxido, N-1,1-dimetiltioetilmetilamina, N-bencilideneamina, N-p-metoxibencilidenamina, N-difenilmetilenoamina, N-[(2-piridilmesitil)metilenoamina, N-(N',N'-dimetilaminometileno)amina, N,N'-isopropilidendiamina, N-p-nitrobencilidenamina, N-salicilidenamina, N-5-cloroalilideneamina, N-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilenoamina, N-ciclohexilidenoamina, N-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de N-borano, derivado de ácido N-difenilborónico, N-[fenil(pentaacilcromo o tungsteno)acil]amina, quelato de N-cobre, quelato de N-zinc, N-nitroamina, N-nitrosoamina, N-óxido de amina, difenilfosfinamina (Dpp), dimetiltiofosfinamida (Mpt), difeniltiofosfinamida (Ppt), dialquifosforamidatos, dibencilfosforamidato, difenilfosforamidato, bencenosulfenamida, o-nitrobencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida y 3-nitropiridinasulfenamida (Npys).

[0051] En ciertas realizaciones, el sustituyente presente en un átomo de oxígeno es un grupo protector de oxígeno (también referido como un grupo protector de hidroxilo). Los grupos protectores de oxígeno incluyen, entre otros, -Raa, -N(Rbb)₂, -C(=O)SRaa, -C(=O)Raa, -CO₂Raa, -C(=O)N(Rbb)₂, -C(=NRbb)Raa, -C(=NRbb)ORaa, -C(=NRbb)N(Rbb)₂, -S(=O)Raa, -SO₂Raa, Si(Raa)₃, -P(Rcc)₂, -P(Rcc)₃, -P(=O)₂Raa, -P(=O)(Raa)₂, -P(=O)(ORcc)₂, -P(=O)₂N(Rbb)₂, y -P(=O)(NRbb)₂, en donde Raa, Rbb y Rcc son como se definen aquí. Los grupos protectores de oxígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, TW Greene y PGM Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

[0052] Los grupos protectores de oxígeno ejemplares incluyen, pero no se limitan a, metilo, metoximetilo (MOM), metiltioetilmetilo (MTM), t-butiltioetilmetilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), p-metoxibenciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metilo (p-AOM), guaiacolmetilo (GUM), t-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropiranilo (THP), 3-bromotetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropiranilo (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, 4-metoxitetrahidrotiopiranilo S, dióxido, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-

cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, t-butilo, alilo, p-clorofenilo, p-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo (Bn), p-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, o-nitrobencilo, p-nitrobencilo, p-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, p-cianobencilo, p-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, 3-metil-2-picolilo N-óxido, difenilmetilo, p,p'-dinitrobenzohidrido, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo, α -naftildifenilmetilo, p-metoxifenildifenilmetilo, di(p-metoxifenil)fenilmetilo, tri(p-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenociloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,4',4"-tris(4,4',4"-tris(-dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzodisulfuran-2-ilo, benzisotiazolilo S,S-dioxido, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetiltexilsililo, t-butildimetilsililo (TBDMS), t-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-p-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), t-butilmetoxifenilsililo (TBMPs), formiato, benzoilformato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, p-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenditio)pentanoato (levulinoilditioacetal), pivaloato, adamantoato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, p-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), alquil metil carbonato, 9-fluorenilmetil carbonato (Fmoc), alquil etil carbonato, alquil 2,2,2-tricloroetil carbonato (Troc), 2-(trimetilsilil)etil carbonato (TMSEC), 2-(fenilsulfonil)etil carbonato (Psec), 2-(trifenilfosfonio)etil carbonato (Peoc), alquil isobutil carbonato, alquil vinil carbonato alquil alil carbonato, alquil p-nitrofenil carbonato, alquil bencil carbonato, alquil p-metoxibencil carbonato, alquil 3,4-dimetoxibencil carbonato, alquil o-nitrobencil carbonato, alquil p-nitrobencil carbonato, alquil S-bencil tiocarbonato, 4-etoxi-1-naftil carbonato, ditiocarbonato de metilo, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, o-(dibromometil) benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometoxi)etilo, 4-(metiltiometoxi) butirato, 2-(metiltiometoximetil) benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (E)-2-metil-2-butenato, o-(metoxiacil)benzoato, α -naftoato, nitrato, alquil N,N,N',N'-tetrametilfosforodiamidato, alquil N-fenilcarbamato, borato, dimetilfosfinotioilo, alquil 2,4-dinitrofenilsulfenato, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato y tosillato (Ts).

[0053] En ciertas realizaciones, el sustituyente presente en un átomo de azufre es un grupo protector de azufre (también referido como un grupo protector de tiol). Los grupos protectores de azufre incluyen, entre otros, -Raa, -N(Rbb)₂, -C(=O)SRaa, -C(=O)Raa, -CO₂Raa, C(=O)N(Rbb)₂, -C(=NRbb)Raa, -C(=NRbb)ORaa, -C(=NRbb)N(Rbb)₂, -S(=O)Raa, -SO₂Raa, -Si(Raa)₃, -P(Rcc)₂, -P(Rcc)₃, -P(=O)₂Raa, -P(=O)(Raa)₂, -P(=O)(ORcc)₂, -P(=O)₂N(Rbb)₂, y -P(=O)(NRbb)₂, en donde Raa, Rbb y Rcc son como se definen aquí. El azufre de grupos protectores son bien conocidos en la técnica e incluyen aquellos descritos en detalle en *Protecting Groups in Organic Synthesis*, TW Greene y PGM Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

[0054] Como se usa en este documento, un "grupo saliente" es un término entendido en la técnica que se refiere a un fragmento molecular que parte con un par de electrones en la división del enlace heterolítico, en el que el fragmento molecular es un anión o una molécula neutra. Véase, por ejemplo, Smith, *Advanced Organic Chemistry*, 6ª ed. de marzo. (501-502). Los ejemplos de grupos salientes incluyen, pero no se limitan a, grupos halo (por ejemplo, cloro, bromo, yodo) e hidroxilo sustituido con sulfonilo (por ejemplo, tosilo, mesilo, besilo).

Definiciones adicionales

[0055] *Animal*: Como se utiliza aquí, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (p. ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, un ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal genéticamente modificado y/o un clon.

[0056] *Aproximadamente o alrededor de*: Como se usa aquí, el término "aproximadamente" o "alrededor de", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentra dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto donde dicho número excedería el 100% de un valor posible).

[0057] *Entrega*: Como se usa aquí, el término "entrega" abarca tanto la administración local como sistémica. Por ejemplo, la entrega de ARNm abarca situaciones en las que se entrega un ARNm a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y retiene dentro del tejido diana (también denominada "distribución local" o "entrega local"), y situaciones en las que un ARNm se entrega a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y se secreta en el sistema de circulación del paciente (por ejemplo, suero) y sistemáticamente se distribuye y absorbe por otros tejidos (también denominados "distribución sistémica" o "administración sistémica").

[0058] *Expresión*: como se usa en el presente documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la traducción de un ARNm en un polipéptido, ensamblar múltiples polipéptidos (por ejemplo, cadena pesada o cadena

ligera de anticuerpo) en una proteína intacta (por ejemplo, anticuerpo) y/o modificación postraduccional de un polipéptido o proteína completamente ensamblada (por ejemplo, anticuerpo). En esta aplicación, los términos "expresión" y "producción" y equivalentes gramaticales, se utilizan de manera intercambiable.

5 **[0059] Mejorar, aumentar o reducir:** como se usa en este documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición de referencia, como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito aquí, o una medición en un sujeto de control (o sujeto de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito aquí. Un "sujeto de control" es un sujeto que padece la misma forma de enfermedad que el sujeto que está siendo tratado, que tiene aproximadamente la misma edad que el sujeto que está siendo tratado.

10 **[0060] In Vitro:** Como se usa aquí, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, *por ejemplo*, en una prueba de recipiente para tubos o de reacción, en cultivo celular, *etc.*, en lugar de dentro de un organismo multicelular.

15 **[0061] In Vivo:** Como se usa aquí, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo multicelular, como un animal no humano y humanos. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (a diferencia de, *por ejemplo*, los sistemas *in vitro*).

20 **[0062] Aislado:** como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a una sustancia y/o entidad que se ha (1) separado de al menos algunos de los componentes con los que se asoció cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) producidos, preparados y/o fabricados por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más de aproximadamente el 99% de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados son aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más de aproximadamente 99% puro. Como se usa en el presente documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Como se usa en este documento, el cálculo del porcentaje de pureza de las sustancias y/o entidades aisladas no debe incluir excipientes (*p. ej.*, tampón, solvente, agua, *etc.*).

35 **[0063] Distribución o entrega local:** Como se usa en el presente documento, los términos "de distribución local", "entrega local," o equivalente gramatical, se refieren a la entrega o distribución específica de tejido. Por lo general, la distribución o entrega local requiere una proteína (*p. ej.*, enzima) codificada por los ARNm que se traducen y se expresan intracelularmente o con una secreción limitada que evita ingresar al sistema de circulación del paciente.

40 **[0064] ARN mensajero (ARNm):** como se usa en el presente documento, el término "ARN mensajero (ARNm)" se refiere a un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido. El ARNm tal como se usa en el presente documento abarca tanto el ARN modificado como el no modificado. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. El ARNm se puede purificar a partir de fuentes naturales, producido utilizando sistemas de expresión recombinantes y opcionalmente purificados, sintetizados químicamente, *etc.* Cuando sea apropiado, *por ejemplo*, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, el ARNm puede comprender análogos de nucleósidos tales como análogos que tienen bases o azúcares modificados químicamente, modificaciones del esqueleto, *etc.* Se presenta una secuencia de ARNm en la dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones, un ARNm es o comprende nucleósidos naturales (*por ejemplo*, adenosina, guanosina, citidina, uridina); análogos de nucleósidos (*p. ej.*, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propiniluridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5 iodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases modificadas químicamente; bases biológicamente modificadas (*p. ej.*, bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (*p. ej.*, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (*p. ej.*, fosforotioatos y enlaces 5'-N-fosforamidita).

55 **[0065] Ácido nucleico:** Como se usa aquí, el término "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que es o puede ser incorporado en una cadena de polinucleótido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse a una cadena polinucleotídica mediante un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (*por ejemplo*, nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a una cadena polinucleotídica que comprende residuos de ácido nucleico individuales. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" abarca ARN tal como ARNm, ARNs, microARN, así como ADN y/o ADNc bicatenario.

60 **[0066] Paciente:** Como se usa aquí, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo para el que una

composición proporcionada se puede administrar, por ejemplo, para propósitos experimental, diagnóstico, profiláctico, cosmético, y/o con fines terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (p. ej., mamíferos como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y/o humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un humano. Un humano incluye formas pre y postnatales.

[0067] Farmacéuticamente aceptable: El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí, se refiere a sustancias que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

[0068] Polímero: Como se usa en este documento, un "polímero" se refiere a un compuesto que consta de al menos 3 (por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, etc.) repitiendo unidades estructurales unidas covalentemente.

[0069] Sal: Como se usa aquí, el término "sal" o "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, SM Berge et al., describe sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66: 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicas y orgánicas adecuadas. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o mediante el uso de otros métodos utilizados en la técnica, como el intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforado, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, metanosulfonato de sodio, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato y similares. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos, alcalinotérreos, amonio y $N+(C1-4alquil)4$. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando es apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes amina formadas usando contraiones como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato y aril sulfonato. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen sales formadas a partir de la cuaternización de una amina usando un electrófilo apropiado, por ejemplo, un haluro de alquilo, para formar una sal amino alquilada cuaternizada.

[0070] Distribución o entrega sistémica: Como se usa en el presente documento, los términos "distribución sistémica", "administración sistémica", o equivalentes gramaticales, se refieren a un mecanismo de entrega o distribución o enfoque que afecta a todo el cuerpo o un entero organismo. Típicamente, la distribución o entrega sistémica se realiza a través del sistema de circulación del cuerpo, por ejemplo, el torrente sanguíneo. En comparación con la definición de "distribución o entrega local".

[0071] Sujeto: Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un cualquier animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, humano o perro, gato, ganado, cerdos, oveja, caballo o primate). Un ser humano incluye formas pre y postnatales. En muchas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un humano que se presenta a un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa aquí de manera intercambiable con "individuo" o "paciente". Un sujeto puede estar afectado o es susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede mostrar o no síntomas de la enfermedad o trastorno.

[0072] Sustancialmente: Como se usa aquí, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir una extensión o grado total o de una propiedad característica o de interés casi total. Una persona con habilidades ordinarias en las artes biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si alguna vez, se completan y/o se completan o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

[0073] Tejidos diana: Como se usa aquí, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido que se ve afectado por una enfermedad a ser tratada. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad.

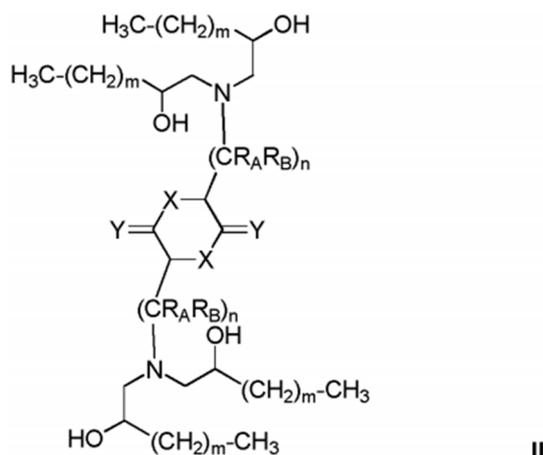
DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0074] La presente invención proporciona, entre otras cosas, una nueva clase de compuestos de lípidos

biodegradables para la mejora *in vivo* suministro de agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos. En particular, un compuesto biodegradable descrito en el presente documento se puede usar como un lípido catiónico, junto con otros lípidos no catiónicos, para formular una nanopartícula basada en lípidos (por ejemplo, liposoma) para encapsular agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARNs, ARNm, microARN) para uso terapéutico.

Compuestos biodegradables

[0075] En algunas realizaciones, el compuesto (es decir, lípido catiónico) de la presente invención es un compuesto según la fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

cada m es independientemente 1 a 19;

cada n es independientemente es de 1 a 6;

cada X independientemente es O o S;

cada Y independientemente es O o S;

cada R_A es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50 opcionalmente sustituido, alquenilo C2-50 opcionalmente sustituido, alquinilo C2-50 opcionalmente sustituido, carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido, heterociclilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido, arilo C6-14 opcionalmente sustituido, heteroarilo o halógeno de 5 a 14 miembros opcionalmente sustituido, en el que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está independientemente sustituido con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R_{dd}, y

cada R_B es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50 opcionalmente sustituido, alquenilo C2-50 opcionalmente sustituido, alquinilo C2-50 opcionalmente sustituido, carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido, heterociclilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido, arilo C6-14 opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente 5-sustituido o halógeno de 14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R_{dd}.

[0076] En algunas realizaciones, cada n es independientemente 2 a 6. En algunas realizaciones, cada n independientemente es de 3 a 5. En algunas realizaciones, cada n independientemente es 3 ó 4. En algunas realizaciones, cada n es el mismo. En algunas realizaciones, cada n es 2. En algunas realizaciones, cada n es 3. En algunas realizaciones, cada n es 4. En algunas realizaciones, cada n es 5. En algunas realizaciones, cada n es 6.

[0077] En algunas realizaciones, cada m independientemente es de 1 a 17. En algunas realizaciones, cada m independientemente es de 3 a 15. En algunas realizaciones, cada m independientemente es de 5 a 13. En algunas realizaciones, cada m independientemente es de 7 a 11. En algunas realizaciones, cada m independientemente es de 8 a 10. En algunas realizaciones, cada m es igual. En algunas realizaciones, cada m es 7. En algunas realizaciones, cada m es 8. En algunas realizaciones, cada m es de 9. En algunas realizaciones, cada m es 10. En algunas realizaciones, cada m es de 11.

[0078] En algunas realizaciones, cada X es igual. En algunas realizaciones, cada X es O. En algunas realizaciones,

cada X es S. En algunas realizaciones, una X es O y una X es S.

[0079] En algunas realizaciones, cada Y es igual. En algunas realizaciones, cada Y es O. En algunas realizaciones, cada Y es S. En algunas realizaciones, un Y es O y un Y es S.

[0080] En algunas realizaciones, cada X es el mismo y cada Y es el mismo. En algunas realizaciones, cada X es O y cada Y es O. En algunas realizaciones, cada X es S y cada Y es S.

[0081] En algunas realizaciones, R_A es hidrógeno. En algunas realizaciones, R_A es alqueno C2-50 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es alqueno C2-50 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es heterociclilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es arilo C6-14 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es heteroarilo de 5-14 miembros opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es halógeno.

[0082] En ciertas realizaciones, R_A es alquilo opcionalmente sustituido; por ejemplo, alquilo C1-6 opcionalmente sustituido, alquilo C2-6 opcionalmente sustituido, alquilo C3-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-5 opcionalmente sustituido, o alquilo C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un caso de R_A es alquilo opcionalmente sustituido; por ejemplo, alquilo C1-6 opcionalmente sustituido, alquilo C2-6 opcionalmente sustituido, alquilo C3-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-5 opcionalmente sustituido o alquilo C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R_A es metilo.

[0083] En ciertas realizaciones, R_A está opcionalmente alqueno sustituido, por ejemplo, alqueno C2-6 opcionalmente sustituido, alqueno C3-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-5 opcionalmente sustituido, o alqueno C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_A está opcionalmente alqueno sustituido, por ejemplo, alqueno C2-6 opcionalmente sustituido, alqueno C3-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-5 opcionalmente sustituido, o alqueno C3-4 opcionalmente sustituido.

[0084] En ciertas realizaciones, R_A es alqueno opcionalmente sustituido, por ejemplo, alqueno C2-6 opcionalmente sustituido, alqueno C3-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-5 opcionalmente sustituido, o alqueno C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_A es alqueno opcionalmente sustituido, por ejemplo, alqueno C2-6 opcionalmente sustituido, alqueno C3-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-5 opcionalmente sustituido, o alqueno C3-4 opcionalmente sustituido.

[0085] En ciertas realizaciones, R_A es carbociclilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-8 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-6 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5 opcionalmente sustituido, o carbociclilo C6 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un caso de R_A es carbociclilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-8 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-6 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5 opcionalmente sustituido, o carbociclilo C6 opcionalmente sustituido.

[0086] En algunas realizaciones, R_A está opcionalmente heterociclilo sustituido, por ejemplo, 3-14 miembros que heterociclilo, heterociclilo de 3-10 miembros, heterociclilo de 5-8 miembros, heterociclilo de 5-6 miembros, opcionalmente heterociclilo de 5 miembros sustituido, o heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un caso de R_A es heterociclilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, heterociclilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido, heterociclilo de 3-10 miembros opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5-6 miembros opcionalmente sustituido, heterociclilo de 5 miembros opcionalmente sustituido, o heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido.

[0087] En algunas realizaciones, R_A es arilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_A es fenilo. En algunas realizaciones, R_A es fenilo sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un caso de R_A es arilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido.

[0088] En algunas realizaciones, R_A es heteroarilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, heteroarilo de 5-14 miembros, heteroarilo de 5-10 miembros, heteroarilo de 5-6 miembros, heteroarilo de 5 miembros, o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un caso de R_A es heteroarilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, heteroarilo de 5-14 miembros opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5-6 miembros opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 miembros opcionalmente sustituido, o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido.

[0089] En algunas realizaciones, R_A es halógeno. En algunas realizaciones, R_A es -F. En algunas realizaciones, R_A es -Cl. En algunas realizaciones, R_A es -Br. En algunas realizaciones, R_A es -I.

[0090] En algunas realizaciones, R_B es hidrógeno. En algunas realizaciones, R_B es alquilo C1-50 opcionalmente

sustituido. En algunas realizaciones, R_B es alqueno C2-50 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es alqueno C2-50 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es heterociclilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es arilo C6-14 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es heteroarilo de 5-14 miembros opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es halógeno.

[0091] En ciertas realizaciones, R_B es alquilo opcionalmente sustituido; por ejemplo, alquilo C1-6 opcionalmente sustituido, alquilo C2-6 opcionalmente sustituido, alquilo C3-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-5 opcionalmente sustituido o alquilo C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_B es alquilo opcionalmente sustituido; por ejemplo, alquilo C1-6 opcionalmente sustituido, alquilo C2-6 opcionalmente sustituido, alquilo C3-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-6 opcionalmente sustituido, alquilo C4-5 opcionalmente sustituido o alquilo C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R_B es metilo.

[0092] En ciertas realizaciones, R_B es alqueno opcionalmente sustituido, por ejemplo, alqueno C2-6 opcionalmente sustituido, alqueno C3-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-5 opcionalmente sustituido o alqueno C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_B es alqueno opcionalmente sustituido, por ejemplo, alqueno C2-6 opcionalmente sustituido, alqueno C3-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-6 opcionalmente sustituido, alqueno C4-5 opcionalmente sustituido, o alqueno C3-4 opcionalmente sustituido.

[0093] En ciertas realizaciones, R_B es alquino opcionalmente sustituido, por ejemplo, alquino C2-6 opcionalmente sustituido, alquino C3-6 opcionalmente sustituido, alquino C4-6 opcionalmente sustituido, alquino C4-5 opcionalmente sustituido, o alquino C3-4 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_B es alquino opcionalmente sustituido, por ejemplo, alquino C2-6 opcionalmente sustituido, alquino C3-6 opcionalmente sustituido, alquino C4-6 opcionalmente sustituido, alquino C4-5 opcionalmente sustituido, o alquino C3-4 opcionalmente sustituido.

[0094] En ciertas realizaciones, R_B es carbociclilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-8 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-6 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5 opcionalmente sustituido, o carbociclilo C6 opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos un caso de R_B es carbociclilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, carbociclilo C3-10 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-8 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5-6 opcionalmente sustituido, carbociclilo C5 opcionalmente sustituido, o carbociclilo C6 opcionalmente sustituido.

[0095] En algunas realizaciones, R_B es heterociclilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, heterociclilo de 3-14 miembros, heterociclilo de 3-10 miembros, heterociclilo de 5-8 miembros, heterociclilo de 5-6 miembros, heterociclilo de 5 miembros opcionalmente sustituido, o heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_B es heterociclilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, heterociclilo de 3-14 miembros, heterociclilo de 3-10 miembros, heterociclilo de 5-8 miembros, heterociclilo de 5-6 miembros, heterociclilo de 5 miembros opcionalmente sustituido, o heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido.

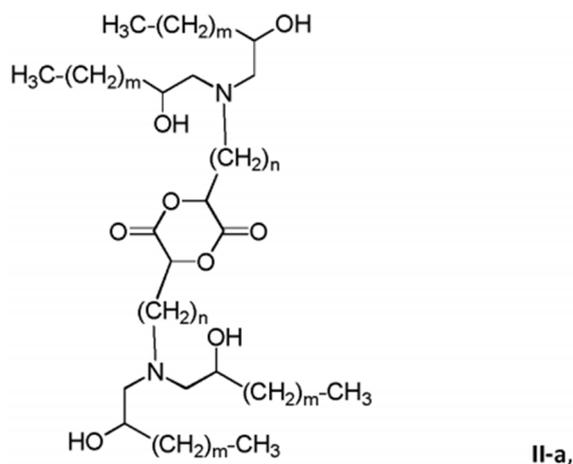
[0096] En algunas realizaciones, R_B es arilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R_B es fenilo. En algunas realizaciones, R_B es fenilo sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_B es arilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido.

[0097] En algunas realizaciones, R_B es heteroarilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, heteroarilo de 5-14 miembros, heteroarilo de 5-10 miembros, heteroarilo de 5-6 miembros, heteroarilo de 5 miembros, o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, al menos una instancia de R_B es heteroarilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, heteroarilo de 5-14 miembros, heteroarilo de 5-10 miembros, heteroarilo de 5-6 miembros, heteroarilo de 5 miembros, o heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido.

[0098] En algunas realizaciones, R_B es halógeno. En algunas realizaciones, R_B es -F. En algunas realizaciones, R_B es -Cl. En algunas realizaciones, R_B es -Br. En algunas realizaciones, R_B es -I.

[0099] En algunas realizaciones, al menos un R_A es alquilo C1-50 está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, al menos un R_A y un R_B son alquilo C1-50 opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, al menos un R_A y un R_B son alquilo C1-50 opcionalmente sustituido, donde los R_A y R_B están unidos al mismo carbono. En algunas realizaciones, al menos un R_A es metilo. En algunas realizaciones, al menos un R_A y un R_B son metilo. En algunas realizaciones, al menos un R_A y un R_B son metilo, donde los R_A y R_B están unidos al mismo carbono.

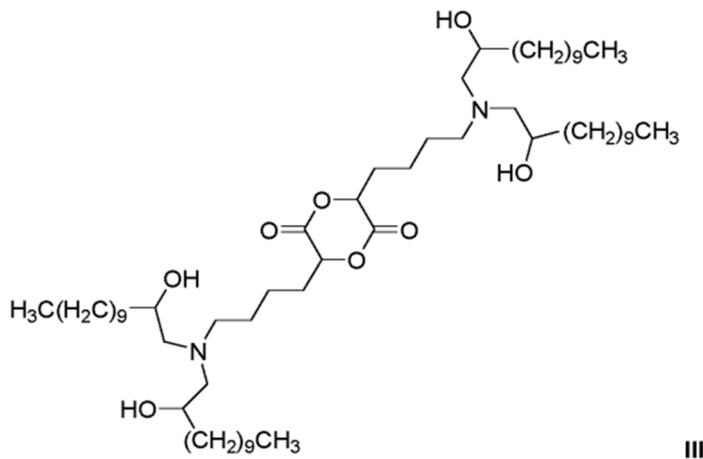
[0100] En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula II-a:



20 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,
en donde m y n son como se definieron anteriormente y se describen en este documento.

25 **[0101]** En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula II-a en donde cada n independientemente es de 2 a 6 y cada m independientemente es de 3 a 15. En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula II-a en donde cada n independientemente es de 3 a 5 y cada m independientemente es de 5 a 13. En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula II-a en donde cada n independientemente es 3 o 4 y cada m independientemente es 7 a 11. En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula II-a en donde cada n es igual y es 3 o 4, y cada m es igual y es de 7 a 11.

30 **[0102]** En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula III:



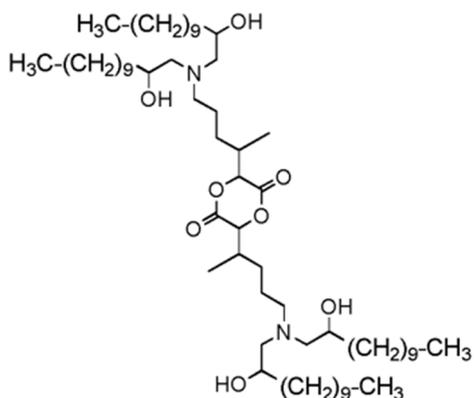
50 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0103] En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula IV:

55

60

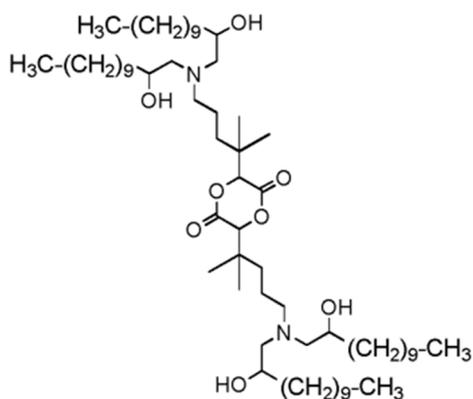
65



IV

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0104] En algunas realizaciones, un compuesto de fórmula II es un compuesto de fórmula V:



V

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

Liposomas para el suministro de agentes, tales como ARNm

[0105] Entre otras cosas, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto biodegradable descrito en el presente documento para el suministro de agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, una composición proporcionada es una nanopartícula basada en lípidos, tal como un liposoma. Como se usa en el presente documento, el término "liposoma" se refiere a cualquier vesícula de nanopartículas lipídicas lamelares, multilamelares o sólidas. Típicamente, un liposoma como se usa en el presente documento puede formarse mezclando uno o más lípidos o mezclando uno o más lípidos y polímero(s). Por lo tanto, el término "liposoma", como se usa en el presente documento, abarca nanopartículas a base de lípidos y polímeros. En particular, un liposoma de acuerdo con la presente invención incorpora un compuesto biodegradable descrito aquí como un lípido catiónico. Como ejemplo no limitante, un liposoma de acuerdo con la presente invención es un compuesto de fórmula III, es decir, 3,6-bis(4-(bis (2-hidroxidodecil)amino)butil)-1,4-dioxano-2,5-diona. Un liposoma adecuado también puede contener lípidos catiónicos secundarios o adicionales, lípidos auxiliares (por ejemplo, lípidos no catiónicos y/o lípidos basados en colesterol), lípidos modificados con PEG y/o polímeros.

[0106] En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos (por ejemplo, el compuesto de fórmula III) constituyen uno o más 30-50% (por ejemplo, aproximadamente 30-45%, aproximadamente 30-40%, aproximadamente 35-50%, aproximadamente 35-45%, o aproximadamente 35-40%) del liposoma por relación molar. En algunas realizaciones, el lípido catiónico (por ejemplo, el compuesto de fórmula III) constituye aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45% o aproximadamente el 50% del liposoma en relación molar. En algunas realizaciones, el liposoma comprende un segundo lípido o lípidos catiónicos adicionales.

Lípidos catiónicos segundos o adicionales

[0107] En algunas realizaciones, los liposomas pueden comprender un segundo lípido catiónico o adicional. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que tienen una carga positiva neta a un pH seleccionado, como el pH fisiológico. Se han descrito varios lípidos catiónicos en la literatura, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Los lípidos catiónicos particularmente

adecuados para usar en las composiciones y métodos incluyen los descritos en las publicaciones de patentes internacionales WO 2010/053572 (y particularmente, C12-200 descrito en el párrafo [00225]), WO 2012/170930 y WO 2013063468. En ciertas realizaciones, las composiciones y métodos emplean nanopartículas lipídicas que comprenden un lípido catiónico ionizable (titulable) descrito en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2013/034602, presentada el 29 de marzo de 2013, Publ. N° WO 2013/149140, tal como, por ejemplo, (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il) tetracosa-15,18-dien-1-amina (HGT5000), (15Z, 18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il) tetracosa-4,15,18-trien-1-amina (HGT5001) y (15Z, 18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-5, 15, 18-trien-1-amina (HGT5002).

[0108] En algunas realizaciones, el segundo lípido catiónico o adicional es cKK-E12 (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)piperazina-2,5-diona) o derivados del mismo, como descrito en las publicaciones internacionales de patentes WO 2013/063468.

[0109] En algunas realizaciones, se usa el lípido catiónico segundo o adicional N-[l-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-cloruro de trimetilamonio o "DOTMA". (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); Patente de los Estados Unidos Núm. 4,897,355). DOTMA puede formularse solo o puede combinarse con el lípido neutro, dioleoilfosfatidiletanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en un vehículo de transferencia liposomal o una nanopartícula lipídica, y dichos liposomas se pueden usar para mejorar el suministro de ácidos nucleicos a las células diana. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, 5-carboxiespermiilglicinadioctadecilamida o "DOGS," 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-lpropanaminium o "DOSPA" (Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); Patente de los Estados Unidos Núm. 5,171,678; Patente de los Estados Unidos Núm. 5,334,761), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano o "DODAP", 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano o "DOTAP". Los lípidos catiónicos ejemplares adicionales también incluyen 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoilenoxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", N-dioleil-N,N-dimetilamonio cloruro o "DODAC", bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de N-(1, 2-dimiristiloilprop-3-il)-N,N-dimetil-Nhidroxiethylamonio o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(cholest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-l-(cis,cis-9,12- octadecadienoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(cholest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetila l-(cis,cis-9',l-2'- octadecadienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetil-3,4-dioleiloiloxibencilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-Dilinoileiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano o "DLin- DMA", 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", y 2-(2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)-l,3-dioxolan-4-il)-N,N-dimetiletanamina (DLin-KC2-DMA)) (Ver, WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), o mezclas de los mismos. (Heyes, J., y col., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., y col., Nat. Biotechnol. 23 (8): 1003-1007 (2005); Publicación PCT WO2005/121348A1). En algunas realizaciones, uno o más de los lípidos catiónicos comprenden al menos uno de un resto imidazol, dialquilamino o guanidinio.

[0110] En algunas realizaciones, el segundo lípido catiónico adicional puede elegirse de XTC (2,2-Dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano), MC3 (((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato), ALNY-100 ((3aR, 5s, 6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienil) tetrahydro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina)), NC98-5 (4,7,13-tris(3-oxo-3-(undecilamino)propil)-N1,N16-diundecil-4,7,10,13-tetraazahexadecano-1,16-diamida), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), HGT4003 (WO 2012/170889), ICE (WO 2011/068810), HGT5000 (publicación de patente internacional WO/2013/149140) o HGT5001 (cis o trans) (WO/2013/149140), lipoides de aminoalcohol como los descritos en WO2010/053572, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple, SC et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, KT et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869).

Lípidos no catiónicos/auxiliares

[0111] En algunas realizaciones, los liposomas provistos contienen uno o más lípidos no catiónicos ("auxiliares"). Como se usa en este documento, la frase "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que llevan una carga negativa neta a un H seleccionado, como el pH fisiológico. Lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-l-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfenoetanolamina (DMPE), diestearoilfosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, l-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), o una mezcla de los mismos.

[0112] En algunas realizaciones, tales lípidos no catiónicos pueden usarse solos, pero preferiblemente se usan en combinación con otros excipientes, por ejemplo, lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, el lípido no catiónico

5 puede comprender una relación molar de aproximadamente 5% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 10% a aproximadamente 70% del lípido total presente en un liposoma. En algunas realizaciones, un lípido no catiónico es un lípido neutro, es decir, un lípido que no lleva una carga neta en las condiciones bajo las cuales se formula y/o administra la composición. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípidos no catiónicos en un liposoma puede ser mayor que 5%, mayor que 10%, mayor que 20%, mayor que 30% o mayor que 40%.

Lípidos basados en colesterol

10 **[0113]** En algunas realizaciones, los liposomas provistos comprenden uno o más lípidos basados en colesterol. Por ejemplo, los lípidos catiónicos basados en colesterol adecuados incluyen, por ejemplo, DC-Chol (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propil)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); Patente de los Estados Unidos Núm. 5,744,335), o ICE. En algunas realizaciones, el lípido a base de colesterol puede comprender una proporción molar de aproximadamente 2% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 20% del lípido total presente en un liposoma. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípidos a base de colesterol en la nanopartícula lipídica puede ser mayor que 5%, 10%, mayor que 20%, mayor que 30% o mayor que 40%.

Lípidos PEGilados

20 **[0114]** En algunas realizaciones, los liposomas provistos comprenden uno o más lípidos PEGilados. Por ejemplo, el uso de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivados como ceramidas derivatizadas (PEG-CER), incluyendo N-Octanoil-Esfingosina-I-[Succinilo(Metoxipolietilenglicol)-2000] (C8 PEG-2000 ceramida) también está contemplado por la presente invención en combinación con uno o más de los lípidos catiónicos y, en algunas realizaciones, juntos que comprenden el liposoma. Lípidos modificados por PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unido covalentemente a un lípido con cadena(s) alquilo de longitud C₆-C₂₀. En algunas realizaciones, un lípido modificado con PEG o PEGilado es colesterol PEGilado o PEG-2K. La adición de tales componentes puede prevenir la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil de la circulación y aumentar el suministro de la composición de lípido-ácido nucleico a la célula diana (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o pueden seleccionarse para intercambiarse rápidamente de la formulación in vivo (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 5,885,613).

35 **[0115]** En algunas realizaciones, los lípidos intercambiables particularmente útiles son PEG-ceramidas que tienen cadenas acilo más cortas (por ejemplo, C₁₄ o C₁₈). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivados de la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente 0% a aproximadamente 15%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, o aproximadamente el 2% del lípido total presente en el liposoma.

40 **[0116]** Según diversas realizaciones, la selección de lípidos catiónicos secundarios o adicionales, lípidos no catiónicos y/o lípidos modificados con PEG que comprenden la nanopartícula lipídica, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa según las características de los lípidos seleccionados, la naturaleza de las células diana previstas, las características del ARNm que se administrará. Consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquílica, así como el tamaño, carga, pH, pKa, fusogénesis y toxicidad de los lípidos seleccionados. Por lo tanto, las relaciones molares pueden ajustarse en consecuencia. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípidos modificados con PEG en un liposoma puede ser mayor que 1%, mayor que 2%, mayor que 5%, mayor que 10% o mayor que 15%.

Polímeros

50 **[0117]** En algunas realizaciones, un liposoma adecuado de acuerdo con la presente invención incluye además un polímero, en combinación con uno o más lípidos catiónicos como se describe y, en algunas realizaciones, otros vehículos que incluyen diversos lípidos descritos aquí. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los vehículos de administración de liposomas, como se usan en el presente documento, también comprenden nanopartículas que contienen polímeros. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, polialquioacrilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicólido, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas, protamina, protamina PEGilada, PLL y PEG. Cuando PEI está presente, puede ser PEI ramificado de un peso molecular que varía de 10 a 40 kDa, por ejemplo, PEI ramificado de 25 kDa (Sigma n° 408727).

Agentes terapéuticos

60 **[0118]** La presente invención puede usarse para administrar cualquier agente terapéutico. Específicamente, cualquier agente terapéutico que se administre a un sujeto puede administrarse usando los complejos, picopartículas, nanopartículas, micropartículas, micelas o liposomas, descritos aquí. El agente puede ser una molécula orgánica (p. ej., un agente terapéutico, un fármaco), molécula inorgánica, ácido nucleico, proteína, aminoácido, péptido, polipéptido, polinucleótido, agente de direccionamiento, molécula orgánica o inorgánica marcada isotópicamente, vacuna, agente inmunológico, etc. En ciertas realizaciones de la presente invención, el agente a suministrar puede ser una mezcla de agentes.

[0119] En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos son moléculas orgánicas con actividad farmacéutica, por ejemplo, un fármaco. En ciertas realizaciones, el fármaco es un agente antibiótico, antivírico, anestésico, agente esteroideo, agente antiinflamatorio, agente antineoplásico, agente anticancerígeno, antígeno, vacuna, anticuerpo, descongestionante, antihipertensivo, sedante, agente anticonceptivo, agente progestacional, anticolinérgico, analgésico, antidepresivo, antipsicótico, agente bloqueante adrenérgico I3, diurético, agente cardiovascular activo, agente vasoactivo, agente antiinflamatorio no esteroideo, agente nutricional, etc.

[0120] Los agentes diagnósticos incluyen gases; rieles; agentes de imagen disponibles comercialmente utilizados en tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía asistida por computadora (CAT), tomografía computarizada por emisión de fotón único, rayos X, fluoroscopia y resonancia magnética (MRI); y agentes de contraste. Los ejemplos de materiales adecuados para su uso como agentes de contraste en MRI incluyen quelatos de gadolinio, así como hierro, magnesio, manganeso, cobre y cromo. Los ejemplos de materiales útiles para imágenes de rayos X y CAT incluyen materiales a base de yodo.

[0121] Los agentes terapéuticos y profilácticos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, suplementos nutricionales y vacunas. Las vacunas pueden comprender proteínas o péptidos aislados, organismos y virus inactivados, organismos y virus muertos, organismos o virus genéticamente alterados y extractos celulares.

Polinucleótidos

[0122] La presente invención puede usarse para administrar cualquier polinucleótido. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un ARN interferente (ARNi). El fenómeno de ARNi se analiza con mayor detalle, por ejemplo, en las siguientes referencias: Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15: 188; Fire et al., 1998, Nature, 391: 806; Tabara y col., 1999, Cell, 99: 123; Hammond et al., Nature, 2000, 404: 293; Zamore et al., 2000, Cell, 101: 25; Chakraborty, 2007, Curr. Drug Targets, 8: 469; y Morris y Rossi, 2006, Gene Ther., 13: 553. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un ARNs (ARN bicatenario). En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un ARNip (ARN interferente corto). En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un ARNsh (ARN corto de horquilla). En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un miARN (micro ARN). Los micro ARN (miARN) son ARN no codificantes codificados genómicamente de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud que ayudan a regular la expresión génica, particularmente durante el desarrollo. Ver, por ejemplo, Bartel, 2004, Cell, 116: 281; Novina y Sharp, 2004, Nature, 430: 161; y la publicación de patente de EE.UU. 2005/0059005; también revisado en Wang y Li, 2007, Front. Biosci., 12: 3975; y Zhao, 2007, Trends Biochem. Sci., 32: 189. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es un ARN antisentido.

[0123] En ciertas realizaciones, el polinucleótido puede proporcionarse como un agente antisentido o interferencia de ARN (ARNi). Véase, por ejemplo, Fire et al., Nature 391: 806-811, 1998. La terapia antisentido está destinada a incluir, por ejemplo, administración o suministro *in situ* de oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios o sus derivados que hibridan específicamente, por ejemplo, se unen, en condiciones celulares, con ARNm celular y/o ADN genómico, o mutantes de los mismos, para inhibir la expresión de la proteína codificada, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. Véase, por ejemplo, Crooke "Molecular mechanisms of action of antisense drugs" Biochim. Biophys. Acta 1489 (1): 31-44, 1999; Crooke "Evaluating the mechanism of action of antiproliferative antisense drugs" Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 10(2):123-126, discussion 127, 2000; Methods in Enzymology volúmenes 313-314, 1999. La unión puede ser por complementariedad de pares de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unión a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice (es decir, la formación de triple hélice). Ver, por ejemplo, Chan et al., J. Mol. Medicina. 75 (4): 267-282, 1997.

[0124] En algunas realizaciones, el ARNs, ARNs, ARNsh, ARNm, ARN antisentido y/o ARNi pueden diseñarse y/o predecirse usando uno o más de un gran número de algoritmos para dar solo algunos ejemplos, los siguientes recursos pueden utilizarse para diseñar y/o predecir polinucleótidos: algoritmos encontrados en Alnylum Online, Dharmacon Online, OligoEngine Online, Molecula Online, Ambion Online, BioPredsi Online, RNAi Web Online, Chang Bioscience Online, Invitrogen Online, LentiWeb Online GenScript Online, Protocol Online; Reynolds et al., 2004, Nat. Biotechnol., 22: 326; Naito et al., 2006, Nucleic Acids Res., 34: W448; Li et al., 2007, RNA, 13: 1765; Yiu et al., 2005, Bioinformatics, 21: 144; y Jia et al., 2006, BMC Bioinformatics, 7: 271.

[0125] Los polinucleótidos pueden ser de cualquier tamaño o secuencia, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. En ciertas realizaciones, el polinucleótido tiene más de 100 pares de bases de largo. En ciertas realizaciones, el polinucleótido es mayor de 1000 pares de bases de largo y puede ser mayor de 10.000 pares de bases de largo. El polinucleótido puede proporcionarse por cualquier medio conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el polinucleótido ha sido diseñado usando técnicas recombinantes. Véanse, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1999); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989). El polinucleótido también puede obtenerse de fuentes naturales y purificarse a partir de componentes contaminantes que se encuentran normalmente en la naturaleza. El polinucleótido también puede sintetizarse químicamente en un laboratorio. En ciertas realizaciones, el polinucleótido se sintetiza usando química estándar en fase sólida.

[0126] El polinucleótido puede modificarse por medios químicos o biológicos. En ciertas realizaciones, estas

modificaciones conducen a una mayor estabilidad del polinucleótido. Las modificaciones incluyen metilación, fosforilación, finalización de la tapa, etc.

ARNm

[0127] La presente invención se puede usar para administrar cualquier ARNm. El ARNm generalmente se considera el tipo de ARN que transporta información desde el ADN al ribosoma. La existencia de ARNm suele ser muy breve e incluye procesamiento y traducción, seguido de degradación. Típicamente, en organismos eucariotas, el procesamiento de ARNm comprende la adición de una "tapa" en el extremo N-terminal(5') y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). Una tapa típica es una tapa de 7-metilguanosina, que es una guanosina que está unida a través de un enlace 5'-5'-trifosfato al primer nucleótido transcrito. La presencia de la tapa es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. La cola es típicamente un evento de poliadenilación por el cual se agrega un resto de poliadenilo al extremo 3' de la molécula de ARNm. La presencia de esta "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de exonucleasa. El ARN mensajero generalmente se traduce por los ribosomas en una serie de aminoácidos que forman una proteína.

[0128] Cualquier ARNm capaz de traducirse en uno o más péptidos (por ejemplo, proteínas) o fragmentos de péptidos se contempla dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un ARNm codifica uno o más péptidos naturales. En algunas realizaciones, un ARNm codifica uno o más péptidos modificados o no naturales.

[0129] En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína intracelular. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína citosólica. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína asociada con el citoesqueleto de actina. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína asociada con la membrana plasmática. En algunas realizaciones específicas, un ARNm codifica una proteína transmembrana. En algunas realizaciones específicas, un ARNm codifica una proteína del canal iónico. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína perinuclear. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína nuclear. En algunas realizaciones específicas, un ARNm codifica un factor de transcripción. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína chaperona. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una enzima intracelular (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima asociada con el ciclo de la urea o trastornos metabólicos de almacenamiento lisosómico). En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína implicada en el metabolismo celular, reparación del ADN, transcripción y/o traducción. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína extracelular. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína asociada con la matriz extracelular. En algunas realizaciones, un ARNm codifica una proteína secretada. En realizaciones específicas, un ARNm usado en la composición y los métodos pueden usarse para expresar proteínas o enzimas funcionales que son excretadas o secretadas por una o más células diana en el fluido extracelular circundante (por ejemplo, hormonas que codifican ARNm y/o neurotransmisores).

Síntesis de ARNm

[0130] ARNm de acuerdo con la presente invención puede ser sintetizado de acuerdo con cualquiera de una variedad de métodos conocidos. Por ejemplo, los ARNm de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse mediante transcripción *in vitro* (IVT). Brevemente, IVT se lleva a cabo típicamente con una plantilla de ADN lineal o circular que contiene un promotor, una reserva de trifosfatos de ribonucleótidos, un sistema tampón que puede incluir la TDT y los iones de magnesio, y una ARN apropiada de la polimerasa (por ejemplo, polimerasa ARN T3, T7 o SP6), ADNsa I, pirofosfatasa y/o inhibidor de ARNasa. Las condiciones exactas variarán según la aplicación específica.

[0131] En algunas realizaciones, para la preparación de ARNm según la invención, se transcribe una plantilla de ADN *in vitro*. Una plantilla de ADN adecuada tiene típicamente un promotor, por ejemplo un promotor T3, T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, seguido de la secuencia de nucleótidos deseada para el ARNm deseado y una señal de terminación.

[0132] Secuencia(s) de ARNm deseado de acuerdo con la invención se puede determinar y se incorporan en una plantilla de ADN usando métodos estándar. Por ejemplo, a partir de una secuencia de aminoácidos deseada (p. ej., una secuencia enzimática), se realiza una traducción inversa virtual basada en el código genético degenerado. Los algoritmos de optimización pueden usarse luego para la selección de codones adecuados. Por lo general, el contenido de G/C se puede optimizar para lograr el mayor contenido de G/C posible, por un lado, teniendo en cuenta la mejor frecuencia posible de los ARNt según el uso de codones, por otro lado. La secuencia de ARN optimizada puede establecerse y visualizarse, por ejemplo, con la ayuda de un dispositivo de visualización apropiado y compararse con la secuencia original (tipo salvaje). También se puede analizar una estructura secundaria para calcular las propiedades estabilizadoras y desestabilizadoras o, respectivamente, las regiones del ARN.

ARNm modificado

[0133] En algunas realizaciones, el ARNm de acuerdo con la presente invención puede sintetizarse como ARNm no modificado o modificado. Típicamente, los ARNm se modifican para mejorar la estabilidad. Las modificaciones del ARNm pueden incluir, por ejemplo, modificaciones de los nucleótidos del ARN. Por lo tanto, un ARNm modificado según la invención puede incluir, por ejemplo, modificaciones del esqueleto, modificaciones del azúcar o

modificaciones de la base. En algunas realizaciones, los ARNm pueden sintetizarse a partir de nucleótidos y/o análogos de nucleótidos naturales (nucleótidos modificados) que incluyen, entre otros, purinas (adenina (A), guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C), uracilo (U)), y como análogos de nucleótidos modificados o derivados de purinas y pirimidinas, tales como, por ejemplo, 1-metil-adenina, 2-metil-adenina, 2-metil-N-6-isopentenil-adenina, N6-metil-adenina, N6-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metil-citosina, 4-acetil-citosina, 5-metil-citosina, 2,6-diaminopurina, 1-metil-guanina, 2-metil-guanina, 2,2-dimetil-guanina, 7-metil-guanina, inosina, 1-metil-inosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidro-uracilo, 2-tio-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, 5-metil-2-tio-uracilo, 5-metil-uracilo, éster metílico del N-uracilo-5-ácido oxiacético, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tio-uracilo, 5'-metoxicarbonilmetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, éster metílico del uracilo-5-ácido oxiacético, uracilo-5-ácido oxiacético (v), 1-metil-pseudouracilo, queosina, β -D-manosil-queosina, wibutosina, y fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, 7-deazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. La preparación de tales análogos es conocida por un experto en la materia, por ejemplo, de la patente de EE.UU. N° 4,373,071, la patente de EE.UU. N° 4,401,796, la patente de EE.UU. 4,415,732, la patente de EE.UU. N° 4,458,066, la patente de EE.UU. N° 4,500,707, la patente de EE.UU. 4,668,777, la patente de EE.UU. N° 4,973,679, la patente de los EE.UU. N° 5,047,524, la patente de EE.UU. N° 5,132,418, la patente de EE.UU. 5,153,319, la patente de EE.UU. N° 5,262,530 y 5,700,642.

[0134] En algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, ARNm que codifican enzimas) pueden contener modificaciones de la cadena principal de ARN. Típicamente, una modificación del esqueleto es una modificación en la cual los fosfatos del esqueleto de los nucleótidos contenían en el ARN se modifican químicamente. Las modificaciones ejemplares de la columna vertebral típicamente incluyen, pero no se limitan a, modificaciones del grupo que consiste en metilfosfonatos, metilfosforamidatos, fosforamidatos, fosforotioatos (por ejemplo, citidina 5'-O-(1-tiofosfato)), boranofosfatos, grupos de guanidinio cargados positivamente, etc., que significa mediante la sustitución del enlace fosfodiéster por otros grupos aniónicos, catiónicos o neutros.

[0135] En algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, ARNm que codifican enzimas) pueden contener modificaciones de azúcar. Una modificación de azúcar típica es una modificación química del azúcar de los nucleótidos que contiene, incluidas, entre otras, modificaciones de azúcar elegidas del grupo que consiste en 2'-desoxi-2'-fluoro-oligoribonucleótido (2'-fluoro-2'-desoxicidina 5'-trifosfato, 2'-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-desoxi-2'-desamina-oligoribonucleótido (2'-amino-2'-desoxicidina 5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-O-alquiloligoribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alquiloligoribonucleótido (2'-O-metilcidina 5'-trifosfato, 2'-metiluridina 5'-trifosfato), 2'-C-alquiloligoribonucleótido y sus isómeros (2'-aracitidina 5'-trifosfato, 2'-arauridina 5'-trifosfato) o azidotrifosfatos (2'-azido-2'-desoxicidina 5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato).

[0136] En algunas realizaciones, los ARNm (p. ej., enzimas que codifican ARNm) pueden contener modificaciones de las bases de los nucleótidos (modificaciones de bases). Un nucleótido modificado que contiene una modificación de base también se denomina nucleótido modificado de base. Los ejemplos de dichos nucleótidos modificados en base incluyen, pero no se limitan a, 2-amino-6-cloropurina ribosida 5'-trifosfato, 2-aminoadenosina 5'-trifosfato, 2-tiocitidina 5'-trifosfato, 2-tiouridina 5'-trifosfato, 4-tiouridina 5'-trifosfato, 5-aminoallicitidina 5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina 5'-trifosfato, 5-bromocitidina 5'-trifosfato, 5-bromouridina 5'-trifosfato, 5-yodocitidina 5'-trifosfato, 5-yodouridina 5'-trifosfato, 5-metilcitidina 5'-trifosfato, 5-metiluridina 5'-trifosfato, 6-azacitidina 5'-trifosfato, 6-azauridina 5'-trifosfato, 6-cloropurina ribosida 5'-trifosfato, 7-deazaadenosina 5'-trifosfato, 7-deazaguanosina 5'-trifosfato, 8-azaadenosina 5'-trifosfato, 8-azidoadenosina 5'-trifosfato, bencimidazol ribosida 5'-trifosfato, N1-metiladenosina 5'-trifosfato, N1-metilguanosina 5'-trifosfato, N6-metiladenosina 5'-trifosfato, O6-metilguanosina 5'-trifosfato, pseudouridina 5'-trifosfato, puomicina 5'-trifosfato o xantosina 5'-trifosfato.

Estructura de tapa

[0137] Típicamente, la síntesis de ARNm incluye la adición de una "tapa" en el extremo N-terminal(5') y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). La presencia de la tapa es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. La presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de exonucleasa.

[0138] Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, ARNm que codifican enzimas) incluyen una estructura de tapa 5'. Una tapa 5' se agrega típicamente de la siguiente manera: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; luego se agrega trifosfato de guanosina (GTP) a los fosfatos terminales a través de una guanilil transferasa, produciendo un enlace trifosfato 5'5'; y el 7-nitrógeno de guanina es luego metilado por una metiltransferasa. Los ejemplos de estructuras de tapa incluyen, pero no se limitan a, m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G).

[0139] En algunas realizaciones, las estructuras de tapa de origen natural comprenden una 7-metil guanosina que está unida a través de un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, lo que da como resultado una tapa de dinucleótido de m7G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. *In vivo*, la tapa se agrega enzimáticamente. La tapa se agrega en el núcleo y es catalizada por la enzima guanilil transferasa. La adición de la tapa al extremo 5' terminal del ARN ocurre inmediatamente después del inicio de la transcripción. El nucleósido terminal es típicamente una guanosina, y está en la orientación inversa a todos los otros nucleótidos, es decir, G(5')ppp(5')GpNpNp.

[0140] Una tapa común para ARNm producido por transcripción *in vitro* es m⁷G(5')ppp(5')G, que se ha utilizado como la tapa del dinucleótido en la transcripción con polimerasa ARN T7 o SP6 *in vitro* para obtener ARN que tienen una estructura de tapa en sus extremos 5'. El método prevalente para la síntesis *in vitro* de ARNm protegido emplea un dinucleótido preformado de la forma m⁷G(5')ppp(5')G("m⁷GpppG") como iniciador de la transcripción.

[0141] Hasta la fecha, una forma habitual de una tapa de dinucleótido sintética utilizada en experimentos de traducción *in vitro* es el análogo de tapa anti-inversa ("ARCA") o ARCA modificado, que generalmente es un análogo de tapa modificado en el que el grupo OH 2' o 3' se reemplaza con -OCH₃.

[0142] Los análogos de tapa adicionales incluyen, pero no se limitan a, estructuras químicas seleccionadas del grupo que consiste en m⁷GpppG, m⁷GpppA, m⁷GpppC; análogos de tapa no metilados (por ejemplo, GpppG); análogo de tapa dimetilada (p. ej., m^{2,7}GpppG), análogo de tapa trimetilada (p. ej., m^{2,2,7}GpppG), análogos de tapa simétrica dimetilada (p. ej., m⁷Gpppm⁷G) o análogos de tapa anti inversa (p. ej., ARCA; m^{7,2}OmeGpppG, m^{7,2d}GpppG, m^{7,3}OmeGpppG, m^{7,3d}GpppG y sus derivados de tetrafosfato) (ver, por ejemplo, Jemielity, J. et al. "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

[0143] En algunas realizaciones, una tapa adecuada es un 7-metil guanilato ("m 7 G") unido a través de un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, dando como resultado m⁷G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. Una realización preferida de la tapa am 7 G utilizada en las realizaciones de la invención es m⁷G(5')ppp(5')G.

[0144] En algunas realizaciones, la tapa es una estructura Tapa0. Las estructuras Tapa0 carecen de un residuo 2'-O-metilo de la ribosa unida a las bases 1 y 2. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura Tapa1. Las estructuras Tapa1 tienen un residuo 2'-O-metilo en la base 2. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura Tapa2. Estructuras Tapa2 tienen un residuo 2'-O-metilo unido a ambas bases 2 y 3.

[0145] Una variedad de análogos de tapa m⁷G son conocidos en la técnica, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos incluyen el m⁷GpppG descrito anteriormente, así como los análogos de la tapa ARCA 3'-OCH₃ y 2'-OCH₃ (Jemielity, J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Los análogos de tapa adicionales para su uso en realizaciones de la invención incluyen análogos de tetrafosfato de dinucleósido bencilado N7 (descritos en Grudzien, E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004)), análogos de tapa de fosforotioato (descritos en Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007)), y análogos de tapa (incluidos los análogos de tapa biotinilados) descritos en las patentes de los Estados Unidos N^{os} 8,093,367 y 8,304,529.

Estructura de la cola

[0146] Típicamente, la presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de la exonucleasa. Se cree que la cola poli A estabiliza los mensajeros naturales y el ARN sentido sintético. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se puede agregar una larga cola poli A a una molécula de ARNm, lo que hace que el ARN sea más estable. Las colas Poli A se pueden agregar utilizando una variedad de técnicas reconocidas por la técnica. Por ejemplo, se pueden agregar largas colas de poli A al ARN transcrito sintético o *in vitro* utilizando la polimerasa de poli A (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas poli A largas. Además, se pueden agregar colas de poli A por transcripción directamente de productos de PCR. El poli A también puede ligarse al extremo 3' de un ARN sentido con ARN ligasa (véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2^a Ed., Ed. Por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991)).

[0147] En algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, ARNm que codifican enzimas) incluyen una estructura de cola de poli(A) 3'. Típicamente, la longitud de la cola poli A puede ser de al menos aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400 al menos 500 nucleótidos. En algunas realizaciones, una cola poli-A en el extremo 3' del ARNm típicamente incluye aproximadamente 10 a 300 nucleótidos de adenosina (por ejemplo, aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de adenosina, o aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de adenosina). En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una estructura de cola de poli(C) 3'. Una cola de poli-C adecuada en el extremo 3' del ARNm típicamente incluye aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de citosina (por ejemplo, aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de citosina, aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de citosina, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de citosina, o aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de citosina). La cola poli-C puede agregarse a la cola poliA o puede sustituir la cola poli-A.

[0148] En algunas realizaciones, la longitud de la cola poli A o poli-C se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm de sentido modificado de la invención y, por lo tanto, la transcripción de proteínas. Por ejemplo, dado que la longitud de la cola poli A puede influir en la vida media de una molécula de ARNm de detección, la longitud de la cola poli A se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm a las nucleasas y, por lo tanto, controlar el curso del tiempo de expresión de polinucleótidos y/o producción de polipéptidos en una célula diana.

Región no traducida 5' y 3'

5 **[0149]** En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una región no traducida 5' y/o 3'. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' incluye uno o más elementos que afectan la estabilidad o traducción de un ARNm, por ejemplo, un elemento sensible al hierro. En algunas realizaciones, una región 5' no traducida puede tener entre aproximadamente 50 y 500 nucleótidos de longitud.

10 **[0150]** En algunas realizaciones, una región no traducida 3' incluye una o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para proteínas que afectan la estabilidad de ubicación de un ARNm en una célula, o uno o más sitios de unión para ARNm. En algunas realizaciones, una región 3' no traducida puede tener entre 50 y 500 nucleótidos de longitud o más.

15 **[0151]** Secuencias ejemplares 3' y/o 5' UTR se pueden derivar de moléculas de ARNm que son estables (por ejemplo, globina, actina, GAPDH, tubulina, las enzimas histona, o ciclo del ácido cítrico) para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido. Por ejemplo, una secuencia 5' UTR puede incluir una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano 1 (IE1), o un fragmento del mismo para mejorar la resistencia a la nucleasa y/o mejorar la vida media del polinucleótido. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humano (hGH), o un fragmento de la misma en el extremo 3' o región no traducida del polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para estabilizar aún más el polinucleótido. Generalmente, estas modificaciones mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (p. ej., la vida media) del polinucleótido en relación con sus contrapartes no modificadas, e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de dichos polinucleótidos a la digestión de nucleasa *in vivo*.

25 **[0152]** Según diversas realizaciones, cualquier tamaño de ARNm puede encapsularse mediante liposomas proporcionados. En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados pueden encapsular ARNm de más de aproximadamente 0,5 kb, 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb o 5 kb de longitud.

Liposomas

30 **[0153]** Los liposomas para usar en las composiciones proporcionadas pueden prepararse mediante diversas técnicas que se conocen actualmente en la técnica. Por ejemplo, las vesículas multilamelares (MLV) pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales, como depositar un lípido seleccionado en la pared interior de un recipiente o recipiente adecuado disolviendo el lípido en un disolvente apropiado y luego evaporando el disolvente para dejar una película delgada en el interior del recipiente o por secado por pulverización. Luego se puede agregar una fase acuosa al recipiente con un movimiento de vórtice que da como resultado la formación de MLV. Las vesículas unilamelares (ULV) se pueden formar por homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilamelares. En adición, las vesículas unilaminares se pueden formar mediante técnicas de eliminación de detergente.

40 **[0154]** En ciertas realizaciones, las composiciones proporcionadas comprenden un liposoma en el que un agente, tal como un ácido nucleico, por ejemplo, ARNm, está asociado tanto en la superficie del liposoma como encapsulado dentro del mismo liposoma. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los liposomas catiónicos pueden asociarse con el ARNm a través de interacciones electrostáticas. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los liposomas catiónicos pueden asociarse con el ARNm a través de interacciones electrostáticas.

50 **[0155]** En algunas realizaciones, las composiciones y métodos comprenden ARNm encapsulado en un liposoma. En algunas realizaciones, la una o más especies de ARNm pueden encapsularse en el mismo liposoma. En algunas realizaciones, la una o más especies de ARNm pueden encapsularse en diferentes liposomas. En algunas realizaciones, el ARNm está encapsulado en uno o más liposomas, que difieren en su composición lipídica, relación molar de componentes lipídicos, tamaño, carga (potencial Zeta), ligandos dirigidos y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el uno o más liposomas pueden tener una composición diferente de lípidos catiónicos, lípidos neutros, lípidos modificados con PEG y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el uno o más liposomas pueden tener una relación molar diferente de lípidos catiónicos, lípidos neutros, colesterol y lípidos modificados con PEG utilizados para crear el liposoma.

60 **[0156]** El proceso de incorporación de un agente terapéutico deseado, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm), en un liposoma a menudo se denomina "carga". Se describen métodos ejemplares en Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992. Los ácidos nucleicos incorporados en liposomas pueden estar total o parcialmente ubicados en el espacio interior del liposoma, dentro de la membrana de la bicapa del liposoma., o asociado con la superficie exterior de la membrana del liposoma. La incorporación de un ácido nucleico en los liposomas también se denomina en el presente documento "encapsulación" en la que el ácido nucleico está completamente contenido dentro del espacio interior del liposoma. El propósito de incorporar un ARNm en un vehículo de transferencia, como un liposoma, a menudo es proteger el ácido nucleico de un entorno que puede contener enzimas o productos químicos que degradan los ácidos nucleicos y/o sistemas o receptores que causan la rápida excreción del núcleo. ácidos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un vehículo de suministro adecuado es capaz de mejorar la estabilidad del

ARNm contenido en él y/o facilitar el suministro de ARNm a la célula o tejido diana.

Tamaño de liposoma

5 **[0157]** Los liposomas adecuados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse en varios tamaños. En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados pueden hacerse más pequeños que los liposomas encapsulantes de ARNm previamente conocidos. En algunas realizaciones, la disminución del tamaño de los liposomas se asocia con un suministro más eficiente de ARNm. La selección de un tamaño de liposoma apropiado puede tener en cuenta el sitio de la célula o tejido diana y, en cierta medida, la aplicación para la que se realiza el liposoma.

10 **[0158]** En algunas realizaciones, se selecciona un tamaño apropiado de liposoma para facilitar la distribución sistémica del anticuerpo codificado por el ARNm. En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar la transfección del ARNm a ciertas células o tejidos. Por ejemplo, para apuntar a los hepatocitos, un liposoma puede dimensionarse de tal manera que sus dimensiones sean más pequeñas que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; en tales casos, el liposoma podría penetrar fácilmente tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana.

15 **[0159]** Alternativa o adicionalmente, un liposoma puede ser dimensionado de tal manera que las dimensiones del liposoma sean de un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en ciertas células o tejidos. Por ejemplo, un liposoma puede tener un tamaño tal que sus dimensiones sean más grandes que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos para limitar así la distribución de los liposomas a los hepatocitos.

20 **[0160]** En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño de menos de aproximadamente 500 nm, 450 nm, 400 nm, 350 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 125 nm, 110 nm, 100 nm, 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm o 50 nm. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño no mayor de aproximadamente 250 nm (por ejemplo, no mayor de aproximadamente 225 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm o 50 nm). En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño que varía de aproximadamente 10 - 250 nm (por ejemplo, que varía de aproximadamente 10 - 225 nm, 10 - 200 nm, 10 - 175 nm, 10 - 150 nm, 10 - 125 nm, 10 - 100 nm, 10-75 nm o 10-50 nm). En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño que varía de aproximadamente 100 - 250 nm (por ejemplo, que varía de aproximadamente 100 - 225 nm, 100 - 200 nm, 100 - 175 nm, 100 - 150 nm). En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño que varía de aproximadamente 10 a 100 nm (por ejemplo, que varía de aproximadamente 10 a 90 nm, 10 a 80 nm, 10 a 70 nm, 10 a 60 nm o 10 a 50 nm).

25 **[0161]** Una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica están disponibles para dimensionar una población de liposomas. Uno de estos métodos de dimensionamiento se describe en la patente de EE.UU. N° 4,737,323. La sonicación de una suspensión de liposomas, ya sea por baño o sonda, produce una reducción progresiva del tamaño hasta un ULV pequeño de menos de aproximadamente 0,05 micras de diámetro. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de corte para fragmentar los liposomas grandes en pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, los MLV se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micras. El tamaño de los liposomas se puede determinar mediante dispersión de luz cuasi-eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421-150 (1981). El diámetro medio de los liposomas puede reducirse mediante sonicación de los liposomas formados. Los ciclos de sonicación intermitente pueden alternarse con la evaluación QELS para guiar la síntesis eficiente de liposomas.

Composiciones farmacéuticas

30 **[0162]** Para facilitar la administración de un agente, como un ácido nucleico, por ejemplo, ARNm, y/o la expresión de ARNm *in vivo*, los vehículos de administración como los liposomas pueden formularse en combinación con uno o más ácidos nucleicos adicionales, vehículos, dirigidos a ligandos o reactivos estabilizadores, o en composiciones farmacológicas donde se mezcla con excipientes adecuados. Las técnicas para la formulación y administración de medicamentos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., Última edición.

35 **[0163]** Los agentes encapsulados en liposomas proporcionados, tales como un ácido nucleico, por ejemplo, ARNm y composiciones que contienen el mismo, se pueden administrar y dosificar de acuerdo con la práctica médica actual, teniendo en cuenta la condición clínica del sujeto, el sitio y el método de administración, la programación de la administración, la edad del sujeto, el sexo, el peso corporal y otros factores relevantes para los clínicos de habilidad ordinaria en la técnica. La "cantidad efectiva" para los fines del presente documento puede determinarse mediante las consideraciones relevantes que conocen los expertos en investigación clínica experimental, artes farmacológicas, clínicas y médicas. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es efectiva para lograr al menos cierta estabilización, mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas de progreso, regresión o mejora de la enfermedad por parte de los expertos en la materia. Por ejemplo, una cantidad adecuada y un régimen de dosificación es uno que causa al menos la producción transitoria de proteínas (*p. ej.*,

enzimas).

[0164] Las vías adecuadas de administración incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, vaginal, transmucosal, pulmonar incluyendo intratraqueal o de inhalación, o intestinal; administración parenteral, incluidas las inyecciones intradérmica, transdérmica (tópica), intramuscular, subcutánea, intramedular, así como la administración intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal y/o intranasal.

[0165] Alternativamente o adicionalmente, los agentes encapsulados en liposomas, tales como un ácido nucleico, por ejemplo, ARNm y composiciones de la invención pueden administrarse de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en un tejido diana, preferiblemente en una formulación de liberación sostenida. La administración local puede verse afectada de varias maneras, dependiendo del tejido a ser dirigido. Por ejemplo, las composiciones que contienen aerosoles de la presente invención pueden inhalarse (para administración nasal, traqueal o bronquial); las composiciones de la presente invención pueden inyectarse en el sitio de lesión, manifestación de enfermedad o dolor, por ejemplo; las composiciones se pueden proporcionar en pastillas para aplicación oral, traqueal o esofágica; puede suministrarse en forma de líquido, tableta o cápsula para administración al estómago o intestinos, puede suministrarse en forma de supositorio para aplicación rectal o vaginal; o incluso puede administrarse al ojo mediante el uso de cremas, gotas o incluso inyecciones. Las formulaciones que contienen composiciones proporcionadas complejadas con moléculas terapéuticas o ligandos pueden incluso administrarse quirúrgicamente, por ejemplo en asociación con un polímero u otra estructura o sustancia que puede permitir que las composiciones se difundan desde el sitio de implantación a las células circundantes. Alternativamente, se pueden aplicar quirúrgicamente sin el uso de polímeros o soportes.

[0166] En algunas realizaciones, los liposomas y/o composiciones proporcionadas se formulan de manera que sean adecuadas para la liberación prolongada del agente, por ejemplo, ARNm contenido en el mismo. Dichas composiciones de liberación prolongada pueden administrarse convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación prolongados. Por ejemplo, en una realización, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En una realización preferida, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces por semana, una vez por semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, o más preferiblemente cada cuatro semanas, una vez al mes, cada seis semanas, cada ocho semanas, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses, cada ocho meses, cada nueve meses o anualmente. También se contemplan composiciones y liposomas que se formulan para la administración de depósito (por ejemplo, intramuscularmente, subcutáneamente, intravítreamente) para administrar o liberar un ARNm durante períodos prolongados de tiempo. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones realizadas en el ARNm para mejorar la estabilidad.

[0167] También se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden uno o más de los liposomas descritos en este documento y métodos relacionados para el uso de tales composiciones como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2012/041663, presentada el 8 de junio de 2012 Publ. N° WO 2012/170889. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas según la invención pueden reconstituirse antes de la administración o pueden reconstituirse *in vivo*. Por ejemplo, una composición farmacéutica liofilizada puede formularse en una forma de dosificación apropiada (por ejemplo, una forma de dosificación intradérmica tal como un disco, varilla o membrana) y administrarse de modo que la forma de dosificación se rehidrate a lo largo del tiempo *in vivo* por los fluidos corporales del individuo.

[0168] Los liposomas y composiciones proporcionadas se pueden administrar a cualquier tejido deseado. En algunas realizaciones, el agente, por ejemplo, ARNm administrado por liposomas o composiciones proporcionadas se expresa en el tejido en el que se administraron los liposomas y/o composiciones. En algunas realizaciones, el ARNm administrado se expresa en un tejido diferente del tejido en el que se administraron los liposomas y/o composiciones. Los tejidos ejemplares en los que se puede administrar y/o expresar ARNm administrado incluyen, pero no se limitan al hígado, riñón, corazón, bazo, suero, cerebro, músculo esquelético, ganglios linfáticos, piel y/o líquido cefalorraquídeo.

[0169] De acuerdo con diversas realizaciones, el momento de expresión de los agentes administrados, por ejemplo, ARNm, puede ajustarse para adaptarse a una necesidad médica particular. En algunas realizaciones, la expresión de la proteína codificada por el ARNm administrado es detectable 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 y/o 72 horas en suero o tejidos diana después de una única administración de liposomas o composiciones proporcionadas. En algunas realizaciones, la expresión de la proteína codificada por el ARNm es detectable 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y/o 7 días en suero o tejidos diana después de una única administración de liposomas proporcionados o composiciones. En algunas realizaciones, la expresión de la proteína codificada por el ARNm es detectable 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y/o 4 semanas en suero o tejidos diana después de una administración única de liposomas o composiciones proporcionadas. En algunas realizaciones, la expresión de la proteína codificada por el ARNm es detectable después de un mes o más después de una única administración de liposomas o composiciones proporcionadas.

65 EJEMPLOS

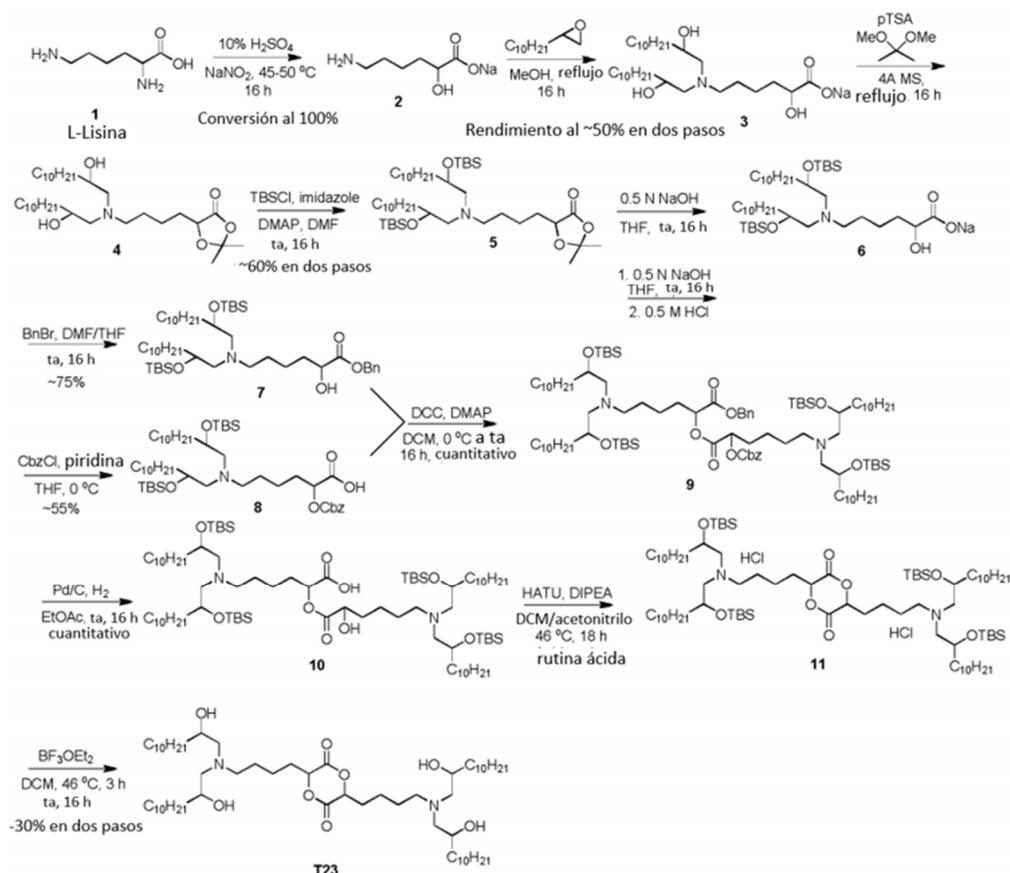
[0170] Si bien ciertos compuestos, composiciones y métodos se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos de la invención y no pretenden limitarlos.

Ejemplo 1 Síntesis de compuestos de fórmula I

A. Los compuestos de fórmula I, tales como T23 (el compuesto de fórmula III), se pueden hacer de acuerdo con la ruta mostrada en el Esquema 1:

[0171]

Esquema 1

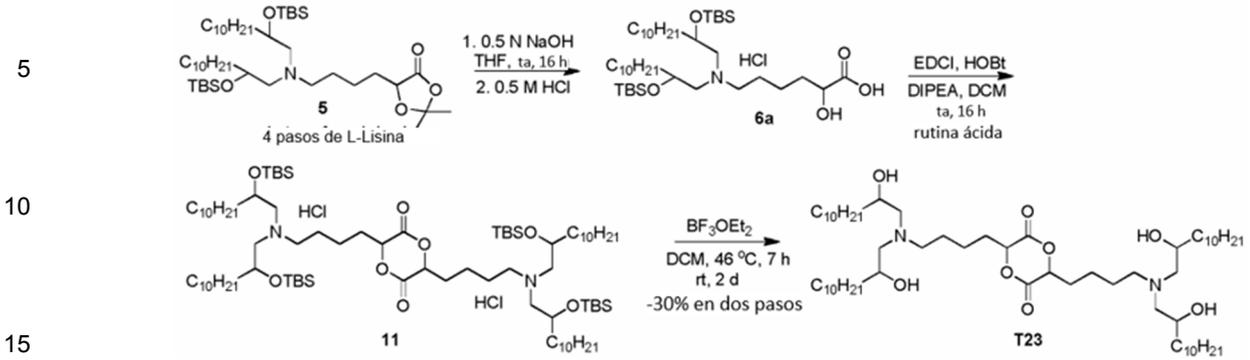


[0172] Como se muestra en el Esquema 1, los compuestos ejemplares de fórmula I se preparan a partir de L-lisina 1. La L-lisina se convierte primero, a través de nitrito de sodio y ácido sulfúrico, en un Intermedio del 6-amino-2-ácido hidroxihexanoico, que se trata con dos equivalentes de 2-deciloxirano para proporcionar el ácido 6-(bis(2-hidroxidodecil)amino)-2-hidroxihexanoico 3, cuya funcionalidad alfa-hidroxiácido está protegida con 2,2-dimetoxipropano para producir 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ona 4. La protección de los alcoholes secundarios y la desprotección de la funcionalidad alfa-hidroxiácido de 5 produce ácido 2-hidroxihexanoico 6. Ácido 2-hidroxihexanoico 6 se divide en dos porciones equivalentes, una de las cuales se convierte en alcohol protegido con bencilo 7 y la otra se convierte en ácido protegido con Cbz 8. El alcohol 7 y el ácido 8 se esterifican usando protocolos de acoplamiento estándar para producir el éster 9. La hidrogenación posterior para eliminar los grupos protectores proporciona el ácido libre 10, que se acopló intramolecularmente para proporcionar el precursor de lactona 11. El paso final requirió la eliminación mediada por boro de los grupos protectores de TBS produce el compuesto objetivo final T23 (Compuesto de Fórmula III).

B. De manera similar, T23 (el compuesto de fórmula III) se puede hacer de acuerdo con la ruta mostrada en el Esquema 2:

[0173]

Esquema 2

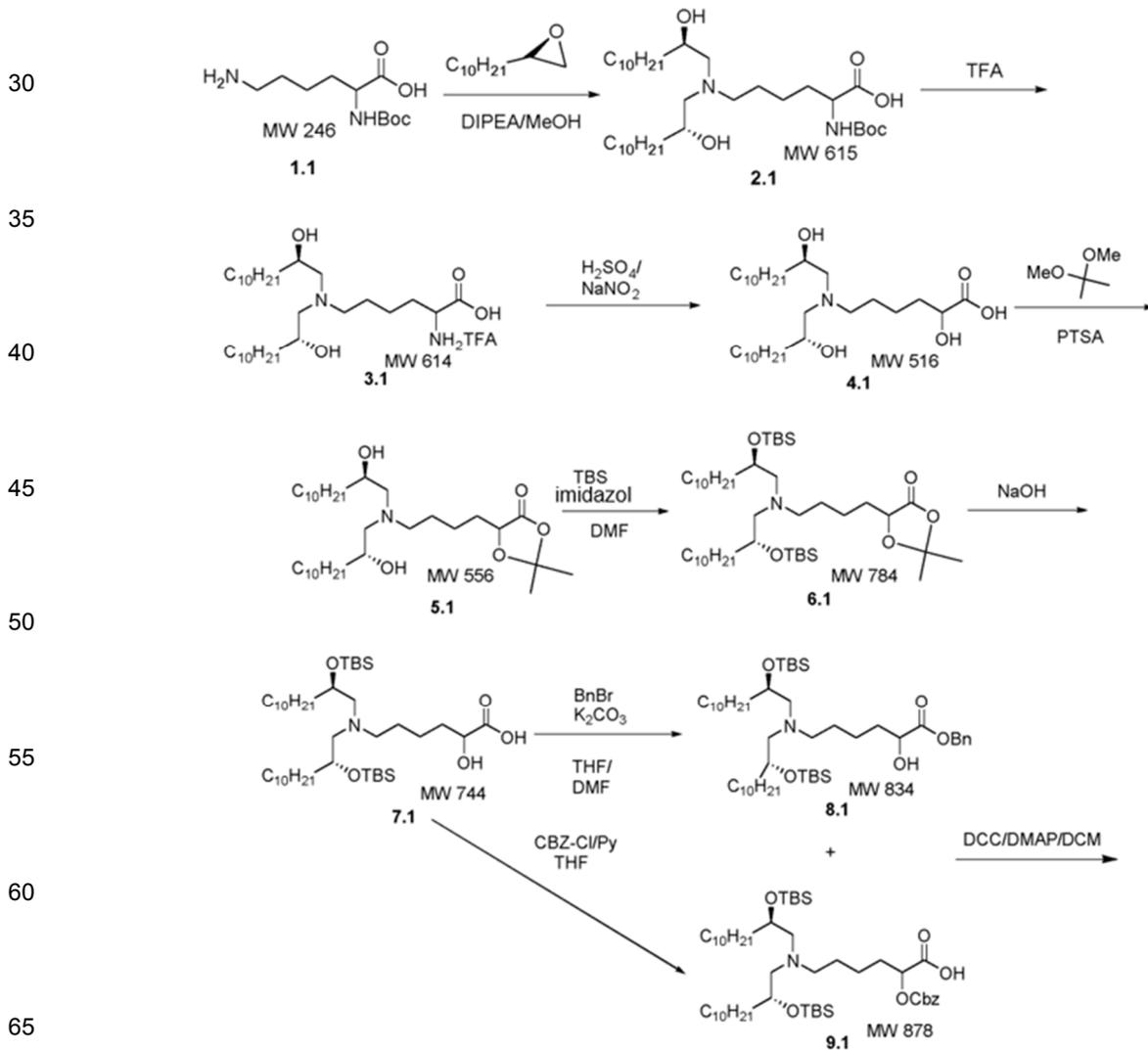


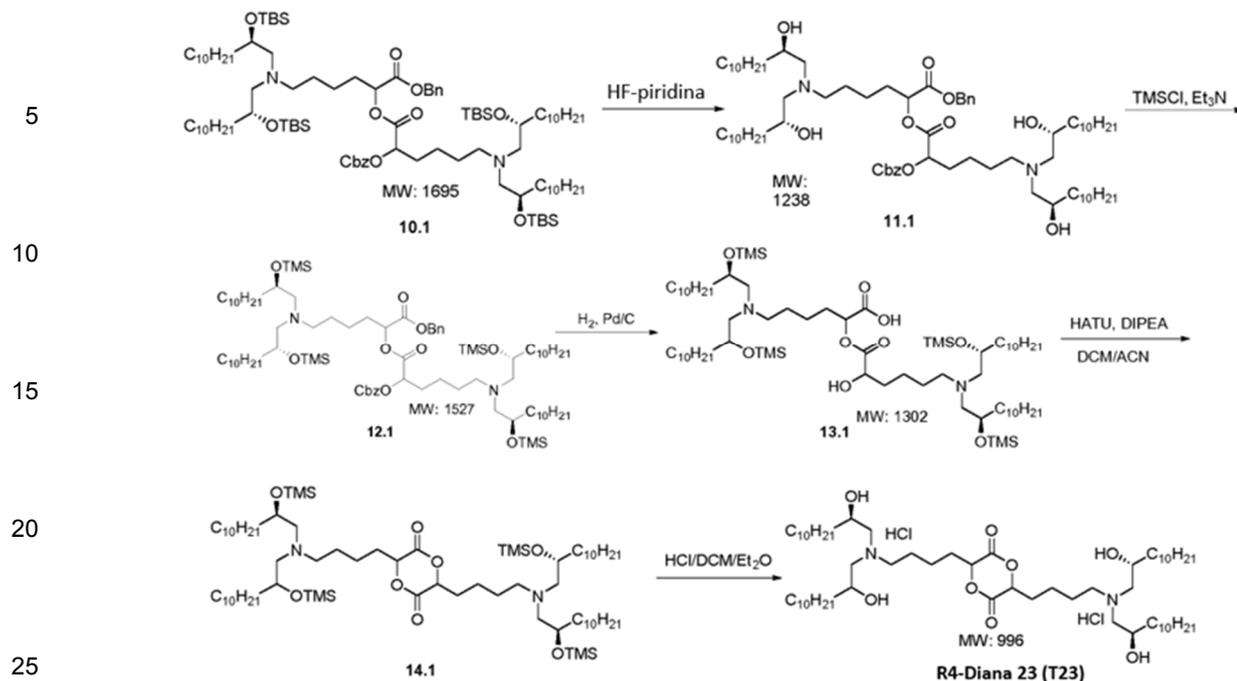
[0174] Como se muestra en Esquema 2, se logró una ruta corta para lograr T23 explotando la ciclación intermolecular directa del α -hidroxiácido libre **6a** para formar el precursor de lactona **11**. Al finalizar, la eliminación idéntica mediada por boro de los grupos TBS proporcionó el compuesto de Fórmula III, **T23**.

C. T23 se puede también hacer de acuerdo con la ruta mostrada en el Esquema 3:

[0175]

Esquema 3





Síntesis del compuesto 2.1

30 **[0176]** A una mezcla de Boc-Lys-OH (18 g, 73 mmol) y DIPEA (16 ml) en metanol (216 ml) a temperatura ambiente se añadió (2S)-1,2-epoxidodecano (40 g, 219 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche. La solución transparente de color amarillo claro se concentró para dar un aceite amarillo, que se mezcló con THF (120 ml), agua (100 ml) e hidróxido de litio (6 g, 250 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se extrajo luego con diclorometano/metanol (9: 1, 500 ml x 4). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄. La filtración y la concentración dieron 82 g de producto bruto que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (1 kg, metanol al 0-35% en acetato de etilo) para producir 38,6 g (81%) de **2.1** como un sólido blanquecino.

Síntesis del compuesto 3.1

40 **[0177]** Una solución del compuesto **2.1** (38,6 g, 62,9 mmol) en diclorometano anhidro (200 ml) y ácido trifluoroacético (200 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción de la mezcla fue concentrada a baja presión. El residuo se secó al vacío para dar 39,5 g (100%) de producto bruto **3.1** que se usó directamente para el siguiente paso sin purificación adicional.

Síntesis del compuesto 4.1

45 **[0178]** A una mezcla de compuesto **3.1** (39,5 g, 62,9 mmol) en ácido sulfúrico al 10% (520 ml) a 0-5°C (baño de hielo-agua) con agitación vigorosa, una solución de nitrito de sodio (32 g, 464 mmol) en agua (130 ml) se añadió gota a gota en más de 2 h manteniendo la temperatura interna por debajo de 5°C. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se extrajo luego con diclorometano/metanol (9: 1, 800 ml x 6). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ y salmuera, después se secó sobre Na₂SO₄. La filtración y la concentración del filtrado dieron 38 g de producto bruto que se purificó usando un sistema de cromatografía automática Teledyne ISCO Combiflash (330 g de columna de gel de sílice Rediseq, 0-50% de MeOH en gradiente CH₂Cl₂) para dar 8,4 g de producto **4.1** como espuma amarilla clara (Rendimiento: 73%, en base al material de partida consumido). También se recuperaron 21 g de material de partida **3.1** (base libre).

Síntesis del Compuesto 5.1

60 **[0179]** Piridinio p-toluenosulfonato (4,15 g, 16,5 mmol) se añadió a una solución del compuesto **4.1** (6,05 g, 11 mmol) en THF/2,2-dimetoxipropano (40 ml/40 ml). La mezcla resultante se agitó a 55°C durante 5 h y 50°C durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se secó al vacío y se usó sin purificación.

Síntesis del compuesto 6.1

65 **[0180]** El compuesto bruto **5.1** se disolvió en DMF (30 ml). A esta solución se le añadió DMAP (269 mg, 2,2 mmol),

imidazol (4,49 g, 66 mmol) y TBDMSCI (6,63 g, 44 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se repartió entre Et₂O (150 ml) y agua (50 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (2 x 25 ml), se secó sobre Na₂SO₄, y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-20%/hexano) para dar 5,4 g (63%, en dos etapas) del producto deseado como un aceite incoloro.

Síntesis del compuesto 7.1 (sal de HCl)

[0181] A una solución del compuesto **6.1** (5,32 g, 6,8 mmol) en THF (65 ml) se añadió gota a gota NaOH 0,5 N (16,3 ml, 8,2 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió EtOAc (150 ml). La mezcla se acidificó con HCl 0,5 M (40 ml). Luego se añadió salmuera (60 ml). La orgánica capa se separó, se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó sobre Na₂SO₄, y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío. El residuo se secó al vacío para dar 5,26 g (98%) del producto deseado como una cera blanquecina.

Síntesis de Compuesto 7.1 (sal de sodio)

[0182] A una solución de compuesto **6.1** se añadió (6,5 g, 8,3 mmol) en THF (80 ml) gota a gota NaOH 0,5 N (20 ml, 10 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió Et₂O (200 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera (3 x 50 ml), se secó sobre Na₂SO₄, y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío para dar 6,5 g (99%) del producto deseado como un aceite incoloro.

Síntesis del compuesto 8.1

[0183] Se añadió bromuro de bencilo (1,08 ml, 9,1 mmol) gota a gota a una solución de sal de sodio del compuesto **7.1** (6,5 g, 8,3 mmol) en DMF/THF (30 ml/30 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se recogió en EtOAc (150 ml). La capa orgánica se lavó con agua (25 ml), salmuera (2 x 25 ml), se secó sobre Na₂SO₄, y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-20% EtOAc/hexano) para dar 6,31 g (91%) del producto deseado como un aceite incoloro.

Síntesis del compuesto 9.1

[0184] A una solución fría (0°C) de compuesto **7.1** se sal de HCl (5,26 g, 6,74 mmol) en THF/piridina (15 ml/10 ml) se añadió gota a gota cloroformiato de bencilo (1,15 ml, 8,1 mmol). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se extrajo una parte alícuota de la mezcla de reacción para análisis MS. El resultado indicó que la reacción no se completó. Se añadió cloroformiato de bencilo (1,15 ml, 8,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante otras 1,5 h, luego se diluyó con EtOAc (200 ml). La capa orgánica se lavó con agua (50 ml), 1,5 M HCl (2 x 50 ml), salmuera (3 x 40 ml), se secó sobre Na₂SO₄, y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-70% EtOAc/hexano) para dar 2,78 g (45%) del producto deseado como un aceite amarillo claro.

Síntesis del compuesto 10.1

[0185] A una solución fría (0 ° solución C) de compuesto **8.1** (3,5 g, 4,2 mmol) y el compuesto **9.1** (2,78 g, 3 mmol) en DCM (30 DMAP ml) se añadió (673 mg, 6 mmol) y DCC (2,48 g, 12 mmol). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. DCM se eliminó bajo presión reducida y el residuo se recogió en Et₂O y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-20% EtOAc/hexano) para dar 4,87 g (95%, contaminado con dicitohexilurea) del producto deseado como un aceite incoloro.

Síntesis del Compuesto 11.1

[0186] A una solución de **10.1** (4,0 g, 2,36 mmol) en THF (anhidro, 15 ml) en un matraz de teflón de 100 ml a 0°C se añadió gota a gota una solución de piridina al 70% en peso/30% en peso de HF (15 ml, 578 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. El análisis de espectrometría de masas indicó la finalización de la reacción. La solución de reacción se diluyó con DCM (50 ml). La solución de DCM se añadió a una mezcla de DCM (200 ml) y solución acuosa Na₂CO₃ (40 g en 180 ml de agua) con agitación rápida. La capa de DCM se separó. La capa acuosa se extrajo con DCM (150 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ y se evapora. El residuo oleoso de color amarillo claro se purificó por columna de gel de sílice (120 g) en un sistema de cromatografía automática ISCO eluyendo con EtOAc al 0-100% en hexanos para dar 2,66 g de **11.1** (77%) como un aceite amarillo claro.

Síntesis del compuesto 12.1

[0187] A una solución de **11.1** se añadió (2,66 g, 2,15 mmol) en THF (anhidro, 70 ml) Et₃N (2,39 ml, 17,2 mmol), seguido de TMSCI (1,49 ml, 11,8 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se

eliminaron los volátiles. El residuo se agitó con Et₂O (anhidro, 100 ml) durante 20 min y se filtró. El sólido se lavó con Et₂O (anhidro, 2 x 20 ml). El filtrado combinado se evaporó y el residuo se secó al vacío durante una noche para dar 3,15 g de **12.1** (96%) como un aceite amarillo claro.

5 Síntesis del compuesto 13.1

[0188] A una suspensión de Pd/C seco (5%, 1,6 g) en EtOAc (15 ml) se le añadió una solución de **12.1** (3,15 g, 2.1 mmol) en EtOAc (70 ml). La mezcla resultante se agitó bajo un globo de hidrógeno durante la noche. Luego se filtró a través de Celite. El Celite se enjuagó con EtOAc (25 ml x 3). El filtrado combinado se evaporó para dar 2,09 g de **13.1** (78%) como un aceite amarillo claro.

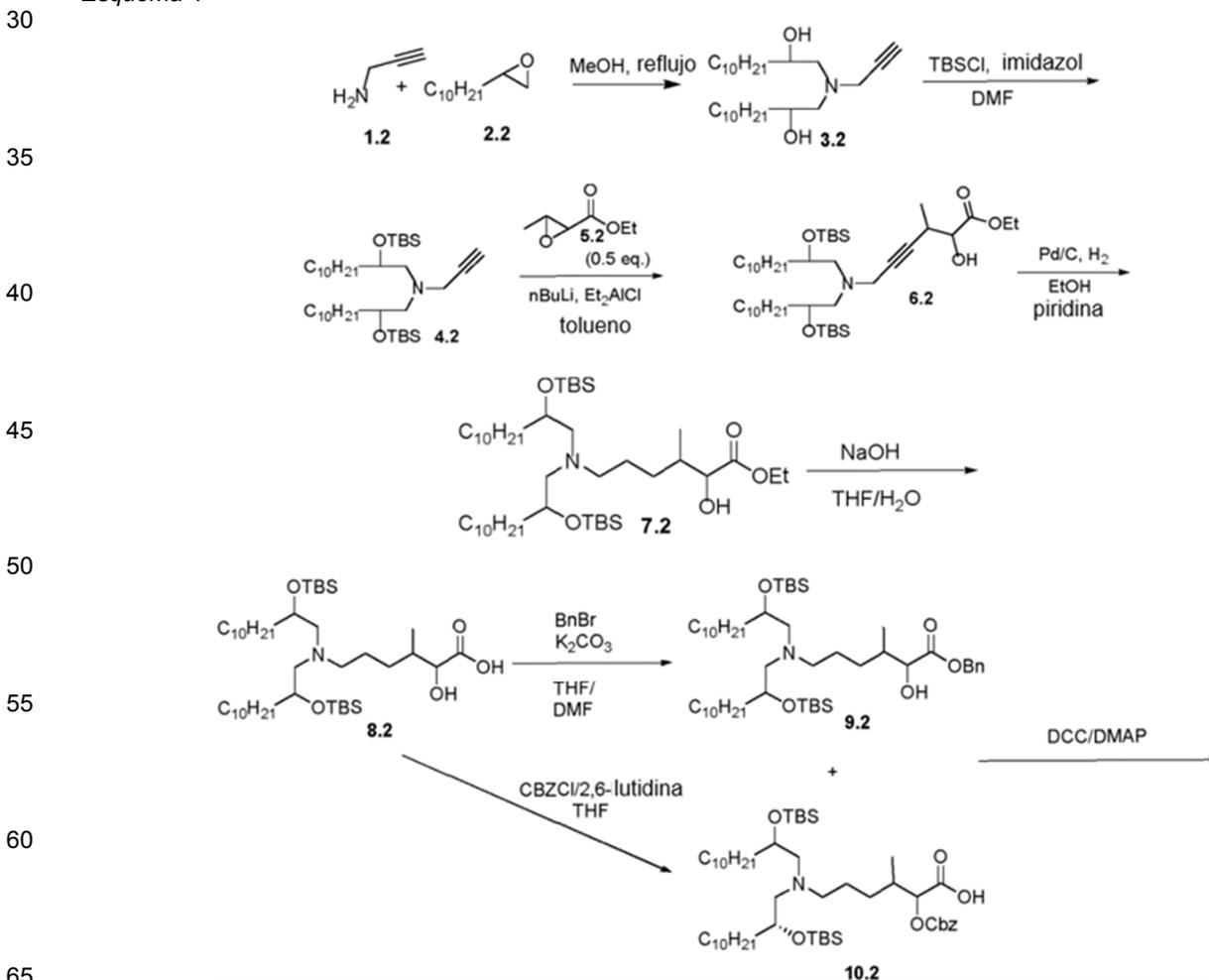
Síntesis de Diana 23

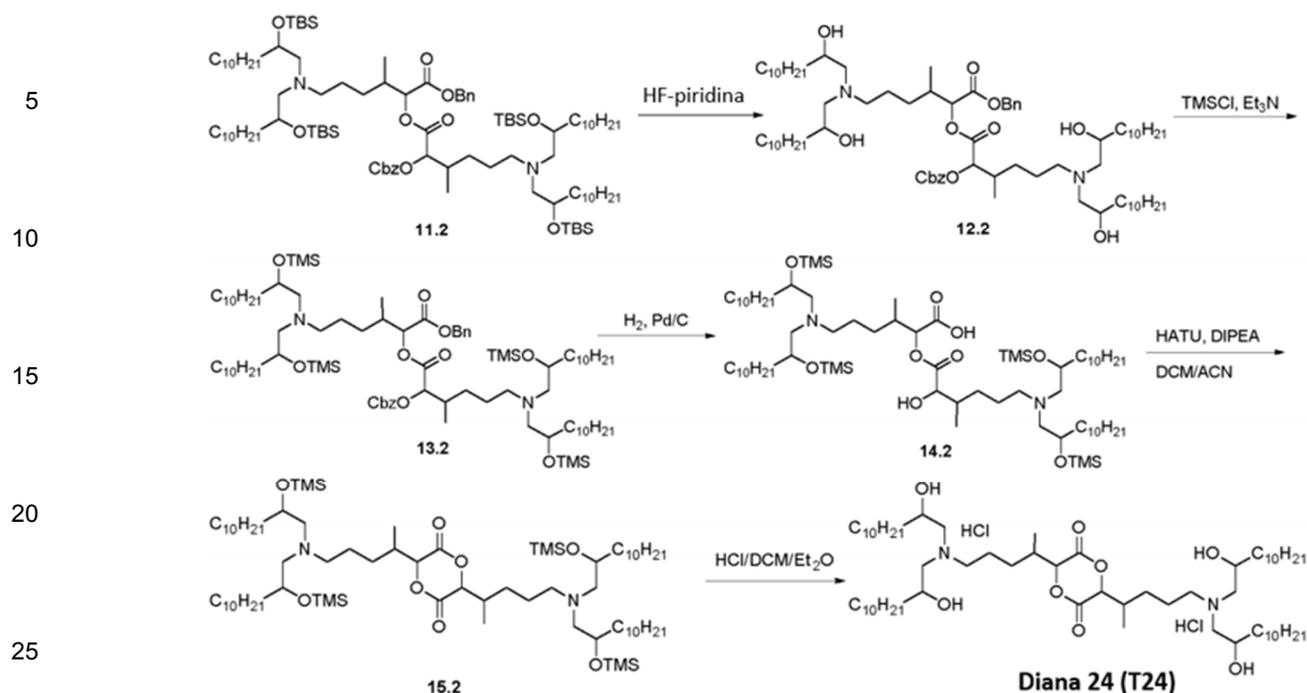
[0189] A una solución de **13.1** (2,09 g, 1,6 mmol) en una mezcla de DCM (anhidro, 60 ml) y CH₃CN (anhidro, 30 ml) se añadió DIPEA (0,415 ml, 2,4 mmol), seguido de HATU (0,912 g, 2,4 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 16 h. Se eliminaron los volátiles. El residuo se extrajo con hexano (100 ml + 25 ml x 2). Los extractos de hexano se combinaron y lavaron con solución acuosa de NaHCO₃ (2 x 60 ml) y HCl ac. HCl (5 ml 1 M de HCl en 60 ml de H₂O). Se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se evaporó para dar el compuesto **14.1** como una espuma de color amarillo claro que se disolvió en DCM (anhidro, 25 ml). HCl en éter dietílico (2 M, 6 ml) se añadió gota a gota y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 3 h. El análisis de espectrometría de masas indicó la finalización de la reacción. Los solventes se eliminaron purgando con un flujo de gas nitrógeno. El residuo se lavó con éter dietílico anhidro (10 ml x 3) y se secó a alto vacío para dar 1,61 g de **Diana 23** como un sólido blanquecino (94%, dos etapas).

25 **D.** El compuesto de fórmula IV, Diana 24 (T24), se puede hacer de acuerdo con la ruta mostrada en el Esquema 4:

[0190]

Esquema 4





Síntesis del Compuesto 3.2

[0191] Una solución de propargilamina (4,83 g, 87,7 mmol) y 1,2-epoxidodecano (40,8 g, 210,4 mmol) en EtOH (300 ml) se calentó a reflujo durante 16 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-30%/hexano) para dar 32,8 g (88%) del producto deseado como un sólido amarillo claro.

Síntesis del compuesto 4.2

[0192] A una solución fría (0°C) de **3.2** (10,16 g, 24 mmol) en DMF (48 ml) se añadieron secuencialmente DMAP (587 mg, 4,8 mmol), imidazol (5,72 g, 84 mmol) y cloruro de *tert*-butildimetilsililo (9,04 g, 60 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 20 min. Luego se retiró el baño de hielo, y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. DMF se eliminó a presión reducida. Al residuo se le añadió EtOAc (200 ml), agua (50 ml) y salmuera (30 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (50 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano) para dar 14,55 g (93%) del producto deseado como un aceite incoloro.

Síntesis del compuesto 6.2

[0193] A una solución fría (0°C) de **4.2** (3,52 g, 5,4 mmol) en tolueno (40 ml) se añadió gota a gota 2,5 M de *n*-BuLi (2,16 ml, 5,4 mmol). La solución resultante se agitó a 0°C durante 30 min, a continuación, 1 M Et₂AlCl (5,4 ml, 5,4 mmol) se añadió gota a gota. Después de la adición, la solución turbia se agitó a 0°C durante otras 2 h, a continuación, una solución de **5.2** (375 mg, 2,88 mmol) se añadió gota a gota en tolueno (2 ml). Después de agitarse durante 30 minutos, el baño de hielo se retiró y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se enfrió con un baño de hielo luego Na₂SO₄·10H₂O (8,3 g) se añadió en una porción. La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 2 h. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-5% EtOAc/hexano) dos veces para dar 1,12 g (53%) del producto deseado como un aceite amarillo.

Síntesis del compuesto 7.2

[0194] A una solución de **6.2** (2,0 g, 2,56 mmol) en EtOH (50 mL) se le añadió piridina (1,45 mL, 17,9 mmol) y 5% en peso de Pd/C (272 mg, 0,128 mmol). La mezcla resultante se desgasificó con Ar tres veces y luego se agitó bajo 1 atm H₂ durante la noche. La mezcla se filtró a través de un tapón de Celite que se lavó a fondo con EtOH. El filtrado y los lavados combinados se evaporaron al vacío para dar 2,0 g de aceite amarillo claro como una mezcla del producto deseado y otros subproductos inseparables. El crudo se usó en el siguiente paso sin más purificación.

Síntesis del compuesto 8.2

[0195] A una solución de **7.2** crudo (2,0 g) en THF (31 ml) se añadió NaOH 0,5 N (6,14 ml, 3,07 mmol) y MeOH (1,5 ml). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se recogió en Et₂O (120 ml) y se lavó con salmuera (3 x 30 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-50% EtOAc/hexano) para dar 739 mg (37% en dos etapas) del producto deseado como un aceite amarillo claro.

Síntesis del Compuesto 9.2

[0196] A una solución del compuesto **8.2** (739 mg, 0,97 mmol) en DMF/THF (5 ml/10 ml) a temperatura ambiente se le añadió K₂CO₃ (201 mg, 1,46 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 20 minutos y luego se añadió bromuro de bencilo (127 µl, 1,07 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se recogió en EtOAc (70 ml) y se lavó con agua (10 ml), salmuera (15 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se evaporó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-10% EtOAc/hexano) para dar 796 mg (97%) del producto deseado como un aceite incoloro.

Síntesis del compuesto 10.2

[0197] A una solución fría (0°C) de **8.2** (795 mg, 1,05 mmol) se añadió en THF (10,5 ml) secuencialmente 2,6-lutidina (128 µL, 1,1 mmol) y cloroformiato de bencilo (157 µL, 1,1 mmol). Después de agitarse durante 15 minutos, se retiró el baño de hielo. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. Se extrajo una parte alícuota de la mezcla de reacción para el análisis de MS. El resultado indicó que la reacción no se completó. Luego se añadió cloroformiato de bencilo (157 µL, 1,1 mmol). Después de agitarse a temperatura ambiente durante 1 h, la reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NaHCO₃ (25 ml). La mezcla se agitó vigorosamente durante la noche. La mezcla se diluyó con EtOAc (70 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 0,5 M HCl (20 ml), salmuera (2 x 15 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc al 0-50%/hexano) para dar 663 mg (67%) del producto deseado como un aceite amarillo.

Síntesis del compuesto 11.2

[0198] A una solución fría (0°C) de compuesto **9.2** (800 mg, 0,94 mmol) y **10.2** (664 mg, 0,71 mmol) en CH₂Cl₂ (7,1 ml) se añadió DMAP (157 mg, 1,42 mmol) y DCC (293 mg, 1,42 mmol). Después de agitarse durante 15 minutos, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. CH₂Cl₂ se eliminó a presión reducida. El residuo se recogió en Et₂O (50 ml). El sólido blanco se eliminó por filtración. El filtrado se evaporó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (0-10% EtOAc/hexano) dos veces para dar 964 mg (79%) del producto **11.2** como un aceite incoloro.

Síntesis del compuesto 12.2

[0199] A una solución de **11.2** (5,04 g, 2,93 mmol) en THF (anhidro, 15 ml) se le añadió la solución de piridina al 70% en peso/30% en peso de HF-piridina (20 ml, 770 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. El análisis de espectrometría de masas después de 2,5 h indicó una reacción completa. THF fue eliminado. La solución residual se diluyó con DCM (50 ml). La solución de DCM se añadió a una mezcla de DCM (200 ml) y solución acuosa Na₂CO₃ (61 g en 300 ml de agua) con rápida agitación. Se separó la capa de DCM. La capa acuosa se extrajo con DCM (150 ml). La orgánica combinada fase se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El residuo oleoso de color amarillo claro se purificó mediante una columna de gel de sílice (80 g) en un sistema de cromatografía automática ISCO eluyendo con EtOAc al 0-100% en hexano para dar 2,85 g de **12.2** (77%) como un aceite amarillo claro.

Síntesis del compuesto 13.2

[0200] A una solución de **12.2** se añadió (2,85 g, 2,25 mmol) en THF (anhidro, 70 ml) Et₃N (2,5 ml, 18 mmol), seguido de TMSCI (1,5 ml, 11,9 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se eliminaron los volátiles. El residuo se agitó con Et₂O (anhidro, 100 ml) durante 20 min y se filtró. El sólido se lavó con Et₂O (anhidro, 2 x 20 ml). El filtrado combinado se evaporó y el residuo se secó al vacío durante una noche para dar 3,29 g de **13.2** (94%) como un aceite amarillo claro.

Síntesis del compuesto 14.2

[0201] A una suspensión de Pd/C (5%, 1,62 g, mmol) en EtOAc (10 ml) se añadió una solución de **13.2** (3,29 g, 2,11 mmol) en EtOAc (70 ml). La mezcla resultante se agitó bajo un globo de H₂ durante 2 h. Luego se filtró a través de Celite. El Celite se enjuagó con EtOAc (3 x 20 ml). El filtrado combinado se evaporó para dar 2,78 g de **14.2** (99%) como un aceite amarillo claro.

Síntesis del Compuesto 15.2

[0202] A una solución de **14.2** (2,78 g, 2,09 mmol) en una mezcla de DCM (anhidro, 40 mL) y CH₃CN (anhidro, 20 mL) se le añadió DIPEA (0,55 mL, 3,14 mmol), seguido de HATU (1,19 g, 3,14 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ para 16 h. Se eliminaron los volátiles. El residuo se extrajo con hexano (150 ml). El extracto de hexano se lavó con solución acuosa de NaHCO₃ (2 x 60 ml) y HCl. Se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se evaporó para dar 2,36 g (86%) de **15.2** como una goma de color amarillo claro.

Síntesis de la diana 24

[0203] A una solución de **15.2** (1,09 g, 0,83 mmol) en DCM (anhidro, 15 ml), se añadió HCl en éter dietílico (2 M, 3 ml) gota a gota y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ por 3,5 h. El análisis de espectrometría de masas indicó la finalización de la reacción. El disolvente se eliminó mediante purga con un flujo de gas nitrógeno. El residuo se lavó con éter dietílico anhidro (20 ml x 3) y se secó a alto vacío para dar 875 mg de **Diana 24** bruto. Se lavaron 255 mg de **Diana 24** cruda con acetonitrilo anhidro (30 ml x 3). El residuo se disolvió en DCM (anhidro, 2 ml) y se añadió a una mezcla de éter dietílico (anhidro, 25 ml) y HCl en éter dietílico (2 M, 0,5 ml) con agitación. Después de continuar agitándose durante 30 minutos, el sólido gomoso se separó de la solución y se lavó con éter dietílico anhidro (5 ml x 2). Se secó a alto vacío para dar 200 mg (69%) de **Diana 24** como una espuma blanquecina.

Ejemplo 2. Formulaciones de liposomas ejemplares para la administración y expresión de ARNm

[0204] Este ejemplo proporciona formulaciones de liposomas ejemplares que incorporan los lípidos catiónicos descritos en esta solicitud, por ejemplo, el compuesto de fórmula III, para administración y expresión efectiva de proteínas de ARNm que codifican proteínas terapéuticas *in vivo*.

Materiales lipídicos

[0205] En general, las formulaciones descritas en el presente documento se basan en una mezcla lipídica de múltiples componentes de proporciones variables que emplean uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos auxiliares (por ejemplo, lípidos no catiónicos y/o lípidos basados en colesterol), y uno o más lípidos PEGilados diseñados para encapsular diversos materiales basados en ácido nucleico. Como ejemplo no limitativo, el compuesto de Fórmula III (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)-1,4-dioxano-2,5-diona) se usa en varias formulaciones descrito aquí. Los ejemplos de lípidos auxiliares incluyen uno o más de DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPC (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfotidicolina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)), colesterol, etc. Los ejemplos de lípidos PEGilados incluyen una cadena de poli(etileno) glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de C₆-C₂₀ de longitud, por ejemplo, PEG-2K. Como ejemplos no limitantes, las formulaciones de liposomas usadas en varios ejemplos descritos en el presente documento incluyen el compuesto de Fórmula III, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K en diversas proporciones. Por ejemplo, en algunos casos, la proporción del compuesto de Fórmula III: DOPE: colesterol: DMG-PEG2K es aproximadamente 40: 30: 20: 10 en peso. En otros casos, la proporción del compuesto de Fórmula III: DOPE: colesterol: DMG-PEG2K es aproximadamente 40: 32: 25: 3 en peso. A menos que se especifique lo contrario, los siguientes ejemplos incluyen una mezcla en la proporción del compuesto de Fórmula III: DOPE: colesterol: DMG-PEG2K de aproximadamente 40: 30: 25: 5 en peso.

Material de ARN mensajero

[0206] Las formulaciones descritas en este documento pueden usarse para administrar cualquier ARNm, en particular, ARNm terapéutico. Como se usa en el presente documento, un ARNm terapéutico se refiere a un ARNm que codifica una proteína terapéutica. Las formulaciones descritas en el presente documento también se pueden usar para administrar cualquier ARNm modificado o no modificado, o ARNm con secuencias naturales u optimizadas por codón.

[0207] Como ejemplos no limitantes, el factor IX humano (FIX), la luciferasa de luciérnaga con codón optimizado (FFL), el ARN mensajero de sintetasa de argininosuccinato humano (ASS1) optimizado con codón, el ARNm de neurona motora espinal humana con codón optimizado con codón (SMN) fueron sintetizados por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, que fue seguido por la adición de una estructura de tapa 5' (Tapa 1) (Fechter, P.; Brownlee, GG "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) y una cola 3' poli (A) de, por ejemplo, aproximadamente 250 nucleótidos de longitud según lo determinado por electroforesis en gel. Típicamente, las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' están presentes en cada producto de ARNm y se representan como X e Y, respectivamente. Los ejemplos de secuencias UTR 5' y 3' se describen a continuación. Las secuencias ejemplares de ARNm de FIX, ASS1 y FFL usadas en los ejemplos de este documento se enumeran a continuación. También se muestran las secuencias UTR de 5' y 3'.

ARNm de luciferasa de luciérnaga con codón optimizado (FFL):

[0208]

5 XAUGGAAGAUGCCAAAAACAUUAAGAAGGGCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGACCGCCGGCGA
 GCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUUUCGA
 GGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAAGCUAUGAAGCGCUAUGGG
 10 CUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCUUGCCCGUGUUGGGUG
 CCCUGUUCUACGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUG
 GGCAUCAGCCAGCCACCGUCGUUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAGAUAUCUACGUGCAAAGAAG
 CUACCGAUCAUACAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUACACC
 15 UUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAAACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAAA
 ACCAUCGCCUGAUCAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCGCACC
 GCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGACACCGCUAUCCUC
 AGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGU
 20 CGUGCUCUAGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUUAAGAUUCAUUCUGCCC
 UGCUGGUGCCACACUUAUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGC
 ACGAGAUCCGAGCGGGCGGGCGCCGCUACAGCAAGGAGGUAGGUGAGGGCCUGGGCCAAACGCUUCCACCUAC
 CAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUCACCCCGAAGGGGACGACAA
 25 GCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACA
 CUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCAUGAUCUAGAGCGGCUACGUUAACAACCC
 CGAGGCUACAAACGCUUCAUCGACAAGGACGGCUGGUGCAGCAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGA
 CGAGCACUUCUUCUUCGUGGACCGGCUAAGAGCCUGAUCAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGA
 30 ACUGGAGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACUUCGACGCCGGGUGCGCCGCCUGCCCCGACGACGAUGC
 CGGCGAGCUGCCCCGCCGAGUCGUCGUGGUAACACGGUAAAACCAUGACCGAGAAGGAGAUUCGUGGACU
 AUGUGGCCAGCCAGGUUAACAACCGCAAGAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAA
 AGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCGCAAGAUCCGCGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGA
 UCGCCGUGUAAY (SEQ ID NO.: 3)

Secuencias de 5' y 3' UTR

35 **[0209]**

X (secuencia de 5' UTR) =

40 GGACAGAUCCGUGGAGACGCCAUCCACGCGUUCUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUC
 CGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ
 ID NO.: 5)

Y (Secuencia 3' UTR) =

45 CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAG
 CCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID NO.: 6)

50 o

GGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGC
 CUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID NO.: 7)

55 Alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas del compuesto de Fórmula III, DOPE, Chol y DMG-PEG2K se mezclan
 en una relación molar de 40: 30: 25: 5 y se diluyen con etanol a 3 ml volumen final. Por separado, se prepara una
 60 solución acuosa tamponada (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm FIX, ASS1 o FFL a partir de una reserva
 de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agita para producir una
 suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1x PBS (pH
 7,4), se concentra y se almacena a 2-8°C. La concentración final de ARNm de FIX se diluye típicamente a
 65 aproximadamente 0,20 mg/ml de ARNm de FIX (encapsulado), Z_{ave} = 76 nm, PDI = 0,08. La concentración final de
 ARNm de ASS1 se diluye típicamente a aproximadamente 0,20 mg/ml de ARNm de ASS1 (encapsulado), Z_{ave} = 78
 nm (D_v (50) = 46 nm; D_v (90) = 96 nm). La concentración final de ARNm de FFL se diluye típicamente a
 aproximadamente 0,20 mg/ml de ARNm de FFL (encapsulado), Z_{ave} = 75 nm, PDI = 0,11. La concentración final de
 ARNm de SMN se diluye típicamente a aproximadamente 0,20 mg/ml de ARNm de SMN (encapsulado). Tamaño de

partícula promedio (Z_{ave}) = 71 nm, (el tamaño de partícula para el 50% de las partículas fue de 44 nm o menos ($Dv(50)$) = 44 nm; y el tamaño de partícula para el 90% de las partículas fue de 93n o menos ($Dv(90)$ = 93 nm)).

Formulación ejemplar que comprende T23:

[0210] Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml del compuesto de Diana 23, DOPE, Chol y DMG-PEG2K en una relación molar de 40: 30: 25: 5 y se diluyeron con etanol a 3 ml de volumen final. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de EPO a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8°C. La concentración final de ARNm de EPO se diluye típicamente a aproximadamente 0,20 mg/ml de ARNm de EPO (encapsulado). Z_{ave} = 80 nm, PDI = 0,11.

Formulación ejemplar que comprende T24:

[0211] Alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas del compuesto de Diana 24, DOPE, Chol y DMG-PEG2K se mezclaron en una relación molar de 40: 30: 25: 5 y se diluyeron con etanol a 3 ml de volumen final. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de EPO a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8°C. La concentración final de ARNm de EPO se diluye típicamente a aproximadamente 0,20 mg/ml de ARNm de EPO (encapsulado). Z_{ave} = 78 nm, PDI = 0,14.

Ejemplo 3. Resultados in vivo

[0212] Se inyectaron ratones CD-1 (N = 4 por grupo) con una formulación de 0,20 mg/ml de LNP basadas en Diana 23 o LNP basadas en Diana 24 cargadas con ARNm de hEPO (1,0 mg/kg). Los niveles séricos de hEPO se monitorizaron a las 6 h y 24 h después de la dosis. Ver Figura 1. Las enzimas hepáticas (ALT/AST) se midieron 24 horas después de la administración. Véase la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de enzimas hepáticas en sueros de ratón de tipo salvaje después del tratamiento a través de hEPO ARNm cargado LNP.

Formulación	Niveles ALT	Niveles AST
Diana 23 LNP	107 + 37	92 + 17
Diana 24 LNP	77 + 16	73 + 11

[0213] El alcance de la presente invención no pretende estar limitada a la descripción anterior, sino más bien es como se expone en las siguientes reivindicaciones:

LISTA DE SECUENCIAS

[0214]

- <110> SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.
- <120> LIPIDOS BIODEGRADABLES PARA LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS
- <130> 2006685-0918
- <140 > PCT/US2015/033173
- <141> 2015-05-29
- <150> 62/005,266
- <151> 2014-05-30
- <160> 4
- <170> Patentin versión 3,5
- <210> 1
- <211> 1898
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 750 686 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1794)..(1794)
 <223> Puede o no estar presente

10 <400> 1

15	ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac	60
15	cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauucctccg ugccaagagu	120
	gacucaccgu ccuugacacg auggaagaug ccaaaaacau uaagaagggc ccagcgccau	180
20	ucuaccacu cgaagacggg accgccggcg agcagcugca caaagccaug aagcgcuacg	240
	cccuggugcc cggcaccauc gccuuuaccg acgcacauau cgagguggac auuaccuacg	300
	ccgaguacuu cgagaugagc guucggcugg cagaagcuau gaagcgcuau gggcugaaua	360
25	caaaccaucg gaucguggug ugcagcgaga auagcuugca guucuucaug cccguguugg	420
	gugcccuguu caucggugug gcuguggccc cagcuaacga caucuacaac gagcgcgagc	480
30	ugcugaacag caugggcauc agccagccca ccgucguauu cgugagcaag aaagggcugc	540
	aaaagauccu caacgugcaa aagaagcuac cgaucauaca aaagaaucau aucauggaua	600
	gcaagaccga cuaccagggc uuccaaagca uguacaccuu cgugacuucc cauugccac	660
35	ccggcuucaa cgaguacgac uucgugcccg agagcuucga cggggacaaa accaucgccc	720
	ugaucaugaa caguaguggc aguaccggau ugcccagggg cguagcccua ccgcaccgca	780
40	ccgcuugugu ccgauucagu caugcccgcg accccaucuu cggcaaccag aucaucctcg	840
	acaccgcua uccucagcgug gugccauuuc accacggcuu cggcauguuc accacgcugg	900

45

50

55

60

65

ES 2 750 686 T3

	gcuacuugau cugcggcuuu cgggucgugc ucauguaccg cuucgaggag gagcuauucu	960
5	ugcgcagcuu gcaagacuau aagauucaau cugcccugcu ggugcccaca cuauuuagcu	1020
	ucuucgcuaa gagcacucuc aucgacaagu acgaccuaag caacuugcac gagaucgcca	1080
10	gcggcggggc gccgcucagc aaggagguag gugaggccgu ggccaaacgc uuccaccuac	1140
	caggcauccg ccagggcuac ggccugacag aaacaaccag cgccauucug aucacccccg	1200
	aaggggacga caagccuggc gcaguaggca agguggugcc cuucuucgag gcuaaggugg	1260
15	uggacuugga caccgguaag acacugggug ugaaccagcg cggcgagcug ugcguccgug	1320
	gccccaugau caugagcggc uacguuaaca accccgaggc uacaaacgcu cucaucgaca	1380
20	aggacggcug gcugcacagc ggcgacaucg ccuacuggga cgaggacgag cacuucuua	1440
	ucguggaccg gcugaagagc cugaucaaa uacaagggcua ccagguagcc ccagccgaac	1500
	uggagagcau ccugcugcaa cacccaaca ucuucgacgc cggggucgcc ggccugcccg	1560
25	acgacgaugc cggcgagcug cccgccgag ucgucgugcu ggaacacggu aaaaccauga	1620
	ccgagaagga gaucguggac uauguggcca gccagguuac aaccgccaag aagcugcgcg	1680
	gugguguugu guucguggac gaggugccua aaggacugac cggcaaguug gacgcccgca	1740
30	agauccgcga gauucucauu aaggccaaga agggcggcaa gaucgccgug uaacgggugg	1800
	caucccugug accccucucc agugccucuc cuggcccugg aaguugccac uccagugccc	1860
35	accagccuug uccuaaauaa auuaaguugc aucaagcu	1898

40

<210> 2

<211> 140

<212> ARN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

50

<400> 2

55	ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac	60
	cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auugaacgc ggauuccccg ugccaagagu	120
60	gacucaccgu ccuugacacg	140

65

<210> 3

<211> 105

ES 2 750 686 T3

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 3

10 **cggguggcau ccugugacc ccucccagu gccucuccug gccuggaag uugccacucc 60**

agugcccacc agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc aagcu 105

15 <210> 4
<211> 104
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 4

25 **ggguggcauc ccugugaccc cuccccagug ccucuccugg ccuggaagu ugccacucca 60**

gugcccacca gccuuguccu aauaaaaua aguugcauca agcu 104

30 LISTA DE SECUENCIAS

[0215]

35 <110> SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.

<120> LIPIDOS BIODEGRADABLES PARA LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> 2006685-0918

40 <140 > PCT/US2015/033173
<141> 2015-05-29

<150> 62/005,266
45 <151> 2014-05-30

<160> 7

<170> Patentin versión 3,5

50 <210> 1

<400> 1
000

55 <210> 2

<400 > 2
000

60 <210> 3
<211> 1898
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

65 <220>

ES 2 750 686 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>

<221> base_modificada

<222> (1794)..(1794)

<223> Puede o no estar presente

<400> 3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac	60
cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu	120
gacucaccgu ccuugacacg auggaagaug ccaaaaacau uaagaagggc ccagcgccau	180
ucuaccacac cgaagacggg accgccggcg agcagcugca caaagccaug aagcgcuacg	240
cccuggugcc cggcaccauc gccuuuaccg acgcacauau cgagguggac auuaccuacg	300
ccgaguacuu cgagaugagc guucggcugg cagaagcuau gaagcgcuau gggcugaaua	360
caaaccaucg gaucguggug ugcagcgaga auagcuugca guucuucaug cccguguugg	420
gugcccuguu caucggugug gcuguggccc cagcuaacga caucuacaac gagcgcgagc	480
ugcugaacag caugggcauc agccagccca ccgucguauu cgugagcaag aaagggcugc	540

ES 2 750 686 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40

```

aaaagauccu caacgugcaa aagaagcuac cgaucauaca aaagaucauc aucauggaua 600
gcaagaccga cuaccagggc uuccaaagca uguacaccuu cgugacuucc cauuugccac 660
ccggcuucaa cgaguacgac uucgugcccg agagcuucga ccgggacaaa accaucgccc 720
ugaucaugaa caguaguggc aguaccggau ugcccaaggg cguagcccua ccgcaccgca 780
ccgcuugugu ccgauucagu caugcccgcg accccaucuu cggcaaccag aucauccccg 840
acaccgcuau ccucagcgug gugccauuuc accacggcuu cggcauguuc accacgcugg 900
gcuacuugau cugcgggcuuu cgggucgugc ucauguaccg cuucgaggag gagcuauucu 960
ugcgcgacuu gcaagacuau aagauucaau cugcccugcu ggugcccaca cuauuuagcu 1020
ucuucgcuaa gagcacucuc aucgacaagu acgaccuag caacuugcac gagaucgcca 1080
gcgcgggggc gccgcucagc aaggagguag gugaggccgu ggccaaacgc uuccaccuac 1140
caggcauccg ccagggcuac ggccugacag aaacaaccag cgccauucug aucacccccg 1200
aaggggacga caagccuggc gcaguaggca agguggugcc cuuucgag gcuagggg 1260
uggacuugga caccgguaag acacugggug ugaaccagcg cggcgagcug ugcguccgug 1320
gccccaugau caugagcggc uacguuaaca accccgaggc uacaaacgcu cucaucgaca 1380
aggacggcug gcugcacagc ggcgacaucg ccuacuggga cgaggacgag cacuucuua 1440
ucguggaccg gcugaagagc cugaucaaa acaagggcua ccagguagcc ccagccgaac 1500
uggagagcau ccugcugcaa caccca ucuucgacgc cgggugcgc ggccugcccg 1560
acgacgaugc cggcgagcug cccgcccag ucgucgugcu ggaacacggu aaaaccauga 1620
ccgagaagga gaucguggac uauguggcca gccagguac aaccgccaag aagcugcgcg 1680
gugguguugu guucguggac gaggugccua aaggacugac cggcaaguug gacgcccgca 1740
agauccgca gauucucau aaggccaaga agggcggcaa gaucgcccug uaacgggugg 1800
cauccccugug accccucccc agugccucuc cuggcccugg aaguugccac uccagugccc 1860
accagccuug uccuauuuu auuaaguugc aucaagcu 1898
  
```

45

<210 > 4

50

<400> 4
000

55

<210> 5
<211> 140
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

65

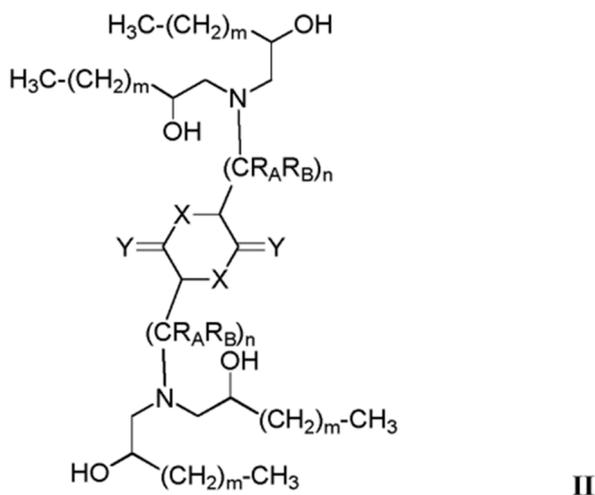
<400> 5

ES 2 750 686 T3

	ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac	60
5	cgauccagcc uccgcgggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu	120
	gacucaccgu ccuugacacg	140
10		
	<210> 6	
	<211> 105	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Síntesis ic polinucleótido	
20	<400> 6	
25	cggguggcau ccugugacc ccucccagug gccucuccug gccuggaag uggccacucc	60
	agugcccacc agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc aagcu	105
30		
	<210> 7	
	<211> 104	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
	<400> 7	
40	ggguggcauc ccugugaccc cuccccagug ccucuccugg ccuggaagu ugccacucca	60
	gugcccacca gccuuguccu aauaaaaua aguugcauca agcu	104
45		
50		
55		
60		
65		

REIVINDICACIONES

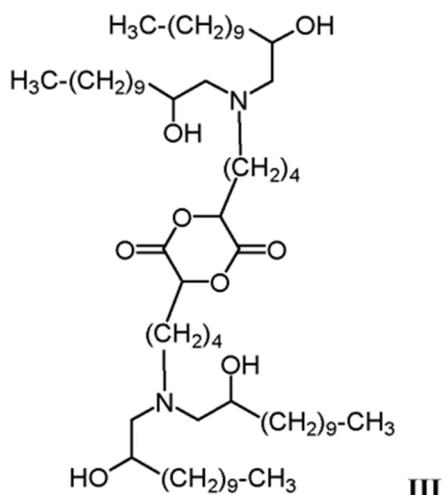
1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula II:



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

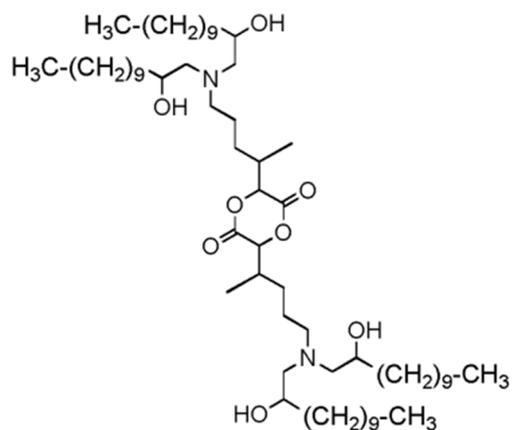
30 cada X independientemente es O o S;
 cada Y independientemente es O o S;
 cada m independientemente es de 0 a 20;
 cada n independientemente es de 1 a 6;
 cada R_A es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50, alqueno C2-50, alquino C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14, heteroarilo de 5-14 miembros o halógeno; y
 35 cada R_B es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50, alqueno C2-50, alquino C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo 3-14 miembros, arilo C6-14, heteroarilo de 5-14 miembros o halógeno.

40 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula III:

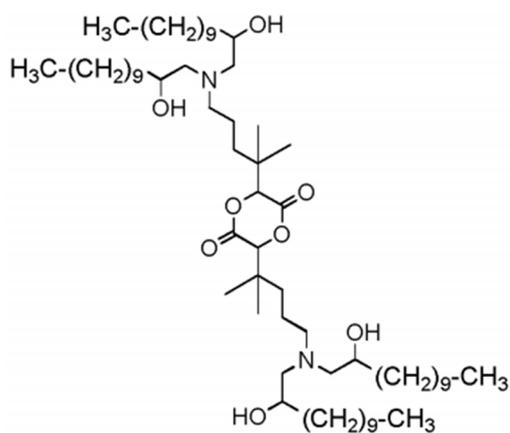


60 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o en donde el compuesto es de fórmula IV:

65



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o en donde el compuesto es de fórmula V:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 **3.** Una composición para la administración de un polinucleótido que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

45 **4.** La composición de la reivindicación 3, en donde la composición es un liposoma; y opcionalmente en donde el liposoma comprende además uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos basados en colesterol y/o uno o más lípidos modificados con PEG; y opcionalmente en el que el uno o más lípidos no catiónicos se seleccionan de DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPC (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfotidilcolina) DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)); u opcionalmente en el que los uno o más lípidos modificados con PEG comprenden una cadena de poli(etileno) glicol de hasta 5 kDa de longitud covalentemente unido a un lípido con cadena(s) alquilo de longitud C6-C20.

50

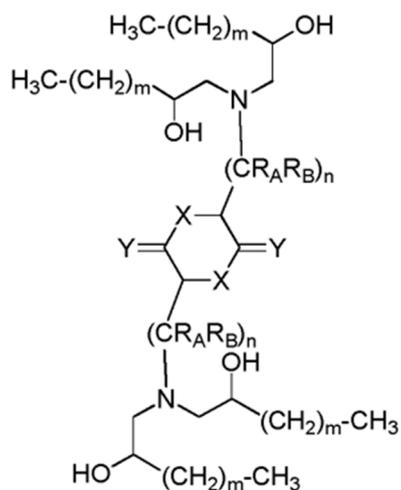
55 **5.** La composición de la reivindicación 4, en la que el liposoma tiene un tamaño inferior a 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm o 50 nm.

6. Un liposoma que comprende un compuesto lipídico catiónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para uso en un método terapéutico de suministro de ARN mensajero (ARNm) *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto que necesita suministro una composición que comprende un ARNm que codifica una proteína, encapsulada dentro de un liposoma de modo que la administración de la composición da como resultado la expresión de la proteína codificada por el ARNm *in vivo*; en donde el liposoma comprende un compuesto lipídico catiónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

60

7. El liposoma para su uso según la reivindicación 6, en el que el lípido catiónico es de fórmula II:

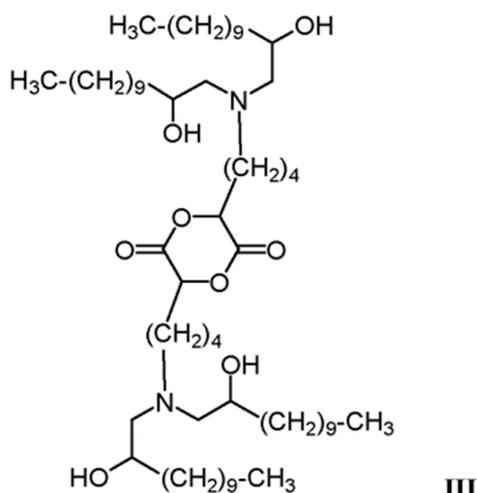
65



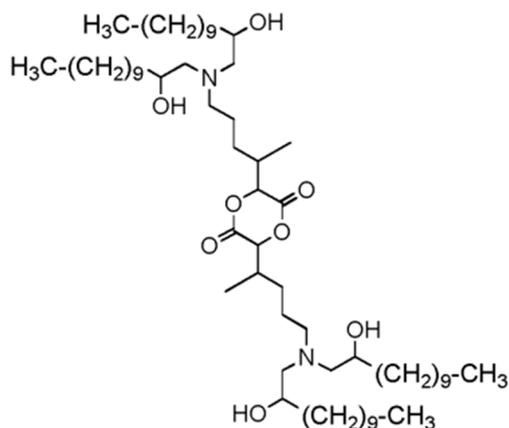
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 25
- 30
- cada X es independientemente O o S;
 - cada Y independientemente es O o S;
 - cada m independientemente es de 0 a 20;
 - cada n independientemente es de 1 a 6;
 - cada R_A es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50, alqueno C2-50, alquino C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo C6-14, heteroarilo de 5-14 miembros o halógeno; y
 - cada R_B es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50, alqueno C2-50, alquino C2-50, carbociclilo C3-10, heterociclilo 3-14 miembros, arilo C6-14, heteroarilo de 5-14 miembros o halógeno.

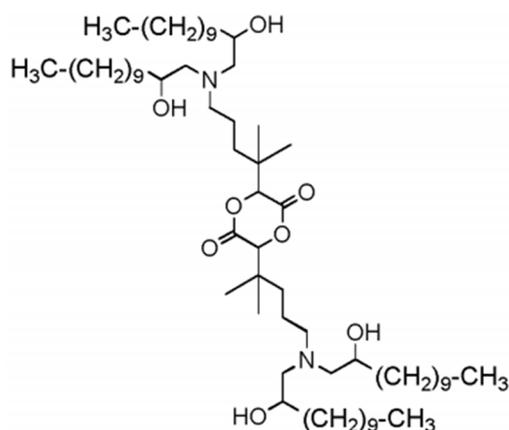
8. El liposoma para su uso según la reivindicación 6, en el que el lípido catiónico es de fórmula III:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o en donde el compuesto es de fórmula IV:



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o en donde el compuesto es de fórmula V:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 **9.** El liposoma para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que el liposoma comprende además uno o más lípidos no católicos, uno o más lípidos basados en colesterol y/o uno o más lípidos modificados con PEG; y opcionalmente en el que el uno o más lípidos no catiónicos se seleccionan de DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPC (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfotidilcolina) DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimirstoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)); y/u opcionalmente en donde el uno o más lípidos basados en colesterol son colesterol y/o colesterol PEGilado.

50 **10.** El liposoma para su uso según la reivindicación 9, en el que uno o más lípidos modificados con PEG comprenden un poli(etileno) de cadena de glicol de hasta 5 kDa de longitud unido covalentemente a un lípido con cadena(s) alquilo de C₆-C₂₀ de longitud.

11. El liposoma para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que el liposoma tiene un tamaño inferior a 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm o 50 nm.

55 **12.** El liposoma para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que el ARNm tiene una longitud de 0,5 kb, 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb o más de 0,5 kb, 4,5 kb o 5 kb.

60 **13.** El liposoma para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-12, en el que la proteína codificada por el ARNm es una proteína citosólica; o en donde la proteína codificada por el ARNm es una proteína secretada; o en donde la proteína codificada por el ARNm es una enzima.

65 **14.** El liposoma para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-13, en el que el ARNm comprende uno o más nucleótidos modificados; y opcionalmente en donde uno o más nucleótidos modificados comprenden pseudouridina, N-1-metil-pseudouridina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-

yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y/o 2-tiocitidina.

15. El liposoma para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-14, en el que el ARNm no está modificado.

16. Un liposoma que comprende un lípido catiónico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6-15 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende una etapa de administrar un ARNm que codifica una proteína terapéutica usando un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6-15.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

