

## DESCRIPCIÓN

### LÍPIDOS CATIÓNICOS

Campo de la invención

[0001]

La presente invención hace referencia a un lípido catiónico que permite la introducción de ácidos nucleicos como ingrediente activo en muchos tipos de células, tejidos u órganos. La presente invención hace referencia además a una partícula lipídica que contiene el lípido catiónico, y una composición que contiene la partícula lipídica y un ácido nucleico.

[0002]

[Antecedentes de la invención]

En los últimos años se ha realizado una investigación exhaustiva y el desarrollo de fármacos de ácidos nucleicos, que contienen un ácido nucleico como ingrediente activo. Por ejemplo, se han realizado varios estudios para fármacos de ácidos nucleicos que tienen efecto de descomposición o efecto inhibidor de la función sobre los ARNm objetivo, incluyendo ácidos nucleicos tales como los ARNip, miARN, imitadores de miARN y ácidos nucleicos antisentido. Además,

se han realizado estudios para fármacos de ácidos nucleicos que contienen un ARNm o similares que codifica una proteína de interés para expresar la proteína de interés en las células. En relación con dicha investigación y desarrollo, se han desarrollado técnicas para introducir ácidos nucleicos en células, tejidos u órganos con alta eficiencia como técnicas de sistema de administración de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés).

[0003]

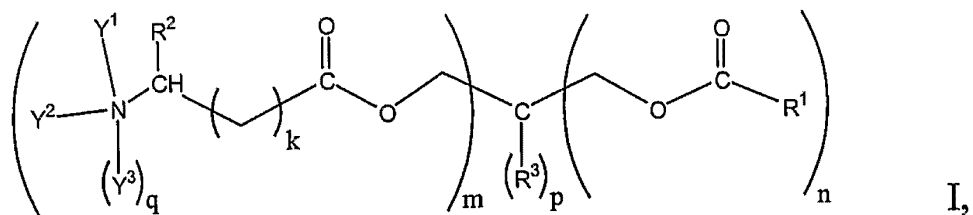
Convencionalmente conocida como tal, la técnica DDS es una técnica donde un ácido nucleico y un lípido se mezclan para formar un complejo y las células pueden incorporar el ácido nucleico a través del complejo. Convencionalmente conocidos como lípidos para su uso en la formación del complejo se encuentran los lípidos catiónicos, los lípidos poliméricos hidrófilos, los lípidos auxiliares, y así sucesivamente. Como tales lípidos catiónicos, por ejemplo, se conocen compuestos descritos en documentos del arte previo, como se muestra a continuación.

[0004]

La literatura de patentes 1 describe un compuesto representado por la siguiente fórmula o una de sus sales, y así sucesivamente.

[0005]

[Fórmula 1]



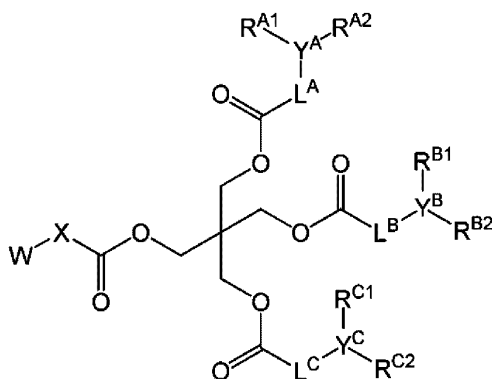
Se especifica para la fórmula que R<sup>1</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido y alquenilo C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido; cada R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, y así sucesivamente; cada Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, y así sucesivamente; cada Y<sup>3</sup>, si está presente, se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> opcionalmente sustituido, arilalquilo opcionalmente sustituido, y así sucesivamente; m es cualquier número entero de 1 a 4; n es cualquier número entero de 0 a 3; p es 0 o 1; la suma de m, n y p es 4; k es cualquier número entero de 1 a 5; y q es 0 o 1.

[0006]

La literatura de patentes 2 describe un compuesto representado por la siguiente fórmula o una de sus sales, etc.

[0007]

[Fórmula 2]



En la fórmula, W denota la fórmula  $-NR^1R^2$  o la fórmula  $-N^+R^3R^4R^5$  ( $Z^-$ );  $R^1$  y  $R^2$  denotan, cada uno independientemente, un grupo alquilo  $C_{1-4}$  o un átomo de hidrógeno;  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  denotan, cada uno independientemente, un grupo alquilo  $C_{1-4}$ ;  $Z^-$  denota un ion negativo; X denota un grupo alquileno  $C_{1-6}$  que puede estar sustituido;  $Y^A$ ,  $Y^B$  e  $Y^C$  denotan, cada uno independientemente, un grupo metida que puede estar sustituido;  $L^A$ ,  $L^B$  y  $L^C$  denotan, cada uno independientemente, un grupo metileno que puede estar sustituido o un enlace;  $R^{A1}$ ,  $R^{A2}$ ,  $R^{B1}$ ,  $R^{B2}$ ,  $R^{C1}$  y  $R^{C2}$  denotan, cada uno independientemente, un grupo alquilo  $C_{4-10}$  que puede estar sustituido.

Lista de citas

Literatura de patentes

[0008]

Literatura de patente 1: Publicación Internacional No. WO  
2003/102150

Literatura de patente 2: Publicación Internacional No. WO  
2016/021683

Resumen de la Invención

Problema técnico

[0009]

Se espera que los lípidos catiónicos que permiten la introducción de ácidos nucleicos en las células con alta eficiencia contribuyan a la creación de fármacos de ácidos nucleicos que son superiores en términos de manifestación de la acción del fármaco, seguridad (baja toxicidad), etc., y exhiben un efecto terapéuticamente superior. Se espera que los lípidos catiónicos que permiten la introducción de ácidos nucleicos en varias células permitan la creación de fármacos de ácido nucleico para enfermedades que ocurren en varios tejidos. Actualmente, sin embargo, no se ha encontrado ningún lípido catiónico que satisfaga suficientemente esos requisitos.

[0010]

Un objeto de la presente invención es proporcionar una técnica que permita la introducción de ácidos nucleicos en células con eficiencia superior; y lípidos catiónicos, etc.,

para su uso en la técnica. Un objeto de la presente invención desde otro punto de vista es proporcionar una técnica que permita la introducción de ácidos nucleicos en varias células; y compuestos, etc., para su uso en la técnica.

#### Solución al problema

[0011]

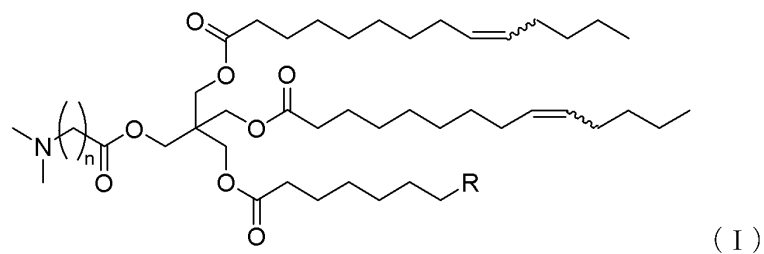
Los presentes inventores han examinado de manera diligente para resolver el problema, y han encontrado que el problema se resuelve con éxito utilizando un compuesto representado por la fórmula a continuación o una de sus sales, completando así la presente invención.

[0012]

Específicamente, la presente invención hace referencia al menos a lo siguiente:

[1] Un compuesto representado por la fórmula (I):

[Fórmula 3]



en donde

n representa un entero de 2 a 5,

R representa un grupo alquilo C<sub>1-5</sub> lineal, un grupo alquenoilo C<sub>7-11</sub> lineal o un grupo alcadienilo C<sub>11</sub> lineal, y

las líneas onduladas representan cada una independientemente un enlace cis o un enlace trans, o una de sus sales.

[2] 3-((4-(Dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-tetradec-9-enoato o una de sus sales.

[3] 3-((5-(Dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi) metil) propil (9Z)-tetradec-9-enoato o una de sus sales.

[4] 3-((6-(Dimetilamino)hexanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi) metil) propil (9Z)-tetradec-9-enoato o una de sus sales.

[5] Una partícula lipídica que contiene el compuesto o una de sus sales, de acuerdo con el punto 1.

[6] Una composición para la introducción de ácido nucleico que contiene un ácido nucleico y la partícula lipídica, de acuerdo con el punto 5.

[7] La composición de acuerdo con el punto 6, en donde el ácido nucleico es un ARN.

[7a] La composición de acuerdo con el punto 6, en donde el ácido nucleico es un ADN.

[8] La composición de acuerdo con el punto 7, en donde el ARN es un ARNm o un ARNip.

[0013]

En el presente documento, "el compuesto representado por la fórmula (I)" se denomina ocasionalmente "compuesto (I)". "El compuesto representado por la fórmula (I) o una de sus sales" se denomina ocasionalmente "el compuesto de la presente invención". Una "partícula lipídica que contiene el compuesto representado por la fórmula (I) o una de sus sales (el compuesto de la presente invención)" se denomina ocasionalmente "la partícula lipídica de la presente invención". Una "composición para la introducción de ácido nucleico que contiene un ácido nucleico y la partícula lipídica de la presente invención" se denomina ocasionalmente "la composición de la presente invención".

Efectos ventajosos de la Invención

[0014]

La presente invención permite la introducción de ácidos nucleicos en células, tejidos u órganos con una eficiencia superior. La presente invención permite la introducción de ácidos nucleicos en diversos tipos de células, tejidos u órganos (por ejemplo, células cancerosas). La presente invención permite la adquisición de fármacos o

reactivos para la investigación a fin de introducir un ácido nucleico en diversos tipos de células, tejidos u órganos.

Además, si se introduce un ácido nucleico en las células, un tejido o un órgano a través de la presente invención, la eficacia de la manifestación de la actividad (por ejemplo, acción del fármaco) que posee el ácido nucleico es alta.

[0015]

(Descripción detallada de la invención)

[0016]

Ahora bien, las definiciones de sustituyentes utilizadas en el presente documento se describirán en detalle. Los sustituyentes tienen las siguientes definiciones, a menos que se especifique lo contrario.

[0017]

Los ejemplos del "grupo alquilo C<sub>1-5</sub> lineal" en el presente documento incluyen metilo, etilo, propilo, butilo y pentilo.

[0018]

Los ejemplos del "grupo alqueno C<sub>7-11</sub> lineal" en el presente documento incluyen 1-heptenilo, 2-heptenilo, 3-heptenilo, 4-heptenilo, 5-heptenilo, 6-heptenilo, 1-octenilo, 2-octenilo, 3-octenilo, 4-octenilo, 5-octenilo, 6-octenilo, 7-octenilo, 1-nonenilo, 2-nonenilo, 3-nonenilo, 4-nonenilo,

5-nonenilo, 6-nonenilo, 7-nonenilo, 8-nonenilo, 1-decenilo ,  
2-decenilo, 3-decenilo, 4-decenilo, 5-decenilo, 6-decenilo,  
7-decenilo, 8 decenilo, 9-decenilo, 1-undecenilo, 2-  
undecenilo, 3-undecenilo, 4-undecenilo, 5 -undecenilo, 6-  
undecenilo, 7-undecenilo, 8-undecenilo, 9-undecenilo y 10-  
undecenilo. Si bien cada uno de estos grupos alquenilo C<sub>7-11</sub>  
lineales tiene un doble enlace carbono-carbono y, por lo  
tanto, el doble enlace carbono-carbono puede formar una  
estructura cis y una transestructura, el doble enlace  
carbono-carbono puede formar cualquiera de las estructuras.  
[0019]

Los ejemplos del "grupo alcadienilo C<sub>11</sub> lineal" en el  
presente documento incluyen 1,3-undecadienilo, 1,4-  
undecadienilo, 1,5-undecadienilo, 1,6-undecadienilo, 1,7-  
undecadienilo, 1,8-undecadienilo, 1,9 -undecadienilo, 1,10-  
undecadienilo, 2,4-undecadienilo, 2,5-undecadienilo, 2,6-  
undecadienilo, 2,7-undecadienilo, 2,8-undecadienilo, 2,9-  
undecadienilo, 2,10-undecadienilo , 3,5-undecadienilo, 3,6-  
undecadienilo, 3,7-undecadienilo, 3,8-undecadienilo, 3,9-  
undecadienilo, 3,10-undecadienilo, 4,6-undecadienilo, 4,7-  
undecadienilo, 4 , 8-undecadienilo, 4,9-undecadienilo, 4,10-  
undecadienilo, 5,7-undecadienilo, 5,8-undecadienilo, 5,9-  
undecadienilo, 5,10-undecadienilo, 6,8-undecadienilo, 6,9-  
undecadienilo, 6,10-undecadienilo, 7,9-undecadienilo, 7,10-

undecadienilo y 8,10-undecadienilo. Si bien cada uno de estos grupos alcadienilo  $C_{11}$  lineales tiene dos enlaces dobles carbono-carbono, y por lo tanto, los enlaces dobles carbono-carbono pueden formar independientemente una estructura cis y una estructura trans, cada enlace doble carbono-carbono puede formar cualquiera de las estructuras.

[0020]

Los ejemplos preferidos de  $n$  y las líneas onduladas en la fórmula (I) son los siguientes.

$n$  es preferiblemente un número entero de 3 a 5, y más preferiblemente 3.

Cada una de las líneas de onda son preferiblemente un enlace cis.

[0021]

Los ejemplos preferidos específicos del compuesto (I) son los siguientes.

Compuesto (A): un compuesto tal que  $n$  es un número entero de 3 a 5,  $R$  es un grupo alqueno  $C_{7-11}$  lineal en una estructura cis, y cada una de las líneas onduladas es un enlace cis.

Compuesto (B): un compuesto tal que  $n$  es 4,  $R$  es un grupo alcadienilo  $C_{11}$  lineal en el que cada uno de los dos enlaces dobles carbono-carbono forma una estructura cis, y cada una de las líneas onduladas es un enlace cis.

Compuesto (C): un compuesto tal que n es 2 o 3, R es un grupo alquilo lineal C1-5, y cada una de las líneas onduladas es un enlace cis.

[0022]

Los ejemplos específicos más preferidos del compuesto (I) son los siguientes.

Compuesto (A1): un compuesto tal que n es un número entero de 3 a 5, R es 5-heptenilo, 7-nonenilo o 9-undecenilo en la estructura cis, y cada una de las líneas onduladas es un enlace cis.

Compuesto (B1): un compuesto tal que n es 4, R es 2,5-undecadienilo en el que cada uno de los dos enlaces dobles carbono-carbono forma una estructura cis, y cada una de las líneas onduladas es un enlace cis.

Compuesto (C1): un compuesto tal que n es 2 o 3, R es metilo, propilo o pentilo, y cada una de las líneas onduladas es un enlace cis.

[0023]

La sal del compuesto (I) es, preferiblemente, una sal farmacológicamente aceptable, y sus ejemplos incluyen sales con una base inorgánica, sales con una base orgánica, sales con un ácido inorgánico, sales con un ácido orgánico y sales con un amino básico o ácido.

[0024]

Los ejemplos preferidos de sales con una base inorgánica incluyen sales de metales alcalinos como sales de sodio y sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos como las sales de calcio y las sales de magnesio; sales de aluminio; y sales de amonio. Se prefieren las sales de sodio, las sales de potasio, las sales de calcio y las sales de magnesio, y las más preferidas son las sales de sodio y las sales de potasio.

[0025]

Los ejemplos preferidos de sales con una base orgánica incluyen sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometanola [tris (hidroximetil)metilamina], terc-butilamina, ciclohexilamina, bencilamina, diciclohexilamina y N,N-dibenciletilendiamina.

[0026]

Los ejemplos preferidos de sales con un ácido inorgánico incluyen sales con ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Se prefieren sales con ácido clorhídrico y sales con ácido fosfórico.

[0027]

Los ejemplos preferidos de sales con un ácido orgánico incluyen sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido

trifluoroacético, ácido ftálico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, y ácido p-toluenosulfónico.

[0028]

Los ejemplos preferidos de sales con un aminoácido básico incluyen sales con arginina, lisina y ornitina.

[0029]

Los ejemplos preferidos de sales con un aminoácido ácido incluyen sales con ácido aspártico y ácido glutámico.

[0030]

En la presente invención, el compuesto de la presente invención puede utilizarse como un lípido catiónico. El lípido catiónico puede formar un complejo con una pluralidad de moléculas en un solvente o medio de dispersión. El complejo puede contener un componente adicional además del compuesto de la presente invención. Los ejemplos del componente adicional incluyen un componente lipídico adicional y un ácido nucleico.

[0031]

Los ejemplos del componente lipídico adicional incluyen lípidos estructurales capaces de constituir una partícula lipídica. Para dicho lípido estructural, por

ejemplo, se puede utilizar al menos uno seleccionado del grupo que consiste en lo siguiente:

esteroles (por ejemplo, colesterol, colesteril éster, colesteril hemisuccinato);

fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina (por ejemplo, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, dilinolenoilfosfatidilcolina, MC-1010 (NOF CORPORATION), MC-2020 (NOF CORPORATION), MC-4040 (NOF CORPORATION)), fosfatidilserina (por ejemplo, dipalmitoilfosfatidilserina, diestearoilfosfatidilserina, dioleoilfosfatidil serina, palmitoiloleoilfosfatidilserina), fosfatidiletanolamina (por ejemplo, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, diestearoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidiletanolamina, palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina), fosfatidilinositol, ácido fosfatídico); y

lípidos de polietilenglicol (lípidos PEG) (por ejemplo, PEG-DAA, PEG-DAG, PEG-fosfolípido conjugado, PEG-Cer, PEG-colesterol, PEG-C-DOMG, 2KPEG-CMG, GM-020 (NOF CORPORATION), GS -020 (NOF CORPORATION), GS-050 (NOF CORPORATION)). En la presente invención, se prefiere utilizar los tres, a saber,

un estero1 (en particular, colesterol), un fosfolípido (en particular, fosfatidilcolina) y un lípido de polietilenglicol, como el lípido estructural.

[0032]

La relación entre el compuesto de la presente invención y el lípido estructural en el componente lipídico mixto que constituye la partícula lipídica de la presente invención puede controlarse apropiadamente de acuerdo con el propósito o uso. Por ejemplo, la proporción del lípido estructural es típicamente de 0,008 a 4 moles y preferiblemente de 0,4 a 1,5 moles por mol del compuesto de la presente invención. En otra definición de relaciones en el componente lipídico mixto, la cantidad del compuesto de la presente invención es normalmente de 1 a 4 moles, la del estero1 es normalmente de 0 a 3 moles, la del fosfolípido es normalmente de 0 a 2 moles, y la del lípido de polietilenglicol es normalmente de 0 a 1 mol. En una realización más preferida con el uso de una mezcla del compuesto de la presente invención y componentes lipídicos adicionales, con respecto a las proporciones, la cantidad del compuesto de la presente invención es de 1 a 1,5 moles, la del estero1 es de 0 a 1,25 mol, la del fosfolípido es de 0 a 0,5 mol, y la del lípido de polietilenglicol es de 0 a 0,125 mol.

[0033]

El compuesto de la presente invención puede utilizarse para producir la partícula lipídica de la presente invención. La partícula lipídica de la presente invención se refiere al complejo descrito anteriormente pero que no contiene ácido nucleico. La forma de la partícula lipídica de la presente invención no se limita a una forma particular, y el alcance incluye un complejo en el que el compuesto de la presente invención y, así sucesivamente, se ensamblan para formar una esfera; un complejo en el que el compuesto de la presente invención y, así sucesivamente, se ensambla sin formar una forma particular; un complejo en el que el compuesto de la presente invención y, así sucesivamente, se disuelven en un solvente; y un complejo en el que el compuesto de la presente invención y, así sucesivamente, se dispersan homogénea o heterogéneamente en un medio de dispersión.

[0034]

La partícula lipídica de la presente invención (por ejemplo, una partícula lipídica compuesta por el compuesto de la presente invención y lípidos estructurales distintos del compuesto) se puede utilizar, por ejemplo, para producir la composición de la presente invención que contiene la partícula lipídica y un ácido nucleico (particularmente, un ácido nucleico como sustancia útil para aplicaciones

farmacéuticas o aplicaciones para investigación). La composición de la presente invención puede usarse como un fármaco o un reactivo. Se prefiere para la composición de la presente invención que la partícula lipídica encapsule un ácido nucleico en una proporción lo más alta posible (es decir, en una proporción de encapsulación alta).

[0035]

El "ácido nucleico" puede ser cualquier molécula en la que se polimerizan moléculas de nucleótido o moléculas que tienen funciones equivalentes a las del nucleótido, y ejemplos de las mismas incluyen ARN, que es un polímero de ribonucleótido; ADN, que es un polímero de desoxirribonucleótido; un polímero de una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos; y un polímero de nucleótidos que incluye un análogo de nucleótido. Además, el ácido nucleico puede ser un polímero nucleótido que incluye un derivado de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario. El concepto del ácido nucleico bicatenario abarca un ácido nucleico bicatenario de manera que una cadena hibrida con la otra cadena en condiciones rigurosas.

[0036]

El análogo de nucleótido puede ser cualquier molécula obtenida modificando ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos,

ARN o ADN para mejorar la resistencia a nucleasas, estabilizar, mejorar la afinidad con un ácido nucleico de cadena complementaria o mejorar la permeabilidad celular en comparación con ARN o ADN, o para visualización. El análogo de nucleótido puede ser una molécula natural o una molécula no natural, y sus ejemplos incluyen un análogo de nucleótido modificado con azúcar y un análogo de nucleótido modificado con enlace fosfodiéster.

[0037]

El análogo de nucleótido modificado con azúcar puede ser cualquiera obtenido por adición o sustitución con una sustancia que tiene una estructura química arbitraria para una parte o la totalidad de la estructura química del azúcar de un nucleótido. Ejemplos específicos de los mismos incluyen un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-metilribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-propilribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-metoxietoxiribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-metoxietilribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-[2-(guanidinio)etil]ribosa, un análogo de nucleótido sustituido con 2'-O-fluororibosa, un ácido nucleico artificial reticulado provisto de dos estructuras cíclicas mediante la introducción de una estructura reticulada en la fracción de azúcar (ácido nucleico puenteado) (BNA, por sus

siglas en inglés), más específicamente, un ácido nucleico artificial bloqueado en el que el átomo de oxígeno en la posición 2' y el átomo de carbono en la posición 4' se reticulan a través de metileno (ácido nucleico bloqueado) (LNA, por sus siglas en inglés) y un etileno ácido nucleico artificial reticulado (ácido nucleico con puente de etileno) (ENA, por sus siglas en inglés) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)], además, un péptido ácido nucleico (PNA, por sus siglas en inglés) [Acc. Chem Res., 32, 624 (1999)], an oxypeptide nucleic acid (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)], and a peptide ribonucleic acid (PRNA) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)].

[0038]

El análogo de nucleótido modificado con enlace fosfodiéster puede ser cualquiera obtenido por adición o sustitución con una sustancia química arbitraria para una parte o la totalidad de la estructura química del enlace fosfodiéster de un nucleótido. Ejemplos específicos de los mismos incluyen un análogo de nucleótido sustituido con un enlace de fosforotioato, y un análogo de nucleótido sustituido con un enlace de fosforamidato N3'-P5' [Saibo Kogaku (en japonés, título traducido: Ingeniería celular), 16, 1463-1473 (1997)] [RNAi and Antisense Strategies, KODANSHA LTD. (2005)].

[0039]

El derivado de ácido nucleico puede ser cualquier molécula obtenida agregando a un ácido nucleico otra sustancia química para mejorar la resistencia a la nucleasa, estabilizar, mejorar la afinidad con un ácido nucleico de cadena complementaria o mejorar la permeabilidad celular en comparación con el ácido nucleico, o para visualización. Ejemplos específicos de los mismos incluyen un derivado con 5'-poliamina agregada, un derivado con colesterol agregado, un derivado con esteroide agregado, un derivado con ácido biliar agregado, un derivado con vitamina agregada, un derivado con Cy5 agregado, un derivado con Cy3 agregado, un derivado con 6-FAM agregado y un derivado con biotina agregada.

[0040]

El ácido nucleico en la presente invención no se limita a un ácido nucleico particular, y puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, con el fin de mejorar una enfermedad, un síntoma o un trastorno, y mitigar una enfermedad, un síntoma, un trastorno o afección patológica o la prevención de su aparición (en el presente documento, en ocasiones denominado "tratamiento o similares de una enfermedad"), o un ácido nucleico para regular la expresión de una proteína

deseada que es útil para la investigación, aunque la proteína no contribuya al tratamiento o similares de una enfermedad.

[0041]

Los genes o polinucleótidos relacionados con enfermedades (denominados ocasionalmente en el presente documento como "genes relacionados con enfermedades) se encuentran disponibles, por ejemplo, del McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Universidad Johns Hopkins (Baltimore, Md.) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.)

[0042]

Los ejemplos específicos del ácido nucleico en la presente invención incluyen ARNNip, ARNhc, miARN, imitadores de miARN, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, ARNm, ácidos nucleicos señuelo, aptámeros, ADN plasmídicos, ADN cósmidos y ADN BAC. El ácido nucleico es preferiblemente un ARN tal como un ARNip y un ARNm o un análogo o derivado obtenido modificando artificialmente un ARN.

[0043]

En la presente invención, el "ARNip" se refiere a un ARN bicatenario o un pariente del mismo que consta de 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente de 15 a 25 nucleótidos, y que incluya secuencias complementarias. El ARNip incluye nucleótidos sobresalientes preferiblemente de uno a tres

nucleótidos, más preferiblemente de dos nucleótidos, en el extremo 3'. La porción de secuencias complementarias puede ser totalmente complementaria o incluir nucleótidos no complementarios, pero preferiblemente son completamente complementarios.

[0044]

El ARNip en la presente invención no se limita a un ARNip particular y, por ejemplo, se puede utilizar un ARNip para la reducción de la expresión génica frente a un gen relacionado con enfermedades. Un gen relacionado con enfermedades se refiere a cualquier gen o polinucleótido que genera un producto de transcripción o traducción en un nivel anormal o de forma anormal en células derivadas del tejido de un paciente, en comparación con los tejidos o células de un control sin enfermedades. Para el ARNip de la presente invención, se puede utilizar un ARNip para regular la expresión de una proteína útil para la investigación.

[0045]

En la presente invención, el término "ARNm" se refiere a un ARN que incluye una secuencia de nucleótidos que se puede traducir en una proteína. El ARNm en la presente invención no se limita a un ARNm particular, y puede ser cualquier ARNm capaz de expresar una proteína deseada en las células. El ARNm es preferiblemente un ARNm útil para

aplicaciones farmacéuticas (por ejemplo, aplicaciones de tratamiento de enfermedades) o aplicaciones para investigación, y los ejemplos de tales ARNm incluyen un ARNm para expresar una proteína marcadora como la luciferasa en las células.

[0046]

La enfermedad no se limita a una enfermedad particular, y los ejemplos de la enfermedad incluyen las enfermedades listadas a continuación. Los contenidos en cada “( )” son ejemplos del gen relacionado a enfermedades correspondiente, excepto en el caso de que se enumeren ejemplos específicos de enfermedades. Otro ejemplo del ácido nucleico en la presente invención es un ácido nucleico que regula el nivel de expresión de cualquiera de aquellos genes relacionados con enfermedades (o una proteína codificada por el gen relacionado con enfermedades).

(1) Enfermedades del sistema sanguíneo [anemia (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT), síndrome del linfocito desnudo (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5), enfermedades hemorrágicas (TBXA2R, P2RX1, P2X1), deficiencias de factor H y factor 1 tipo H (HF1, CFH, HUS), deficiencias del factor V y factor VIII (MCFD2), deficiencia de factor VII (F7), deficiencia de

factor X (F10), deficiencia de factor XI (F11), deficiencia de factor XII (F12, HAF), deficiencia de factor XIII A (F13A1, F13A), deficiencia de factor XIII B (F13B), anemia de Fanconi (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FACE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596), linfocitosis hemofagocítica (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3), hemofilia A, (F8, F8C, HEMA), hemofilia B (F9, HEMB), trastornos hemorrágicos (PI, ATT, F5), deficiencia de leucocitos (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4), anemia de células falciformes (HBB), talasemia (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1), y así sucesivamente];

(2) enfermedades inflamatorias/inmunológicas [SIDA (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1), síndrome linfoproliferativo autoinmune (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A), inmunodeficiencia combinada (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4), infección por VIH (CCL5, SCYA5, D17S135E, TCP228, IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, DMKBR5, CCKR5, CCR5), inmunodeficiencia (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPEX, AIID, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TACI), inflamación (IL10, IL-1, IL-13, IL-17, IL-23, CTLA4), inmunodeficiencia combinada grave (JAK3, JAKL, DCLRE1C, ATREMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA,

IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4), artritis reumatoide, psoriasis, enfermedades inflamatorias intestinales (por ejemplo, Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de Sjogren, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, lupus eritematoso discoide, enfermedad de Castleman, espondilitis anquilosante, polimiositis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, enfermedad mixta del tejido conectivo, dermatosclerosis, lupus profundo, tiroiditis crónica, enfermedad de Graves, gastritis autoinmune, diabetes mellitus tipo I y tipo II, anemia hemolítica autoinmune, neutropenia autoinmune, trombocitopenia, dermatitis atópica, hepatitis crónica activa, miastenia gravis, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Addison, respuesta inmune anormal, artritis, dermatitis, radiodermatitis, cirrosis biliar primaria, etc.];

(3) enfermedades metabólicas/hepáticas/renales [neuropatía amiloidea (TTR, PALB), amiloidosis (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB), esteatohepatitis no alcohólica y fibrosis hepática (COL1A1 ), cirrosis (KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988), fibrosis quística (CFTR, ABCC7, CF, MRP7), enfermedad de almacenamiento de glucógeno (SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL , GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM), adenoma

hepatocelular (TCF1, HFN1A, MODY3), insuficiencia hepática (SCOD1, SCO1), deficiencia de lipasa hepática (LIPC), hepatoblastoma (CTNNB1, PDGRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, PDF, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5), enfermedad renal quística medular (UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2), fenilcetonuria (PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS), enfermedades de riñón multiquístico y de hígado (FCYT, PKHD1, APRKD, PDK1, PDK2, PDK4, PDKTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63), etc.];

(4) enfermedades del sistema nervioso [ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF), enfermedad de Alzheimer (APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLA2, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3), autismo (BZRAP1, MDGA2, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, NLGN4, NLGN4 KIAA1260, AUTSX2), síndrome X frágil (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5), enfermedad de Huntington (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17), enfermedad de Parkinson (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, DBH, NDUFV2), síndrome de Rett (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9), esquizofrenia (GSK3, 5-HTT, COMT, DRD, SLC6A3, DAOA, DTNBP1), trastorno relacionado con secretasa (APH-1), etc.];

(5) enfermedades oculares [degeneración macular relacionada con la edad (Abcr, Ccl2, cp, Timp3, catepsina D, Vldlr, Ccr2),

cataratas (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BSFP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, CTPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYG4, CRYG4 CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1), opacidad corneal (APOA1, TGFB1, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TASTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PP, RINX KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD), córnea plana congénita hereditaria (KERA, CNA2), glaucoma (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A1, GLC3 , NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A), amaurosis congénita de Leber (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12) , distrofia macular (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2), etc.]; y

(6) enfermedades neoplásicas [tumor maligno, glaucoma neovascular, hemangioma infantil, mieloma múltiple, sarcoma crónico, melanoma metastásico, sarcoma de Kaposi, angioproliferación, caquexia, metástasis o similares de cáncer de mama, cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer colorrectal familiar, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis, tumor del estroma gastrointestinal), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células

pequeñas, mesotelioma maligno), mesotelioma, cáncer de páncreas (por ejemplo, carcinoma ductal pancreático), cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células adenoscamosas), cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma ductal de mama invasivo, carcinoma ductal de mama no invasivo, carcinoma de mama inflamatorio), cáncer de ovario (por ejemplo, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales extragonadales, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo grado), cáncer de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata dependiente de hormonas, cáncer de próstata independiente de hormonas), cáncer de hígado (por ejemplo, cáncer primario de hígado, cáncer de conducto biliar extra hepático), cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer medular de tiroides), cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales, carcinoma de células transicionales de pelvis renal y uréter), cáncer uterino, tumor cerebral (por ejemplo, astrocitoma pineal, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico), melanoma, sarcoma, cáncer de vejiga, cáncer hematológico o similares, incluyendo mieloma múltiple, adenoma hipofisario, glioma, neurinoma acústico, sarcoma de retina, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de lengua, timoma, carcinoma esofágico, cáncer duodenal, cáncer de colon, cáncer rectal, carcinoma hepatocelular, tumor

endocrino pancreático, cáncer de conducto biliar, cáncer de vesícula biliar, cáncer de pene, cáncer ureteral, tumor testicular, carcinoma vulvar, cáncer de cuello uterino, carcinoma del cuerpo uterino, sarcoma uterino, enfermedad trofoblástica, cáncer vaginal, cáncer de piel, micosis fungoide, basalioma, sarcoma de partes blandas, linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, síndrome mielodisplásico, leucemia de células T en adultos, enfermedad mieloproliferativa crónica, tumor endocrino pancreático, histiocitoma fibroso, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de sitio primario desconocido), leucemia (por ejemplo, leucemia aguda (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda), leucemia crónica (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica (síndrome mielodisplásico), sarcoma uterino (por ejemplo, tumor mixto mesodérmico uterino, leiomiosarcoma uterino, tumor del estroma endometrial), mielofibrosis, etc.]

[0047]

La composición de la presente invención como fármaco puede producirse utilizando un método conocido en el arte de la formulación de fármacos con un portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de la forma farmacéutica del fármaco incluyen formulaciones para administración parenteral (por ejemplo, un líquido, como una inyección) mezclado con un

auxiliar convencional tal como un agente tamponador o un estabilizador; y formulaciones para administración tópica, como una pomada, una crema, un líquido y un yeso, mezclados con un portador farmacéutico convencional.

[0048]

La composición de la presente invención puede utilizarse para la introducción de un ingrediente activo en diversos tipos de células, tejidos u órganos. Los ejemplos de células a las que se puede aplicar la composición de la presente invención incluyen células madre mesenquimales, células madre neurales, células madre de la piel, esplenocitos, células nerviosas, células gliales, células B pancreáticas, células de médula ósea, células mesangiales, células de Langerhans, células epidérmicas, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, células de fibra, células musculares (por ejemplo, células del músculo esquelético, células del músculo cardíaco, mioblastos, células satélite musculares, células del músculo liso), células adiposas, células sanguíneas (por ejemplo, macrófagos, células T, Células B, células asesinas naturales, mastocitos, leucocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, megacariocitos, células madre hematopoyéticas), sinoviocitos, condrocitos, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células mamarias, hepatocitos o células del estroma, óvulos,

espermatozoides, o células precursoras capaces de inducir la diferenciación en estas células, células madre (por ejemplo, incluyendo células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre embrionarias (células ES)), células germinales primordiales, ovocitos y óvulos fecundados. Los ejemplos de tejidos u órganos a los que se puede aplicar la composición de la presente invención incluyen todos los tejidos u órganos en los que están presentes las células anteriores, por ejemplo, cerebro, sitios del cerebro (por ejemplo, el bulbo olfatorio, las amígdalas, el ganglio basal, el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, el núcleo subtalámico, la corteza cerebral, el bulbo raquídeo, el cerebelo, el lóbulo occipital, el lóbulo frontal, el lóbulo temporal, el putamen, el núcleo caudado, el cuerpo calloso, la sustancia negra, la médula espinal, la glándula pituitaria, el estómago, el páncreas, el riñón, el hígado, la gónada, la tiroides, la vesícula biliar, la médula ósea, la glándula suprarrenal, la piel, el pulmón, el tracto digestivo (por ejemplo, el intestino grueso, el intestino delgado), el vaso sanguíneo, el corazón, el timo, el bazo, la glándula submandibular, la sangre periférica, las células de sangre periférica, la próstata, la placenta, el útero, los huesos, las articulaciones y los músculos (por ejemplo, el músculo esquelético, el músculo liso y el músculo cardíaco). Esas

células, tejidos u órganos pueden ser células cancerosas, tejidos cancerosos o similares que se han vuelto cancerosos.

[0049]

La composición de la presente invención es particularmente superior en eficiencia para introducir un ácido nucleico en células cancerosas.

[0050]

El compuesto, la partícula lipídica y la composición de la presente invención son estables y tienen baja toxicidad y pueden utilizarse de manera segura. Al usar la composición de la presente invención in vivo, o al usar la composición como un fármaco, la composición se administra adecuadamente a un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano (preferiblemente, un ser humano)) de modo que una cantidad efectiva del ácido nucleico puede ser suministrado a las células objetivo.

[0051]

Al usar la composición de la presente invención in vivo, o al usar la composición como fármaco, la composición puede administrarse por vía oral o parenteral (por ejemplo, administración local, rectal o intravenosa) administrada de manera segura en forma de una forma farmacéutica tal como tabletas (incluyendo tabletas recubiertas de azúcar, tabletas recubiertas con película, tabletas sublinguales, tabletas que

se desintegran por vía oral), polvos, gránulos, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas, micro cápsulas), líquidos, grageas, jarabes, emulsiones, suspensiones, inyecciones (por ejemplo, inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraperitoneales), formulaciones tópicas (por ejemplo, formulaciones para administración nasal, formulaciones transdérmicas, pomadas), supositorios (por ejemplo, supositorios rectales, supositorios vaginales), gránulos, formulaciones nasales, formulaciones pulmonares (inhalaciones), e infusiones. Cada formulación puede ser una formulación de liberación controlada como una formulación de liberación rápida y una formulación de liberación sostenida (por ejemplo, una micro cápsula de liberación sostenida).

[0052]

Ahora, se describirá un método para producir el compuesto de la presente invención.

[0053]

Cada una de las materias primas y de los reactivos utilizados en cada paso del método de producción a continuación, y el compuesto resultante puede formar una sal. Los ejemplos de tales sales son los mismos que las sales mencionadas anteriormente para el compuesto de la presente invención.

[0054]

Cuando un compuesto obtenido en cada etapa es un compuesto libre, el compuesto se puede convertir en una sal prevista utilizando un método conocido. Por el contrario, cuando un compuesto obtenido en cada etapa es una sal, el compuesto puede convertirse en una forma libre u otra sal prevista utilizando un método conocido.

[0055]

Un compuesto obtenido en cada paso puede utilizarse para la reacción posterior directamente como una solución de reacción, o puede obtenerse un producto bruto a partir de la misma y utilizarse para la reacción posterior. Como alternativa, un compuesto obtenido en cada paso puede aislarse o purificarse a partir de una mezcla de reacción, de acuerdo con un método convencional, utilizando medios de separación tales como concentración, cristalización, recristalización, destilación, extracción con solventes, destilación fraccionada y cromatografía.

[0056]

Si un compuesto como materia prima o reactivo en cada paso está disponible comercialmente, el producto disponible comercialmente puede utilizarse de manera directa.

[0057]

El tiempo de reacción para la reacción en cada paso, que puede variar dependiendo de los reactivos y solventes a utilizar, es normalmente de 1 minuto a 48 horas, y preferiblemente de 10 minutos a 8 horas, a menos que se especifique lo contrario.

[0058]

La temperatura de reacción para la reacción en cada paso, la cual puede variar dependiendo de los reactivos y de los solventes a utilizar, es normalmente de -78 °C a 300 °C, y preferiblemente de -78 °C a 150 °C, a menos que se especifique lo contrario.

[0059]

La presión para la reacción en cada paso, que puede variar dependiendo de los reactivos y de los solventes a utilizar, es normalmente de 1 atm a 20 atm, y, preferiblemente, de 1 atm a 3 atm, a menos que se especifique lo contrario.

[0060]

Un aparato de síntesis de microondas tal como un Iniciador producido por Biotage se usa ocasionalmente en reacción en un paso. La temperatura de reacción, la cual puede variar dependiendo de los reactivos y de los solventes a utilizar, es normalmente temperatura ambiente a 300 °C, preferiblemente, temperatura ambiente a 250 °C, y más

preferiblemente, 50 °C a 250 °C, a menos que se especifique lo contrario. El tiempo de reacción, que puede variar dependiendo de los reactivos y de los solventes a utilizar, es típicamente de 1 minuto a 48 horas, y, preferiblemente, de 1 minuto a 8 horas, a menos que se especifique lo contrario.

[0061]

En la reacción en cada paso, se utiliza un reactivo en una cantidad de 0,5 equivalentes a 20 equivalentes, preferiblemente, en una cantidad de 0,8 equivalentes a 5 equivalentes, a la cantidad de un sustrato, a menos que se especifique lo contrario. Cuando se utiliza un reactivo como catalizador, el reactivo se utiliza en una cantidad de 0,001 equivalentes a 1 equivalente, preferiblemente, en una cantidad de 0,01 equivalentes a 0,2 equivalentes, a la cantidad de un sustrato, a menos que se especifique lo contrario. Si un reactivo sirve como solvente de reacción en combinación con su propio papel, el reactivo se utiliza en una cantidad como disolvente.

[0062]

En la reacción en cada paso, la reacción se realiza sin solvente, o en un solvente apropiado disolviendo o suspendiendo reactivos en el mismo, a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos del solvente incluyen

los solventes descritos en los ejemplos y los siguientes disolventes.

[0063]

Alcoholes: metanol, etanol, isopropanol, isobutanol, alcohol terc-butílico, 2-metoxietanol, etc.,

éteres: éter dietílico, éter diisopropílico, éter difenílico, tetrahidrofurano, 1,2-dimetoxietano, etc.,

hidrocarburos aromáticos: clorobenceno, tolueno, xileno, etc.,

hidrocarburos saturados: ciclohexano, hexano, heptano, etc.,

amidas: N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, etc.,

hidrocarburos halogenados: diclorometano, tetracloruro de carbono, etc.,

nitrilos: acetonitrilo, etc.,

sulfóxidos: dimetilsulfóxido, etc.,

bases orgánicas aromáticas: piridina, etc.,

anhídrido de ácido: anhídrido acético etc.,

ácidos orgánicos: ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, etc.,

ácidos inorgánicos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, etc.,

ésteres: acetato de etilo, acetato de isopropilo, etc.,

cetonas: acetona, metil etil cetona, etc., y

agua.

Dos o más de estos solventes se pueden mezclar para usar con una proporción apropiada.

[0064]

Cuando se utiliza una base en reacción en cada paso, por ejemplo, se utiliza cualquiera de las bases listadas a continuación o las bases descritas en los ejemplos.

[0065]

Bases inorgánicas: hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, etc.,

Sales básicas: carbonato de sodio, carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, etc.,

bases orgánicas: trietilamina, dietilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina, N,N-dimetilanilina, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno, imidazol, piperidina, etc.,

alcóxidos metálicos: etóxido de sodio, terc-butóxido de potasio, terc-butóxido de sodio, etc.,

hidruros de metales alcalinos: hidruro de sodio etc.,

amidas metálicas: amida de sodio, diisopropilamida de litio, hexametildisilazida de litio, etc., y

organolitios: n-butil-litio, sec-butil-litio, etc.

[0066]

Cuando un ácido un catalizador ácido se utiliza en reacción en cada paso, por ejemplo, se utiliza cualquiera de los ácidos y catalizadores ácidos listados a continuación y ácidos y catalizadores ácidos descritos en los ejemplos.

[0067]

ácidos inorgánicos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, etc.,

ácidos orgánicos: ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido p-toluenosulfónico, ácido 10-alcanforsulfónico, etc., y

ácidos de Lewis: complejo de dietiléter de trifluoruro de boro y yoduro de zinc, cloruro de aluminio anhidro, cloruro de zinc anhidro, cloruro de hierro anhidro etc.,

[0068]

A menos que se especifique lo contrario, la reacción en cada paso se realiza de acuerdo con un método conocido como el método descrito en The Fifth Series of Experimental Chemistry, Vol. 13 a 19 (The Chemical Society of Japan (ed.)); Shin Jikken Kagaku Koza (en Japonés, título traducido: Nueva Química Experimental), Vol. 14 and 15 (The Chemical Society of Japan (ed.)); Seimitsu Yuki Kagaku (en Japonés, título traducido: Química Orgánica Precisa, título original: Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium) 2° Edición revisada (L.

F. Tietze, Th. Eicher, Nankodo Co., Ltd.); Organic Name Reaction; The Reaction Mechanism and Essence Edición Revisada (TOGO, Hideo, KODANSHA LTD.); ORGANIC SYNTHESSES Collective Volumen I a VII (John Wiley & Sons Inc.); Modern Organic Synthesis in the Laboratory A Collection of Standard Experimental Procedures (Jie Jack Li, Oxford University Pres); Comprehensive Heterocyclic Chemistry III, Vol. 1 a Vol. 14 (Elsevier Japan K.K.); Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis (Supervisor de traducción: TOMIOKA, Kiyoshi, editorial: Kagaku-Dojin Publishing Company, INC.); Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc.) (1989); o similares, o de acuerdo con un método descrito en los ejemplos.

[0069]

La protección o de desprotección para un grupo funcional en cada paso se realiza de acuerdo con un método conocido como el método descrito en "Protective Groups in Organic Synthesis, 4° Ed." (Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts) publicado por Wiley-Interscience Publication, 2007; "Protecting Groups 3° Ed." (P. J. Kocienski) publicado por Thieme Medical Publishers, 2004; o similares, o de acuerdo con un método descrito en los ejemplos.

[0070]

Los ejemplos de grupos protectores para un grupo hidroxilo de alcoholes o similares, y de grupos hidroxilo fenólicos incluyen grupos protectores de tipo éter tales como metoximetil éter, bencil éter, p-metoxibencil éter, t-butildimetilsilil éter, t-butildifenilsilil éter y tetrahidropiranyl éter; grupos protectores de tipo carboxilato tales como acetato; ésteres de tipo sulfonato tales como metanosulfonato; y grupos protectores de tipo carbonato tales como carbonato de t-butilo.

[0071]

Los ejemplos de grupos protectores para un grupo carbonilo de aldehídos incluyen grupos protectores de tipo acetal tales como dimetilacetal; y grupos protectores cíclicos de tipo acetal tales como 1,3-dioxano cíclico.

[0072]

Los ejemplos de grupos protectores para un grupo carbonilo de cetonas incluyen grupos protectores de tipo cetal tales como dimetil cetal; grupos protectores de tipo cetal cíclicos tales como 1,3-dioxano cíclico; grupos protectores de tipo oxima tales como O-metiloxima; y grupos protectores de tipo hidrazona tales como N,N-dimetilhidrazona.

[0073]

Los ejemplos de grupos protectores para un grupo carboxi incluyen grupos protectores de tipo éster tales como

éster metílico; y grupos protectores de tipo amida tales como N, N-dimetilamida.

[0074]

Los ejemplos de grupos protectores para tiol incluyen grupos protectores de tipo éter tales como bencil tioéter; y grupos protectores de tipo éster tales como tioacetato, tiocarbonato y tiocarbamato.

[0075]

Los ejemplos de grupos protectores para un grupo amino y heterociclos aromáticos tales como imidazol, pirrol e indol incluyen grupos protectores de tipo carbamato tales como bencilcarbamato; grupos protectores de tipo amida tales como acetamida; grupos protectores de tipo alquilamina tales como N-trifenilmetilamina; y grupos protectores de tipo sulfonamida tales como metanosulfonamida.

[0076]

La eliminación de un grupo protector se puede realizar utilizando un método conocido como un método que utiliza un ácido, una base, luz ultravioleta, hidrazina, fenilhidrazina, N-metilditiotiocarbamato de sodio, fluoruro de tetrabutilamonio, acetato de paladio o haluro de trialquilsililo (por ejemplo, yoduro de trimetilsililo). , bromuro de trimetilsililo), o mediante el uso de un método de reducción.

[0077]

Los ejemplos de reductores que se utilizarán cuando se realice la reacción de reducción en cada paso incluyen hidruros metálicos como el hidruro de litio y aluminio, triacetoxiborohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, diisobutilaluminio (DIBAL-H), borohidruro de sodio y triacetoxiborohidruro de tetrametilamonio; boranos como un complejo borano-tetrahidrofurano; níquel Raney; cobalto Raney; hidrógeno y ácido fórmico. Por ejemplo, el níquel Raney o el cobalto Raney se pueden usar en presencia de hidrógeno o de ácido fórmico. Cuando se reduce un doble enlace carbono-carbono o triple, se puede utilizar un método que usa un catalizador tal como paladio-carbono y el catalizador de Lindlar.

[0078]

Los ejemplos de oxidantes que se utilizarán cuando se realiza la reacción de oxidación en cada paso incluyen perácidos como el ácido m-cloroperbenzoico (MCPBA), peróxido de hidrógeno e hidroperóxido de t-butilo; percloratos como perclorato de tetrabutylamonio; cloratos como el clorato de sodio; cloritos como clorito de sodio; periodatos como periodato de sodio; reactivos de yodo hipervalentes como yodosilbenceno; reactivos que contienen manganeso como dióxido de manganeso y permanganato de potasio; plomos como el tetraacetato de plomo; reactivos que contienen cromo como

clorocromato de piridinio (PCC), dicromato de piridinio (PDC) y el reactivo de Jones; compuestos de halógeno como N-bromosuccinimida (NBS); oxígeno; ozono; un complejo trióxido de azufre-piridina; tetroxido de osmio; dióxido de selenio; y 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ).

[0079]

Los ejemplos de iniciadores radicales que se utilizarán cuando se realice la reacción de ciclación radical en cada paso incluyen compuestos azo tales como azobisisobutironitrilo (AIBN); iniciadores de radicales solubles en agua tales como ácido 4-4'-azobis-4-cianopentanoico (ACPA); trietilboron en presencia de aire u oxígeno; y peróxido de benzoilo. Los ejemplos de reactivos de reacción radical que se utilizarán incluyen tributilstannano, tris(trimetilsilil) silano, 1,1,2,2-tetrafenildisilano, difenilsilano y yoduro de samario.

[0080]

Los ejemplos de reactivos de Wittig que se utilizarán cuando la reacción de Wittig se realice en cada paso incluyen alquilidenefosforanos. Los alquilidenefosforanos se pueden preparar utilizando un método conocido como la reacción de una sal de fosfonio y una base fuerte.

[0081]

Los ejemplos de reactivos que se utilizarán cuando se realiza la reacción de Horner-Emmons en cada paso incluyen fosfonoacetatos como metil dimetilfosfonoacetato y etil dietilfosfonoacetato; y bases como los hidruros de metales alcalinos y organolitios.

[0082]

Los ejemplos de reactivos que se utilizarán cuando se realice la reacción Friedel-Crafts en cada paso incluyen un ácido de Lewis con un cloruro ácido o un reactivo alquilante (por ejemplo, un alquilo halogenado, un alcohol, una olefina). Como alternativa, se puede utilizar un ácido orgánico o un ácido inorgánico en lugar de un ácido de Lewis, y se puede utilizar un anhídrido de ácido tal como un anhídrido acético en lugar de un cloruro de ácido.

[0083]

Cuando se realiza una reacción de sustitución nucleófila aromática en cada paso, se utilizan como reactivos un nucleófilo (por ejemplo, una amina, imidazol) y una base (por ejemplo, una sal básica, una base orgánica).

[0084]

Los ejemplos de bases utilizadas para generar un carbanión cuando se realiza la reacción de adición nucleofílica con un carbanión, la reacción de adición 1,4 nucleófila con un carbanión (reacción de adición de Michael)

o la reacción de sustitución nucleófila con un carbanión en cada paso incluyen organolitios, alcóxidos metálicos, bases inorgánicas y bases orgánicas.

[0085]

Los ejemplos de reactivos de Grignard que se utilizarán cuando la reacción de Grignard se realiza en cada paso incluyen haluros de arilmagnesio como bromuro de fenilmagnesio; y haluros de alquilmagnesio tales como bromuro de metilmagnesio y bromuro de isopropilmagnesio. Los reactivos de Grignard pueden prepararse utilizando un método conocido como la reacción de un alquilo halogenado o arilo halogenado y magnesio metálico en un solvente de un éter o tetrahidrofurano.

[0086]

Cuando la reacción de condensación de Knoevenagel se realiza en cada paso, un compuesto de metileno activo intercalado entre dos grupos aceptadores de electrones (por ejemplo, ácido malónico, malonato de dietilo, malononitrilo) y una base (por ejemplo, una base orgánica, un alcóxido metálico, una base inorgánica ) se utilizan como reactivos.

[0087]

Cuando se realiza la reacción de Vilsmeier-Haack en cada paso, se utilizan el cloruro de fosforilo y un derivado de amida (por ejemplo, N,N-dimetilformamida) como reactivos.

[0088]

Los ejemplo de agentes azidantes que se utilizarán cuando la reacción de azidación se realice para un alcohol, un haluros de alquilo o un sulfonato en cada paso incluye difenilfosforilazida (DPPA), trimetilsililazida y azida de sodio. Cuando se azida un alcohol, por ejemplo, se puede utilizar un método que utiliza difenilfosforilazida y 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (DBU) o un método que utiliza trimetilsililazida y un ácido de Lewis.

[0089]

Los ejemplos de reductores que se utilizarán cuando se realiza la reacción de aminación reductora en cada paso incluyen triacetoxiborohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, hidrógeno y ácido fórmico. Los ejemplos de compuestos de carbonilo que se utilizarán cuando el sustrato es un compuesto de amina incluyen aldehídos, como el paraformaldehído, así como el acetaldehído, y cetonas, como la ciclohexanona. Los ejemplos de aminas que se utilizarán cuando el sustrato es un compuesto de carbonilo incluyen amoníaco; aminas primarias como la metilamina; y las aminas secundarias como la dimetilamina.

[0090]

Cuando se realiza la reacción de Mitsunobu en cada paso, se utilizan como reactivos el azodicarboxilato (por

ejemplo, azodicarboxilato de dietilo (DEAD), el azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD)) y la trifenilfosfina. [0091]

Los ejemplos de reactivos que se utilizarán cuando se realiza la reacción de esterificación, la reacción de amidación o la reacción de formación de urea en cada paso incluyen formas de acilo halogenadas como cloruros de ácido y bromuros de ácido; y ácidos carboxílicos activados como anhídridos de ácido, formas de éster activadas y formas de sulfato. Los ejemplos de activadores para ácidos carboxílicos incluyen agentes de condensación de carbodiimida como el clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSCD); agentes de condensación basados en triazina como 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio cloruro-n-hidrato (DMT-MM); agentes de condensación de carbonato como 1,1-carbonildiimidazol (CDI); difenilfosforilazida (DPPA); sal de benzotriazol-1-iloxi-trisdimetilaminofosfonio (reactivo BOP); yoduro de 2-cloro-1-metil-piridinio (reactivo de Mukaiyama); cloruro de tionilo; haloformiatos de alquilo inferior como el cloroformiato de etilo; hexafluorofosfato de O- (7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N', N'-tetrametiluronio (HATU); ácido sulfúrico; y cualquiera de sus combinaciones. Cuando se utiliza un agente de condensación de carbodiimida, se

puede agregar a la reacción un aditivo como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), la N-hidroxisuccinimida (HOSu) y la dimetilaminopiridina (DMAP).

[0092]

Los ejemplos de catalizadores metálicos que se utilizarán cuando se realice la reacción de acoplamiento en cada paso incluyen compuestos de paladio tales el acetato de paladio (II), tetrakis (trifenilfosfina)paladio (0), diclorobis (trifenilfosfina)paladio (II), diclorobis (triethylfosfina)paladio (II), tris (dibencilideneacetona) dipalladio (0), cloruro de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocenopaladio (II) y acetato de paladio (II); compuestos de níquel como la tetrakis (trifenilfosfina) níquel (0); compuestos de rodio como el cloruro de tris (trifenilfosfina) rodio (III); compuestos de cobalto; compuestos de cobre como el óxido de cobre y el yoduro de cobre (I); y compuestos de platino. Se puede agregar una base adicional a la reacción, y los ejemplos de la base incluyen bases inorgánicas y sales básicas.

[0093]

Cuando se realiza la reacción de tiocarbonilación en cada paso, el pentasulfuro de difósforo se utiliza normalmente como agente de tiocarbonilación; sin embargo, no solo el pentasulfuro de difósforo, sino también un reactivo

que tiene una estructura de 1,3,2,4-ditiadifosfetano-2,4-disulfuro como el 2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetano -2,4-disulfuro (reactivo de Lowesson).

[0094]

Los ejemplos de agentes halogenantes que se utilizarán cuando la reacción de Wohl-Ziegler se realice en cada paso incluyen N-yodosuccinimida, N-bromosuccinimida (NBS), N-clorosuccinimida (NCS), bromo y cloruro de sulfurilo. Además, la reacción puede acelerarse mediante la adición de calor, luz o un iniciador radical como el peróxido de benzoilo y el azobisisobutironitrilo.

[0095]

Los ejemplos de agentes halogenantes que se utilizarán cuando se realice la reacción de halogenación para un grupo hidroxilo en cada paso incluyen ácidos hidrohídricos y haluros ácidos de ácidos inorgánicos, específicamente, ácido clorhídrico, cloruro de tionilo, oxiclорuro de fósforo para la cloración y 48 % de ácido bromhídrico para la bromación. Se puede utilizar un método en el que se obtiene una forma de alquilo halogenado a partir de un alcohol por la acción de trifenilfosfina y tetracloruro de carbono, tetrabromuro de carbono o similares. Como alternativa, se puede utilizar un método en el que se sintetiza una forma de alquilo halogenado a través de una reacción en dos etapas de manera que un

alcohol se convierte en un sulfato y luego reacciona con bromuro de litio, cloruro de litio o yoduro de sodio.

[0096]

Los ejemplo de reactivos que se utilizarán cuando se realiza la reacción Arbuzov en cada paso incluyen alquilos halogenados como el acetato de bromoetilo; y fosfitos como el trietilfisfita y el tri(isopropil)fosfita.

[0097]

Los ejemplos de agentes sulfonantes que se utilizarán cuando se realice la reacción de sulfonación en cada paso incluyen cloruro de metanosulfonilo, cloruro de p-toluenosulfonilo, anhídrido metanosulfónico, anhídrido p-toluenosulfónico y anhídrido trifluorometanosulfónico.

[0098]

Cuando se realiza la reacción de hidrólisis en cada paso, se utiliza un ácido o una base como reactivo. Cuando se realiza la reacción de hidrólisis ácida para un éster de t-butilo, en algunos casos se agrega ácido fórmico o trietilsilano para atrapar reductivamente los cationes de t-butilo producidos como subproductos.

[0099]

Los ejemplos de agentes deshidratantes que se utilizarán cuando se realice la reacción de deshidratación en cada paso incluyen ácido sulfúrico, pentóxido de difósforo,

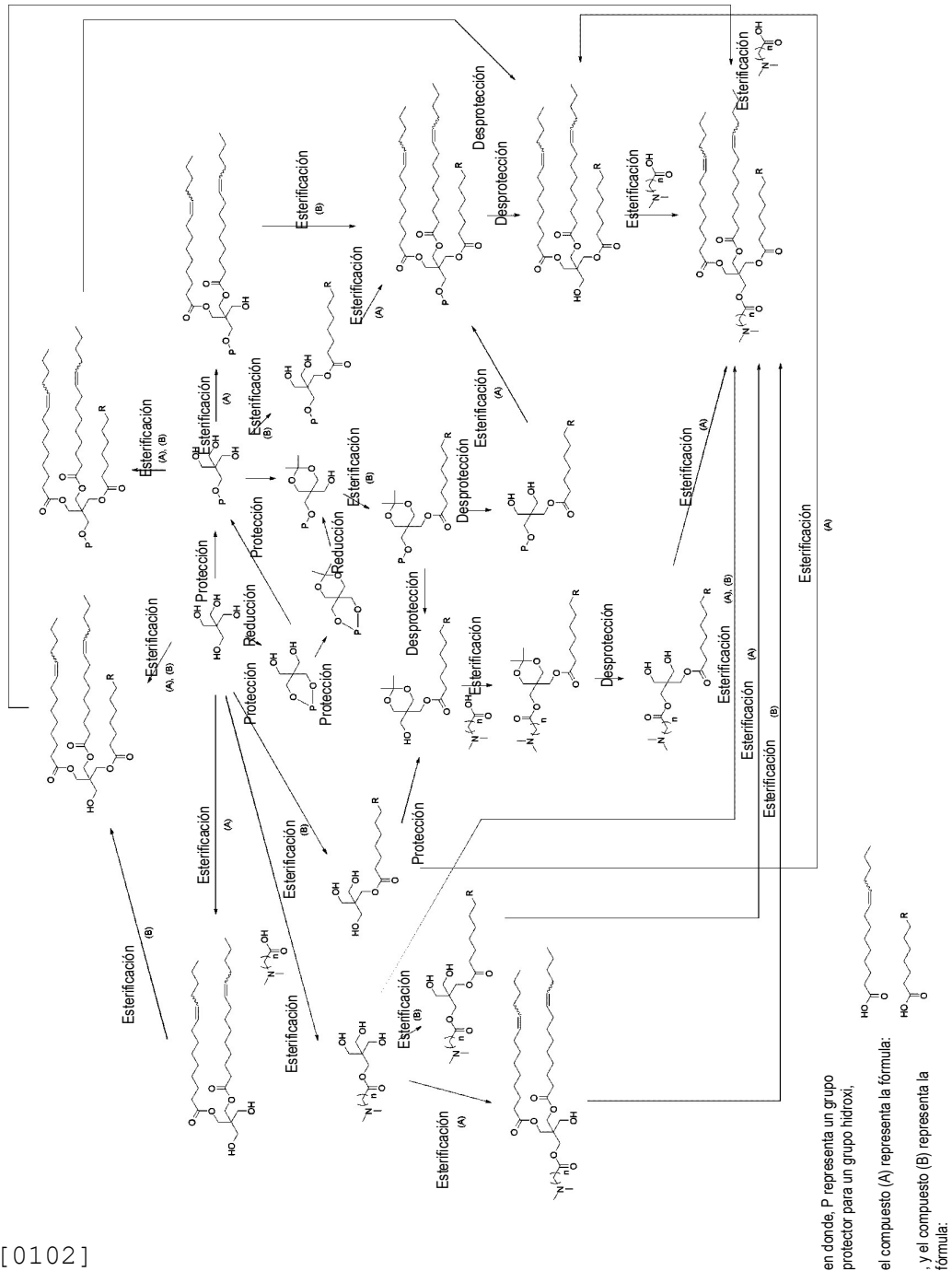
oxicloruro de fósforo, N,N'-diciclohexilcarbodiimida, alúmina y ácido polifosfórico.

[0100]

El compuesto (I) se puede producir, por ejemplo, usando un método de producción que se muestra a continuación. Entre los compuestos (I), un compuesto en el que cada una de las líneas onduladas forma una estructura cis y un compuesto en el que una o ambas líneas onduladas forman una estructura trans se pueden producir utilizando el mismo método de producción que el método de producción que se muestra a continuación. En la presente invención, el compuesto (I) con una estructura deseada puede sintetizarse utilizando una materia prima apropiada para la estructura deseada del compuesto (I), particularmente en la esterificación. Se puede obtener una sal del compuesto (I) mediante la mezcla apropiada con una base inorgánica, una base orgánica, un ácido orgánico o un aminoácido básico o ácido.

[0101]

[Fórmula 4]



[0102]

Ahora, se describirá un método para producir una partícula lipídica que contiene el compuesto de la presente invención y para producir una composición que contiene la

partícula lipídica y un ácido nucleico para la introducción de ácido nucleico.

[0103]

La partícula lipídica de la presente invención se puede producir mezclando el compuesto de la presente invención (lípidico catiónico) y, según sea necesario, un componente lipídico adicional, y aplicar posteriormente un método conocido para preparar una partícula lipídica a partir de un componente lipídico. Por ejemplo, la partícula lipídica puede producirse como una dispersión de partículas lipídicas disolviendo el componente lipídico (mixto) en un solvente orgánico y mezclando la solución de solvente orgánico resultante con agua o una solución tampón (por ejemplo, mediante un método de emulsión). La mezcla puede realizarse usando un sistema de mezclado de microfluidos (por ejemplo, el aparato NanoAssembler (Precision NanoSystems)). La partícula lipídica obtenida puede someterse a desalación o diálisis y filtración estéril. Según sea necesario, se puede realizar un ajuste de pH o un ajuste de presión osmótica.

[0104]

El compuesto (I) puede formar diferentes estructuras dependiendo de la combinación de las definiciones de n, R y las líneas onduladas de la fórmula (I). Para producir la partícula lipídica, un compuesto que tiene una estructura

específica puede utilizarse solo como compuesto (I), y una mezcla de una pluralidad de compuestos de diferentes estructuras puede usarse como compuesto (I).

[0105]

Los ejemplos del "componente lipídico adicional" incluyen los lípidos estructurales ya mencionados como los esteroides, los fosfolípidos y los lípidos de polietilenglicol. El "componente lipídico adicional" se utiliza, por ejemplo, en una cantidad de 0,008 a 4 moles por mol del compuesto de la presente invención. El compuesto de la presente invención se utiliza preferiblemente como una mezcla con el componente lipídico adicional (en particular, colesterol, fosfatidilcolina y un lípido de polietilenglicol). En una realización preferida que utiliza una mezcla del compuesto de la presente invención y el componente lipídico adicional, la mezcla es una mezcla de 1 a 4 moles del compuesto de la presente invención, 0 a 3 moles de un esteroide, 0 a 2 moles de un fosfolípido y de 0 a 1 mol de un lípido de polietilenglicol. En una realización más preferida que utiliza una mezcla del compuesto de la presente invención y el componente lipídico adicional, la mezcla es una mezcla de 1 a 1,5 moles del compuesto de la presente invención, 0 a 1,25 moles de un esteroide, 0 a 0,5 mol de un fosfolípido y de 0 a 0,125 mol de un lípido de polietilenglicol.

[0106]

La concentración del compuesto de la presente invención o la mezcla del compuesto de la presente invención y el componente lipídico adicional en la solución de solvente orgánico es preferiblemente de 0,5 a 100 mg/mL.

[0107]

Los ejemplos del solvente orgánico incluyen metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, terc-butanol, acetona, acetonitrilo, N, N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido y mezclas de estos. El solvente orgánico puede contener 0 20 % de agua o de una solución tamponada.

[0108]

Los ejemplos de la solución tampón incluyen soluciones tampón ácidas (por ejemplo, tampón acetato, tampón citrato, tampón 2-morfolinoetanosulfonato (MES), tampón fosfato) y tampones neutros (por ejemplo, tampón de 4-2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfonato (HEPES), tampón de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), tampón de fosfato, solución salina tamponada con fosfato (PBS)).

[0109]

Si la mezcla se realiza utilizando un sistema de mezcla de microfluidos, se prefiere mezclar de 1 a 5 partes por volumen de agua o el tampón por parte por volumen de la

solución de solvente orgánico. La velocidad de flujo de la solución mixta (solución mixta de la solución de solvente orgánico y agua o la solución tampón) en el sistema es preferiblemente de 0,1 a 10 mL/min, y la temperatura es preferiblemente de 15 a 45 °C.

[0110]

La composición de la presente invención se puede producir como una dispersión de partículas lipídicas que contiene un ingrediente activo mediante la adición anticipada de un ácido nucleico como ingrediente activo al agua o a la solución tampón en la producción de la partícula lipídica o una dispersión de partículas lipídicas. El ingrediente activo se agrega preferiblemente de modo que la concentración de ingrediente activo de agua o de la solución tampón alcance de 0,05 a 2,0 mg/mL.

[0111]

Además, la composición de la presente invención puede producirse como una dispersión de partículas lipídicas que contiene un ingrediente activo mezclando la partícula lipídica o una dispersión de partículas lipídicas y un ingrediente activo o una solución acuosa del ingrediente activo a través de un método conocido. La dispersión de partículas lipídicas se puede preparar dispersando la partícula lipídica en un medio de dispersión apropiado. La

solución acuosa del ingrediente activo se puede preparar disolviendo el ingrediente activo en un solvente apropiado.

[0112]

El contenido del compuesto de la presente invención en la composición de la presente invención con el medio de dispersión y el solvente excluidos es preferiblemente del 40 al 70 % en peso.

[0113]

El contenido del ingrediente activo en la composición de la presente invención con el medio de dispersión y el solvente excluidos es preferiblemente del 1 al 20 % en peso.

[0114]

El medio de dispersión de la dispersión de partículas lipídicas o la dispersión que contiene la composición se puede reemplazar con agua o con una solución tampón a través de diálisis. La diálisis se realiza con una membrana de ultrafiltración que tiene un corte de peso molecular de 10 a 20 K en una temperatura de 4 °C a temperatura ambiente. La diálisis se puede llevar a cabo de manera repetida. Para remplazo del medio de dispersión, se puede utilizar la filtración de flujo tangencial (FFT). Después de reemplazar el medio de dispersión, se puede realizar un ajuste de pH o de presión osmótica, según sea necesario.

[0115]

Ahora bien, a continuación se describirán métodos para analizar una partícula lipídica que contiene el compuesto de la presente invención, y una composición que contiene la partícula lipídica y un ácido nucleico como ingrediente activo.

[0116]

El tamaño de partícula de la partícula lipídica (en la composición) se puede medir utilizando un medio conocido. Por ejemplo, se puede utilizar un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited), un analizador de tamaño de partículas basado en una técnica NIBS (retrodispersión no invasiva) para calcular el tamaño de partícula como un tamaño de partícula promedio  $z$  a través del análisis acumulativo de la función de autocorrelación. El tamaño de partícula (tamaño de partícula promedio) de la partícula lipídica (en la composición) es preferiblemente de 10 a 200 nm.

[0117]

La concentración y la relación de encapsulación de un ácido nucleico (por ejemplo, un ARNip, un ARNm) como ingrediente activo en la composición de la presente invención se pueden medir utilizando un medio conocido. Por ejemplo, después de que el ácido nucleico se marca con fluorescencia con Quant-iT (TM) RiboGreen (R) (Invitrogen), la relación de concentración y de encapsulación se puede determinar midiendo

la intensidad de fluorescencia. La concentración del ácido nucleico en la composición se puede calcular usando una curva estándar preparada a partir de soluciones acuosas del ácido nucleico con concentraciones conocidas, y la relación de encapsulación se puede calcular sobre la base de la diferencia en la intensidad de fluorescencia dependiendo de la presencia o ausencia de adición de Triton-X100 (un tensoactivo para desintegrar la partícula lipídica). La concentración del ácido nucleico en la composición hace referencia a la concentración total de moléculas del ácido nucleico encapsuladas en la partícula lipídica y las moléculas del ácido nucleico no encapsuladas en la partícula lipídica, y la relación de encapsulación hace referencia a la fracción de moléculas de ácido nucleico encapsulado en la partícula lipídica de todas las moléculas del ácido nucleico en la composición.

## Ejemplos

[0118]

La presente invención se describirá de manera detallada con referencia a los ejemplos, a los ejemplos de ensayo y a los ejemplos de formulaciones; sin embargo, estos no limitan la presente invención, y se puede llevar a cabo

cualquier modificación sin apartarse del alcance de la presente invención.

[0119]

El término "temperatura ambiente" en los ejemplos a continuación, normalmente indica aproximadamente 10 °C a aproximadamente 35 °C. Cada relación que se muestra para el solvente mixto indica una relación en volumen, a menos que se indique lo contrario. % indica % en peso, a menos que se indique lo contrario.

[0120]

La elución en cromatografía de columna se llevó a cabo bajo observación con cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), a menos que se indique lo contrario. En la observación por TLC, se usó una 60 F<sub>254</sub> producida por Merck KGaA como placa de TLC, y se utilizó como eluyente un solvente usado como solvente de elución en cromatografía en columna. Para la detección se empleó un detector UV, y la observación se realizó con un reactivo colorante TLC, según fuese necesario. En la descripción de la cromatografía en columna de gel de sílice, NH indica que se utilizó gel de sílice unido a aminopropilsilano, y Diol indica que se utilizó gel de sílice unido a 3-(2,3-dihidroxipropoxi)propilsilano. En la descripción de la cromatografía líquida de alta resolución preparativa (HPLC), C18 indica que se

utilizó gel de sílice unido a octadecilo. Cada relación que se muestra para el solvente de elución indica una relación en volumen, a menos que se indique lo contrario.

[0121]

$^1\text{H}$  RMN se midió utilizando una RMN de transformación de Fourier. El software ACD/SpecManager (nombre del producto), etc., se utilizaron para el análisis de  $^1\text{H}$  RMN. La descripción se omite ocasionalmente para picos para un grupo hidroxilo, un grupo amino, etc., con un pico de protón muy amplio.

[0122]

La MS se midió por medio de una LC/MS y una MALDI/TOFMS. Para el método de ionización, se utilizó un método ESI, un método APCI o un método MALDI. Para la matriz se utilizó CHCA. Los valores medidos (encontrados) se reportaron como datos. En casos típicos, algunos picos de iones moleculares se observan como iones fragmento. En el caso de una sal, normalmente se observan el pico de iones moleculares para la forma libre, o catiónica, aniónica o picos de iones fragmento.

[0123]

Las siguientes abreviaciones se utilizan en los ejemplos a continuación.

MS: Espectro de masas

M: Concentración molar

N: Normalidad

CDCl<sub>3</sub>: Clorofórmio deuterado

DMSO-d<sub>6</sub>: Dimetilsulfóxido deuterado

<sup>1</sup>H RMN: Resonancia magnética nuclear de protones

LC/MS: Cromatografía líquida/espectrómetro de masas

ESI Ionización por electrospray

APCI: Ionización química a presión atmosférica

MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz

TOFMS: Espectrometría de masas de tiempo de vuelo

CHCA: Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinnámico

DMF: N,N-dimetilformamida

THF: Tetrahidrofurano

DMAP: 4-Dimetilaminopiridina

TBAF: Fluoruro de tetrabutilamonio

[0124]

[Ejemplo 1] 3-((4-(Dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z) -tetradec-9-enoiloxi)metil)propil(9Z) -tetradec-9-enoato

A) 2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

A una mezcla de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol (5,45 g), 1H-imidazol (2,72 g) y DMF (190 mL), se añadió una solución de terc-butilclorodimetilsilano (3,01 g) en DMF (10

mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 24 horas la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó tres veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (2,25 g).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,08 (6H, s), 0,90 (9H, s), 2,53 (3H, t,  $J = 5,5$  Hz), 3,66 (2H, s), 3,73 (6H, d,  $J = 5,5$  Hz)

[0125]

B) 3-((terc-butil(dimetil)silil)oxi)-2,2-bis(((9Z) - tetradec-9-enoiloxi)metil)propil(9Z)-tetradec-9-enoato

A una solución de 2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2-hidroximetil)propano-1,3-diol (258 mg), ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (769 mg) y DMAP (126 mg) en DMF (3 ml), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (790 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por

cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (860 mg).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,03 (6H, s), 0,81-0,96 (18H, m), 1,18-1,41 (36H, m), 1,53-1,67 (6H, m), 1,91-2,10 (12H, m), 2,29 (6H, t,  $J = 7,6$  Hz), 3,58 (2H, s), 4,08 (6H, s), 5,27-5,43 (6H, m)

[0126]

C) 3-hidroxi-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil(9Z)-tetradec-9-enoato

A una solución de 3-((terc-butil(dimetil)silil)oxi) - 2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z) - tetradec-9-enoato (5.91 g) en THF (120 ml), se añadió una mezcla de una solución THF de TBAF (1 M, 14,85 mL) y ácido acético (4,91 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 días, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó una vez con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (4,96 g).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,82-0,97 (9H, m), 1,16-1,42 (36H, m), 1,52-1,68 (6H, m), 1,90-2,12 (12H, m), 2,32 (6H, t,  $J = 7,6$  Hz), 2,52 (1H, t,  $J = 7,0$  Hz), 3,49 (2H, d,  $J = 7,0$  Hz), 4,11 (6H, s), 5,26-5,42 (6H, m)  
[0127]

D) 3-((4-(Dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z) - tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-tetradec-9-enoato

A una solución de 3-hidroxi-2,2-bis(((9Z) -tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z) -tetradec-9-enoato (4.96 g), DMAP (796 mg) y clorhidrato de ácido 4-(dimetilamino)butanoico (2,19 g) en DMF (20 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (2,50 g) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó una vez con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (5,31 g).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,82-0,94 (9H, m), 1,20-1,42 (36H, m), 1,50-1,66 (6H, m), 1,69-1,83 (2H, m), 1,90-2,10 (12H, m), 2,20 (6H, s), 2,23-2,41 (10H, m), 4,11 (8H, s), 5,23-5,44 (6H, m)

[0128]

[Ejemplo 4] 3-((4-(Dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil(9Z)-hexadec-9-enoato

A) 2-(((terc-butilo(difenil)silil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

A una mezcla de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol (5,0 g), 1H-imidazol (2,5 g) y DMF (200 mL), se añadió una solución de terc-butilclorodifenilsilano (5,1 g) en DMF (10 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 horas la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó tres veces con agua y una vez con salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (6,4 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1,07 (9H, s), 2,34 (3H, t, J = 5,5 Hz), 3,67 (2H, s), 3,74 (6H, d, J = 5,5 Hz), 7,39-7,48 (6H, m), 7,63-7,67 (4H, m)

[0129]

B) (5-(((Terc-butilo(difenil)silil)oxi)metil)-2,2dimetil-1,3-dioxano-5-il)metanol

A una solución de 2-((((terc-butilo(difenil)silil)oxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (3,5 g) y 2,2-dimetoxipropano (1,5 g) en acetona (35 mL), se añadió monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (88,9 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, se añadió amoníaco acuoso diluido a la mezcla de reacción para neutralizar la mezcla de reacción, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (2,7 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 1,07 (9H, s), 1,27 (3H, s), 1,41 (3H, s), 2,12-2,18 (1 H, m), 3,69-3,78 (8H, m), 7,38-7,47 (6H, m), 7,65-7,69 (4H, m)

[0130]

C) (5-((((terc-butilo(difenil)silil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metil (9Z)-hexadec-9-enoato

A una solución de (5-((((terc-butilo(difenil)silil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol (910 mg), DMAP (215 mg) y ácido (9Z)-hexadec-9-enoico (838 mg) en DMF (10 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (757 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 6 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se

lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (1,43 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,84 - 0,91 (3 H, m), 1,03 - 1,07 (9 H, m), 1,22 - 1,35 (16 H, m), 1,40 (6 H, d,  $J=17,0$  Hz), 1,49 - 1,63 (2 H, m), 2,01 (4 H, q,  $J=6,5$  Hz), 2,24 (2 H, t,  $J=7,6$  Hz), 3,65 (2 H, s), 3,73 (2 H, d,  $J=11,7$  Hz), 3,80 (2 H, d,  $J=12,0$  Hz), 4,17 (2 H, s), 5,29-5,39 (2 H, m), 7,35-7,46 (6 H, m), 7,65 (4 H, d,  $J=6,9$  Hz)  
[0131]

D) (5- hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)  
metil (9Z)-hexadec-9-enoato

A una solución de (5-(((terc-butilo(difenil)silil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metil (9Z) -hexadec-9-enoato (1,43 g) en THF (4 mL), se añadió una solución THF de TBAF (1 M, 2,64 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 horas la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó una vez con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente

se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (0,82 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,85-0,91 (3 H, m), 1,24-1,36 (16 H, m), 1,42 (6 H, s), 1,58-1,66 (2 H, m), 2,01 (4 H, q,  $J = 6,5$  Hz), 2,30 (1 H, t,  $J = 6,6$  Hz), 2,35 (2 H, t,  $J = 7,6$  Hz), 3,48 (2 H, d,  $J = 6,6$  Hz), 3,69-3,75 (4 H, m), 4,25 (2 H, s), 5,31-5,38 (2 H, m)

[0132]

E) (5-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metil (9Z)-hexadec-9-enoato

A una solución de (5-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metil (9Z)-hexadec-9-enoato (410 mg), DMAP (97 mg) y clorhidrato de ácido 4-(dimetilamino)butírico (250 mg) en DMF (4 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (343 mg) a 50 °C. Después de agitar durante 4 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de

etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (430 mg).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,86-0,91 (3 H, m), 1,24-1,36 (16 H, m), 1,42 (6 H, s), 1,53-1,69 (2 H, m), 1,78 (2 H, m), 1,98-2,04 (4 H, m), 2,21 (6 H, s), 2,29 (4 H, m), 2,37 (2 H, t,  $J = 7,6$  Hz), 3,74 (4 H, s), 4,11 (4 H, d,  $J = 5,7$  Hz), 5,31-5,38 (2 H, m)

[0133]

F) 3-((4-(Dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z) - tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-hexadec-9-enoato

Al (5-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2,2dimetil-1,3dioxano-5-il)metil (9z)-hexadec-9-enoato (430 mg), se agregaron ácido acético (2 mL) y agua (1 mL), y el resultante se agitó a 75 °C durante 2 horas, y el solvente luego se removió por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le agregaron acetato de etilo y solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y el resultante se agitó durante 2 horas. Después de lavar con agua dos veces, el resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. A una solución del residuo resultante, DMAP (201 mg) y ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (466 mg) en DMF (4 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (458 mg) a 50 °C. Después de agitar durante 4 horas, se

añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (604 mg).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 0,85-0,92 (9 H, m), 1,24-1,36 (40 H, m), 1,55-1,64 (6 H, m), 1,73-1,80 (2 H, m), 1,98-2,05 (12 H, m), 2,20 (6 H, s), 2,24-2,33 (8 H, m), 2,36 (2 H, t,  $J = 7,6$  Hz), 4,09-4,13 (8 H, m), 5,31-5,38 (6 H, m)

[0134]

[Ejemplo 8] 2-(((N,N-dimetil- $\beta$ -alanil)oxi) metil)-2-((octanoiloxi)metil)propano-1,3-diil (9Z, 9'Z)bis-tetradec-9-enoato

A) (2-(4-Metoxifenil)-1,3-dioxano-5,5-diil)dimetanol

Una solución de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-diol (506 g) en agua (2,0 l) se agitó a 50 °C. A esto se añadió ácido clorhídrico concentrado (18 mL), al que se añadió gota a gota p-metoxibenzaldehído (474 ml) a aproximadamente 30 °C durante 3 horas. Posteriormente, la temperatura de la solución de reacción se ajustó a 25 °C, y la solución de reacción se agitó durante 5 horas. A esto, se añadió solución acuosa 2 N de hidróxido de sodio (120 mL), y el

resultante se agitó durante 1 hora. Los cristales se recogieron por medio de filtración y se lavaron con agua, y luego la recrystalización se realizó con acetato de etilo/hexano para proporcionar el compuesto del título (769 g).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,24 (2H, d,  $J = 5,0$  Hz), 3,67 (2H, d,  $J = 5,4$  Hz), 3,74 (3H, s), 3,77 (2H, d,  $J = 11,3$  Hz), 3,88 (2H, t,  $J = 11,3$  Hz), 4,53 (1H, t,  $J = 5,4$  Hz), 4,62 (1H, t,  $J = 5,0$  Hz), 5,34 (1H, s), 6,90 (2H, d,  $J = 8,9$  Hz), 7,33 (2H, d,  $J = 8,9$  Hz)

[0135]

B-1) 2-(hidroximetil)-2-(((4-metoxibencil)oxi)metil)propano-1,3-diol

A una solución en suspensión de (2-(4-metoxifenil)-1,3-dioxano-5,5-diil)dimetanol (10,0 g) en tolueno (100 mL), se añadió solución DIBAL-H 1,5 M (105 mL) gota a gota a temperatura ambiente, y el resultante se agitó durante 5 horas. Se le añadió metanol (30 mL) y luego se le añadieron ácido clorhídrico 2 N (20 mL) y solución acuosa 4 N de hidróxido sódico (240 mL), y el resultante se agitó durante 2 horas, y después se retiró la capa de tolueno. Después de neutralizar la capa acuosa con ácido clorhídrico, la extracción se realizó con acetato de etilo, y el extracto se lavó dos veces con salmuera saturada y se filtró a través de

un Celite. El solvente se removió por destilación a presión reducida, y el residuo se recrystalizó con acetato de etilo/hexano para proporcionar el compuesto del título (6,6 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  ppm 3,32 (2H, s), 3,39 (6H, d,  $J=5,4$  Hz), 3,74 (3H, s), 4,21 (3H, t,  $J=5,4$  Hz), 4,36 (2H, s), 6,90 (2H, d like,  $J=7,8$  Hz), 7,23 (2H, d like,  $J=7,8$  Hz)  
[0136]

C-1) (5-(((4-Metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metanol

A una solución de 2-(hidroximetil)-2-(((4-metoxibencil)oxi)metil)propano-1,3-diol (1,00 g) y 2,2-dimetoxipropano (1,22 g) en DMF (5 mL), se añadió p-tolueno sulfonato de piridinio (10 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 2 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó una vez con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y dos veces con solución salina al 5 %, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (426 mg).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  ppm 1,29 (3H, s), 1,29 (3H, s), 3,35 (2H, s), 3,39 (2H, d,  $J = 5,1$  Hz), 3,61 (4H, s), 3,74 (3H, s), 4,38 (2H, s), 4,59 (1H, t,  $J = 5,1$  Hz), 6,90 (2H, d like,  $J = 7,5$  Hz), 7,24 (2H, como d,  $J = 7,5$  Hz)

[0137]

B-2) 9-(4-Metoxifenil)-3,3-dimetil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5]undecano

A una solución de (2-(4-metoxifenil)-1,3-dioxano-5,5-diil)dimetanol (2,00 g) y 2,2-dimetoxipropano (2,46 g) en DMF (8 mL), se añadió p-tolueno sulfonato piridinio (20 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 4 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó dos veces con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y dos veces con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se recristalizó con acetato de etilo/hexano para proporcionar el compuesto del título (1,62 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  ppm 1,34 (6H, s), 3,33 (2H, s), 3,63 (2H, d,  $J = 11,7$  Hz), 3,74 (3H, s), 3,99 (2H, s), 4,12 (2H, d,  $J = 11,7$  Hz), 5,37 (1H, s), 6,90 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz), 7,34 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz)

[0138]

C-2) (5-(((4-Metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metanol

A una solución en suspensión de 9-(4-metoxifenil) - 3,3-dimetil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (22,0 g) en tolueno (200 mL), se añadió solución DIBAL-H 1.5 M (60 mL) gota a gota a una temperatura de 5 a 20 °C, y el resultante se agitó a 15 °C durante 3 horas. Se añadió metanol (22 ml), y luego se añadieron gota a gota solución acuosa 2 N de hidróxido sódico (100 mL) y solución acuosa 4 N de hidróxido sódico (200 mL) en el orden presentado. Después de agitar durante 1,5 horas, la capa de tolueno se separó y se lavó con solución salina al 5 %. El solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (14,7 g).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,29 (3H, s), 1,29 (3H, s), 3,35 (2H, s), 3,39 (2H, d, J= 5,1 Hz), 3,61 (4H, s), 3,74 (3H, s), 4,38 (2H, s), 4,59 (1H, t, J= 5,1 Hz), 6,90 (2H, como d, J= 7,5 Hz), 7,24 (2H, como d, J= 7,5 Hz)

[0139]

D) octanoato de (5-(((4-Metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metilo

A una solución de (5-(((4-metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metanol (2,00 g), DMAP (412 mg) y ácido octanoico (1,27 g) en DMF (20 ml), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (1,94 g) a 50 °C. Después de agitar durante 4 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (2,78 g).

$^1\text{H}$  RMN(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,84 - 0,91 (3 H, m), 1,22 - 1,33 (8 H, m), 1,40 (6 H, s), 1,53 - 1,61 (2 H, m), 2,26 (2 H, t,  $J = 7,6$  Hz), 3,39 (2 H, s), 3,68 - 3,74 (2 H, m), 3,76 - 3,80 (2 H, m), 3,80 (3 H, s), 4,15 (2 H, s), 4,42 (2 H, s), 6,87 (2 H, d,  $J = 7,8$  Hz), 7,20 - 7,24 (2 H, m)

[0140]

E) octanoato de (5-(Hidroximetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metilo

A una solución de octanoato de (5-(((4-metoxibencil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metilo (2,78 g) en etanol (30 ml), se añadió Pd-carbono (840 mg) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó bajo una

atmósfera de hidrógeno durante 5 horas. Después de la reacción, el Pd-carbono se removió por filtración, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (1,35 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,85-0,91 (3 H, m), 1,23-1,34 (8 H, m), 1,38-1,44 (6 H, m), 1,63 (2 H, m), 2,30-2,38 (3 H, m), 3,48 (2 H, d,  $J = 6,6$  Hz), 3,68-3,75 (4 H, m), 4,25 (2 H, s)  
[0141]

F) Octanoato de (5-(((N,N-dimetil- $\beta$ -alanil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metilo

A una solución de octanoato de (5-(hidroximetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metilo (400 mg), DMAP (129 mg) y clorhidrato de ácido 3-(dimetilamino)propanoico (305 mg) en DMF (4 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (456 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 4 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de

sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (320 mg).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,84-0,92 (3 H, m), 1,21-1,33 (8 H, m), 1,42 (6 H, s), 1,61 (2 H, br), 2,23 (6 H, s), 2,32 (2 H, t,  $J=7,6$  Hz), 2,47-2,51 (2 H, m), 2,57-2,61 (2 H, m), 3,75 (4 H, s), 4,13 (4 H, d,  $J=11,7$  Hz)

[0142]

G) 2-(((N,N-dimetil- $\beta$ -alanil)oxi)metil)-2-((octanoiloxi)metil)propano-1,3-diil (9Z,9'Z) bis-tetradec-9-enoato

Al octanoato de (5-(((N,N-dimetil- $\beta$ -alanil)oxi)metil)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-5-il)metilo (320 mg), se agregaron ácido acético (1,6 ml) y agua (0,8 ml), y el resultante se agitó a 65 °C durante 3,5 horas, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. Al residuo se le agregaron acetato de etilo y solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y el resultante se agitó durante 2 horas. Después de lavar dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, el resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. A una solución del residuo resultante (150 mg), DMAP (101 mg) y ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (235 mg) en DMF (4,5 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo)carbodiimida (231 mg) a 50 °C. Después de

agitar durante 8 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (230 mg).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,84-0,93 (9 H, m), 1,24-1,36 (30 H, m), 1,53-1,65 (8 H, m), 1,98-2,05 (8 H, m), 2,22 (6 H, s), 2,30 (6 H, t,  $J=7,6$  Hz), 2,48 (2 H, t,  $J=6,9$  Hz), 2,58 (2 H, t,  $J=6,8$  Hz), 4,06-4,22 (8 H, m), 5,31-5,38 (4 H, m)  
[0143]

[Ejemplo 11] 2-(((4-Dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-  
2-(dodecanoiloxi)metil)propano-1,3-diil (9Z,9'Z)bis-  
tetradec-9-enoato

A) Dodecanoato de 3-hidroxi-2,2-  
bis(hidroximetil)propilo

A una solución de 2,2-bis(hidroximetil)propano-1,3-  
diol (5,00 g), DMAP (2,24 g) y ácido láurico (3,68 g) en DMF  
(150 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-  
dimetilaminopropil)carbodiimida (7,04 g) a temperatura  
ambiente. Después de agitar durante 20 horas, se añadió  
acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se

lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (1,79 g).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,85-0,91 (3 H, m), 1,22-1,33 (16 H, m), 1,59-1,66 (3 H, m), 2,36 (2 H, t,  $J = 7,6$  Hz), 2,51 (2 H, t,  $J = 5,8$  Hz), 3,65 (6 H, d,  $J = 5,7$  Hz), 4,23 (2 H, s)  
[0144]

B) 2-((Dodecanoiloxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diil (9Z,9'Z) bis-tetradec-9-enoato

A una solución de dodecanoato de 3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)propilo (400 mg), DMAP (153 mg) y ácido (9Z)-tetradec-9-enoico (569 mg) en DMF (4 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (602 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 8 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (230 mg).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,85-0,93 (9 H, m), 1,22-1,36 (40 H, m), 1,58-1,65 (6 H, m), 1,99-2,05 (8 H, m), 2,32 (6 H, t,  $J=7,6$  Hz), 2,52 (1 H, t,  $J=7,1$  Hz), 3,48 (2 H, d,  $J=6,9$  Hz), 4,09-4,14 (6 H, m), 5,31-5,38 (4 H, m)

[0145]

C) 2-(((4-Dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2-(dodecanoiloxi)metil)propano-1,3-diil (9Z,9'Z)bis-tetradec-9-enoato

A una solución de 2-((dodecanoiloxi)metil)-2-(hidroximetil)propano-1,3-diil(9Z,9'Z) bis-tetradec-9-enoato (230 mg), DMAP (38 mg) y clorhidrato de ácido 4-dimetilamino)butírico (105 mg) en DMF (4 mL), se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (150 mg) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 3 horas, se añadió acetato de etilo a la mezcla de reacción, el resultante se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera saturada, y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente luego se removió por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (NH, acetato de etilo/hexano) para proporcionar el compuesto del título (100 mg).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,85-0,93 (9 H, m), 1,23-1,35 (40 H, m), 1,55-1,67 (6 H, m), 1,77 (2 H, m), 1,98-2,05 (8 H, m),

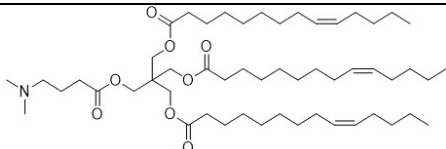
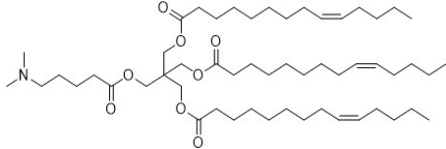
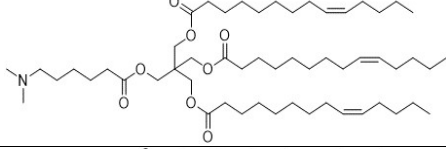
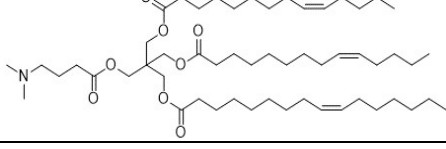
2,20 (6 H, s), 2,24-2,33 (8 H, m), 2,36 (2 H, t, J= 7,6 Hz),  
4,09-4,13 (8 H, m), 5,31-5,38 (4 H, m)

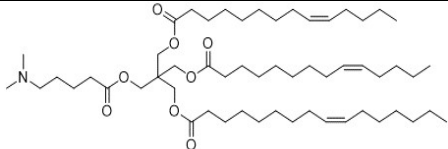
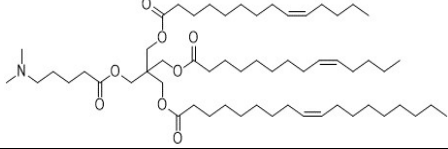
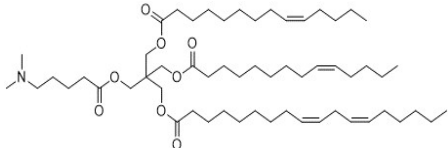
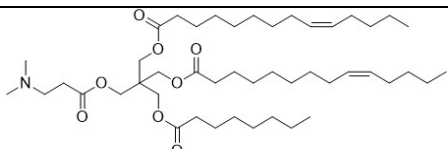
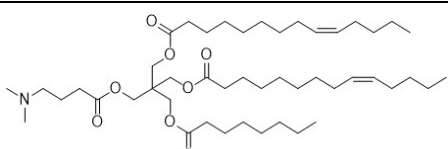
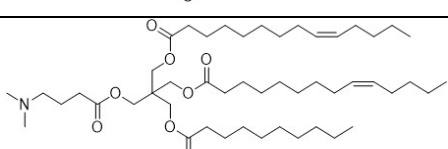
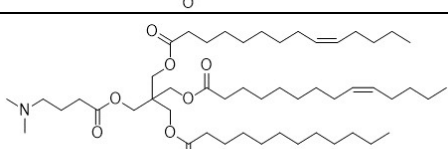
[0146]

Los ejemplos 2 y 3, 5 al 7 y 9 al 10, en la tabla a continuación, se produjeron de acuerdo con cualquiera de los métodos mostrados en los ejemplos anteriores y en métodos conformes a los mismos. La tabla 1 muestra los nombres de los compuestos, estructuras y números de masa observados durante la producción (indicados como MS en la tabla) para aquellos ejemplos junto con los ejemplos 1, 4, 8 y 11.

[0147]

[Tabla 1]

| Número de ejemplo | Nombre IUPAC                                                                                             | Fórmula estructural                                                                  | MS:m/z (M+H) |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1                 | 3-((4-(Dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-tetradec-9-enoato  |  | 874,75       |
| 2                 | 3-((5-(Dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-tetradec-9-enoato |  | 888,73       |
| 3                 | 3-((6-(Dimetilamino)hexanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-tetradec-9-enoato  |  | 902,74       |
| 4                 | 3-((4-(Dimetilamino)butanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-hexadec-9-enoato   |  | 902,74       |

|    |                                                                                                                  |                                                                                      |        |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 5  | 3-((5-(Dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-hexadec-9-enoato          |    | 916,76 |
| 6  | 3-((5-(Dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z)-octadec-9-enoato          |    | 944,79 |
| 7  | 3-((5-(Dimetilamino)pentanoil)oxi)-2,2-bis(((9Z)-tetradec-9-enoiloxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadec-9,12-dienoato |    | 942,77 |
| 8  | 2-(((N,N-dimetil-β-alanil)oxi)metil)-2-[(octanoiloxi)metil]propano-1,3-diil (9Z,9'Z)bis-tetradec-9-enoato        |    | 778,62 |
| 9  | 2-(((4-dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2-(octanoiloxi)metil]propano-1,3-diil (9Z,9'Z)bis-tetradec-9-enoato      |   | 792,63 |
| 10 | 2-((decanoiloxi)metil)-2-(((4-dimetilamino)butanoil)oxi)metil]propano-1,3-diil(9Z,9'Z)bis-tetradec-9-enoato      |  | 820,67 |
| 11 | 2-(((4-dimetilamino)butanoil)oxi)metil)-2-(dodecanoiloxi)metil]propano-1,3-diil (9Z,9'Z)bis-tetradec-9-enoato    |  | 848,70 |

[0148]

[Ejemplo de producción y ejemplo de prueba para composición que contiene la partícula lipídica de la presente invención y ácido nucleico para la introducción de ácido nucleico]

[Ejemplo de Producción 1]

Una mezcla de lípidos (lípidos catiónicos producidos en los ejemplos: DPPC: colesterol: GM-020 = 60:10,6:28: 1,4, en

relación molar) se disolvió en EtOH al 90 %/agua libre de RNasa al 10 % para proporcionar 8,5 mg/mL de solución lipídica. EL ARNm de luciferasa (TriLink Bio Technologies) se disolvió en 10 nM solución tampón 2-morfolinoetanosulfonato (MES) en un pH de 4,0 para proporcionar una solución de ácido nucleico de 0,22 mg/mL. La solución lipídica y la solución de ácido nucleico obtenidas se mezclaron usando el aparato NanoAssemblr (Precision Nanosystems) a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de 3 mL/min:6 mL/min para proporcionar una dispersión que contiene una partícula lipídica que encapsula el ácido nucleico. Mediante el uso de un Slyde-A-Lyzer (corte de peso molecular: 20k, Thermo Fisher Scientific), la dispersión obtenida se dializó con agua a temperatura ambiente durante 1 hora y con PBS a 4 °C durante 48 horas. Posteriormente, la filtración se realizó con un filtro de jeringa de 0,2 µm (IWAKI CO., LTD.) para preparar una composición para la introducción de ácido nucleico, y posteriormente la composición se almacenó a 4 °C. El tamaño de partícula de la partícula lipídica se midió utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited). La concentración de ARNm y la relación de encapsulación de la partícula lipídica fueron medidas utilizando un Quant-iT (TM)

RiboGreen (R) (Invitrogen). La Tabla 2 muestra los resultados del análisis.

[0149]

[Tabla 2]

| Lípido Catiónico | Tamaño de partícula (nm) | Concentración de ARNm (µg/mL) | Proporción de encapsulación (%) |
|------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Ejemplo 1        | 71                       | 136                           | 96                              |
| Ejemplo 2        | 90                       | 73                            | 96                              |
| Ejemplo 3        | 93                       | 87                            | 96                              |
| Ejemplo 4        | 76                       | 113                           | 97                              |
| Ejemplo 5        | 91                       | 96                            | 98                              |
| Ejemplo 8        | 67                       | 84                            | 94                              |
| Ejemplo 9        | 108                      | 129                           | 62                              |
| Ejemplo 10       | 92                       | 86                            | 84                              |
| Ejemplo 11       | 83                       | 85                            | 92                              |

[0150]

[Ejemplo de Prueba 1] Prueba de transfección de ARNm en células cultivadas

Las células de la línea celular HCT116 derivadas del cáncer colorrectal humano se cultivaron en una placa de 96 pozos en una densidad celular de 6000 células/pozo, y después de 24 horas se añadieron al medio 10µl de la composición que contenía 10 ng de ARNm de luciferasa para la introducción del ácido nucleico (una solución obtenida al diluir el producto del Ejemplo producción 1 en una concentración de ARNm de 10 ng/10 µL). El nivel de luciferasa expresada en la HCT116 24 horas después de la adición de ARNm se midió utilizando un kit Picagene LT2.0 (TOYOBO CO., LTD.) Las tablas 3 y 4 muestran los resultados de las medición.

[0151]

[Tabla 3]

| Lípido Catiónico | Valor medio de luminiscencia (cps) para 3 pozos |
|------------------|-------------------------------------------------|
| Control PBS      | 560                                             |
| Ejemplo 1        | 227720                                          |
| Ejemplo 2        | 570027                                          |
| Ejemplo 3        | 412187                                          |
| Ejemplo 4        | 407547                                          |
| Ejemplo 5        | 545507                                          |
| Ejemplo 8        | 3853                                            |
| Ejemplo 10       | 1203467                                         |
| Ejemplo 11       | 953520                                          |

[0152]

[Tabla 4]

| Lípido Catiónico | Valor medio de luminiscencia (cps) para 3 pozos |
|------------------|-------------------------------------------------|
| Control PBS      | 627                                             |
| Ejemplo 9        | 549893                                          |

[0153]

[Ejemplo de producción y ejemplo de prueba para composición que contiene la partícula lipídica de la presente invención y ácido nucleico para la introducción de ácido nucleico]

[Ejemplo de Producción 2]

Una mezcla de lípidos (lípidos catiónicos producido en los ejemplos: DPPC: colesterol: GM-020 = 60:10,6:28: 1,4, en relación molar) se disolvió en EtOH al 90 %/agua libre de RNasa al 10 % para proporcionar 7 mg/mL de una solución lipídica. Cantidades iguales de un ARNip para el Colla1 y un ARNip para el Factor VII (FV VII) se mezclaron juntas, y la

mezcla fue disuelta en 25 mM de tampón de acetato con un pH de 4,0 para proporcionar 0,2 mg/mL de una solución de ácido nucleico. La información de las secuencias sobre los ARNm se muestra en la tabla a continuación. La solución lipídica y la solución de ácido nucleico obtenidas se mezclaron usando el aparato NanoAssemblr (Precision Nanosystems) a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de 3 mL/min:9 mL/min para proporcionar una dispersión que contiene una partícula lipídica que incluye los ácidos nucleicos. Mediante el uso de un Slide-A-Lyzer (corte de peso molecular: 20k, Thermo Fisher Scientific), la dispersión obtenida se dializó con agua a temperatura ambiente durante 1 hora y con PBS a 4 °C durante 48 horas. Posteriormente, la filtración se realizó con un filtro de jeringa de 0,2 µm (IWAKI CO., LTD.) para preparar una composición para la introducción de ácido nucleico, y posteriormente la composición se almacenó a 4 °C. El tamaño de partícula de la partícula lipídica se midió utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Limited). La concentración de ARNm y la relación de encapsulación de la partícula lipídica fueron medidas utilizando un Quant-iT (TM) RiboGreen (R) (Invitrogen). La Tabla 6 muestra los resultados del análisis.

[0154]

[Tabla 5]

ARNip de Colla1 (citado de Calvente et al. Hepatología 2015, 62: 4)

|             |                                                                 |
|-------------|-----------------------------------------------------------------|
| Sentido     | 5' - G[mU][mC][mU]AGA[mC]A[mU]G[mU][mC]AG[mC][mU][mU][ts]t - 3' |
| Antisentido | 5' - AAGCUGAA[mC]AUGUC[mU]AGAC[ts]t - 3'                        |

Factor VII ARNip (citado de Landesman et al. Silence 2010, 1:16)

|             |                                                                     |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|
| Sentido     | 5' - [mC][mU]A[mC]GAAAG[mC]A[mU][mC][mC][mU][mU][mC]A[mU][ts]t - 3' |
| Antisentido | 5' - AUGAAGGAUGCUUUCG[mU]AG[ts]t - 3'                               |

N: ARN [01  
n: ADN  
[mN]: 2'-OMe ARN 55]  
[ns]: fosforotioato

[Tabla 6]

| Compuesto  | Tamaño de partícula (nm) | Concentración de ARNip (µg/mL) | Proporción de encapsulación (%) |
|------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Ejemplo 2  | 104                      | 251                            | 98                              |
| Ejemplo 3  | 117                      | 196                            | 95                              |
| Ejemplo 10 | 88                       | 307                            | 90                              |
| Ejemplo 11 | 85                       | 402                            | 91                              |
| Ejemplo 4  | 90                       | 355                            | 89                              |
| Ejemplo 5  | 103                      | 367                            | 94                              |
| Ejemplo 6  | 87                       | 333                            | 98                              |
| Ejemplo 7  | 102                      | 320                            | 96                              |

[0156]

[Ejemplo de prueba 2] Prueba de administración de ARNip a células estrelladas hepáticas en ratones modelo con trastorno hepático causado por tetracloruro de carbono

La dispersión de PBS de la partícula lipídica, incluido el ARNip del Colla1 y el ARNip del FVII, se diluyó

con PBS a concentraciones de ARNip respectivas de 40 µg/mL y 120 µg/mL, y se administró al seno orbital de cada ratón Balb/c para lograr la dosis respectiva de ARNip de 0,2 mg/kg y 0,6 mg/kg. Tres horas después de la administración de los ARNip, se administró tetracloruro de carbono vía oral para lograr una dosis de 0,1 mL/kg. Cuatro días después de la administración de tetracloruro de carbono, cada ratón se sacrificó mediante sangrado bajo anestesia con isoflurano, y se extrajo el hígado. Del hígado obtenido, el ARN total se extrajo con un Mini Kit RNeasy (QIAGEN), y los niveles de ARNm del Colla1, ARNm del FVII y ARNm del GAPDH se midieron mediante un método de PCR cuantitativa. Las tasas de reducción de expresión para el ARNm del Colla1 y ARNm del FVII normalizadas frente al nivel de ARNm del GAPDH se calcularon con referencia a las de ratones sin administración de ARNip, y la siguiente tabla muestra los resultados del cálculo.

[0157]

[Tabla 7]

| Compuesto  | Eficiencia del <i>knockdown</i> (%)<br>COL1A1 | Eficiencia del <i>knockdown</i> (%)<br>FVII |
|------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Ejemplo 2  | 73                                            | 0                                           |
| Ejemplo 3  | 81                                            | 0                                           |
| Ejemplo 10 | 31                                            | 0                                           |
| Ejemplo 11 | 60                                            | 0                                           |
| Ejemplo 4  | 67                                            | 19                                          |
| Ejemplo 5  | 83                                            | 14                                          |

|           |    |    |
|-----------|----|----|
| Ejemplo 6 | 86 | 27 |
| Ejemplo 7 | 85 | 24 |

#### Aplicación Industrial

[0158]

El compuesto de la partícula lipídica, o la composición de la presente invención permite la introducción de ácidos nucleicos en varios tipos de células, tejidos u órganos. Por consiguiente, el compuesto, la partícula lipídica o la composición de la presente invención se encuentra disponible como técnica DDS para fármacos de ácidos nucleicos. Además, el compuesto, la partícula lipídica o la composición de la presente invención está disponible como reactivo para la introducción de ácido nucleico para investigación.