

LÍPIDOS DE AMINA IONIZABLES Y NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/838,551, presentada el 25 de abril de 2019, y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/843,854, presentada el 6 de mayo de 2019, cuyos contenidos se incorporan a la presente mediante esta referencia.

Antecedentes

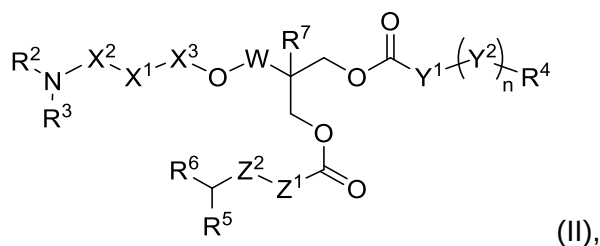
Las nanopartículas lipídicas que se formulan con lípidos con amina ionizables pueden servir como vehículos de carga para la administración de sustancias biológicamente activas, en particular polinucleótidos, tales como ARN, ARNm y ARN guías en las células. Las composiciones de LNP (por su sigla en inglés) que contienen lípidos ionizables pueden facilitar la administración de agentes con oligonucleótidos a través de la membrana celular, y se pueden usar para introducir componentes y composiciones para la edición génica en células vivas. Las sustancias biológicamente activas que son particularmente difíciles de administrar a las células incluyen proteínas, fármacos con base en ácido nucleico y derivados de estos, particularmente fármacos que incluyen oligonucleótidos relativamente grandes, tales como ARNm. Las composiciones para la administración de tecnología prometedora de edición génica a las células, tal como la administración de componentes del sistema CRISPR/Cas9, son de particular interés (por ejemplo, ARNm que codifica una nucleasa y ARN guía asociado (ARNg)).

Se necesitan composiciones para administrar la proteína y componentes de ácido nucleico de CRISPR/Cas a una célula, tal como una célula en un paciente. En particular, son de particular interés las composiciones para administrar ARNm que codifica el componente de la proteína CRISPR y para administrar ARNg de CRISPR. También son de particular interés las composiciones con propiedades útiles para la administración *in vitro* e *in vivo* que pueden estabilizar y administrar componentes de ARN.

Breve compendio

La presente descripción proporciona lípidos que contienen amina que son útiles para la formulación de composiciones con nanopartículas lipídicas (LNP). Tales composiciones de LNP pueden tener propiedades ventajosas para la administración a las células de cargas de ácido nucleico, tal como componentes de edición génica de CRISPR/Cas.

En algunas modalidades, el lípido es un compuesto que tiene una estructura de la Fórmula II



en donde

X^1 es O, NR^1 o un enlace directo;

X^2 es alquileo C_{2-5} ,

X^3 es $C(=O)$, o un enlace directo;

R^1 es H o Me,

R^3 es alquilo C_{1-3} ,

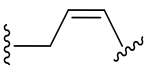
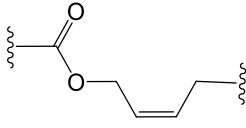
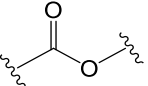
R^2 es alquilo C_{1-3} , o

R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que está unido y 1-3 átomos de carbono de X^2 forman un anillo de 4, 5 o 6 miembros, o

X^1 es NR^1 , R^1 y R^2 junto con los átomos de nitrógeno a los que están unidos forman un anillo de 5 o 6 miembros, o

R^2 junto con R^3 y el átomo de nitrógeno al que está unido forman un anillo de 5, 6 o 7 miembros.

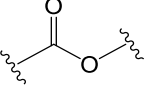
Y^1 es alquileo C_{2-12} ,

Y^2 se selecciona de  (en cualquier orientación),  (en cualquier orientación), y  (en cualquier orientación),

n es 0 a 3,

R^4 es alquilo C_{1-15} ,

Z^1 es alquileo C_{1-6} o un enlace directo,

Z^2 es  (en cualquier orientación) o está ausente, siempre que si Z^1 es un enlace directo, Z^2 está ausente;

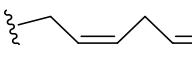
R^5 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

R^6 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

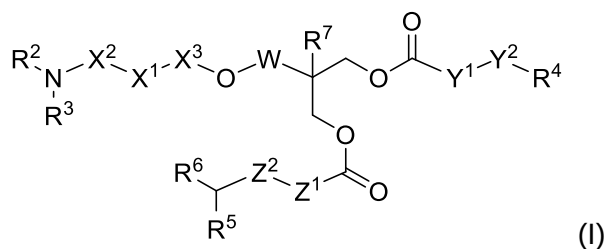
W es metileno o un enlace directo, y

R⁷ es H o Me,

o una sal de este,

siempre que si R³ y R² son alquilos C₂, X¹ es O, X² es alquileno C₃ lineal, X³ es C(=O), Y¹ es alquileno C₆ lineal, (Y²)_n-R⁴ es , R⁴ es alquilo C₅ lineal, Z¹ es alquileno C₂, Z² está ausente, W es metileno, y R⁷ es H, entonces R⁵ y R⁶ no son alcoxi C₈.

En determinadas modalidades, el lípido es un compuesto que tiene una estructura de la Fórmula I:



X¹ es O, NR¹ o un enlace directo;

X² es alquileno C₂₋₅,

X³ es C(=O), o un enlace directo,

R¹ es H o Me,

R³ es alquilo C₁₋₃,

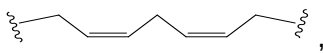
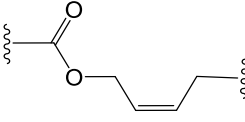
R² es alquilo C₁₋₃, o

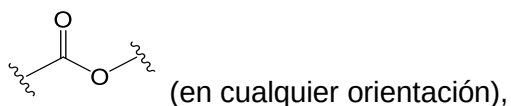
R², junto con el átomo de nitrógeno al que está unido y 1-3 átomos de carbono de X² forman un anillo de 4, 5 o 6 miembros, o

X¹ es NR¹, R¹ y R² junto con los átomos de nitrógeno a los que están unidos forman un anillo de 5 o 6 miembros, o

R² junto con R³ y el átomo de nitrógeno al que está unido forman un anillo de 5, 6 o 7 miembros.

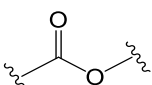
Y¹ es alquileno C₂₋₁₂,

Y² se selecciona de ,  (en cualquier orientación), y



R⁴ es alquilo C₃₋₁₅,

Z¹ es alquileno C₁₋₆ o un enlace directo,

Z^2 is  (en cualquier orientación) o ausente, siempre que si Z^1 es un enlace directo, Z^2 está ausente,

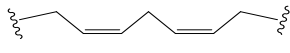
R^5 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

R^6 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

W es metileno o un enlace directo, y

R^7 es H o Me,

o una sal de este,

siempre que si R^3 y R^2 son alquilos C_2 , X^1 es O, X^2 es alquileo C_3 lineal, X^3 es $C(=O)$, Y^1 es alquileo C_6 lineal, Y^2 es , R^4 es alquilo C_4 lineal, Z^1 es alquileo C_2 , Z^2 está ausente, W es metileno, y R^7 es H, entonces R^5 y R^6 no son alcoxi C_8 .

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier compuesto descrito en la presente, en donde la pKa de la forma protonada del compuesto es de alrededor de 5,1 a alrededor de 9,0, por ejemplo de alrededor de 5,7 a alrededor de 7,6, o de alrededor de 6 a alrededor de 7,5.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con una composición que comprende cualquier compuesto descrito en la presente y un componente lipídico, por ejemplo, que comprende de alrededor de 50 % (por ejemplo, alrededor de 50 % del componente lipídico) de un compuesto descrito en la presente y un componente lipídico, por ejemplo, un lípido de amina, preferentemente un compuesto de la Fórmula (I) o la Fórmula (II).

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición descrita en la presente, en donde la composición es una composición de LNP. Por ejemplo, la invención se relaciona con una composición de LNP que comprende cualquier compuesto descrito en la presente y un componente lipídico. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el componente lipídico comprende un lípido auxiliar y un lípido PEG. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el componente lipídico comprende un lípido auxiliar, un lípido PEG y un lípido neutro. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, que comprende además un crioprotector. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, que comprende además un amortiguador.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, que comprende además un componente de ácido nucleico. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente,

que comprende además un componente de ARN o ADN. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde la composición de LNP tiene un cociente de N/P de alrededor de 3-10, por ejemplo el cociente de N/P es de alrededor de 6 ± 1 , o el cociente de N/P es de alrededor de $6 \pm 0,5$. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde la composición de LNP tiene un cociente de N/P de alrededor de 6.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el componente de ARN comprende un ARNm. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el componente de ARN comprende un agente de unión a ADN guiado por ARN, por ejemplo, un ARNm de nucleasa Cas, tal como un ARNm de nucleasa Cas clase 2 o un ARNm de nucleasa Cas9.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el ARNm es un ARNm modificado. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el componente de ARN comprende un ácido nucleico ARNg. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el ácido nucleico de ARNg es un ARNg.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con una composición de LNP descrita en la presente, en donde el componente de ARN comprende un ARNm de nucleasa Cas de clase 2 y un ARNg. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el ácido nucleico ARNg es o codifica un ARN doble guía (ARNgd). En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el ácido nucleico ARNg es o codifica un ARN guía simple (ARNgs).

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el ARNg es un ARNg modificado. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el ARNg modificado comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en un extremo 5'. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, en donde el ARNg modificado comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en un extremo 3'.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier composición de LNP descrita en la presente, que comprende además al menos un ácido nucleico como plantilla.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con un método de edición génica, que comprende poner en contacto una célula con una LNP. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, que comprende escindir ADN.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con un método para escindir ADN, que comprende poner en contacto una célula con una composición de LNP. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método para escindir ADN descrito en la presente, en donde la etapa de escisión comprende introducir una muesca de ADN monocatenario. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método para escindir ADN descrito en la presente, en donde la etapa de escisión comprende introducir una ruptura de ADN bicatenario. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método para escindir ADN descrito en la presente, en donde la composición de LNP comprende un ARNm de Cas clase 2 y un ácido nucleico de ARNg. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método para escindir ADN descrito en la presente, que comprende además introducir al menos un ácido nucleico como plantilla en la célula. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método para escindir ADN descrito en la presente, que comprende poner en contacto la célula con una composición de LNP que comprende un ácido nucleico como plantilla.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, en donde el método comprende administrar la composición de LNP a un animal, por ejemplo, un ser humano. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, en donde el método comprende administrar la composición de LNP a una célula, por ejemplo, una célula eucariota.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, en donde el método comprende administrar ARNm formulado en una primera composición de LNP y una segunda composición de LNP que comprende uno o más de un ARNm, un ARNg, un ácido nucleico de ARNg y un ácido nucleico plantilla. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, en donde la primera y la segunda composición de LNP se administran en forma simultánea. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, en donde la primera y la segunda composición de LNP se administran en forma consecutiva. En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica

descrito en la presente, en donde el método comprende administrar el ARNm y el ácido nucleico de ARNg formulados en una única composición de LNP.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, en donde la edición génica produce una inactivación génica.

En determinadas modalidades, la invención se relaciona con cualquier método de edición génica descrito en la presente, en donde la edición génica produce una corrección génica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de edición de TTR en células hepáticas de ratón luego de la administración con LNP que comprenden el Compuesto 1, Compuesto 29, Compuesto 31 o Compuesto 32. También se muestran los datos de la respuesta a la dosis. Véase el Ejemplo 122.

La Figura 1B es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de edición de TTR en células hepáticas de ratón luego de la administración con LNP que comprenden el Compuesto 1, Compuesto 40, Compuesto 53 o Compuesto 54. También se muestran los datos de la respuesta a la dosis. Véase el Ejemplo 122.

La Figura 1C es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de edición de B2M y TTR en células hepáticas de ratón luego de la administración con LNP que comprenden el Compuesto 1 o el Compuesto 59. También se muestran los datos de la respuesta a la dosis. Véase el Ejemplo 122.

La Figura 1D es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de edición de TTR en células hepáticas de ratón luego de la administración con LNP que comprenden el Compuesto 1, Compuesto 24, Compuesto 59, Compuesto 61 o Compuesto 94. También se muestran los datos de la respuesta a la dosis. Véase el Ejemplo 122.

La Figura 2 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de edición de TTR en células hepáticas de ratón luego de la administración con LNP que comprenden el Compuesto 1, Compuesto 100, Compuesto 101, Compuesto 102 o Compuesto 103. Véase el Ejemplo 123.

La Figura 3 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de edición de TTR en células hepáticas de ratón luego de la administración con LNP que comprenden el Compuesto 1, Compuesto 114, Compuesto 115 o Compuesto 116. Véase el Ejemplo 123.

La Figura 4 es una gráfica en la que se muestra el porcentaje de edición de TTR en células hepáticas de rata luego de la administración con LNP que comprenden el Compuesto 1, Compuesto 12, Compuesto 59 o Compuesto 94. Se muestran los datos de la respuesta a la dosis. Véase el Ejemplo 125.

Composiciones de nanopartículas lipídicas

Lípidos

$$\begin{array}{c}
 \text{R}^2 \text{---} \text{N} \text{---} \text{X}^2 \text{---} \text{X}^1 \text{---} \text{X}^3 \text{---} \text{O} \text{---} \text{W} \text{---} \text{C}(\text{R}^7) \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{Y}^1 \text{---} (\text{Y}^2)_n \text{---} \text{R}^4 \\
 | \\
 \text{R}^3 \\
 | \\
 \text{C} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \\
 | \quad | \\
 \text{R}^6 \quad \text{Z}^2 \\
 | \quad | \\
 \text{R}^5 \quad \text{Z}^1
 \end{array}
 \quad (II),$$

X² es alquileo C₂₋₅,

X^3 es $C(=O)$, o un enlace directo,

R^1 es H o Me,

R^3 es alquilo C_{1-3} ,

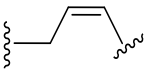
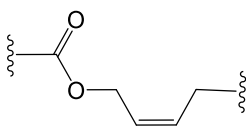
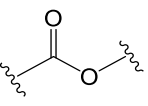
R^2 es alquilo C_{1-3} , o

R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que está unido y 1-3 átomos de carbono de X^2 forman un anillo de 4, 5 o 6 miembros, o

X^1 es NR^1 , R^1 y R^2 junto con los átomos de nitrógeno a los que están unidos forman un anillo de 5 o 6 miembros, o

R^2 junto con R^3 y el átomo de nitrógeno al que está unido forman un anillo de 5, 6 o 7 miembros.

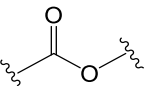
Y^1 es alquilenos C_{2-12} ,

Y^2 se selecciona de  (en cualquier orientación),  (en cualquier orientación), y  (en cualquier orientación),

n es 0 a 3,

R^4 es alquilo C_{1-15} ,

Z^1 es alquilenos C_{1-6} o un enlace directo,

Z^2 es  (en cualquier orientación) o está ausente, siempre que si Z^1 es un enlace directo, Z^2 está ausente;

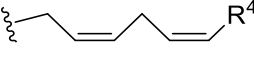
R^5 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

R^6 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

W es metileno o un enlace directo, y

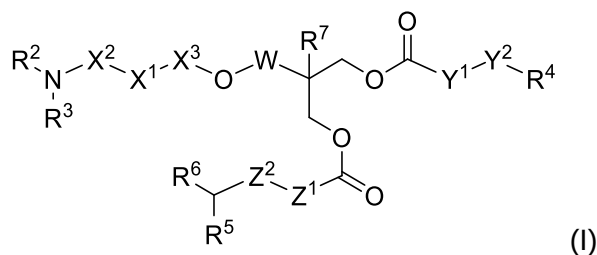
R^7 es H o Me,

o una sal de este,

siempre que si R^3 y R^2 son alquilos C_2 , X^1 es O, X^2 es alquilenos C_3 lineal, X^3 es $C(=O)$, Y^1 es alquilenos C_6 lineal, $(Y^2)_n-R^4$ es , R^4 es alquilo C_5 lineal, Z^1 es alquilenos C_2 , Z^2 está ausente, W es metileno, y R^7 es H, entonces R^5 y R^6 no son alcoxi C_8 .

En algunas modalidades, n es 1 a 3, por ejemplo, n es 1. En determinadas modalidades, n es 2. En algunas modalidades, n es 3.

En determinadas modalidades, el lípido es un compuesto que tiene una estructura de la Fórmula (I):



X^1 es O, NR^1 o un enlace directo,

X^2 es alquileo C_{2-5} ,

X^3 es $C(=O)$, o un enlace directo,

R^1 es H o Me,

R^3 es alquilo C_{1-3} ,

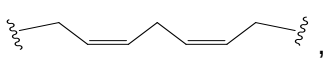
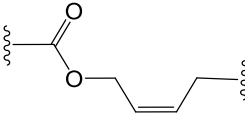
R^2 es alquilo C_{1-3} , o

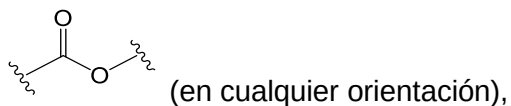
R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que está unido y 1-3 átomos de carbono de X^2 forman un anillo de 4, 5 o 6 miembros, o

X^1 es NR^1 , R^1 y R^2 junto con los átomos de nitrógeno a los que están unidos forman un anillo de 5 o 6 miembros, o

R^2 junto con R^3 y el átomo de nitrógeno al que está unido forman un anillo de 5, 6 o 7 miembros.

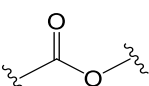
Y^1 es alquileo C_{2-12} ,

Y^2 se selecciona de ,  (en cualquier orientación), y



R^4 es alquilo C_{3-15} ,

Z^1 es alquileo C_{1-6} o un enlace directo,

Z^2 es  (en cualquier orientación) o ausente, siempre que si Z^1 es un enlace directo, Z^2 está ausente,

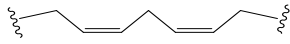
R^5 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

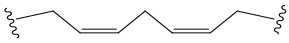
R^6 es alquilo C_{5-9} o alcoxi C_{6-10} ,

W es metileno o un enlace directo, y

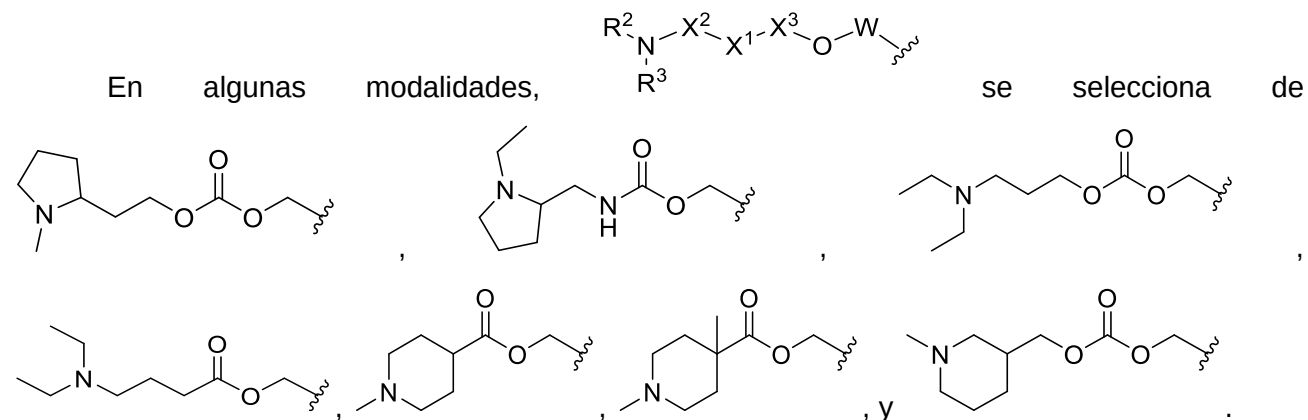
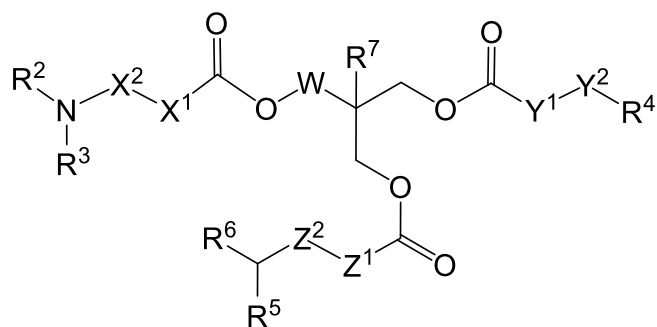
R^7 es H o Me,

o una sal de este,

siempre que si R^3 y R^2 son alquilos C_2 , X^1 es O, X^2 es alquileo C_3 lineal, X^3 es $C(=O)$, Y^1 es alquileo C_6 lineal, Y^2 es , R^4 es alquilo C_4 lineal, Z^1 es alquileo C_2 , Z^2 está ausente, W es metileno, y R^7 es H, entonces R^5 y R^6 no son alcoxi C_8 (p. ej. el compuesto no es el Compuesto 1).

Preferiblemente, el compuesto es un compuesto que tiene una estructura de Fórmula (I) siempre que si R^3 y R^2 son alquilos C_2 , X^1 es O, X^2 es alquileo C_3 lineal, X^3 es $C(=O)$, Y^1 es alquileo C_6 lineal, Y^2 es , R^4 es alquilo C_4 lineal, Z^1 es alquileo C_2 , Z^2 está ausente, W es metileno, y R^7 es H, entonces R^5 y R^6 no son alcoxi C_{6-10} .

En algunas modalidades, el compuesto es un compuesto de la Fórmula (Ia):



En algunas modalidades X^2 es alquileo C_2 lineal, o alquileo C_3 lineal, o alquileo C_4 lineal.

En otras modalidades, R^3 es alquilo C_1 o alquilo C_2 .

En determinadas modalidades, R^2 es alquilo C_1 o alquilo C_2 . En algunas otras modalidades, R^2 junto con el átomo de nitrógeno y 1-2 átomos de carbono de X^2 forman un anillo de 5 miembros. Alternativamente, R^2 , junto con el átomo de nitrógeno y 1-3 átomos de carbono de X^2 pueden formar un anillo de 6 miembros.

En incluso otras modalidades, R^2 y R^3 junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo de 5 miembros. En determinadas modalidades, X^1 es NH o es un enlace directo.

En algunas modalidades Y^1 es alquileo C_{3-10} lineal, tal como un alquileo C_{4-8} lineal, por ejemplo un alquileo C_{5-7} lineal.

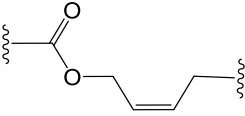
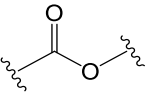
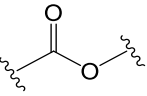
En determinadas modalidades R^4 es alquilo C_{4-14} lineal, preferentemente un alquilo C_{6-12} lineal.

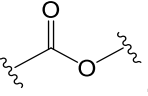
En algunas modalidades, Z^1 es alquileo C_{2-4} lineal.

En determinadas modalidades R^5 y R^6 son cada uno independientemente alquilo C_{5-9} lineal, tal como un alquilo C_{6-8} lineal.

En algunas modalidades, R^5 y R^6 son cada uno independientemente alcoxi C_{7-9} lineal.

En determinadas modalidades, R^5 y R^6 son idénticos. Alternativamente, R^5 y R^6 son diferentes.

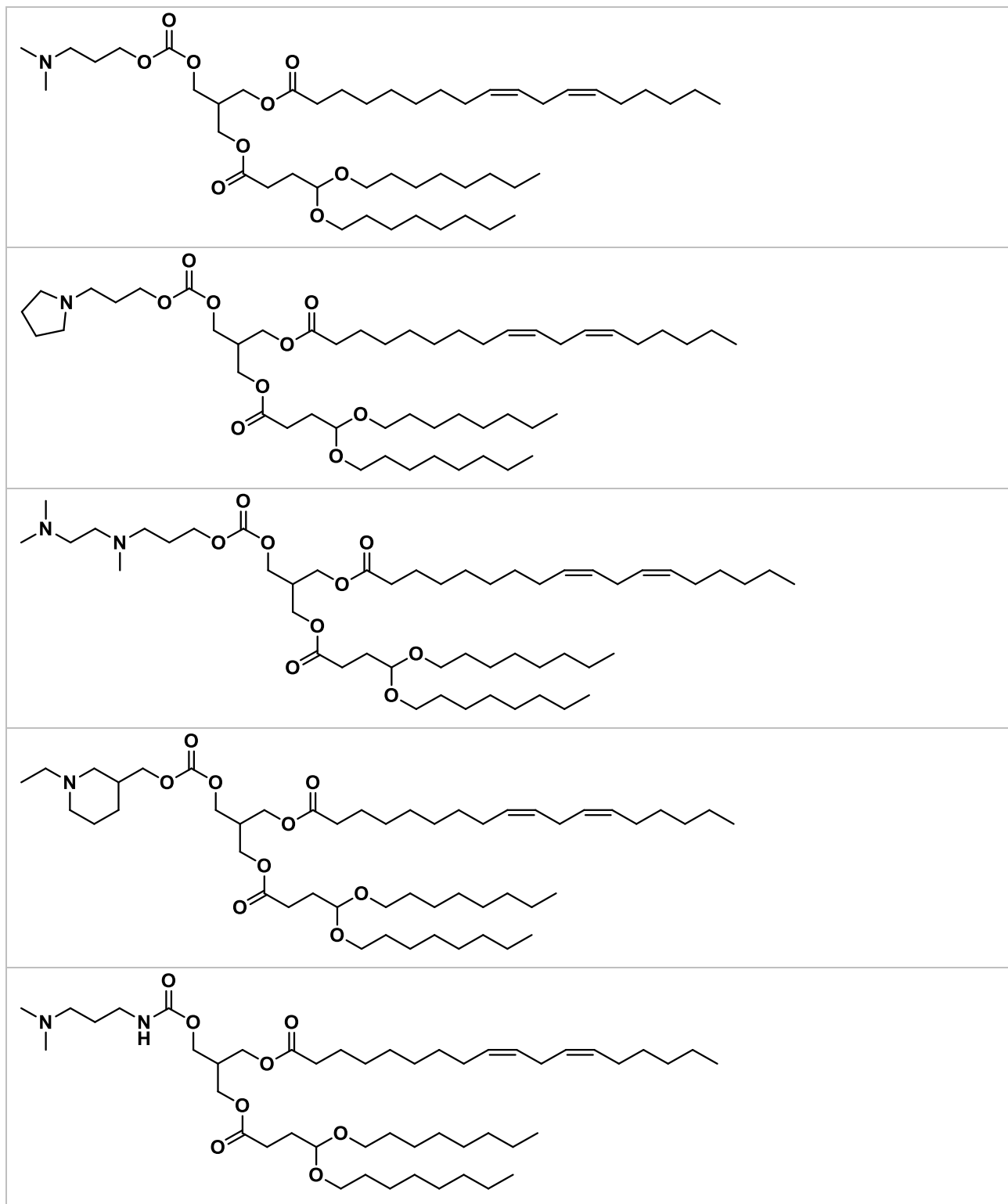
En algunas modalidades, Y^2 es . En otras modalidades, Y^2 es . En algunas modalidades, Y^1 es alquileo C_7 lineal, Y^2 es , n es 1 y R^4 es alquilo C_{10} lineal.

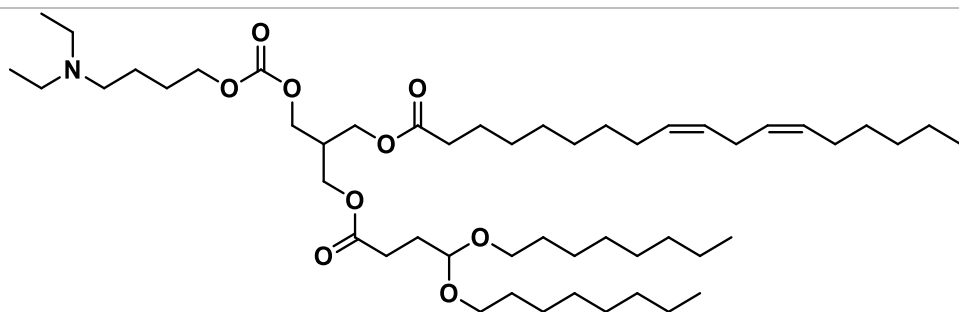
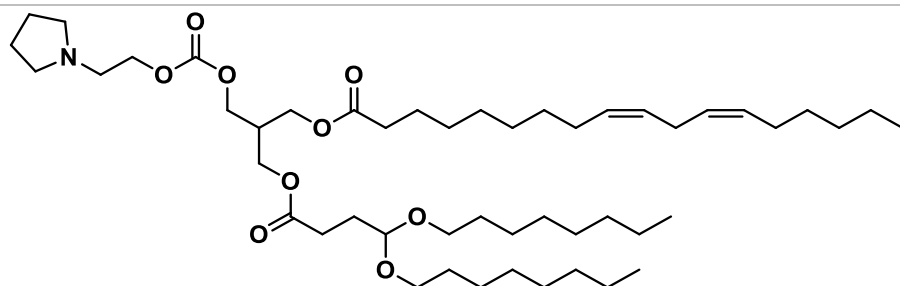
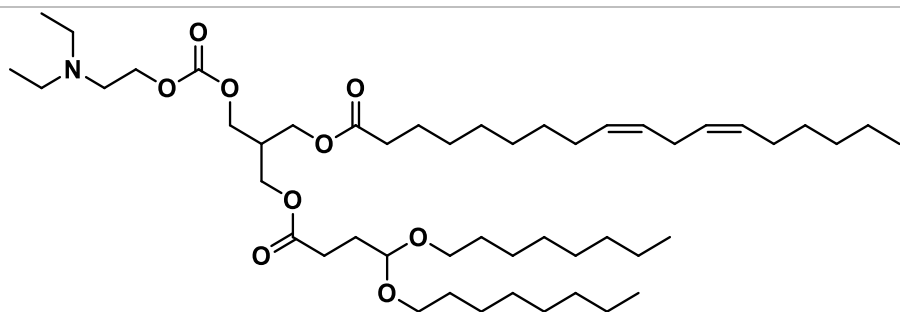
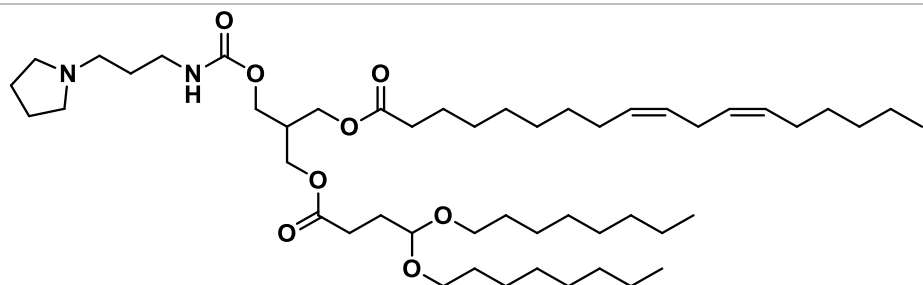
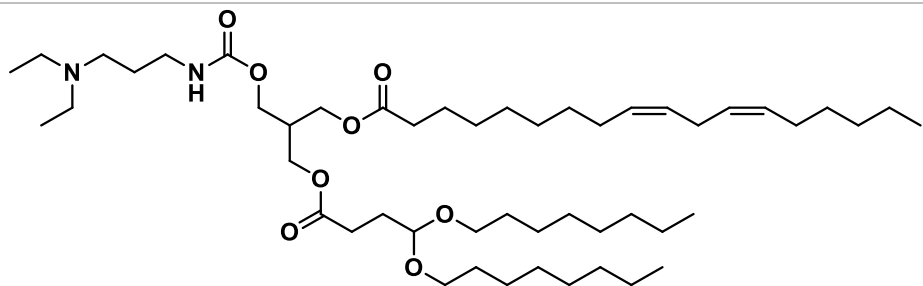
En determinadas modalidades, Z^2 es .

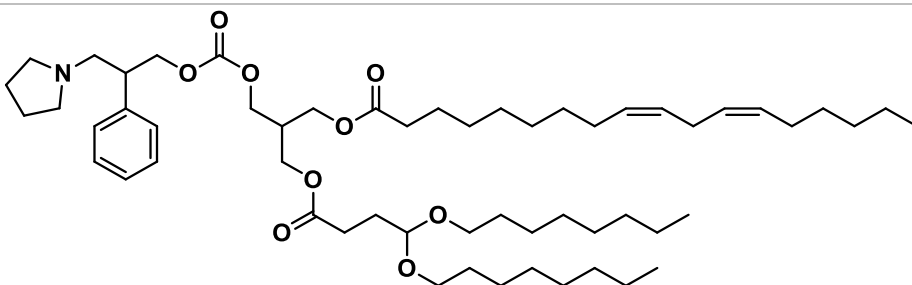
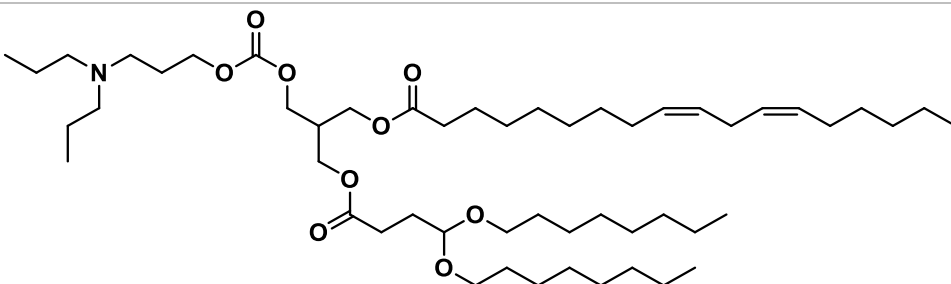
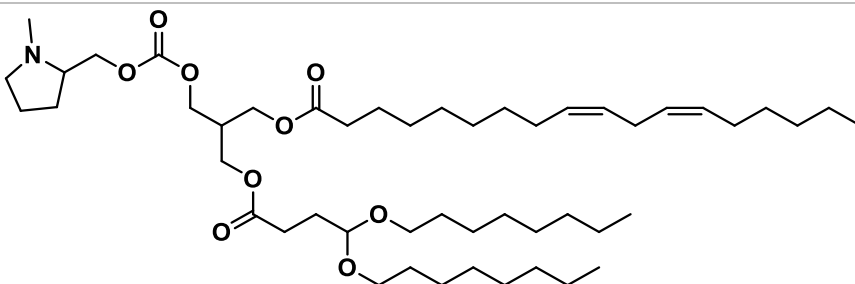
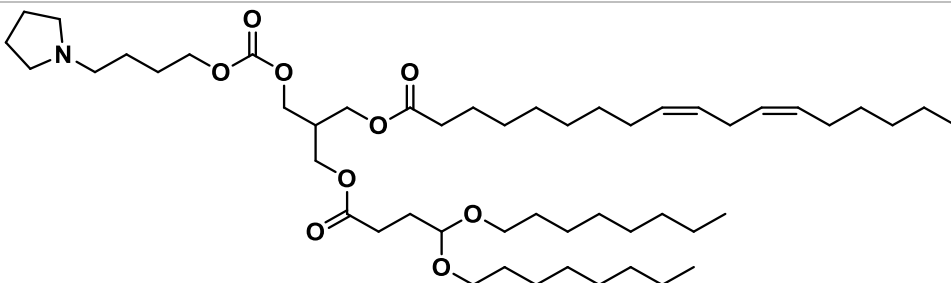
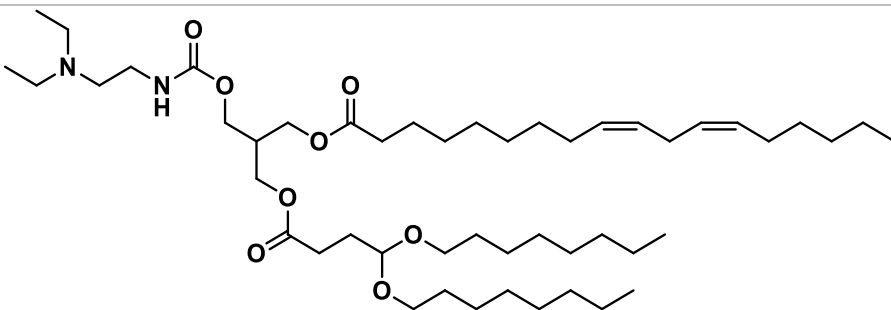
En algunas modalidades, Z^1 , Z^2 y R^5 se seleccionan para formar una cadena lineal de 6-18 átomos, incluidos los átomos de carbono y oxígeno del éster y el acetal.

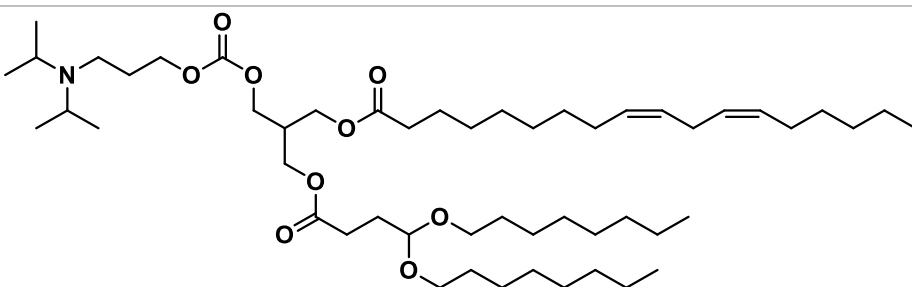
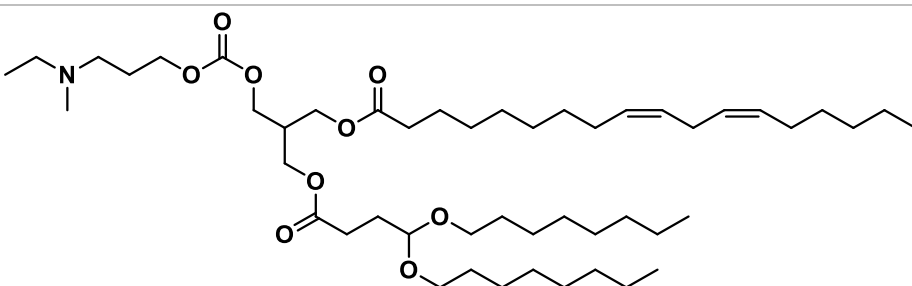
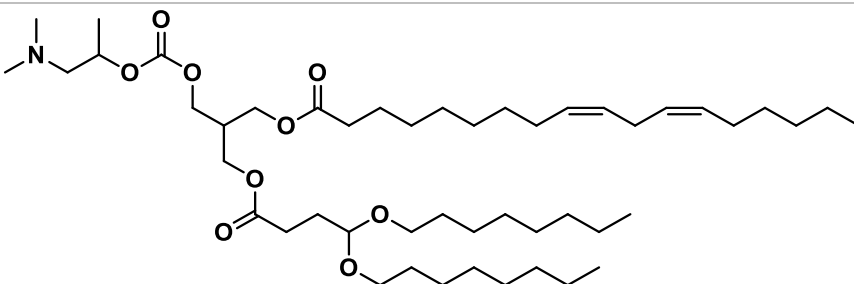
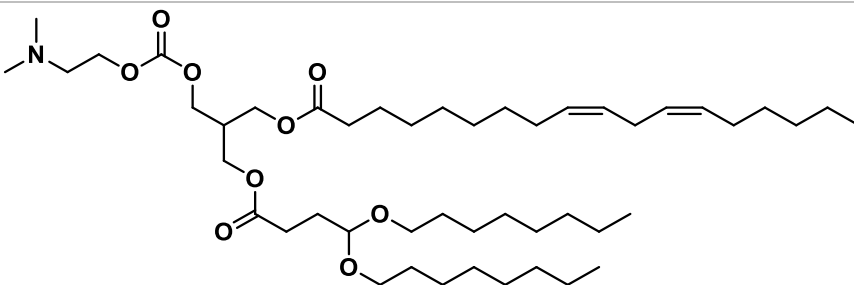
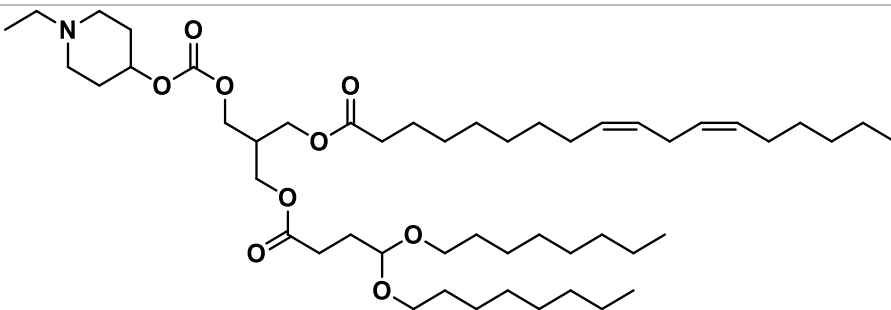
En algunas modalidades, Y^1 , Y^2 y R^4 se seleccionan para formar una cadena lineal de 14-24 átomos, incluidos los átomos de carbono y oxígeno del éster.

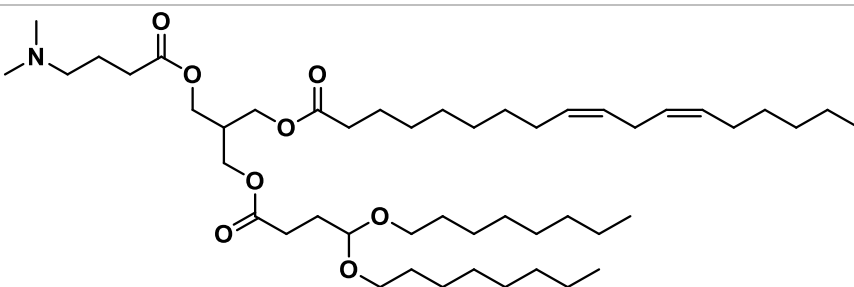
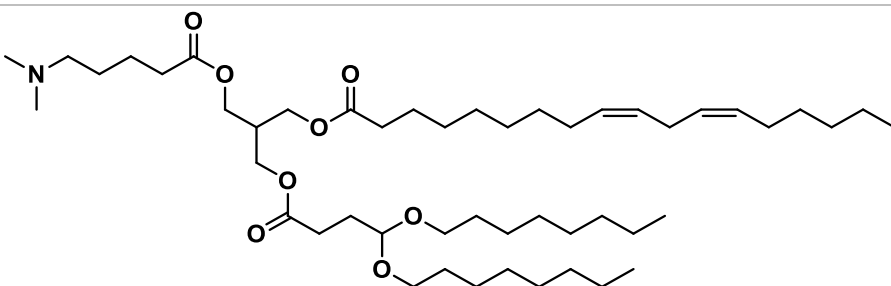
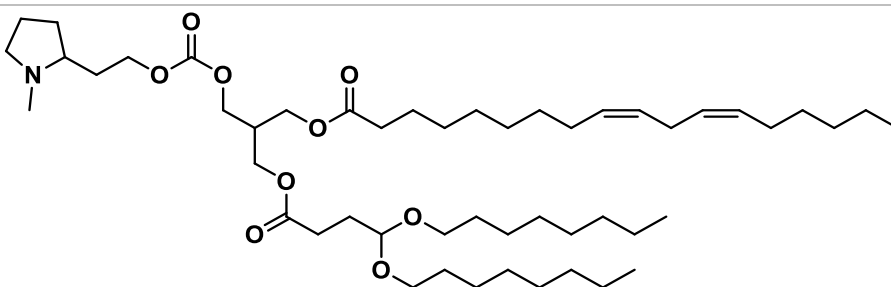
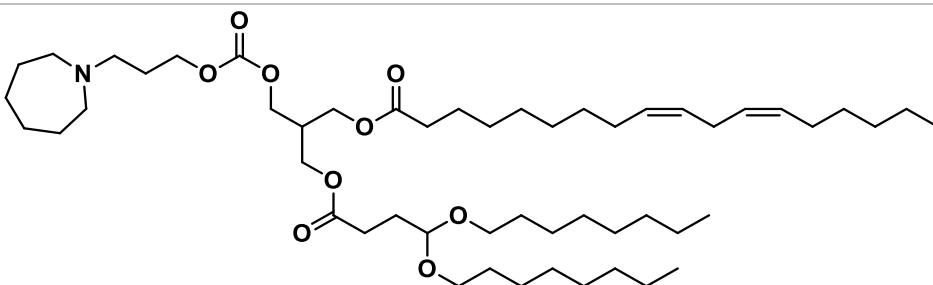
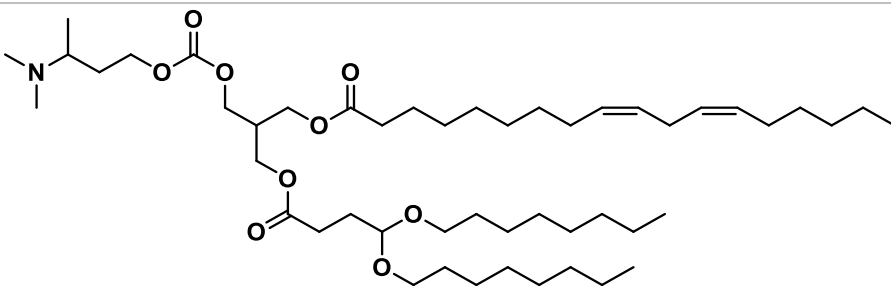
Los compuestos representativos de la Fórmula (II) incluyen:

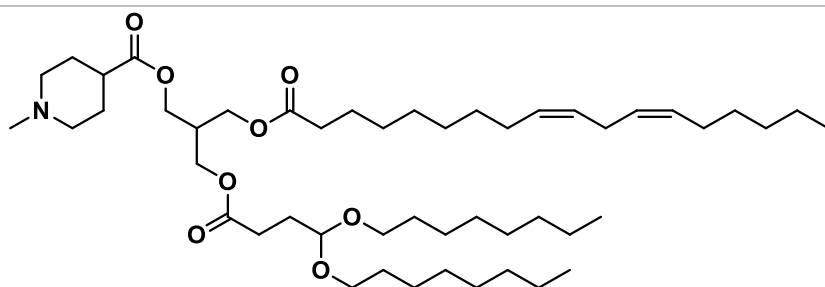
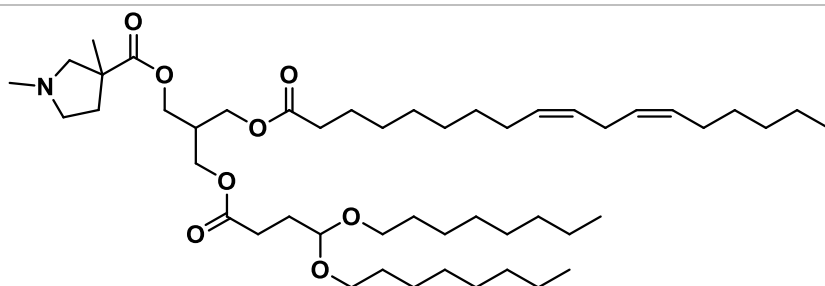
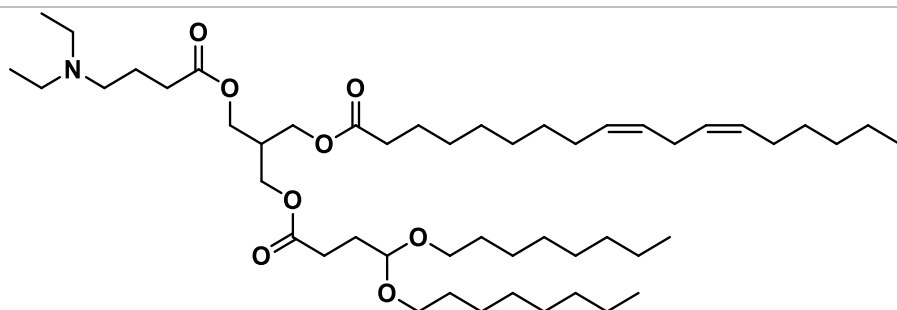
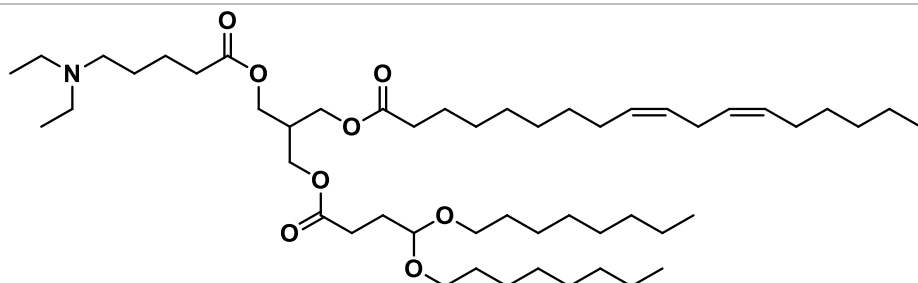
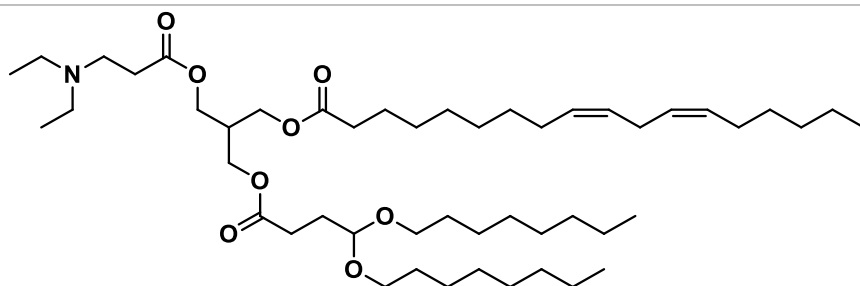


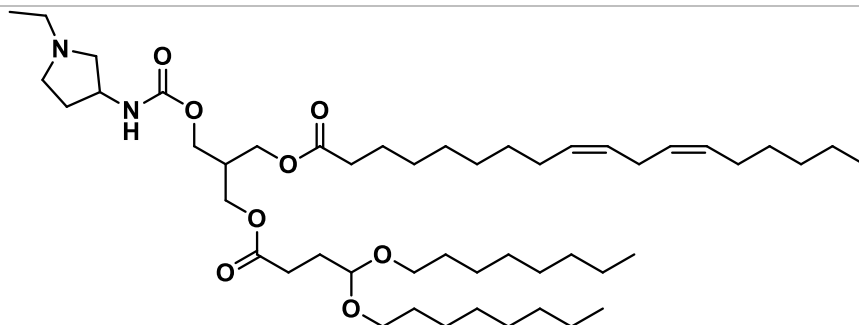
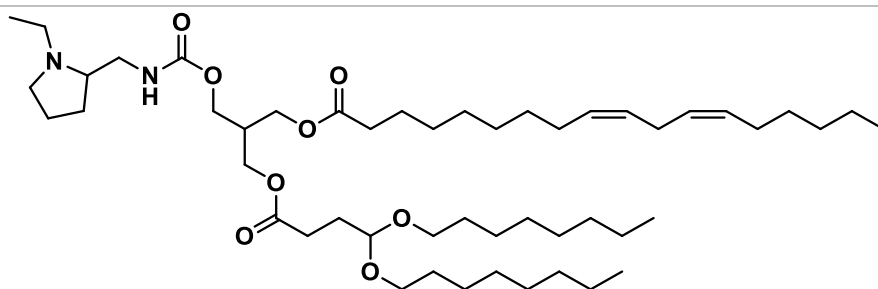
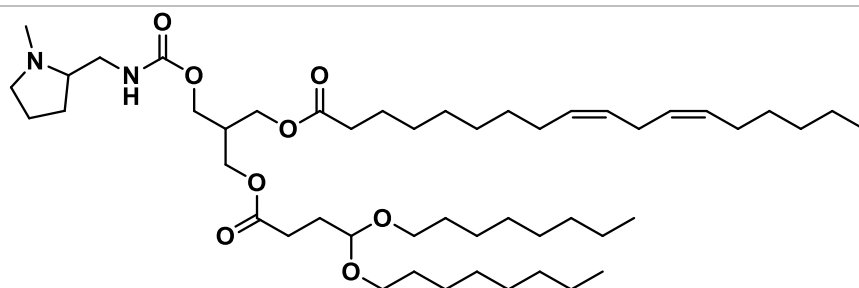
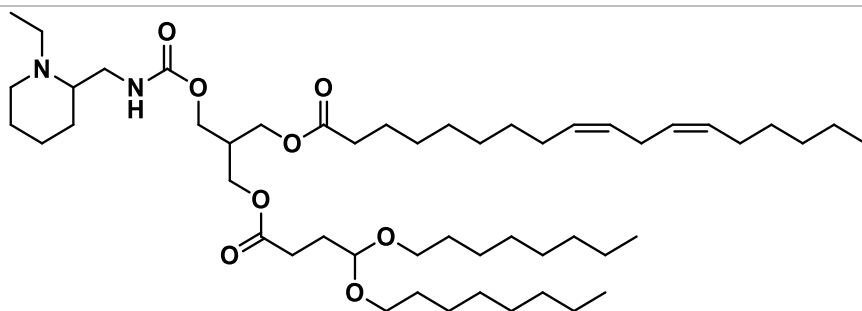
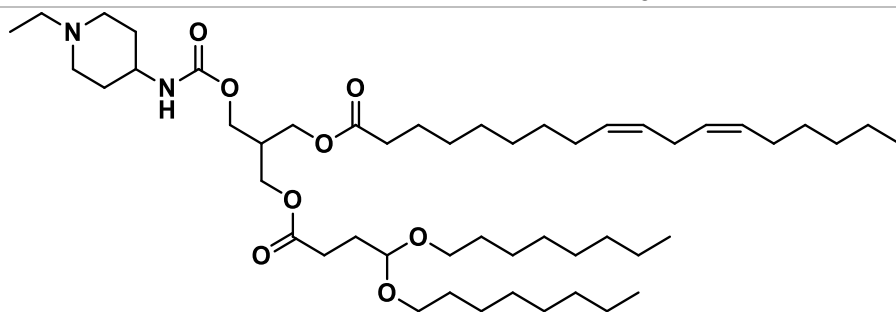


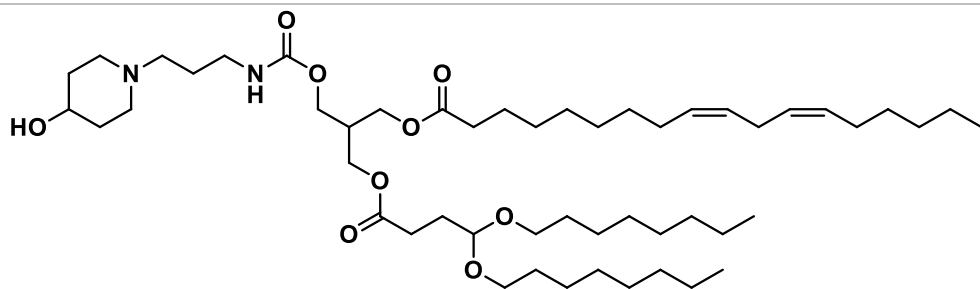
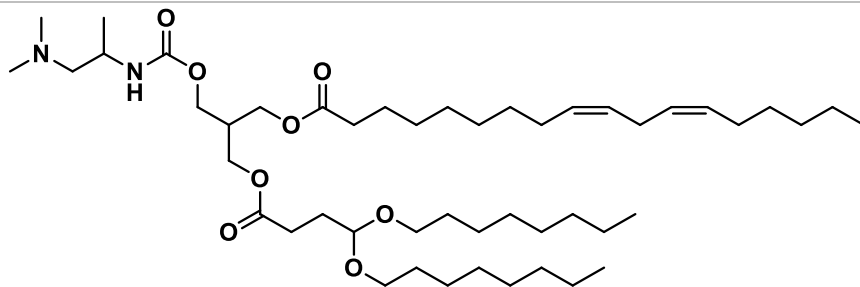
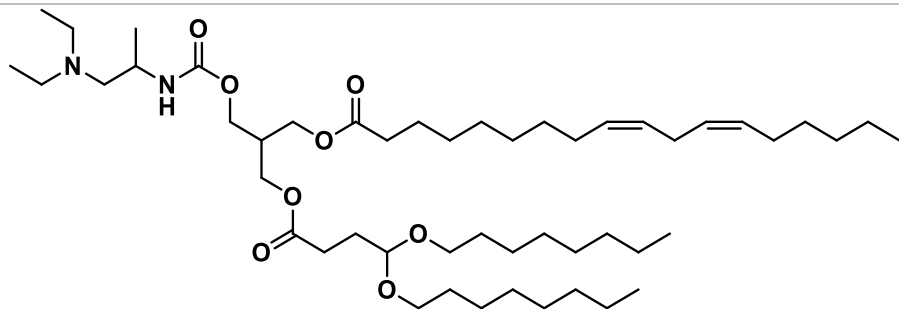
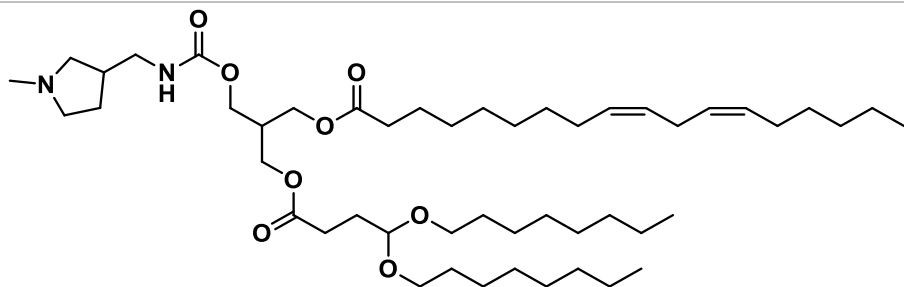
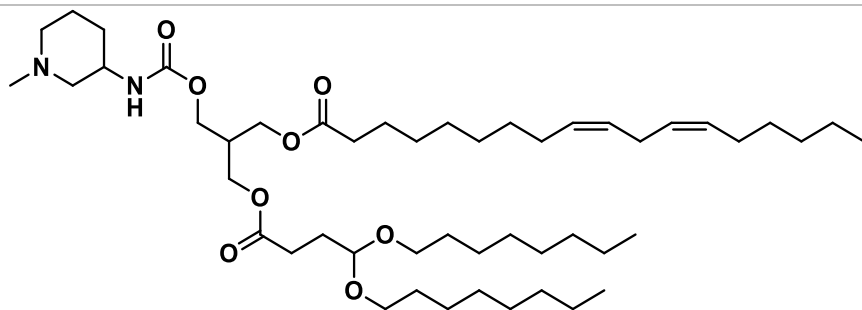


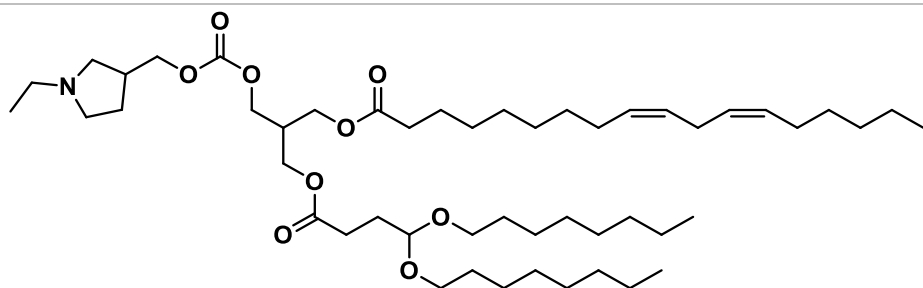
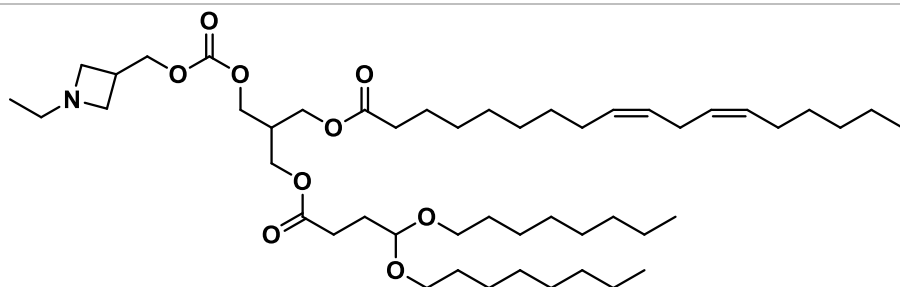
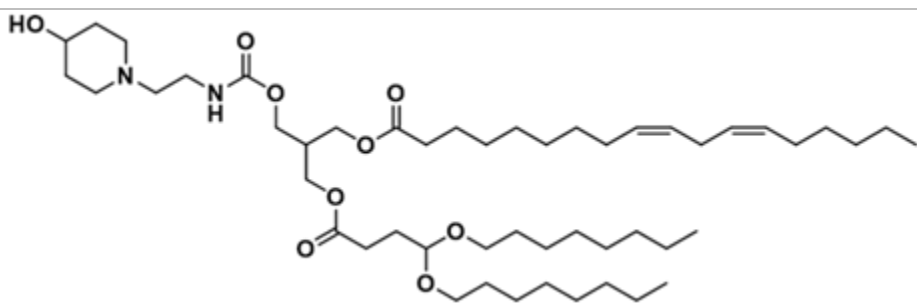
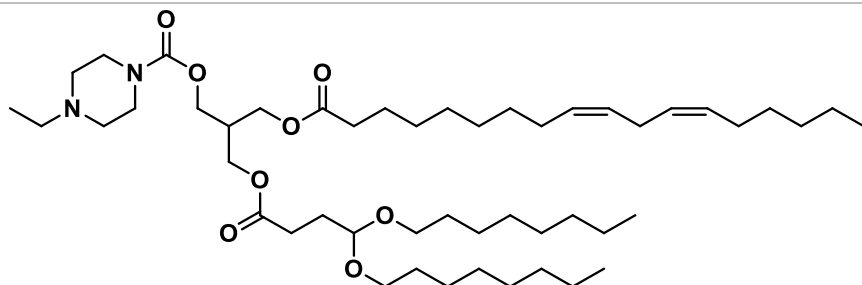
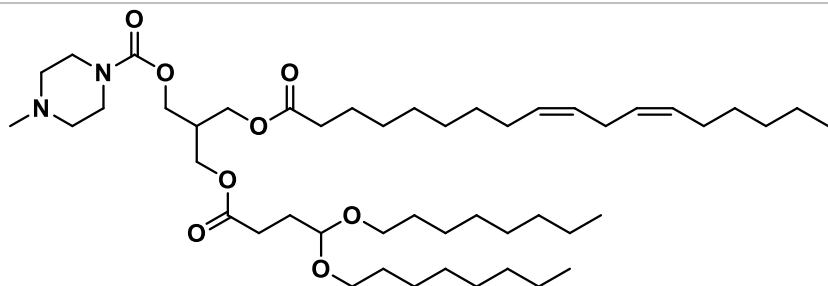


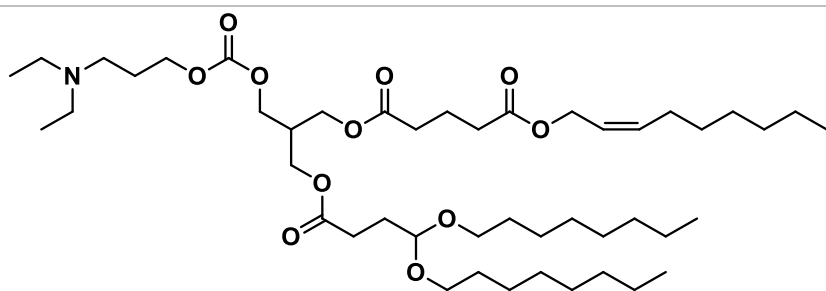
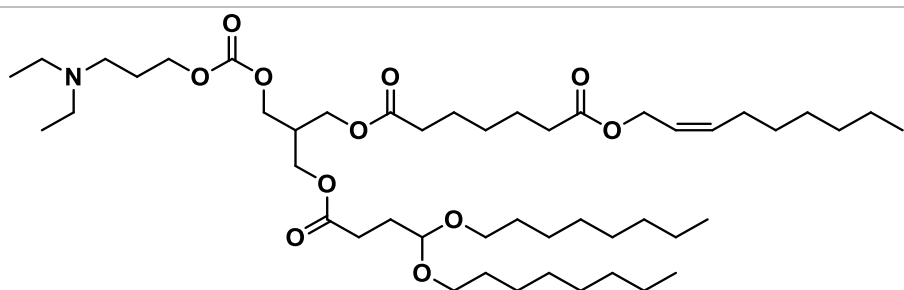
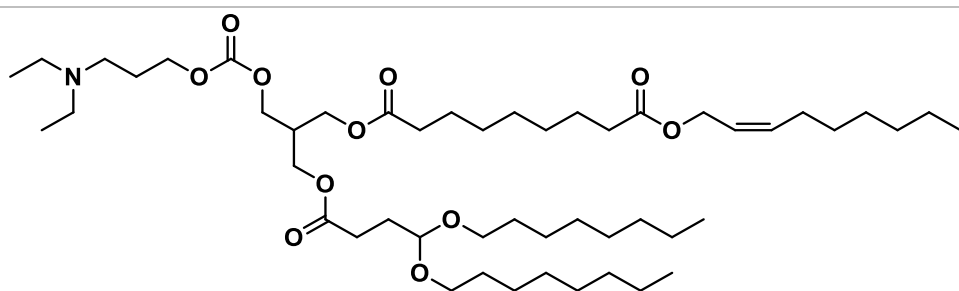
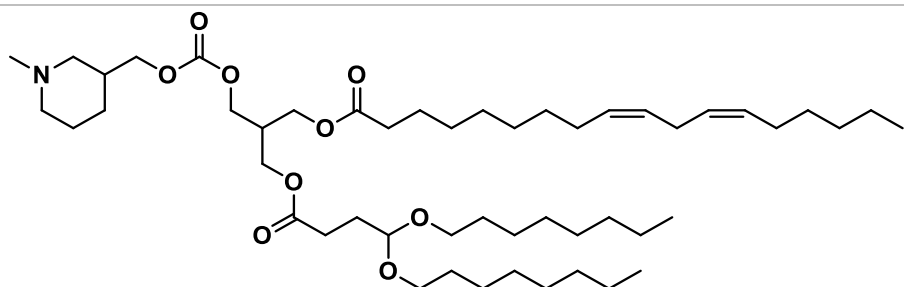
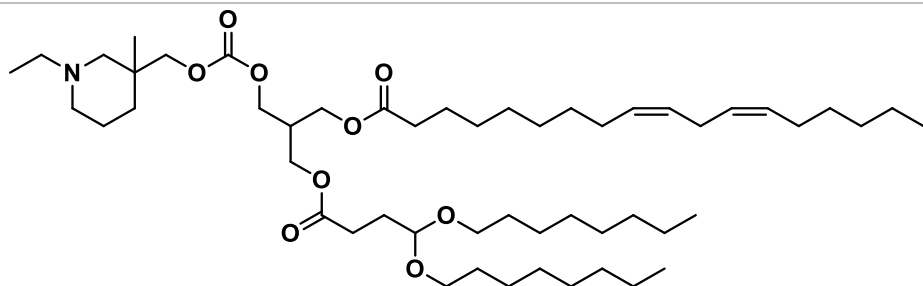


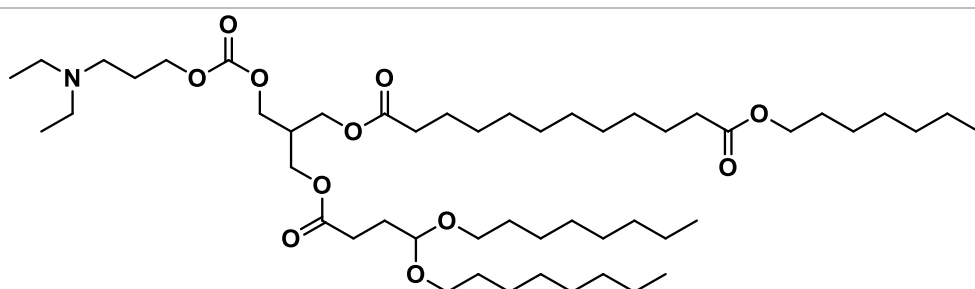
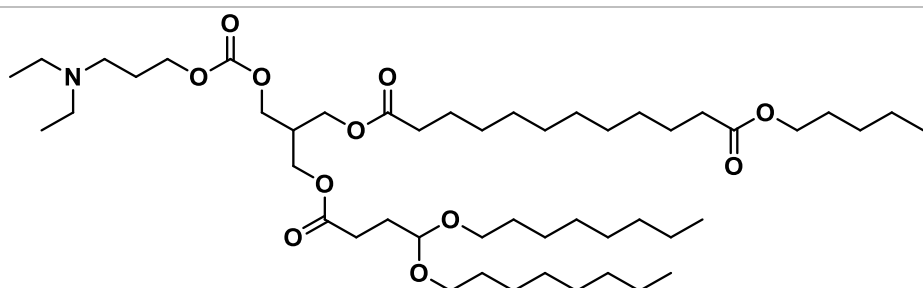
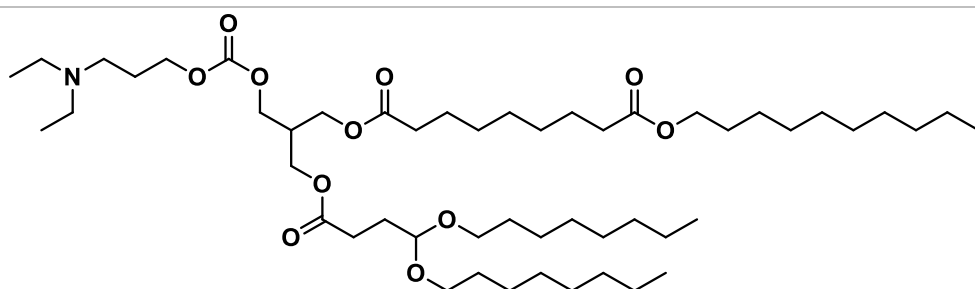
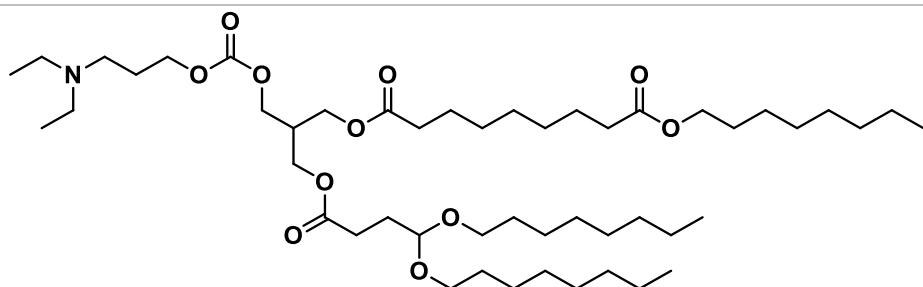
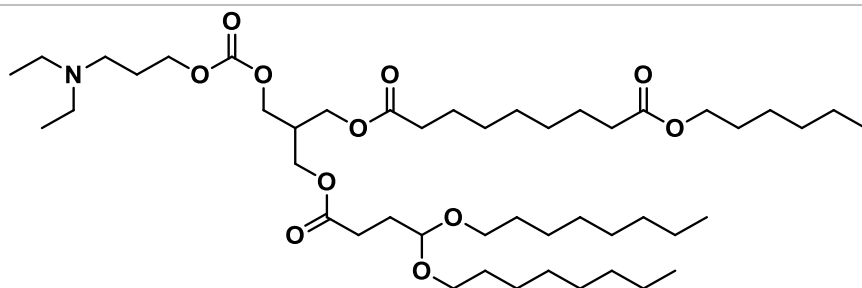


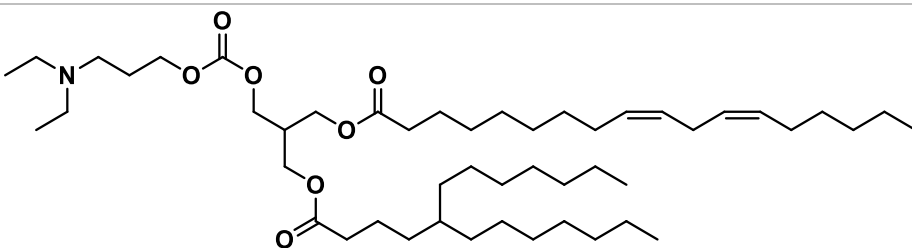
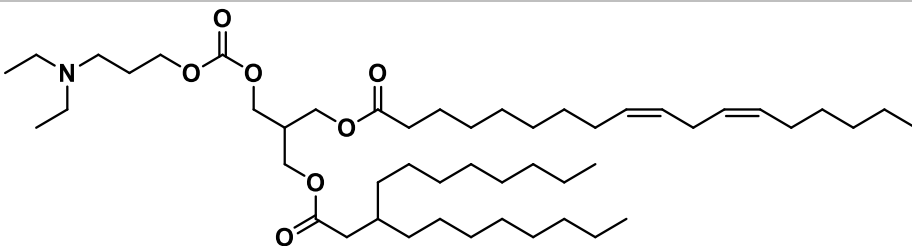
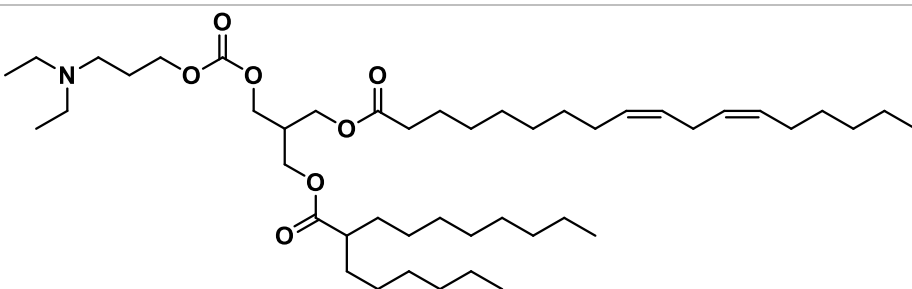
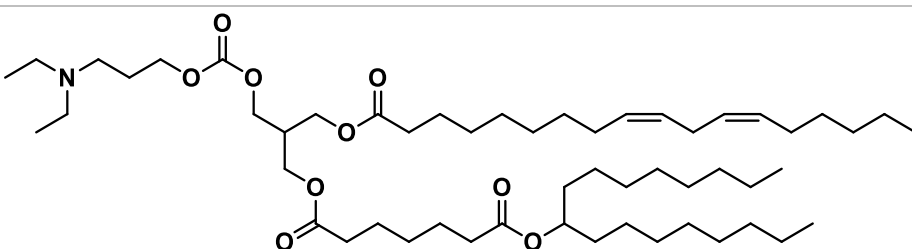
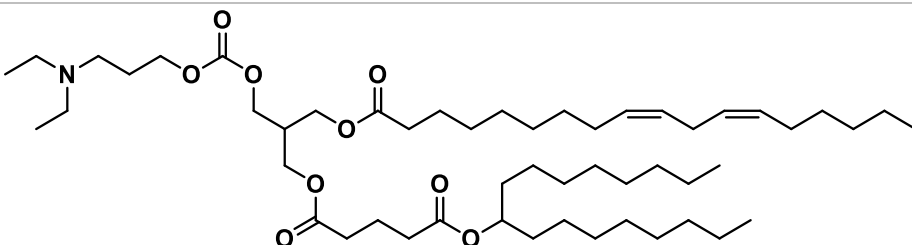
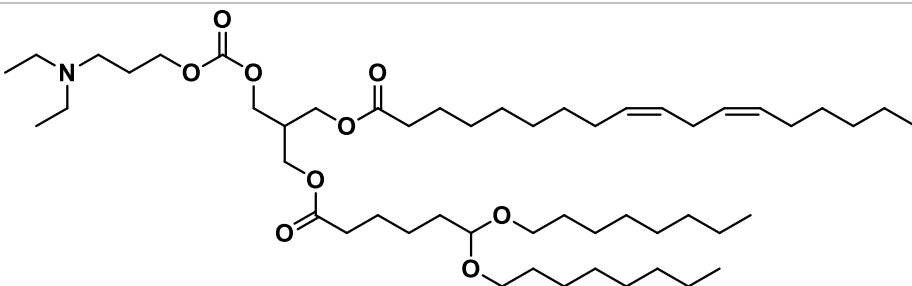


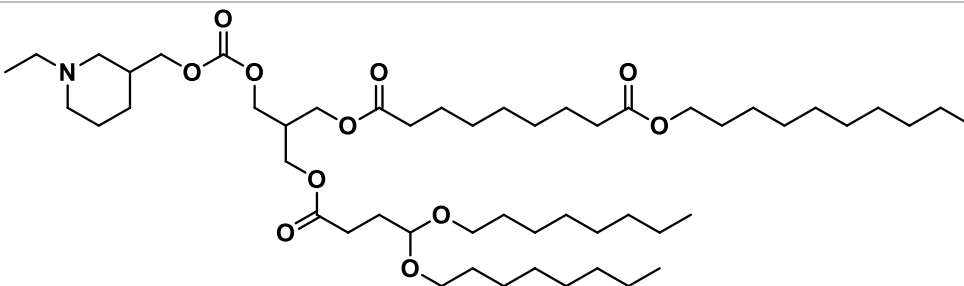
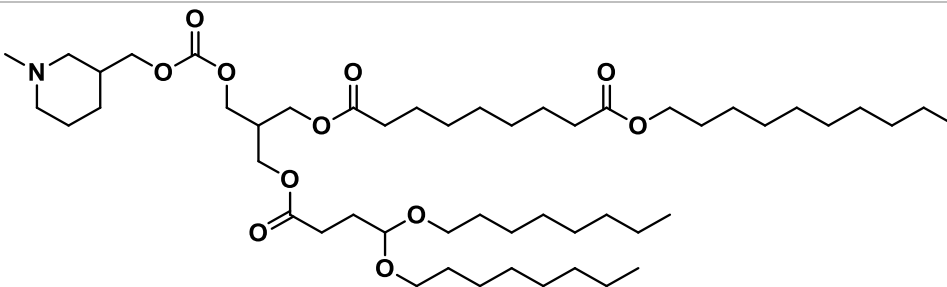
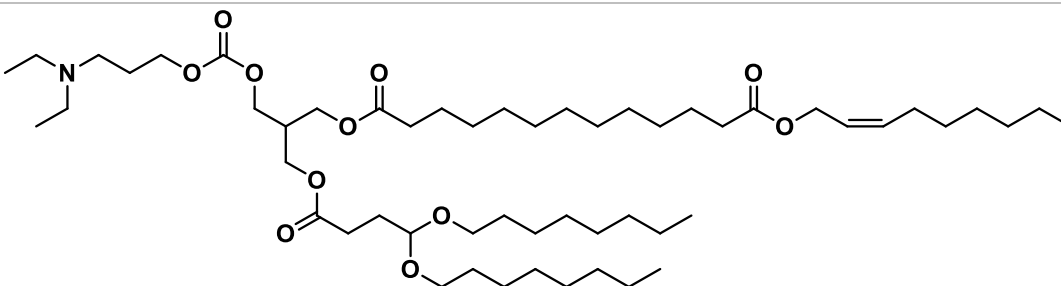
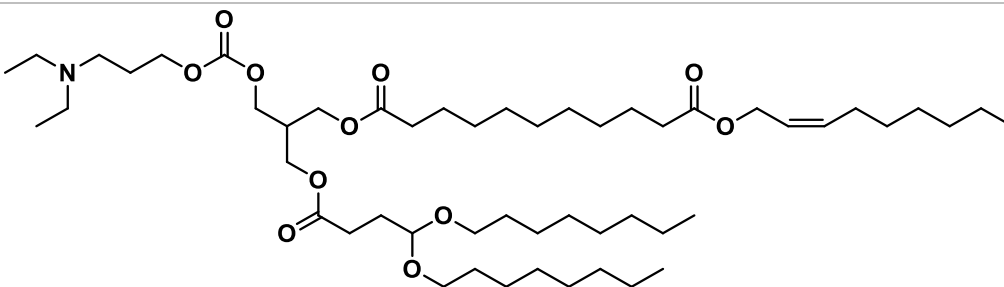
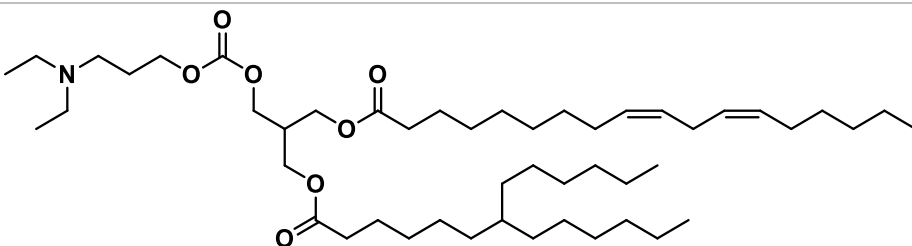


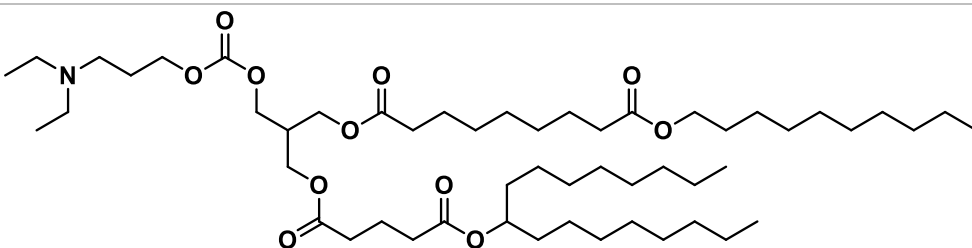
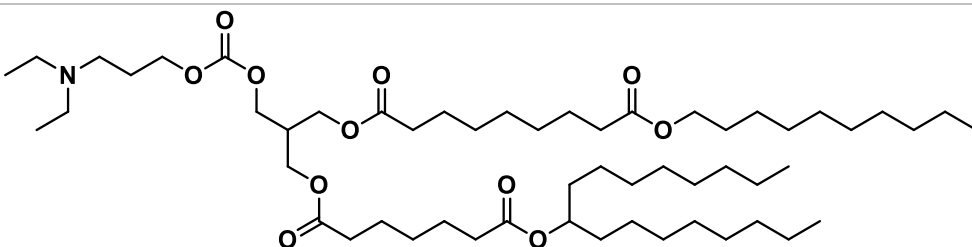
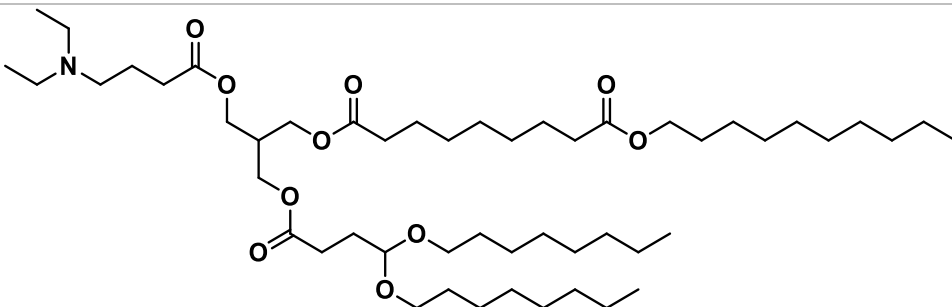
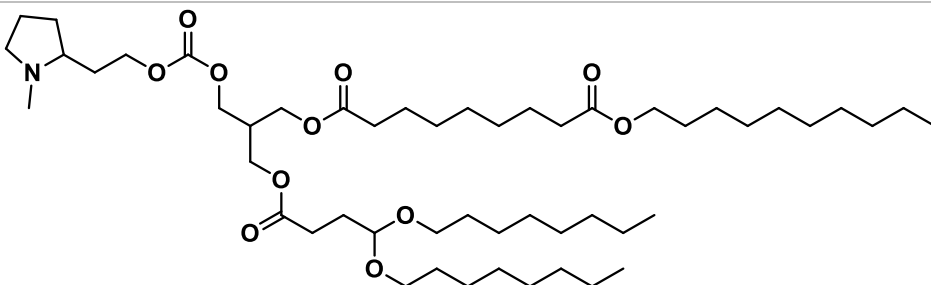
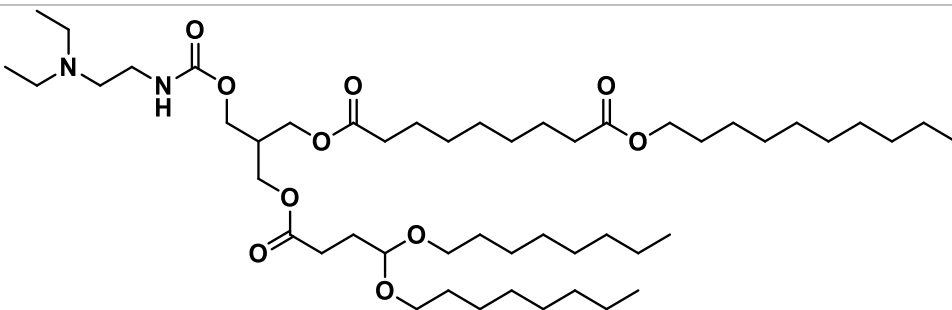


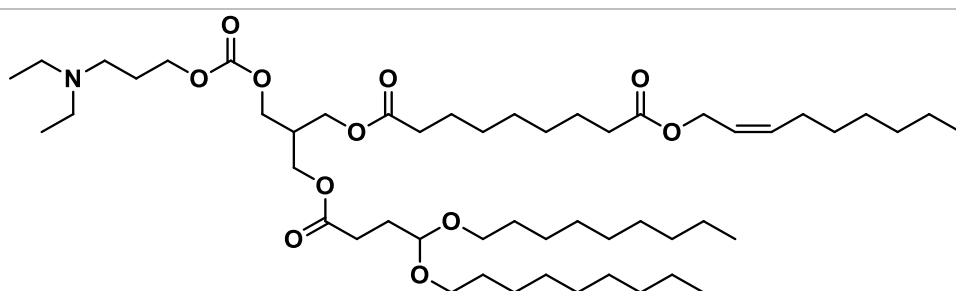
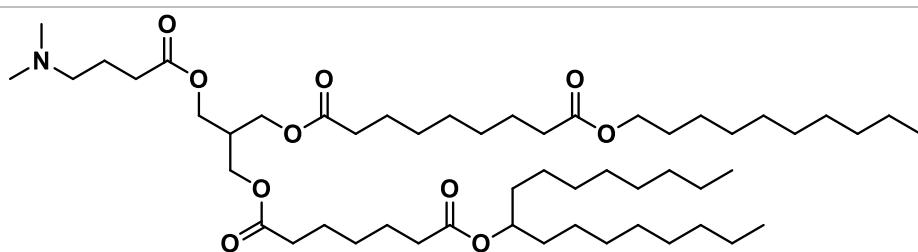
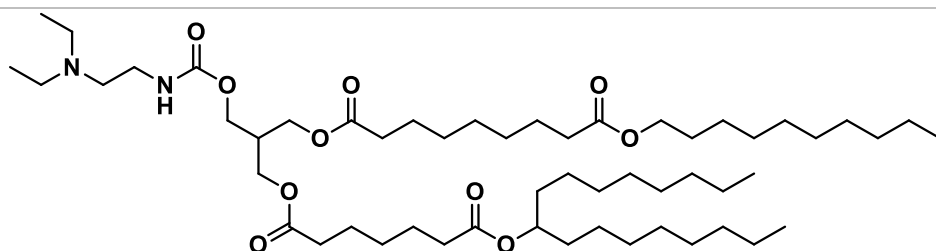
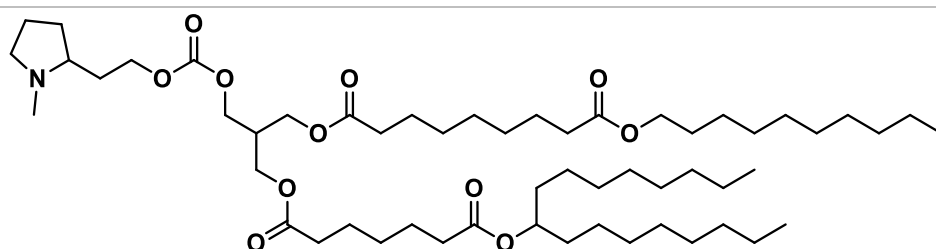
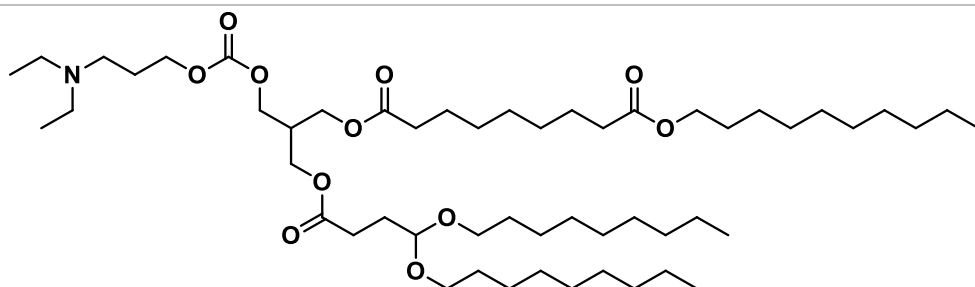
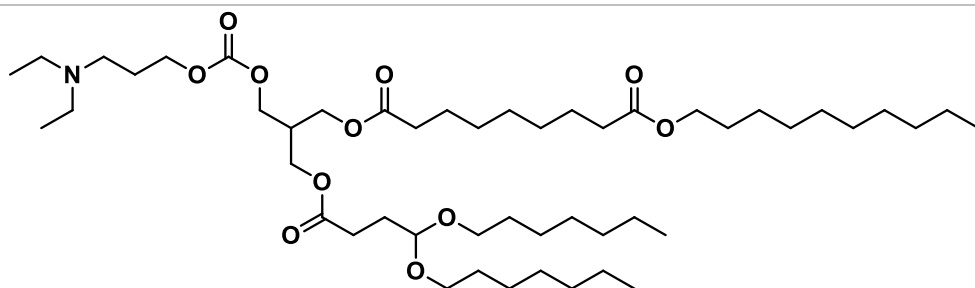


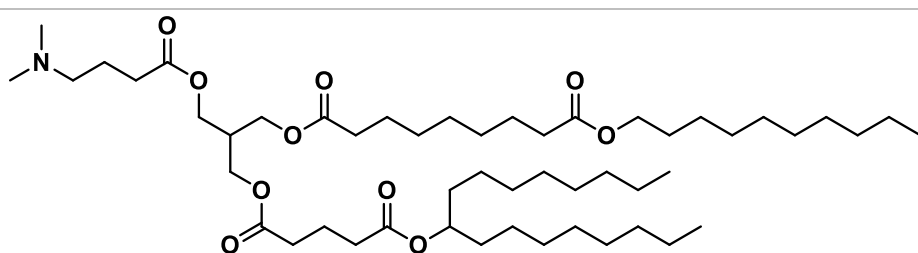
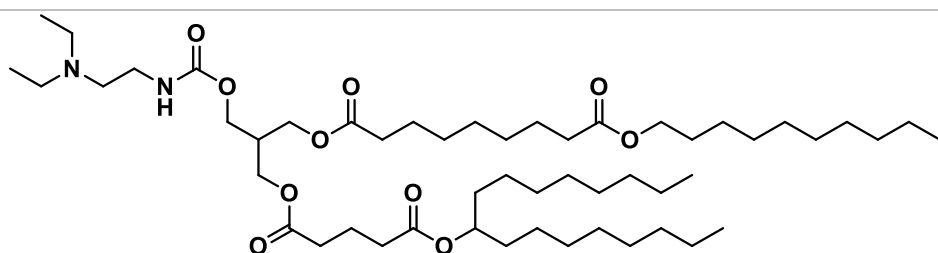
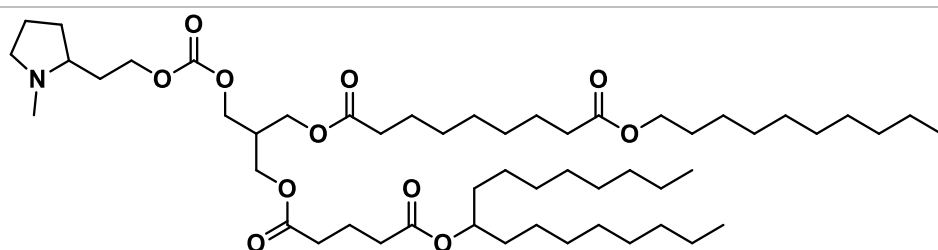
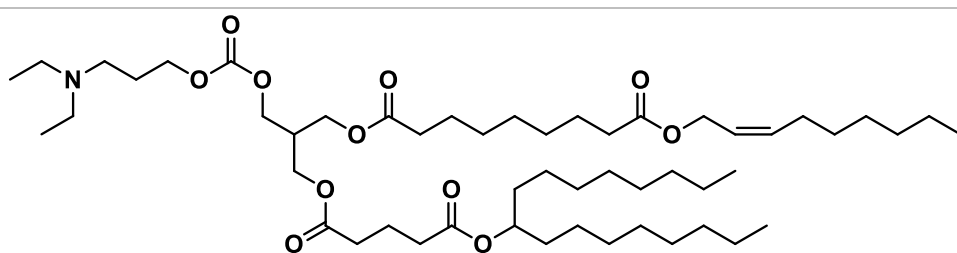
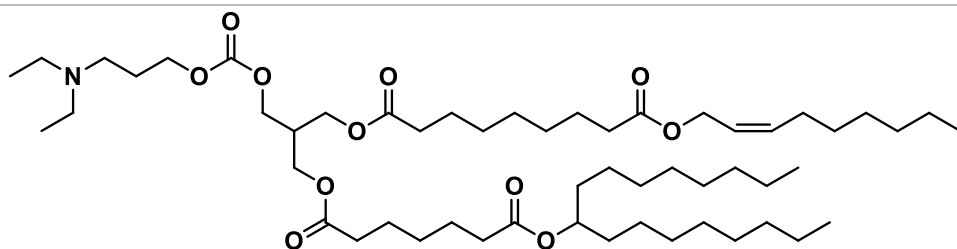
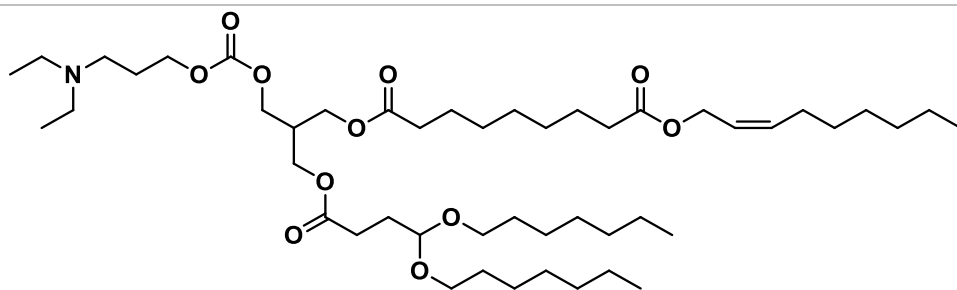


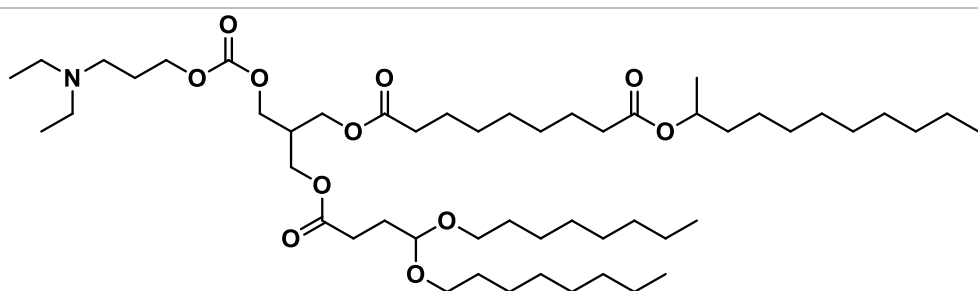
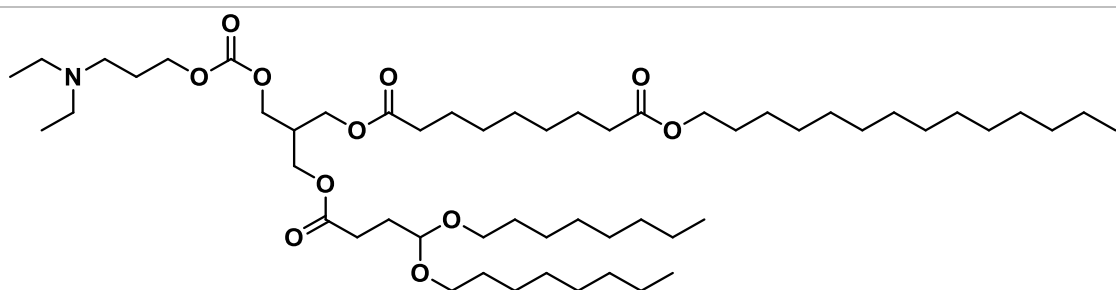
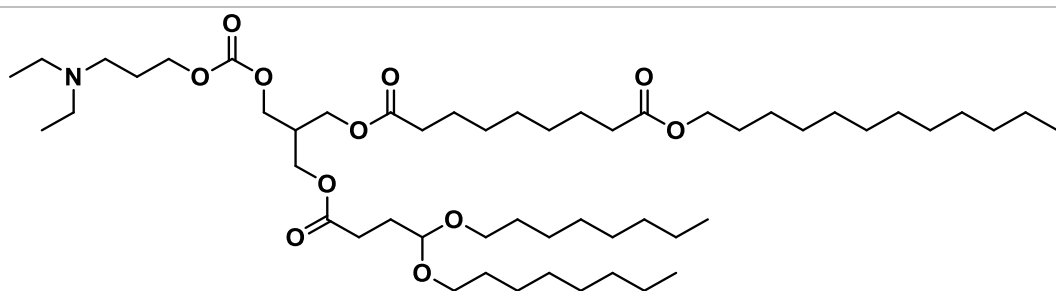
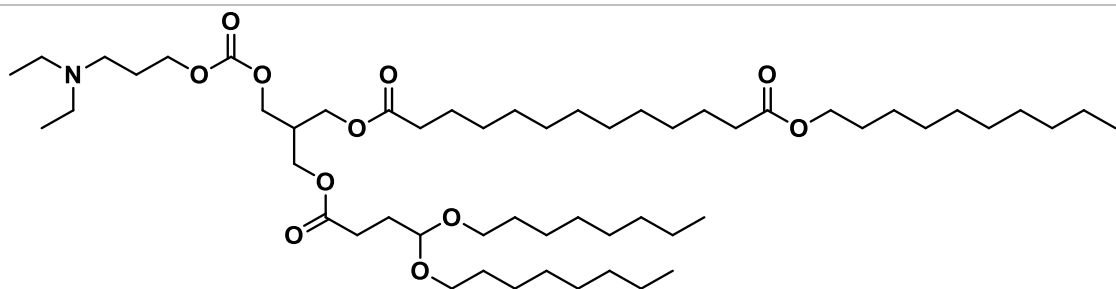
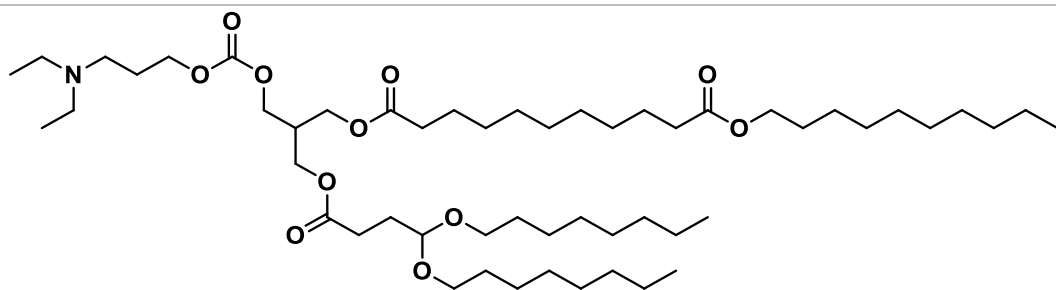


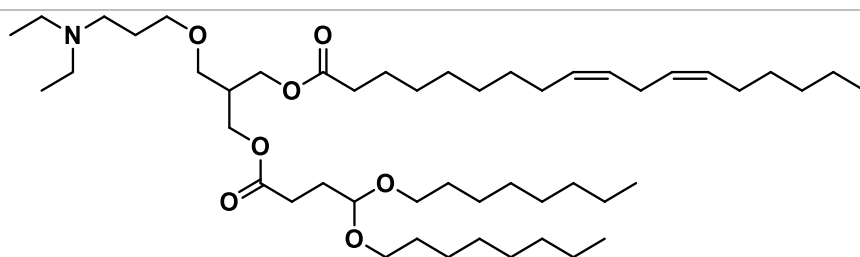
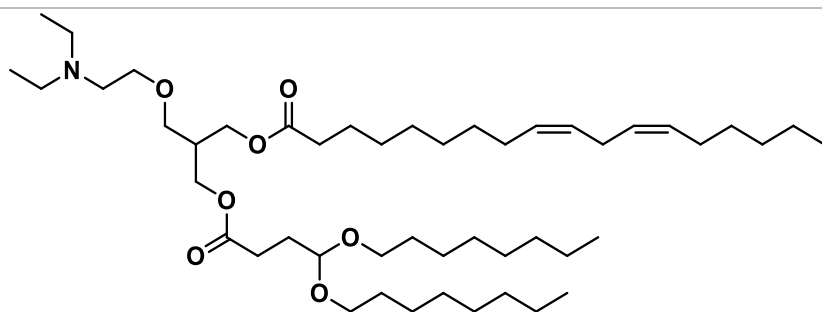
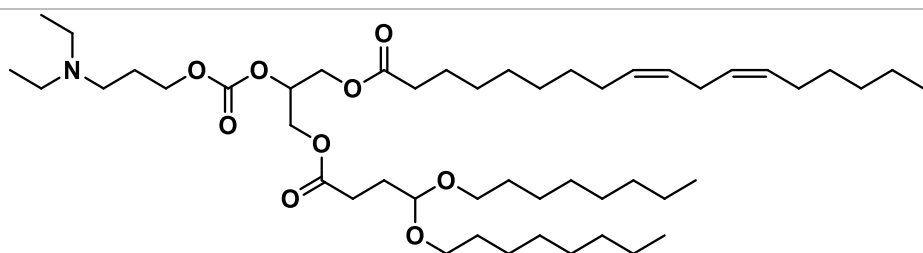
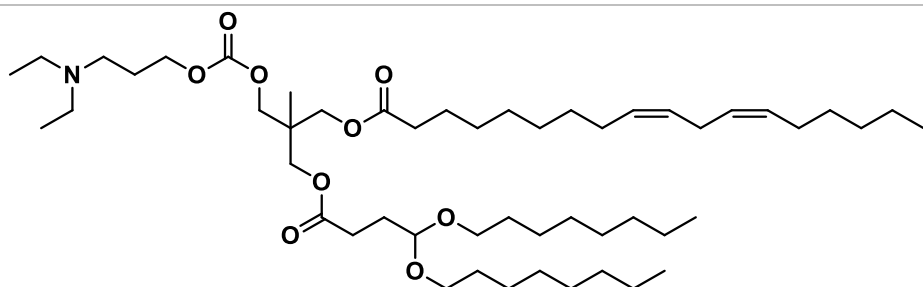
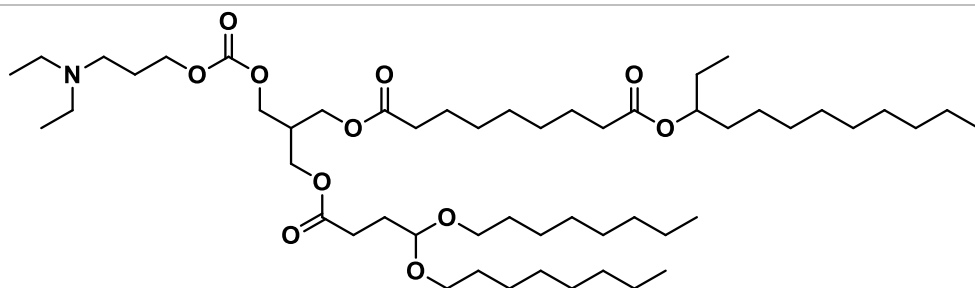


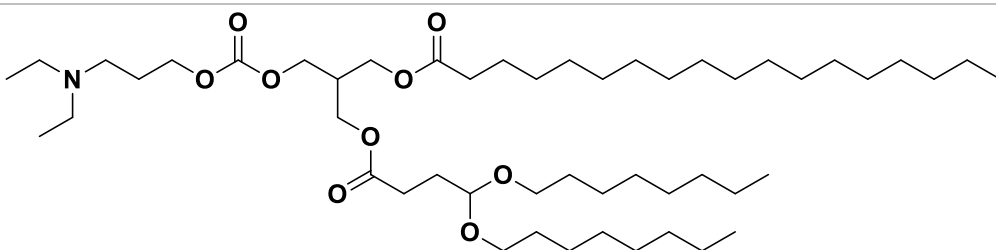
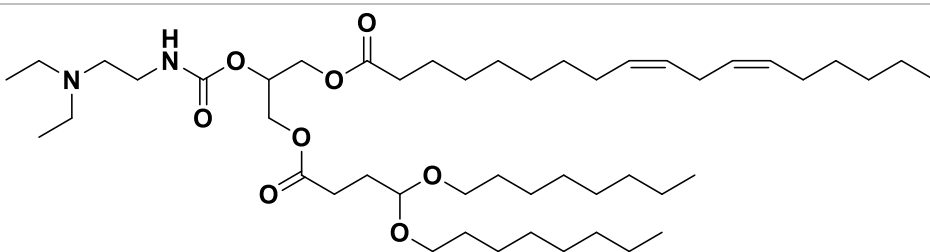
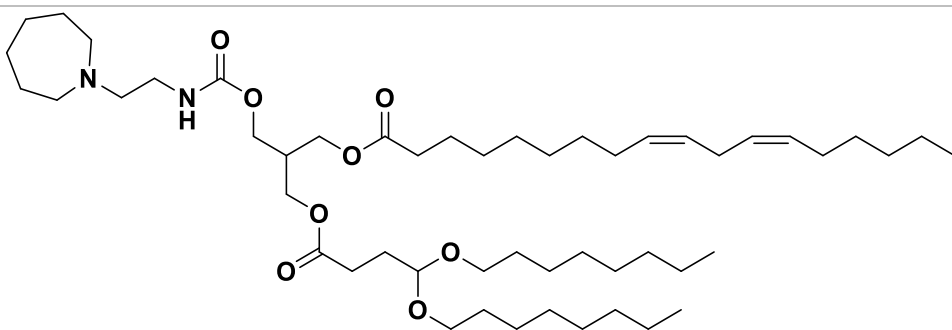
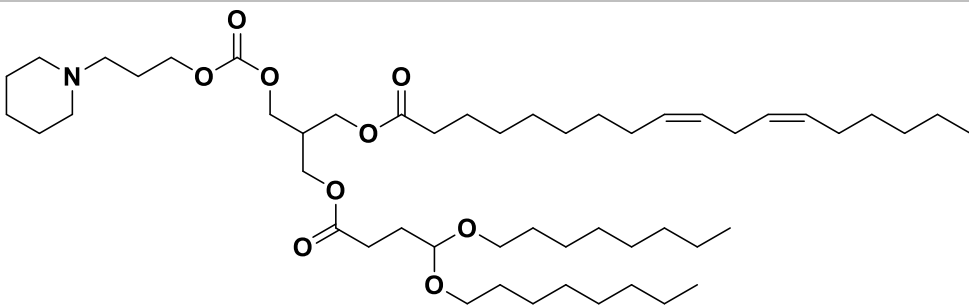
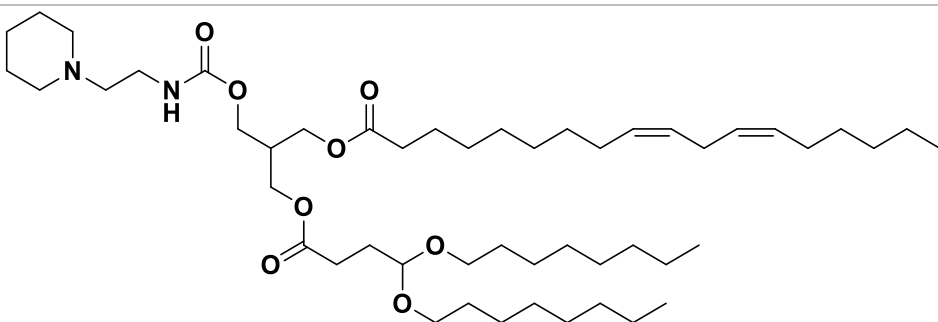


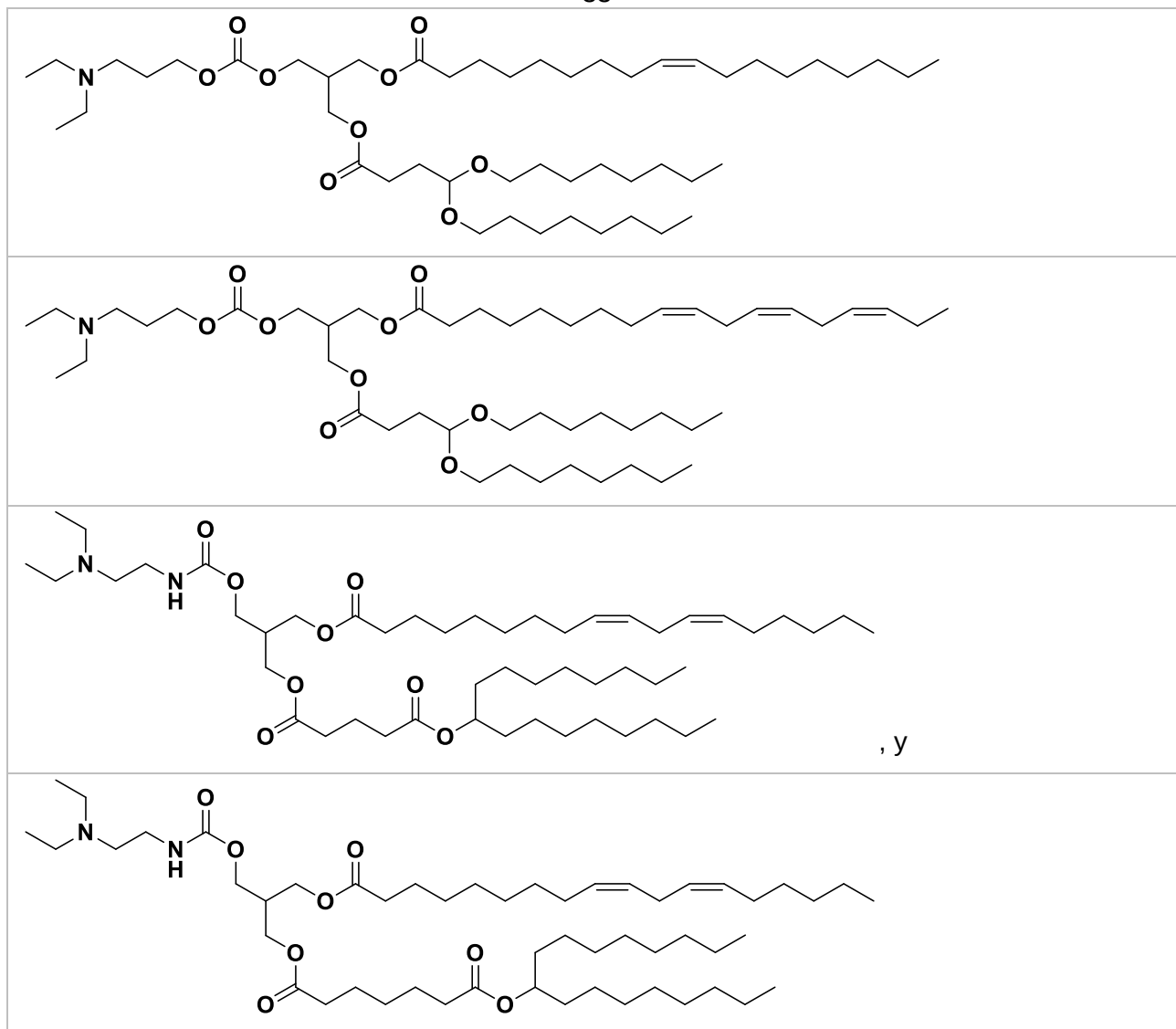












o una sal de estos, tal como una sal farmacéuticamente aceptable de estos. En determinadas modalidades, al menos 75 % del compuesto con la Fórmula (II) o (I) de las composiciones lipídicas formuladas tal como se describe en la presente se elimina del plasma del sujeto dentro de 8, 10, 12, 24, o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7, o 10 días después de la administración. En determinadas modalidades, al menos 50 % de las composiciones lipídicas que comprenden un compuesto de la Fórmula (II) o (I), tal como se describe en la presente, se elimina del plasma del sujeto dentro de 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7 o 10 días después de la administración, lo que puede determinarse, por ejemplo, al medir un lípido (por ejemplo, un compuesto de la Fórmula (II), o (I)), ARN (por ejemplo, ARNm), u otro componente en el plasma. En determinadas modalidades, se mide el lípido libre en oposición al lípido encapsulado del ARN o el componente de ácido nucleico de la composición lipídica.

La eliminación de lípidos puede medirse de la forma descrita en la bibliografía. Véase Maier, M.A., *et al.* Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78 («Maier»). Por ejemplo, en Maier, se administraron sistemas de LNP de ARNip que contenían ARNip dirigido a luciferasa a ratones C57Bl/6 machos de seis a ocho semanas de edad por medio de inyección intravenosa por bolo de 0,3 mg/kg en la vena lateral de la cola. Se recogieron muestras de sangre, hígado y bazo 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 y 168 horas después de la dosis. Se perfundieron los ratones con solución salina antes de recoger el tejido y las muestras de sangre se procesaron para obtener plasma. Todas las muestras se procesaron y analizaron mediante LC-MS. Además, Maier describe un procedimiento para evaluar la toxicidad después de la administración de las composiciones de LNP-ARNip. Por ejemplo, un ARNip dirigido a luciferasa se administró a 0, 1, 3, 5 y 10 mg/kg (5 animales/grupo) por medio de una única inyección intravenosa en bolo con un volumen de dosis de 5 mL/kg a ratas Sprague-Dawley macho. Después de 24 horas, se obtuvo alrededor de 1 mL de sangre de la vena yugular de animales conscientes y se aisló el suero. 72 horas después de la dosis, todos los animales se sacrificaron para realizar la necropsia. Se realizó la evaluación de los signos clínicos, peso corporal, química del suero, pesos de los órganos e histopatología. Aunque Maier describe métodos para evaluar las formulaciones de LNP-ARNip, estos métodos pueden aplicarse para evaluar la eliminación, farmacocinética y toxicidad de las composiciones lipídicas, tal como las composiciones de LNP, de la presente descripción.

En determinadas modalidades, las composiciones lipídicas con los compuestos de la Fórmula (II) o (I) descritos en la presente tienen una mayor velocidad de eliminación con respecto a los lípidos con amina ionizables alternativos. En algunas de dichas modalidades, la velocidad de eliminación es una velocidad de eliminación de lípidos, por ejemplo, la velocidad a la que se elimina un compuesto con la Fórmula (II) o (I) de la sangre, el suero o el plasma. En algunas modalidades, la velocidad de eliminación es una velocidad de eliminación de carga (por ejemplo, un agente biológicamente activo), por ejemplo, la velocidad a la que se elimina un componente de carga de la sangre, el suero o el plasma. En algunas modalidades, la velocidad de eliminación es una velocidad de eliminación de ARN, por ejemplo, la velocidad a la que se elimina un ARNm o un ARNg de la sangre, el suero o el plasma. En algunas modalidades, la velocidad de eliminación es la velocidad a la que se elimina una LNP de la sangre, el suero o el plasma. En algunas modalidades, la velocidad de eliminación es la velocidad a la que se elimina una LNP de un tejido, tal como tejido hepático o tejido del bazo. Resulta deseable que una velocidad de eliminación elevada produzca un perfil de seguridad sin efectos no deseados considerables y/o menor acumulación de LNP en la circulación y/o en los tejidos.

Los compuestos de la Fórmula (II) o (I) de la presente descripción pueden formar sales según el pH del medio en el que se encuentren. Por ejemplo, en un medio apenas ácido, los compuestos de la Fórmula (II) o (I) se pueden protonar y por tanto tienen una carga positiva. En cambio, en un medio ligeramente básico, tal como, por ejemplo, sangre con un pH de aproximadamente 7,35, los compuestos con la Fórmula (II) o (I) no pueden protonarse y, por lo tanto, no presentan carga. En algunas modalidades, los compuestos de la Fórmula (II) o (I) de la presente descripción se pueden protonar predominantemente a un pH de al menos alrededor de 9. En algunas modalidades, los compuestos de la Fórmula (II) o (I) de la presente descripción se pueden protonar predominantemente a un pH de al menos alrededor de 10.

El pH al cual se protona predominantemente un compuesto de la Fórmula (II) o (I) se relaciona con su pKa intrínseco. En modalidades preferidas, una sal de un compuesto de la Fórmula (II) o (I) de la presente descripción tiene un pKa en el intervalo de alrededor de 5,1 a alrededor de 8,0, incluso con mayor preferencia de alrededor de 5,5 a alrededor de 7,6. En otras modalidades, una sal de un compuesto de la Fórmula (II) o (I) de la presente descripción tiene un pKa en el intervalo de alrededor de 5,7 a alrededor de 7,6, por ejemplo, de alrededor de 6 a alrededor de 7,5. De manera alternativa, una sal de un compuesto de la Fórmula (II) o (I) de la presente descripción tiene un pKa en el intervalo de alrededor de 6 a alrededor de 8. El pKa de una sal de un compuesto de la Fórmula (II) o (I) puede ser una consideración importante en la formulación de LNP, ya que se descubrió que las LNP formuladas con determinados lípidos que tienen un pKa en el intervalo de alrededor de 5,5 a alrededor de 7,0 son eficaces para la administración de la carga *in vivo*, por ejemplo, en el hígado. Además, se descubrió que las LNP formuladas con determinados lípidos que tienen un pKa en el intervalo de alrededor de 5,3 a alrededor de 6,4 son eficaces para la administración *in vivo*, por ejemplo, en tumores. Véase, por ejemplo, WO 2014/136086.

Lípidos adicionales

Los “lípidos naturales” adecuados para su uso en una composición lipídica de la descripción incluyen, por ejemplo, una variedad de lípidos neutros, sin carga o zwitteriónicos. Los ejemplos de fosfolípidos neutros adecuados para su uso en la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoil fosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidil colina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE),

dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina y combinaciones de estos. En determinadas modalidades, el fosfolípido neutro puede seleccionarse de distearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), preferentemente, distearoilfosfatidilcolina (DSPC).

Los «lípidos auxiliares» incluyen esteroides, esterol y resorcinol de alquilo. Los lípidos auxiliares adecuados para su uso en la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, colesterol, 5-heptadecilresorcinol y hemisuccinato de colesterol. En determinadas modalidades, el lípido auxiliar puede ser colesterol o un derivado de este, tal como hemisuccinato de colesterol.

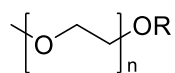
Los lípidos PEG pueden afectar la cantidad de tiempo de existencia de las nanopartículas *in vivo* (por ejemplo, en la sangre). Los lípidos de PEG pueden ayudar en el proceso de formulación, por ejemplo, al reducir la agregación de partículas y controlar el tamaño de las partículas. Los lípidos de PEG utilizados en la presente pueden modular las propiedades farmacocinéticas de las LNP. Típicamente, el lípido de PEG comprende un resto lipídico y un resto polimérico basado en PEG (al que a veces se denomina poli(óxido de etileno)) (un resto de PEG). Los lípidos de PEG adecuados para su uso en una composición lipídica con un compuesto de la Fórmula (II) o (I) de la presente descripción e información sobre la bioquímica de tales lípidos se pueden encontrar en Romberg et al., *Pharmaceutical Research* 25(1), 2008, págs. 55-71 y Hoekstra et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52. Los lípidos de PEG adicionales que son adecuados se describen, por ejemplo, en WO 2015/095340 (pág. 31, línea 14 a pág. 37, línea 6), WO 2006/007712 y WO 2011/076807 («lípidos ocultos»).

En algunas modalidades, el resto lipídico puede derivar de un diacilglicerol o diacilglicamida, inclusive los que comprenden un grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida que tenga una longitud de cadena de alquilo que comprende independientemente de C4 a alrededor de C40 átomos de carbono saturados o no saturados, en donde la cadena puede comprender uno o más grupos funcionales, tal como, por ejemplo, una amida o éster. En algunas modalidades, la longitud de la cadena alquilo comprende alrededor de C10 a C20. El grupo dialquilglicerol o dialquilglicamida puede comprender además uno o más grupos alquilo sustituidos. Las longitudes de cadena pueden ser simétricas o asimétricas.

A menos que se indique algo diferente, el término «PEG» tal como se usa en la presente significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de polialquilenéter, tal como un polímero de etilenglicol u óxido de etileno lineal o ramificado opcionalmente sustituido. En determinadas modalidades, el resto PEG es no sustituido. De manera alternativa, el resto PEG puede ser sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos alquilo, alcoxi, acilo, hidroxilo o arilo. Por ejemplo, el resto PEG puede comprender un copolímero PEG tal como PEG-poliuretano o PEG-polipropileno (véase, por ejemplo, J. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical*

applications (1992)); alternatively, the rest PEG can be a homopolymer PEG. In determined modalities, the rest PEG has a molecular weight of around 130 to around 50 000, such as around 150 to around 30 000, or even around 150 to around 20 000. In a similar manner, the rest PEG can have a molecular weight of around 150 to around 15 000, around 150 to around 10 000, around 150 to around 6000, or even around 150 to around 5000. In determined preferred modalities, the rest PEG has a molecular weight of around 150 to around 4000, around 150 to around 3000, around 300 to around 3000, around 1000 to around 3000, or around 1500 to around 2500.

In determined preferred modalities, the rest PEG is a «PEG-2K», also denominated «PEG 2000», which has an average molecular weight of around 2000 daltons. PEG-2K is represented in the present by the following formula (II), in which n is 45, which signifies that the average degree of polymerization comprises around 45 subunits



(II). However, other modalities of PEG known in the technique, which include, for example, those where the average weighted degree of polymerization comprises around 23 subunits ($n=23$) and/or 68 subunits ($n=68$). In some modalities, n can vary from around 30 to around 60. In some modalities, n can vary from around 35 to around 55. In some modalities, n can vary from around 40 to around 50. In some modalities, n can vary from around 42 to around 48. In some modalities, n can be 45. In some modalities, R can be selected from H , alkyl substituted and alkyl non-substituted. In some modalities, R can be alkyl non-substituted, such as methyl.

In any of the modalities described in the present, the lipid PEG can be selected from PEG-dilauroylglycerol, PEG-dimiristoylglycerol (PEG-DMG) (n.º de catálogo GM-020 de NOF, Tokio, Japón), PEG-dipalmitoylglycerol, PEG-distearoylglycerol (PEG-DSPE) (n.º de catálogo DSPE-020CN, NOF, Tokio, Japón), PEG-dilaurylglycamide, PEG-dimiristylglycamide, PEG-dipalmitoylglycamide, and PEG-distearoylglycamide, PEG-cholesterol (1-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-methyl-poly(ethylene glycol)), PEG-DMB (ether of 3,4-ditetradecoxylbencil-[omega]-methyl-poly(ethylene glycol)), 1,2-dimiristoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(poly(ethylene glycol))-2000] (PEG2k-DMG), 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(poly(ethylene glycol))-2000] (PEG2k-DSPE) (n.º de catálogo 880120C de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 1,2-distearoyl-sn-glycerol, methoxypoly(ethylene glycol) (PEG2k-DSG; GS-020, NOF Tokio, Japón), poly(ethylene glycol)-2000-dimethacrylate (PEG2k-DMA) and 1,2-distearoyloxipropyl-3-amine-N-[methoxy(poly(ethylene glycol))-2000] (PEG2k-DSA). In determined of such modalities, the

lípidos de PEG puede ser PEG2k-DMG. En algunas modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-DSG. En otras modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-DSPE. En algunas modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-DMA. En incluso otras modalidades más, el lípido PEG puede ser PEG2k-C-DMA. En determinadas modalidades, el lípido PEG puede ser el compuesto S027, descrito en WO2016/010840 (párrafos [00240] a [00244]). En algunas modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-DSA. En otras modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-C11. En algunas modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-C14. En algunas modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-C16. En algunas modalidades, el lípido PEG puede ser PEG2k-C18.

Los lípidos catiónicos adecuados para su uso en una composición lipídica de la invención incluyen, de modo no taxativo, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 1,2-Dioleoil-3-Dimetilamonio-propano (DODAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), 1,2-Dioleoilcarbamil-3-Dimetilamonio-propano (DOCDAP), 1,2-Dilinoil-3-Dimetilamonio-propano (DLINDAP), dilauril(C12:0) trimetil amonio propano (DLTAP), Dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), DC-Choi, Dioleiloxi-N-[2-(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), bromuro de 1,2-Dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxiethyl amonio (DMRIE), 3-Dimetilamino-2-(Colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 2-[5'-(colest-5-en-3[beta]-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi) propano (CpLinDMA), N,N-Dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA) y 1,2-N,N'-Dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP). En una modalidad el lípido catiónico es DOTAP o DLTAP.

Los lípidos aniónicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, de modo no taxativo, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoil fosfatidil etanolamina, N-succinil fosfatidiletanolamina, N-glutaril fosfatidiletanolamina, hemisuccinato de colesterol (CHEMS) y lisilfosfatidilglicerol.

Composiciones lipídicas

La presente invención proporciona una composición lipídica que comprende al menos un compuesto de la Fórmula (II) o (I) o una sal de este (por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable de este) y al menos un componente lipídico más. Tales composiciones también contienen un agente biológicamente activo, opcionalmente, combinado con uno o más de otros componentes lipídicos. En algunas modalidades, las composiciones lipídicas comprenden un componente lipídico y un componente acuoso que comprende un agente biológicamente activo.

En una modalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y al menos otro componente lipídico. En otra modalidad, la composición lipídica comprende, además, un agente biológicamente activo,

opcionalmente, combinado con uno o más de otros componentes lipídicos. En otra modalidad, la composición lipídica se encuentra en forma de un liposoma. En otra modalidad, la composición lipídica se encuentra en forma de una nanopartícula lipídica (LNP). En otra modalidad, la composición lipídica es adecuada para su administración en el hígado.

En una modalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y otro componente lipídico. Dichos otros componentes lipídicos incluyen, de modo no taxativo, lípidos neutros, lípidos auxiliares, lípidos de PEG, lípidos catiónicos y lípidos aniónicos. En determinadas modalidades, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un lípido neutro, por ejemplo, DSPC, opcionalmente, con uno o más componentes lipídicos adicionales. En otra modalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un lípido auxiliar, por ejemplo, colesterol, opcionalmente, con uno o más componentes lipídicos adicionales. En otra modalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un lípido de PEG, opcionalmente, con uno o más componentes lipídicos adicionales. En otra modalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un lípido catiónico, opcionalmente, con uno o más componentes lipídicos adicionales. En otra modalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un lípido aniónico, opcionalmente, con uno o más componentes lipídicos adicionales. En una submodalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, un lípido auxiliar y un lípido de PEG, opcionalmente, con un lípido neutro. En otra submodalidad, la composición lipídica comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, un lípido auxiliar, un lípido de PEG y un lípido neutro.

Las composiciones que contienen lípidos de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o composiciones lipídicas de este, pueden encontrarse en diversas formas, que incluyen, de modo no taxativo, agentes para administración que forman partículas que incluyen micropartículas, nanopartículas y agentes de transfección que son útiles para administrar diversas moléculas a las células. Las composiciones específicas son eficaces para la transfección o administración de agentes biológicamente activos. Los agentes biológicamente activos preferidos son ARN y ADN. En otras modalidades, el agente biológicamente activo se selecciona de ARNm, ARNg y ADN. El ARNg puede ser un ARNgd o un ARNGs. En determinadas modalidades, la carga incluye un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN (por ejemplo, una nucleasa

Cas, una nucleasa Cas de clase 2 o Cas9), un ARNg o un ácido nucleico que codifica un ARNg o una combinación de ARNm y ARNg.

En los Ejemplos **2-99, 100-103 y 113-118** se proporcionan ejemplos de compuestos de la Fórmula (I) o (II) para su uso en las composiciones lipídicas anteriores. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 2. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 3. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 4. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 5. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 6. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 7. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 8. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 9. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 10. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 11. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 12. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 13. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 14. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 15. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 16. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 17. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 18. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 19. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 20. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 21. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 22. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 23. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 24. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 25. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 26. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 27. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 28. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 29. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 30. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 31. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 32. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 33. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 34. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 35. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 36. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 37. En determinadas modalidades, el compuesto de

compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 79. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 80. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 81. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 82. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 83. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 84. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 85. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 86. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 87. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 88. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 89. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 90. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 91. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 92. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 93. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 94. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 95. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 96. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 97. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 98. En determinadas modalidades, el compuesto de la Fórmula (I) es el Compuesto 99. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 100. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 101. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 102. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 103. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 113. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 114. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 115. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 116. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 117. En determinadas modalidades, el compuesto es el Compuesto 118.

Composiciones de LNP

Las composiciones lipídicas se pueden proporcionar como composiciones de LNP. Las nanopartículas lipídicas pueden ser, por ejemplo, microesferas (inclusive vesículas unilamelares y multilamelares, por ejemplo, «liposomas» —capas dobles de lípidos en fase lamelar que, en algunas modalidades, son considerablemente esféricas— y, en modalidades más particulares, pueden comprender un núcleo acuoso, por ejemplo, comprender una parte considerable de moléculas de ARN), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión.

Las LNP tienen un tamaño de alrededor de 1 a alrededor de 1000 nm, de alrededor de 10 a alrededor de 500 nm, de alrededor de 20 a alrededor de 500 nm, en una submodalidad de alrededor de 50 a alrededor de 400 nm, en una submodalidad de alrededor de 50 a alrededor de 300 nm, en

una submodalidad de alrededor de 50 a alrededor de 200 nm, y en una submodalidad de alrededor de 50 a alrededor de 150 nm, y en otra submodalidad de alrededor de 60 a alrededor de 120 nm. Preferentemente, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 60 nm a alrededor de 100 nm. Los tamaños promedio (diámetros) de la LNP totalmente formada pueden medirse con dispersión dinámica de la luz en un instrumento Malvern Zetasizer o Wyatt NanoStar. La muestra de LNP se diluye en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), de modo que la velocidad de recuento sea de aproximadamente 200 – 400 kcps. Los datos se presentan como promedio ponderado de la medición de intensidad.

Las modalidades de la presente descripción proporcionan composiciones lipídicas descritas de acuerdo con los cocientes molares respectivos de los componentes lipídicos en la composición. Todos los números de % molar se proporcionan como una fracción del componente lipídico de la composición lipídica o, más específicamente, las composiciones de LNP. En determinadas modalidades, el % molar del compuesto con la Fórmula (II) o (I) puede ser de alrededor de 30 % molar a alrededor de 70 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del compuesto de la Fórmula (II) o (I) puede ser al menos 30 % molar, al menos 40 % molar, al menos 50 % molar o al menos 60 % molar.

En determinadas modalidades, el % molar del lípido neutro puede ser de alrededor de 0 % molar a alrededor de 30 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido neutro puede ser de alrededor de 0 % molar a alrededor de 20 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido neutro puede ser de alrededor de 10 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido neutro puede ser de alrededor de 9 % molar.

En determinadas modalidades, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 0 % molar a alrededor de 80 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 20 % molar a alrededor de 60 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 30 % molar a alrededor de 50 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido auxiliar puede ser de alrededor de 30 % molar a alrededor de 40 % molar o de alrededor de 35 % molar a alrededor de 45 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido auxiliar se ajusta en función de la concentración del compuesto de la Fórmula (II) o (I) del lípido neutro y/o del lípido de PEG para llevar el componente lipídico al 100 % molar.

En determinadas modalidades, el % molar del lípido de PEG puede ser de alrededor de 1 % molar a alrededor de 10 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido de PEG puede ser de alrededor de 1 % molar a alrededor de 4 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido de PEG puede ser de alrededor de 1 % molar a alrededor de 2 % molar. En determinadas modalidades, el % molar del lípido de PEG puede ser de alrededor de 1,5 % molar.

En diversas modalidades, una composición de LNP comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I) o una sal de este (tal como una sal farmacéuticamente aceptable de este (por ejemplo, tal como se describe en la presente)), un lípido neutro (por ejemplo, DSPC), un lípido auxiliar (por ejemplo, colesterol) y un lípido PEG (por ejemplo, PEG2k-DMG). En algunas modalidades, una composición de LNP comprende un compuesto con la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este (por ejemplo, tal como se describe en la presente), DSPC, colesterol y un lípido de PEG. En algunas de dichas modalidades, la composición de LNP comprende un lípido de PEG que comprende DMG, tal como PEG2k-DMG. En determinadas modalidades preferidas, una composición de LNP comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, colesterol, DSPC y PEG2k-DMG.

En determinadas modalidades, las composiciones lipídicas, tal como composiciones de LNP, comprenden un componente lipídico y un componente de ácido nucleico, por ejemplo un componente de ARN y se puede medir el cociente molar del compuesto de la Fórmula (II) o (I) respecto al ácido nucleico. En las modalidades de la presente descripción también se proporcionan composiciones lipídicas que tienen un cociente molar definido entre los grupos amina con carga positiva de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la Fórmula (II) o (I) (N) y los grupos fosfato con carga negativa (P) del ácido nucleico que se va a encapsular. Esto se representa matemáticamente mediante la ecuación N/P. En algunas modalidades, una composición lipídica, tal como una composición de LNP, puede comprender un componente lipídico que comprende un compuesto de la Fórmula (II) o (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este; y un componente de ácido nucleico, en donde el cociente de N/P es de alrededor de 3 a 10. En algunas modalidades, una composición de LNP puede comprender un componente lipídico que comprende un compuesto con la Fórmula (II) o (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este; y un componente ARN, en donde la relación de N/P es de alrededor de 3 a 10. Por ejemplo, la relación de N/P puede ser de alrededor de 4-7. De manera alternativa, la relación de N/P puede ser de alrededor de 6, por ejemplo, 6 ± 1 o $6 \pm 0,5$.

En algunas modalidades, el componente acuoso comprende una sustancia biológicamente activa. En algunas modalidades, el componente acuoso comprende un polipéptido, opcionalmente combinado con un ácido nucleico. En algunas modalidades, el componente acuoso comprende un ácido nucleico, tal como un ARN. En algunas modalidades, el componente acuoso es un componente de ácido nucleico. En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico comprende ADN y se puede denominar componente de ADN. En algunas modalidades, el componente de ácido nucleico comprende ARN. En algunas modalidades, el componente acuoso, tal como un componente de ARN, puede comprender un ARNm, tal como un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN. En algunas modalidades, el agente de unión a ADN guiado

por ARN es una nucleasa Cas. En determinadas modalidades, el componente acuoso puede comprender un ARNm que codifica Cas9. En determinadas modalidades, el componente acuoso puede comprender un ARNg. En algunas composiciones que comprenden un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN, la composición comprende, además, un ácido nucleico de ARNg, tal como un ARNg. En algunas modalidades, el componente acuoso comprende un agente de unión a ADN guiado por ARN y un ARNg. En algunas modalidades, el componente acuoso comprende un ARNm de nucleasa Cas y un ARNg. En algunas modalidades, el componente acuoso comprende un ARNm de nucleasa Cas de clase 2 y un ARNg.

En determinadas modalidades, una composición lipídica, tal como una composición de LNP, puede comprender un ARNm que codifica una nucleasa Cas tal como una nucleasa Cas de clase 2, un compuesto de la Fórmula (II) o (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, un lípido auxiliar, opcionalmente un lípido neutro y un lípido PEG. En determinadas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas de clase 2, el lípido auxiliar es colesterol. En otras composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas tal como una nucleasa Cas de clase 2, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas tal como una nucleasa Cas de clase 2, por ejemplo Cas9, el lípido PEG es PEG2k-DMG. En composiciones específicas que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas tal, como una nucleasa Cas de clase 2, y un compuesto con la Fórmula (II) o (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En determinadas composiciones, la composición comprende, además, un ARNg, tal como un ARNgd o un ARNGs.

En algunas modalidades, una composición lipídica, tal como una composición de LNP, puede comprender un ARNg. En determinadas modalidades, una composición puede comprender un compuesto con la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, un ARNg, un lípido auxiliar, opcionalmente, un lípido neutro y un lípido de PEG. En determinadas composiciones de LNP que comprenden un ARNg, el lípido auxiliar es colesterol. En algunas composiciones que comprenden un ARNg, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNg, el lípido de PEG es PEG2k-DMG. En determinadas composiciones, el ARNg se selecciona de ARNgd y ARNGs.

En determinadas modalidades, una composición lipídica, tal como una composición de LNP, comprende un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN y un ARNg, que puede ser un ARNGs, en un componente acuoso y un compuesto de la Fórmula (II) o (I) en un componente lipídico. Por ejemplo, una composición de LNP puede comprender un compuesto de la Fórmula (II) o (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, un ARNm que codifica una nucleasa Cas, un ARNg, un lípido auxiliar, un lípido neutro y un lípido de PEG. En determinadas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido auxiliar es colesterol. En

algunas composiciones que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido neutro es DSPC. En modalidades adicionales que comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas y un ARNg, el lípido de PEG es PEG2k-DMG.

En determinadas modalidades, las composiciones lipídicas, tal como las composiciones de LNP incluyen un agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como un ARNm de Cas de clase 2 y al menos un ARNg. En determinadas modalidades, la composición de LNP incluye un cociente de ARNg respecto al ARNm agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como ARNm de nucleasa Cas de clase 2, de alrededor de 1:1 o alrededor de 1:2. En algunas modalidades, el cociente es de alrededor de 25:1 a alrededor de 1:25, de alrededor de 10:1 a alrededor de 1:10, de alrededor de 8:1 a alrededor de 1:8, de alrededor de 4:1 a alrededor de 1:4, o de alrededor de 2:1 a alrededor de 1:2.

Las composiciones lipídicas descritas en la presente, tales como las composiciones de LNP, pueden incluir una plantilla de ácido nucleico, por ejemplo, una plantilla de ADN. La plantilla de ácido nucleico puede administrarse junto con las composiciones lipídicas o separada de estas, que comprenden un compuesto de la Fórmula (II) o (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que incluye composiciones de LNP. En algunas modalidades, la plantilla de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, dependiendo del mecanismo de reparación deseado. La plantilla puede tener regiones de homología respecto al ADN diana, por ejemplo, dentro de la secuencia de ADN diana y/o respecto a secuencias adyacentes al ADN diana.

En algunas modalidades, las LNP se forman mediante la mezcla de una solución acuosa de ARN con una solución lipídica a base de solvente orgánico. Las soluciones o solventes adecuados incluyen o pueden contener: agua, PBS, amortiguador Tris, NaCl, amortiguador de citrato, amortiguador de acetato, etanol, cloroformo, dietiléter, ciclohexano, tetrahidrofurano, metanol, isopropanol. Por ejemplo, el solvente orgánico puede ser etanol al 100 %. Se puede usar un amortiguador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, para la administración *in vivo* de LNP. En determinadas modalidades, se usa un amortiguador para mantener el pH de la composición que comprende LNP a pH 6,5 o por encima de este. En determinadas modalidades, se usa un amortiguador para mantener el pH de la composición que comprende LNP a pH 7,0 o por encima de este. En determinadas modalidades, la composición tiene un pH que varía de alrededor de 7,2 a alrededor de 7,7. En modalidades adicionales, la composición tiene un pH que varía de alrededor de 7,3 a alrededor de 7,7, o que varía de alrededor de 7,4 a alrededor de 7,6. En modalidades adicionales, la composición tiene un pH de alrededor de 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 o 7,7. El pH de una composición puede medirse con una microsonda de pH. En determinadas modalidades, se incluye un crioprotector en la composición. Los ejemplos no taxativos de crioprotectores incluyen sacarosa, trehalosa, glicerol, DMSO y etilenglicol. Las composiciones ilustrativas pueden incluir hasta 10 % de

crioprotector, tal como, por ejemplo, sacarosa. En determinadas modalidades, la composición puede comprender sacarosa salina tris (TSS, por su sigla en inglés). En determinadas modalidades, la composición de LNP puede incluir alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de crioprotector. En determinadas modalidades, la composición de LNP puede incluir alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de sacarosa. En algunas modalidades, la composición de LNP puede incluir un amortiguador. En algunas modalidades, el amortiguador puede comprender un amortiguador de fosfato (PBS), un amortiguador Tris, un amortiguador de citrato y mezclas de estos. En determinadas modalidades de ejemplo, el amortiguador comprende NaCl. En determinadas modalidades, el amortiguador carece de NaCl. Las cantidades de ejemplo de NaCl puede variar de alrededor de 20 mM a alrededor de 45 mM. Las cantidades de ejemplo de NaCl puede variar de alrededor de 40 mM a alrededor de 50 mM. En algunas modalidades, la cantidad de NaCl es de alrededor de 45 mM. En algunas modalidades, el amortiguador es un amortiguador Tris. Las cantidades de ejemplo de Tris pueden variar de alrededor de 20 mM a alrededor de 60 mM. Las cantidades de ejemplo de Tris pueden variar de alrededor de 40 mM a alrededor de 60 mM. En algunas modalidades, la cantidad de Tris es de alrededor de 50 mM. En algunas modalidades, el amortiguador comprende NaCl y Tris. Determinadas modalidades ilustrativas de las composiciones de LNP contienen sacarosa al 5 % y NaCl 45 mM en amortiguador Tris. En otras modalidades ilustrativas, las composiciones contienen sacarosa en una cantidad de alrededor de 5 % p/v, NaCl alrededor de 45 mM y Tris alrededor de 50 mM a pH 7,5. Las cantidades de sal, amortiguador y crioprotector pueden variar de modo que se mantenga la osmolalidad de la composición total. Por ejemplo, la osmolalidad final se puede mantener a menos de 450 mOsm/L. En modalidades adicionales, la osmolalidad es entre 350 y 250 mOsm/L. Determinadas modalidades tienen una osmolalidad final de 300 +/- 20 mOsm/L o 310 +/- 40 mOsm/L.

En algunas modalidades, se usa la mezcla microfluida, mezcla en T o mezcla cruzada de la solución acuosa de ARN y la solución lipídica en un disolvente orgánico. En determinados aspectos, pueden variar las velocidades de flujo, tamaño de las uniones, geometría de las uniones, forma de las uniones, diámetro del tubo, soluciones y/o concentraciones de ARN y lípidos. Las LNP o las composiciones de LNP se pueden concentrar o purificar, por ejemplo, mediante diálisis, filtro centrífugo, filtración de flujo tangencial o cromatografía. Las LNP pueden almacenarse como una suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado, por ejemplo. En algunas modalidades, una composición de LNP se almacena a 2-8 °C, en determinados aspectos, las composiciones de LNP se almacenan a temperatura ambiente. En modalidades adicionales, una composición de LNP se almacena congelada, por ejemplo, a -20 °C o -80 °C. En otras modalidades, una composición de LNP se almacena a una temperatura en el intervalo de alrededor de 0 °C a alrededor de -80 °C. Las

composiciones de LNP congeladas pueden descongelarse antes de su uso, por ejemplo, en hielo, a temperatura ambiente, o a 25 °C.

Las LNP pueden ser, por ejemplo, microesferas (inclusive vesículas unilamelares y multilamelares, por ejemplo, «liposomas» —capas dobles de lípidos en fase lamelar que, en algunas modalidades, son considerablemente esféricas— y, en modalidades más particulares, pueden comprender un núcleo acuoso, por ejemplo, comprender una parte considerable de moléculas de ARN), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión.

Las composiciones lipídicas preferidas, tales como las composiciones de LNP, son biodegradables, dado que no acumulan niveles citotóxicos *in vivo* con una dosis terapéuticamente eficaz. En algunas modalidades, las composiciones no provocan una respuesta inmunitaria innata que produzca efectos sustancialmente adversos en un nivel de dosis terapéutico. En algunas modalidades, las composiciones proporcionadas en la presente no provocan toxicidad en un nivel de dosis terapéutico.

En algunas modalidades, las LNP descritas en la presente tienen un índice de polidispersión (PDI, por su sigla en inglés) que puede variar de alrededor de 0,005 a alrededor de 0,75. En algunas modalidades, la LNP tiene un PDI que puede variar de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,5. En algunas modalidades, la LNP tiene un PDI que puede variar de alrededor de cero a alrededor de 0,4. En algunas modalidades, la LNP tiene un PDI que puede variar de alrededor de cero a alrededor de 0,35. En algunas modalidades, la LNP tiene un PDI que puede variar de alrededor de cero a alrededor de 0,35. En algunas modalidades, el PDI de LNP puede variar de alrededor de cero a alrededor de 0,3. En algunas modalidades, la LNP tiene un PDI que puede variar de alrededor de cero a alrededor de 0,25. En algunas modalidades, el PDI de LNP puede variar de alrededor de cero a alrededor de 0,2. En algunas modalidades, la LNP tiene un PDI que puede ser menor que alrededor de 0,08, 0,1, 0,15, 0,2, o 0,4.

Las LNP descritas en la presente tienen un tamaño (por ejemplo, un diámetro de promedio Z) de alrededor de 1 a alrededor de 250 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 10 a alrededor de 200 nm. En modalidades adicionales, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 20 a alrededor de 150 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 50 a alrededor de 150 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 50 a alrededor de 100 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 50 a alrededor de 120 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 60 a alrededor de 100 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 75 a alrededor de 150 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 75 a alrededor de 120 nm. En algunas modalidades, las LNP tienen un tamaño de alrededor de 75 a alrededor de 100 nm. A menos que se indique lo contrario, todos los tamaños

mencionados en la presente son tamaños (diámetros) promedio de nanopartículas totalmente formadas, tal como se miden mediante dispersión dinámica de la luz en un Malvern Zetasizer o Wyatt NanoStar. La muestra de nanopartículas se diluye en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), de manera que la velocidad de recuento sea de aproximadamente 200-400 kcps. Los datos se presentan como promedio ponderado de la medición de intensidad (diámetro promedio Z).

En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía de alrededor de 50 % a alrededor de 100 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía de alrededor de 50 % a alrededor de 95 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía de alrededor de 70 % a alrededor de 90 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía de alrededor de 90 % a alrededor de 100 %. En algunas modalidades, las LNP se forman con una eficiencia de encapsulación promedio que varía de alrededor de 75 % a alrededor de 95 %.

Carga

La carga administrada mediante la composición de LNP puede ser un agente biológicamente activo. En determinadas modalidades, la carga es o comprende uno o más agentes biológicamente activos, tales como ARNm, ARNg, vector de expresión, plantilla de ácido nucleico, agente de unión a ADN guiado por ARN, anticuerpo (por ejemplo, monoclonal, quimérico, humanizado, nanocuerpo y fragmentos de estos, etc.), colesterol, hormona, péptido, proteína, agentes quimioterapéuticos y otros tipos de antineoplásicos, fármaco de bajo peso molecular, vitamina, cofactor, nucleósido, nucleótido, oligonucleótido, ácido nucleico enzimático, ácido nucleico antisentido, oligonucleótido formador de triples, composición de ADN o ARN antisentido, composición quimérica de ADN:ARN, alozima, aptámero, ribozima, señuelos y análogos de estos, plásmido y otros tipos de vectores, y molécula pequeña de ácido nucleico, agente de ARNi, ácido nucleico interferente corto (ANip), ARN interferente corto (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro ARN (miARN), ARN horquillado corto (ARNhc) y moléculas de «ARN autorreplicante» (que codifica una actividad de la enzima replicasa y puede dirigir su propia replicación o amplificación in vivo), ácido nucleico peptídico (ANP), un ribonucleótido de ácido nucleico bloqueado (ANB), nucleótido de morfolino, ácido nucleico de treosa (ANT), ácido nucleico de glicol (ANG), ARNipsi (ARN interferente pequeño segmentado internamente) y ARNia (ARN interferente asimétrico). La lista que antecede de agentes biológicamente activos es solamente ilustrativa y no se pretende que sea taxativa. Dichos compuestos pueden purificarse o purificarse parcialmente, y pueden ser de origen natural o sintéticos, y pueden modificarse químicamente.

La carga administrada mediante la composición de LNP puede ser un ARN, tal como una molécula de ARNm que codifica una proteína de interés. Por ejemplo, se incluye un ARNm para

expresar una proteína tal como proteína fluorescente verde (GFP, por su sigla en inglés), un agente de unión a ADN guiado por ARN o una nucleasa Cas. Se proporcionan las composiciones de LNP que incluyen un ARNm de nucleasa Cas, por ejemplo un ARNm de nucleasa Cas de clase 2 que permite la expresión en una célula de una nucleasa Cas de clase 2 tal como una proteína Cas9 o Cpf1. Además, la carga puede contener uno o más ARNg o ácidos nucleicos que codifican ARNg. También se puede incluir una plantilla de ácido nucleico, por ejemplo, para reparación o recombinación, en la composición, o se puede usar una plantilla de ácido nucleico en los métodos descritos en la presente. En una submodalidad, la carga comprende un ARNm que codifica una Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y, opcionalmente, un ARNg de *S. pyogenes*. En una submodalidad adicional, la carga comprende un ARNm que codifica una Cas9 de *Neisseria meningitidis* y, opcionalmente, un ARNg de *Nme* (*Neisseria meningitidis*).

«ARNm» hace referencia a un polinucleótido y comprende un marco abierto de lectura que se puede traducir en un polipéptido (es decir, puede servir como sustrato para la traducción con un ribosoma y ARNt amino-acilado). El ARNm puede comprender una estructura principal de fosfato-azúcar que incluya residuos de ribosa o análogos de estos, por ejemplo, residuos de 2'-metoxi ribosa. En algunas modalidades, los azúcares de una estructura principal de fosfato-azúcar de ARNm consisten básicamente en residuos de ribosa, residuos 2'-metoxi ribosa, o una combinación de estos. En general, los ARNm no contienen una cantidad considerable de residuos de timidina (por ejemplo, 0 residuos o menos de 30, 20, 10, 5, 4, 3 o 2 residuos de timidina; o menos de 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 % o 0,1 % de contenido de timidina). Un ARNm puede contener uridinas modificadas en algunas o en todas las posiciones de uridina.

Carga de CRISPR/Cas

En determinadas modalidades, las composiciones descritas comprenden un ARNm que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas. En modalidades particulares, las composiciones descritas comprenden un ARNm que codifica una nucleasa Cas de clase 2, tal como Cas9 de *S. pyogenes*.

Tal como se usa en la presente, un «agente de unión a ADN guiado por ARN» significa un polipéptido o complejo de polipéptidos que tiene actividad de unión a ARN o ADN, o una subunidad de unión a ADN de tal complejo, en donde la actividad de unión a ADN es específica para la secuencia y depende de la secuencia del ARN. Los agentes de unión a ADN guiados por ARN ilustrativos incluyen cleavasas/nickasas Cas y formas inactivadas de estas («agentes de unión a ADN dCas»). «Nucleasa Cas», tal como se usa en la presente, abarca cleavasas Cas, nickasas Cas y agentes de unión a ADN dCas. Los agentes de unión de cleavasas/nickasas Cas y ADN dCas incluyen un complejo de Csm o Cmr de un sistema CRISPR tipo III, la subunidad Cas10, Csm1 o Cmr2 de este, un complejo de cascada de un sistema CRISPR tipo I, la subunidad Cas3 de este y

nucleasas Cas de clase 2. Tal como se usa en la presente, una «nucleasa Cas de clase 2» es un polipéptido monocatenario con actividad de unión a ADN guiada por ARN. Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen cleavasas/nickasas Cas de clase 2 (por ejemplo, las variantes H840A, D10A o N863A), que tienen además actividad de cleavasas o nickasa de ADN guiada por ARN y agentes de unión a ADN dCas de clase 2, en las que se inactiva la actividad de cleavasa/nickasa. Las nucleasas Cas clase 2 incluyen, por ejemplo, proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (por ejemplo, las variantes N497A, R661A, Q695A, Q926A), HypaCas9 (por ejemplo, las variantes N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (por ejemplo, las variantes K810A, K1003A, R1060A) y eSPCas9(1.1) (por ejemplo, las variantes K848A, K1003A, R1060A) y modificaciones de estas. La proteína Cpf1, Zetsche et al., *Cell*, 163: 1-13 (2015), es homóloga a Cas9, y contiene un dominio de nucleasa tipo RuvC. Las secuencias de Cpf1 de Zetsche se incorporan mediante esta referencia en su totalidad. Véase, por ejemplo, Zetsche, Tablas 2 y 4. Véase, por ejemplo, Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

Tal como se usa en la presente, «ribonucleoproteína» (RNP) o «complejo de RNP» hace referencia a un ARNg junto con un agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas, por ejemplo, una cleavasa Cas, nickasa Cas o un agente de unión a ADN dCas (por ejemplo, Cas9). En algunas modalidades, el ARNg sirve para guiar el agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como Cas9, hacia una secuencia diana, y el ARNg se hibrida y el agente se une a la secuencia diana; en los casos donde el agente es una cleavasa o una nickasa, la unión puede estar seguida de escisión o corte.

En algunas modalidades de la presente descripción, la carga para la composición de LNP incluye al menos un ARNg que comprende secuencias guía que dirige un agente de unión a ADN guiado por ARN, que puede ser una nucleasa (por ejemplo, una nucleasa Cas tal como Cas9), a un ADN seleccionado como diana. El ARNg puede guiar la nucleasa Cas o nucleasa Cas de clase 2 a una secuencia diana en una molécula de ácido nucleico diana. En algunas modalidades, un ARNg se une a una nucleasa Cas de clase 2 y proporciona especificidad de escisión mediante esta. En algunas modalidades, el ARNg y la nucleasa Cas pueden formar una ribonucleoproteína (RNP), por ejemplo, un complejo de CRISPR/Cas, tal como un complejo de CRISPR/Cas9. En algunas modalidades, el complejo de CRISPR/Cas puede ser un complejo de CRISPR/Cas9 Tipo II. En algunas modalidades, el complejo de CRISPR/Cas puede ser un complejo de CRISPR/Cas de Tipo V, tal como un complejo de Cpf1/ARNg. Las nucleasas Cas y ARNg análogos pueden emparejarse. Las estructuras de andamiaje de ARNg que se emparejan con cada nucleasa Cas de clase 2 varían con el sistema CRISPR/Cas específico.

«ARN guía», «ARNg» y simplemente «guía» se usan en la presente de forma indistinta para hacer referencia a un ácido nucleico análogo para un agente de unión a ADN guiado por ARN. Los

ARN guía pueden incluir ARN modificados tal como se describen en la presente. Un ARNg puede ser un ARNcr (también conocido como ARN CRISPR) o a la combinación de un ARNcr y un ARNtr (también conocido como ARNtracr). El ARNcr y ARNtr se pueden asociar como una única molécula de ARN (ARN guía simple, ARNg_s) o en dos moléculas de ARN separadas (ARN guía doble, ARNg_d). «ARN guía» o «ARNg» hace referencia a cada tipo. El ARNtr puede ser una secuencia de origen natural, o una secuencia de ARNtr con modificaciones o variaciones en comparación con secuencias de origen natural.

Tal como se usa en la presente, una «secuencia guía» hace referencia a una secuencia dentro de un ARNg que es complementaria a una secuencia diana y funciona para dirigir un ARNg a una secuencia diana para la unión o modificación (por ejemplo, escisión) mediante un agente de unión a ADN guiado por ARN. Una «secuencia guía» también puede mencionarse como una «secuencia de direccionamiento» o una «secuencia espaciadora». Una secuencia guía puede tener una longitud de 20 pares de bases, por ejemplo, en el caso de *Streptococcus pyogenes* (es decir, Spy Cas9) y los homólogos/ortólogos de Cas9 relacionados. También se pueden usar secuencias más cortas o más largas como guías, por ejemplo, una longitud de 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia diana es un gen o un cromosoma, por ejemplo, y es complementaria respecto a la secuencia guía. En algunas modalidades, el grado de complementariedad o de identidad entre una secuencia guía y su secuencia diana correspondiente puede ser al menos o de alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas modalidades, la secuencia guía y la región diana puede ser 100 % complementaria o idéntica respecto a una región de al menos 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos contiguos. En otras modalidades, la secuencia guía y la región diana pueden contener al menos un emparejamiento incorrecto. Por ejemplo, la secuencia guía y la secuencia diana pueden contener 1, 2, 3 o 4 emparejamientos incorrectos, donde la longitud total de la secuencia diana es al menos 17, 18, 19, 20 o más pares de bases. En algunas modalidades, la secuencia guía y la región diana pueden contener 1-4 emparejamientos incorrectos donde la secuencia guía comprende al menos 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia guía y la región diana puede contener 1, 2, 3 o 4 emparejamientos incorrectos donde la secuencia guía comprende 20 nucleótidos.

Las secuencias diana para las proteínas de unión a ADN guiadas por ARN tales como las proteínas Cas incluyen tanto la cadena positiva como la negativa del ADN genómico (es decir, la secuencia proporcionada y el complemento inverso de la secuencia), ya que el sustrato de ácido nucleico para una proteína Cas es un ácido nucleico bicatenario. Por consiguiente, cuando se dice que una secuencia guía es «complementaria a una secuencia diana», se entiende que la secuencia guía puede dirigir un ARNg para unirse al complemento inverso de la secuencia diana. Por lo tanto,

en algunas modalidades, cuando la secuencia guía se une al complemento inverso de una secuencia diana, la secuencia guía es idéntica a determinados nucleótidos de la secuencia diana (por ejemplo, la secuencia diana que no incluye el PAM) excepto por la sustitución de U por T en la secuencia guía.

La longitud de la secuencia de direccionamiento puede depender del sistema de CRISPR/Cas y los componentes utilizados. Por ejemplo, diferentes nucleasas Cas de clase 2 de diferentes especies de bacterias tienen diversas longitudes de secuencia de direccionamiento óptimas. Por consiguiente, la secuencia de direccionamiento puede comprender una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de 50 nucleótidos. En algunas modalidades, la longitud de la secuencia de direccionamiento es 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos más larga o más corta que la secuencia guía de un sistema de CRISPR/Cas de origen natural. En determinadas modalidades, el andamiaje de ARNg y nucleasa Cas se derivará del mismo sistema CRISPR/Cas. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en 18-24 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en 19-21 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en 20 nucleótidos.

En algunas modalidades, el ARNg es un «ARNg de Cas9» capaz de mediar la escisión de ADN guiada por ARN mediante una proteína Cas9. En algunas modalidades, el ARNg es un «ARNg de Cpf1» capaz de mediar la escisión de ADN guiada por ARN mediante una proteína Cpf1. En determinadas modalidades, el ARNg comprende un ARNcr y ARN tracr suficiente para formar un complejo activo con una proteína Cas9 y mediar la escisión de ADN guiada por ARN. En determinadas modalidades, el ARNg comprende un ARNcr suficiente para formar un complejo activo con una proteína Cpf1 y mediar la escisión de ADN guiada por ARN. Véase Zetsche 2015.

Determinadas modalidades de la invención también proporcionan ácidos nucleicos, por ejemplo, cassettes de expresión, que codifican el ARNg descrito en la presente. Un «ácido nucleico de ARN guía» se utiliza en la presente para hacer referencia a un ARNg (por ejemplo, un ARNg o un ARNgd) y un casete de expresión de ARNg, que es un ácido nucleico que codifica uno o más ARNg.

ARN modificados

En determinadas modalidades, las composiciones lipídicas, tal como las composiciones de LNP, comprenden ácidos nucleicos modificados, que incluyen ARN modificados.

Puede haber nucleósidos o nucleótidos modificados presentes en un ARN, por ejemplo, un ARNg o ARNm. Un ARNg o ARNm que comprende uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados, por ejemplo, se denomina un ARN «modificado» para describir la presencia de una o más configuraciones o componentes de origen natural y/o no natural que se utilizan en lugar, o

además, de los residuos A, G, C y U canónicos. En algunas modalidades, un ARN modificado se sintetiza sin un nucleósido o nucleótido no canónico, llamado aquí «modificado».

Los nucleósidos o nucleótidos modificados pueden incluir: (i) alteración, por ejemplo, reemplazo, de uno o ambos oxígenos que no son de unión a fosfato y/o uno o más de los oxígenos de unión a fosfato en la unión de estructura principal de fosfodiéster (un ejemplo de modificación a la estructura principal); (ii) alteración, por ejemplo, reemplazo, de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del 2' hidroxilo en el azúcar ribosa (un ejemplo de modificación de azúcar); (iii) reemplazo en conjunto del resto de fosfato con enlazadores «defosfo» (un ejemplo de modificación de la estructura principal); (iv) modificación o reemplazo de una nucleobase de origen natural, inclusive una nucleobase no canónica (un ejemplo de modificación de base); (v) reemplazo o modificación de la estructura principal de ribosa-fosfato (un ejemplo de modificación de estructura principal); (vi) modificación del extremo 3' o el extremo 5' del polinucleótido, por ejemplo, eliminación, modificación o reemplazo de un grupo fosfato terminal o conjugación de un resto, casquete o enlazador (dichas modificaciones al casquete 3' o 5' pueden comprender una modificación de azúcar y/o estructura principal); y/o (vii) modificación o reemplazo del azúcar (un ejemplo de modificación de azúcar). Determinadas modalidades comprenden una modificación del extremo 5' a un ARNm, ARNg o ácido nucleico. Determinadas modalidades comprenden una modificación a un ARNm, ARNg o ácido nucleico. Determinadas modalidades comprenden una modificación en el extremo 3' a un ARNm, ARNg o ácido nucleico. Un ARN modificado puede contener modificaciones en el extremo 5' y el extremo 3'. Un ARN modificado puede contener uno o más residuos modificados en ubicaciones que no sean los extremos. En determinadas modalidades, un ARNg incluye al menos un residuo modificado. En determinadas modalidades, un ARNm incluye al menos un residuo modificado.

Los ácidos nucleicos no modificados pueden tender a degradarse, por ejemplo, mediante nucleasas intracelulares o las que se encuentran en suero. Por ejemplo, las nucleasas pueden hidrolizar enlaces fosfodiéster de ácido nucleico. Por consiguiente, en un aspecto, los ARN (por ejemplo, ARNm, ARNg) que se describen en la presente pueden contener uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados, por ejemplo, para introducir estabilidad hacia las nucleasas intracelulares o basadas en suero. En algunas modalidades, las moléculas de ARN modificado descritas en la presente pueden presentar una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introducen en una población de células, tanto *in vivo* como *ex vivo*. El término «respuesta inmunitaria innata» incluye una respuesta celular a ácidos nucleicos exógenos, que incluyen ácidos nucleicos monocatenarios, que implica la inducción de liberación y expresión de citocinas, particularmente, los interferones, y muerte celular.

Por consiguiente, en algunas modalidades, un ARN o ácido nucleico comprende al menos una modificación que confiere una estabilidad mayor o potenciada al ácido nucleico, inclusive, por ejemplo, resistencia mejorada a la digestión de nucleasa in vivo. Tal como se usan en la presente, los términos «modificación» y «modificado», en cuanto tales términos se relacionan con los ácidos nucleicos que se proporcionan en la presente, incluyen al menos una alteración que preferentemente potencia la estabilidad y hace que el ARN o el ácido nucleico sea más estable (por ejemplo, resistente a la digestión de nucleasa) que la versión de tipo salvaje o de origen natural del ARN o el ácido nucleico. Tal como se usan en la presente, los términos «estable» y «estabilidad» en cuanto tales términos se relacionan con los ácidos nucleicos de la presente invención, y particularmente con respecto al ARN, hacen referencia a una resistencia mayor o potenciada a la degradación, por ejemplo, mediante nucleasa (es decir, endonucleasas o exonucleasas) que normalmente son capaces de degradar tal ARN. La mayor estabilidad puede incluir, por ejemplo, menor sensibilidad a la hidrólisis u otra destrucción con enzimas endógenas (por ejemplo, endonucleasas o exonucleasas) o condiciones dentro del tejido o la célula diana, lo que aumenta o potencia de este modo la permanencia de tal ARN o ácido nucleico en la célula, el tejido, el sujeto y/o el citoplasma seleccionado. Las moléculas de ARN o ácido nucleico estabilizadas que se proporcionan en la presente tienen semividas más prolongadas con respecto a sus homólogos no modificados de origen natural (por ejemplo, la versión de tipo salvaje de la molécula). También se contemplan los términos «modificación» y «modificado», en cuanto tales términos se relacionan con el ARNm de las composiciones de LNP que se describen en la presente, son alteraciones que mejoran o potencian la traducción de los ácidos nucleicos de ARNm, inclusive, por ejemplo, la inclusión de secuencias que funcionan al inicio de la traducción de proteínas (por ejemplo, la secuencia de consenso de Kozak). (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20): 8125-48 (1987)).

En algunas modalidades, el ARN o ácido nucleico se sometió a una modificación química o biológica para hacerlo más estable. Las modificaciones de ejemplo a un ARN o ácido nucleico incluyen la reducción de una base (por ejemplo, mediante la deleción o la sustitución de un nucleótido con otro) o la modificación de una base, por ejemplo, la modificación química de una base. La expresión «modificaciones químicas», tal como se usa en la presente, incluye modificaciones que introducen químicas diferentes a las observadas en ácidos nucleicos o ARN de origen natural, por ejemplo, modificaciones covalentes tales como la introducción de nucleótidos modificados, (por ejemplo, análogos de nucleótidos o la inclusión de grupos colgantes que no se encuentran de forma natural en tales moléculas de ácido nucleico o ARN).

En algunas modalidades de una modificación de estructura principal, el grupo fosfato de un residuo modificado puede modificarse mediante el reemplazo de uno o más de los oxígenos con un sustituyente diferente. Además, el residuo modificado, por ejemplo, residuo modificado presente en

un ácido nucleico modificado, puede incluir el reemplazo en conjunto de un resto de fosfato no modificado con un grupo fosfato modificado, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, la modificación de la estructura principal de fosfato puede incluir alteraciones que den como resultado ya sea un enlazador sin carga o un enlazador con carga con una distribución de carga asimétrica.

Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de arilo o alquilo y fosfodiésteres. El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es aquiral. Sin embargo, el reemplazo de uno de los oxígenos que no forman puentes con uno de los átomos anteriores o grupos de átomos vuelven quiral el átomo de fósforo. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer ya sea la configuración “R” (Rp en la presente) o la configuración “S” (Sp en la presente). La estructura principal también puede modificarse mediante el reemplazo de un oxígeno que forma puentes (es decir, el oxígeno que une el fosfato con el nucleósido) con nitrógeno (fosforamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (metilfosfonatos puenteados). El reemplazo se puede producir en cualquiera de los oxígenos de unión o en ambos oxígenos de unión. El grupo fosfato puede reemplazarse mediante conectores que no contienen fósforo, en determinadas modificaciones de la cadena principal. En algunas modalidades, el grupo fosfato con carga puede reemplazarse con un resto neutro. Los ejemplos de restos que pueden reemplazar el grupo fosfato pueden incluir, de modo no taxativo, por ejemplo, fosfonato de metilo, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo y metilenoximetilimino.

ARNm

En algunas modalidades, una composición o formulación descrita en la presente comprende un ARNm que comprende un marco abierto de lectura (ORF, por su sigla en inglés) que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas o nucleasa Cas de clase 2 tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, se proporciona, usa o administra un ARNm que comprende un ORF que codifica un agente de unión a ADN guiado por ARN, tal como una nucleasa Cas o una nucleasa Cas de clase 2. Un ARNm puede comprender uno o más de un casquete en 5', una región no traducida en 5' (UTR), una UTR en 3' y una cola de poliadenina. El ARNm puede comprender un marco de lectura abierto modificado, por ejemplo, para codificar una secuencia de localización nuclear o para usar codones alternados para codificar la proteína.

El ARNm en las composiciones de LNP descritas puede codificar, por ejemplo, una hormona, una enzima, un receptor, un polipéptido, un péptido, que se secretan, u otra proteína de interés que se secreta normalmente. En una modalidad de la invención, el ARNm puede tener opcionalmente

modificaciones químicas o biológicas que, por ejemplo, mejoran la estabilidad y/o la semivida de tal ARNm o que mejoran o facilitan de otro modo la producción de proteínas.

Además, las modificaciones adecuadas incluyen alteraciones en uno o más nucleótidos de un codón tal como el codón que codifica el mismo aminoácido pero es más estable que el codón que se encuentra en la versión de tipo salvaje del ARNm. Por ejemplo, se ha demostrado una relación inversa entre la estabilidad del ARN y una mayor cantidad de residuos citidinas (C) y/o residuos de uridinas (U), y se descubrió que el ARN que carece de residuos de C y U es estable para la mayoría de las ARNasas (Heidenreich, et al. *J Biol Chem* 269, 2131-8 (1994)). En algunas modalidades, se reduce la cantidad de residuos de C y/o U en una secuencia de ARNm. En otra modalidad, se reduce la cantidad de residuos de C y/o U mediante la sustitución de un codón que codifica un aminoácido particular por otro codón que codifica el mismo aminoácido o uno relacionado. Las modificaciones contempladas a los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención incluyen también la incorporación de pseudouridinas. La incorporación de pseudouridinas en los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención puede potenciar la estabilidad y la capacidad traduccional, así como disminuir la inmunogenicidad in vivo. Véase, por ejemplo, Karikó, K., et al., *Molecular Therapy* 16 (11): 1833-1840 (2008). Las sustituciones y modificaciones al ARNm de la presente invención se pueden llevar a cabo con métodos ya conocidos para el experto en la técnica.

Las limitaciones para la reducción de la cantidad de residuos de C y U en una secuencia probablemente será mayor en la región de codificación de un ARNm, en comparación con una región no traducida, (es decir, probablemente no será posible eliminar todos los residuos de C y U presentes en el mensaje mientras que se conserva la capacidad del mensaje de codificar la secuencia de aminoácidos deseada). La redundancia del código genético, sin embargo, presenta una oportunidad para permitir que se reduzca la cantidad de residuos de C y/o U que se encuentran presentes en la secuencia, mientras que se mantiene la misma capacidad de codificación (es decir, dependiendo de qué aminoácido se codifique con un codón, diversas posibilidades diferentes son posibles para la modificación de las secuencias de ARN).

El término modificación también incluye, por ejemplo, la incorporación de enlaces que no sean de nucleótidos o nucleótidos modificados en las secuencias de ARNm de la presente invención (por ejemplo, modificaciones a uno o ambos de los extremos 3' y 5' de una molécula de ARNm que codifica una proteína o enzima funcional secretada). Tales modificaciones incluyen la adición de bases a una secuencia de ARNm (por ejemplo, la inclusión de una cola de poli A o una cola de poli A más larga), la alteración de la UTR en 3' o la UTR en 5', la formación de complejos del ARNm con un agente (por ejemplo, una proteína o una molécula de ácido nucleico complementaria) y la

inclusión de elementos que cambian la estructura de una molécula de ARNm (por ejemplo, que forman estructuras secundarias).

Se cree que la cola de poli A estabiliza los mensajeros naturales. Por lo tanto, en una modalidad, se puede agregar una cola larga de poli A a una molécula de ARNm que, por lo tanto, hace que el ARNm sea más estable. Las colas de poli A pueden agregarse mediante el uso de una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden agregar colas de poli A largas al ARNm sintético o transcrito in vitro usando la poli A polimerasa (Yokoe, et al. *Nature Biotechnology*. 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas de poli A largas. Además, pueden agregarse colas de poli A mediante transcripción directamente de los productos de PCR. En una modalidad, la longitud de la cola de poli A es de al menos alrededor de 90, 200, 300, 400, al menos 500 nucleótidos. En una modalidad, la longitud de la cola poli A se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm modificada de la invención y por tanto la transcripción de la proteína. Por ejemplo, dado que la longitud de la cola de poli A puede influir en la semivida de una molécula de ARNm, la longitud de la cola de poli A se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm respecto a las nucleasas y controlar por tanto el transcurso del tiempo de la expresión de proteínas en una célula. En una modalidad, las moléculas de ARNm estabilizado son suficientemente resistentes para la degradación in vivo (por ejemplo, con nucleasas), de modo que se puedan administrar a la célula diana sin un vehículo de transferencia.

En una modalidad, un ARNm puede modificarse mediante la incorporación de secuencias no traducidas (UTR) en 3' y/o 5' que no se encuentran en forma natural en el ARNm de tipo salvaje. En una modalidad, la secuencia flanqueante en 3' y/o 5' que flanquea naturalmente un ARNm y codifica una segunda proteína no relacionada se puede incorporar en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm que codifica una proteína funcional o terapéutica para modificarla. Por ejemplo, las secuencias en 3' o 5' de moléculas de ARNm que son estables (por ejemplo, globina, actina, GAPDH, tubulina, histona o enzimas cíclicas de ácido cítrico) se pueden incorporar en la región 3' y/o 5' de una molécula de ácido nucleico de ARNm sentido para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido. Véase, por ejemplo, US2003/0083272.

Se pueden encontrar descripciones más detalladas de las modificaciones de ARNm en US2017/0210698A1, en las páginas 57-68, cuyo contenido se incorpora a la presente.

Plantilla de ácido nucleico

Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden incluir una plantilla de ácido nucleico. La plantilla puede usarse para alterar o insertar una secuencia de ácido nucleico en el sitio diana o cerca de este para una proteína de unión a ADN guiada por ARN tal como una nucleasa Cas, por ejemplo, una nucleasa Cas de clase 2. En algunas modalidades, los métodos comprenden la introducción de una plantilla a la célula. En algunas modalidades, puede proporcionarse una única

plantilla. En otras modalidades, pueden proporcionarse dos o más plantillas, de manera que pueda producirse la edición en dos o más sitios diana. Por ejemplo, pueden proporcionarse diferentes plantillas para editar un único gen en una célula, o dos genes diferentes en una célula.

En algunas modalidades, la plantilla puede utilizarse en recombinación homóloga. En algunas modalidades, la recombinación homóloga puede dar como resultado la integración de la secuencia de plantilla o una parte de la secuencia de plantilla en la molécula de ácido nucleico diana. En otras modalidades, la plantilla puede utilizarse en reparación dirigida por homología, que implica la invasión de la cadena de ADN en el sitio de escisión en el ácido nucleico. En algunas modalidades, la reparación dirigida por homología puede dar como resultado la inclusión de la secuencia de plantilla en la molécula de ácido nucleico diana editada. En incluso otras modalidades adicionales, la plantilla puede utilizarse en la edición génica mediada por unión de extremos no homólogos. En algunas modalidades, la secuencia de plantilla no tiene similitud con la secuencia de ácido nucleico cerca del sitio de escisión. En algunas modalidades, se incorpora la plantilla o una parte de la secuencia de plantilla. En algunas modalidades, la plantilla incluye secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) flanqueantes.

En algunas modalidades, la secuencia de plantilla puede corresponder a, comprender o consistir en una secuencia endógena de una célula diana. De manera adicional o alternativa, también puede corresponder a, comprender o consistir en una secuencia exógena de una célula diana. Tal como se usa en la presente, el término “secuencia endógena” se refiere a una secuencia que es natural de la célula. La expresión “secuencia exógena” se refiere a una secuencia que no es natural de una célula, o una secuencia cuya ubicación natural en el genoma de la célula es en una ubicación diferente. En algunas modalidades, la secuencia endógena puede ser una secuencia genómica de la célula. En algunas modalidades, la secuencia endógena puede ser una secuencia cromosómica o extracromosómica. En algunas modalidades, la secuencia endógena puede ser una secuencia de plásmidos de la célula.

En algunas modalidades, la plantilla contiene ADNmc o ADNbc que contiene secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) flanqueantes. En algunas modalidades, la plantilla se proporciona como un vector, plásmido, minicírculo o nanocírculo o producto de PCR.

En algunas modalidades, el ácido nucleico está purificado. En algunas modalidades, el ácido nucleico se purifica mediante el uso de un método de precipitación (por ejemplo, precipitación de LiCl, precipitación de alcohol o un método equivalente, por ejemplo, tal como se describe en la presente). En algunas modalidades, el ácido nucleico se purifica mediante el uso de un método basado en cromatografía, tal como método basado en HPLC o un método equivalente (por ejemplo, tal como se describe en la presente). En algunas modalidades, el ácido nucleico se purifica mediante el uso de un método de precipitación (por ejemplo, precipitación de LiCl) y un método de precipitación

basado en HPLC. En algunas modalidades, el ácido nucleico se purifica mediante filtración de flujo tangencial (TFF).

Los compuestos o composiciones generalmente, pero no necesariamente, incluirán uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término «excipiente» incluye cualquier ingrediente que no sea el compuesto de la descripción, los demás componentes lipídicos ni el agente biológicamente activo. Un excipiente puede proporcionar una característica funcional (por ejemplo, controlar la velocidad de liberación del fármaco) y/o no funcional (por ejemplo, procesar un auxiliar o diluyente) a las composiciones. La selección del excipiente dependerá en gran medida de factores tales como el modo de administración particular, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación.

Las formulaciones parenterales son típicamente suspensiones o soluciones acuosas u oleosas. Cuando la formulación es acuosa, los excipientes, tales como azúcares (inclusive, de modo no taxativo, glucosa, manitol, etc.), sales, carbohidratos y agentes amortiguadores (preferentemente a un pH entre 3 y 9), pero, para algunas aplicaciones, se puede formular de forma más adecuada con una solución no acuosa estéril o en forma seca para ser utilizada junto con un vehículo adecuado, tal como agua estéril y libre de pirógenos (WFI).

Si bien la invención se describe junto con las modalidades ilustradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a tales modalidades. Por el contrario, se pretende que la invención abarque todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, incluso equivalentes de características específicas, que puedan incluirse dentro de la invención como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Tanto la descripción general como la descripción detallada que anteceden, así como los ejemplos que siguen a continuación, son ilustrativos y explicativos solamente y no restringen la descripción. Los títulos de las secciones usados en la presente tienen únicamente fines de organización y no debe interpretarse que limiten la materia deseada de ningún modo. En caso de que cualquier documento bibliográfico incorporado mediante referencia contradiga cualquier término definido en la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva será la que rija. Todos los intervalos proporcionados en la solicitud abarcan los extremos, a menos que se establezca lo contrario.

Definiciones

Cabe destacar que, tal como se usan en la presente solicitud, las formas en singular «un», «una» y «el/la», incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a «una composición» incluye múltiples composiciones y

la referencia a «una célula» incluye múltiples células, y similares. El uso de «o» es inclusivo y significa «y/o» a menos que se indique algo diferente.

A menos que se observe específicamente en la memoria descriptiva que antecede, las modalidades en la memoria descriptiva que contengan «que comprende» diversos componentes también se contemplan como «que consiste en» o «que consiste básicamente en» los componentes enumerados; las modalidades en la memoria descriptiva que contengan «que consiste en» diversos componentes también se contemplan como «que comprende» o «que consiste básicamente en» los componentes enumerados; las modalidades en la memoria descriptiva que contengan «alrededor de» diversos componentes también se contemplan como «en» los componentes enumerados; y las modalidades en la memoria descriptiva que enumeran «que consiste básicamente en» diversos componentes también se contemplan como «que consiste en» o «que comprende» los componentes enumerados (esta capacidad de intercambiarse no aplica al uso de estas expresiones en las reivindicaciones).

Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Se entiende que los valores medidos y medibles son aproximados, tomando en cuenta las cifras significativas y el error asociado con la medición. Tal como se usan en la presente solicitud, los términos «alrededor de» y «aproximadamente» tienen su significado conocido en la técnica; el uso de uno en oposición al otro no necesariamente implica que haya un alcance diferente. A menos que se indique algo diferente, los números en la presente solicitud, con o sin un término que lo modifique tal como «alrededor de» o «aproximadamente», debe entenderse que abarca la divergencia y/o fluctuaciones normales que comprenderá el experto en la técnica pertinente. En determinadas modalidades, el término «aproximadamente» o «alrededor de» se refiere a un intervalo de valores que se encuentra dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor o menor) de un valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100 % de un valor posible).

Como se usa en la presente, la expresión «poner en contacto» significa establecer una conexión física entre dos o más entidades. Por ejemplo, poner en contacto una célula de mamífero con una composición de nanopartículas significa que la célula de mamífero y una nanopartícula comparten una conexión física. Los métodos para poner en contacto células con entidades externas in vivo y ex vivo se conocen en las técnicas biológicas. Por ejemplo, el contacto de una composición de nanopartículas y una célula de mamífero dispuesta dentro de un mamífero puede realizarse mediante diversas vías de administración (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica, y subcutánea) y puede implicar diversas cantidades de composiciones de nanopartículas. Además, una composición de nanopartículas puede entrar en contacto con más de una célula de mamífero.

Tal como se usa en la presente, el término “administrar” significa proporcionar una entidad a un destino. Por ejemplo, administrar un agente terapéutico y/o profiláctico a un sujeto puede implicar administrar una composición de nanopartículas que incluye el producto terapéutico y/o profiláctico al sujeto (por ejemplo, mediante una vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, o subcutánea). La administración de una composición de nanopartículas a un mamífero o célula de mamífero puede implicar poner en contacto uno o más células con la composición de nanopartículas.

Tal como se usa en la presente, «eficiencia de encapsulación» hace referencia a la cantidad de un producto terapéutico y/o profiláctico que se vuelve parte de una composición de nanopartículas, con respecto a la cantidad total inicial del producto terapéutico y/o profiláctico usado en la preparación de una composición de nanopartículas. Por ejemplo, si se encapsulan 97 mg de producto terapéutico y/o profiláctico en una composición de nanopartículas de un total de 100 mg de producto terapéutico y/o profiláctico proporcionado inicialmente a la composición, la eficiencia de encapsulación puede determinarse en 97 %. Tal como se usa en la presente, «encapsulación» puede hacer referencia a un cerramiento, confinamiento, entorno o envoltura completo, considerable o parcial.

Tal como se usa en la presente, el término «biodegradable» se usa para hacer referencia a materiales que, cuando se introducen en las células, se descomponen por el mecanismo celular (por ejemplo, degradación enzimática) o mediante hidrólisis en componentes que las células pueden reutilizar o descartar sin efectos tóxicos significativos en las células. En determinadas modalidades, los componentes generados por la descomposición de un material biodegradable no inducen la inflamación y/u otros efectos indeseables *in vivo*. En algunas modalidades, los materiales biodegradables se descomponen en forma enzimática. De manera alternativa o adicional, en algunas modalidades, los materiales biodegradables se descomponen mediante hidrólisis.

Tal como se usa en la presente, el «cociente de N/P» es la relación molar de átomos de nitrógeno ionizables que contienen un lípido (por ejemplo, compuesto con la Fórmula I) con respecto a los grupos fosfato en ARN, por ejemplo, en una composición de nanopartículas que incluye un componente lipídico y un ARN.

Las composiciones también pueden incluir sales de uno o más compuestos. Las sales pueden ser sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en la presente, «sales farmacéuticamente aceptables» hace referencia a derivados de los compuestos descritos, en donde el compuesto original se altera al convertir un resto de ácido o base existente en su forma salina (por ejemplo, al hacer reaccionar un grupo de base libre con un ácido orgánico adecuado). Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas, sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos, y similares. Las sales de adición de ácido representativas incluyen

sales de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, sulfato de laurilo, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, que incluyen, a modo no taxativo, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene un resto ácido o básico mediante métodos químicos convencionales. En general, dichas sales pueden prepararse al hacer reaccionar las formas básicas o ácidos libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido o la base adecuados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos; en general, se prefieren los medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17° ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pág. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, y Use, P. H. Stahl y C. G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, y Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977), cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

Tal como se usa en la presente, «índice de polidispersión» es un cociente que describe la homogeneidad de la distribución del tamaño de partícula de un sistema. Un valor pequeño, por ejemplo, menor que 0,3 indica una distribución estrecha del tamaño de partícula. En algunas modalidades, el índice de polidispersión puede ser menor que 0,1.

Tal como se usa en la presente, «transfección» hace referencia a la introducción de una especie (por ejemplo, un ARN) en una célula. La transfección puede producirse, por ejemplo, in vitro, ex vivo o in vivo.

El término «alquilo» como se usa en la presente es un grupo de hidrocarburo saturado, ramificado o no ramificado de 1 a 24 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *s*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, *s*-pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo, y similares. El grupo alquilo

puede ser cíclico o acíclico. El grupo alquilo puede ser ramificado o no ramificado (es decir, lineal). El grupo alquilo también puede estar sustituido o no sustituido. Por ejemplo, el grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más grupos que incluyen, de modo no taxativo, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxilo, nitro, sililo, sulfoxo, sulfonato, carboxilato o tiol, tal como se describe en la presente. Un grupo «alquilo inferior» es un grupo alquilo que contiene de uno a seis (por ejemplo, de uno a cuatro) átomos de carbono.

El término «alqueno», tal como se usa en la presente, hace referencia a un grupo alifático que contiene al menos un enlace doble carbono-carbono y se pretende que incluya tanto «alquenos no sustituidos» como «alquenos sustituidos», donde estos últimos hacen referencia a restos alqueno con sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos del grupo alqueno. Dichos sustituyentes pueden presentarse en uno o más carbonos incluidos o no en uno o más de los enlaces dobles. Asimismo, dichos sustituyentes incluyen todos aquellos contemplados para los grupos alquilo, tal como se menciona más adelante, excepto en los casos en los que lo impide la estabilidad. Por ejemplo, se contempla que un grupo alqueno puede sustituirse con uno o más grupos alquilo, carbocíclico, arilo, heterocíclico o heteroarilo. Los grupos alqueno ilustrativos incluyen, de modo no taxativo, vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), alilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), ciclopentenilo ($-\text{C}_5\text{H}_7$) y 5-hexenilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

Un grupo «alqueno» hace referencia a un radical alquilo divalente que puede ser ramificado o no ramificado (es decir, lineal). Cualquiera de los grupos alquilo monovalentes antemencionados puede convertirse en un alqueno por abstracción de un segundo átomo de hidrógeno del alquilo. Los alquenos representativos incluyen alqueno C_{2-4} y alqueno C_{2-3} . Los grupos alqueno típicos incluyen, de modo no taxativo $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, y similares. El grupo alqueno también puede estar sustituido o no sustituido. Por ejemplo, el grupo alqueno puede estar sustituido con uno o más grupos que incluyen, de modo no taxativo, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, alcoxi, amino, éter, haluro, hidroxilo, nitro, sililo, sulfoxo, sulfonato, carboxilato o tiol, tal como se describe en la presente.

El término «alqueno» incluye grupos hidrocarbilo acíclico no saturados, lineales o ramificados, divalentes que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono y, en una modalidad, no tienen enlaces triples carbono-carbono. Cualquiera de los grupos alquilo monovalentes antemencionados puede convertirse en un alqueno por abstracción de un segundo átomo de hidrógeno del alquilo. Los alquenos representativos incluyen alquenos C_{2-6} .

El término « C_{x-y} », cuando se utiliza junto con un resto químico, tal como alquilo o alqueno significa que incluye grupos que contienen de x a y carbonos en la cadena. Por ejemplo, el término «alquilo C_{x-y} » hace referencia a grupos hidrocarburo saturados sustituidos o no sustituidos, inclusive

grupos alquilo y alquileo de cadena lineal y de cadena ramificada que contienen de x a y carbonos en la cadena.

Incorporación por referencia

El contenido de los artículos, las patentes y las solicitudes de patente, y todos los otros documentos e información disponibles en formato electrónico que se mencionan o citan en la presente, se incorporan a esta en su totalidad mediante referencia en la misma medida que si se incorporara mediante referencia cada publicación individual en forma específica e individual. El solicitante se reserva el derecho de incorporar en forma física a la presente solicitud todo material e información de cualquiera de tales artículos, patentes, solicitudes de patente y otros documentos físicos o electrónicos.

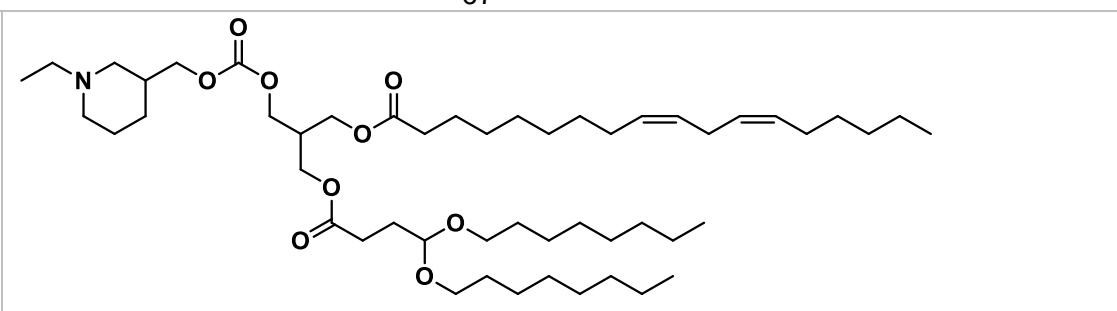
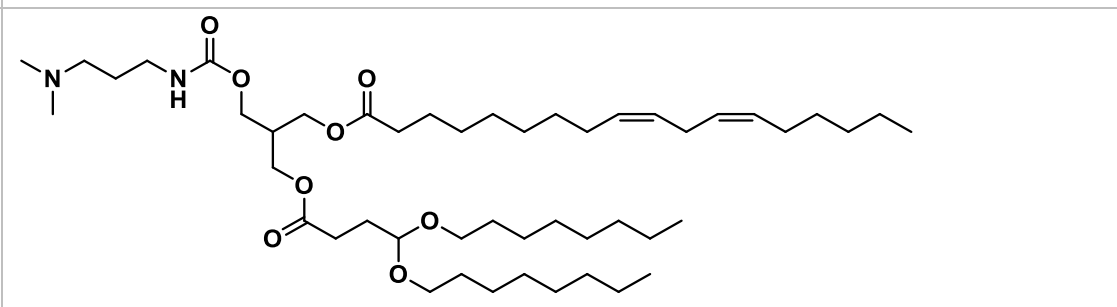
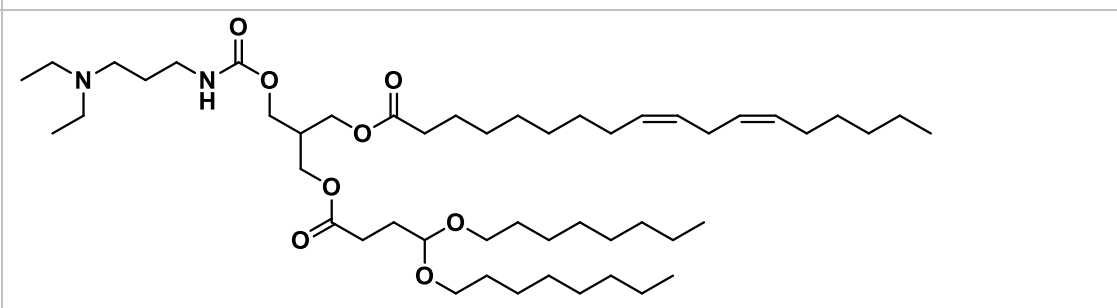
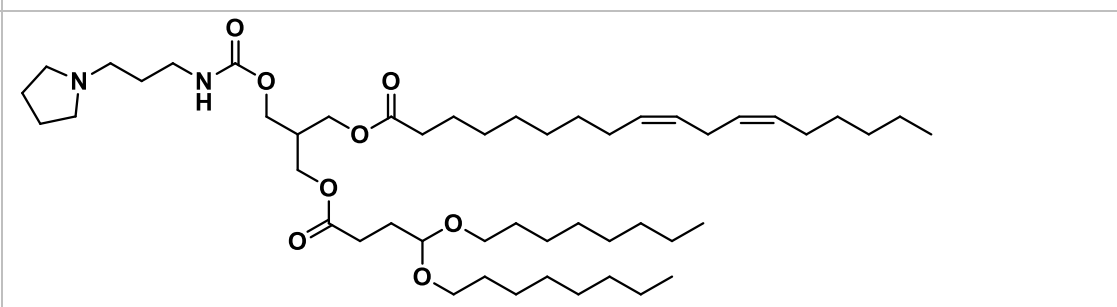
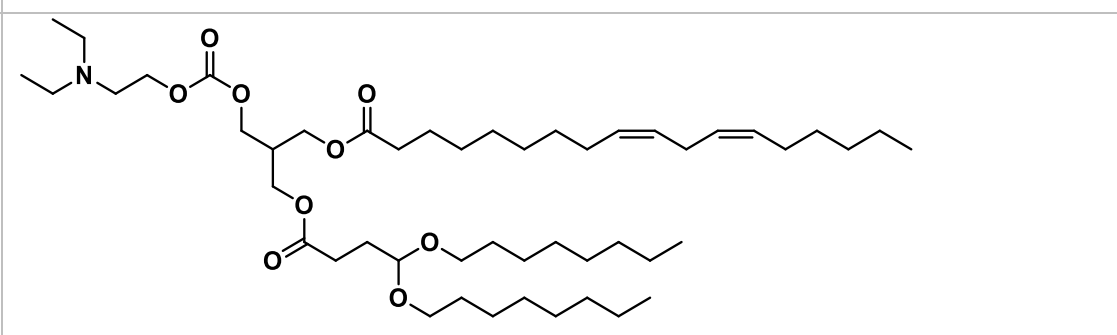
Ejemplos

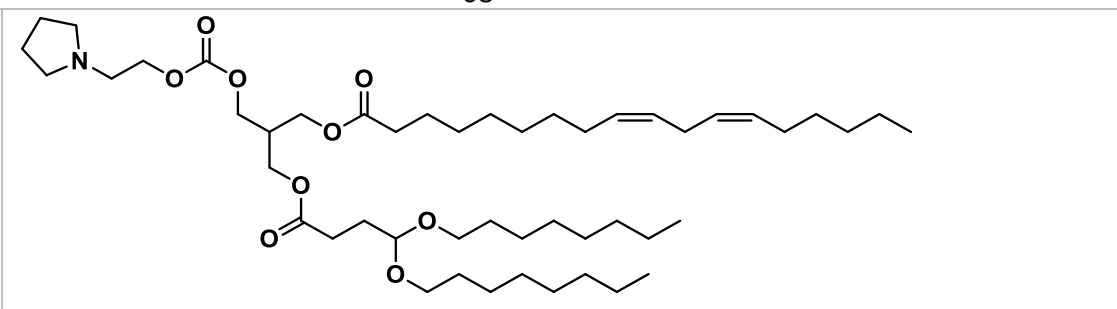
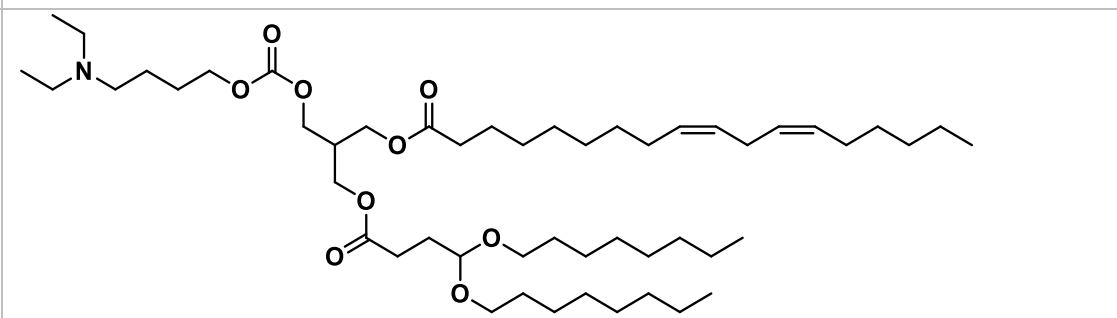
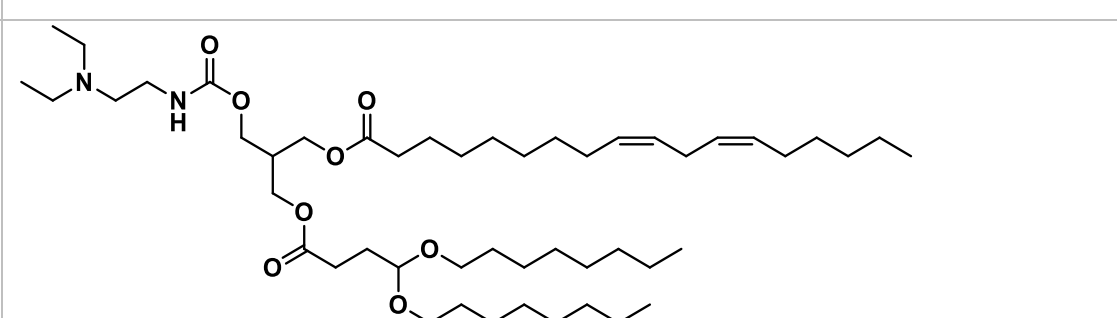
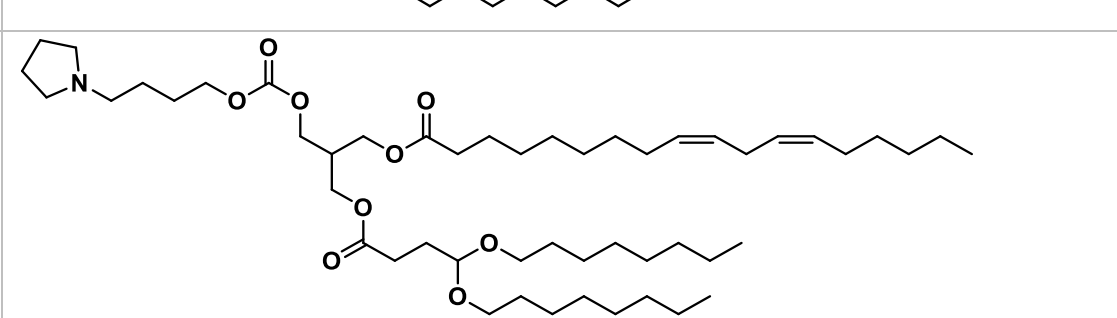
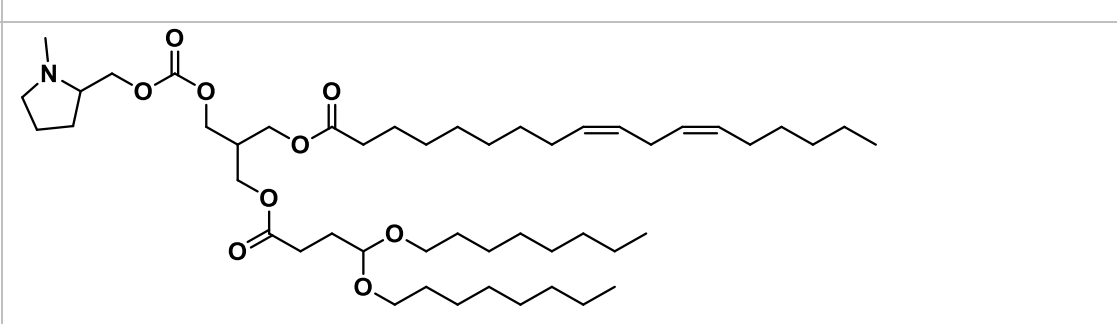
Información general

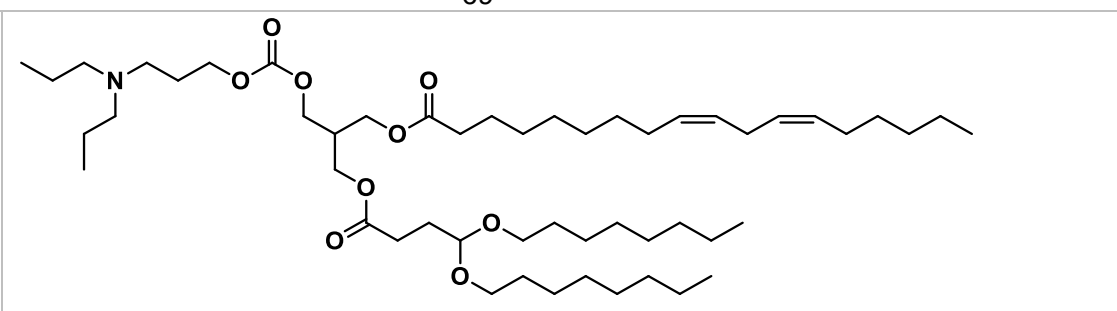
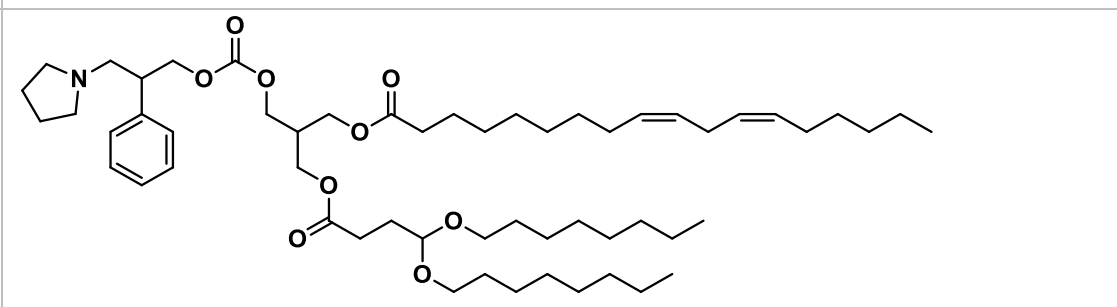
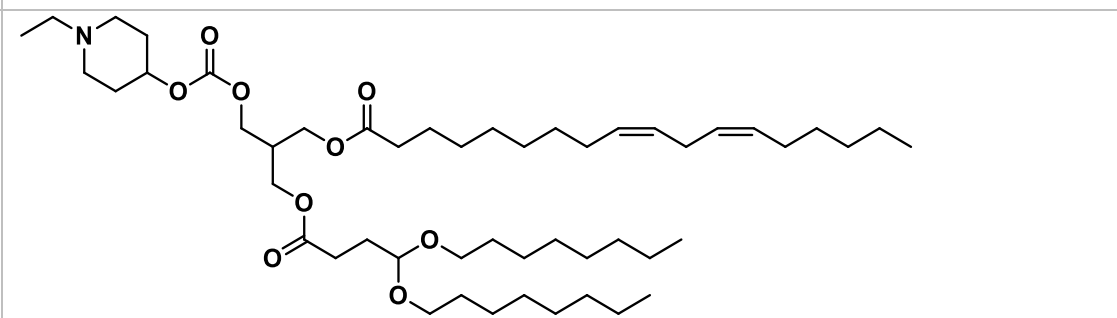
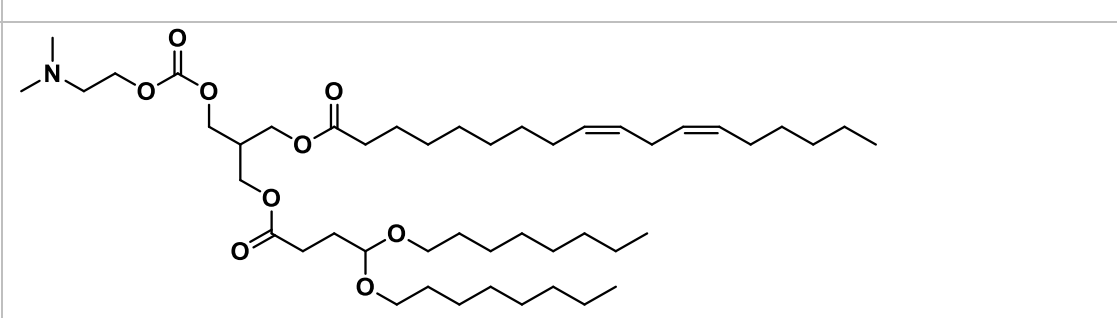
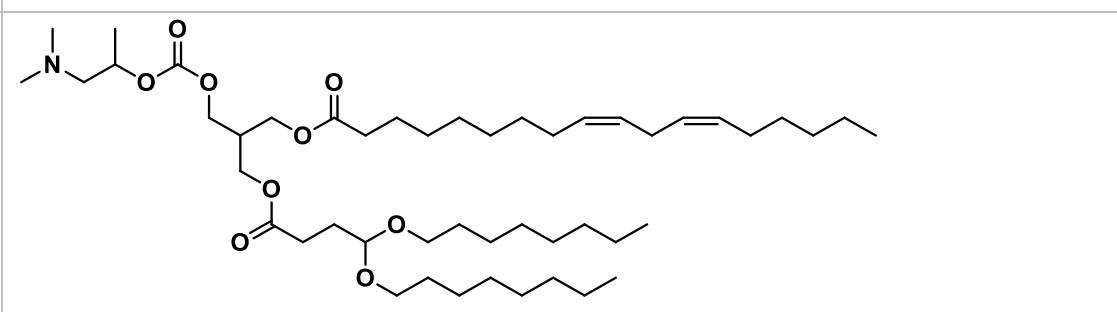
Todos los reactivos y disolventes se adquirieron y se usaron tal cual se recibieron de los proveedores comerciales o se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos citados. Todos los intermedios y compuestos finales se purificaron mediante el uso de cromatografía de columna ultrarrápida en gel de sílice. Se registraron espectros de RMN en un espectrómetro Bruker o Varian de 400 MHz y se recolectaron los datos de RMN en CDCl_3 a temperatura ambiente. Los cambios químicos se informaron en partes por millón (ppm) con respecto a CDCl_3 (7,26). Los datos para ^1H RMN se informan de la siguiente manera: desplazamiento químico, multiplicidad (br = amplio, s = singlete, d = doblete, t = triplete, dd = doblete de dobletes, dt = doblete de triplete, q = cuarteto, m = multiplete, ddd = doblete de doblete de dobletes, td = triplete de dobletes, tt = triplete de triplete, tdd = triplete de doblete de dobletes, dddd = doblete de doblete de doblete de dobletes, etc.), constante de acoplamiento e integración. Los datos de MS se registraron en un espectrómetro de masas Waters SQD2 con una fuente de ionización por electropulverización (ESI). La pureza de los compuestos finales se determinó mediante UPLC-MS-ELS con un instrumento de cromatografía

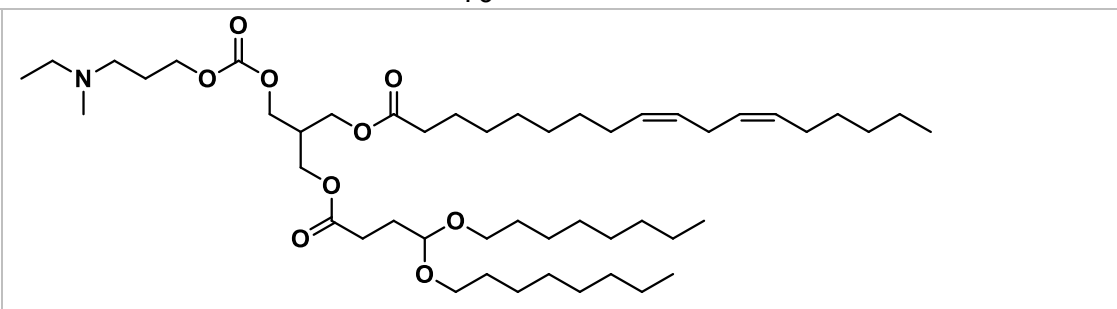
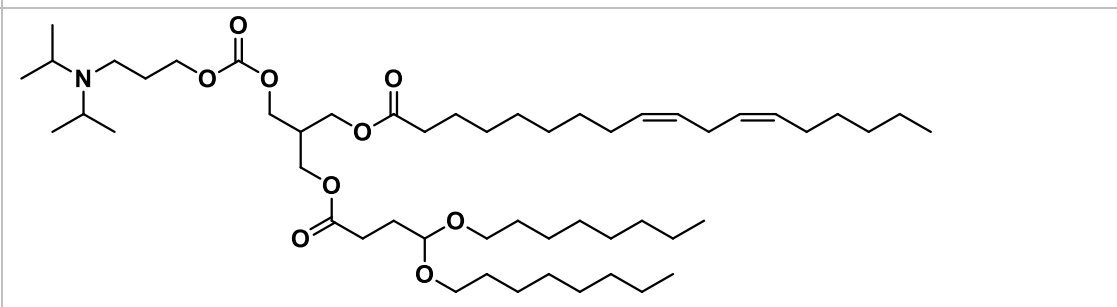
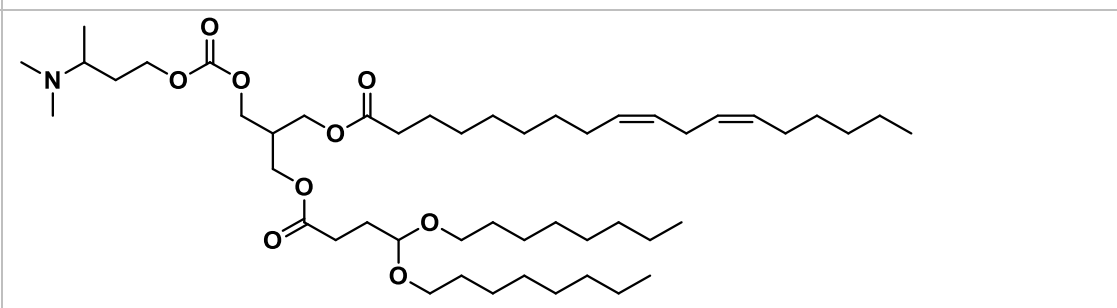
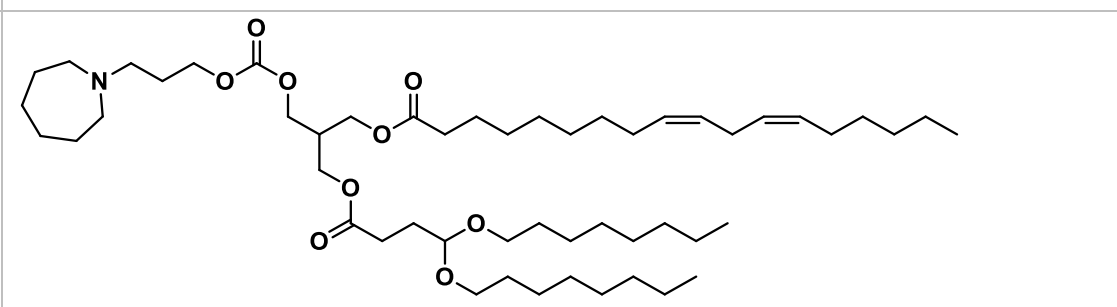
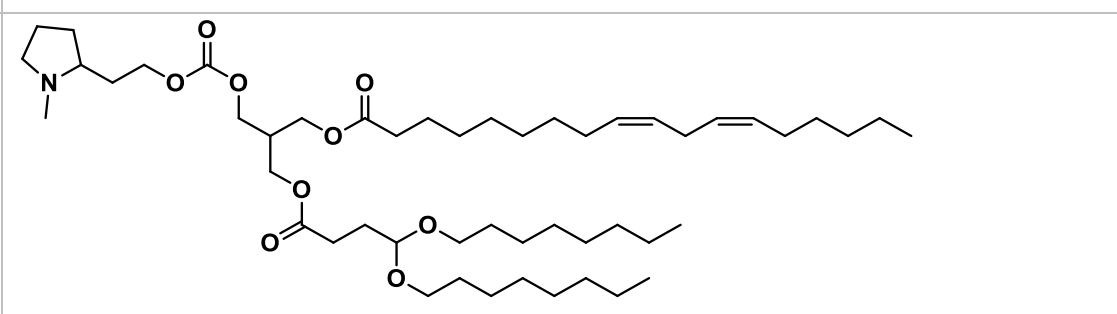
líquida Waters Acquity clase H equipado con un espectrómetro de masas SQD2 con matriz de fotodiodos (PDA) y detectores de dispersión evaporativa de la luz (ELS, por su sigla en inglés).

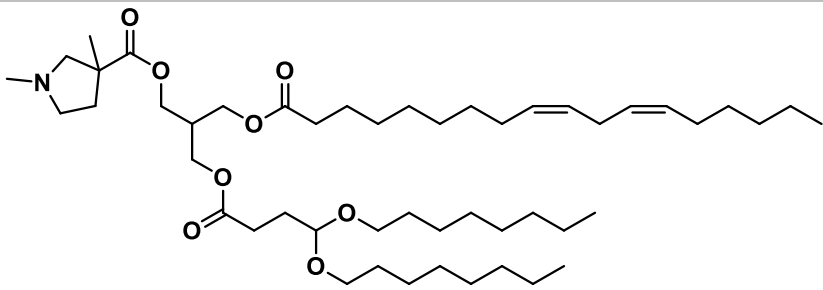
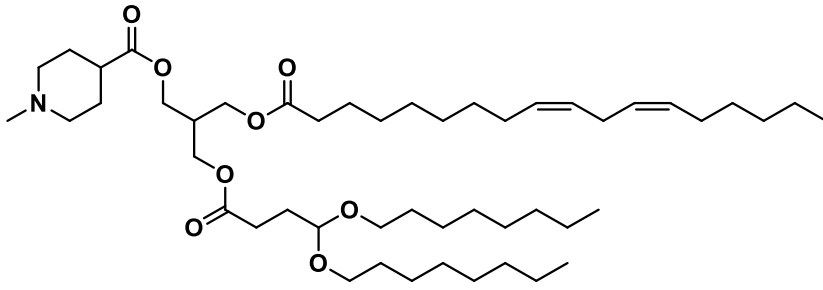
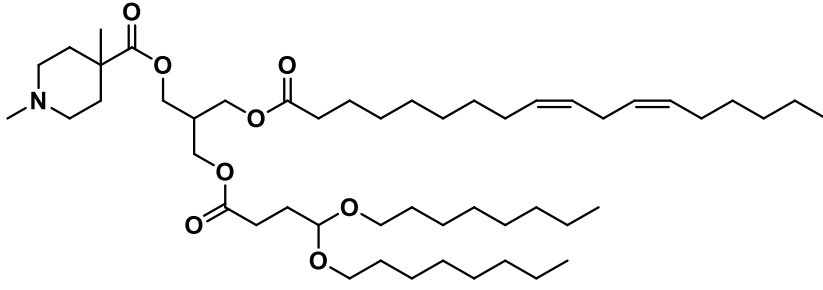
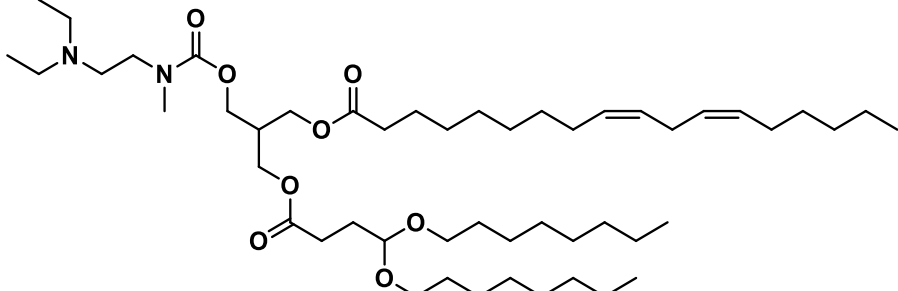
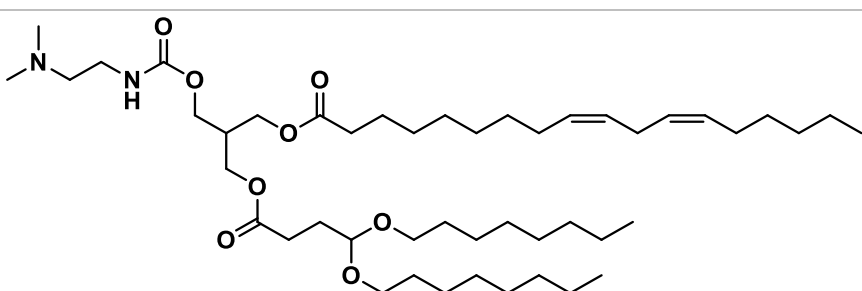
Compuest o	Estructura
1	
2	
3	
4	

5	
6	
7	
8	
9	

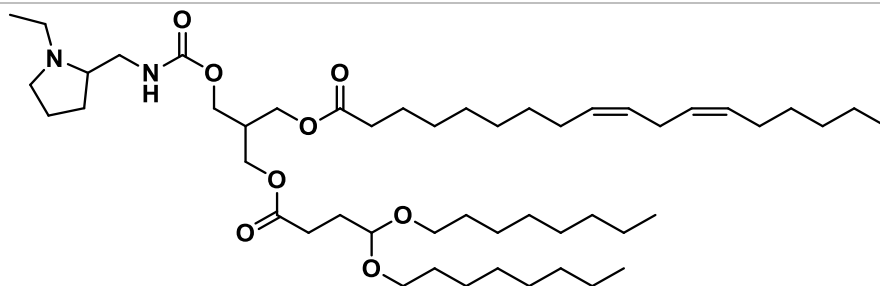
10	 <chem>CCCCCCCCCOC(=O)C(CCCCCC)C(=O)OCC1CCCN1C(=O)OCC(COC(=O)CCCCC)C(=O)OCCCCCCCCC/C=C/C=C/CCCCCCCC</chem>
11	 <chem>CCCCCCCCCOC(=O)C(CCCCCC)C(=O)OCCN(CC)CC(=O)OCC(COC(=O)CCCCC)C(=O)OCCCCCCCCC/C=C/C=C/CCCCCCCC</chem>
12	 <chem>CCCCCCCCCOC(=O)C(CCCCCC)C(=O)OCCNC(=O)N(CC)CC(=O)OCC(COC(=O)CCCCC)C(=O)OCCCCCCCCC/C=C/C=C/CCCCCCCC</chem>
13	 <chem>CCCCCCCCCOC(=O)C(CCCCCC)C(=O)OCCN1CCCC1C(=O)OCC(COC(=O)CCCCC)C(=O)OCCCCCCCCC/C=C/C=C/CCCCCCCC</chem>
14	 <chem>CCCCCCCCCOC(=O)C(CCCCCC)C(=O)OCC1CCN(C)C1C(=O)OCC(COC(=O)CCCCC)C(=O)OCCCCCCCCC/C=C/C=C/CCCCCCCC</chem>

15	 <chem>CCN(CC)CCOC(=O)OCC(OC(=O)CCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC)COC(=O)CCC(OC(=O)CCCCCCCC)OC(=O)CCCCCCCC</chem>
16	 <chem>CCN(CC)CCOC(=O)OCC(OC(=O)CCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC)COC(=O)CCC(OC(=O)CCCCCCCC)OC(=O)CCCCCCCC</chem>
17	 <chem>CCN1CCCCC1OC(=O)OCC(OC(=O)CCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC)COC(=O)CCC(OC(=O)CCCCCCCC)OC(=O)CCCCCCCC</chem>
18	 <chem>CN(C)CCOC(=O)OCC(OC(=O)CCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC)COC(=O)CCC(OC(=O)CCCCCCCC)OC(=O)CCCCCCCC</chem>
19	 <chem>CN(C)C(C)COC(=O)OCC(OC(=O)CCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC)COC(=O)CCC(OC(=O)CCCCCCCC)OC(=O)CCCCCCCC</chem>

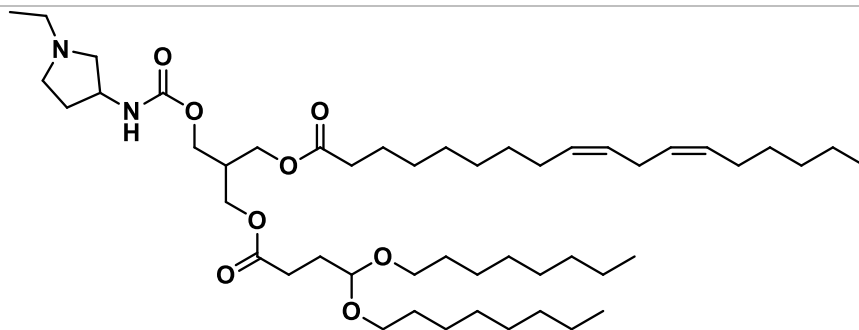
20	
21	
22	
23	
24	

30	
31	
32	
33	
34	

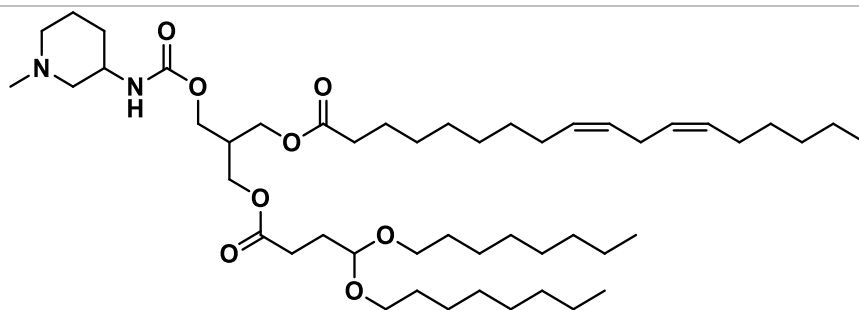
40



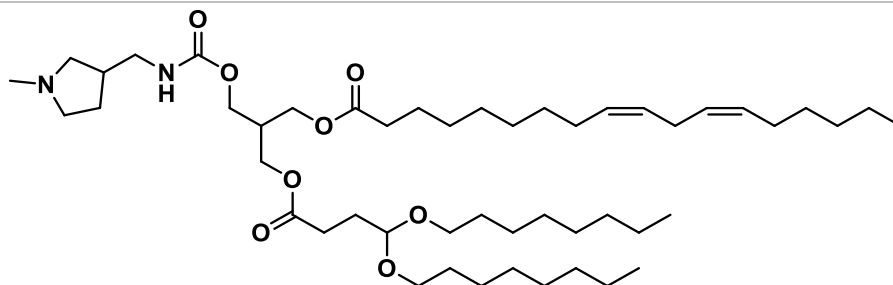
41



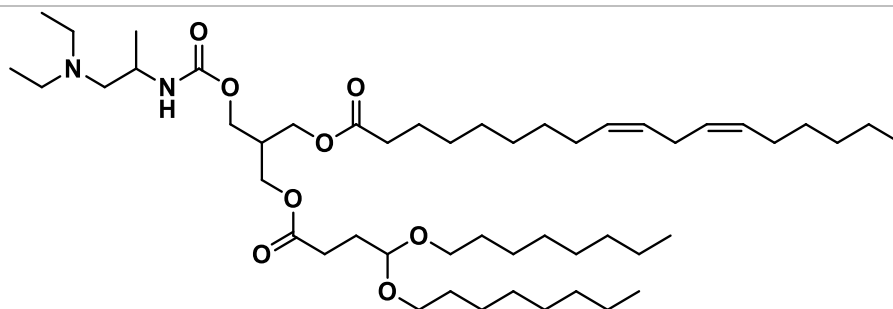
42

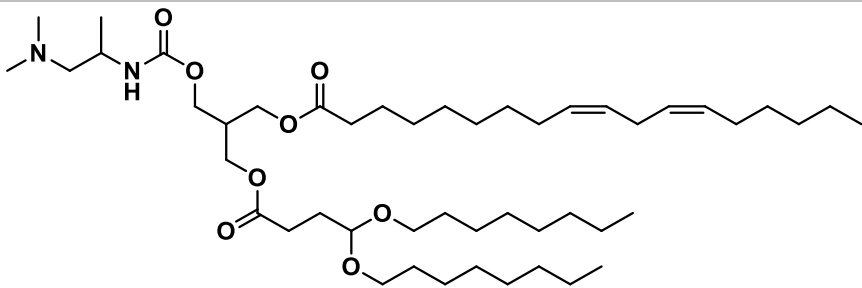
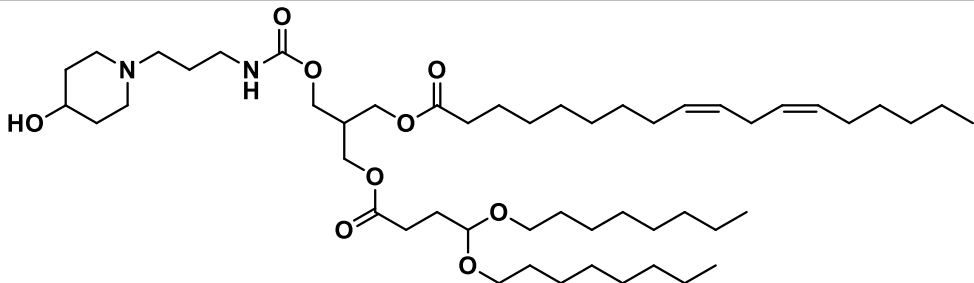
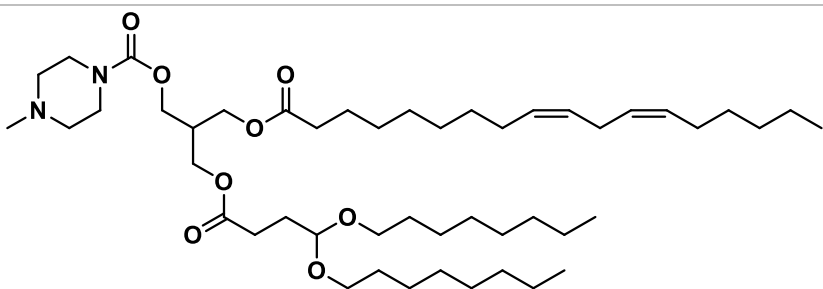
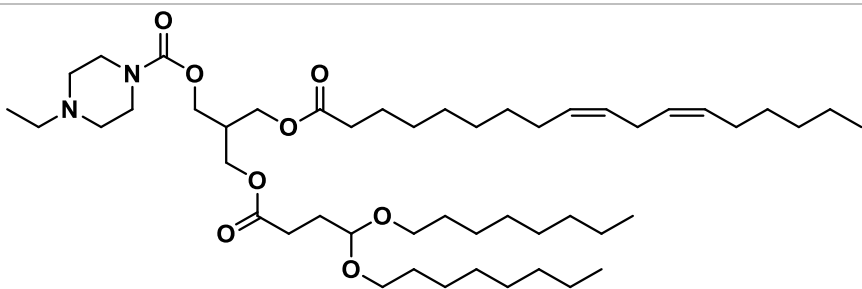
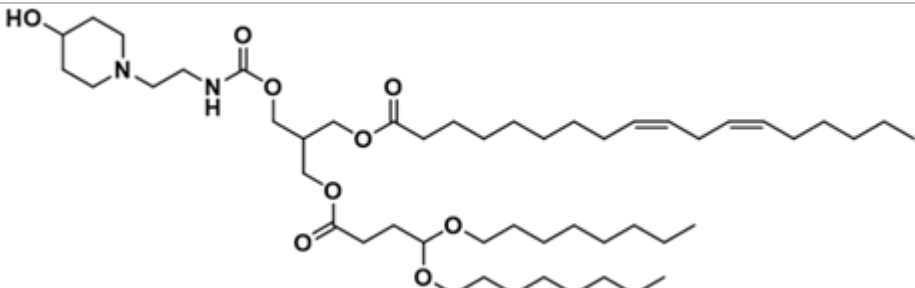


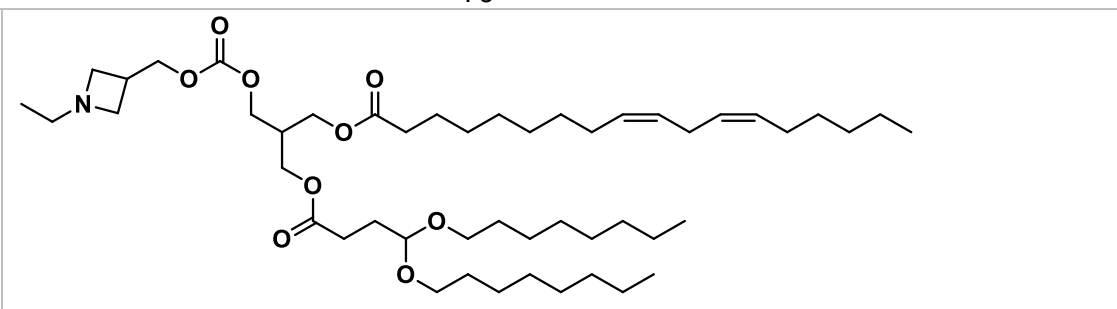
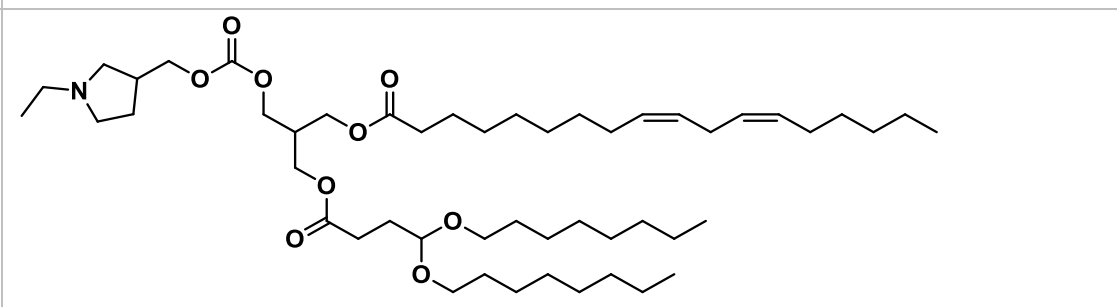
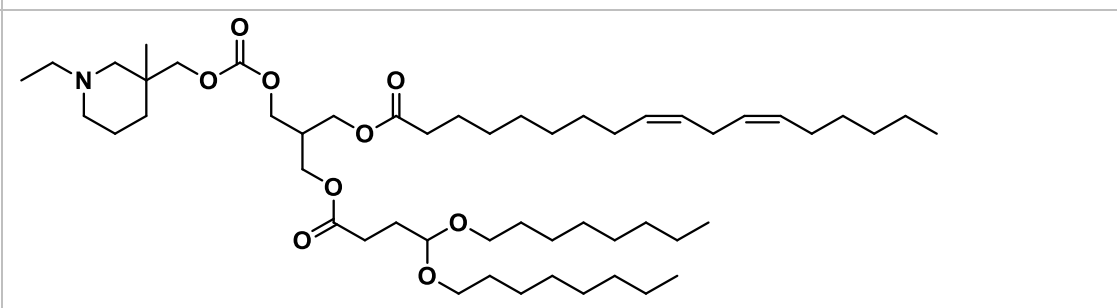
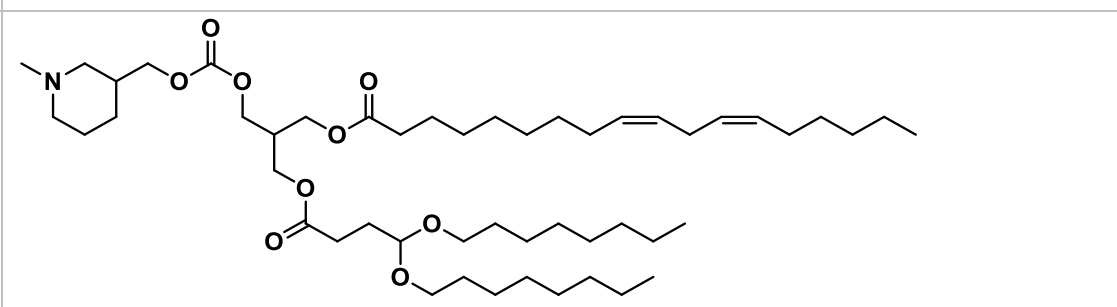
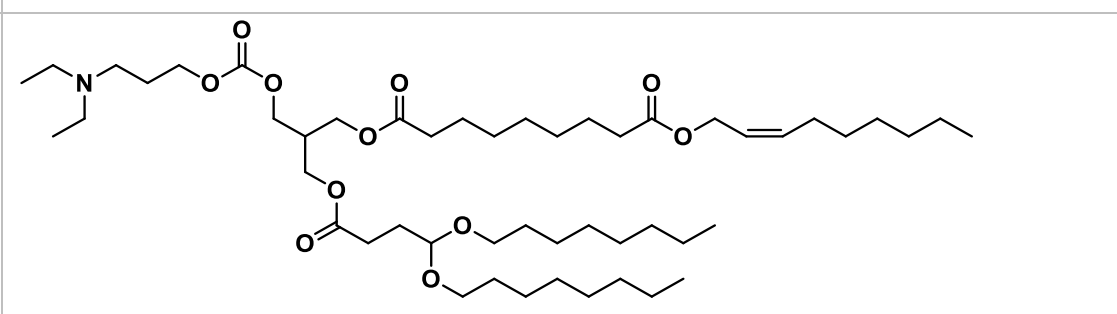
43

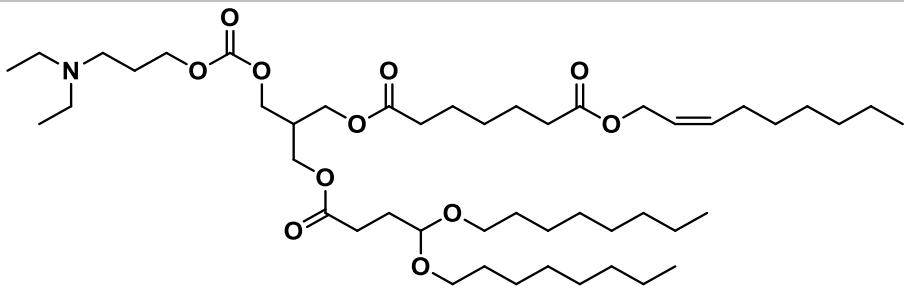
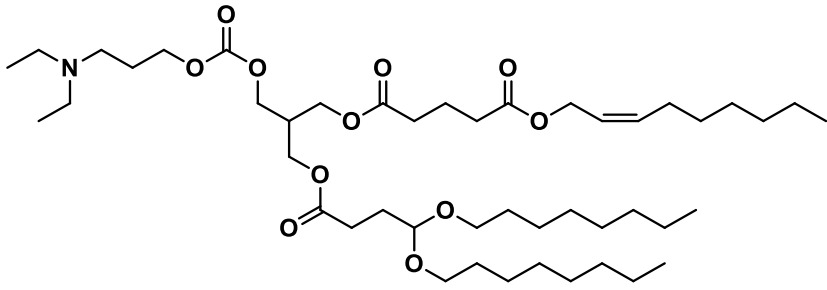
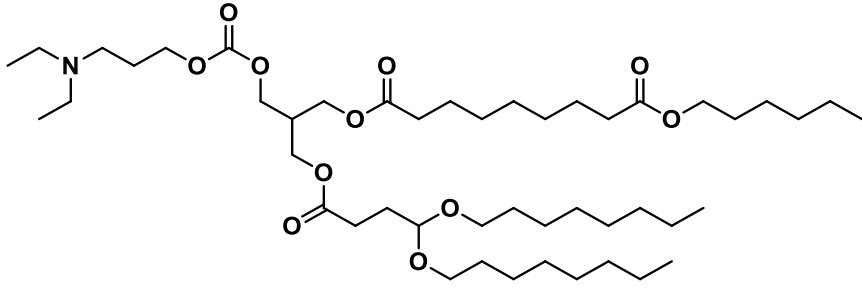
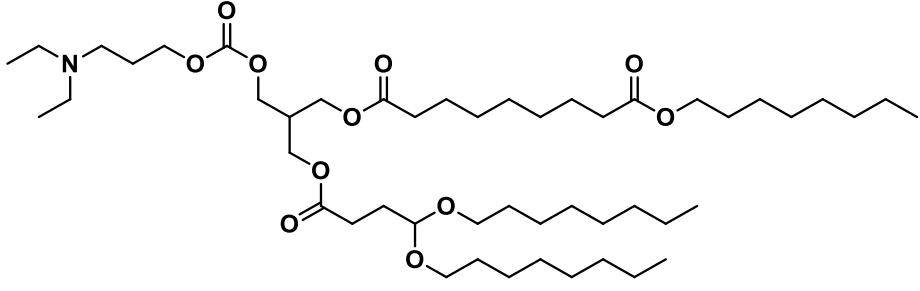
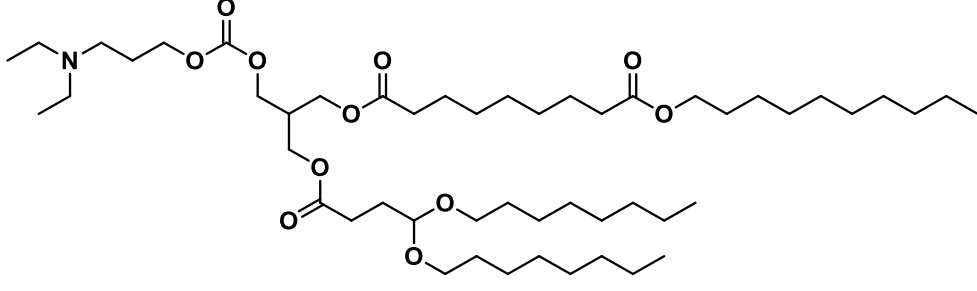


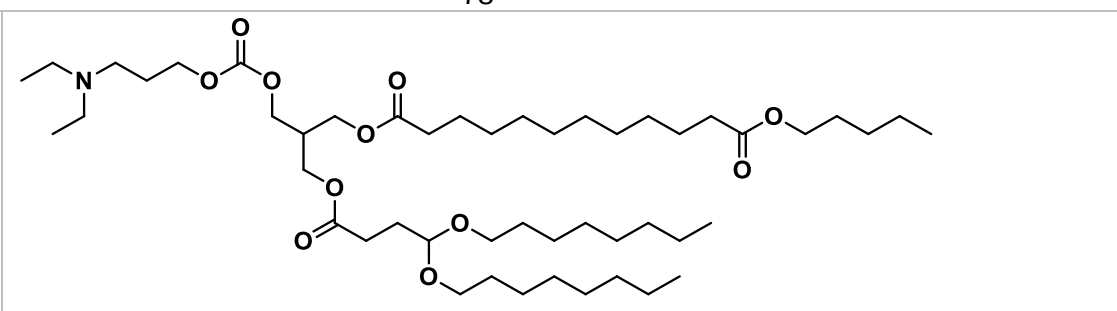
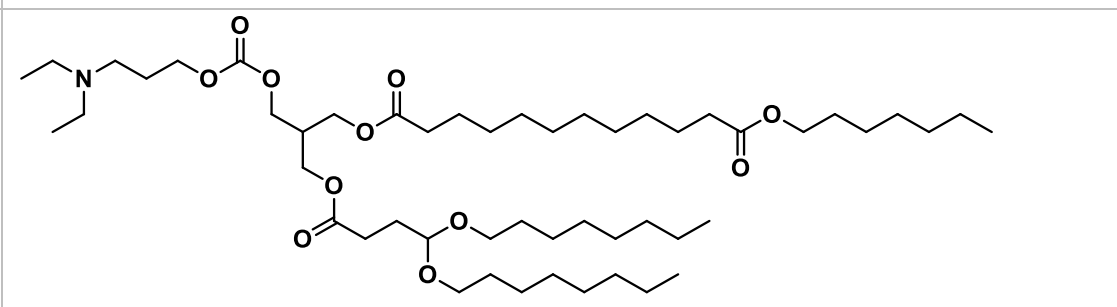
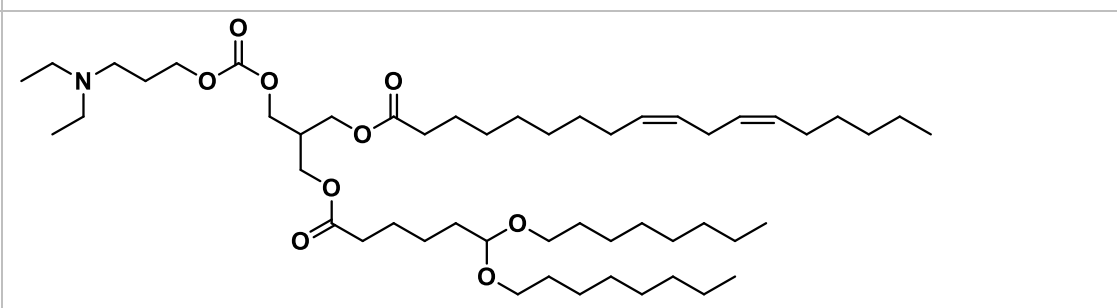
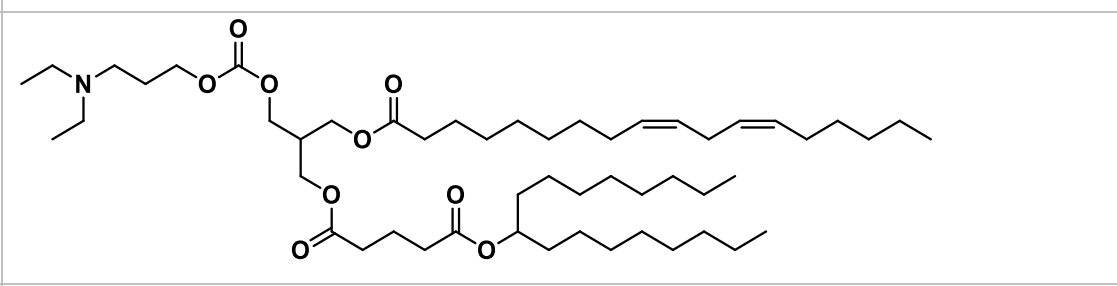
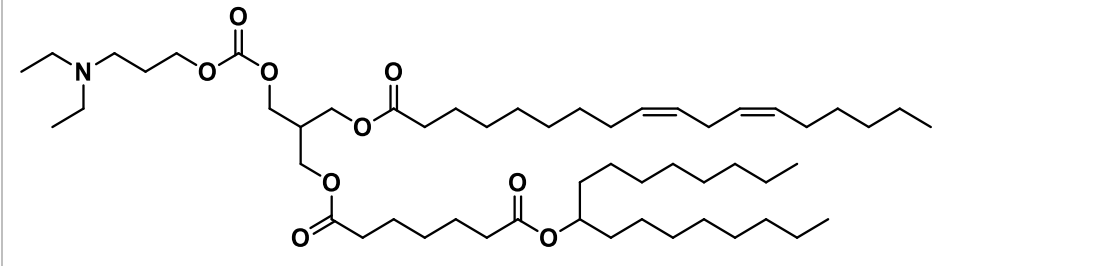
44

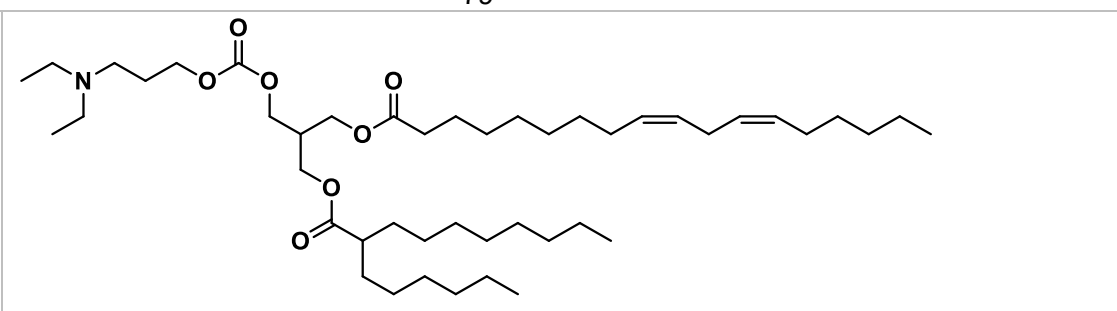
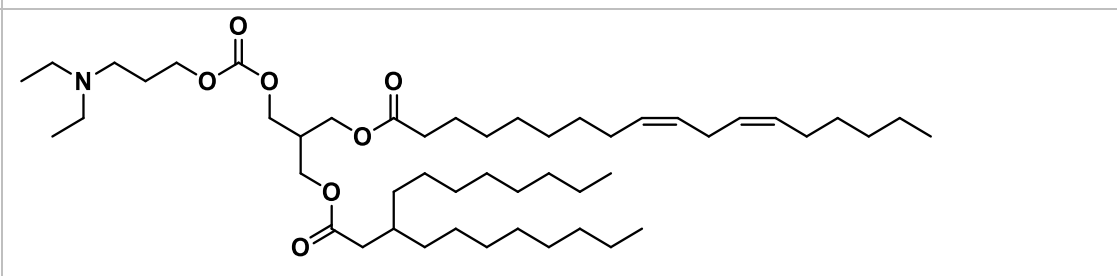
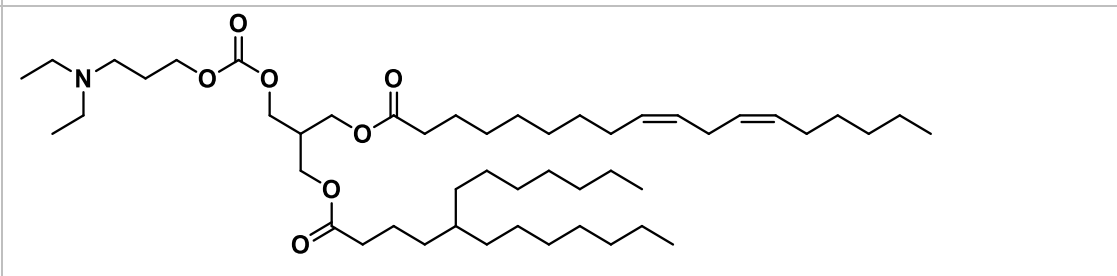
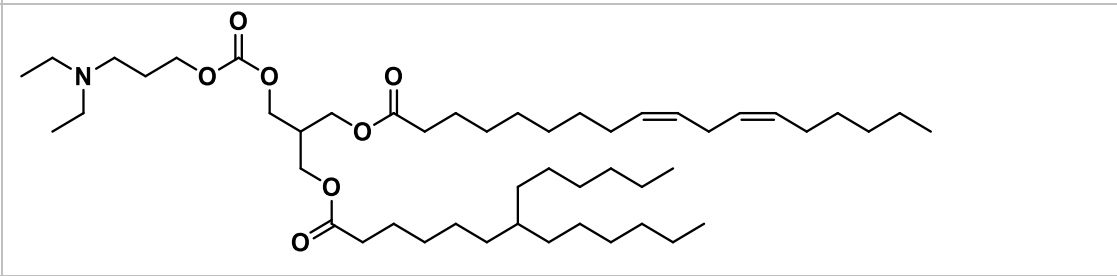
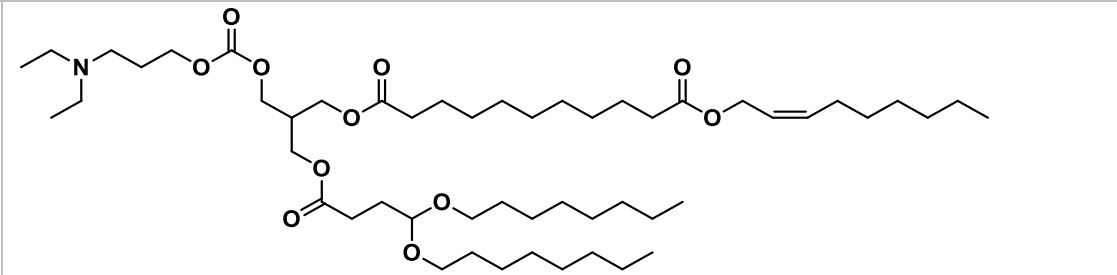
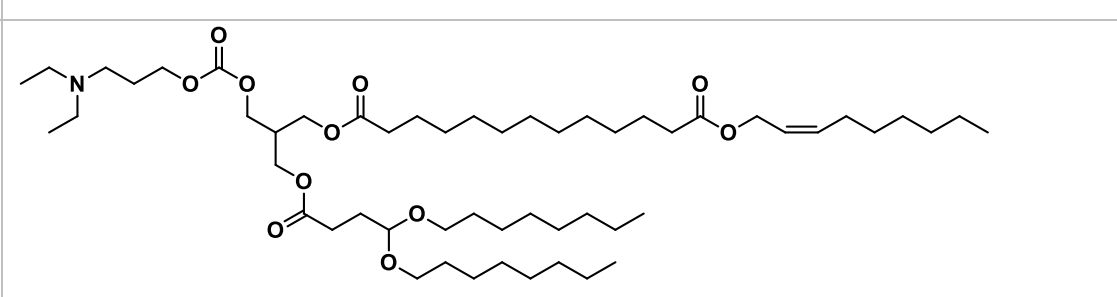


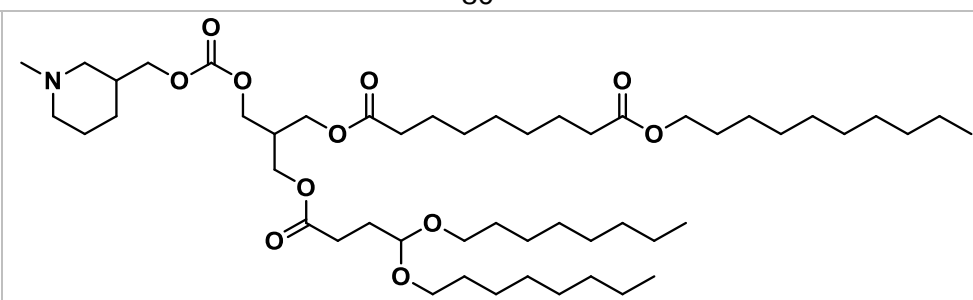
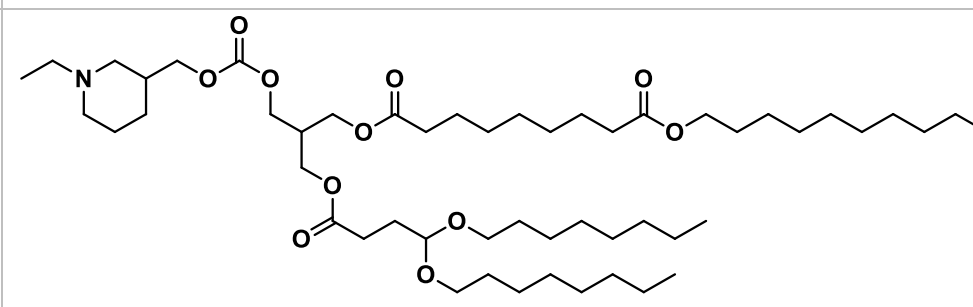
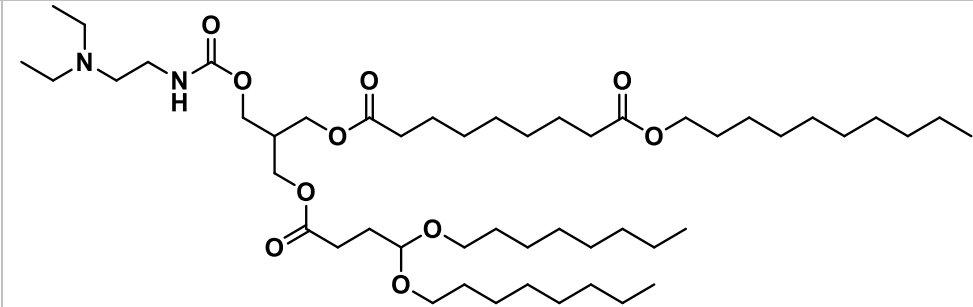
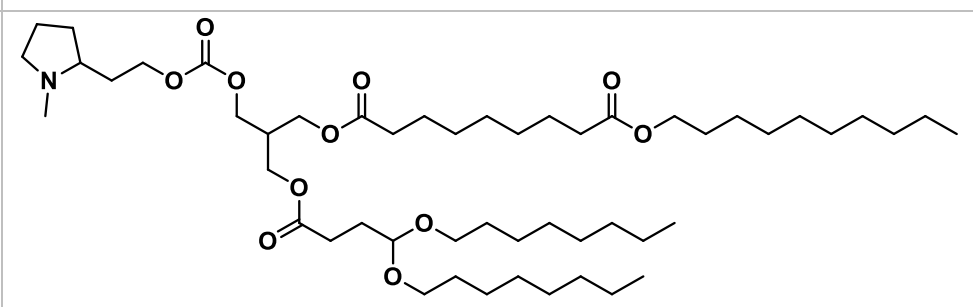
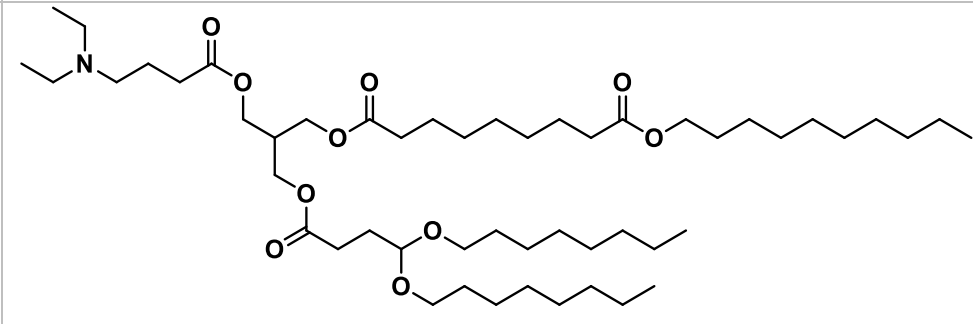
45	
46	
47	
48	
49	

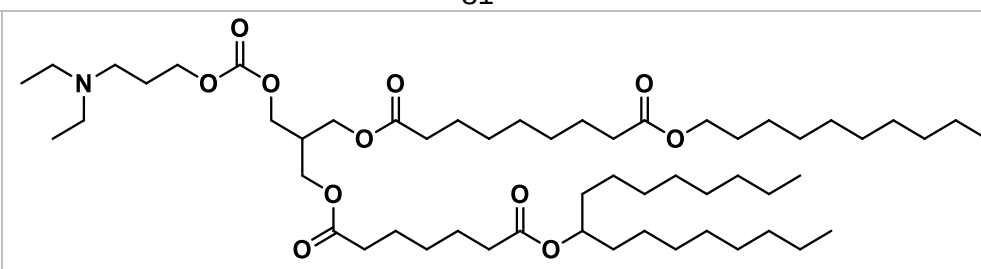
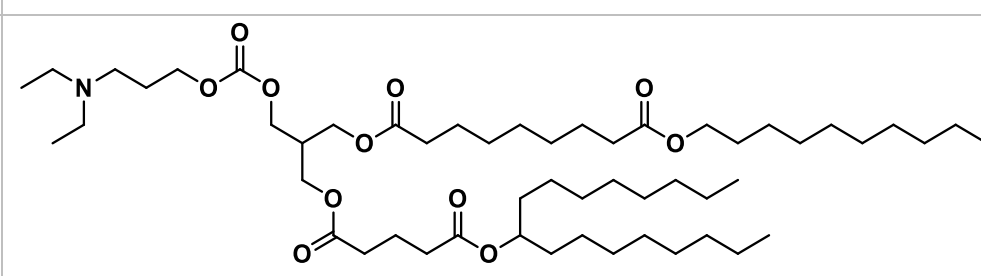
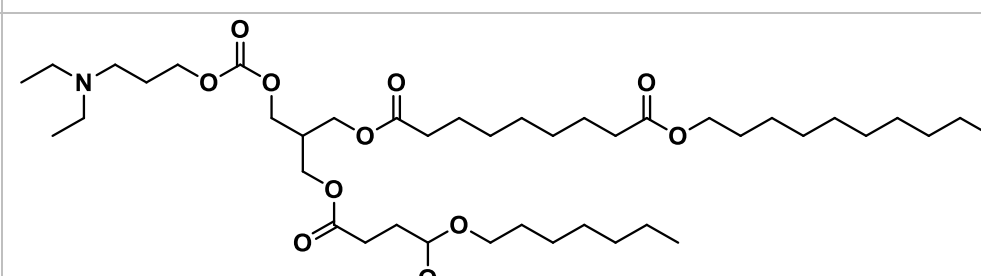
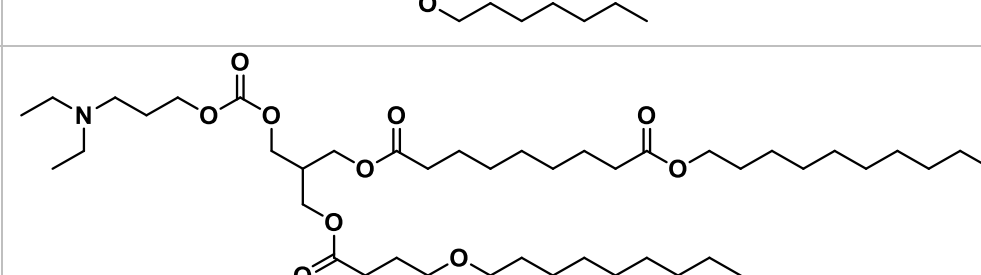
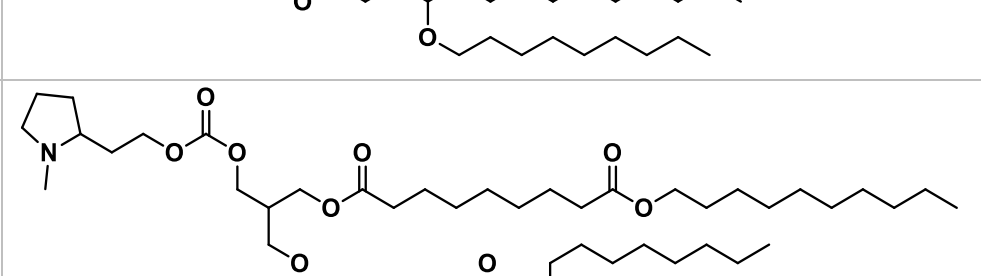
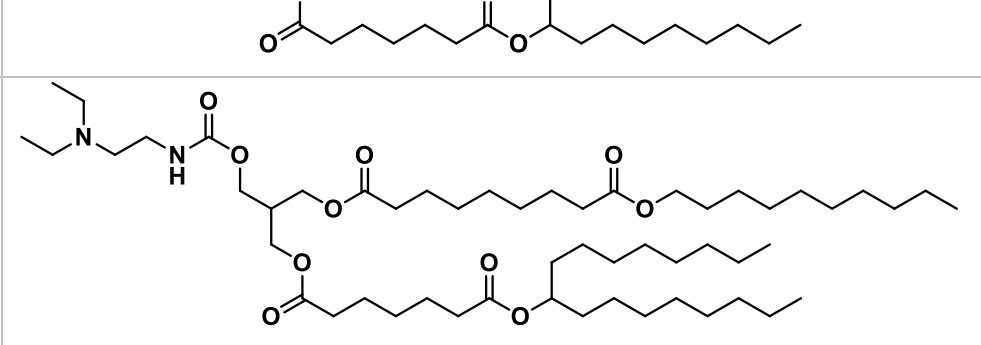
50	
51	
52	
53	
54	

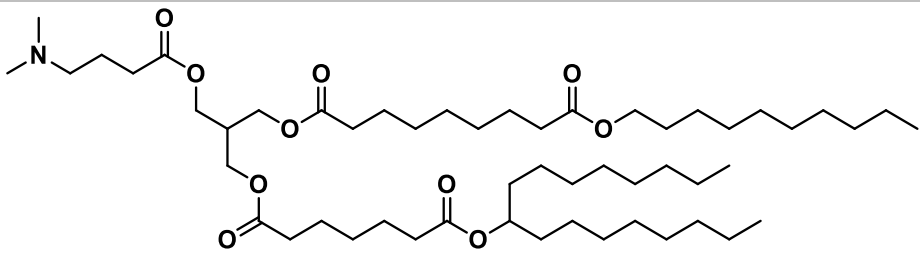
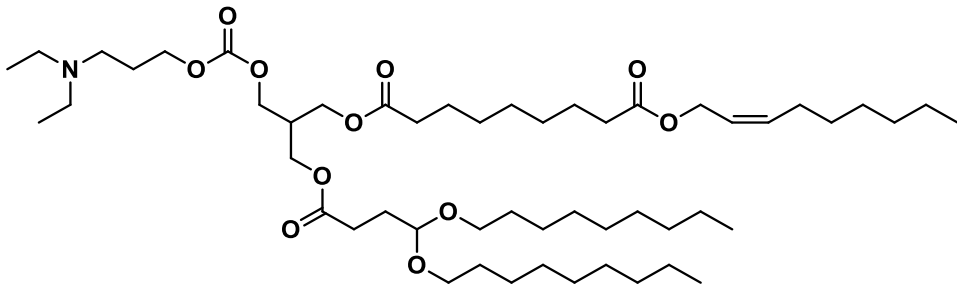
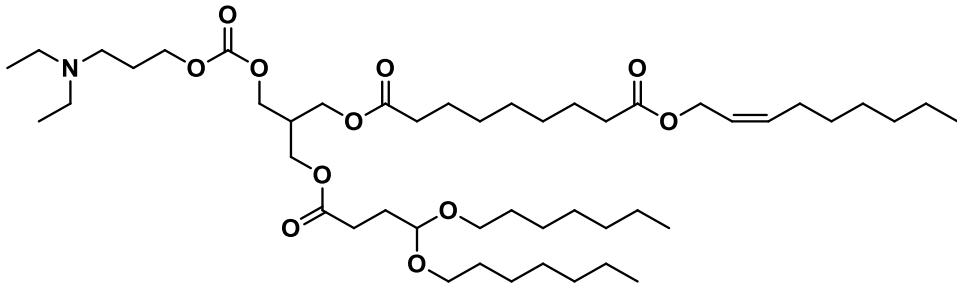
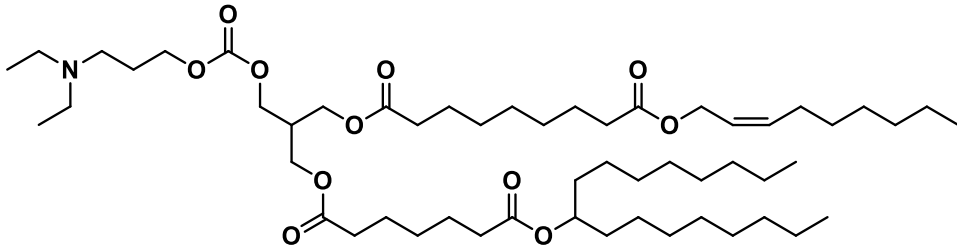
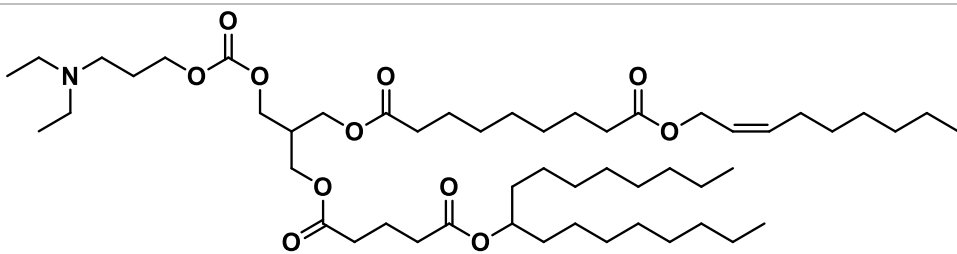
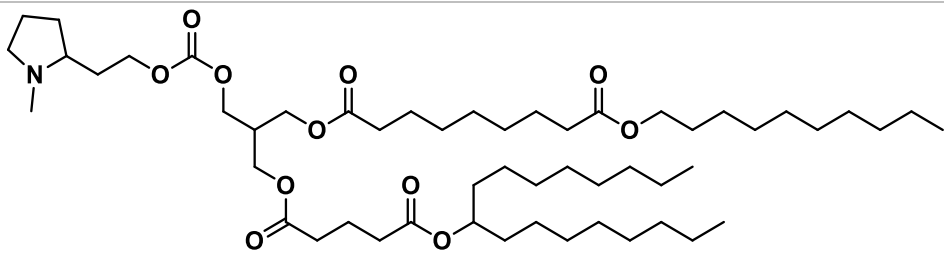
55	
56	
57	
58	
59	

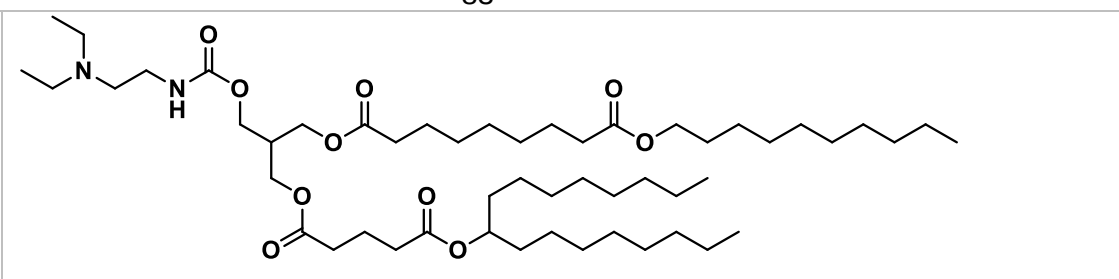
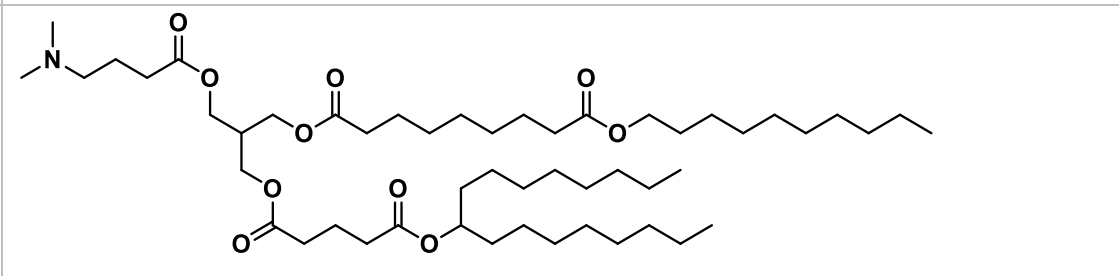
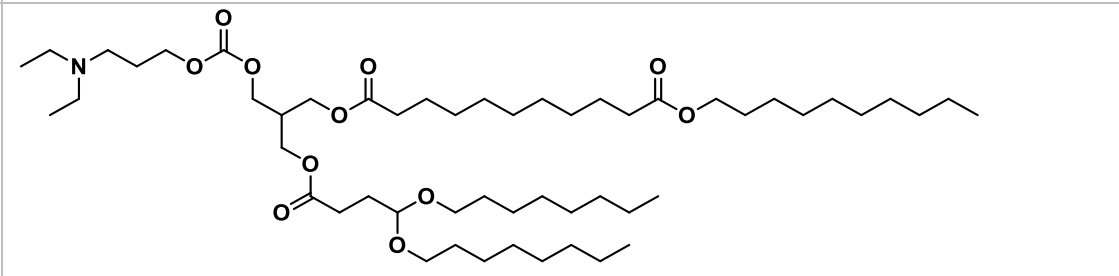
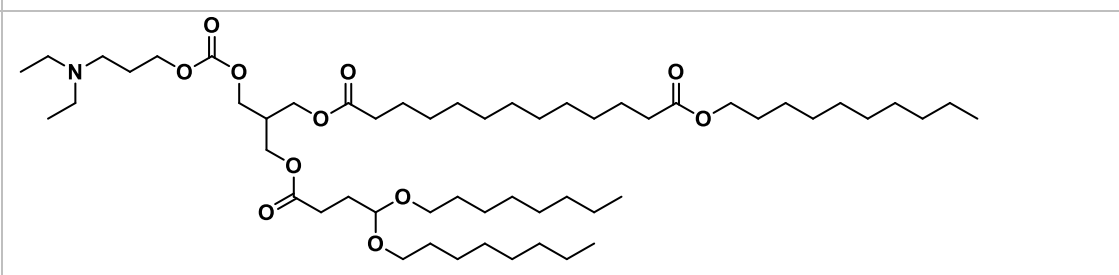
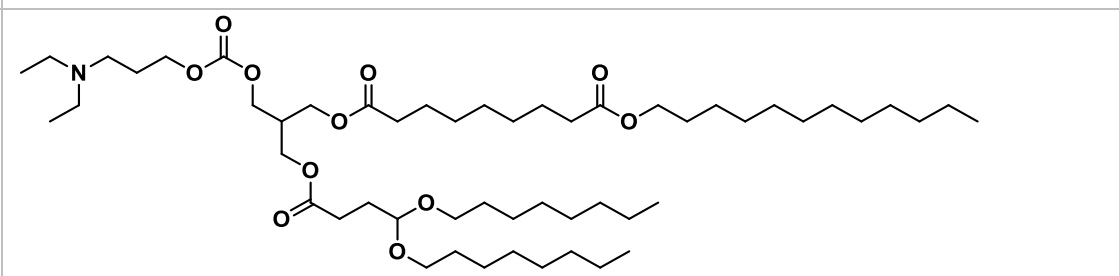
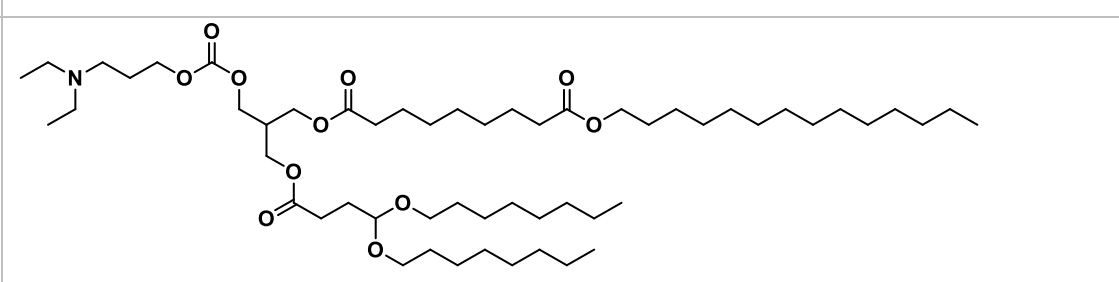
60	
61	
62	
63	
64	

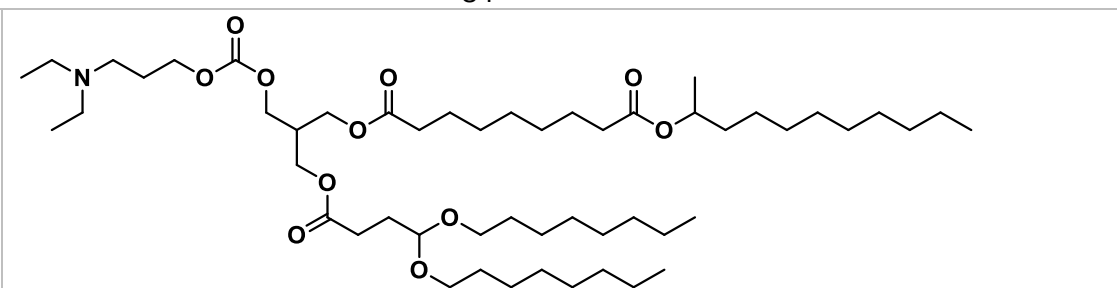
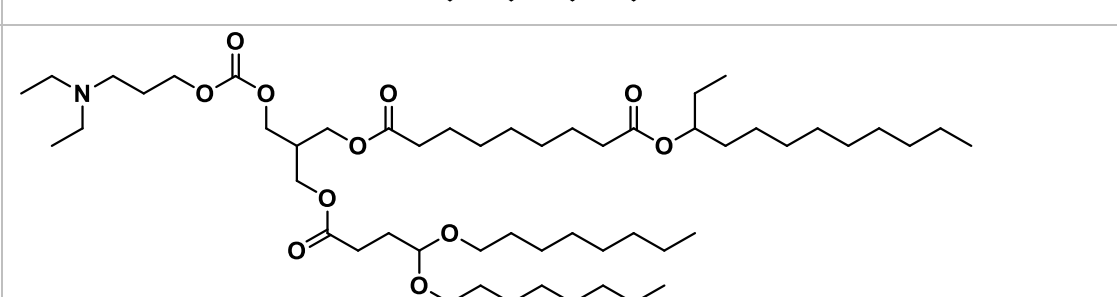
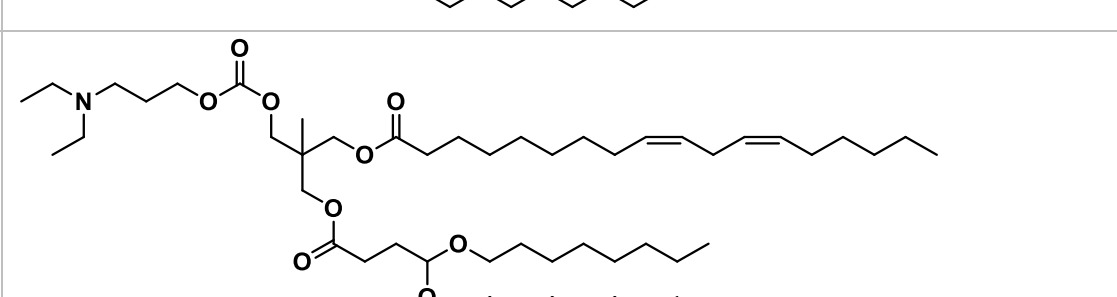
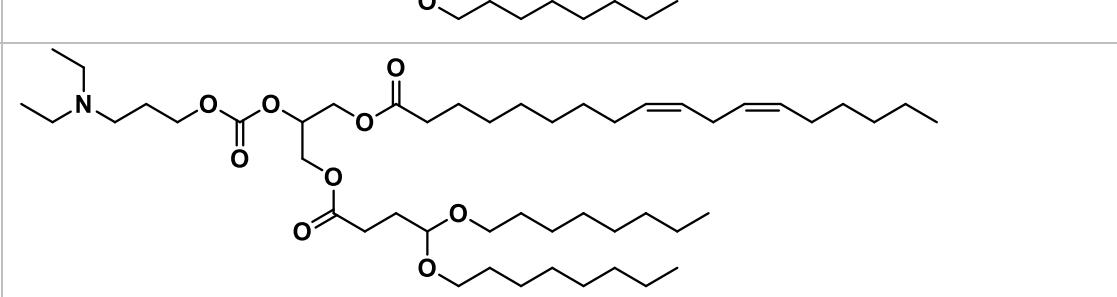
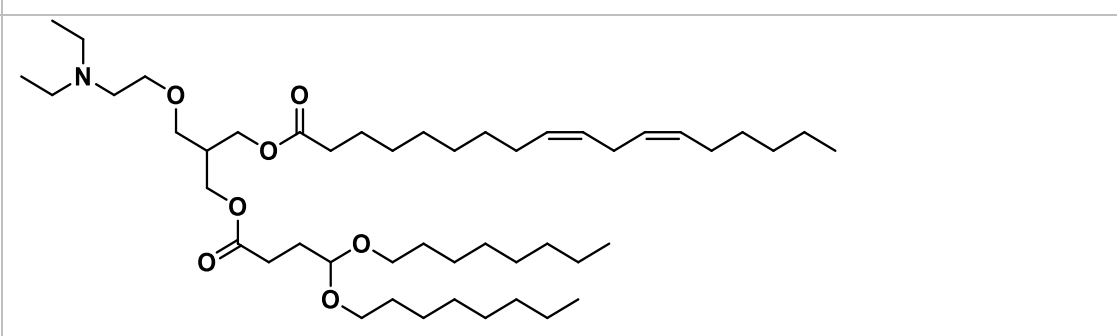
65	
66	
67	
68	
69	
70	

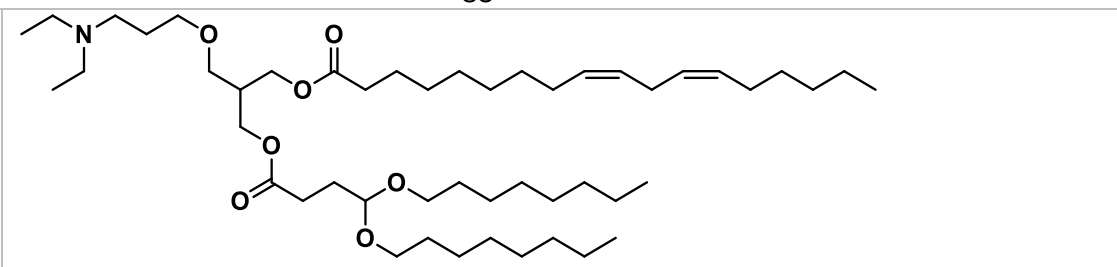
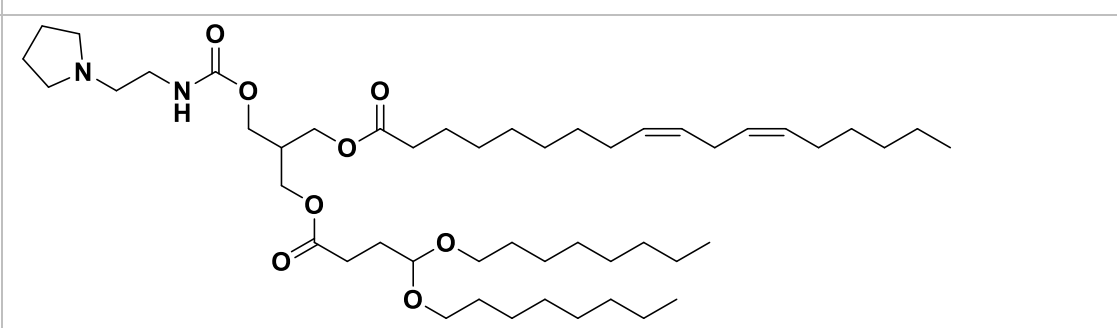
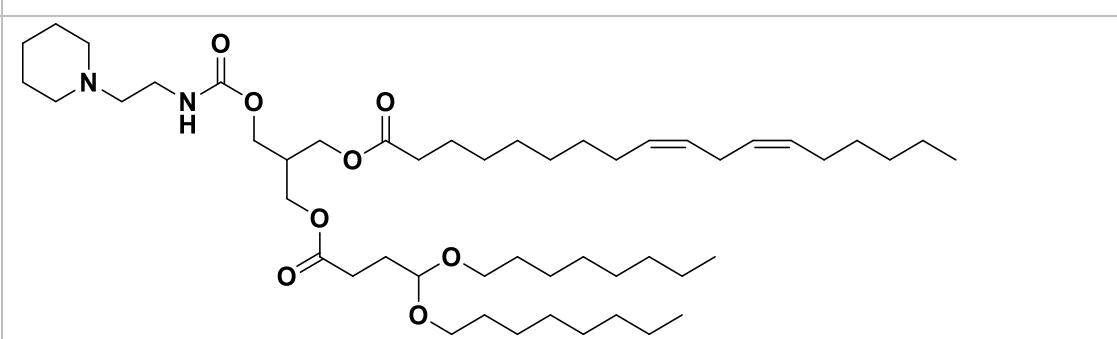
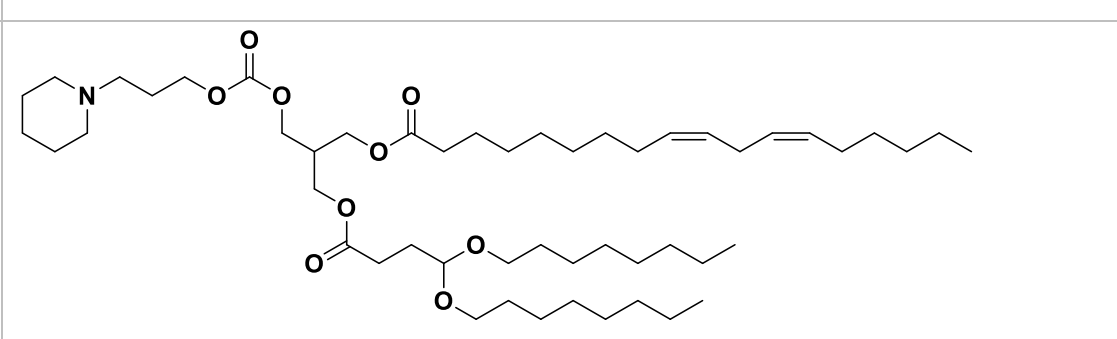
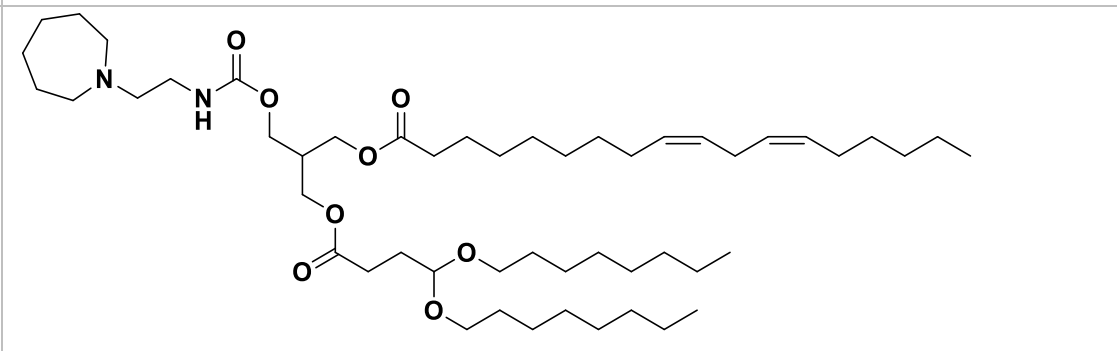
71	
72	
73	
74	
75	

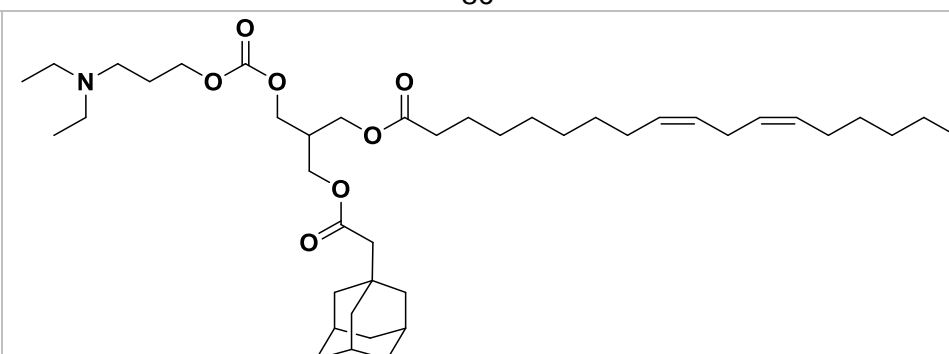
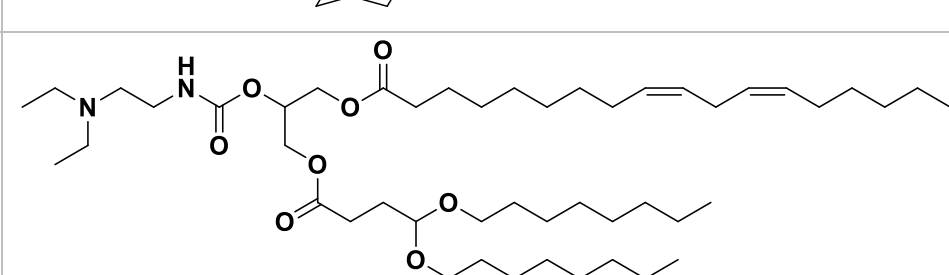
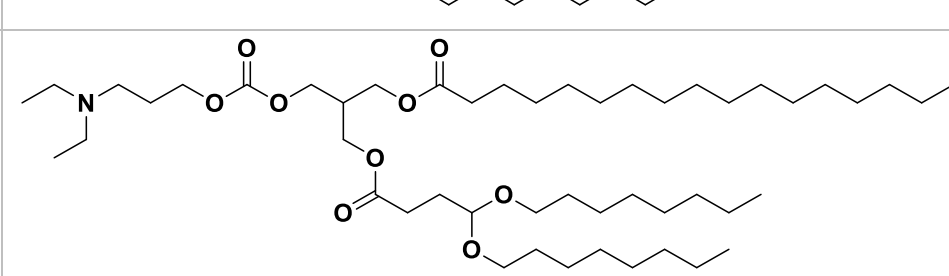
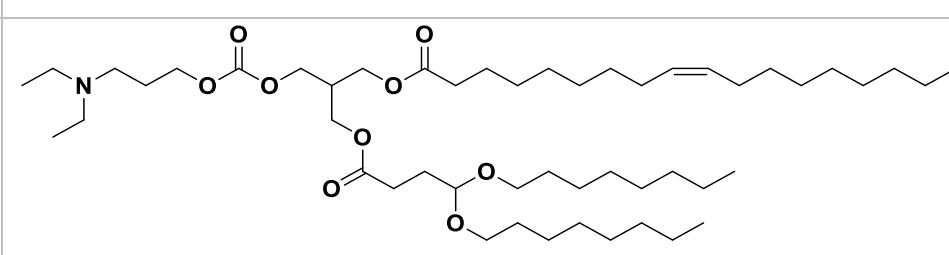
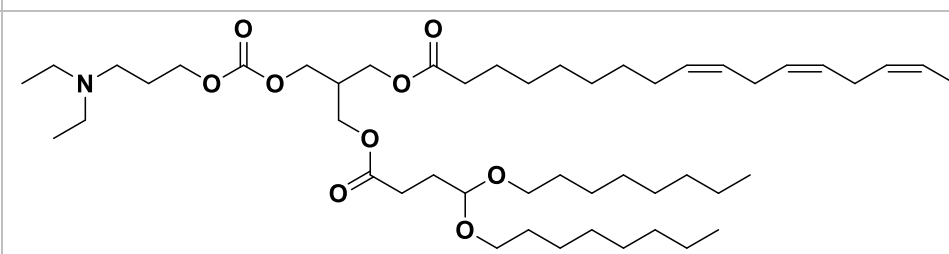
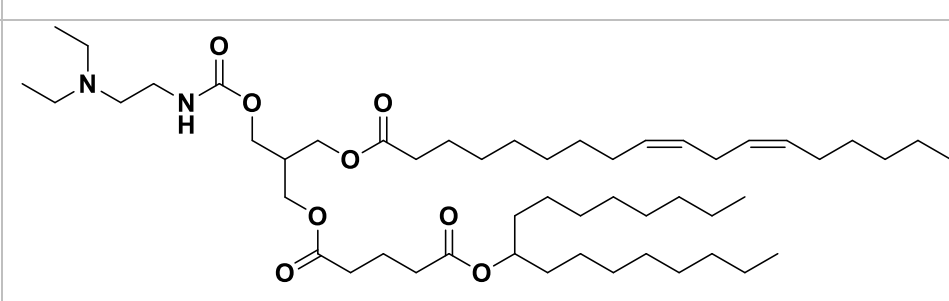
76	
77	
78	
79	
80	
81	

82	
83	
84	
85	
86	
87	

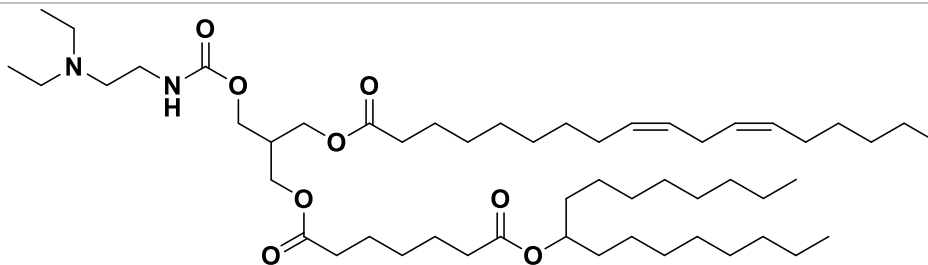
88	
89	
90	
91	
92	
93	

94	
95	
96	
97	
98	

99	
100	
101	
102	
103	

107	 <chem>CCN(CC)CCOC(=O)OCC(COC(=O)CCCCC/C=C/C/C=C/C)COC(=O)C12CCC3C1CCC2C3</chem>
113	 <chem>CCN(CC)CCNC(=O)OCC(COC(=O)CCCCC/C=C/C/C=C/C)COC(=O)CCOC(=O)CCCC</chem>
114	 <chem>CCN(CC)CCOC(=O)OCC(COC(=O)CCCCCCCCC)COC(=O)CCOC(=O)CCCC</chem>
115	 <chem>CCN(CC)CCOC(=O)OCC(COC(=O)CCCCC/C=C/C)COC(=O)CCOC(=O)CCCC</chem>
116	 <chem>CCN(CC)CCOC(=O)OCC(COC(=O)CCCCC/C=C/C/C=C/C/C=C/C)COC(=O)CCOC(=O)CCCC</chem>
117	 <chem>CCN(CC)CCNC(=O)OCC(COC(=O)CCCCC/C=C/C/C=C/C)COC(=O)CCOC(=O)CCCC</chem>

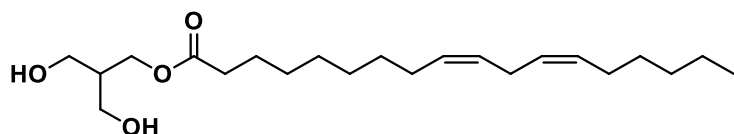
118



SÍNTESIS DE LOS EJEMPLOS

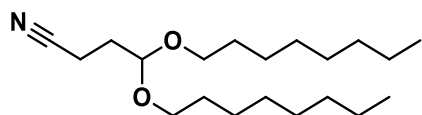
Síntesis del ejemplo 1

Intermedio 1a: 3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



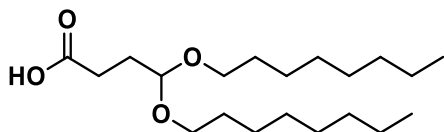
A una solución de ácido linoleico (13,2 g, 47,1 mmol), DMAP (1,15 g, 9,42 mmol), DIPEA (12,3 mL, 70,6 mmol) y 2-(hidroximetil) propano-1,3-diol (5 g, 47,1 mmol) en DCM (100 mL) se añadió EDC·HCl (13,5 g, 70,6 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 24 h, se concentró al vacío y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice (120 g de HC Si, 0-50 % de EtOAc en hexanos) para proporcionar 6,7 g (18,1 mmol, 39 % de rendimiento) del producto deseado como aceite. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,25 (m, 4H), 4,25 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,76 (m, 4H), 2,77 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,43 – 2,27 (m, 4H), 2,11 – 1,96 (m, 5H), 1,62 (m, 2H), 1,43 – 1,22 (m, 14H), 0,89 (t, J = 6,8 Hz, 3H) ppm.

Intermedio 1b: 4,4-bis(octiloxi)butanonitrilo



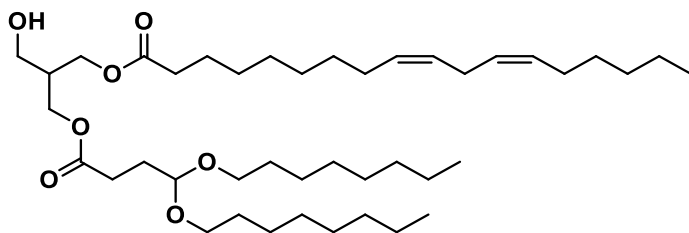
A una mezcla de 4,4-dietoxibutanonitrilo (9,4 g, 60 mmol, 1 equiv) y octan-1-ol (3 equiv) se añadió p-toluensulfonato de piridinio (0,05 equiv) a ta. La mezcla de reacción se calentó hasta 105 °C y se agitó durante al menos 18 h con el recipiente de reacción abierto al aire y no equipado con un condensador de reflujo. Después, la mezcla de reacción se enfrió a ta y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en hexanos) para proporcionar 10,1 g (31,0 mmol, rendimiento del 52 %) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,55 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 3,60 (dt, J = 9,2, 6,6 Hz, 2H), 3,43 (dt, J = 9,2, 6,6 Hz, 2H), 2,42 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 1,94 (td, J = 7,4, 5,3 Hz, 2H), 1,63 – 1,50 (m, 4H), 1,38 – 1,19 (m, 20H), 0,93 – 0,82 (m, 6H) ppm; MS: 348 m/z [$\text{M}+\text{Na}$].

Intermedio 1c: Ácido 4,4-bis(octiloxi)butanoico



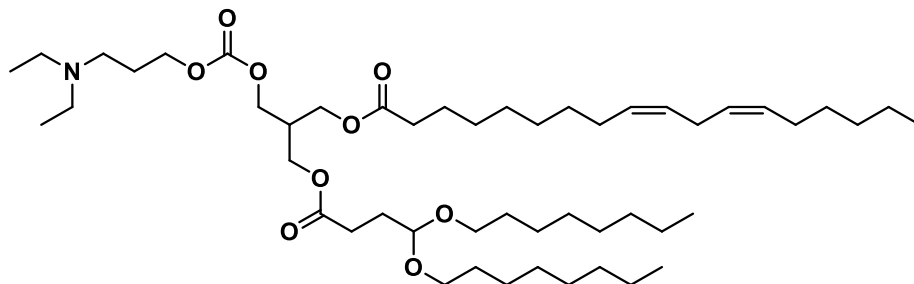
A una solución del Intermedio 1b (8,42 g, 31 mmol, 1 equiv.) en etanol (1 M) se añadió hidróxido de potasio acuoso (2,5 M, 2,5 equiv.) a ta. Tras ajustar el recipiente de reacción con un condensador de reflujo, la mezcla de reacción se calentó a 110 °C y se agitó durante 20-24 h. Después, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se acidificó con HCl acuoso 1N a pH 5 y se extrajo en hexanos. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro o sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar 8,15 g (23,6 mmol, 76 % de rendimiento) del producto deseado como aceite transparente, que se utilizó en bruto sin purificación adicional. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,50 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,57 (dt, $J = 9,4, 6,7$ Hz, 2H), 3,41 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,92 (td, $J = 7,4, 5,3$ Hz, 2H), 1,56 (m, 4H), 1,37 – 1,21 (m, 20H), 0,92 – 0,83 (m, 6H) ppm; MS: 343 m/z [M-H].

Intermedio 1d: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 1a (0,8-1,2 equiv.) y el Intermedio 1c (1,1 g, 3,2 mmol, 1 equiv. en DCM (0,08-0,4 M) se agregó DMAP (0,1-0,2 equiv.), DIPEA (1,4-3 equiv.), y EDC·HCl (1,4-1,6 equiv) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante al menos 5 h, se concentró al vacío y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice (un gradiente de EtOAc en hexanos) para proporcionar 1,08 g (1,55 mmol, 48 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,36 (m, 4H), 4,49 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 4,17 (m, 4H), 3,66 – 3,53 (m, 4H), 3,40 (m, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,32 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,19 (m, 2H), 2,05 (m, 4H), 1,93 (m, 2H), 1,58 (m, 7H), 1,31 (m, 32H), 0,88 (m, 9H) ppm.

Ejemplo 1: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)-carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato

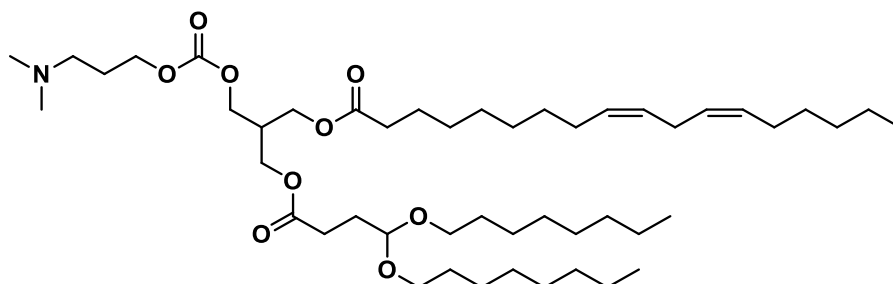


A una solución del intermedio 1d (1,08 g, 1,55 mmol, 1 equiv.) en acetonitrilo (0,04-0,1 M) se añadió piridina (2 equiv.), DMAP (0,2 equiv.) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (1,5 equiv.) secuencialmente a ta. Tras agitar durante al menos 2 h, se añadió 3-(dietilamino)propan-1-ol (3 equiv.) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 2-24 h más a ta. La mezcla de reacción se extrajo en hexanos (20 mL) y se lavó con agua. La capa de agua resultante se volvió a extraer con hexanos. Las capas de hexanos combinadas se secaron en Na_2SO_4 o MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (un gradiente de EtOAc en hexanos o metanol en DCM) para proporcionar 711 mg (0,834 mmol, 54 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,35 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,17 (m, 8H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,77 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,55 (q, $J = 7,2$ Hz, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,30 (m, 34H), 1,03 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 853 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis de los ejemplos 2-24

Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 1d y un reactivo aminoalcohol o diamina usando el método empleado para el Ejemplo 1.

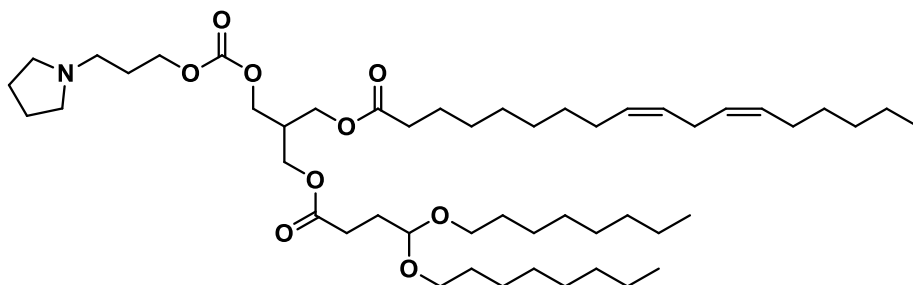
Ejemplo 2: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



42 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,08 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H),

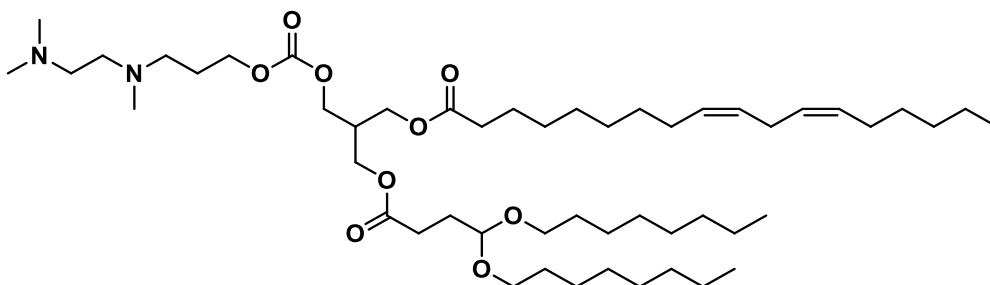
2,47 – 2,34 (m, 5H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,24 (s, 6H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,97 – 1,79 (m, 4H), 1,58 (m, 6H), 1,41 – 1,24 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm. MS: 825 m/z [M+H].

Ejemplo 3: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(pirrolidin-1-il)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



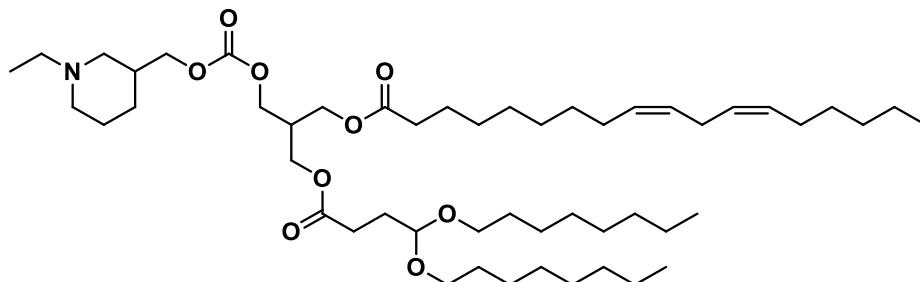
38 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,24 – 4,08 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,56 (m, 6H), 2,47 – 2,35 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,97 – 1,85 (m, 4H), 1,86 – 1,73 (m, 4H), 1,58 (m, 6H), 1,41 – 1,24 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 851 m/z [M+H].

Ejemplo 4: 13-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)metil)-2,5-dimetil-10-oxo-9,11-dioxa-2,5-diazatetradecan-14-il (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



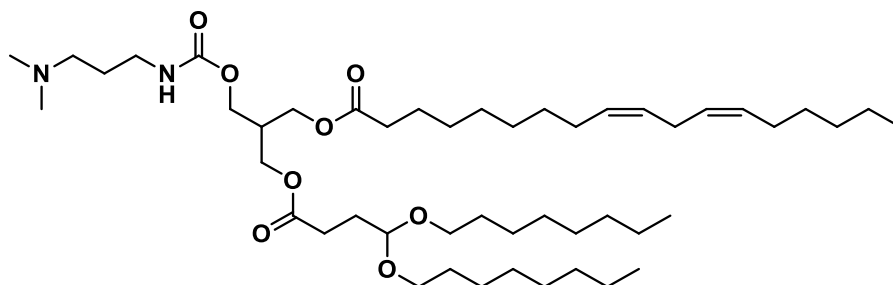
25 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,11 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,58 – 2,38 (m, 9H), 2,33-2,28 (m, 8H), 2,25 (s, 3H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,97 – 1,79 (m, 4H), 1,58 (m, 6H), 1,41 – 1,23 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 882 m/z [M+H].

Ejemplo 5: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



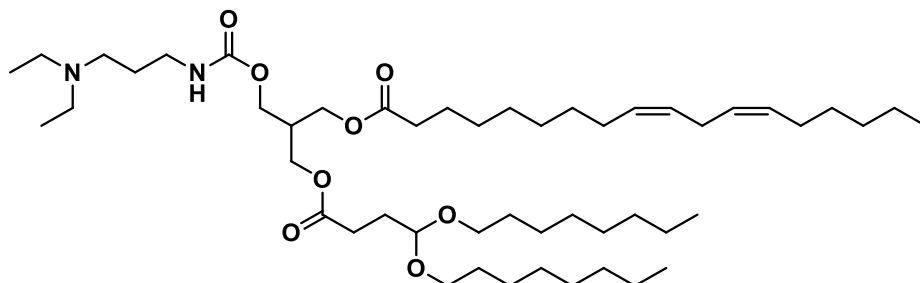
19 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 - 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,13 - 3,95 (m, 8H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,96 (m, 2H), 2,77 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,54 - 2,35 (m, 5H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,05 (q, J = 6,9 Hz, 5H), 2,02 - 1,54 (m, 15H), 1,42 - 1,24 (m, 31H), 1,16 - 1,00 (m, 5H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 865 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 6: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dimetilamino)propil)-carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



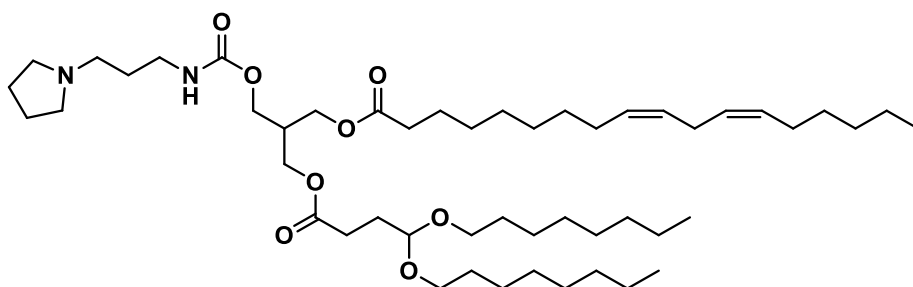
50 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,70 (br m, 1H), 5,44 - 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,13 (br m, 6H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,26 (q, J = 6,2 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,55 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,40 (m, 7H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,21 - 2,02 (m, 11H), 1,92 (m, 2H), 1,77 (m, 2H), 1,57 (m, 4H), 1,42 - 1,25 (m, 31H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 824 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 7: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



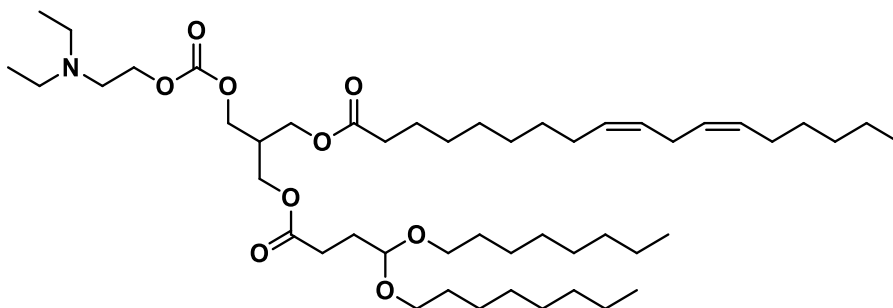
37 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,14 (s, 1H), 5,44 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,18 – 4,06 (m, 6H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,27 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 2,74 (m, 7H), 2,39 (m, 3H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,13 – 2,00 (m, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 2H), 1,78 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 1,57 (m, 6H), 1,40 – 1,22 (m, 35H), 1,14 (t, J = 7,2 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 852 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 8: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(pirrolidin-1-il)propil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



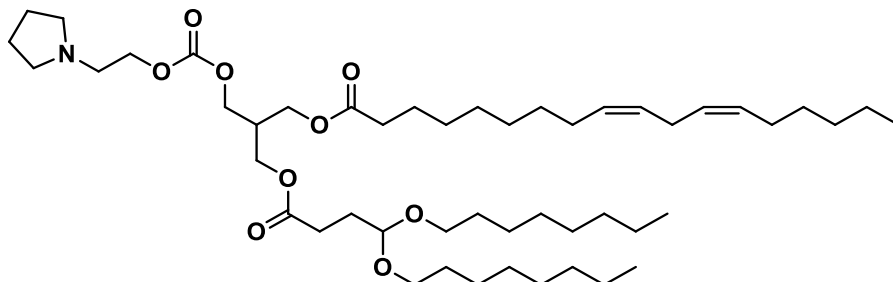
44 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,87 (br m, 1H), 5,43 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,11 (m, 6H), 3,56 (dt, J = 9,2, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,29 (q, J = 6,1 Hz, 2H), 2,95 – 2,68 (m, 8H), 2,44 – 2,26 (m, 5H), 2,05 (m, 4H), 1,98 – 1,81 (m, 8H), 1,58 (m, 7H), 1,41 – 1,18 (m, 33H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 850 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 9: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(dietilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



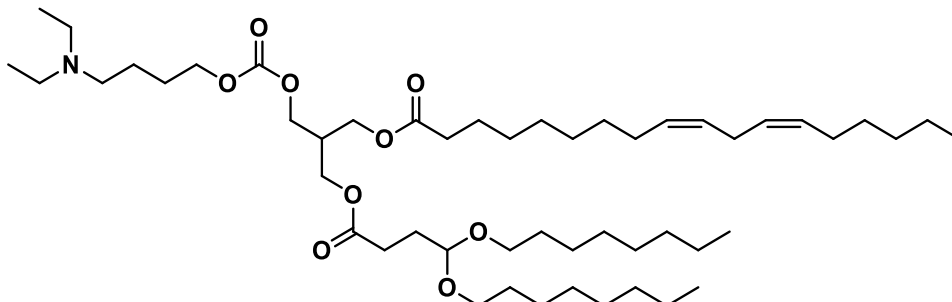
84 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,28 – 4,06 (m, 8H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,79 – 2,60 (m, 8H), 2,46 – 2,35 (m, 3H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,05 (q, J = 6,8 Hz, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,4 Hz, 2H), 1,58 (m, 9H), 1,42 – 1,17 (m, 31H), 1,05 (br m, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 839 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 10: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(pirrolidin-1-il)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



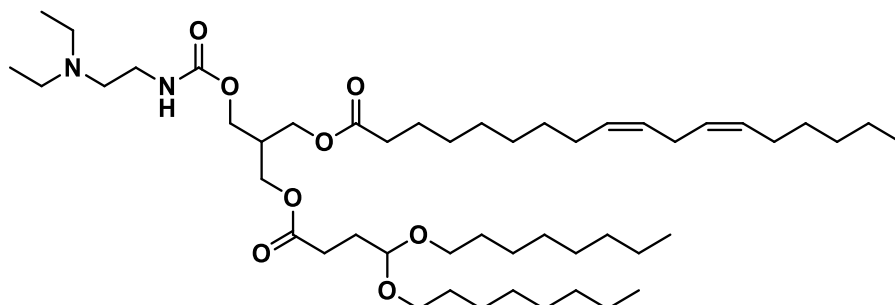
74 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,27 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 4,23 – 4,08 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (m, 4H), 2,59 (br s, 4H), 2,47 – 2,35 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,86 – 1,74 (br m, 4H), 1,58 (m, 7H), 1,41 – 1,16 (m, 33H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 837 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 11: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((4-(dietilamino)butoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



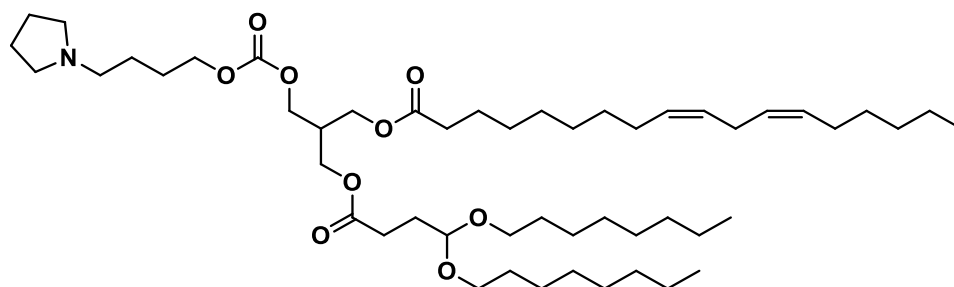
74 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,2, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,65 – 2,35 (m, 8H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,74 – 1,52 (m, 12H), 1,42 – 1,18 (m, 33H), 1,03 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 867 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 12: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



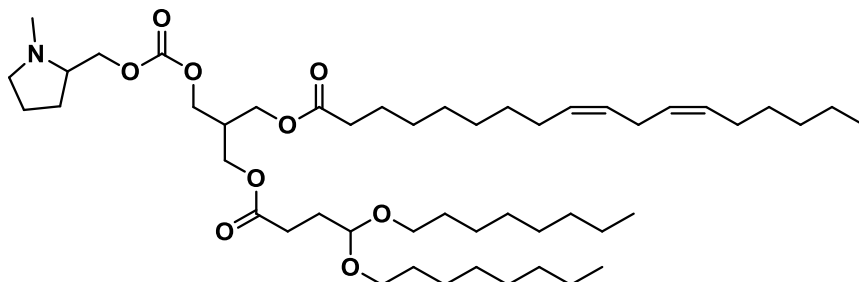
72 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,25 (br m, 2H), 2,77 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,57 (s, 5H), 2,44 – 2,26 (m, 5H), 2,05 (q, J = 6,8 Hz, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 2H), 1,58 (m, 9H), 1,41 – 1,18 (m, 32H), 1,05 (br m, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 838 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 13: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((4-(pirrolidin-1-il)butoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



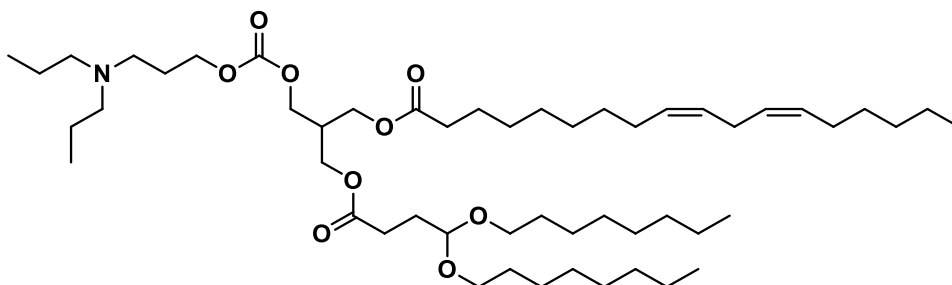
58 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,22 – 4,11 (m, 8H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,60 – 2,38 (m, 8H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,05 (q, J = 6,8 Hz, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,4 Hz, 2H), 1,86 – 1,77 (br m, 4H), 1,77 – 1,52 (m, 13H), 1,41-1,24 (m, 32H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 865 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 14: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpirrolidin-2-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



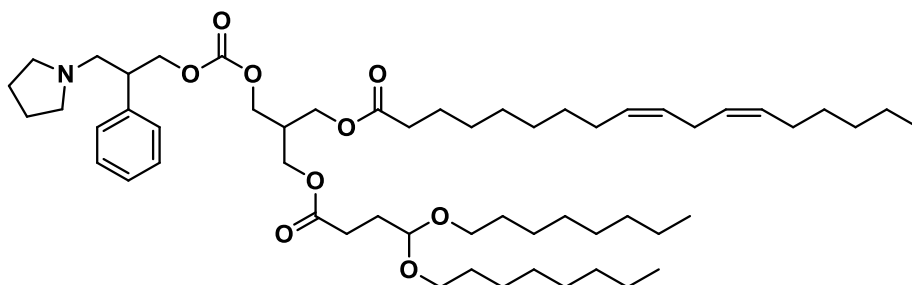
60 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,21 – 4,05 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,11 (br m, 1H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,50 – 2,35 (m, 6H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H), 2,07-1,52 (m, 19H), 1,30 (m, 32H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 837 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 15: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dipropilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



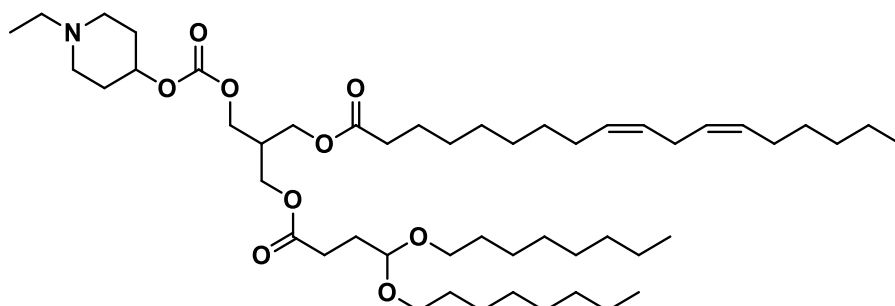
79 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,07 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,55 – 2,28 (m, 11H), 2,10 – 2,00 (m, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,81 (br m, 2H), 1,62 – 1,24 (m, 44H), 0,88 (m, 15H) ppm; MS: 881 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 16: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-fenil-3-(pirrolidin-1-il)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



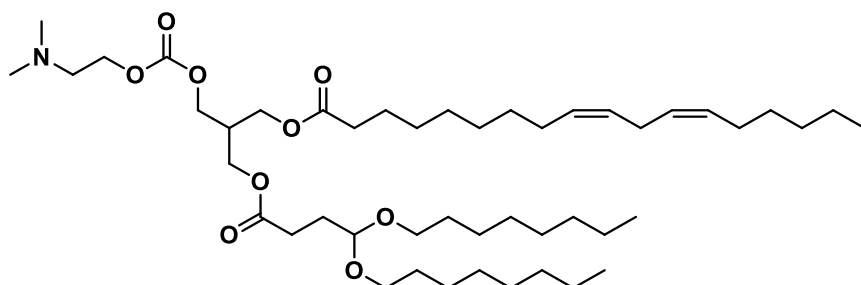
58 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,36 – 7,17 (m, 5H), 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,53 – 4,43 (m, 2H), 4,33 (dd, $J = 10,7, 7,6$ Hz, 1H), 4,11 (m, 6H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,24 (br m, 1H), 2,92 (br m, 1H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,61 – 2,33 (m, 7H), 2,28 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,91 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,74 (br m, 4H), 1,66 – 1,51 (m, 8H), 1,41 – 1,24 (m, 33H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 927 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 17: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpiperidin-4-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



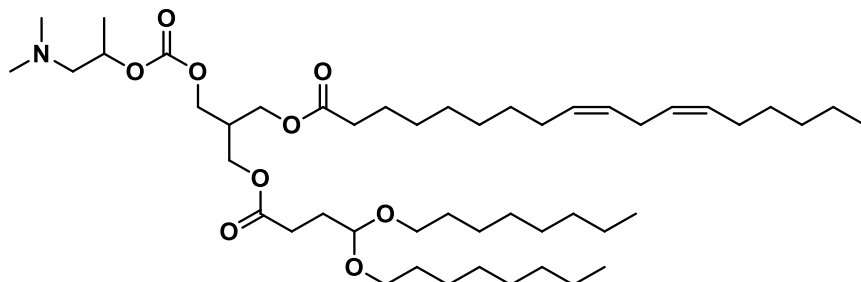
40 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,66 (br s, 1H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,11 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (m, 4H), 2,50 – 2,24 (m, 8H), 2,05 (m, 6H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,87 – 1,74 (m, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,41 – 1,24 (m, 31H), 1,11 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 851m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 18: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



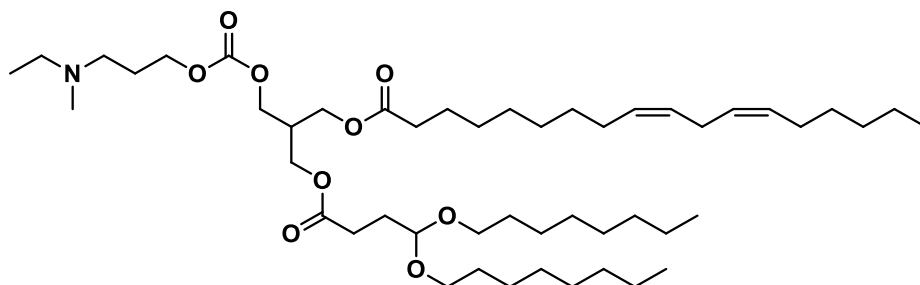
52 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,29 – 4,18 (m, 4H), 4,18 – 4,08 (m, 4H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,64 (br t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 2,40 (m, 3H), 2,31 (m, 7H), 2,04 (dd, $J = 8,8, 5,0$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,56 (m, 10H), 1,30 (m, 31H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 811 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 19: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-(dimetilamino)propan-2-il)oxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



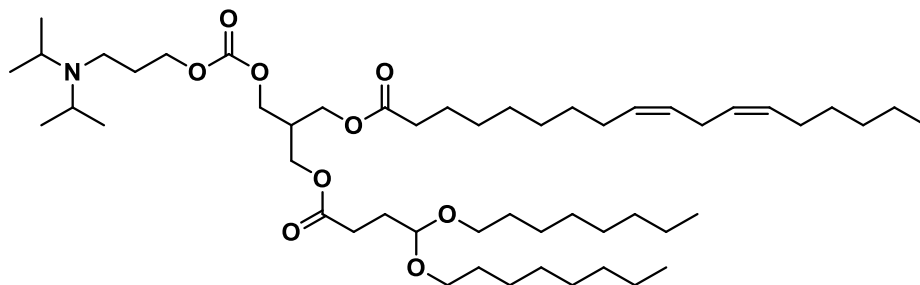
63 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,26 (m, 4H), 4,88 (m, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,16 (m, 7H), 3,56 (dt, $J = 9,2, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,57 (dd, $J = 13,0, 7,7$ Hz, 1H), 2,49 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (m, 8H), 2,09 – 1,99 (m, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,69-1,53 (m, 10H), 1,30 (m, 33H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 825 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 20: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(etil(metil)amino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



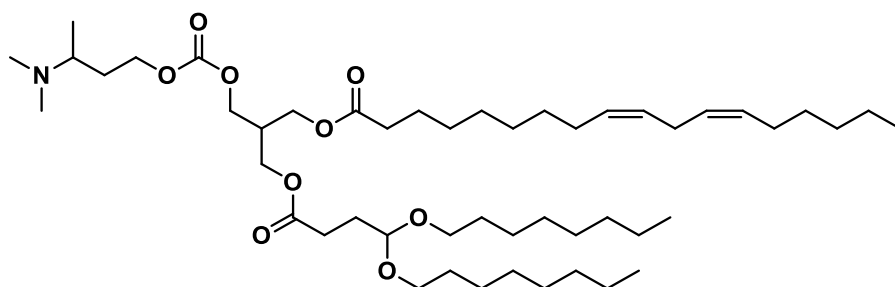
30 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,24 – 4,09 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,57 – 2,38 (m, 6H), 2,32 – 2,20 (m, 5H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,95 – 1,82 (m, 4H), 1,58 (m, 7H), 1,42 – 1,25 (m, 34H), 1,09 (br m, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 839 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 21: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(diisopropilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



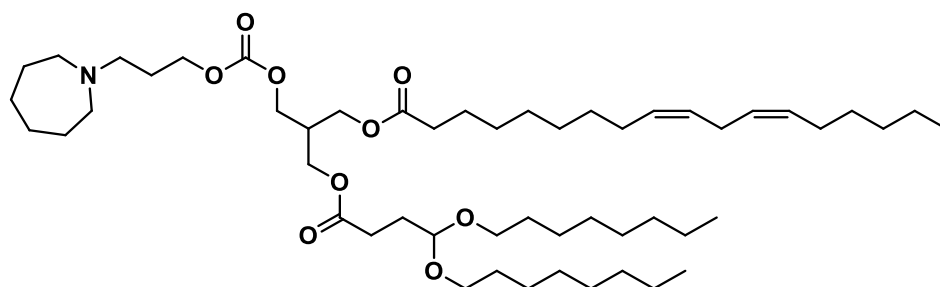
31 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,98 (m, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,50 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 2,47 – 2,35 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,74 (m, 2H), 1,63 – 1,51 (m, 10H), 1,42 – 1,24 (m, 36H), 0,98 (d, $J = 6,6$ Hz, 9H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 881 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 22: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dimetilamino)butoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



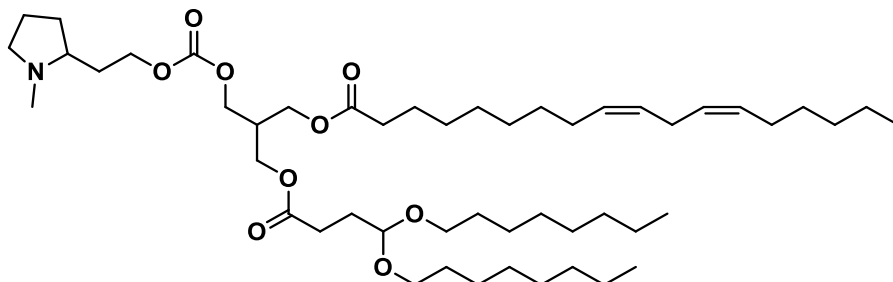
35 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,29 – 4,21 (m, 1H), 4,27 – 4,10 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H), 2,46 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (m, 7H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 3H), 1,60 (m, 8H), 1,42 – 1,25 (m, 33H), 1,02 (br s, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 839 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 23: 3-(((3-(azepan-1-il)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



59 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,35 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,24 – 4,09 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,4, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,64 (br m, 6H), 2,47 – 2,35 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,04 (dd, $J = 7,9, 5,9$ Hz, 4H), 1,95 – 1,81 (m, 4H), 1,70 – 1,52 (m, 14H), 1,41 – 1,23 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 879 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

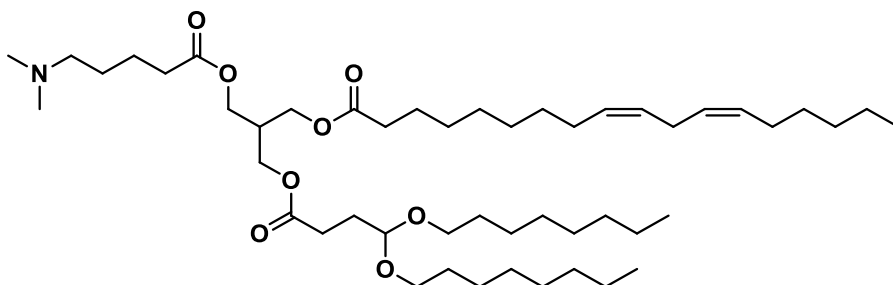
Ejemplo 24: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(1-metilpirrolidin-2-il)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



56 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,35 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,29 – 4,07 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,13 (br s, 1H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,45 – 1,50 (m, 28H) 1,29 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 851 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis del ejemplo 25

Ejemplo 25: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(1-metilpirrolidin-2-il)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato

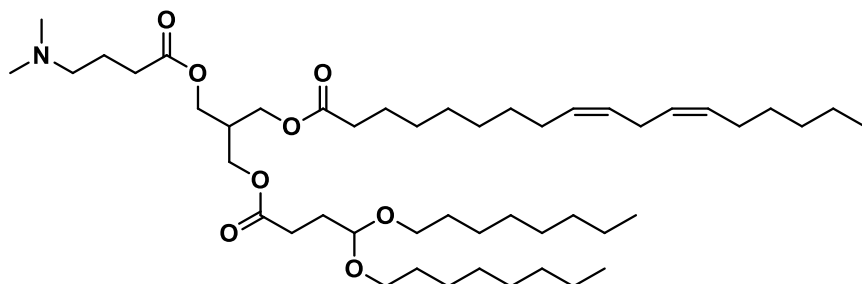


A una solución de Intermedio 1d (300 mg, 0,43 mmol, 1 equiv), ácido 5-(dimetilamino)pentanoico (1-3 equiv), DIPEA (1,4-3 equiv) y DMAP (0,1-0,2 equiv) en DCM (0,10-0,15 M) se añadió EDC·HCl (1,4-1,5 equiv.) a ta. Tras agitar durante al menos 2 h a ta, la mezcla de reacción se diluyó con agua y la capa orgánica se separó y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en hexanos o MeOH en DCM) para proporcionar 159 mg (0,19 mmol, 44 % de rendimiento) del producto deseado. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,35 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,70 (br m, 2H), 2,56 (br s, 6H), 2,39 (m, 5H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,04 (m, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,81 – 1,52 (m, 10H), 1,41 – 1,24 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 823,42 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis de los ejemplos 26-32

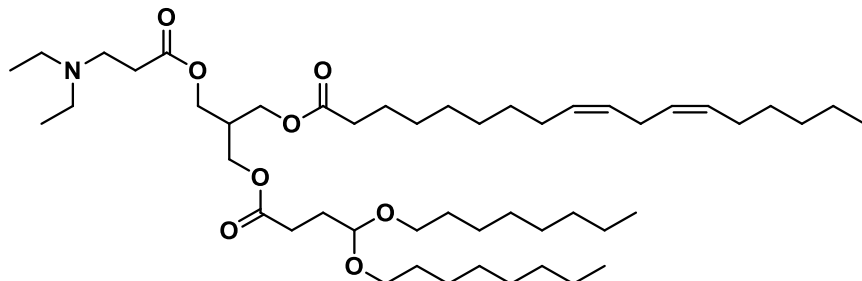
Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 1d y un reactivo de ácido carboxílico usando el método empleado para el Ejemplo 25.

Ejemplo 26: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



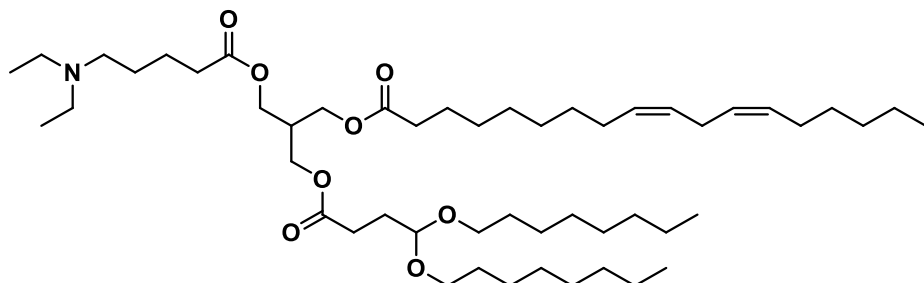
39 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,13 (m, J = 6,0, 2,2 Hz, 6H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,44 – 2,28 (m, 9H), 2,21 (s, 6H), 2,10 – 2,00 (m, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 2H), 1,78 (m, J = 7,4 Hz, 2H), 1,58 (m, 6H), 1,42 – 1,22 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 809,47 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 27: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



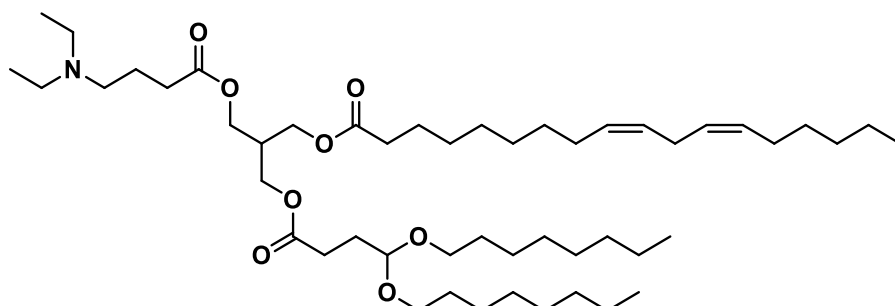
78 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,77 (m, 4H), 2,56 – 2,34 (m, 9H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,10 – 2,00 (m, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 2H), 1,58 (m, 6H), 1,42 – 1,22 (m, 34H), 1,01 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 823,42 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 28: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((5-(dietilamino)pentanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



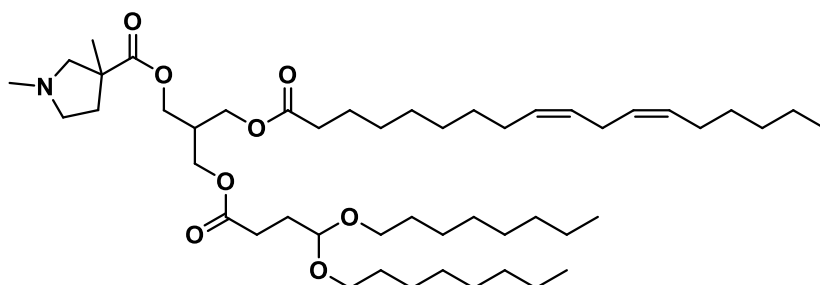
77 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (q, $J = 7,2$ Hz, 4H), 2,45 – 2,27 (m, 9H), 2,04 (dd, $J = 7,8, 6,2$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,64 – 1,44 (m, 11H), 1,31 (m, 33H), 1,01 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm. MS: 851,86 m/z [M+H].

Ejemplo 29: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((4-(dietilamino)butanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



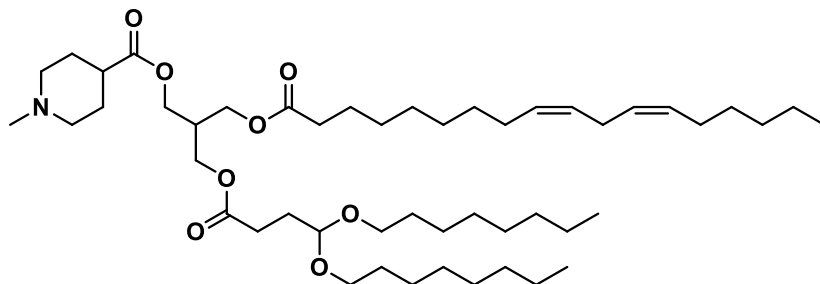
53 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (m, 5H), 2,45 – 2,29 (m, 10H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,66 – 1,52 (m, 7H), 1,40 – 1,23 (m, 30H), 1,00 (m, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 837,01 m/z [M+H].

Ejemplo 30: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil 1,3-dimetilpirrolidina-3-carboxilato



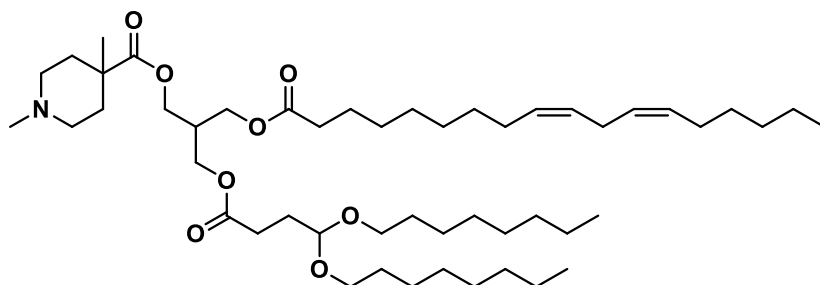
45 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,18 – 4,11 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,93 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,64 – 2,52 (m, 2H), 2,47 – 2,27 (m, 11H), 2,05 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,71 – 1,52 (m, 9H), 1,40 – 1,24 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 821,30 m/z [M+H].

Ejemplo 31: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil 1-metilpiperidina-4-carboxilato



87 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,16 – 4,09 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,78 (m, 4H), 2,43 – 2,34 (m, 3H), 2,34 – 2,22 (m, 6H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 2,00 – 1,87 (m, 6H), 1,76 (m, 2H), 1,65 – 1,52 (m, 7H), 1,42 – 1,19 (m, 33H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 821,80 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 32: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil 1,4-dimetilpiperidina-4-carboxilato

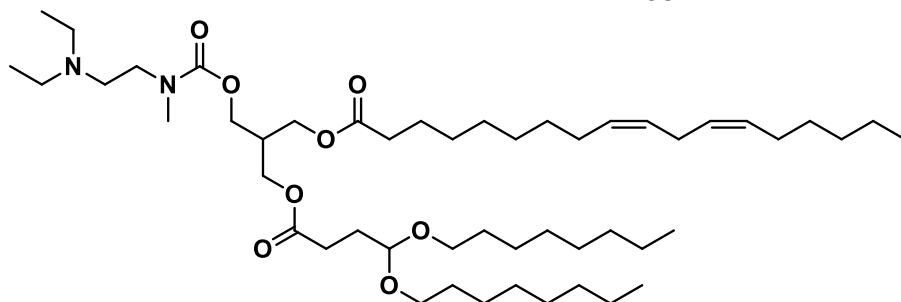


39 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,17 – 4,09 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,58 (m, 2H), 2,41 (m, 3H), 2,31 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,15 – 2,01 (m, 8H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,3$ Hz, 2H), 1,63 – 1,48 (m, 9H), 1,42 – 1,24 (m, 33H), 1,19 (s, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 835,79 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis de los ejemplos 33-36

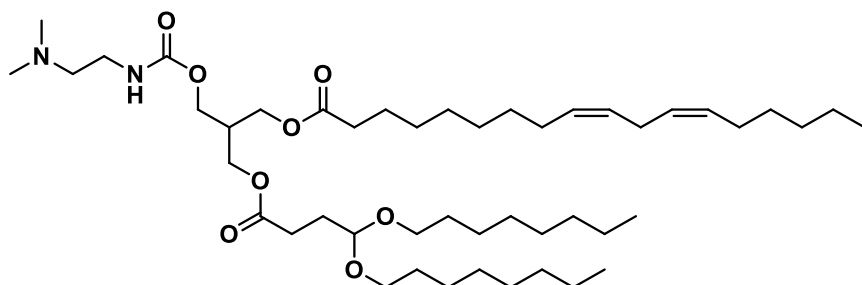
Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 1d y un reactivo aminoalcohol o diamina usando el método empleado para el Ejemplo 1.

Ejemplo 33: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(dietilamino)etil)(metil)-carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



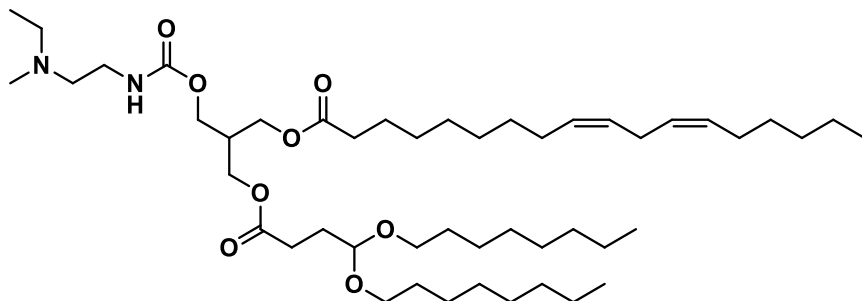
62 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,30 (m, 2H), 2,94 (s, 1,5H), 2,91 (s, 1,5H), 2,77 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,54 (m, 6H), 2,39 (m, 3H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,04 (m, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 2H), 1,64 – 1,54 (m, 7H), 1,39 – 1,22 (m, 33H), 1,01 (m, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 852,80 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 34: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(dimetilamino)etil)-carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



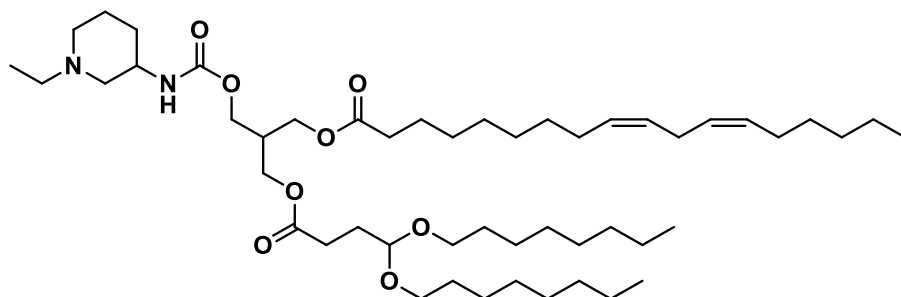
44 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 5,20 (br t, J = 5,1 Hz, 1H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,24 (m, 2H), 2,77 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,43 – 2,34 (m, 5H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,22 (s, 6H), 2,05 (q, J = 6,9 Hz, 5H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,4 Hz, 2H), 1,63 – 1,52 (m, 7H), 1,40 – 1,24 (m, 32H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 810,73 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 35: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(etil(metil)amino)etil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



53 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 5,20 (t, $J = 5,1$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,24 (m, 2H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,48 – 2,33 (m, 7H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,20 (s, 3H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,7, 5,5$ Hz, 2H), 1,62 – 1,52 (m, 7H), 1,35 – 1,23 (m, 33H), 1,04 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 824,77 m/z [$\text{M}+\text{H}$].

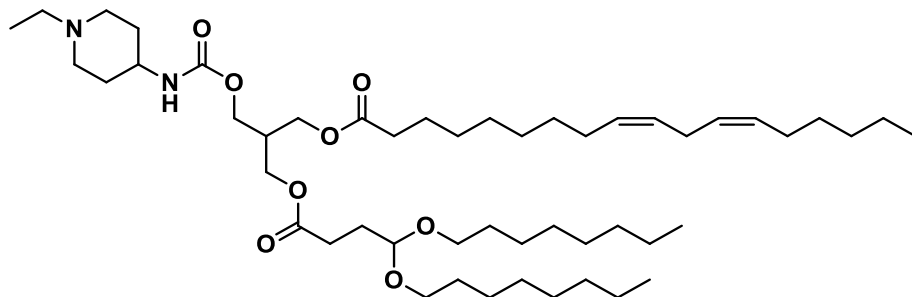
Ejemplo 36: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-3-il)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



46 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 5,20 (br s, 1H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 3,78 (br s, 1H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,50 – 2,19 (m, 8H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,73 – 1,52 (m, 14H), 1,41 – 1,23 (m, 33H), 1,04 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 850,48 m/z [$\text{M}+\text{H}$].

Síntesis del ejemplo 37

Ejemplo 37: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilpiperidin-4-il)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



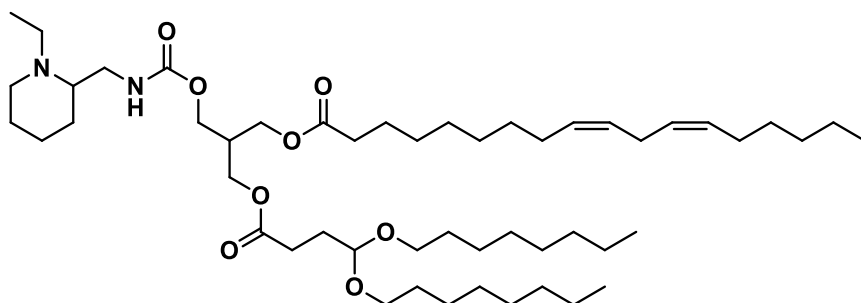
A una solución del intermedio 1d (400 mg, 0,57 mmol) en acetonitrilo (6 mL) se añadió piridina (93 μL , 1,15 mmol), DMAP (14 mg, 0,08 equiv.) y clorofornato de 4-nitrofenilo (173 mg, 0,86 mmol) secuencialmente a ta. Tras agitar durante 2 h, se añadió diclorhidrato de 1-etilpiperidin-4-amina (344 mg, 1,72 mmol) y DIPEA (800 μL , 4,60 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 4 h más a ta. La mezcla de reacción se extrajo en hexanos y se lavó con agua. De ser necesario, la

capa de agua resultante se volvió a extraer con hexanos. Las capas de hexanos combinadas se secaron en MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en hexanos o metanol en DCM) para proporcionar 157 mg (0,18 mmol, 32 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 4,59 (br d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 3,59 – 3,49 (m, 3H), 3,40 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 2,85 (br d, $J = 11,1$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,45 – 2,35 (m, 5H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 7,2$ Hz, 6H), 1,99 – 1,87 (m, 4H), 1,65 – 1,21 (m, 43H), 1,07 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 850,34 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis de los ejemplos 38-49

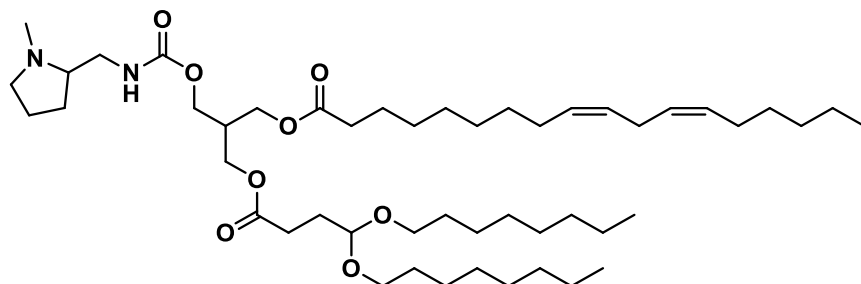
Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 1d y un reactivo de diamina usando el método empleado para el Ejemplo 1.

Ejemplo 38: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpiperidin-2-il)metil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



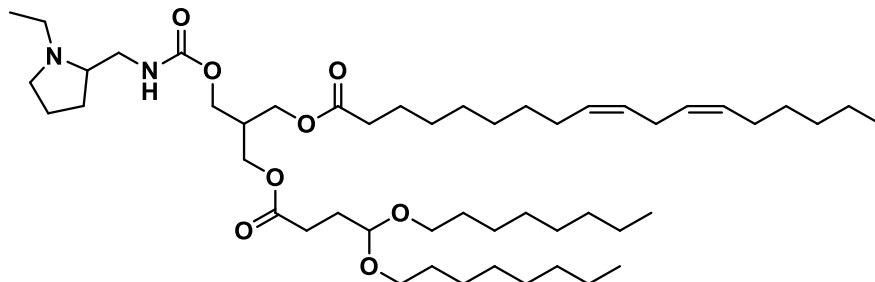
30 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,41 – 5,27 (m, 4H), 5,14 (br s, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,16 – 4,09 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 3,45 – 3,23 (m, 4H), 2,89 (m, 1H), 2,77 (m, 3H), 2,49 – 2,26 (m, 7H), 2,19 (m, 1H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,5$, 5,5 Hz, 2H), 1,73 – 1,25 (m, 46H), 1,02 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), 0,93 – 0,84 (m, 9H) ppm; MS: 864,39 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 39: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpirrolidin-2-il)metil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



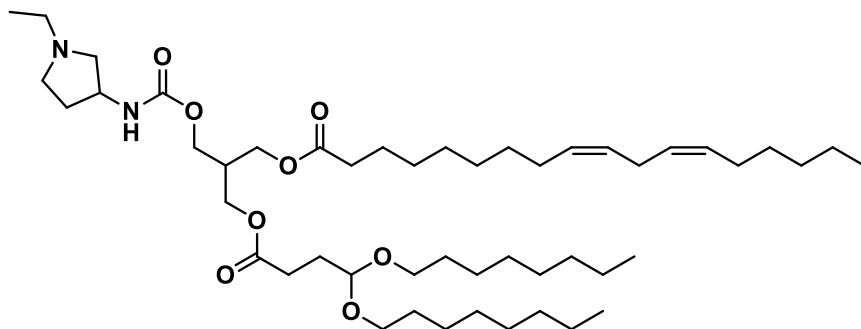
18 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 5,13 (s, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (m, 3H), 3,20 – 2,98 (m, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,41 – 2,17 (m, 10H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,98 – 1,78 (m, 3H), 1,72 – 1,52 (m, 11H), 1,41 – 1,24 (m, 32H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 836,27 m/z [M+H].

Ejemplo 40: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpirrolidin-2-il)metil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



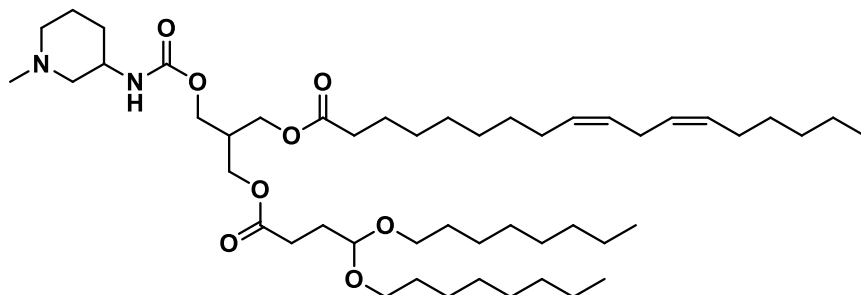
13 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,27 (m, 4H), 5,15 (br d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,43 – 3,31 (m, 3H), 3,19 – 3,05 (m, 2H), 2,78 (m, 3H), 2,50 (br m, 1H), 2,39 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,26 – 2,08 (m, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,97 – 1,79 (m, 3H), 1,76 – 1,51 (m, 11H), 1,40 – 1,22 (m, 32H), 1,09 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 850,20 m/z [M+H].

Ejemplo 41: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpirrolidin-3-il)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



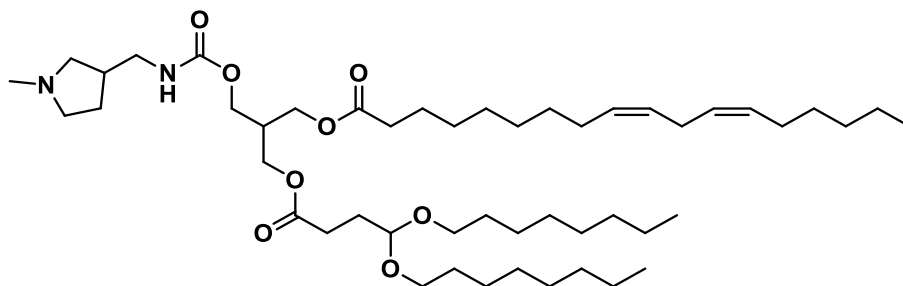
34 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 5,01 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,20 – 4,02 (m, 7H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,86 – 2,73 (m, 3H), 2,62 – 2,19 (m, 11H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,66 – 1,51 (m, 9H), 1,44 – 1,21 (m, 32H), 1,10 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 836,33 m/z [M+H].

Ejemplo 42: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpiperidin-3-il)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



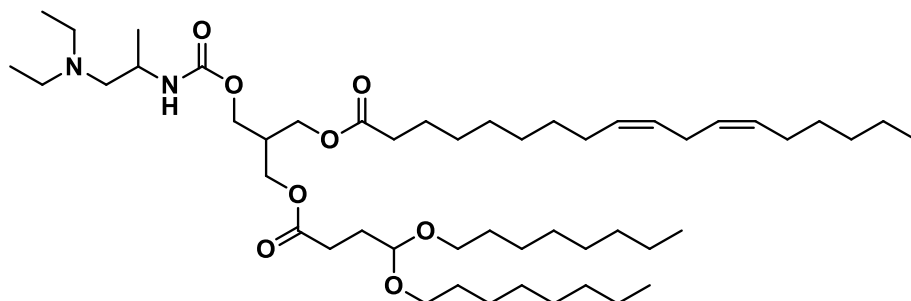
57 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 5,18 (br m, 1H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,13 (m, 6H), 3,78 (br m, 1H), 3,56 (dt, J = 9,2, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,2, 6,7 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,47 – 2,13 (m, 11H), 2,05 (q, J = 6,9 Hz, 4H), 1,92 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 3H), 1,71 – 1,52 (m, 11H), 1,41 – 1,24 (m, 33H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 836,51 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 43: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpirrolidin-3-il)metil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



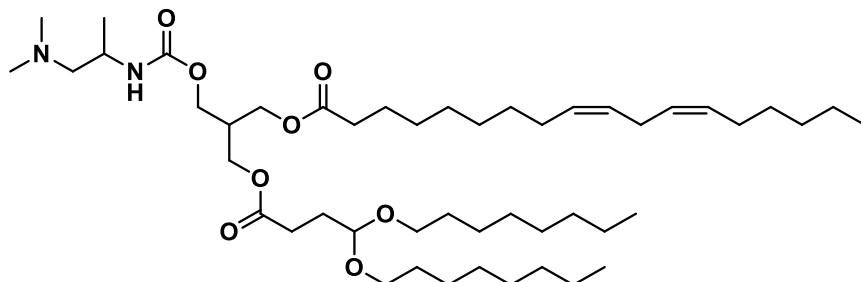
30 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,30 (m, 4H), 5,19 (t, J = 5,1 Hz, 1H), 4,51 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,18 – 4,11 (m, 6H), 3,58 (dt, J = 9,2, 6,7 Hz, 2H), 3,42 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,19 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 2,84 – 2,79 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,64 (m, 1H), 2,56 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 2,44 – 2,31 (m, 11H), 2,10 – 1,92 (m, 7H), 1,71 – 1,46 (m, 9H), 1,44 – 1,19 (m, 33H), 0,91 (m, 9H) ppm; MS: 836,31 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 44: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-(dietilamino)propan-2-il)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



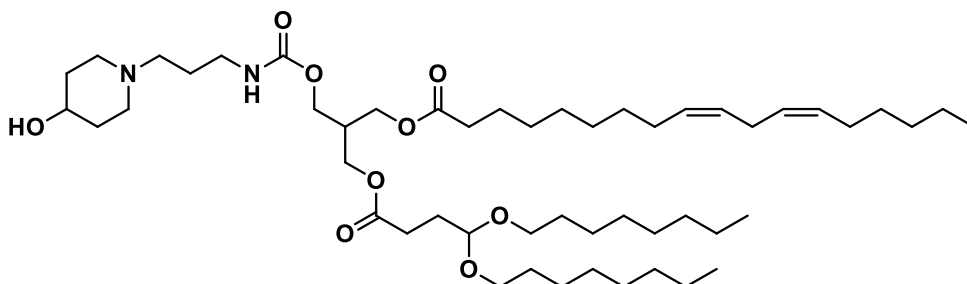
78 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,27 (m, 4H), 5,07 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,12 (m, 6H), 3,67 – 3,51 (m, 3H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,61 – 2,26 (m, 10H), 2,04 (dd, $J = 7,8, 5,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,68 – 1,50 (m, 7H), 1,41 – 1,24 (m, 34H), 1,17 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), 0,99 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 852,59 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 45: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-(dimetilamino)propan-2-il)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



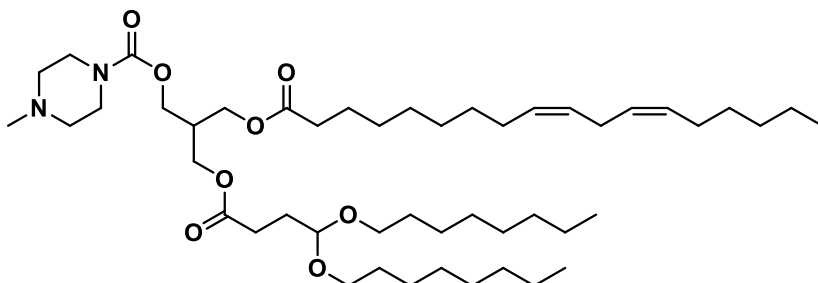
68 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,27 (m, 4H), 5,02 (br m, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,18 – 4,07 (m, 6H), 3,66 (m, 1H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,42 – 2,27 (m, 6H), 2,22 (s, 6H), 2,14 (dd, $J = 12,4, 5,5$ Hz, 1H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,65 – 1,50 (m, 8H), 1,41 – 1,25 (m, 32H), 1,18 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 824,28 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 46: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(4-hidroxipiperidin-1-il)propil)-carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



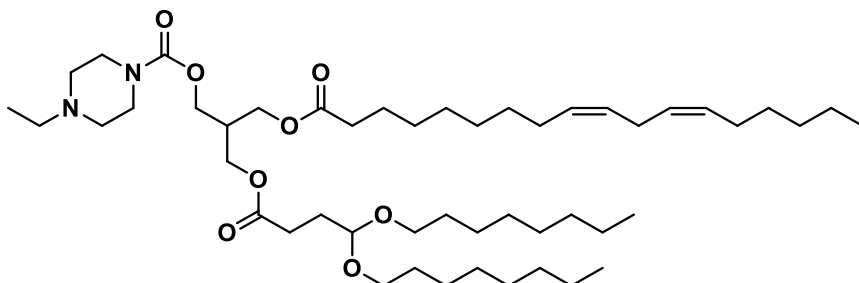
26 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 6,72 (br s, 1H), 5,42 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,05 (m, 6H), 3,62 (br s, 1H) 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,27 (q, $J = 5,7$ Hz, 2H), 2,83 (d, $J = 11,2$ Hz, 2H), 2,77 (m, 2H), 2,49 – 2,26 (m, 7H), 2,09 – 2,02 (m, 6H), 1,93 (m, 4H), 1,68 – 1,52 (m, 11H), 1,41 – 1,24 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 880,46 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 47: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil 4-metilpiperazina-1-carboxilato



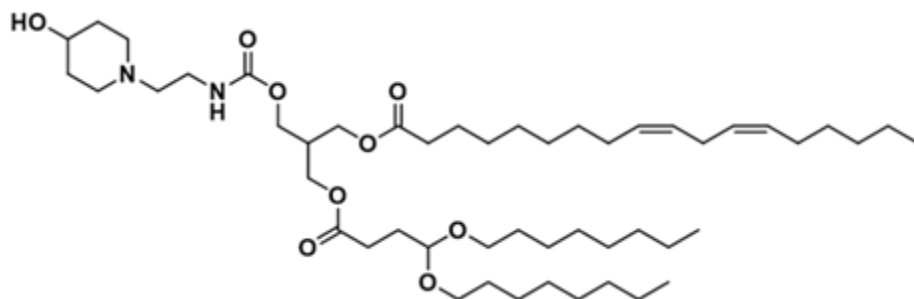
61 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,18 – 4,09 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,47 (br s, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,81 – 2,73 (m, 2H), 2,45 – 2,26 (m, 11H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,65 – 1,49 (m, 7H), 1,41 – 1,21 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 822,25 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 48: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil 4-etilpiperazina-1-carboxilato



66 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,19 – 4,09 (m, 6H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,48 (br s, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,81 – 2,73 (m, 2H), 2,47 – 2,35 (m, 8H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,65 – 1,52 (m, 7H), 1,41 – 1,24 (m, 34H), 1,09 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 836,30 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

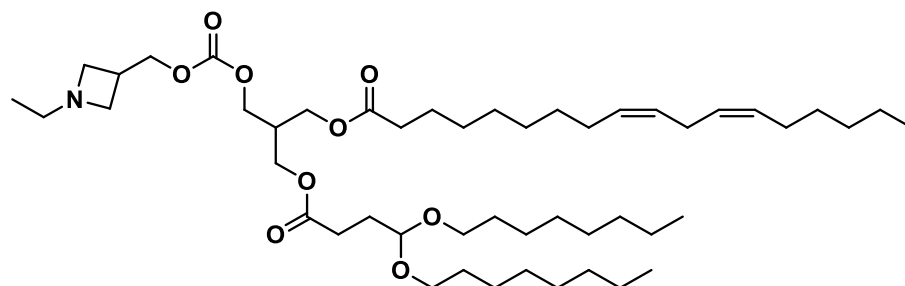
Ejemplo 49: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(4-hidroxipiperidin-1-il)etil)-carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



58 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 3H), 5,18 (s, 1H), 4,48 (t, 1H), 4,17 – 4,09 (m, 6H), 3,76 – 3,65 (m, 1H), 3,56 (d, 2H), 3,40 (dt, 2H), 3,30 – 3,21 (m, 2H), 2,81 – 2,66 (m, 4H), 2,53 – 2,34 (m, 6H), 2,30 (t, 2H), 2,21 – 2,10 (m, 2H), 2,05 (q, 4H), 1,97 – 1,85 (m, 5H), 1,67 – 1,51 (m, 10H), 1,40 – 1,25 (m, 35H), 0,94 – 0,84 (m, 9H); MS: 866,41m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis del ejemplo 50

Ejemplo 50: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-etilazetidín-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



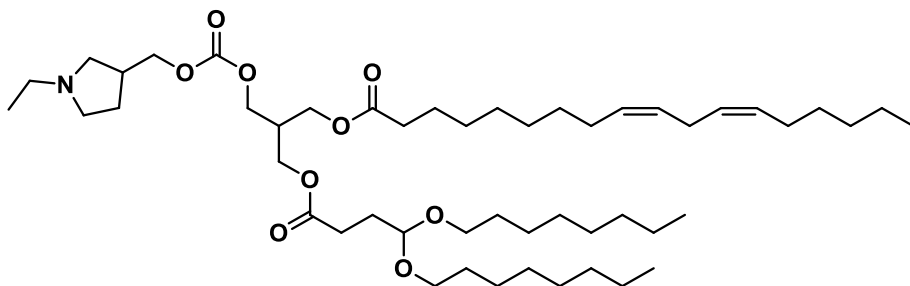
A una solución del intermedio 1d (300 mg, 0,43 mmol) en acetonitrilo (6 mL) se añadió piridina (69 μL , 86 mmol), DMAP (11 mg, 0,086 mmol) y clorofornato de 4-nitrofenilo (134 mg, 0,65 mmol) secuencialmente a ta. Tras agitar durante 2 h, se añadió clorhidrato de (1-etilazetidín-3-il) (194 mg, 1,29 mmol) y Et_3N (359 μL , 2,58 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 4 h más a ta. La mezcla de reacción se extrajo en hexanos y se lavó con agua. De ser necesario, la capa de agua resultante se volvió a extraer con hexanos. Las capas de hexanos combinadas se secaron en MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando

cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en hexanos) para proporcionar 181 mg (0,22 mmol, 50 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,35 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,27 – 4,14 (m, 8H), 3,66 – 3,36 (m, 4H), 2,94 (br s, 1H), 2,78 (m, 3H), 2,42 (m, 5H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,62 – 1,52 (m, 8H), 1,31 (m, 35H), 0,95 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,89 (m, 9H) ppm; MS: 837,30 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis de los ejemplos 51-53

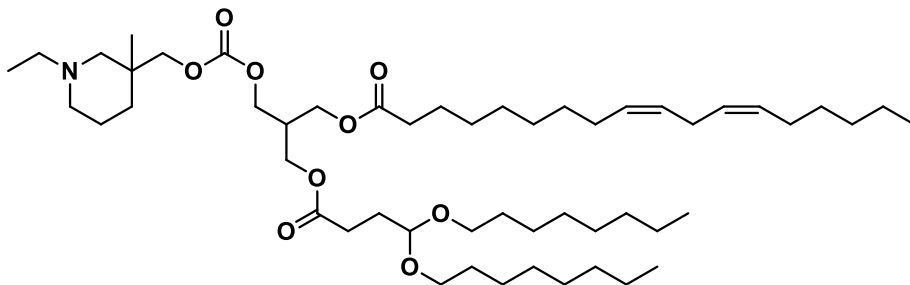
Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 1d y un reactivo aminoalcohol usando el método empleado para el Ejemplo 1.

Ejemplo 51: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpirrolidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



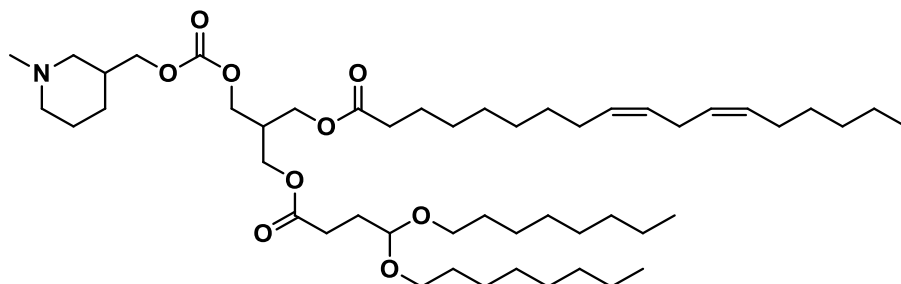
57 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,29 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,09 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,6$ Hz, 2H), 2,96 – 2,49 (m, 7H), 2,45 – 2,36 (m, 4H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,20 – 2,29 (m, 5H), 1,91 (td, $J = 7,6, 5,3$ Hz, 2H), 1,75 – 1,52 (m, 8H), 1,40 – 1,16 (m, 37H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 851,48 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 52: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etil-3-metilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



66 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,12 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,46 – 2,37 (m, 3H), 2,31 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,21 (br s, 6H), 2,05 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,57 (m, 10H), 1,45 – 1,17 (m, 40H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 865,58 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

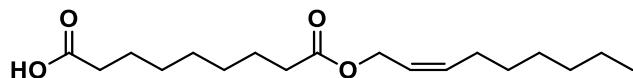
Ejemplo 53: 3-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-metilpiperidin-3-il)metoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



42 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,45 – 5,24 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,24 – 3,93 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,2, 6,7$ Hz, 2H), 3,09 (br m, 2H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H), 2,70 – 2,16 (m, 7H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,87 – 1,71 (m, 3H), 1,57 (m, 10H), 1,42 – 1,00 (m, 36H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 850,77 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

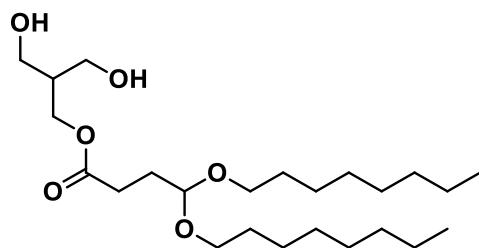
Síntesis del ejemplo 54

Intermedio 54a: ácido (Z)-9-(non-2-en-1-iloxi)-9-oxononanoico



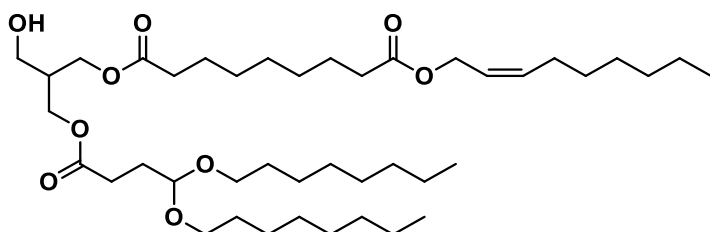
A una solución de ácido nonanodioico (25 g, 132 mmol, 1 equiv.) en THF (0,4-0,5 M) se le añadió cloruro de oxalilo (1,1-1,5 equiv.) a 15-25 °C. Tras agitar durante al menos 10 min, se añadió DMF (0,01-0,1 equiv.), seguido de al menos 10 min de agitación adicional. Luego, se añadió por goteo (Z)-non-2-en-1-ol (24,3 g, 171 mmol, 1,3 equiv.) y la mezcla resultante se agitó al menos 30 min a 15-25 °C. La mezcla de reacción se concentró y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice para proporcionar 17,3 g (55,4 mmol, 42 % de rendimiento) del producto deseado en forma de aceite. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,65 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 4,62 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,33 (m, 4H), 2,10 (m, 2H), 1,63 (m, 4H), 1,28 (m, 14H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm; MS: 335,27 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

Intermedio 54b: 3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil 4,4-bis(octiloxi)butanoato



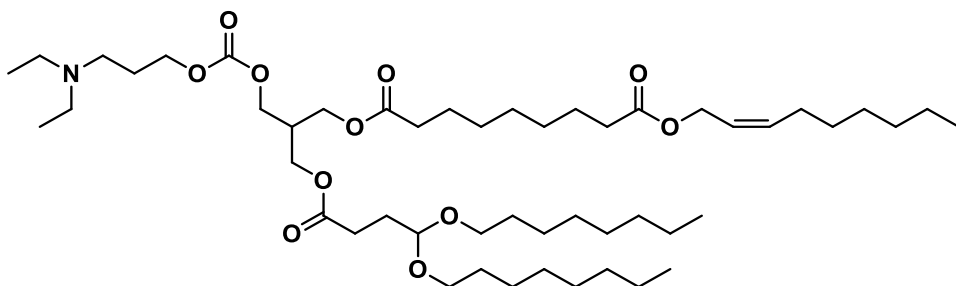
A una solución de Intermedio 1c (16,0 g, 46,4 mmol), DMAP (1,1 g, 9,28 mmol), DIPEA (24,1 mL, 139 mmol) y 2-(hidroximetil) propano-1,3-diol (6,39 g, 60,3 mmol) en DCM (231 mL) se añadió EDC·HCl (10,6 g, 55,6 mmol) a ta. Se agitó la mezcla de reacción a ta durante 18 h, se diluyó con agua, y la capa orgánica se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-100 % de EtOAc en hexanos) para proporcionar 6,7 g (15,4 mmol, 33 % de rendimiento) del producto deseado. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,24 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,75 (m, 4H), 3,55 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,39 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,54 (br s, 2H), 2,41 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,02 (m, 1H), 1,93 (td, J = 7,5, 5,4 Hz, 2H), 1,59 – 1,48 (m, 4H), 1,37 – 1,20 (m, 20H), 0,87 (t, J = 7,0 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 54c: (Z)-1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



A una solución de Intermedio 54a (1-1,2 equiv.), DMAP (0,15 equiv.), DIPEA (1,6-3,0 equiv.) e Intermedio 54b (900 mg, 2,08 mmol, 1 equiv.) en DCM (0,2 M) se agregó EDCI·HCl (1,6 equiv.) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante al menos 2 h, se concentró al vacío y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en hexanos) para proporcionar 503 mg (0,69 mmol, 33 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,61 (d, J = 6,7 Hz, 2H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,17 (m, 4H), 3,65 – 3,51 (m, 4H), 3,39 (dt, J = 9,4, 6,7 Hz, 2H), 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,29 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 2,09 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 1,93 (td, J = 7,5, 5,4 Hz, 2H), 1,67 – 1,50 (m, 8H), 1,40 – 1,19 (m, 32H), 0,87 (t, J = 6,7 Hz, 9H) ppm; MS: 749,69 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

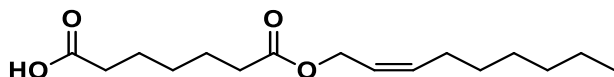
Ejemplo 54: (Z)-1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



El ejemplo 54 se sintetizó con 48 % de rendimiento a partir del Intermedio 54c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,68 – 5,58 (m, 1H), 5,55 – 5,46 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,8, 1,2$ Hz, 2H), 4,47 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,21 – 4,06 (m, 8H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,45 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,09 (m, 2H), 1,91 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,67 – 1,49 (m, 8H), 1,40 – 1,21 (m, 34H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 885,65 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

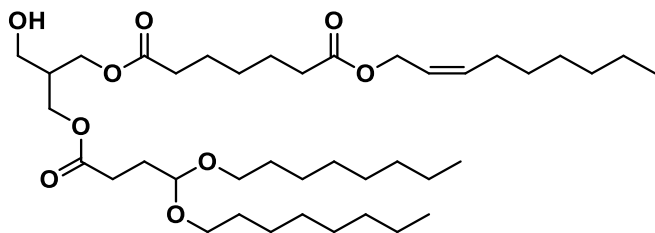
Síntesis del ejemplo 55

Intermedio 55a: ácido (Z)-7-(non-2-en-1-iloxi)-7-oxoheptanoico



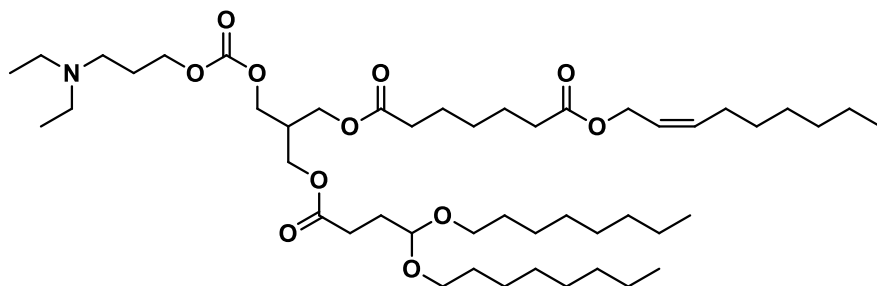
Se sintetizó el intermedio 54a a partir de ácido heptanodioico y (Z)-non-2-en-1-ol con el método empleado para el intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,58 (m, 1H), 5,44 (m, 1H), 4,55 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,26 (m, 4H), 2,03 (m, 2H), 1,59 (m, 4H), 1,30 (m, 10H), 0,81 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 55b: (Z)-1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 7-(non-2-en-1-il) heptanodioato



Se sintetizó el intermedio 55b en 30 % de rendimiento a partir del Intermedio 55a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,62 (dd, $J = 6,8, 1,2$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,07 (m, 4H), 3,67 – 3,51 (m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,32 (td, $J = 7,5, 5,9$ Hz, 4H), 2,19 (m, 1H), 2,09 (m, 2H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,68 – 1,50 (m, 8H), 1,39 – 1,23 (m, 30H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 721,67 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

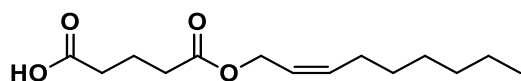
Ejemplo 55: (Z)-1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 7-(non-2-en-1-il) heptanodioato



El ejemplo 55 se sintetizó con 46 % de rendimiento a partir del Intermedio 55b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,69 – 5,59 (m, 1H), 5,55 – 5,47 (m, 1H), 4,62 (dd, J = 6,9, 1,3 Hz, 2H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,20 (m, 4H), 4,13 (m, 4H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,94 – 2,57 (br m, 6H), 2,47 – 2,36 (m, 3H), 2,31 (td, J = 7,5, 2,0 Hz, 4H), 2,19 – 1,89 (m, 6H) 1,70 – 1,49 (m, 9H), 1,41 – 1,08 (m, 35H), 0,88 (m, 9H); MS: 857,57 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

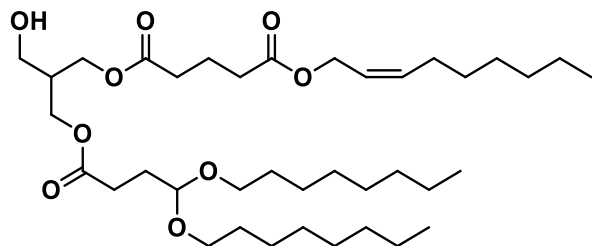
Síntesis del ejemplo 56

Intermedio 56a: ácido (Z)-5-(non-2-en-1-iloxi)-5-oxopentanoico



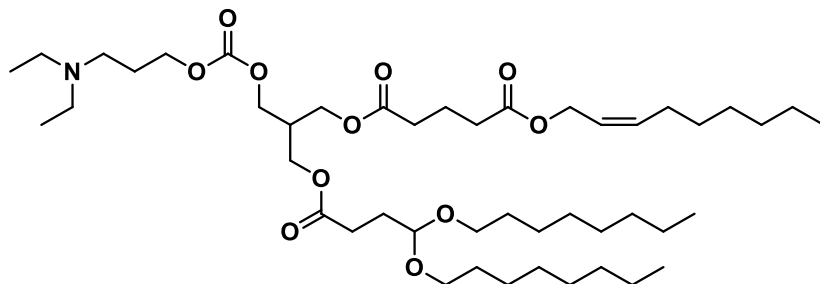
Se sintetizó el Intermedio 56a a partir de ácido pentanodioico y (Z)-non-2-en-1-ol con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,66 (m, 1H), 5,52 (m, 1H), 4,64 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 2,43 (m, 4H), 2,15 (m, 2H), 1,97 (m, 2H), 1,28 (m, 8H), 0,89 (t, J = 6,8 Hz, 3H) ppm.

Intermedio 56b: (Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil non-2-en-1-il glutarato



Se sintetizó el Intermedio 56b 32 % de rendimiento a partir del Intermedio 56a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,65 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,63 (dd, J = 6,9, 1,3 Hz, 2H), 4,49 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,18 (m, 4H), 3,64 (m, 2H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,40 (m, 6H), 2,19 (m, 1H), 2,20 (m, 2H), 1,94 (m, 4H), 1,56 (m, 4H), 1,39 – 1,19 (m, 28H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 693,64 $[\text{M}+\text{Na}]$.

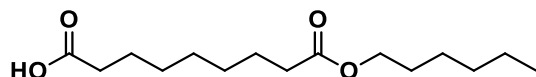
Ejemplo 56: (Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil non-2-en-1-il glutarato



El ejemplo 56 se sintetizó con 66 % de rendimiento a partir del Intermedio 56b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,74 – 5,58 (m, 1H), 5,58 – 5,45 (m, 1H), 4,63 (dd, $J = 6,8, 1,3$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,25 – 4,17 (m, 4H), 4,14 (dd, $J = 6,2, 3,1$ Hz, 4H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,71 (br m, 6H), 2,48 – 2,35 (m, 7H), 2,09 (qd, $J = 7,3, 1,5$ Hz, 3H), 2,04 – 1,87 (m, 5H), 1,66 – 1,52 (m, 5H), 1,42 – 1,30 (m, 30H), 1,15 (br m, 3H), 0,88 (m, 9H); MS: 829,67 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

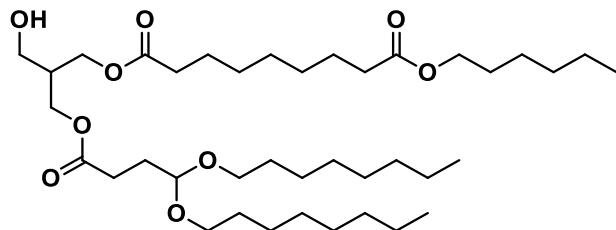
Síntesis del ejemplo 57

Intermedio 57a: Ácido 9-(hexiloxi)-9-oxononanoico



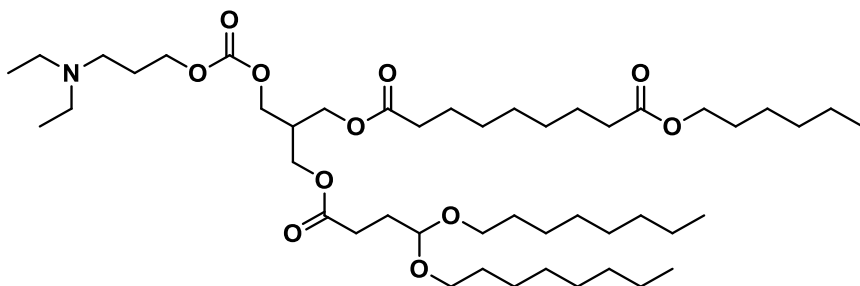
Se sintetizó el intermedio 57a a partir de ácido nonanodioico y hexan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,36 – 2,26 (m, 4H), 1,60 (m, 6H), 1,32 (m, 12H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 57b: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-hexil nonanodioato



Se sintetizó el intermedio 57b en 30 % de rendimiento a partir del Intermedio 57a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,21 – 4,12 (m, 4H), 4,04 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,61 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,29 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,92 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 9H), 1,38 – 1,24 (m, 32H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 709,64 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

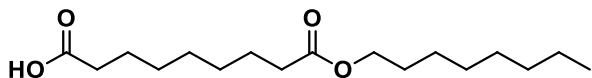
Ejemplo 57: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil)-9-hexil nonanodioato



El ejemplo 57 se sintetizó con 65 % de rendimiento a partir del Intermedio 57b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,47 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,08 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,29 (td, $J = 7,5, 5,9$ Hz, 4H), 1,91 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 10H), 1,39 – 1,21 (m, 32H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 845,63 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

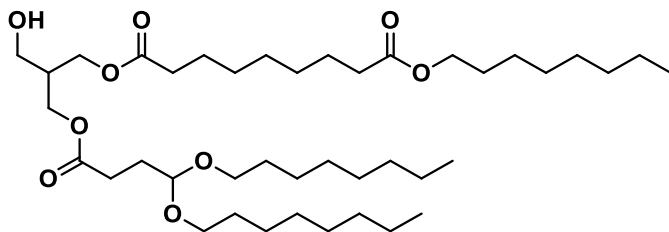
Síntesis del ejemplo 58

Intermedio 58a: Ácido 9-(octiloxi)-9-oxononanoico



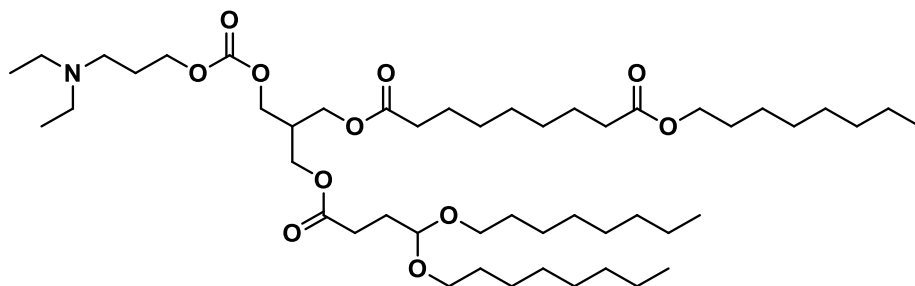
Se sintetizó el intermedio 58a a partir de ácido nonanodioico y octan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 4,05 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,28 (m, 4H), 1,61 (m, 6H), 1,32 (m, 16H), 0,90 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 58b: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil)-9-octil nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 58b en 26 % de rendimiento a partir del Intermedio 58a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,13 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,62 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,4, 6,7$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,34 – 2,24 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 10H), 1,39 – 1,19 (m, 36H), 0,87 (m, 9H) ppm.

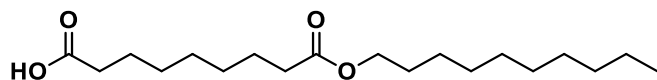
Ejemplo 58: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-octil nonanodioato



El ejemplo 58 se sintetizó a partir del Intermedio 58b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,47 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,29 (td, $J = 7,6, 6,2$ Hz, 4H), 1,91 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,66 – 1,51 (m, 10H), 1,38 – 1,21 (m, 36H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 873,67 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

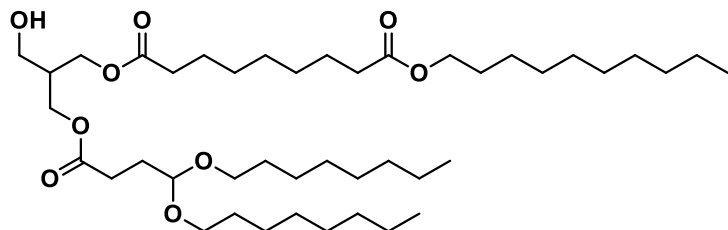
Síntesis del ejemplo 59

Intermedio 59a: Ácido 9-(deciloxi)-9-oxononanoico



Se sintetizó el Intermedio 59a en rendimiento de 39 % a partir de ácido nonanoico y decan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 4,08 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,31 (m, 4H), 1,63 (m, 6H), 1,33 (m, 20H), 0,92 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

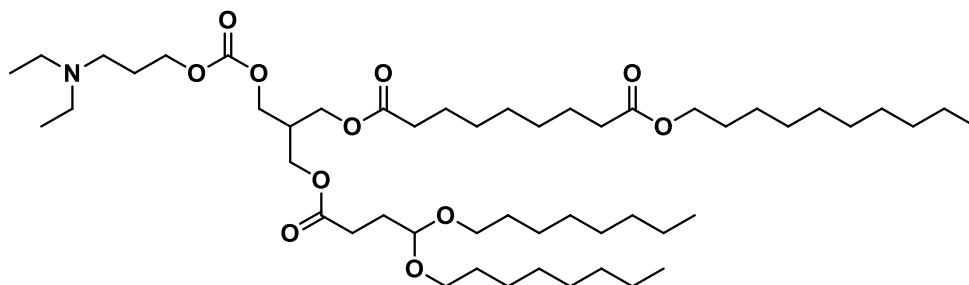
Intermedio 59b: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-decil nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 59b en 43 % de rendimiento a partir del Intermedio 59a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,12 (m, 4H), 4,04 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,61 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,34 – 2,24 (m, 5H), 2,19 (m,

1H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,50 (m, 10H), 1,37 – 1,21 (m, 40H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 765,68 m/z [M+Na].

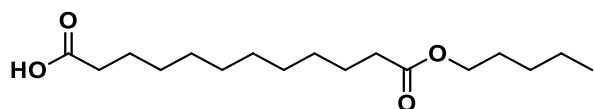
Ejemplo 59: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanodioato



El ejemplo 59 se sintetizó con 65 % de rendimiento a partir del Intermedio 59b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,47 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,21 – 4,09 (m, 8H), 4,04 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,39 (m, 3H), 2,28 (m, 4H), 1,91 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 10H), 1,37 – 1,21 (m, 40H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 901,76 m/z [M+H].

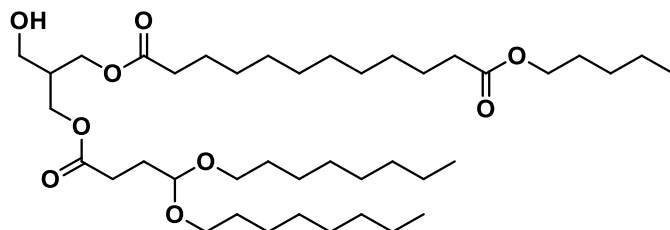
Síntesis del ejemplo 60

Intermedio 60a: Ácido 12-oxo-12-(pentiloxi)dodecanoico



Se sintetizó el Intermedio 60a a partir de ácido dodecanodioico y pentan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,07 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,30 (m, 4H), 1,63 (m, 6H), 1,33 (m, 16H), 0,93 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

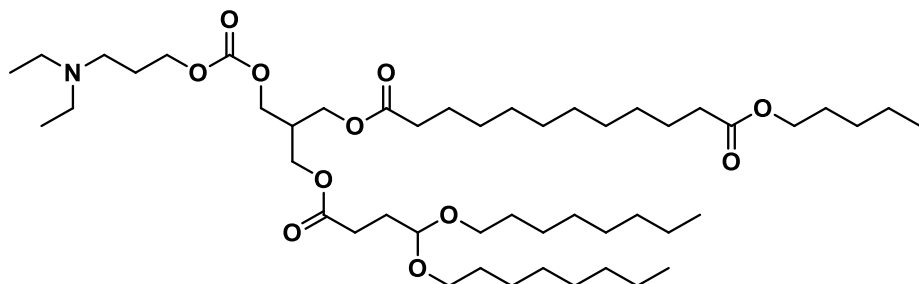
Intermedio 60b: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 12-pentil dodecanodioato



Se sintetizó el Intermedio 60b en 21 % de rendimiento a partir del Intermedio 60a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t,

$J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,11 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,61 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,34 – 2,24 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,65 – 1,50 (m, 10H), 1,29 (m, 36H), 0,89 (m, 9H) ppm; MS: 737,68 m/z [M+Na].

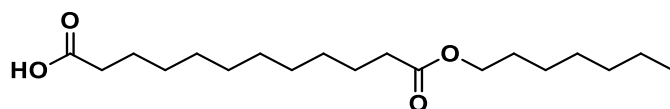
Ejemplo 60: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 12-pentil dodecanodioato



El ejemplo 60 se sintetizó con 65 % de rendimiento a partir del Intermedio 60b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,47 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,24 – 4,09 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,55 (dt, $J = 9,2, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,29 (td, $J = 7,6, 5,8$ Hz, 4H), 1,91 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,80 (dq, $J = 8,7, 6,7$ Hz, 2H), 1,68 – 1,49 (m, 10H), 1,38 – 1,24 (m, 36H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,89 (m, 9H) ppm; MS: 873,67 m/z [M+H].

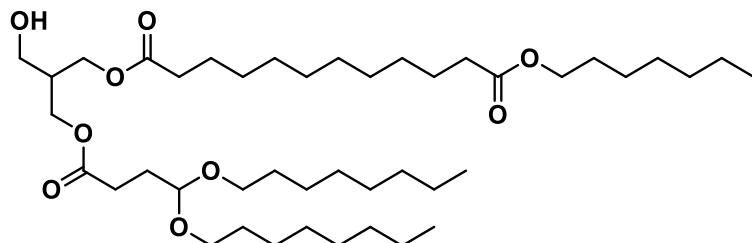
Síntesis del ejemplo 61

Intermedio 61a: Ácido 12-(heptiloxi)-12-oxododecanoico



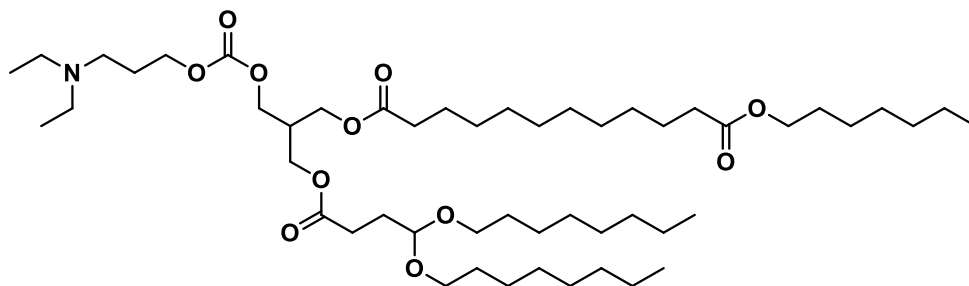
Se sintetizó el Intermedio 61a a partir de ácido dodecanodioico y heptan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,31 (m, 4H), 1,61 (m, 6H), 1,30 (m, 20H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 61b: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 12-heptil dodecanodioato



Se sintetizó el Intermedio 61b en 33 % de rendimiento a partir del Intermedio 61a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,12 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,64 – 3,59 (m, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,35 – 2,23 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,5$, 5,5 Hz, 2H), 1,66 – 1,50 (m, 10H), 1,37 – 1,23 (m, 40H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 765,68 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

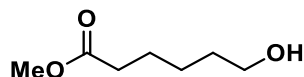
Ejemplo 61: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 12-heptil dodecanodioato



El ejemplo 61 se sintetizó con 69 % de rendimiento a partir del Intermedio 61b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,47 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,09 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,55 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3$, 6,6 Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,40 (m, 3H), 2,29 (td, $J = 7,6$, 6,3 Hz, 4H), 1,91 (td, $J = 7,6$, 5,5 Hz, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 10H), 1,37 – 1,24 (m, 40H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 901,72 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

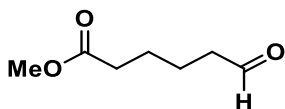
Síntesis del ejemplo 62

Intermedio 62a: 6-hidroxihexanoato de metilo



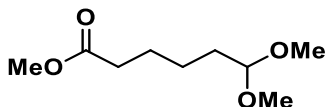
Se agitó una mezcla de oxepan-2-ona (100 g, 876 mmol) en HCl en MeOH (1000 mL) a 70 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se ajustó hasta pH = 8 mediante adición de NaHCO_3 ac. y luego se extrajo con EtOAc (3 x 1000 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 mL), se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío para proporcionar 100 g (685 mmol, 78 % de rendimiento) del producto bruto como un aceite incoloro, que no requirió purificación adicional. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,65 (m, 5H), 2,33 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,69 – 1,57 (m, 4H), 1,41 (m, 3H) ppm.

Intermedio 62b: 6-oxohexanoato de metilo



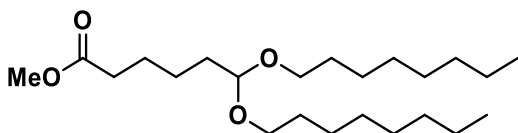
A una solución del Intermedio 62a (93 g, 636 mmol) en DCM (1200 mL) se añadió Et₃N (266 mL, 1,91 mol) a 0 °C. Luego, se añadió por goteo trióxido de piridina·azufre (203 g, 1,27 mol) en DMSO (497 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a 15 °C durante 2 h, se diluyó con agua (1000 mL) y se extrajo en DCM (2 X 1000 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1000 mL), se secaron en Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-5 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 63 g (437 mmol, 69 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,77 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 2,47 (m, 2H), 2,33 (m, 2H), 1,67 (m, 4H) ppm.

Intermedio 62c: 6,6-dimetoxihexanoato de metilo



A una solución de Intermedio 62b (60 g, 416 mmol) en MeOH (300 mL) se agregó H₂SO₄ (2,22 mL, 4,08 g, 41,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo, diluido con NaHCO₃ sat. a pH 7, y se extrajo en EtOAc (3 X 500 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con **salmuera (500 mL)**, se secaron en **Na₂SO₄ anhidro**, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-5 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 30 g (158 mmol, 38 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,36 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,32 (s, 6H), 2,32 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,67 – 1,60 (m, 4H), 1,35 (m, 2H) ppm.

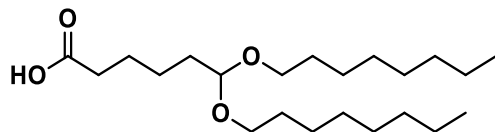
Intermedio 62d: 6,6-bis(octiloxi)hexanoato de metilo



A una solución de Intermedio 62c (30 g, 158 mmol) en octan-1-ol (80 mL) se agregó KHSO₄ (10,7 g, 78,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 12 h, se diluyó con éter de petróleo (150 mL) y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo) para proporcionar 35 g (90,5 mmol, 57 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro.

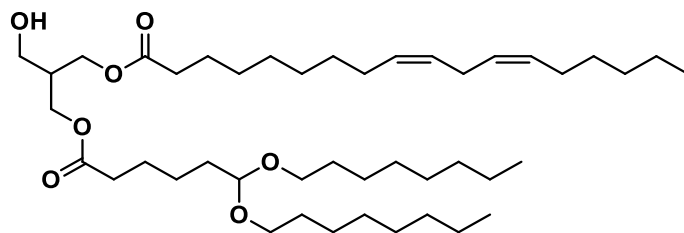
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,46 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,57 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,32 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,67 – 1,55 (m, 8H), 1,36 – 1,28 (m, 22H), 0,80 (t, $J = 6,8$ Hz, 6H) ppm.

Intermedio 62e: Ácido 6,6-bis(octiloxi)hexanoico



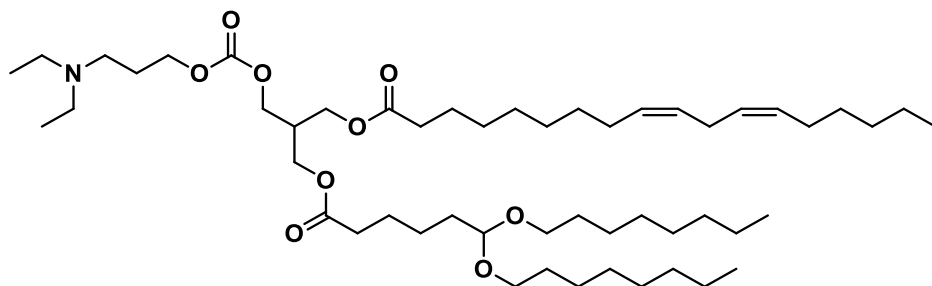
A una solución del Intermedio 62d (35 g, 90,5 mmol) en MeOH (150 mL) se agregó una solución de NaOH (10,9 g, 272 mmol) en H_2O (50 mL). Tras agitar a 15 °C durante 5 h, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se diluyó con agua (150 mL) y se extrajo en éter de petróleo (200 mL). La capa orgánica se lavó con salmuera (200 mL), se secó en Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-5 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 9,5 g (25,5 mmol, 28 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite amarillo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,47 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,37 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,69 – 1,55 (m, 8H), 1,33 (m, 22H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 6H) ppm; MS: 371,3 [M-H].

Intermedio 62f: 3-((6,6-bis(octiloxi)hexanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el Intermedio 62f en 34 % de rendimiento a partir del Intermedio 1a y el Intermedio 62e usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,45 – 5,29 (m, 4H), 4,47 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,26 – 4,11 (m, 4H), 3,63 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,57 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,41 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,78 (m, 2H), 2,35 (td, $J = 7,6, 6,4$ Hz, 4H), 2,28 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H), 2,21 (m, 1H), 2,07 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,72 – 1,53 (m, 9H), 1,45 – 1,23 (m, 38H), 0,90 (m, 9H) ppm; MS: 745,74 [M+Na].

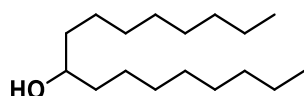
Ejemplo 62: 3-((6,6-bis(octiloxi)hexanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



El ejemplo 62 se sintetizó con 47 % de rendimiento a partir del Intermedio 62f y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 4,44 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,22 – 4,07 (m, 8H), 3,55 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,39 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,51 (q, J = 6,9 Hz, 6H), 2,41 (m, 1H), 2,31 (td, J = 7,6, 5,4 Hz, 4H), 2,04 (q, J = 6,8 Hz, 4H), 1,81 (m, 2H), 1,60 (m, 10H), 1,44 – 1,20 (m, 36H), 1,00 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 881,76 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

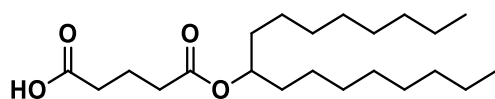
Síntesis del ejemplo 63

Intermedio 63a: heptadecan-9-ol



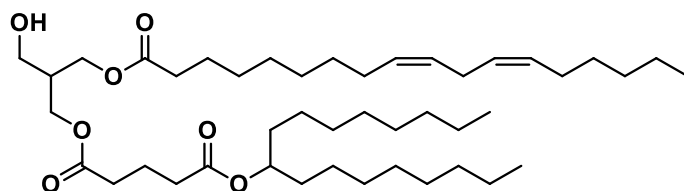
A una solución de nonanal (40 g, 281,22 mmol) en THF (400 mL) se añadió bromo (octil) magnesio (1 M, 309,34 mL) a -40°C . La mezcla se agitó a 16°C durante 2 h. El residuo se vertió en NH_4Cl (500 mL) sat. y se extrajo en acetato de etilo (3 X 700 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (800 mL), se secaron en Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-1,5 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 32 g (124,8 mmol, 44 % de rendimiento) del producto deseado como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,52 (m, 1H), 1,42 – 1,21 (m, 28H), 0,81 (t, J = 6,6 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 63b: Ácido 5-(heptadecan-9-iloxi)-5-oxopentanoico



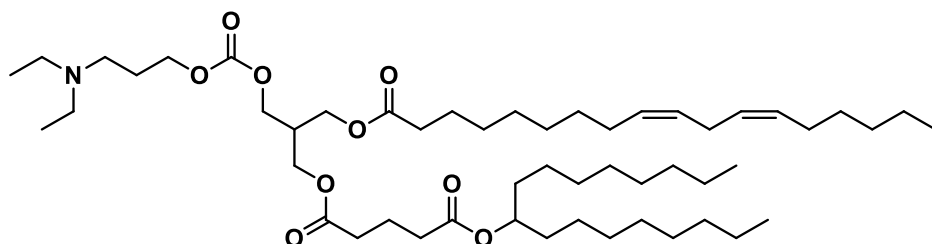
Se sintetizó el Intermedio 63b a partir de ácido pentanodioico e Intermedio 63a con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 4,90 (m, 1H), 2,36 (m, 4H), 1,91 (m, 2H), 1,54 (m, 4H), 1,29 (m, 24H) 0,90 (t, J = 6,6 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 63c: heptadecan-9-il (3-hidroxi-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil) glutarato



Se sintetizó el Intermedio 63c en 41 % de rendimiento a partir del Intermedio 1a y el Intermedio 63b usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,26 (m, 4H), 4,86 (m, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 4H), 3,61 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 2,77 (m, 2H), 2,43 – 2,28 (m, 6H), 2,26 – 2,16 (m, 2H), 2,04 (q, J = 6,8 Hz, 4H), 1,95 (m, 2H), 1,65 – 1,58 (m, 2H), 1,50 (m, 4H), 1,40 – 1,18 (m, 37H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 721,84 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

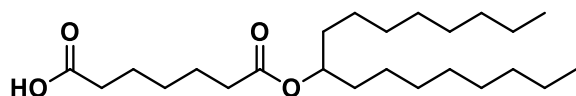
Ejemplo 63: 3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil heptadecan-9-il glutarato



El ejemplo 63 se sintetizó con 59 % de rendimiento a partir del Intermedio 63c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,28 (m, 4H), 4,86 (m, 1H), 4,21 – 4,08 (m, 8H), 2,76 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,50 (q, J = 7,0 Hz, 6H), 2,46 – 2,27 (m, 7H), 2,04 (d, J = 6,2 Hz, 4H), 1,94 (m, J = 7,5 Hz, 2H), 1,80 (m, J = 6,8 Hz, 2H), 1,60 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,50 (q, J = 6,2 Hz, 4H), 1,35 (t, J = 7,1 Hz, 4H), 1,33 – 1,22 (m, 34H), 1,00 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 879,78 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

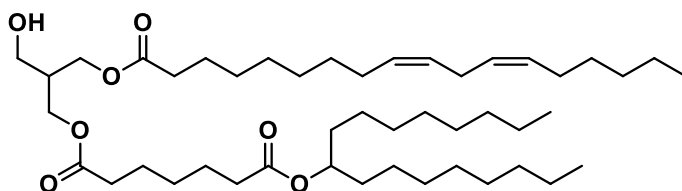
Síntesis del ejemplo 64

Intermedio 64a: Ácido 7-(heptadecan-9-ilo)-7-oxoheptanoico



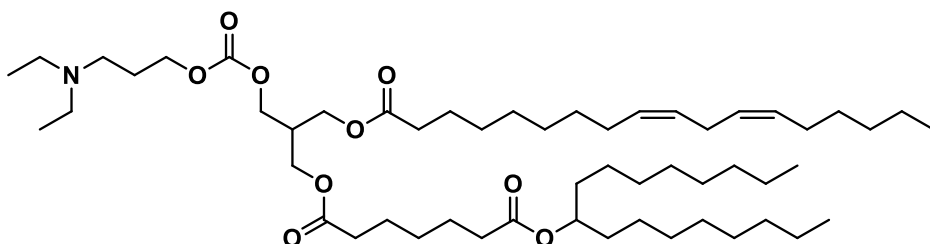
Se sintetizó el Intermedio 64 a partir de ácido heptanodioico e Intermedio 63a con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 4,90 (m, 1H), 2,30 (m, 4H), 1,62 (m, 4H), 1,53 (m, 4H), 1,29 (m, 26H) 0,90 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 64b: 1-(heptadecan-9-il) 7-(3-hidroxi-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil) heptanodioato



Se sintetizó el intermedio 64b en 43 % de rendimiento a partir del Intermedio 1a y el Intermedio 64a usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,27 (m, 4H), 4,85 (m, 1H), 4,22 – 4,12 (m, 4H), 3,61 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 2,76 (dd, J = 7,2, 5,9 Hz, 2H), 2,36 – 2,24 (m, 6H), 2,19 (m, 1H), 2,04 (t, J = 3,5 Hz, 4H), 1,69 – 1,58 (m, 6H), 1,49 (t, J = 6,2 Hz, 4H), 1,41 – 1,19 (m, 40H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 749,83 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

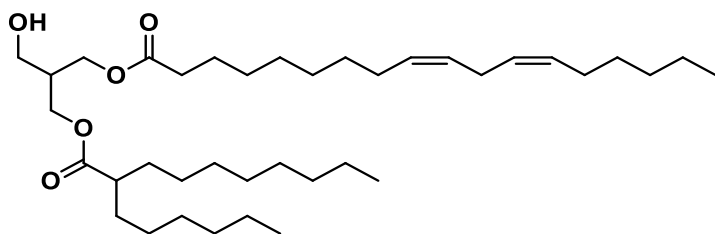
Ejemplo 64: 1-(3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil) 7-(heptadecan-9-il) heptanedioato



El ejemplo 64 se sintetizó con 63 % de rendimiento a partir del Intermedio 64b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,26 (m, 4H), 4,85 (m, 1H), 4,22 – 4,07 (m, 8H), 2,76 (m, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,41 (m, 1H), 2,35 – 2,24 (m, 7H), 2,04 (q, J = 6,2 Hz, 4H), 1,80 (m, 2H), 1,63 (m, 7H), 1,49 (q, J = 6,1 Hz, 4H), 1,38 – 1,24 (m, 38H), 1,00 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 907,61 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis del ejemplo 65

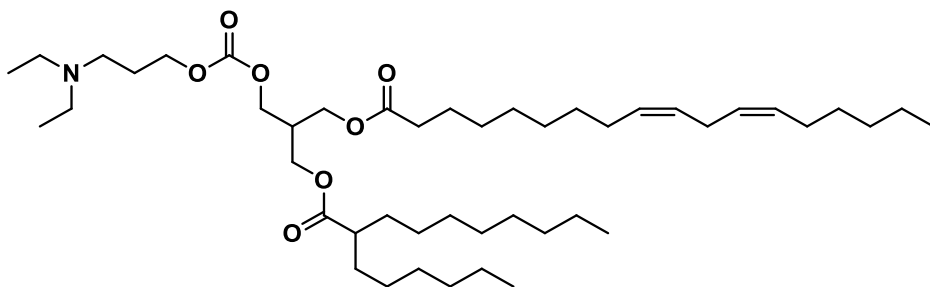
Intermedio 65a: 3-((2-hexildecanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el Intermedio 65a en 40 % de rendimiento a partir del Intermedio 1a y ácido 2-hexildecanoico usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,45 – 5,25 (m, 4H), 4,25 – 4,10 (m, 4H), 3,61 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,39 –

2,29 (m, 3H), 2,27 – 2,16 (m, 2H), 2,04 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,60 (m, 4H), 1,50 – 1,16 (m, 36H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 607,77 m/z [M+H].

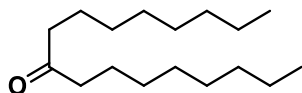
Ejemplo 65: 3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((2-hexildecanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



El ejemplo 65 se sintetizó con 63 % de rendimiento a partir del Intermedio 65a y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 4,22 – 4,07 (m, 8H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,50 (q, $J = 7,1$ Hz, 6H), 2,42 (m, 1H), 2,36 – 2,26 (m, 3H), 2,09 – 2,00 (m, 4H), 1,80 (m, 2H), 1,63 – 1,51 (m, 4H), 1,43 (m, 2H), 1,39 – 1,19 (m, 34H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 765,68 m/z [M+H].

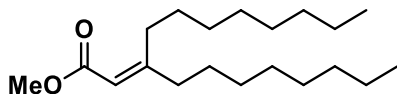
Síntesis del ejemplo 66

Intermedio 66a: heptadecan-9-ona



A una solución de Intermedio 63a (32,8 g, 127 mmol) en DCM (300 mL) se agregó periodinano Dess Martin (81,4 g, 192 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 15 °C durante 5 h, se concentró al vacío y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo) para proporcionar 20 g (70,5 mmol, 56 % de rendimiento) del producto deseado como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 2,39 (t, $J = 7,4$ Hz, 4H), 1,56 (m, 4H), 1,30 (m, 20H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 6H) ppm.

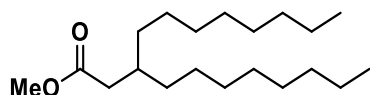
Intermedio 66b: 3-octilundec-2-enoato de metilo



A una solución de 2-dimetoxifosforilacetato de metilo (2 equiv.) en DMF (75 mL) se añadió NaH (2 equiv.) a 15 °C. Tras agitar durante 1 h, se añadió el Intermedio 66a (7,5 g, 29,48 mmol, 1 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h más. Luego, la mezcla de reacción se calentó a 90-110 °C y se agitó durante 10-48 h. La mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo en acetato de

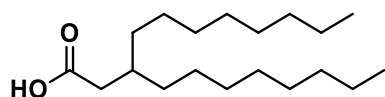
etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron en Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice para proporcionar 12 g (38,65 mmol, 66 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite amarillo.

Intermedio 66c: 3-octilundecanoato de metilo



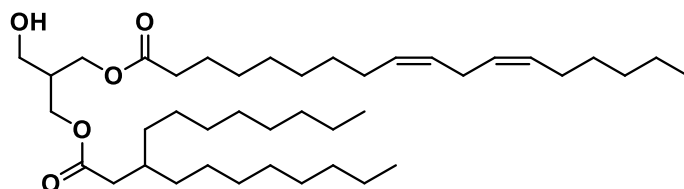
A una solución de Intermedio 66b (7,5 g, 24 mmol) en EtOH (75 mL) se añadió Pd/C (1 g) bajo N_2 . La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó con H_2 tres veces. La mezcla se agitó en H_2 (15 psi) a 15 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con MeOH (1 L). El filtrado se concentró al vacío y se purificó directamente usando cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo) para proporcionar 10 g (32,00 mmol, rendimiento del 66 %) del producto deseado como un aceite incoloro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,59 (s, 3H), 2,16 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,77 (br m, 1H), 1,19 (m, 28H), 0,81 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 66d: ácido 3-octilundecanoico



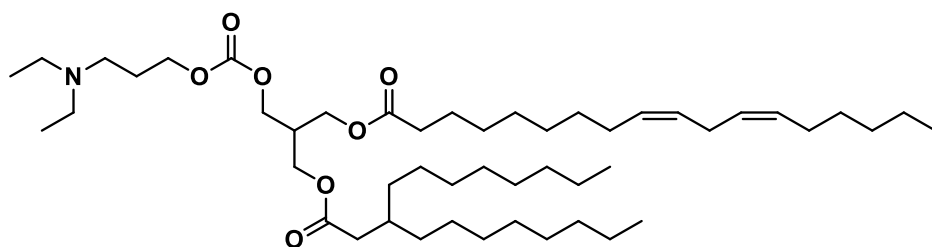
A una solución del Intermedio 66c (10 g, 32,0 mmol) en EtOH (50 mL) y H_2O (50 mL) se le añadió $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,69 g, 64,0) y NaOH (2,56 g, 64,0 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró para eliminar EtOH y luego se vertió en agua (30 mL). La mezcla resultante se acidificó con HCl 1M (ac.) a pH 6 y luego se extrajo en acetato de etilo (3 x 60 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 40 mL), se secaron en Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-50 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 3,6 g (12,4 mmol, 38 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 2,20 (br m, 2H), 1,82 (br m, 1H), 1,31 (m, 28H), 0,89 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 66e: 3-hidroxi-2-(((3-octilundecanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el Intermedio 66e en 39 % de rendimiento a partir del Intermedio 1a y el Intermedio 66d usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,45 – 5,26 (m, 4H), 4,24 – 4,10 (m, 4H), 3,61 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,32 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,28 – 2,14 (m, 4H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,83 (m, 1H), 1,61 (m, 2H), 1,28 (m, 42H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 649,67 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

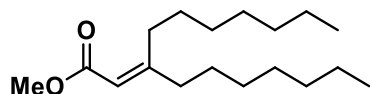
Ejemplo 66: 3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((3-octildecanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



El ejemplo 66 se sintetizó con 53 % de rendimiento a partir del Intermedio 66e y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,19 – 4,13 (m, 8H), 2,77 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (q, $J = 7,0$ Hz, 6H), 2,42 (m, 1H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,24 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,05 (m, 4H), 1,80 (m, 3H), 1,61 (m, 2H), 1,42 – 1,15 (m, 42H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 807,58 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

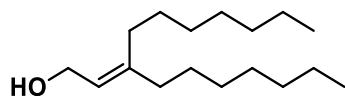
Síntesis del ejemplo 67

Intermedio 67a: 3-heptildec-2-enoato de metilo



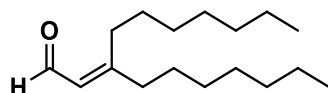
A una solución de NaH (14,13 g, 353,36 mmol, 2 equiv.) en THF (0,4 M) se añadió lentamente 2-dimetoxifosforilacetato de metilo (64,35 g, 353,36 mmol, 2 equiv.) a 0 °C. Después de agitar durante 1 h, se añadió lentamente pentadecan-8-ona (40 g, 176,68 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 15 °C. Después de agitar adicionalmente durante 1 h, la mezcla de reacción se calentó a 70 °C y se agitó durante 48 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se diluyó con agua y se extrajo en éter de petróleo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron en sulfato de magnesio o sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice para proporcionar 20 g (56,65 mmol, 32 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro.

Intermedio 67b: 3-heptildec-2-en-1-ol



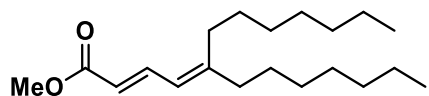
A una solución del Intermedio 67a (21,5 g, 76,1 mmol) en THF (200 mL) se añadió DIBAL (1 M, 228,4 mL) a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y luego a 15 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL) a 0 °C, seguido de 200 mL adicionales antes de extraerse en EtOAc (2 X 200 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 mL), se secaron en Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-2 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 17 g (40,1 mmol, 53 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,39 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 4,16 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 3,65 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 2,03 (m, 4H), 1,35 - 1,28 (m, 20H), 0,89 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 67c: 3-heptildec-2-enal



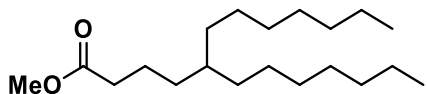
A una suspensión agitada de IBX (1,5-3,5 M) en DMSO (1,5-3,5 M) se añadió el Intermedio 67b (17 g, 66,8 mmol, 1 equiv.) en THF (0,5-1 M) a 30 °C. Tras agitar durante al menos 2 h a 30 °C, la mezcla de reacción se diluyó con éter de petróleo, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice para proporcionar 12 g (47,5 mmol, 71 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,99 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,86 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,21 (m, 2H) 1,52 (m, 4H), 1,30 (m, 16H), 0,89 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 67d: (E)-5-heptildodeca-2,4-dienoato de metilo



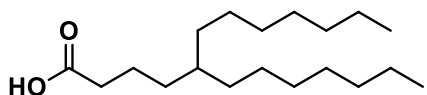
Se sintetizó el intermedio 67d en 44 % de rendimiento a partir del Intermedio 67c y 2-dimetoxifosforilacetato de metilo usando el método que se empleó para 67a. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,60 (dd, J = 15,0 Hz, 11,8 Hz, 1H), 5,97 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 5,79 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 2,27 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,13 (t, J = 7,6 Hz, 2H) 1,48 - 1,29 (m, 20H), 0,89 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 67e: 5-heptildodecanoato de metilo



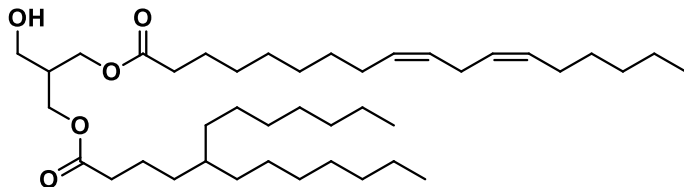
A una solución de Intermedio 67d (8 g, 20,75 mmol) en MeOH (100 mL) se añadió Pd/C (10 g, 339,59 μ mol, 33,96 μ L, 10 % pureza). La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó varias veces con H₂. La mezcla se agitó en H₂ (15 psi) a 15 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 6 g (15,36 mmol, rendimiento 74 %) del producto deseado como un aceite incoloro, que no requirió purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,68 (s, 3 H), 2,29 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,28 (m, 27H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 67f: ácido 5-heptildodecanoico



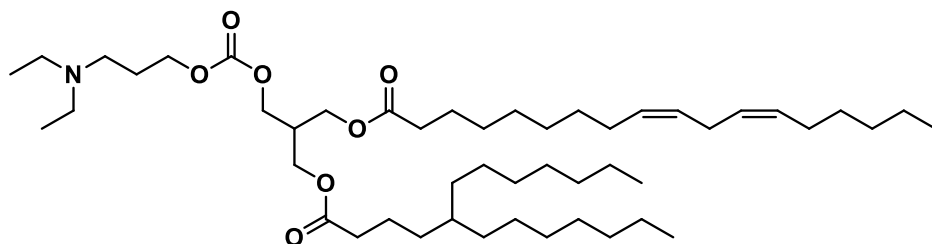
A una solución del Intermedio 67e (6 g, 15,36 mmol) en THF (120 mL) se agregó una solución de NaOH (3,07 g, 76,79 mmol) en agua (60 mL). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 5 h, se diluyó con agua (20 mL), se neutralizó a pH 4 con HCl 1 M y se extrajo en EtOAc (3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-2 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 3,51 g (11,68 mmol, 76,03 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 2,27 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,29 (m, 27H), 0,91 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm; MS: 297,2 m/z [M-H].

Intermedio 67g: 3-((5-heptildodecanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el intermedio 67g en 42 % de rendimiento a partir del Intermedio 1a y el Intermedio 67f usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,44 – 5,26 (m, 4H), 4,17 (m, 4H), 3,61 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,31 (q, J = 7,3 Hz, 4H), 2,26 – 2,13 (m, 2H), 2,04 (q, J = 6,8 Hz, 4H), 1,59 (m, 5H), 1,41 – 1,16 (m, 39H), 0,88 (m, 9H) ppm. MS: 649,67 m/z [M+H].

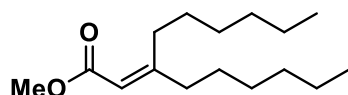
Ejemplo 67: 3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-heptildodecanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



El ejemplo 67 se sintetizó con 51 % de rendimiento a partir del Intermedio 67g y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,28 (m, 4H), 4,22 – 4,08 (m, 8H), 2,77 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,50 (q, J = 7,0 Hz, 6H), 2,42 (m, 1H), 2,29 (m, 4H), 2,04 (m, 4H), 1,80 (m, 2H), 1,59 (m, 4H), 1,40 – 1,20 (m, 42H), 1,00 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 807,53 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

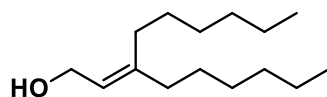
Síntesis del ejemplo 68

Intermedio 68a: 3-hexilnon-2-enoato de metilo



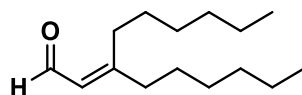
Se sintetizó el intermedio 68a en 55 % de rendimiento a partir de tridecan-7-ona y 2-dimetoxifosforilacetato de metilo usando el método que se empleó para 66b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,63 (s, 1H), 3,68 (s, 3H), 2,60 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 2,14 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,45 – 1,27 (m, 16H), 0,89 (t, J = 6,4 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 68b: 3-heptildec-2-en-1-ol



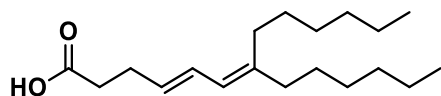
Se sintetizó el intermedio 68b en 49 % de rendimiento a partir del Intermedio 68a usando el método que se empleó para el Intermedio 67b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,38 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 4,14 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,01 (m, 4H), 1,39 - 1,27 (m, 16H), 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 68c: 3-heptildec-2-enal



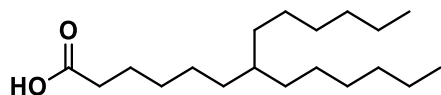
Se sintetizó el intermedio 68c en 73 % de rendimiento a partir del Intermedio 68b usando el método que se empleó para el Intermedio 67c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 9,99 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,85 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 2,55 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 2,21 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,49 (m, 4H), 1,31 (m, 12H), 0,89 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm.

Intermedio 68d: Ácido (E)-7-hexiltrideca-4,6-dienoico



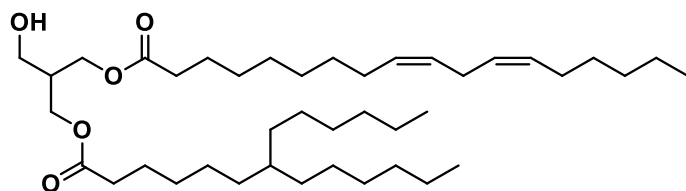
A una solución del Intermedio 68c (9 g, 40,1 mmol) en HMPA (8 mL) y THF (104 mL) se añadió NaHMDS (1 M, 160,4 mL) a 0 °C. Se añadió 3-carboxipropil(trifenil)fosfonio (22,42 g, 64,18 mmol) en THF (28 mL) a la mezcla de reacción, que se agitó adicionalmente a 15 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (200 mL), se acidificó con HCl 2N (ac.) y se extrajo en EtOAc (4 x 150 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 mL), se secaron en Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (1-100 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 8 g (19,0 mmol, 24 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite amarillo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6,25 (m, 1H), 6,05 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 5,30 (m, 1H), 2,59 – 2,45 (m, 4H), 2,13-2,07 (m, 4H), 1,40 – 1,29 (m, 16H), 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 6H) ppm; MS: 295,2 [M+H].

Intermedio 68e: Ácido 7-hexiltridecanoico



A una solución de Intermedio 68d (4 g, 13,6 mmol) en MeOH (50 mL) se añadió Pd/C (0,4 g, 13,58 mmol) bajo N₂. La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó varias veces con H₂. La mezcla de reacción se agitó en H₂ (15 psi) a 35 °C durante 12 h, se filtró y se lavó con MeOH (300 mL) y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo) para proporcionar 5,3 g (16,0 mmol, 59 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite amarillo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 2,35 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,25 (m, 27H), 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 6H) ppm; MS: 297,2 m/z [M-H].

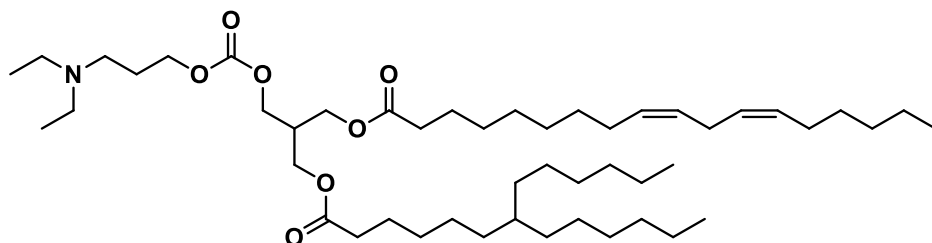
Intermedio 68f: 3-((7-hexiltridecanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el Intermedio 68f en 60 % de rendimiento a partir del Intermedio 1a y el Intermedio 68e usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,45 – 5,27 (m, 4H), 4,17 (m, 4H), 3,61 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,77 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,32 (t, *J* = 7,6 Hz, 4H), 2,25

– 2,14 (m, 2H), 2,04 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,68 – 1,55 (m, 5H), 1,40 – 1,15 (m, 39H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 649,72 m/z [M+H].

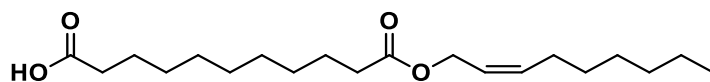
Ejemplo 68: 3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((7-hexiltridecanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



El ejemplo 68 se sintetizó con 43 % de rendimiento a partir del Intermedio 68f y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,27 (m, 4H), 4,22 – 4,07 (m, 8H), 2,77 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,55 – 2,46 (m, 6H), 2,46 – 2,37 (m, 1H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,04 (m, 4H), 1,86 – 1,75 (m, 2H), 1,61 (t, $J = 7,3$ Hz, 4H), 1,42 – 1,11 (m, 41H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 807,72 m/z [M+H].

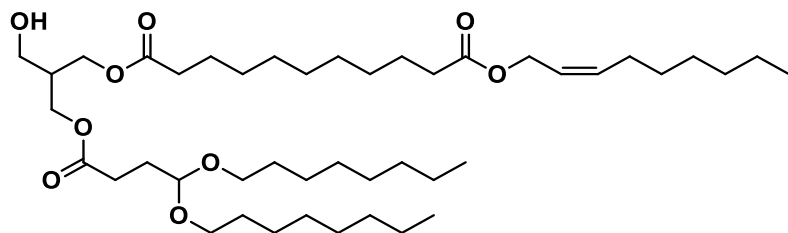
Síntesis del ejemplo 69

Intermedio 69a: ácido (Z)-11-(non-2-en-1-iloxi)-11-oxoundecanoico



Se sintetizó el intermedio 69a en rendimiento de 36 % a partir de ácido undecanoico y (Z)-non-2-en-1-ol con el método empleado para el intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,65 (m, 1H), 5,52 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,9, 1,2$ Hz, 2H), 2,32 (m, 4H), 2,09 (m, 2H), 1,61 (m, 4H), 1,41 – 1,20 (m, 18H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

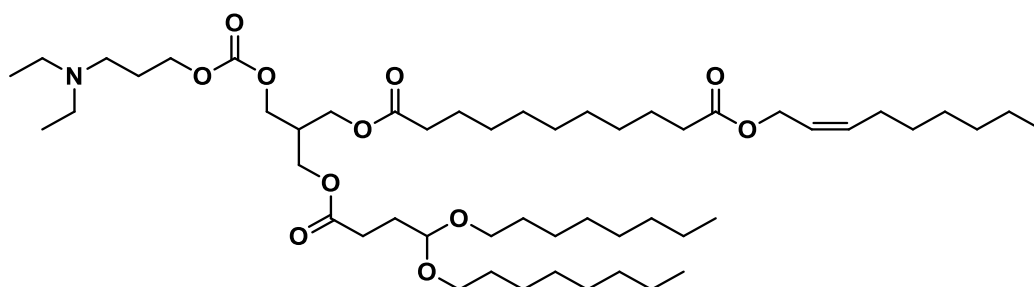
Intermedio 69b: (Z)-1-(3-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 11-(non-2-en-1-il)undecanodioato



Se sintetizó el Intermedio 69b en 35 % de rendimiento a partir del Intermedio 69a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,52 (m, 1H), 4,62 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 4,49 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,24 – 4,10 (m, 4H), 3,67 – 3,52

(m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,30 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 2,21 (m, 2H), 2,14 – 2,05 (m, 2H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,57 (m, 9H), 1,40 – 1,21 (m, 36H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 777,78 m/z [M+Na].

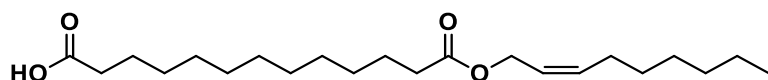
Ejemplo 69: (Z)-1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 11-(non-2-en-1-il) undecanodioato



El ejemplo 69 se sintetizó con 19 % de rendimiento a partir del Intermedio 69b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,62 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 4,61 (d, $J = 7,0, 1,3$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,09 (m, 8H), 3,55 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 2,56 (q, $J = 7,2$ Hz, 6H), 2,47 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,09 (m, 2H), 1,97 – 1,78 (m, 4H), 1,65 – 1,49 (m, 8H), 1,40 – 1,24 (m, 35H), 1,03 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 913,37 m/z [M+H].

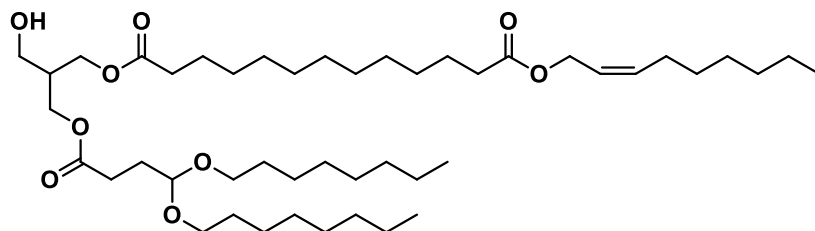
Síntesis del ejemplo 70

Intermedio 70a: ácido ((Z)-13-(non-2-en-1-iloxi)-13-oxotridecanoico



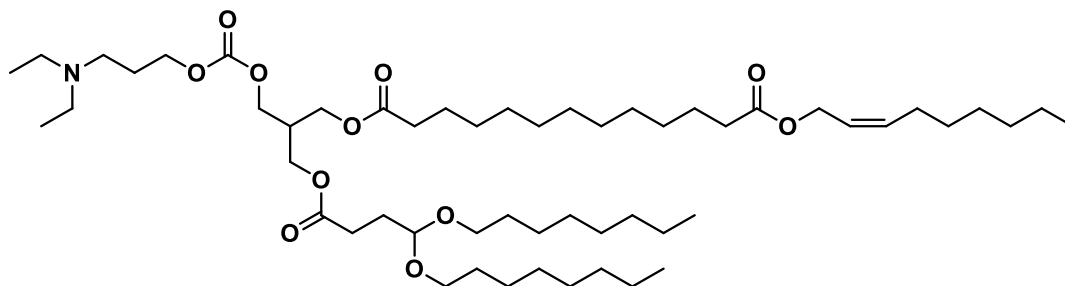
Se sintetizó el Intermedio 70a en rendimiento de 40 % a partir de ácido tridecanoico y (Z)-non-2-en-1-ol con el método empleado para el Intermedio 54a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,62 (m, 1H), 5,50 (m, 1H), 4,59 (dd, $J = 6,8, 1,2$ Hz, 2H), 2,29 (m, 4H), 2,07 (m, 2H), 1,59 (m, 4H), 1,39 – 1,18 (m, 22H), 0,85 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 70b: (Z)-1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 13-(non-2-en-1-il) tridecanodioato



Se sintetizó el Intermedio 70b en 34 % de rendimiento a partir del Intermedio 70a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,52 (m, 1H), 4,62 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 4,49 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,17 (m, 4H), 3,62 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,31 (q, $J = 7,9$ Hz, 4H), 2,25 – 2,15 (m, 2H), 2,09 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,58 (m, 8H), 1,39 – 1,21 (m, 41H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 805,63 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

Ejemplo 70: (Z)-1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 13-(non-2-en-1-il) tridecanodioato

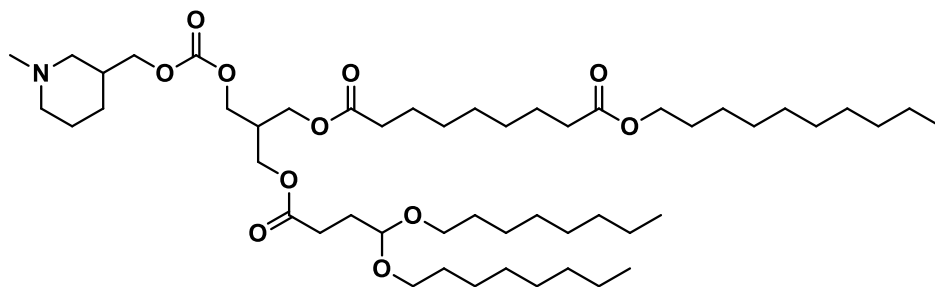


El ejemplo 70 se sintetizó con 15 % de rendimiento a partir del Intermedio 70b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,61 (d, $J = 6,9, 1,2$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,22 – 4,09 (m, 8H), 3,55 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,51 (q, $J = 7,0$ Hz, 6H), 2,46 – 2,35 (m, 3H), 2,34 – 2,26 (m, 4H), 2,15 – 2,04 (m, 2H), 1,97 – 1,87 (m, 2H), 1,86 – 1,75 (m, 4H), 1,67 – 1,49 (m, 8H), 1,40 – 1,23 (m, 40H), 1,01 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 942,04 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis de los ejemplos 71-74

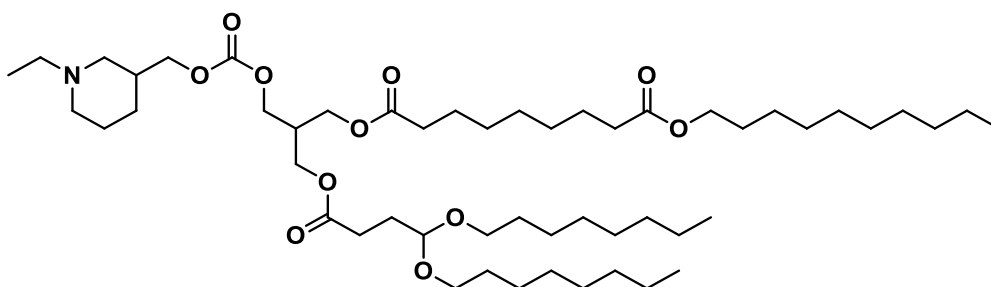
Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 59b y un reactivo aminoalcohol o diamina usando el método empleado para el Ejemplo 1.

Ejemplo 71: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((1-metilpiperidin-3-il)metioxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanedioato



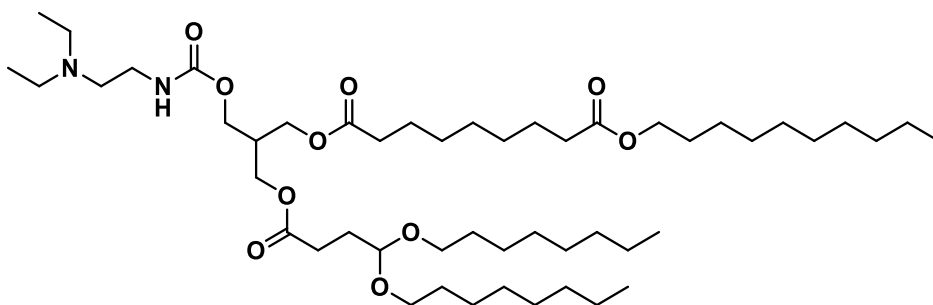
19 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,19 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 4,14 (dt, $J = 6,0, 1,4$ Hz, 4H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H), 3,96 (dd, $J = 10,6, 7,3$ Hz, 1H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,78 (m, 2H), 2,47 – 2,36 (m, 3H), 2,33 – 2,23 (m, 7H), 2,07 – 1,86 (m, 4H), 1,79 – 1,50 (m, 16H), 1,29 (m, 38H), 1,00 (m, 1H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 899,87 m/z [M+H].

Ejemplo 72: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((1-etilpiperidin-3-il)metioxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanedioato



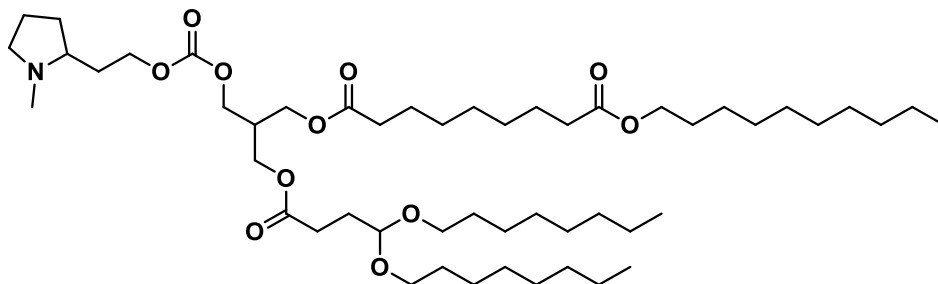
19 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,19 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 4,14 (dt, $J = 6,0, 1,4$ Hz, 4H), 4,05 (td, $J = 6,9, 6,4, 3,7$ Hz, 3H), 3,96 (dd, $J = 10,7, 7,2$ Hz, 1H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,87 m, 2H), 2,48 – 2,36 (m, 5H), 2,34 – 2,24 (m, 4H), 2,05 – 1,85 (m, 3H), 1,79 – 1,50 (m, 16H), 1,39 – 1,20 (m, 40H), 1,12 – 0,97 (m, 3H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 913,46 m/z [M+H].

Ejemplo 73: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanedioato



14 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,22 (br s, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,20 – 4,08 (m, 6H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,21 (br m, 2H), 2,52 (q, $J = 7,1, 6,2$ Hz, 6H), 2,40 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,29 (td, $J = 7,6, 5,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,76 – 1,49 (m, 13H), 1,39 – 1,20 (m, 40H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 886,69 m/z [M+H].

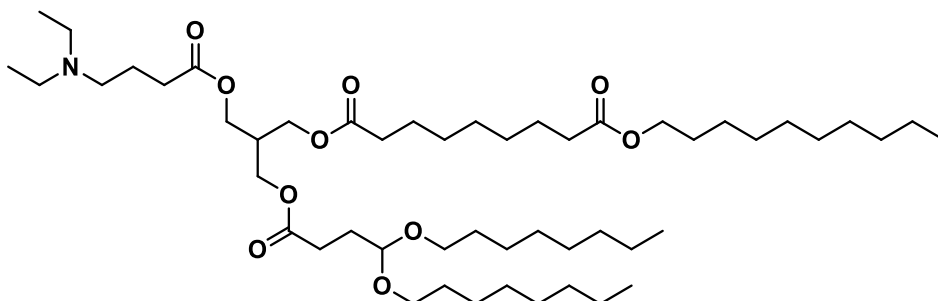
Ejemplo 74: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(1-metilpirrolidin-2-il)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanodioato



26 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,28 – 4,09 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,05 (m, 1H), 2,46 – 2,36 (m, 3H), 2,34 – 2,24 (m, 7H), 2,21 – 1,87 (m, 4H), 1,84 – 1,43 (m, 12H), 1,40 – 1,18 (m, 40H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 899,38 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis del ejemplo 75

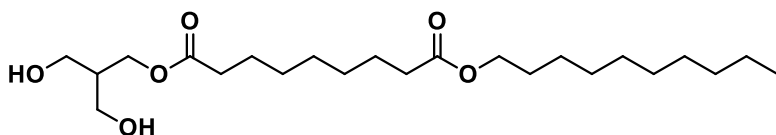
Ejemplo 75: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((4-(dietilamino)butanoil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanodioato



El Ejemplo 75 se sintetizó con 61 % de rendimiento a partir del Intermedio 59b y ácido 4-(dietilamino)butanoico mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 25. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,12 (dd, $J = 6,1, 1,6$ Hz, 6H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 2,45 – 2,24 (m, 10H), 1,92 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,65 – 1,50 (m, 12H), 1,38 – 1,20 (m, 40H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 8H) ppm; MS: 885,43 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

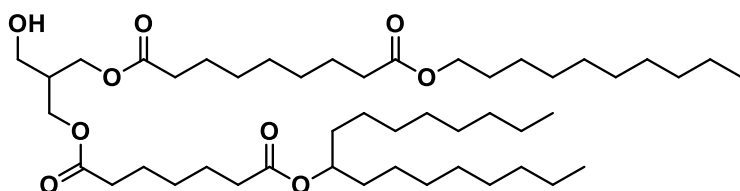
Síntesis del ejemplo 76

Intermedio 76a: 1-decil 9-(3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil) nonanodioato



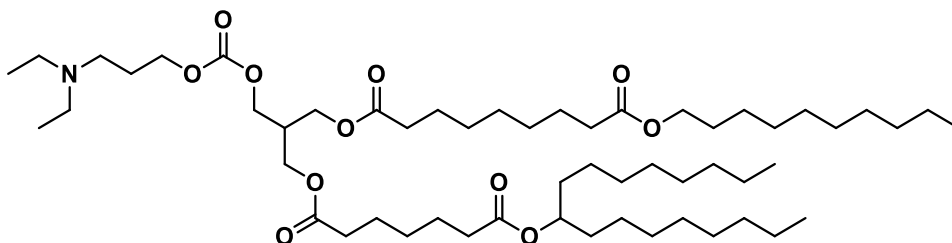
A una solución del Intermedio 59a (15 g, 45,6 mmol, 1 equiv.), (2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol (1-1,2 equiv.), DMAP (0,2 equiv.) y DIPEA (1,5-3 equiv.) en DCM (0,2 M) se añadió EDC·HCl (1,5 equiv.) a ta. La mezcla de reacción se agitó durante al menos 16 h, se diluyó con agua, se lavó secuencialmente con HCl 1M y bicarbonato de sodio al 5 %, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío. El intermedio protegido con acetónido bruto se resuspendió en MeOH y se añadió resina Dowex® 50W X8. Se agitó la mezcla de reacción resultante a ta durante al menos 12 h, se filtró y se lavó con MeOH, y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en hexanos) para proporcionar 12,2 g (29,3 mmol, 65 % de rendimiento) del producto deseado como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,24 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 4,04 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,76 (m, 4H), 2,52 (br s, 2H), 2,30 (dt, J = 16,1, 7,5 Hz, 4H), 2,03 (m, 1H), 1,61 (m, 6H), 1,38 – 1,20 (m, 20H), 0,87 (t, J = 6,8 Hz, 3H) ppm; MS: 439,56 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

Intermedio 76b: 1-decil 9-(3-(((7-(heptadecan-9-iloxi)-7-oxoheptanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 76b en 37 % de rendimiento a partir del Intermedio 76a y el Intermedio 64a usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,85 (m, 1H), 4,21 – 4,12 (m, 4H), 4,04 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,61 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 2,37 – 2,24 (m, 8H), 2,18 (m, 1H), 1,63 (m, 11H), 1,49 (m, 7H), 1,39 – 1,19 (m, 42H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 797,96 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 76: 1-decil 9-(3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((7-(heptadecan-9-iloxi)-7-oxoheptanoil)oxi)metil)propil) nonanodioato

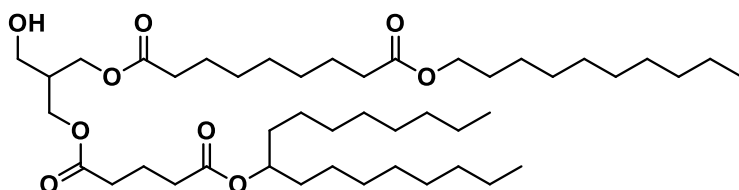


El ejemplo 76 se sintetizó con 22 % de rendimiento a partir del Intermedio 76b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,85 (m, 1H), 4,22 – 4,10 (m, 8H), 4,05 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 2,55 – 2,50 (m, 6H), 2,41 (m,

1H), 2,35 – 2,24 (m, 8H), 1,81 (m, 2H), 1,70 – 1,55 (m, 12H), 1,50 (m, 4H), 1,41 – 1,23 (m, 44H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 956,17 m/z [M+H].

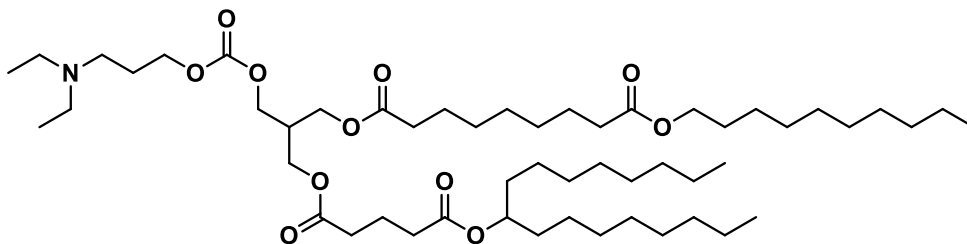
Síntesis del ejemplo 77

Intermedio 77a: 1-decil 9-(3-(((5-(heptadecan-9-iloxi)-5-oxopentanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 77a en 26 % de rendimiento a partir del Intermedio 76a y el Intermedio 63b usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,86 (m, 1H), 4,23 – 4,13 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,62 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 2,33 (m, 8H), 2,19 (m, 1H), 1,95 (m, 2H), 1,61 (m, 8H), 1,50 (m, 4H), 1,38 – 1,19 (m, 42H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 769,91 m/z [M+H].

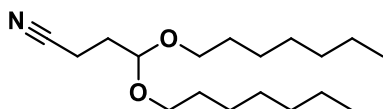
Ejemplo 77: 1-decil 9-(3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-(heptadecan-9-iloxi)-5-oxopentanoil)oxi)metil)propil) nonanodioato



El ejemplo 77 se sintetizó a partir del Intermedio 77a y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,87 (m, 1H), 4,16 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,51 (m, 6H), 2,46 – 2,24 (m, 9H), 1,94 (m, 2H), 1,87 – 1,76 (m, 2H), 1,69 – 1,57 (m, 6H), 1,49 (m, 4H), 1,40 – 1,17 (m, 44H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,89 (m, 9H) ppm; MS: 928,07 m/z [M+H].

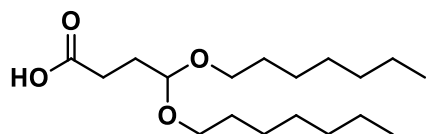
Síntesis del ejemplo 78

Intermedio 78a: 4,4-bis(heptiloxi)butanonitrilo



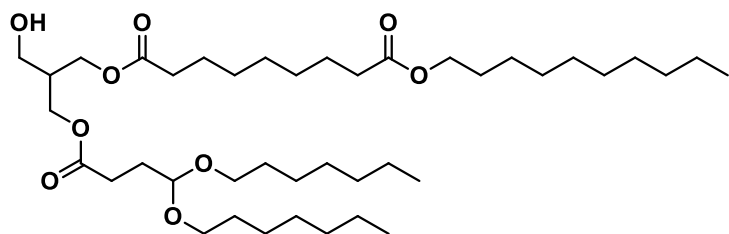
Se sintetizó el intermedio 78a en 99 % de rendimiento a partir de 4,4-dietoxibutanonitrilo y heptan-1-ol usando el método que se empleó para el Intermedio 1b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,55 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 3,60 (dt, J = 9,3, 6,6 Hz, 2H), 3,43 (dt, J = 9,3, 6,6 Hz, 2H), 2,42 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 1,94 (td, J = 7,4, 5,3 Hz, 2H), 1,57 (m, 4H), 1,40 – 1,23 (m, 16H), 0,88 (m, 6H) ppm.

Intermedio 78b: Ácido 4,4-bis(heptiloxi)butanoico



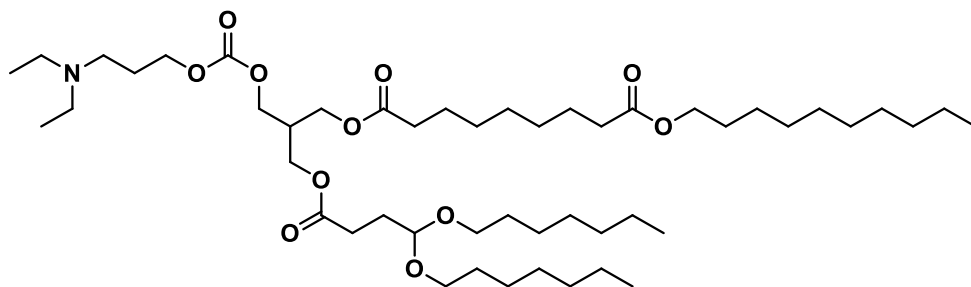
Se sintetizó el intermedio 78b en 92 % de rendimiento a partir del Intermedio 78a usando el método que se empleó para el Intermedio 1c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,85 (br s, 1H), 4,46 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 3,52 (dt, J = 9,4, 6,8 Hz, 2H), 3,39 (dt, J = 9,3, 6,8 Hz, 2H), 2,26 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,85 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 1,53 (m, 4H), 1,29 (m, 16H), 0,94 – 0,80 (m, 6H) ppm; MS: 315 m/z [M-H].

Intermedio 78c: 1-(3-((4,4-bis(heptiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-decil nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 78c en 46 % de rendimiento a partir del Intermedio 76a y el Intermedio 78b usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,23 – 4,11 (m, 4H), 4,04 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,65 – 3,50 (m, 4H), 3,39 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,29 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, J = 7,5, 5,4 Hz, 2H), 1,68 – 1,49 (m, 11H), 1,38 – 1,19 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 737,82 m/z [M+Na].

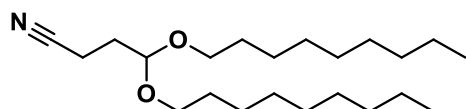
Ejemplo 78: 1-(3-((4,4-bis(heptiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanodioato



El ejemplo 78 se sintetizó con 35 % de rendimiento a partir del Intermedio 78c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,22 – 4,09 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,51 (m, 6H), 2,46 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 12H), 1,39 – 1,23 (m, 34H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 873,52 m/z [M+H].

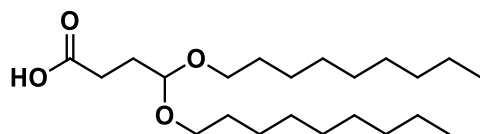
Síntesis del ejemplo 79

Intermedio 79a: 4,4-bis(noniloxi)butanonitrilo



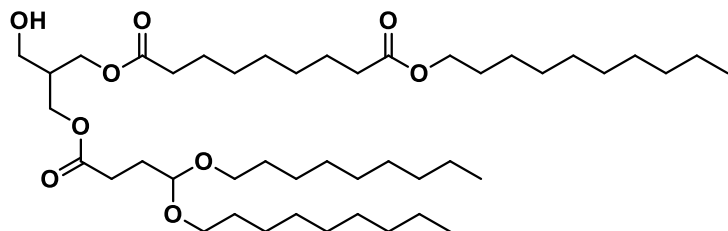
Se sintetizó el intermedio 79a en 16 % de rendimiento a partir de 4,4-dietoxibutanonitrilo y nonan-1-ol usando el método que se empleó para el intermedio 1b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,55 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 3,60 (dt, $J = 9,2, 6,6$ Hz, 2H), 3,43 (dt, $J = 9,3, 6,6$ Hz, 2H), 2,42 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,94 (td, $J = 7,4, 5,3$ Hz, 2H), 1,57 (m, 4H), 1,38 – 1,24 (m, 24H), 0,88 (t, $J = 6,7$ Hz, 6H) ppm.

Intermedio 79b: Ácido 4,4-bis(noniloxi)butanoico



Se sintetizó el Intermedio 79b en 100 % de rendimiento a partir del Intermedio 79a usando el método que se empleó para el Intermedio 1c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,32 (br s, 1H), 4,44 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,49 (dt, $J = 9,3, 6,9$ Hz, 2H), 3,38 (dt, $J = 9,4, 6,9$ Hz, 2H), 2,10 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,78 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,53 (m, 4H), 1,27 (m, 24H), 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 6H) ppm; MS: 371 m/z [M-H].

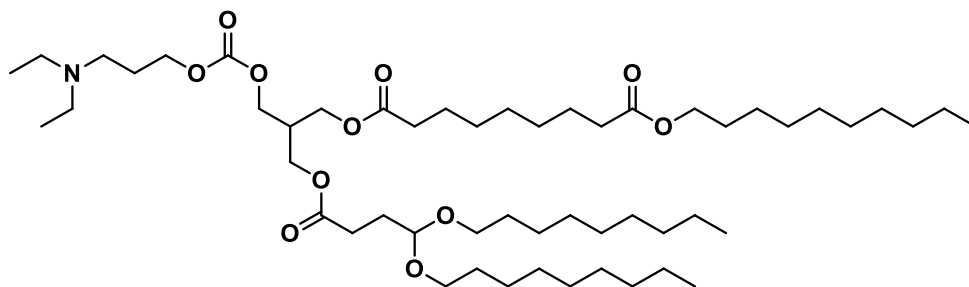
Intermedio 79c: 1-(3-((4,4-bis(noniloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-decil nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 79c en 43 % de rendimiento a partir del Intermedio 76a y el Intermedio 79b usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,12 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,67 – 3,51 (m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz,

2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,30 (dt, $J = 11,9, 7,6$ Hz, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,6, 5,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,48 (m, 11H), 1,37 – 1,20 (m, 42H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 793,91 m/z [M+Na].

Ejemplo 79: 1-(3-((4,4-bis(noniloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-decil nonanodioato

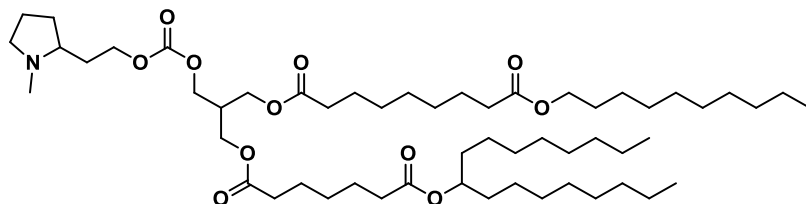


El ejemplo 79 se sintetizó con 35 % de rendimiento a partir del Intermedio 79c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,10 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,55 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,45 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,86 – 1,74 (m, 3H), 1,66 – 1,49 (m, 10H), 1,35 – 1,23 (m, 43H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 929,60 m/z [M+H].

Síntesis de los ejemplos 80-81

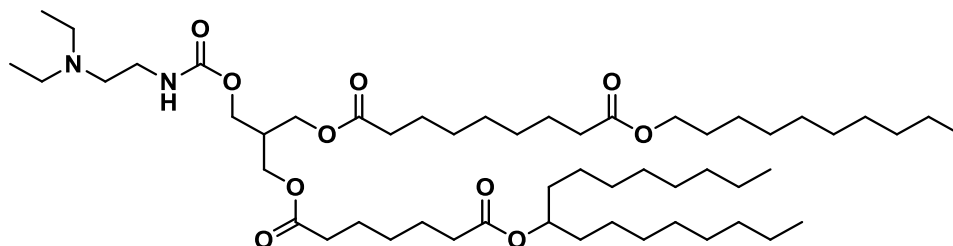
Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 76b y reactivo aminoalcohol o diamina usando el método empleado para el Ejemplo 1.

Ejemplo 80: 1-decil 9-(3-((7-(heptadecan-9-iloxi)-7-oxoheptanoil)oxi)-2-(((2-(1-metilpirrolidin-2-il)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil) nonanodioato



48 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,85 (m, 1H), 4,26 – 4,09 (m, 8H), 4,04 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,05 (m, 1H), 2,41 (m, 1H), 2,34 – 2,26 (m, 11H), 2,19 – 1,89 (m, 4H), 1,83 – 1,43 (m, 18H), 1,40 – 1,17 (m, 46H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 954,23 m/z [M+H].

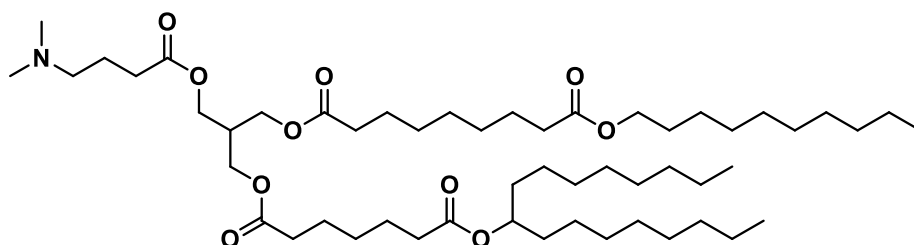
Ejemplo 81: 1-decil 9-(3-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)oxi)-2-(((7-(heptadecan-9-iloxi)-7-oxoheptanoil)oxi)metil)propil) nonanodioato



43 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,21 (br t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 4,85 (m, 1H), 4,12 (d, $J = 6,0$ Hz, 6H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,21 (br q, $J = 5,8$ Hz, 2H), 2,51 (q, $J = 7,1, 6,3$ Hz, 6H), 2,43 – 2,23 (m, 8H), 1,62 (m, 11H), 1,50 (q, $J = 6,1$ Hz, 4H), 1,40 – 1,20 (m, 46H), 0,99 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 940,46 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis del ejemplo 82

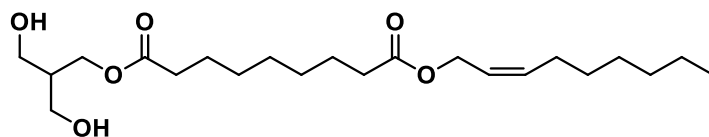
Ejemplo 82: 1-decil 9-(3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2-(((7-(heptadecan-9-iloxi)-7-oxoheptanoil)oxi)metil)propil) nonanodioato



El Ejemplo 82 se sintetizó con 55 % de rendimiento a partir del Intermedio 76b y ácido 4-(dimetilamino)butanoico mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 25. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,85 (m, 1H), 4,12 (dd, $J = 6,0, 2,3$ Hz, 6H), 4,04 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,42 – 2,23 (m, 13H), 2,20 (s, 6H), 1,77 (m, 2H), 1,62 (m, 11H), 1,49 (q, $J = 6,0$ Hz, 4H), 1,40 – 1,19 (m, 45H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 911,44 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

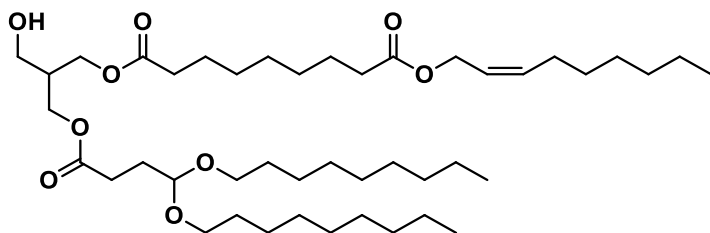
Síntesis del ejemplo 83

Intermedio 83a: (Z)-1-(3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



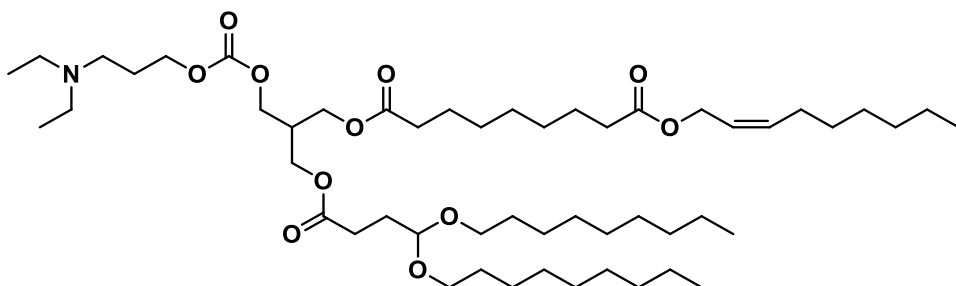
Se sintetizó el Intermedio 83a en 84 % de rendimiento a partir del Intermedio 54a y 2-(hidroximetil)propano-1,3-diol usando el método que se empleó para 76a. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,65 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,9, 1,2$ Hz, 2H), 4,24 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 3,76 (m, 4H), 2,52 (br s, 2H), 2,31 (m, 4H), 2,12 – 1,98 (m, 3H), 1,61 (m, 4H), 1,40 – 1,21 (m, 14H), 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 83b: (Z)-1-(3-((4,4-bis(noniloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 83b en 33 % de rendimiento a partir del Intermedio 83a y el Intermedio 79b usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,9, 1,2$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,17 (m, 4H), 3,62 (br m, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,30 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 2,09 (m, 2H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,50 (m, 10H), 1,39 – 1,21 (m, 36H), 0,087 (m, 9H) ppm; MS: 777,87 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

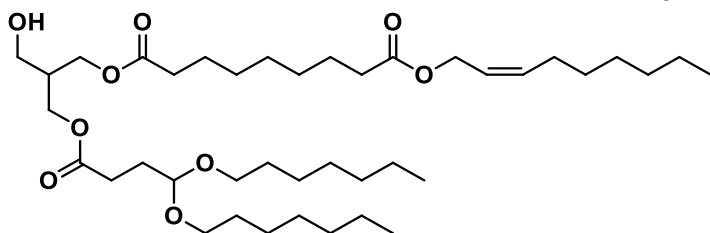
Ejemplo 83: (Z)-1-(3-((4,4-bis(noniloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



El ejemplo 83 se sintetizó con 60 % de rendimiento a partir del Intermedio 83b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,62 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,8, 1,2$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,21 – 4,09 (m, 8H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,51 (m, 6H), 2,45 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (t, $J = 7,6$ Hz, 4H), 2,09 (m, 2H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,67 – 1,48 (m, 8H), 1,42 – 1,20 (m, 38H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 913,71 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

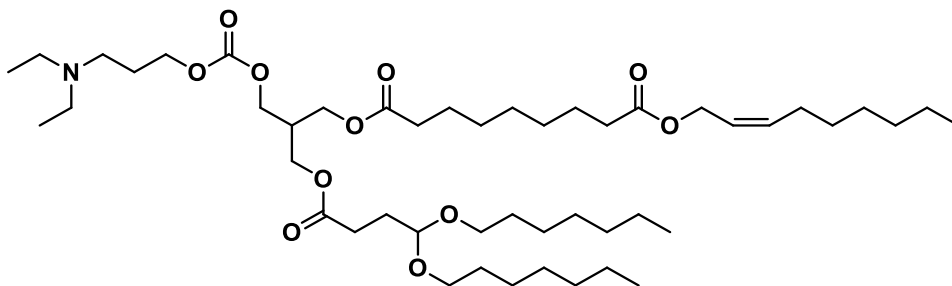
Síntesis del ejemplo 84

Intermedio 84a: (Z)-1-(3-((4,4-bis(heptiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 84a en 38 % de rendimiento a partir del Intermedio 83a y el Intermedio 78b usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,9, 1,2$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,12 (m, 4H), 3,62 (br t, $J = 5,2$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,30 (td, $J = 7,5, 5,8$ Hz, 5H), 2,19 (m, 1H), 2,09 (m, 2H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,50 (m, 8H), 1,39 – 1,25 (m, 30H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 721,65 $[\text{M}+\text{Na}]$.

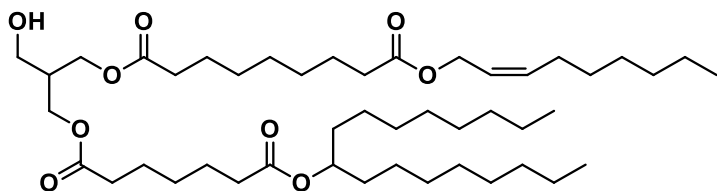
Ejemplo 84: (Z)-1-(3-((4,4-bis(heptiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



El ejemplo 84 se sintetizó a partir del Intermedio 84a y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,8, 1,2$ Hz, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,10 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,46 – 2,35 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 4H), 2,09 (m, 2H), 1,92 (m, 2H), 1,80 (dq, $J = 8,2, 6,6$ Hz, 2H), 1,58 (m, 8H), 1,40 – 1,21 (m, 30H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,89 (m, 9H) ppm; MS: 857,54 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

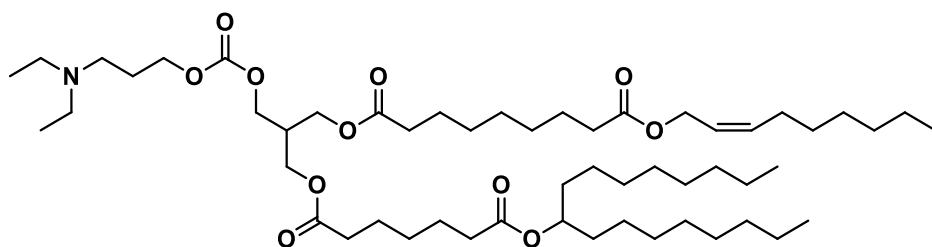
Síntesis del ejemplo 85

Intermedio 85a: (Z)-1-(3-((7-(heptadecan-9-iloxi)-7-oxoheptanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



Se sintetizó el intermedio 85a en 37 % de rendimiento a partir del Intermedio 83a y el Intermedio 64a usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,85 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,9, 1,2$ Hz, 2H), 4,22 – 4,12 (m, 4H), 3,61 (m, 2H), 2,30 (m, 9H), 2,19 (m, 1H), 2,09 (m, 2H), 1,64 (m, 8H), 1,49 (m, 4H), 1,41 – 1,18 (m, 40H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 781,73 m/z [M+H].

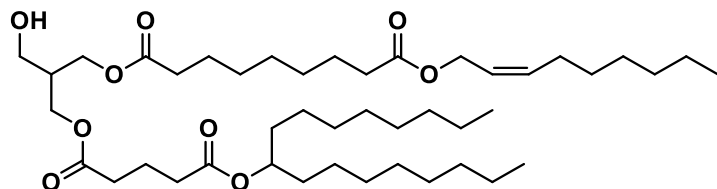
Ejemplo 85: (Z)-1-(3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((7-(heptadecan-9-ilo)xi)-7-oxoheptanoil)oxi)metil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



El ejemplo 85 se sintetizó con 48 % de rendimiento a partir del Intermedio 85a y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,85 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,8, 1,2$ Hz, 2H), 4,24 – 4,09 (m, 8H), 2,51 (m, 6H), 2,41 (m, 1H), 2,35 – 2,21 (m, 8H), 2,09 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,69 – 1,55 (m, 10H), 1,50 (q, $J = 6,2$ Hz, 4H), 1,40 – 1,18 (m, 38H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 939,19 m/z [M+H].

Síntesis de los ejemplos 86-88

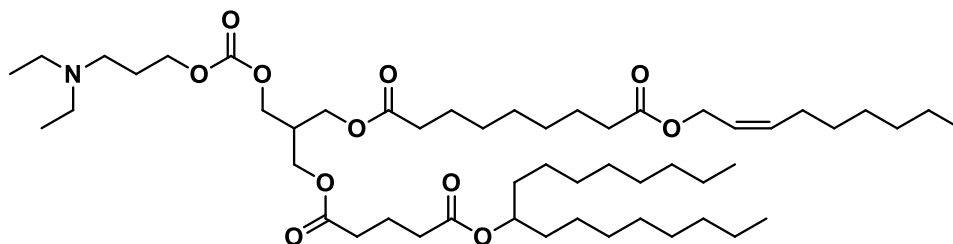
Intermedio 86a: (Z)-1-(3-(((5-(heptadecan-9-ilo)xi)-5-oxopentanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 86a en 39 % de rendimiento a partir del Intermedio 83a y el Intermedio 63b usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,64 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 7,0, 1,2$ Hz, 2H), 4,23 – 4,12 (m, 4H), 3,62 (t, $J = 4,4$ Hz, 2H), 2,44 – 2,24 (m, 9H), 2,19 (m, 1H), 2,09 (m, 2H), 1,95 (m, 2H), 1,61 (m, 5H), 1,50 (m, 4H), 1,38 – 1,20 (m, 37H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 753,74 m/z [M+H].

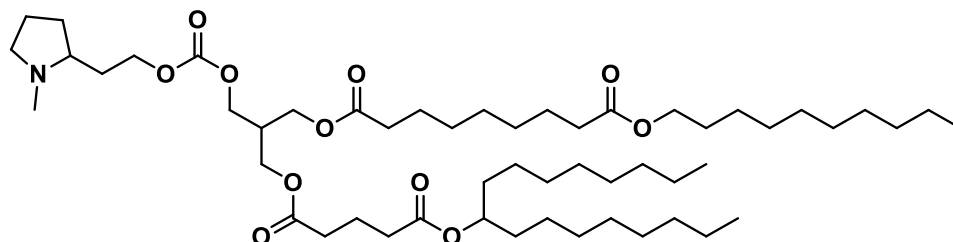
Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 86a y un reactivo aminoalcohol o diamina usando el método empleado para el Ejemplo 1.

Ejemplo 86: (Z)-1-(3-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)-2-(((5-(heptadecan-9-ilo)xi)-5-oxopentanoil)oxi)metil)propil) 9-(non-2-en-1-il) nonanodioato



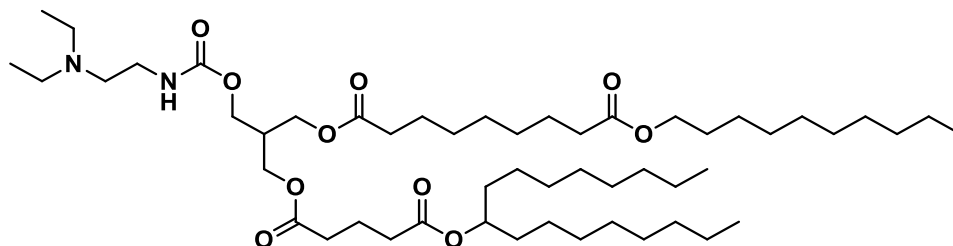
48 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,65 (m, 1H), 5,51 (m, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,61 (dd, $J = 6,9, 1,3$ Hz, 2H), 4,22 – 4,09 (m, 8H), 2,50 (q, $J = 7,1$ Hz, 6H), 2,46 – 2,25 (m, 9H), 2,09 (m, 2H), 1,94 (m, 2H), 1,86 – 1,74 (m, 3H), 1,61 (m, 4H), 1,50 (m, 4H), 1,40 – 1,23 (m, 37H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 912,23 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 87: 1-decil 9-(3-(((5-(heptadecan-9-ilo)xi)-5-oxopentanoil)oxi)-2-(((2-(1-metilpirrolidin-2-il)etoxi)carbonil)oxi)metil)propil) nonanodioato



50 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,86 (m, 1H), 4,27 – 4,08 (m, 8H), 4,04 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,05 (m, 1H), 2,48 – 2,24 (m, 12H), 2,20 – 1,88 (m, 6H), 1,82 – 1,41 (m, 15H), 1,37 – 1,21 (m, 43H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 925,43 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 88: 1-decil 9-(3-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)oxi)-2-(((5-(heptadecan-9-ilo)xi)-5-oxopentanoil)oxi)metil)propil) nonanodioato

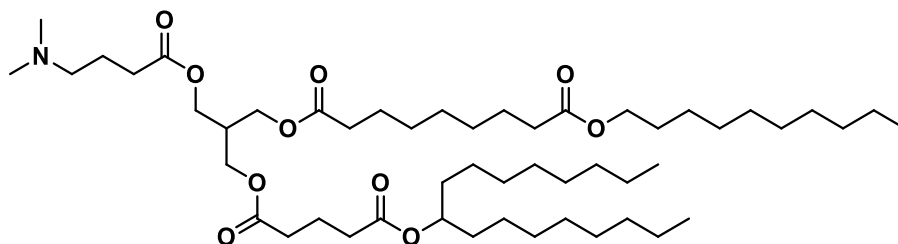


49 % rendimiento; ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 5,23 (br t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,12 (m, 6H), 4,04 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,20 (br q, $J = 5,9$ Hz, 2H), 2,51 (q, $J = 7,0$ Hz, 6H), 2,41 – 2,25 (m, 9H),

1,93 (m, 2H), 1,61 (m, 6H), 1,50 (m, 4H), 1,33 – 1,23 (m, 44H), 0,99 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 912,43 m/z [M+H].

Síntesis del ejemplo 89

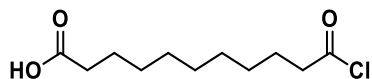
Ejemplo 89: 1-decil 9-(3-((4-(dimetilamino)butanoil)oxi)-2-(((5-(heptadecan-9-iloxi)-5-oxopentanoil)oxi)metil)propil) nonanodioato



El Ejemplo 89 se sintetizó con 43 % de rendimiento a partir del Intermedio 86a y ácido 4-(dimetilamino)butanoico mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 25. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 4,91 – 4,82 (m, 1H), 4,12 (m, 6H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,42 – 2,23 (m, 13H), 2,20 (s, 6H), 1,94 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,61 (m, 6H), 1,49 (m, 4H), 1,37 – 1,16 (m, 44H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 883,85 m/z [M+H].

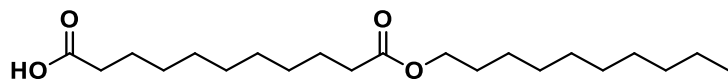
Síntesis del ejemplo 90

Intermedio 90a: Ácido 11-cloro-11-oxoundecanoico



A una solución de ácido undecanodioico (15 g, 69,36 mmol, 1 equiv.) en THF (0,6 M) se añadió cloruro de oxalilo (1,1-1,3 equiv.). Después de la adición, la mezcla se agitó y se añadió por goteo DMF (0,01-0,05 equiv.). La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 h y luego se concentró para dar 16 g (47,0 mmol, rendimiento 99 %) del producto bruto deseado en forma de aceite amarillo, que no requirió purificación adicional.

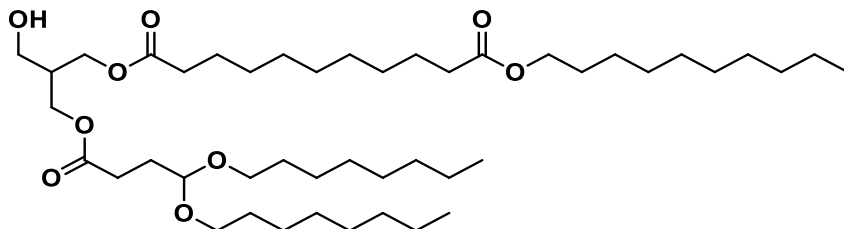
Intermedio 90b: Ácido 11-(deciloxi)-11-oxoundecanoico



A una solución del Intermedio 90a (16,28 g, 69,36 mmol, 1 equiv.) en THF (0,45 M) se añadió decan-1-ol (1,1 equiv.). La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h y luego se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna (gradiente de EtOAc en éter de petróleo) y, según fuera necesario, se recrystalizó en éter de petróleo para proporcionar 5,5 g (15,5 mmol, rendimiento del 22 %) del producto deseado como un sólido blanco. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ

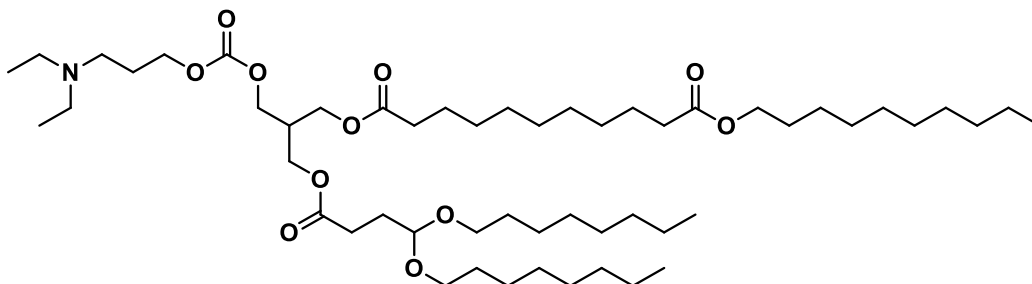
4,06 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,37 – 2,28 (m, 4H), 1,62 (m, 6H), 1,28 (m, 24H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm; MS: 355,2 m/z [M-H].

Intermedio 90c: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 11-decil undecanodioato



Se sintetizó el intermedio 90c en 39 % de rendimiento a partir del Intermedio 90b y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,18 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,64 – 3,51 (m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,34 – 2,23 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,65 – 1,50 (m, 10H), 1,37 – 1,21 (m, 44H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 793,73 m/z [M+Na].

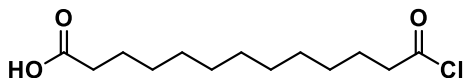
Ejemplo 90: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 11-decil undecanodioato



El ejemplo 90 se sintetizó con 59 % de rendimiento a partir del Intermedio 90c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 4,47 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,21 – 4,08 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,55 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (q, $J = 7,0$ Hz, 6H), 2,46 – 2,36 (m, 3H), 2,29 (q, $J = 7,7$ Hz, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,65 – 1,51 (m, 10H), 1,36 – 1,24 (m, 44H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm. MS: 929,93 m/z [M+H].

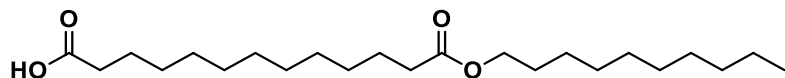
Síntesis del ejemplo 91

Intermedio 91a: Ácido 13-cloro-13-oxotridecanoico



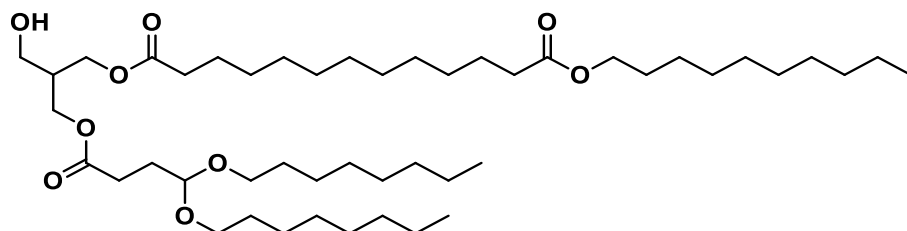
El intermedio 91a se sintetizó con rendimiento cuantitativo a partir de ácido tridecanodioico usando el método empleado para 90a.

Intermedio 91b: Ácido 13-(deciloxi)-13-oxotridecanoico



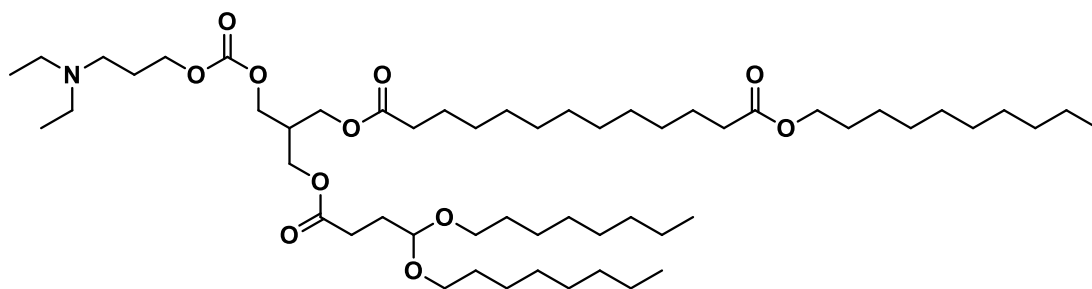
Se sintetizó el Intermedio 91b en 17 % de rendimiento a partir del Intermedio 91a y decan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 90b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,06 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,37 – 2,27 (m, 4H), 1,64 (m, 6H), 1,27 (m, 28H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm; MS: 383,3 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Intermedio 91c: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 13-decil tridecanodioato



Se sintetizó el intermedio 91c en 40 % de rendimiento a partir del Intermedio 91b y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,12 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,65 – 3,51 (m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,34 – 2,22 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,58 (m, 10H), 1,38 – 1,20 (m, 48H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 821,77 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

Ejemplo 91: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 13-decil tridecanodioato

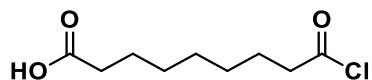


El ejemplo 91 se sintetizó con 56 % de rendimiento a partir del Intermedio 91c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,21 – 4,08 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (q, $J = 7,1$ Hz, 6H), 2,46 – 2,36 (m, 3H), 2,29 (q, $J = 7,8$

Hz, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,65 – 1,52 (m, 10H), 1,36 – 1,22 (m, 48H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 958,01 m/z [M+H].

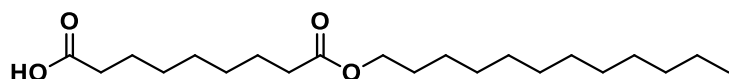
Síntesis del ejemplo 92

Intermedio 92a: Ácido 9-cloro-9-oxononanoico



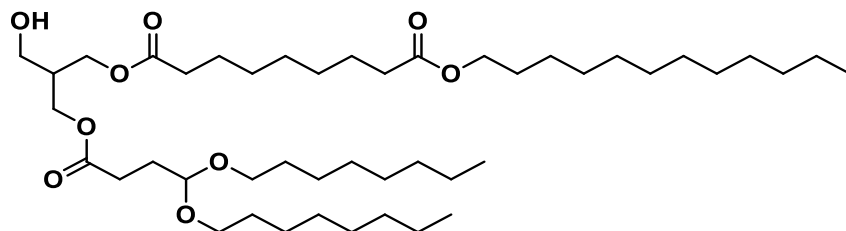
El intermedio 92a se sintetizó con rendimiento cuantitativo a partir de ácido nonanodioico usando el método empleado para 90a.

Intermedio 92b: Ácido 9-(dodeciloxi)-9-oxononanoico



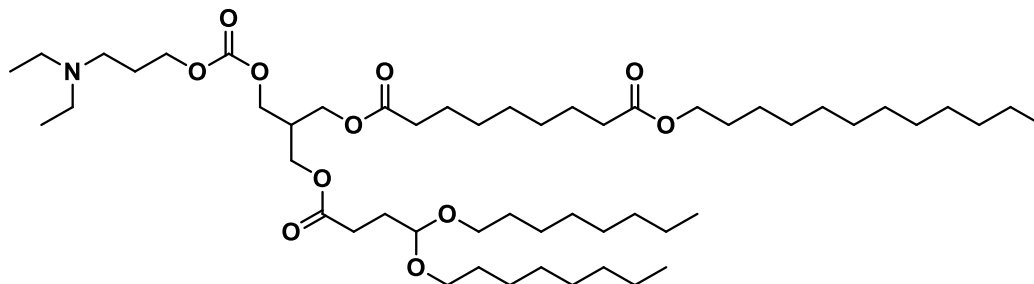
Se sintetizó el intermedio 92b en 31 % de rendimiento a partir del Intermedio 92a y dodecan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 90b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,06 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,37 – 2,28 (m, 4H), 1,63 (m, 6H), 1,37 – 1,27 (m, 24H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm; MS: 355,2 m/z [M-H].

Intermedio 92c: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-dodecil nonanodioato



Se sintetizó el intermedio 92c en 43 % de rendimiento a partir del Intermedio 92b y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,12 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,65 – 3,51 (m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,30 (dt, $J = 12,0, 7,6$ Hz, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,5$ Hz, 2H), 1,66 – 1,48 (m, 11H), 1,37 – 1,22 (m, 43H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 793,77 m/z [M+Na].

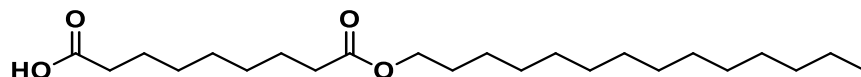
Ejemplo 92: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-dodecil nonanodioato



El ejemplo 92 se sintetizó con 53 % de rendimiento a partir del Intermedio 92c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,09 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 2,50 (m, 6H), 2,45 – 2,35 (m, 3H), 2,34 – 2,24 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,71 – 1,51 (m, 10H), 1,37 – 1,21 (m, 44H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 929,53 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

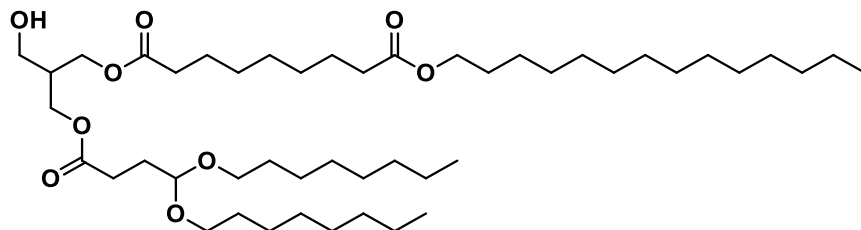
Síntesis del ejemplo 93

Intermedio 93a: Ácido 9-oxo-9-(tetradeciloxi)nonanoico



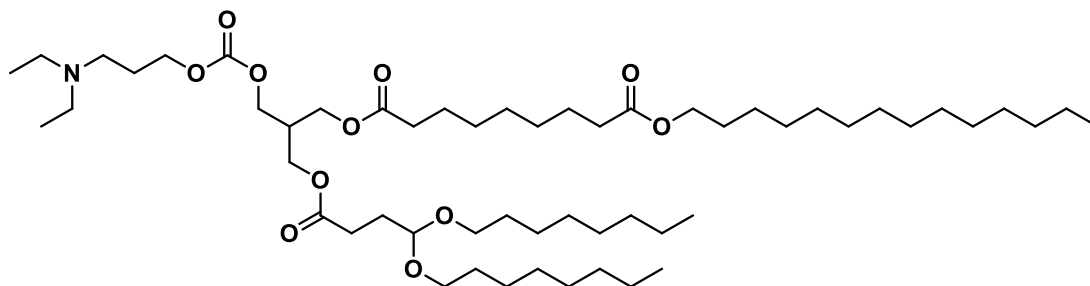
Se sintetizó el intermedio 93a en 11 % de rendimiento a partir del Intermedio 92a y tetradecan-1-ol con el método empleado para el Intermedio 90b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,06 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,37 – 2,28 (m, 4H), 1,62 (m, 6H), 1,33 – 1,26 (m, 30H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm; MS: 383,3 m/z $[\text{M}-\text{H}]$.

Intermedio 93b: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-tetradecil nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 93b en 45 % de rendimiento a partir del Intermedio 93a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,12 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,65 – 3,50 (m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3$, 6,7 Hz, 2H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,35 – 2,24 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,5$, 5,5 Hz, 2H), 1,66 – 1,49 (m, 11H), 1,38 – 1,21 (m, 46H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 822,00 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

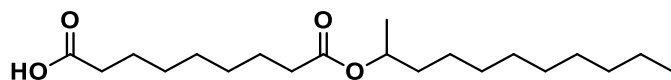
Ejemplo 93: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-tetradecil nonanodioato



El ejemplo 93 se sintetizó con 47 % de rendimiento a partir del Intermedio 93b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,08 (m, 8H), 4,05 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,50 (q, $J = 7,1$ Hz, 6H), 2,45 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,67 – 1,49 (m, 12H), 1,37 – 1,21 (m, 47H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 5H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 943,03 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

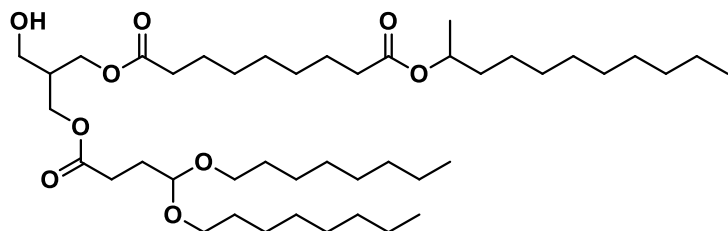
Síntesis del ejemplo 94

Intermedio 94a: Ácido 9-oxo-9-(undecan-2-iloxi)nonanoico



Se sintetizó el intermedio 94a en 30 % de rendimiento a partir del Intermedio 92a y undecan-2-ol con el método empleado para el Intermedio 90b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,90 (m, 1H), 2,35 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,27 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,30 (m, 26H), 1,20 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H), 0,89 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H) ppm; MS: 341,2 m/z $[\text{M}-\text{H}]$.

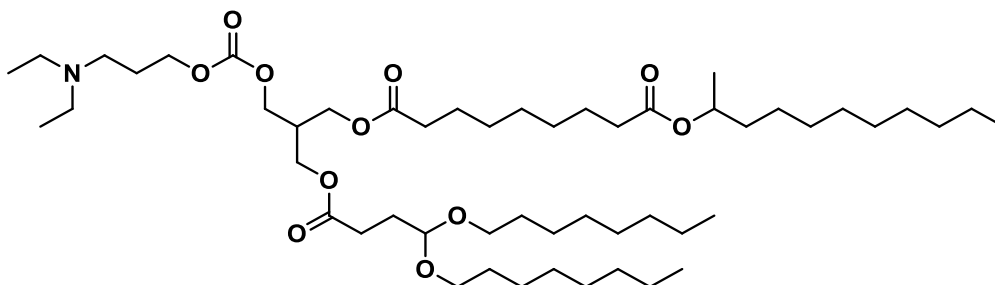
Intermedio 94b: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-(undecan-2-il) nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 94b en 39 % de rendimiento a partir del Intermedio 94a y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,88 (m, 1H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,11 (m, 4H), 3,66 – 3,52 (m, 4H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H),

2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,35 – 2,23 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,66 – 1,22 (m, 50H), 1,19 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H), 0,87 (m, 9H) ppm; MS: 779,78 m/z [M+Na].

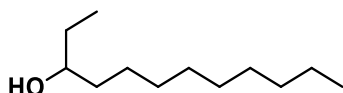
Ejemplo 94: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-(undecan-2-il) nonanodioato



El ejemplo 94 se sintetizó con 63 % de rendimiento a partir del Intermedio 94b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,89 (m, 1H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,22 – 4,07 (m, 8H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,39 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,55 – 2,45 (m, 6H), 2,45 – 2,35 (m, 3H), 2,34 – 2,22 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,64 – 1,26 (m, 50H), 1,19 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,00 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 915,44 m/z [M+H].

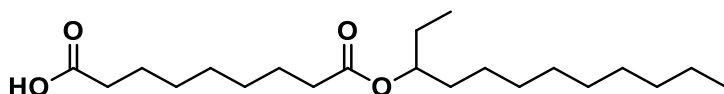
Síntesis del ejemplo 95

Intermedio 95a: dodecan-3-ol



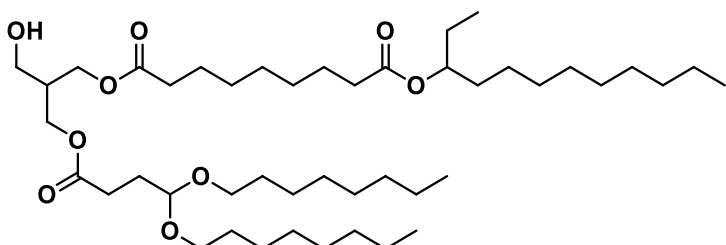
A una solución de decanal (12,8 mL, 64 mmol) en THF (100 mL) se añadió bromo(etil)magnesio (3 M, 19,20 mL) por goteo a -78°C . La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 2 h, se diluyó con agua (200 mL) y se extrajo en EtOAc (2 X 200 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (2-2,5 % de EtOAc en éter de petróleo) para proporcionar 6,9 g (37 mmol, 64 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite incoloro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 3,53 (m, 1H), 1,49 – 1,27 (m, 18H), 0,95 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 95b: Ácido 9-(dodecan-3-iloxi)-9-oxononanoico



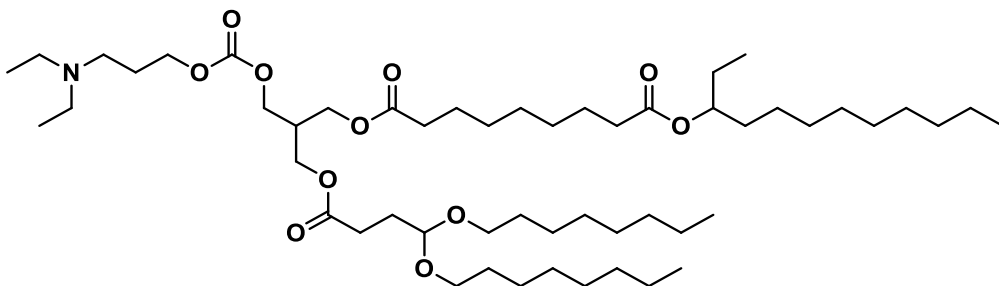
Se sintetizó el Intermedio 95b en 38 % de rendimiento a partir del Intermedio 92a y dodecan-3-ol con el método empleado para el Intermedio 90b. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,82 (m, 1H), 2,37 – 2,27 (m, 4H), 1,63 (m, 8H), 1,34 – 1,26 (m, 20H), 0,88 (m, 6H) ppm; MS: 355,2 m/z [M-H].

Intermedio 95c: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil) 9-(dodecan-3-il) nonanodioato



Se sintetizó el Intermedio 95c en 42 % de rendimiento a partir del Intermedio 95b y el Intermedio 54b usando el método que se empleó para el Intermedio 54c. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,80 (m, 1H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,23 – 4,10 (m, 4H), 3,66 – 3,50 (m, 4H), 3,39 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,36 – 2,24 (m, 5H), 2,19 (m, 1H), 1,93 (td, J = 7,6, 5,4 Hz, 2H), 1,67 – 1,46 (m, 11H), 1,38 – 1,18 (m, 40H), 0,87 (m, 12H) ppm; MS: 793,77 m/z [M+Na].

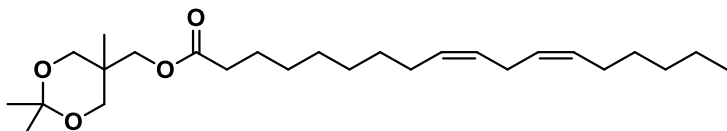
Ejemplo 95: 1-(3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil) 9-(dodecan-3-il) nonanodioato



El ejemplo 95 se sintetizó con 63 % de rendimiento a partir del Intermedio 95c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 4,82 (m, 1H), 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,22 – 4,07 (m, 8H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,50 (q, J = 6,9 Hz, 6H), 2,45 – 2,35 (m, 3H), 2,29 (q, J = 7,5 Hz, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,68 – 1,47 (m, 11H), 1,37 – 1,23 (m, 41H), 1,00 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 0,87 (m, 12H) ppm; MS: 929,03 m/z [M+H].

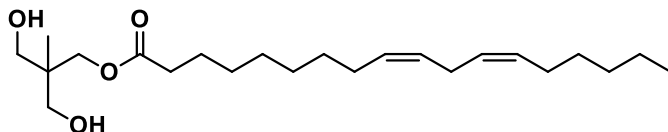
Síntesis del ejemplo 96

Intermedio 96a: (2,2,5-trimetil-1,3-dioxan-5-il)metil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



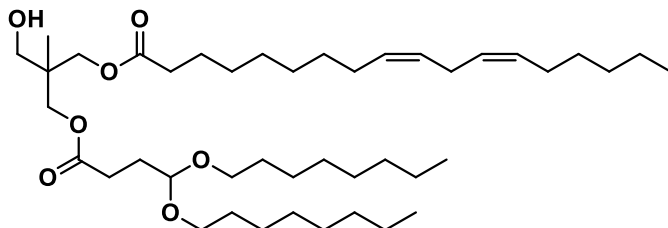
A una solución de (2,2,5-trimetil-1,3-dioxan-5-il) metanol (2 g, 12,4 mmol), ácido linoleico (4,23 mL, 13,6 mmol), DMAP (302 mg, 2,48 mmol), y DIPEA (4,32 mL, 24,8 mmol) en DCM (50 mL) se agregó EDC·HCl (3,56 g, 18,6 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 48 horas y luego se diluyó con agua (25 mL). Se recolectó la capa orgánica, se lavó con agua (25 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-100 % de EtOAc en hexanos) para proporcionar 2,16 g (5,11 mmol, 41 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. MS: 867,22 m/z [M+Na].

Intermedio 96b: 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se disolvió el Intermedio 96a (2,16 g, 5,11 mmol) en metanol (50 mL) y se añadió resina Dowex 50x8. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 16 h a ta, se filtró y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-60 % de EtOAc en hexanos) para proporcionar 1,43 g (3,73 mmol, 73 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,20 (s, 2H), 3,58 (dd, J = 11,3, 4,2 Hz, 2H), 3,51 (dd, J = 11,3, 4,9 Hz, 2H), 2,81 – 2,74 (m, 2H), 2,71 (m, 2H), 2,36 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,05 (dt, J = 8,5, 6,7 Hz, 4H), 1,69 – 1,56 (m, 2H), 1,40 – 1,25 (m, 14H), 0,89 (m, 3H), 0,84 (s, 3H) ppm.

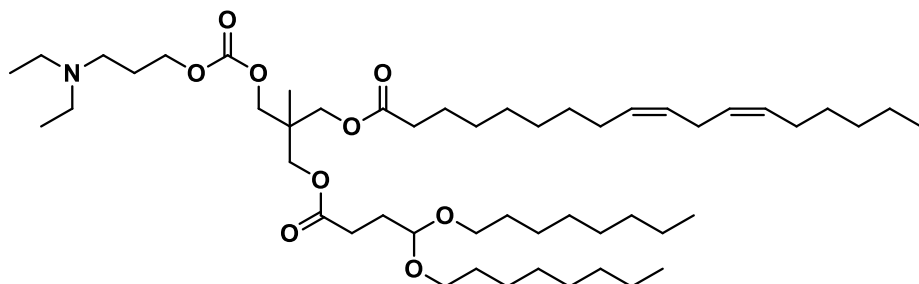
Intermedio 96c: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)-2-metilpropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el Intermedio 96c en 67 % de rendimiento a partir del Intermedio 96b y el Intermedio 1c usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,49 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,02 (d, J = 2,7 Hz, 4H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,44 – 3,36 (m, 4H), 2,80 – 2,74 (m, 2H), 2,42 (t, J = 7,5 Hz, 3H), 2,33 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,05 (q, J = 6,8 Hz,

4H), 1,94 (td, $J = 7,5, 5,4$ Hz, 2H), 1,69 – 1,50 (m, 7H), 1,40 – 1,20 (m, 34H), 0,95 (s, 3H), 0,88 (m, 9H) ppm.

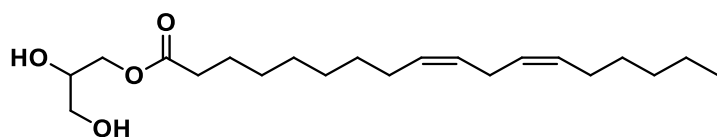
Ejemplo 96: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)-2-metilpropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



El ejemplo 96 se sintetizó con 32 % de rendimiento a partir del Intermedio 96c y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,18 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,06 (s, 2H), 4,01 (m, 4H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,51 (q, $J = 7,1$ Hz, 6H), 2,40 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,31 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 5H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,67 – 1,49 (m, 12H), 1,42 – 1,19 (m, 38H), 1,05 – 0,96 (m, 9H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 867,22 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

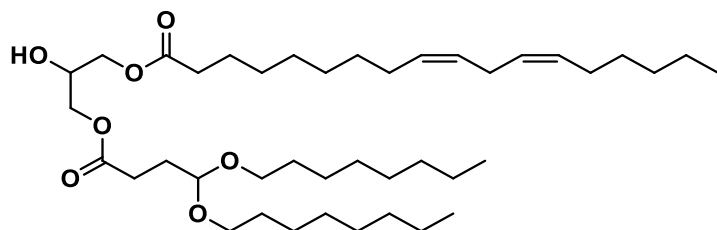
Síntesis del ejemplo 97

Intermedio 97a: 2,3-dihidroxipropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



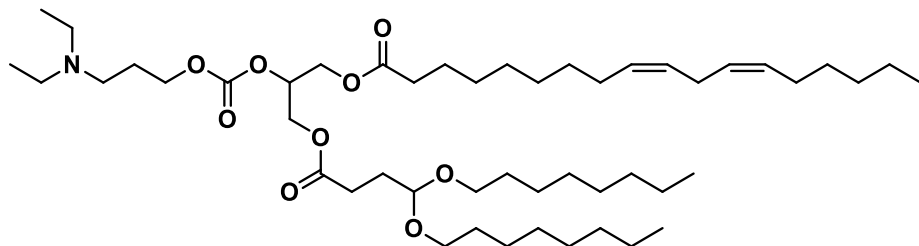
A una solución de glicerol (1,59 g, 17,3 mmol) en DCM (172 mL) se añadió ácido linoleico (35,6 mmol), DMAP (423 mg, 3,47 mmol) y DIPEA (7,23 mL, 41,6 mmol) a ta. Se añadió EDC·HCl (8,05 g, 41,6 mmol) en tres porciones durante 15 min, seguido de la adición de DMF (1 mL). La mezcla de reacción resultante se agitó durante 16 h, se lavó con agua, HCl 1M y NaHCO_3 al 5 %, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (gradiente de EtOAc en hexanos) para proporcionar 2,10 g (5,9 mmol, 34 % de rendimiento) del producto deseado. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 4,24 – 4,06 (m, 2H), 3,92 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 3,59 (dt, $J = 11,0, 5,1$ Hz, 1H), 2,76 (m, 2H), 2,67 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 2,34 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,25 (m, 1H), 2,04 (m, 4H), 1,63 (m, 2H), 1,41 – 1,22 (m, 14H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm.

Intermedio 97b: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-hidroxipropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el Intermedio 97b en 11 % de rendimiento a partir del Intermedio 97a y el Intermedio 1c usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,35 (m, 4H), 4,50 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,23 – 4,05 (m, 5H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (m, 2H), 2,55 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 2,44 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,35 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,95 (td, $J = 7,4, 5,5$ Hz, 2H), 1,70 – 1,51 (m, 8H), 1,39 – 1,21 (m, 34H), 0,88 (m, 9H) ppm.

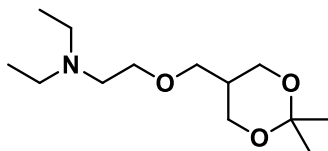
Ejemplo 97: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)-carbonil)oxi)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 96b (170 mg, 0,25 mmol) en acetonitrilo (5 mL) se añadió piridina (40 μL , 0,5 mmol) y cloroformiato de 4-nitrofenilo (70 mg, 0,35 mmol) secuencialmente a ta. Después de agitar durante 4 h, se añadió 3-dietilamino-1-propanol (111 μL , 0,75 mmol) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 2 h más. La mezcla de reacción se extrajo en hexanos (10 mL), se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-100 % de EtOAc en hexanos) para proporcionar 52 mg (0,062 mmol, 25 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,36 (m, 4H), 5,08 (m, 1H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,34 (m, 2H), 4,25 – 4,13 (m, 4H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,40 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,56 – 2,46 (m, 6H), 2,41 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,36 – 2,28 (m, 2H), 2,05 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,67 – 1,52 (10H), 1,40 – 1,23 (m, 34H), 1,01 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 840,03 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

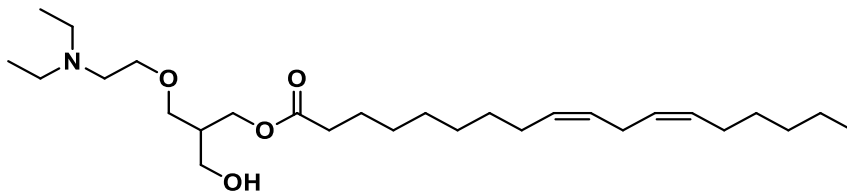
Síntesis del ejemplo 98

Intermedio 98a: 2-((2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metoxi)-N,N-dietiletan-1-amina



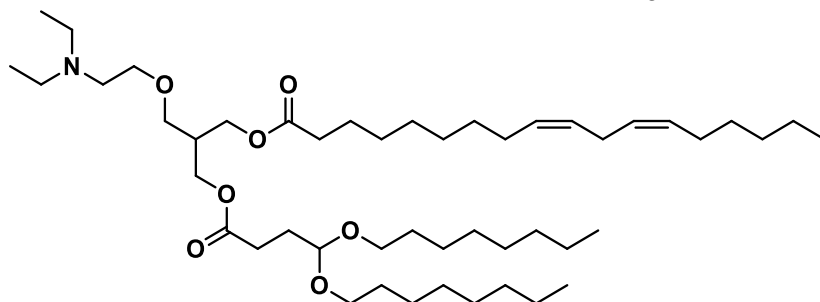
A una mezcla de hidruro de sodio al 95 % (2,5 equiv.) en DCM anhidro (1,7-4,3 M) a 0 °C se añadió una solución de (2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il) metanol (1 equiv) en DCM anhidro (0,45-1,1 M). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 15 min, seguido de la adición de bromhidrato de (2-bromoetil)dietilamina (1,23 g, 4,78 mmol, 1,4 equiv.). La reacción se calentó a ta y se agitó durante 2 h, antes de volver a enfriarse a 0 °C, se diluyó con agua y se extrajo en EtOAc. La capa orgánica se recogió, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró al vacío para proporcionar 370 mg (1,50 mmol, 44 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite transparente, que no se purificó más. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 3,95 (m, 2H), 3,75 (m, 2H), 3,51 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,47 (d, J = 6,7 Hz, 2H), 2,64 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,57 (q, J = 7,1 Hz, 4H), 1,98 (m, 1H), 1,42 (s, 3H), 1,40 (s, 3H) 1,02 (t, J = 7,1 Hz, 6H) ppm; MS: 246,40 [M+H].

Intermedio 98b: 3-(2-(dietilamino)etoxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se añadió HCl 4N en 1,4-dioxano (10 mL, 40 equiv.) puro al Intermedio 98a (1 equiv.). La mezcla de reacción resultante se agitó a ta durante 2 h y luego se concentró al vacío para proporcionar el intermedio desprotegido con acetónido. El residuo bruto, ácido linoleico (0,9-1,5 equiv.), DIPEA (2-3,2 equiv.) y DMAP (0,15-0,26 equiv.) se disolvieron en DCM (0,2-0,3 M). Se añadió EDC-HCl (1,2-1,9 equiv.) a la solución y la mezcla de reacción se agitó durante 16 h a ta. La mezcla de reacción se concentró al vacío y luego se purificó usando cromatografía en gel de sílice (0-100 % de EtOAc en hexanos, seguido de 0-10 % de MeOH en DCM) para proporcionar 550 mg (78 % de rendimiento en dos etapas) del producto deseado como una goma blanca. MS: 469,08 [M+H].

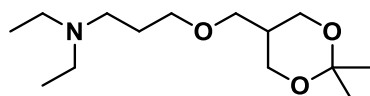
Ejemplo 98: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((2-(dietilamino)etioxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución de Intermedio 98b (1 equiv.), DIPEA (1,5 equiv.), DMAP (0,2 equiv.) e Intermedio 1c (1 equiv.) en DCM (0,1-0,5 M) se añadió EDC-HCl (1,5 equiv.) a ta. La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a ta, se concentró al vacío y se purificó usando cromatografía en gel de sílice (MeOH al 0-10 % en DCM con hidróxido de amonio al 0,1 %). Las fracciones de producto se reunieron, se concentraron al vacío y se destilaron azeotrópicamente con 50 mL de tolueno (tres veces) para eliminar el hidróxido de amonio residual y proporcionar 174 mg (0,22 mmol, 19 % de rendimiento) del producto deseado como un aceite amarillo pálido. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,43 – 5,28 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,18 – 4,07 (m, 4H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,52 – 3,32 (m, 6H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,63 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,55 (q, $J = 7,2$ Hz, 4H), 2,39 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,29 (m, 3H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,57 (m, 7H), 1,31 (m, 33H), 1,02 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,93 – 0,84 (m, 9H) ppm; MS: 795,56 M+H (ESI+).

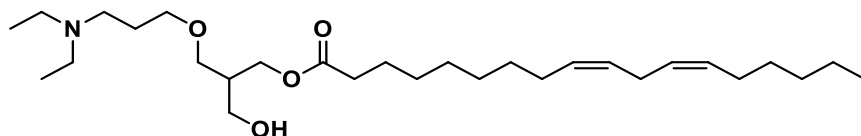
Síntesis del ejemplo 99

Intermedio 99a: 3-((2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metoxi)-N,N-dietilpropan-1-amina



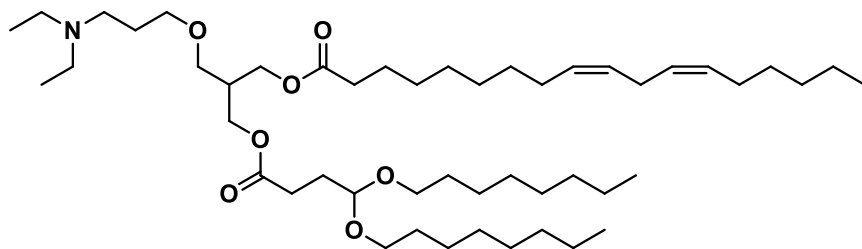
El intermedio 99a se sintetizó con un rendimiento del 77 % a partir de bromhidrato de (3-bromopropil)dietilamina y (2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il)metanol usando el método empleado para el Intermedio 98a. MS: 260,58 [M+H].

Intermedio 99b: 3-(3-(dietilamino)propoxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



Se sintetizó el Intermedio 99b en 50 % de rendimiento (dos etapas) a partir del Intermedio 99a y ácido linoleico usando el método que se empleó para el Intermedio 98b. MS: 483,12 [M+H].

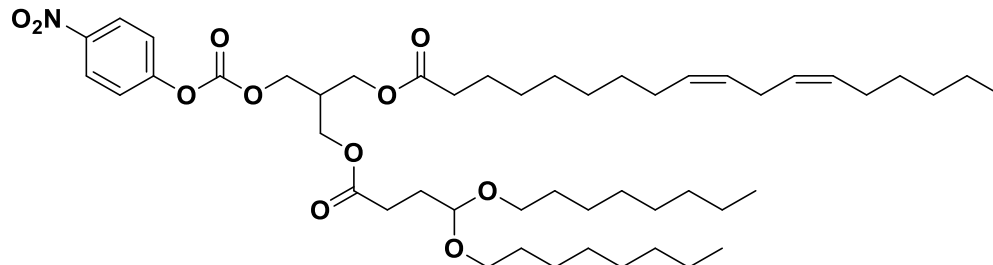
Ejemplo 99: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



El Ejemplo 99 se sintetizó con 20 % de rendimiento a partir del Intermedio 99b y el Intermedio 1c mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 98. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 – 5,27 (m, 4H), 4,48 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,13 (m, 4H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 3,46 – 3,34 (m, 6H), 2,77 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,56 – 2,43 (m, 6H), 2,39 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,29 (m, 3H), 2,05 (q, J = 6,8 Hz, 4H), 1,93 (m, 2H), 1,64 (m, 9H), 1,36 – 1,26 (m, 33H), 1,01 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 809,74 $[\text{M}+\text{H}]$.

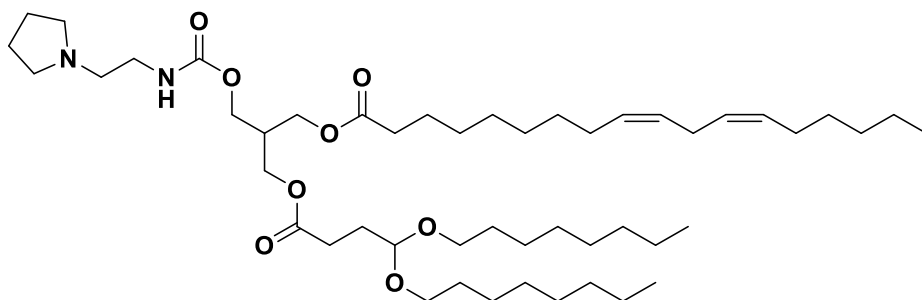
Síntesis del ejemplo 100

Intermedio 100a: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 1d (3 g, 1,0 equiv.) y carbonocloridato de (4-nitrofenilo) (1,74 g, 2,0 equiv.) en DCM (30 mL) se le agregó piridina (1,05 mL, 3,0 equiv.) a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 h en atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el DCM. El residuo se diluyó con H_2O y se extrajo 2x con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (2,5 g, 67%).

Ejemplo 100: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(pirrolidin-1-il)etil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



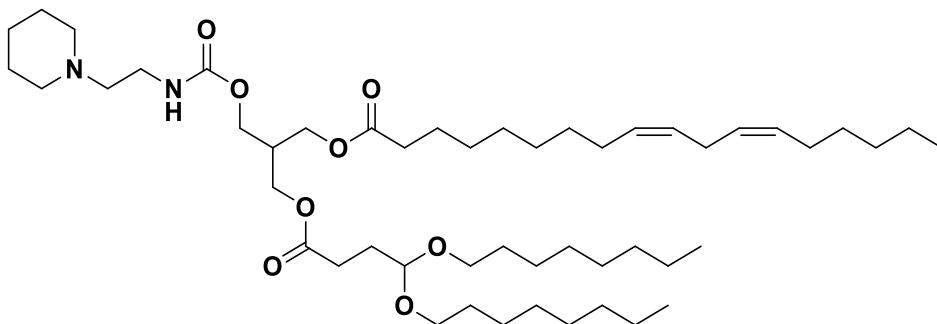
A una solución del Intermedio 100a (500 mg, 1,0 equiv.) en MeCN (9 mL) se le agregó 2-pirrolidin-1-iletanamina (133 mg, 2,0 equiv.), piridina (94 μ L, 2,0 equiv.) y DMAP (71 mg, 1,0 equiv.). La mezcla se agitó a 20 °C durante 5 h en atmósfera de N₂. La mezcla se concentró a presión reducida para eliminar el solvente. El residuo se diluyó con EtOAc y se lavó 5x con NaHCO₃ 1 N y 3x con H₂O. La capa orgánica se secó en Na₂SO₄, se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (150 mg, 31 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,36 – 5,22 (m, 4H), 5,20 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 4,42 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,05 (t, J = 5,4 Hz, 6H), 3,49 (dt, J = 9,4, 6,7 Hz, 2H), 3,38 – 3,30 (m, 2H), 3,21 (q, J = 5,8 Hz, 2H), 2,70 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,51 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 2,43 (d, J = 6,2 Hz, 4H), 2,33 (dd, J = 9,7, 5,5 Hz, 3H), 2,23 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 1,98 (q, J = 6,9 Hz, 4H), 1,85 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 2H), 1,70 (q, J = 3,3 Hz, 4H), 1,57 – 1,44 (m, 12H), 1,23 (ddt, J = 18,4, 10,5, 6,3 Hz, 37H), 0,84 – 0,78 (m, 9H). MS: 836,3 m/z [M+H].

Síntesis de los ejemplos 101-103

Los siguientes ejemplos se sintetizaron a partir del Intermedio 100a y un reactivo aminoalcohol o diamina usando el método empleado para el Ejemplo 100.

Ejemplo 101

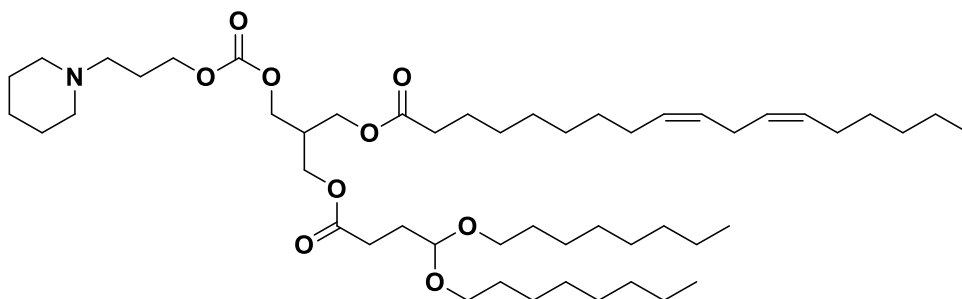
Ejemplo 101: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((2-(piperidin-1-il)etil)carbamoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



32 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,36 – 5,17 (m, 4H), 4,41 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,18 – 4,02 (m, 8H), 3,49 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,33 (dt, $J = 9,3, 6,6$ Hz, 2H), 2,68 (dt, $J = 19,3, 6,5$ Hz, 4H), 2,50 (q, $J = 7,2$ Hz, 4H), 2,40 – 2,28 (m, 3H), 2,23 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,98 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,85 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,61 – 1,44 (m, 12H), 1,32 – 1,14 (m, 35H), 0,96 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,82 (td, $J = 6,9, 4,0$ Hz, 9H). MS: 850,3 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 102

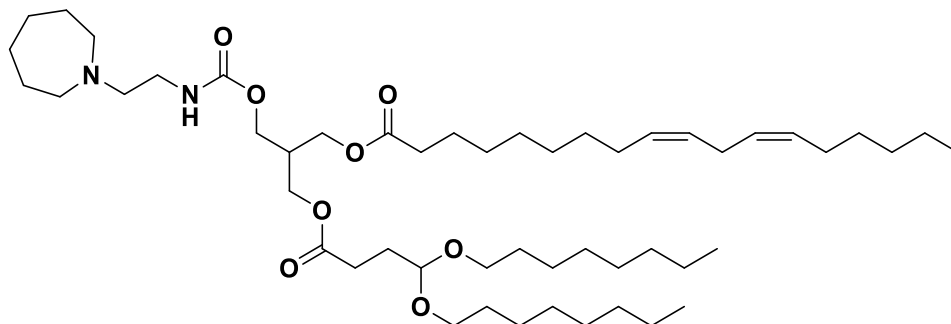
Ejemplo 102: 3-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(piperidin-1-il)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



91 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,36 – 5,21 (m, 4H), 4,41 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,16 – 4,00 (m, 8H), 3,49 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,33 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,70 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,40 – 2,19 (m, 11H), 1,98 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,89 – 1,74 (m, 4H), 1,60 – 1,43 (m, 14H), 1,41 – 1,08 (m, 36H), 0,82 (td, $J = 6,9, 4,0$ Hz, 9H). MS: 865,3 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 103

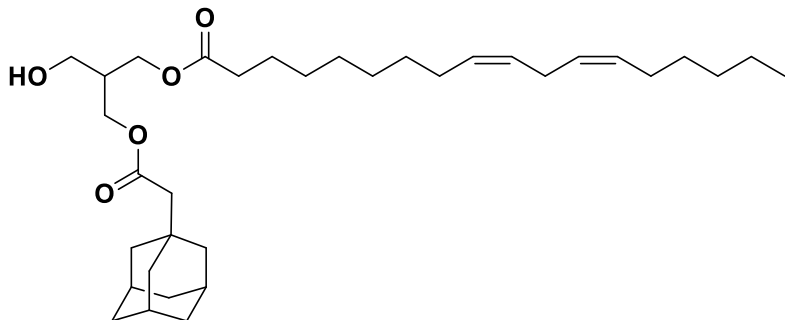
Ejemplo 103: 3-(((2-(azepan-1-il)etil)carbamoil)oxi)-2-(((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



47 % rendimiento; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,67 (s, 1H), 5,42 – 5,29 (m, 4H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,12 (qt, $J = 6,2, 4,1, 3,7$ Hz, 7H), 3,56 (dt, $J = 9,3, 6,7$ Hz, 2H), 3,44 – 3,38 (m, 2H), 3,27 (q, $J = 5,6$ Hz, 2H), 2,71 (ddt, $J = 30,8, 24,9, 12,7$ Hz, 8H), 2,35 (dt, $J = 37,4, 7,7$ Hz, 6H), 2,27 – 1,99 (m, 13H), 1,92 (td, $J = 7,6, 5,5$ Hz, 2H), 1,60 (ddt, $J = 24,3, 21,1, 6,7$ Hz, 14H), 1,40 – 1,19 (m, 35H), 0,88 (td, $J = 6,8, 4,0$ Hz, 9H). MS: 864,3 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

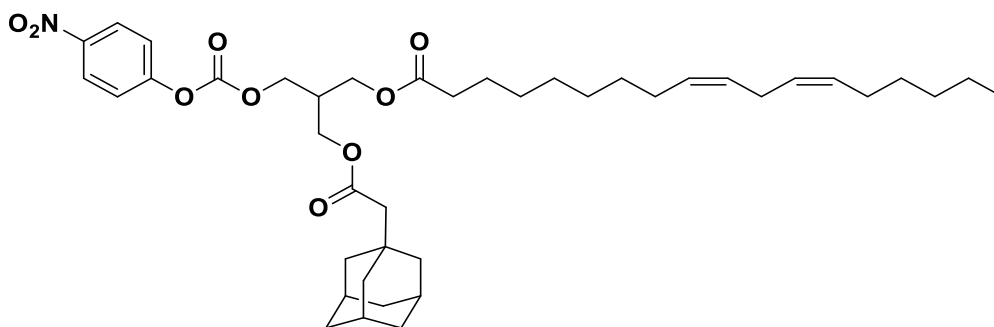
Síntesis del ejemplo 107

Intermedio 107a: 3-(2-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il)acetoxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 1a (4 g, 1,0 equiv.) en DCM (40 mL) se añadió EDCI (2,5 g, 1,2 equiv.), DMAP (132 mg, 0,1 equiv.) y DIPEA (3,78 mL, 2,0 equiv. ácido-(1-adamantil)acético (2,11 g, 1,0 equiv.) se añadió a la mezcla anterior a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 h en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el DCM. El residuo se diluyó con H₂O y se extrajo 2x con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (4 g, 68 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,37 – 5,20 (m, 4H), 4,19 – 4,01 (m, 4H), 3,56 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 2,70 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,25 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,13 (dt, J = 11,6, 5,8 Hz, 2H), 2,04 – 1,95 (m, 6H), 1,90 (q, J = 3,2 Hz, 3H), 1,64 (dt, J = 12,3, 3,0 Hz, 3H), 1,55 (dd, J = 15,4, 2,5 Hz, 11H), 1,33 – 1,15 (m, 15H), 0,87 – 0,77 (m, 3H).

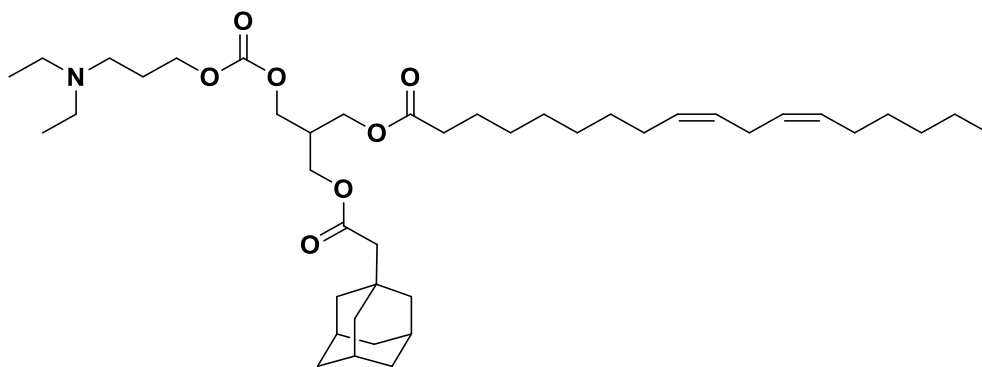
Intermedio 107b: 3-(2-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il)acetoxi)-2-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 107a (3 g, 1,0 equiv.), (4-nitrofenil) carbonocloridato (3,3 g, 3,0 equiv.) en DCM (30 mL) se añadió piridina (1,3 mL, 3,0 equiv.) a 0 °C. La mezcla se agitó a 20 °C durante 2-5 h en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente. El residuo se diluyó con hexanos, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida

para brindar el producto deseado. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice para obtener el producto como un aceite incoloro (3 g, 76 % rendimiento). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,31 (dd, $J = 9,3, 3,1$ Hz, 2H), 7,41 (dd, $J = 9,3, 3,0$ Hz, 2H), 5,37 (dtp, $J = 11,1, 7,1, 3,9$ Hz, 4H), 4,39 (dd, $J = 6,0, 3,0$ Hz, 2H), 4,23 (dt, $J = 9,5, 4,1$ Hz, 4H), 2,80 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,54 (ddt, $J = 11,6, 8,5, 4,3$ Hz, 1H), 2,35 (td, $J = 7,6, 3,0$ Hz, 2H), 2,17 – 1,95 (m, 9H), 1,78 – 1,58 (m, 15H), 1,42 – 1,26 (m, 15H), 0,91 (td, $J = 6,8, 3,0$ Hz, 3H).

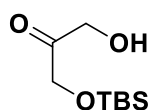
Ejemplo 107: 3-(2-((3r,5r,7r)-adamantan-1-il)acetoxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 107b (1 g, 1,0 equiv.) en MeCN (10 mL) se le agregó 3-(dietilamino)propan-1-ol (555 mg, 3,0 equiv.), piridina (342 μL , 2,0 equiv.) y DMAP (17 mg, 0,1 equiv.). La mezcla se agitó a 20 °C durante 12 h en atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente. El residuo se diluyó con H_2O y se extrajo 3x con EtOAc. La capa orgánica se secó en Na_2SO_4 , se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite amarillo pálido (432 mg, 44 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,28 (tt, $J = 11,2, 5,5$ Hz, 4H), 4,21 – 3,97 (m, 8H), 2,70 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,40 (dq, $J = 29,5, 6,5, 6,0$ Hz, 7H), 2,24 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,98 (dd, $J = 14,6, 7,7$ Hz, 6H), 1,94 – 1,85 (m, 3H), 1,74 (p, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,68 – 1,46 (m, 16H), 1,24 (d, $J = 6,6$ Hz, 14H), 0,94 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,82 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H). MS: 703,3 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis del ejemplo 113

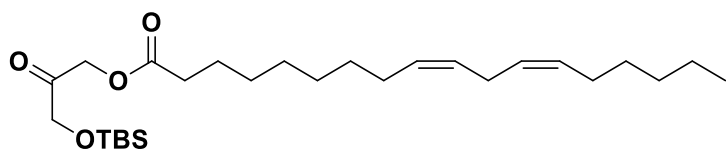
Intermedio 113a: 1-((terc-butildimetilsilil)oxi)-3-hidroxipropan-2-ona



A una mezcla de 1,3-dihidroxipropan-2-ona (20 g, 1,0 equiv.) en THF (150 mL) se añadió imidazol (15,12 g, 1,0 equiv.). A continuación, se añadió por goteo una mezcla de TBSCl (1,0 equiv.) en THF

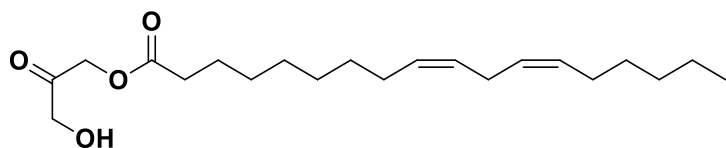
(150 mL) a la mezcla anterior a 0 °C. La mezcla se agitó a 15 °C durante 2 h bajo N₂. Después de completarse, la mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo 3x con EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó 2x con salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (5,5 g, 12 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,47 (s, 2H), 4,28 (s, 2H), 0,91 – 0,87 (m, 12H), 0,14 – 0,01 (m, 9H).

Intermedio 113b: 3-((terc-butildimetilsilil)oxi)-2-oxopropilo (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



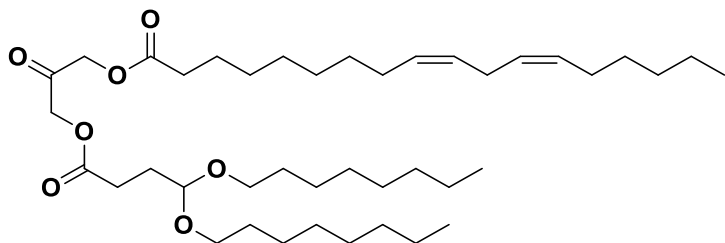
A una mezcla de Intermedio 113a (5,5 g, 1,0 equiv.), EDCI (6,19 g, 1,2 equiv.), DMAP (658 mg, 0,2 equiv.) y DIPEA (14,06 mL, 3,0 equiv.) en DCM (55 mL) se añadió ácido (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienoico (7,6 mL, 1,0 equiv.). La reacción se agitó a 15 °C durante 12 h en N₂. Después de completarse, la mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo 3x con DCM. La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (7 g, 56 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,33 – 5,18 (m, 4H), 4,85 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 2,67 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,32 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,94 (q, J = 6,9 Hz, 4H), 1,57 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 1,32 – 1,13 (m, 14H), 0,87 – 0,74 (m, 12H).

Intermedio 113c: 3-hidroxi-2-oxopropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



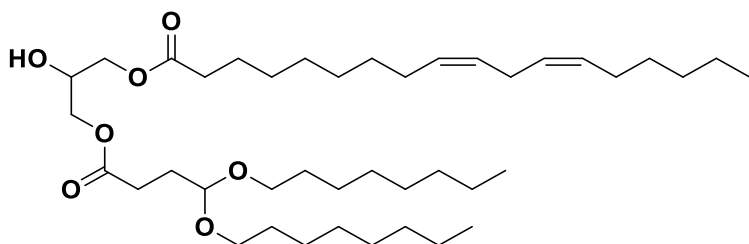
A una solución del Intermedio 113b (7,0 g, 1,0 equiv.) en THF (70 mL) se añadió por goteo HF-piridina (6,76 ml, 5,0 equiv.) a 0-15 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 15 °C. Después, la mezcla se vertió en agua y se extrajo 3x con EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (3 g, 57 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,35 (tp, J = 11,2, 3,6, 3,2 Hz, 4H), 4,76 (s, 1H), 4,37 (s, 1H), 2,93 (s, 1H), 2,77 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,43 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,39 – 2,31 (m, 1H), 2,05 (p, J = 7,1, 6,4 Hz, 4H), 1,65 (dp, J = 11,8, 6,4, 5,4 Hz, 2H), 1,41 – 1,22 (m, 15H), 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H).

Intermedio 113d: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-oxopropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



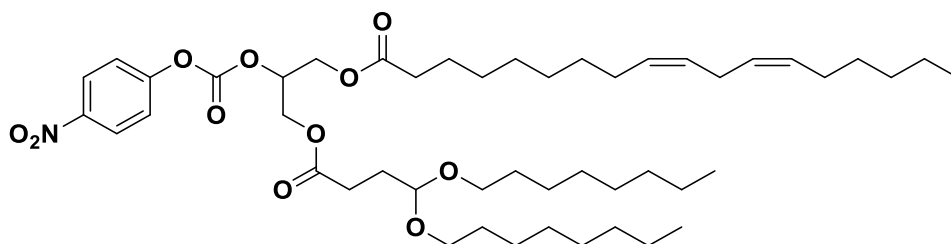
A una solución de Intermedio 113c (3 g, 1,0 equiv.), EDCI (1,96 g, 1,2 equiv.), DMAP (208 mg, 0,2 equiv.) y DIPEA (4,45 mL, 3,0 equiv.) en DCM (30 mL) se añadió el Intermedio 1c (2,93 g, 1,0 equiv.). Luego, la mezcla de reacción se agitó a 15 °C durante 12 h bajo N₂. El residuo se vertió en agua y se extrajo 3x con DCM. La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (4 g, 69 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,43 – 5,26 (m, 4H), 4,74 (d, J = 1,9 Hz, 4H), 4,50 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,11 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,56 (dt, J = 9,3, 6,6 Hz, 2H), 3,40 (dt, J = 9,3, 6,7 Hz, 2H), 2,76 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,50 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,41 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,04 (d, J = 5,9 Hz, 6H), 1,96 (dd, J = 7,5, 5,5 Hz, 2H), 1,65 (p, J = 7,2 Hz, 2H), 1,55 (q, J = 6,9 Hz, 4H), 1,40 – 1,19 (m, 33H), 0,87 (td, J = 6,8, 3,9 Hz, 8H).

Intermedio 113e: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-hidroxipropil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



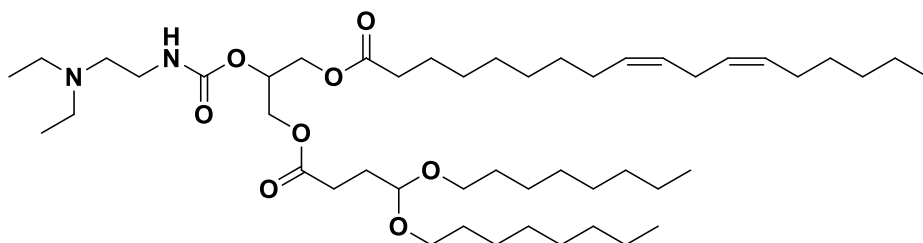
A una solución del Intermedio 113d (4 g, 1,0 equiv.) en THF (80 mL), H₂O (40 mL y tolueno (20 mL) se añadió NaBH₄ (1,11 g, 5,0 equiv.) a 5 °C. La mezcla se agitó a 5 °C durante 5 h. Luego se vertió la mezcla de reacción en NH₄Cl saturado y se extrajo 2x con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (2,5 g, 62 %).

Intermedio 113f: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 113e (2,5 g, 1,0 equiv.) y carbonocloridato de (4-nitrofenilo) (1,48 g, 2,0 equiv.) en DCM (25 mL) se agregó DMAP (4 mg, 0,01 equiv.) y piridina (5,93 mL, 20 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 5 h a 15 °C. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para eliminar el disolvente. El producto bruto (aceite incoloro) se utilizó directamente en el siguiente paso con purificación adicional (2,4 g, 79 %).

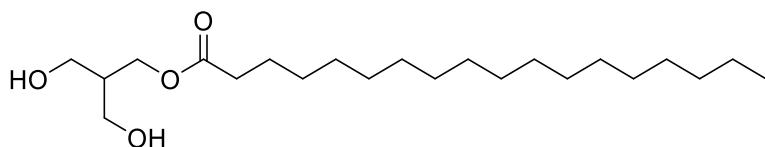
Ejemplo 113: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)oxi)propil (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato



A una solución del Intermedio 113f (800 mg, 1,0 equiv.) y N',N'-dietiletano-1,2-diamina (664 uL, 5,0 equiv.) en MeCN (10 mL) se añadió piridina (1,53 mL, 20 equiv.) y DMAP (12 mg, 0,1 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a 15 °C durante 12 h. La mezcla se vertió en agua y se extrajo 3x con EtOAc. La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto como un aceite incoloro (320 mg, 41 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,33 (ddt, J = 19,7, 13,2, 7,4 Hz, 4H), 5,19 – 5,09 (m, 1H), 4,47 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,25 (dt, J = 11,5, 3,8 Hz, 2H), 4,17 (dd, J = 11,9, 5,7 Hz, 2H), 3,55 (dt, J = 9,4, 6,7 Hz, 2H), 3,38 (dt, J = 9,2, 6,7 Hz, 2H), 3,21 (q, J = 5,7 Hz, 2H), 2,76 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,51 (q, J = 7,3 Hz, 5H), 2,39 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,03 (q, J = 6,9 Hz, 3H), 1,91 (td, J = 7,6, 5,5 Hz, 2H), 1,57 (dt, J = 21,9, 7,1 Hz, 5H), 1,29 (q, J = 10,3, 5,5 Hz, 25H), 0,99 (t, J = 7,1 Hz, 4H), 0,87 (td, J = 6,7, 3,9 Hz, 6H). MS: 825,4 m/z [M+H].

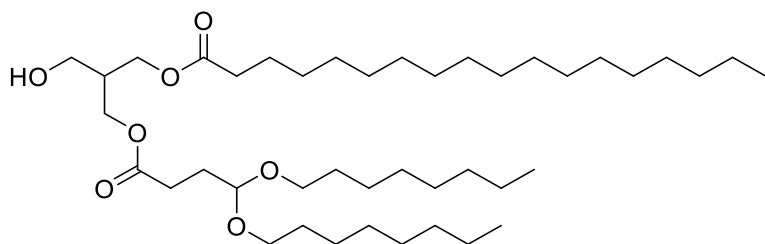
Síntesis del ejemplo 114

Intermedio 114a: Estearato de 3-Hidroxi-2-(hidroximetil)propil



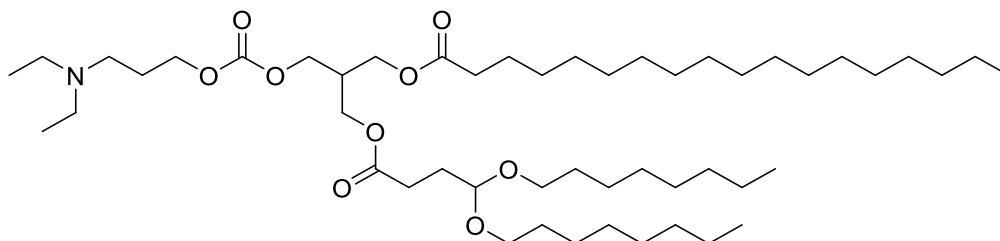
A una solución (2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il) metanol (1,53 g, 10,5 mmol), ácido esteárico (3 g, 10,5 mmol), DMAP (256 mg, 2,1 mmol) y DIPEA (4,39 ml, 25,2 mmol) en DCM (25 mL) se añadió EDC-HCl (2,41 g, 12,6 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 24 h luego se diluyó con agua (25 mL). La capa orgánica se recogió, se lavó con 1 HCl (10 mL), una solución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y luego con agua (10 mL). La capa orgánica se recogió, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se concentró al vacío. El residuo bruto se disolvió en metanol, seguido de hexanos hasta que la muestra se solubilizó por completo y se añadió resina Dowex® 50x8. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 24 h a ta, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 2,74 g (7,35 mmol, rendimiento del 70 %) del producto deseado en forma de un sólido blanco. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4,27 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,77 (m, 4H), 2,33 (m, 2H), 2,10 (s, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,62 (m, 2H), 1,25 (m, 29H), 0,87 (t, J = 6,7 Hz, 3H); MS: 373,32 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Intermedio 114b: Estearato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil



Se sintetizó el intermedio 114b en 43 % de rendimiento a partir del Intermedio 114a y el Intermedio 1c usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4,49 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,17 (m, 4H), 3,62 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,41 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,32 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,20 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,55 (m, 6H), 1,27 (m, 49H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 9H); MS: 721,78 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

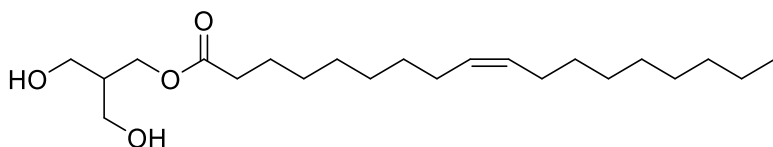
Ejemplo 114: Estearato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil



El ejemplo 114 se sintetizó con 30 % de rendimiento a partir del Intermedio 114b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 4,48 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,17 (m, 8H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,52 (s, 5H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,92 (m, 2H), 1,82 (s, 2H), 1,57 (m, 7H), 1,26 (m, 48H), 1,02 (t, J = 6,8 Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 857,14 m/z [M+H].

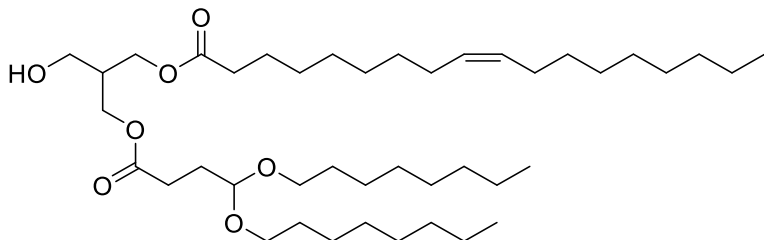
Síntesis del ejemplo 115

Intermedio 115a: Oleato de 3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil



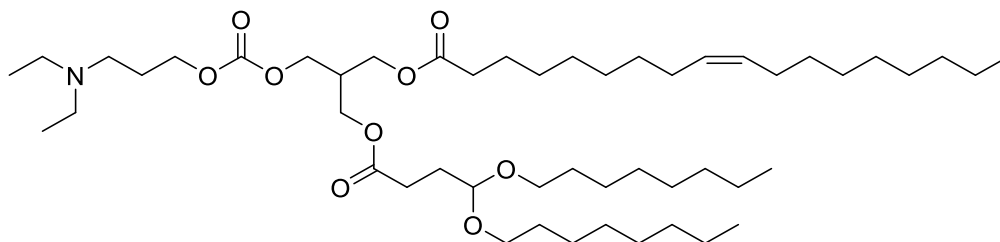
A una solución (2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il) metanol (1,53 g, 10,5 mmol), ácido oleico (3,37 mL, 10,5 mmol), DMAP (256 mg, 2,1 mmol) y DIPEA (4,39 mL, 25,2 mmol) en DCM (25 mL) se añadió EDC-HCl (2,41 g, 12,6 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 24 h luego se diluyó con agua (25 mL). La capa orgánica se recogió, se lavó con 1 HCl (10 mL), una solución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y luego con agua (10 mL). La capa orgánica se recogió, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se concentró al vacío. El residuo bruto se disolvió en metanol y se añadió resina Dowex® 50x8. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 24 h a ta, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 2,76 g (7,44 mmol, rendimiento del 70 %) del producto deseado en forma de un aceite transparente. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,35 (m, 2H), 4,27 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,77 (m, 4H), 2,33 (t, 7,5 Hz, 2H), 2,02 (m, 6H), 1,62 (m, 2H), 1,29 (m, 20H), 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H); MS: 371,29 m/z [M+H].

Intermedio 115b: Oleato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil



Se sintetizó el Intermedio 115b en 45 % de rendimiento a partir del Intermedio 115a y el Intermedio 1c usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,34 (m, 2H), 4,49 (t, J = 5,5 Hz, 1H) 4,18 (m, 4H), 3,62 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,41 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,32 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,01 (q, J = 6,2 Hz, 4H), 1,94 (m, 2H), 1,61 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 1,56 (m, 6H), 1,29 (m, 42H), 0,87 (m, 9H); MS: 720,52 m/z [M+Na].

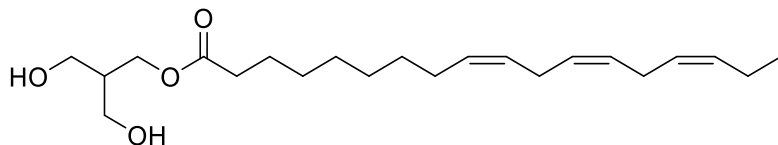
Ejemplo 115: Oleato de 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil



El ejemplo 115 se sintetizó con 40 % de rendimiento a partir del Intermedio 115b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,34 (m, 2H), 4,48 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,17 (m, 8H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,52 (s, 5H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,00 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,57 (m, 7H), 1,26 (m, 40H), 1,02 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,88 (m, 9H) ppm; MS: 855,37 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

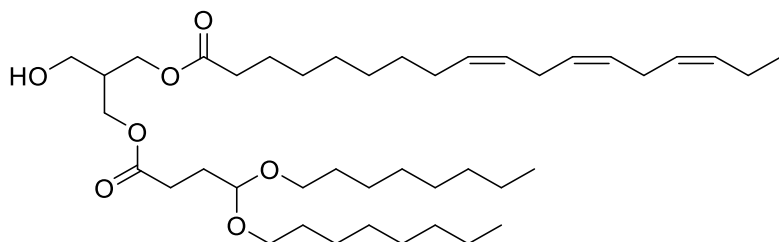
Síntesis del ejemplo 116

Intermedio 116a: 3-hidroxi-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoato



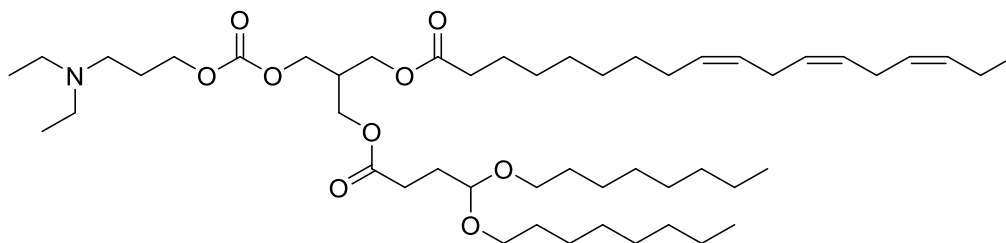
A una solución (2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-il) metanol (1,53 g, 10,5 mmol), ácido linoleico (3,28 mL, 10,5 mmol), DMAP (256 mg, 2,1 mmol) y DIPEA (4,39 mL, 25,2 mmol) en DCM (25 mL) se añadió EDC-HCl (2,41 g, 12,6 mmol) a ta. La mezcla de reacción se agitó a ta durante 24 h luego se diluyó con agua (25 mL). La capa orgánica se recogió, se lavó con 1 HCl (10 mL), una solución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y luego con agua (10 mL). La capa orgánica se recogió, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se concentró al vacío. El residuo bruto se disolvió en metanol y se añadió resina Dowex® 50x8. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 24 h a ta, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 2,36 g (6,43 mmol, rendimiento del 60 %) del producto deseado en forma de un aceite transparente. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,36 (m, 6H), 4,27 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 3,77 (m, 4H), 2,81 (m, 4H), 2,33 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,06 (m, 6H), 1,62 (m, 2H), 1,31 (m, 9H), 0,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H); MS: 367,29 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Intermedio 116b: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(hidroximetil)propil (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoato



Se sintetizó el Intermedio 116b en 45 % de rendimiento a partir del Intermedio 116a y el Intermedio 1c usando el método que se empleó para el Intermedio 1d. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,36 (m, 6H), 4,49 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,18 (m, 4H), 3,62 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,81 (m, 4H), 2,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,32 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,07 (m, 4H), 1,93 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,56 (m, 6H), 1,31 (m, 30H), 0,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H), 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 6H); MS: 715,93 m/z $[\text{M}+\text{Na}]$.

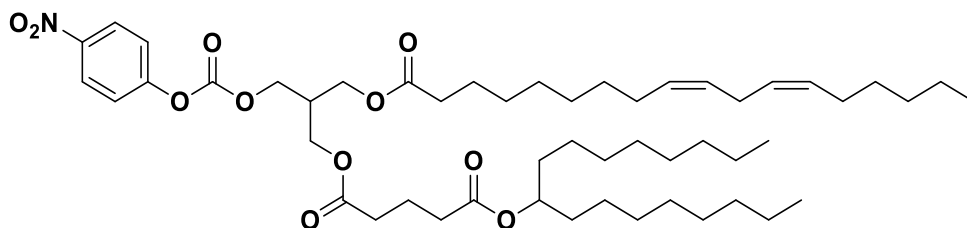
Ejemplo 116: 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,12Z, 15Z)-octadeca-9,12,15-trienoato



El ejemplo 116 se sintetizó con 31 % de rendimiento a partir del Intermedio 116b y 3-(dietilamino)propan-1-ol mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 1. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5,34 (m, 6H), 4,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 4,17 (m, 8H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 2H), 2,81 (m, 4H), 2,52 (s, 5H), 2,40 (m, 3H), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,08 (m, 4H), 1,92 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,57 (m, 8H), 1,29 (m, 28H), 0,99 (m, 8H), 0,88 (m, 6H) ppm; MS: 851,32 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Síntesis del ejemplo 117

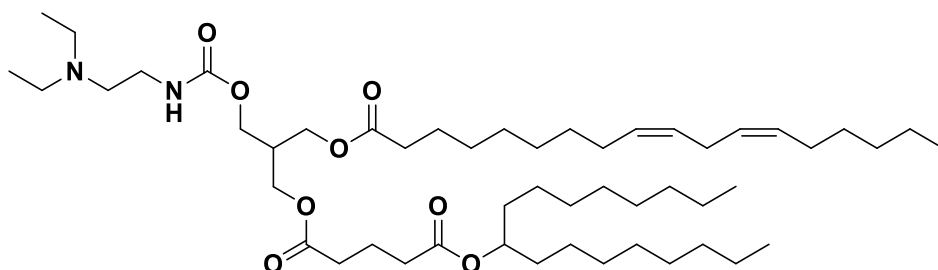
Intermedio 117a: heptadecan-9-il (3-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil) glutarato



A una mezcla del Intermedio 63a (1,0 equiv.) y carbonocloridato de (4-nitrofenilo) (2,0 equiv.) en DCM (0,05-0,2 M) se le agregó piridina (2,0 equiv.). La mezcla se agitó a 20 °C durante 5 h en

atmósfera inerte. Una vez completada, la mezcla se concentró al vacío y el residuo resultante se diluyó con hexanos y se filtró. El filtrado se concentró para producir un residuo de color que se usó directamente en el siguiente paso sin purificación adicional (47 %).

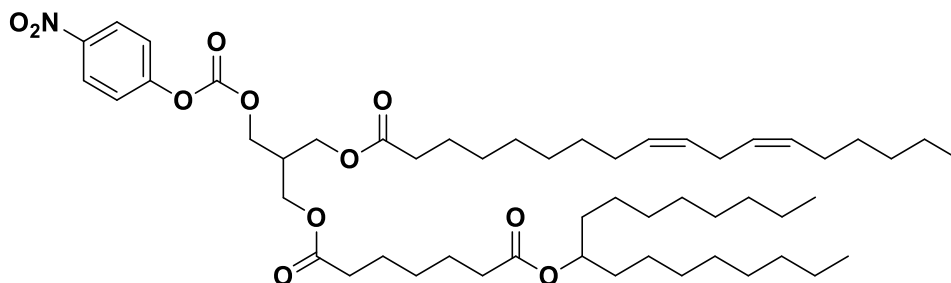
Ejemplo 117: 3-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)oxi)-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil heptadecan-9-il glutarato



A una mezcla del Intermedio 117a (1,0 equiv.) en MeCN (0,1 M) se añadió N',N'-dietiletano-1,2-diamina (2,0 equiv.), piridina (2,0 equiv.) y DMAP (1,0 equiv.) bajo atmósfera inerte. La mezcla se agitó a 20 °C durante 12 h en atmósfera inerte, después de lo cual la mezcla se concentró al vacío. El residuo resultante se diluyó con EtOAc y se lavó 5x con NaHCO₃ 1 N y 3x con H₂O. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el producto como un aceite amarillo pálido (36 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,36 – 5,21 (m, 5H), 4,79 (p, J = 6,2 Hz, 1H), 4,06 (t, J = 5,9 Hz, 6H), 3,20 (s, 2H), 2,70 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,49 (d, J = 25,8 Hz, 6H), 2,36 – 2,20 (m, 8H), 1,97 (dd, J = 7,8, 5,9 Hz, 5H), 1,87 (p, J = 7,5 Hz, 3H), 1,54 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,43 (d, J = 6,5 Hz, 4H), 1,35 – 1,06 (m, 42H), 0,98 (s, 6H), 0,81 (td, J = 6,8, 4,9 Hz, 9H). MS: 863,7 m/z [M+H].

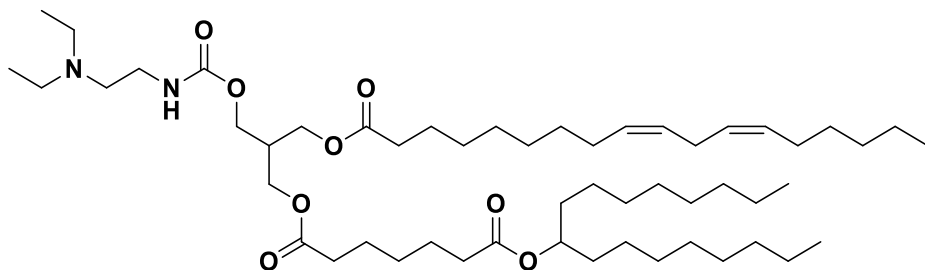
Síntesis del ejemplo 118

Intermedio 118a: 1-(heptadecan-9-il) 7-(3-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil) heptanodioato



Se sintetizó el Intermedio 118a en 61 % de rendimiento a partir del Intermedio 64b usando el método que se empleó para el Intermedio 117a.

Ejemplo 118: 1-(3-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)oxi)-2-((((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoil)oxi)metil)propil) 7-(heptadecan-9-il) heptanodioato



El Ejemplo 118 se sintetizó con 96 % de rendimiento a partir del Intermedio 118a mediante el uso del método empleado para el Ejemplo 117. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,28 (dt, $J = 17,4, 10,8, 6,0$ Hz, 4H), 5,15 (s, 1H), 4,79 (p, $J = 6,2$ Hz, 1H), 4,05 (d, $J = 6,1$ Hz, 6H), 3,14 (q, $J = 5,9$ Hz, 2H), 2,70 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,45 (q, $J = 6,8$ Hz, 6H), 2,37 – 2,18 (m, 7H), 1,98 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,56 (q, $J = 7,9$ Hz, 6H), 1,43 (q, $J = 6,3$ Hz, 4H), 1,21 (d, $J = 18,3$ Hz, 40H), 0,93 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 0,81 (q, $J = 6,4$ Hz, 9H). MS: 891,8 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 119: mediciones de pKa

Se determinó el pKa de cada lípido con amina de acuerdo con el método en Jayaraman, et al. (Angewandte Chemie, 2012) con las siguientes adaptaciones. El pKa se determinó para lípidos con amina no formulados en etanol a una concentración de 2,94 mM. Se diluyó el lípido a 100 μM en amortiguador de fosfato 0,1 M (Boston Bioproducts) donde el pH varió de 2,0-12,0. Se midió la intensidad de fluorescencia con longitud de ondas de excitación y emisión de 321 nm y 448 nm. En la Tabla 1 se muestran las mediciones del pKa para los compuestos enumerados.

Tabla 1 – valores de pKa

Compuesto	pKa	Compuesto	pKa	Compuesto	pKa
Compuesto 1	6,4	Compuesto 53	6,85	Compuesto 82	6,31
Compuesto 25	7,65	Compuesto 54	6,4	Compuesto 83	6,16
Compuesto 26	7,39	Compuesto 55	6,84	Compuesto 84	6,16
Compuesto 27	5,35	Compuesto 56	6,85	Compuesto 85	6,16
Compuesto 28	7,3	Compuesto 57	6,586	Compuesto 86	6,16
Compuesto 29	6,84	Compuesto 58	6,4	Compuesto 87	6,52
Compuesto 30	6,06	Compuesto 59	6,396	Compuesto 88	6,84
Compuesto 31	7,31	Compuesto 60	6,382	Compuesto 89	6,79
Compuesto 32	7,32	Compuesto 61	6,295	Compuesto 90	6,14
Compuesto 33	6,03	Compuesto 62	6,03	Compuesto 91	6,08

Compuesto 34	7,84		Compuesto 63	6,09		Compuesto 92	6,16
Compuesto 35	7,39		Compuesto 64	6,08		Compuesto 93	6,15
Compuesto 36	6,58		Compuesto 65	5,88		Compuesto 94	6,14
Compuesto 37	7,84		Compuesto 66	6,06		Compuesto 95	6,14
Compuesto 38	7,17		Compuesto 67	6,19		Compuesto 96	5,76
Compuesto 39	7,34		Compuesto 68	6,1		Compuesto 97	6,09
Compuesto 40	7,33		Compuesto 69	6,18		Compuesto 98	6,4
Compuesto 41	7,82		Compuesto 70	6,02		Compuesto 99	7,1
Compuesto 42	6,9		Compuesto 71	6,44		Compuesto 100	7,2
Compuesto 43	8,6		Compuesto 72	6,07		Compuesto 101	6,4
Compuesto 44	6,1		Compuesto 73	6,64		Compuesto 102	5,7
Compuesto 45	7,3		Compuesto 74	6,39		Compuesto 103	7,0
Compuesto 46	8,9		Compuesto 75	6,45		Compuesto 107	6,43
Compuesto 47	5,9		Compuesto 76	6,17		Compuesto 113	NA
Compuesto 48	5,3		Compuesto 77	6,16		Compuesto 114	6,134
Compuesto 49	8,4		Compuesto 78	6,11		Compuesto 115	5,957
Compuesto 50	5,2		Compuesto 79	6,13		Compuesto 116	6,039
Compuesto 51	7,3		Compuesto 80	6,21		Compuesto 117	NA
Compuesto 52	7,8		Compuesto 81	6,65		Compuesto 118	NA

Ejemplo 120 – Materiales y métodos

Composiciones de LNP para edición *in vivo*

Las LNP se prepararon usando varios lípidos de amina en un sistema de lípidos de 4 componentes que consta de un lípido ionizable (por ejemplo, un lípido de amina), DSPC, colesterol y PEG-2k-DMG. Las concentraciones molares de lípidos en el componente lipídico de las LNP se usan a % molar de lípido con amina/DSPC/colesterol/PEG-2k-DMG de 50/9/38/3. En ensayos para determinar el porcentaje de edición en hígado de ratones, se formularon ARNm de Cas9 y ARNg modificados en forma química que se dirige a una secuencia de ratón en las LNP, a un cociente de 1:1 p/p, cociente de 1:2 p/p o un cociente de 1:1,3 p/p.

Formulación de LNP

Los componentes lipídicos se disolvieron en etanol al 100 % con los cocientes molares de componentes lipídicos que se describen a continuación. El ARNm de Cas9 y el ARNg modificados químicamente se combinaron y se disolvieron en citrato 25 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0, lo que produjo

una concentración de la carga de ARN total de aproximadamente 0,45 mg/mL. Las LNP se formularon con un cociente de N/P de alrededor de 6, con la relación de ARNgs químicamente modificado: ARNm de Cas9 en una reacción de 1:1 p/p, 1:2 p/p o 1:1,3 p/p tal como se describe a continuación.

Las LNP se formaron mediante mezcla por chorro de impacto del lípido en etanol con dos volúmenes de solución de ARN y un volumen de agua. El lípido en etanol se mezcló mediante una cruz mezcladora con los dos volúmenes de solución de ARN. Se mezcla una cuarta corriente de agua con la corriente de salida de la cruz a través de una te en línea. (Véase, por ejemplo, WO2016010840, Fig. 2.) Alternativamente, las LNP se formaron mediante mezclado microfluídico de soluciones de ARN y lípidos mediante el uso del instrumento NanoAssemblr™ Benchtop de Precision Nanosystems, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se mantuvo un cociente de 2:1 entre el disolvente acuoso y el orgánico durante el mezclado mediante el uso de velocidades de flujo diferenciales. Las LNP se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente y se diluyeron adicionalmente con agua (aproximadamente 1:1 v/v). Las LNP diluidas se concentraron mediante el uso de filtración de flujo tangencial en un cartucho de lámina plana (Sartorius, MWCO 100 kD) y luego se les cambió el amortiguador mediante diafiltración en Tris 50 mM, NaCl 45 mM, sacarosa al 5 % (p/v), pH 7,5 (TSS). Alternativamente, el intercambio de amortiguador final en TSS se completó con columnas de desalación PD-10 (GE). Si se necesitó, se concentraron las composiciones con centrifugación con filtros para centrífuga Amicon de 100 kDa (Millipore). Luego, la mezcla resultante se filtró mediante el uso de un filtro estéril de 0,2 µm. La LNP final se almacenó de 4 °C o -80 °C hasta su uso posterior.

Analítica de la composición de LNP

Se utiliza dispersión dinámica de la luz («DLS») para caracterizar el índice de polidispersión («PDI») y el tamaño de las LNP de la presente descripción. La DLS mide la dispersión de luz que resulta de someter una muestra a una fuente de luz. El PDI, tal como se determina mediante las mediciones de DLS, representa la distribución de tamaño de las partículas (alrededor del tamaño de partículas promedio) en una población, donde una población perfectamente uniforme tiene un PDI de cero.

Se usa la dispersión electroforética de la luz para caracterizar la carga en la superficie de la LNP a un pH específico. La carga en la superficie, o el potencial zeta, es una medida de la magnitud de repulsión/atracción electrostática entre las partículas en la suspensión de LNP.

Se usa fraccionamiento de flujo en campo de flujo asimétrico – dispersión de la luz de múltiples ángulos (AF4-MALS) para separar las partículas en la composición mediante radio hidrodinámico, y luego, se miden los pesos moleculares, los radios hidrodinámicos y los radios de la media cuadrática de las partículas fraccionadas. Esto permite evaluar el peso molecular y las

distribuciones de tamaño, así como características secundarias tales como el radio del gráfico de Burchard-Stockmeyer (relación del radio de media cuadrática («rms») respecto al radio hidrodinámico en función del tiempo, lo que sugiere la densidad interna del núcleo de una partícula) y el gráfico de conformación de rms (logaritmo del radio rms en función del logaritmo de peso molecular cuando la pendiente del ajuste lineal resultante proporciona un grado de compactibilidad en oposición a la elongación).

Se puede usar el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, Malvern Nanosight) para determinar la distribución del tamaño de las partículas, así como la concentración de partículas. Las muestras de LNP se diluyen adecuadamente y se inyectan en un portaobjetos de microscopio. Una cámara registra la luz dispersada a medida que las partículas se infunden lentamente a través del campo de visión. Una vez capturada la película, el análisis de seguimiento de nanopartículas procesa la película mediante el seguimiento de píxeles y el cálculo de un coeficiente de difusión. Este coeficiente de difusión puede traducirse en el radio hidrodinámico de la partícula. El instrumento también cuenta la cantidad de partículas individuales contadas en el análisis para obtener la concentración de partículas.

Puede usarse microscopía crioelectrónica («cryo-EM») para determinar el tamaño de las partículas, morfología y características estructurales de una LNP.

El análisis composicional lipídico de las LNP se puede determinar a partir de cromografía líquida seguida por la detección de aerosol cargados (LC-CAD). Este análisis puede proporcionar una comparación del contenido lipídico real con el contenido lipídico teórico.

Las composiciones de LNP se analizan para determinar el tamaño promedio de partícula, el índice de polidispersión (PDI), el contenido total de ARN, la eficiencia de encapsulación del ARN y el potencial zeta. Las composiciones de LNP se pueden caracterizar además con análisis lipídicos, AF4-MALS, NTA y/o cryo-EM. El tamaño promedio de las partículas y la polidispersión se miden mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) mediante el uso de un instrumento Zetasizer DLS de Malvern o Wyatt NanoStar. Las muestras de LNP se diluyeron con amortiguador PBS antes de medirse con DLS. El diámetro promedio Z, que es una medición basada en la intensidad del tamaño promedio de las partículas, se informó junto con el diámetro promedio en número y el PDI. También se usa un instrumento Malvern Zetasizer o Wyatt NanoStar para medir el potencial zeta de la LNP. Las muestras se diluyen 1:17 (50 µL en 800 µL) en PBS 0,1X, pH 7,4 antes de la medición.

Se utiliza un ensayo basado en fluorescencia (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) para determinar la concentración de ARN total y ARN libre. Se calcula la eficiencia de encapsulación como $(\text{ARN total} - \text{ARN libre})/\text{ARN total}$. Las muestras de LNP se diluyen adecuadamente con amortiguador TE 1x que contiene Triton-X 100 al 0,2 % para determinar el ARN total o amortiguador TE 1x para determinar el ARN libre. Se prepararon curvas de calibración con el uso de la solución

de ARN de partida para hacer las composiciones y se diluyeron en amortiguador TE 1x +/- Triton-X 100 al 0,2 %. Luego se agregó el tinte diluido RiboGreen® (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) a cada una de las calibraciones y muestras y se permitió que incubara durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, sin luz. Se utiliza un lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices) para leer las muestras con longitudes de onda de excitación, corte automático y emisión fijadas en 488 nm, 515 nm y 525 nm, respectivamente. El ARN total y el ARN libre se determinan a partir de las curvas de calibración adecuadas.

Se calcula la eficiencia de encapsulación como $(\text{ARN total} - \text{ARN libre})/\text{ARN total}$. Puede utilizarse el mismo procedimiento para determinar la eficiencia de encapsulación de un componente de la carga a base de ADN. En un ensayo basado en fluorescencia, puede utilizarse tinte Oligogreen para ADN monocatenario, y tinte Picogreen para ADN bicatenario. Alternativamente, la concentración de ARN total se puede determinar mediante un método de HPLC de emparejamiento de iones en fase inversa (RP-IP). Triton X-100 se usa para interrumpir las LNP, liberando el ARN. A continuación, el ARN se separa de los componentes lipídicos cromatográficamente mediante HPLC RP-IP y se cuantifica frente a una curva estándar usando absorbancia UV a 260 nm.

AF4-MALS se utiliza para observar las distribuciones de tamaño y peso molecular, así como las estadísticas secundarias de esos cálculos. Las LNP se diluyen según sea adecuado y se inyectan en un canal de separación AF4 mediante el uso de un inyector automático de HPLC cuando se enfocan, y luego, se eluyen con un gradiente exponencial en el flujo cruzado a través del canal. Todo el fluido se impulsa mediante una bomba de HPLC y el instrumento Wyatt Eclipse. Las partículas que eluyen del canal AF4 fluyen a través de un detector UV, un detector de dispersión de luz de múltiples ángulos, un detector de dispersión de luz cuasi-elástico y un detector de índice de refracción diferencial. Se procesan los datos en bruto con un modelo Debye para determinar el peso molecular y el radio rms a partir de las señales del detector.

Los componentes lipídicos en las LNP se analizan en forma cuantitativa con HPLC acoplados a un detector en aerosol con carga (CAD). La separación cromatográfica de 4 componentes lipídicos se logra mediante HPLC de fase inversa. El CAD es un detector basado en masa destructivo que detecta todos los compuestos no volátiles y la señal es coherente independientemente de la estructura del analito.

Cargas de ARNg y ARNm de Cas9

Se preparó la carga de ARNm de Cas9 (por ejemplo, SEQ ID NO: 3) mediante transcripción *in vitro*. El ARNm de Cas9 que comprende 1X NLS con casquetes y poliadenilado se generó mediante transcripción *in vitro* mediante el uso de plantilla de ADN de plásmido y polimerasa de ARN de T7 con un método de la siguiente manera: El ADN de plásmido que contenía un promotor de T7 y una región poli(A/T) de 100 nt se linealizaron mediante incubación a 37 °C durante 2 horas con

XbaI con las siguientes condiciones: 200 ng/μL de plásmido, 2 U/μL de XbaI (NEB), y 1x de amortiguador de reacción. Se inactiva XbaI al calentar la reacción a 65 °C durante 20 min. Se puede purificar el plásmido linealizado a partir de la enzima y sales del amortiguador con una columna de sílice maxi spin (Epoch Life Sciences) y analizarse con gel de agarosa para confirmar la linealización. La reacción IVT para generar ARNm modificado de Cas9 se lleva a cabo con incubación a 37 °C durante 4 horas en las siguientes condiciones: 50 ng/μL de plásmido linealizado; GTP, ATP, CTP y N1-metil pseudo-UTP (Trilink) cada uno con una concentración de 2 mM; ARCA 10 mM (Trilink); 5 U/μL de ARN polimerasa T7 (NEB); 1 U/μL de inhibidor de ARNasa murina (NEB); 0,004 U/μL de pirofosfatasa inorgánica de *E. coli* (NEB); y 1x de amortiguador de reacción. Luego de una incubación de 4 horas, se agrega ADNasa TURBO (ThermoFisher) hasta una concentración final de 0,01 U/μL y la reacción se incuba durante otros 30 minutos para eliminar la plantilla de ADN. Se purificó el ARNm de Cas9 con TFF o un método que contenía precipitación de LiCl.

Se generó un ARNm de Cas9 con casquetes y poliadenilado que comprende la SEQ ID NO: 6 y 1X NLS mediante transcripción in vitro usando una plantilla de ADN plasmídico linealizada y ARN polimerasa de T7. El ADN plasmídico que contiene un promotor T7 y una región poli(A/T) entre 90-100 nt se linealiza incubando a 37 °C con XbaI hasta su finalización. El plásmido linealizado se purifica a partir de enzima y sales de amortiguador. La reacción IVT para generar ARNm modificado de Cas9 se lleva a cabo con incubación a 37 °C durante 1,5 o 2 horas en las siguientes condiciones: 50 ng/μL de plásmido linealizado; GTP, ATP, CTP y N1-metil pseudo-UTP (Trilink) cada uno con una concentración de 5 mM; ARCA 25 mM (Trilink); 5 U/μL de ARN polimerasa T7; 1 U/μL de inhibidor de ARNasa murina; 0,004 U/μL de pirofosfatasa inorgánica de *E. coli*; y 1x de amortiguador de reacción. Luego se agrega ADNasa TURBO (ThermoFisher) para eliminar la plantilla de ADN.

El ARNm se purificó a partir de la enzima y los nucleótidos usando un kit RNeasy Maxi (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Alternativamente, el ARNm se purificó usando un kit MEGAClear (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Alternativamente, el ARNm se purifica usando precipitación con LiCl, precipitación con acetato de amonio y precipitación con acetato de sodio. Alternativamente, el ARNm se purifica con un método de precipitación con LiCl seguido de una purificación adicional mediante filtración de flujo tangencial. Alternativamente, el ARN se purificó mediante precipitación con LiCl en combinación con filtración de flujo tangencial. La concentración del transcrito se determinó midiendo la absorbancia de luz a 260 nm (Nanodrop) y el transcrito se analizó mediante electroforesis capilar mediante Fragment Analyzer (Agilent).

Los ARNgs de los siguientes ejemplos se sintetizaron químicamente mediante métodos conocidos con fosforamiditas.

Administración de LNP *in vivo*

Estudios en ratones

Se utilizaron ratones hembra CD-1 de entre 6-10 semanas de edad en cada estudio. Se pesaron y agruparon los animales de acuerdo con el peso corporal para preparar las soluciones de administración basándose en el peso promedio grupal. Se dosificaron las LNP por medio de la vena lateral de la cola en un volumen de 0,2 mL por animal (aproximadamente 10 mL por kilogramo de peso corporal). Se observó periódicamente a los animales para determinar efectos adversos durante al menos 24 horas después de la dosis.

Para los estudios que miden la edición *in vivo* en el hígado, se dosificó a ratones hembra CD-1 a 0,1 mg/kg, a menos que se indique lo contrario. Se practicó eutanasia a los animales a los 6 o 7 días mediante desangrado mediante punción cardíaca con anestesia de isoflurano. Se recolectó tejido hepático de cada animal para la extracción y análisis de ADN. Se recolectó la sangre en tubos separadores de suero y en tubos que contenían citrato de sodio amortiguado para plasma, tal como se describe en la presente. Se midieron las cohortes de ratones para determinar la edición mediante secuenciación de última generación (NGS).

Estudios en ratas

En cada estudio se utilizaron ratas hembra Sprague Dawley de entre 6 y 7 semanas de edad. Se pesó cada animal y se prepararon soluciones de dosificación basadas en el peso corporal. Se dosificaron las LNP por medio de la vena lateral de la cola en un volumen de 0,35 mL por animal (aproximadamente 2 mL por kilogramo de peso corporal). Se observó periódicamente a los animales para determinar efectos adversos durante al menos 24 horas después de la dosis.

Para los estudios que miden la edición *in vivo* en el hígado, los animales recibieron una dosis de 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg. Los animales se sacrificaron mediante asfixia con CO₂ 6 días después de la dosis. En la necropsia, se recogió el hígado para el análisis de edición mediante NGS y se recogió sangre en tubos separadores de suero para medir la TTR en suero.

Secuenciación NGS

Brevemente, para determinar de forma cuantitativa la eficiencia de edición en la ubicación diana en el genoma, se aisló ADN genómico y se utilizó secuenciación profunda para identificar la presencia de inserciones y eliminaciones introducidas mediante edición génica.

Se diseñaron cebadores de PCR alrededor del sitio diana (por ejemplo, dentro de B2M) y se amplificó el área genómica de interés. Se realizó PCR adicional de acuerdo con los protocolos del fabricante (Illumina) para agregar la química necesaria para la secuenciación. Se secuenciaron los amplicones en un instrumento MiSeq de Illumina. Se alinearon las lecturas con el genoma de referencia de ratón o rata (por ejemplo, GRCm38) después de eliminar las que tenían puntuaciones de calidad bajas. Los archivos resultantes de las lecturas se mapearon respecto al genoma de referencia (archivos BAM), donde se seleccionaron las lecturas que se superponían con la región de

interés y se calculó la cantidad de lecturas de tipo salvaje en relación con la cantidad de lecturas que contenían una inserción, sustitución o eliminación.

El porcentaje de edición (por ejemplo, la «eficiencia de indel» o «indel porcentual») se definió como la cantidad total de lecturas de secuencia con inserciones o eliminaciones respecto a la cantidad total de lecturas de secuencia, incluidas las de tipo salvaje.

Análisis ELISA con transtirretina (TTR)

Se recolectó sangre y se aisló el suero tal como se indica. Los niveles totales de TTR en suero de ratón se determinaron mediante el uso del kit de ELISA de prealbúmina de ratón (transtirretina) (Aviva Systems Biology, OKIA00111). En resumen, los sueros se diluyeron en serie con diluyente de muestra del kit hasta una dilución final de 10 000 veces para una dosis de 0,1 mg/kg y diluciones finales de 10 000 veces y de 2500 veces para 0,3 mg/kg. Esta muestra diluida se agregó luego a las placas de ELISA y se llevó a cabo el ensayo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 121 - Evaluación de la eficacia de los lípidos mediante edición *in vivo*

Se evaluó la eficiencia de la edición *in vivo* de los materiales administrados con las formulaciones incluidos varios compuestos lipídicos con amina. La edición se midió usando G282 (SEQ ID No: 1) que se dirige al gen TTR de ratón o G650 (SEQ ID No 2) que se dirige al gen B2M de ratón. Se evaluó la eficacia de los lípidos descritos anteriormente mediante experimentos de edición *in vivo*. Los LNP se formularon con un cociente de 1:1 o 1:1,3 p/p de ARNGs a ARNm de Cas9, y en un cociente de N/P de alrededor de 6. Las concentraciones molares de lípidos en el componente lipídico de las LNP se usan a % molar de lípido con amina/DSPC/colesterol/PEG-2k-DMG de 50/9/38/3. Las LNP finales se caracterizaron para determinar la eficiencia de encapsulación, índice de polidispersión y tamaño promedio de las partículas, de acuerdo con los métodos analíticos proporcionados anteriormente. Se muestran el análisis del tamaño de partícula promedio, la polidispersión (PDI), el contenido total de ARN y la eficiencia de encapsulación del ARN en la Tabla 2.

Tabla 2 – Analítica de la composición

Compuesto	gs:ARNm	Encapsulación (%)	Z prom (nm)	PDI	Promedio numérico (nm)	Experimento
Compuesto 1	1:1,3	97	77,85	0,022	63,16	1
Compuesto 2	1:1,3	96	75,64	0,046	59,17	1
Compuesto 3	1:1,3	91	86,16	0,079	61,67	1

Compuesto 4	1:1,3	100	72,11	0,129	44,92	1
Compuesto 5	1:1,3	98	66,28	0,059	50,89	1
Compuesto 6	1:1,3	100	56,86	0,066	41,82	1
Compuesto 1	1:1	96	77,23	0,008	63,61	2
Compuesto 1	1:1	97	75,7	0,026	62,04	2
Compuesto 7	1:1	99	67,61	0,126	43,91	2
Compuesto 8	1:1	100	53,88	0,093	37,17	2
Compuesto 10	1:1	90	57,21	0,086	39,12	2
Compuesto 11	1:1	97	85,35	0,022	68,35	2
Compuesto 12	1:1	83	88,53	0,007	73,4	2
Compuesto 13	1:1	97	91,12	0,013	74,6	2
Compuesto 1	1:1	97	75,7	0,026	62,04	3
Compuesto 1	1:1	97	75,55	0,043	60,41	3
Compuesto 9	1:1	89	62,99	0,058	45,11	3
Compuesto 23	1:1	95	74,78	0,068	56,62	3
Compuesto 24	1:1	98	76,82	0,027	61,34	3
Compuesto 1	1:1	97	75,55	0,043	60,41	4
Compuesto 1	1:1	97	75,7	0,026	62,04	4
Compuesto 14	1:1	93	64,69	0,091	45,18	4
Compuesto 17	1:1	98	70,97	0,037	56,58	4
Compuesto 18	1:1	97	68,72	0,090	48,22	4
Compuesto 20	1:1	96	79,25	0,023	64,34	4
Compuesto 21	1:1	94	75,41	0,039	59,75	4
Compuesto 22	1:1	98	89,43	0,004	73,96	4
Compuesto 1	1:1	99	76	0,040	59	5
Compuesto 25	1:1	99	87	0,080	61	5
Compuesto 26	1:1	98	88	0,000	73	5
Compuesto 27	1:1	97	66	0,100	45	5
Compuesto 28	1:1	98	83	0,010	68	5
Compuesto 32	1:1	99	77	0,040	61	5
Compuesto 1	1:1	97	79,18	0,047	63,19	6
Compuesto 36	1:1	98	73,71	0,024	59,48	6
Compuesto 37	1:1	100	65,01	0,091	44,73	6
Compuesto 38	1:1	96	91,5	0,019	74,58	6

Compuesto 39	1:1	97	79,81	0,024	64,79	6
Compuesto 41	1:1	98	74,83	0,074	54,1	6
Compuesto 1	1:1	97	79,18	0,047	63,19	7
Compuesto 42	1:1	99	74,03	0,027	58,66	7
Compuesto 44	1:1	91	81,19	0,025	64,78	7
Compuesto 45	1:1	98	82,93	0,007	69,23	7
Compuesto 47	1:1	97	58,93	0,086	40,95	7
Compuesto 48	1:1	97	64,68	0,085	45,32	7
Compuesto 51	1:1	98	86,15	0,018	72,23	7
Compuesto 52	1:1	99	86,72	0,032	69,4	7
Compuesto 1	1:1	97	79,18	0,047	63,19	8
Compuesto 1	1:1	98	78,08	0,007	63,4	8
Compuesto 53	1:1	99	76,24	0,040	60,35	8
Compuesto 54	1:1	98	95,76	0,019	76,95	8
Compuesto 55	1:1	96	101	0,048	79,46	8
Compuesto 56	1:1	96	105,2	0,067	81,44	8
Compuesto 1	1:1	99	86,06	0,033	71,23	9
Compuesto 40	1:1	98	74,12	0,056	56,73	9
Compuesto 1	1:1	99	86,06	0,033	71,23	10
Compuesto 24	1:1	98	83,92	0,033	66,88	10
Compuesto 29	1:1	98	82,41	0,009	66,92	10
Compuesto 31	1:1	98	75,11	0,059	58,67	10
Compuesto 1	1:1	98	74,98	0,042	60,38	11
Compuesto 24	1:1	97	77,24	0,025	63,16	11
Compuesto 29	1:1	98	78,63	0,002	64,63	11
Compuesto 31	1:1	99	73,65	0,015	59,35	11
Compuesto 1	1:1	98	75,34	0,052	59,17	12
Compuesto 57	1:1	89	102	0,011	83,41	12
Compuesto 58	1:1	95	89,07	0,029	72,42	12
Compuesto 59	1:1	97	87,86	0,028	73,04	12
Compuesto 97	1:1	98	68,66	0,037	55,14	12
Compuesto 1	1:1	97	78,85	0,036	64,05	13
Compuesto 60	1:1	97	104,2	0,022	84,46	13
Compuesto 61	1:1	97	87,26	0,018	72	13

Compuesto 1	1:1	98	82,71	0,056	64,97	14
Compuesto 62	1:1	98	73,46	0,044	59,35	14
Compuesto 63	1:1	98	79,37	0,019	64,05	14
Compuesto 64	1:1	98	85,16	0,032	69,25	14
Compuesto 65	1:1	98	70,19	0,034	55,76	14
Compuesto 66	1:1	98	58,54	0,071	44,03	14
Compuesto 67	1:1	99	69,85	0,025	56,56	14
Compuesto 68	1:1	98	72,71	0,008	60,04	14
Compuesto 54	1:1	98	89,8	0,037	71,8	15
Compuesto 55	1:1	92	113,2	0,039	90,16	15
Compuesto 69	1:1	98	85,11	0,026	68,12	15
Compuesto 70	1:1	98	83,47	0,017	66,78	15
Compuesto 1	1:1	96	83,65	0,031	67,22	16
Compuesto 1	1:1	99	84,99	0,007	71,1	16
Compuesto 54	1:1	98	99,71	0,058	78,39	16
Compuesto 59	1:1	99	100,4	0,005	84,05	16
Compuesto 76	1:1	99	111,8	0,097	80,2	16
Compuesto 77	1:1	99	101,8	0,006	85,4	16
Compuesto 79	1:1	99	99,24	0,019	83,64	16
Compuesto 83	1:1	99	89,55	0,009	74,41	16
Compuesto 84	1:1	95	114,2	0,086	86,08	16
Compuesto 85	1:1	99	97,86	0,006	81,21	16
Compuesto 86	1:1	98	99,01	0,016	81,23	16
Compuesto 1	1:1	96	83,65	0,031	67,22	17
Compuesto 1	1:1	99	85,79	0,002	68,64	17
Compuesto 59	1:1	99	100,4	0,005	84,05	17
Compuesto 80	1:1	98	105,8	0,016	87,3	17
Compuesto 82	1:1	98	117,5	0,038	94,01	17
Compuesto 87	1:1	98	98,47	0,006	81,57	17
Compuesto 88	1:1	98	117,1	0,011	99,51	17
Compuesto 89	1:1	95	107,3	0,008	89,4	17
Compuesto 90	1:1	99	99,62	0,017	81,15	17
Compuesto 91	1:1	99	93,13	0,028	75,67	17
Compuesto 92	1:1	99	93,69	0,022	77,35	17

Compuesto 93	1:1	98	95,19	0,004	78,73	17
Compuesto 94	1:1	99	96,35	0,018	78,22	17
Compuesto 95	1:1	99	91,1	0,029	74,5	17
Compuesto 1	1:1	99	84,48	0,041	66,21	18
Compuesto 59	1:1	99	100,4	0,005	84,05	18
Compuesto 71	1:1	99	95,57	0,035	76,95	18
Compuesto 72	1:1	99	91,65	0,002	75,22	18
Compuesto 73	1:1	97	110,6	0,008	94,5	18
Compuesto 74	1:1	99	105,7	0,021	87,14	18
Compuesto 75	1:1	98	110,9	0,020	92,74	18
Compuesto 1	1:1	96	83,65	0,031	67,22	19
Compuesto 1	1:1	98	86,84	0,020	71,49	19
Compuesto 96	1:1	98	81,55	0,019	65,94	19
Compuesto 1	1:1	99	76	0,04	59	20
Compuesto 98	1:1	99	70	0,02	57	20
Compuesto 99	1:1	99	89	0,003	74	20

En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de edición en el hígado de ratón tal como se midió con NGS.

Tabla 3. Eficiencia de edición en el hígado de ratón, que proporciona % formación de indel para los experimentos G282 y G650 y niveles de TTR en suero para los experimentos G282.

Compuesto	Edición			TTR en suero				Guía	Experimento
	% medio de Indel	SD	N	TTR en suero (ug/ml)	SD	N	%TSS		
TSS	0,1	0,0	5	1235	279	5	100 %	G282	1
Compuesto 1	15,7	4,0	5	523	178	5	42 %	G282	1
Compuesto 1	18,7	12,8	5	773	255	5	63 %	G282	1
Compuesto 1	15,1	8,8	5	689	320	5	56 %	G282	1
Compuesto 2	6,3	2,8	5	1114	257	5	90 %	G282	1
Compuesto 3	8,8	3,1	5	1297	75	5	105 %	G282	1
Compuesto 4	0,1	0,0	5	1347	283	5	109 %	G282	1

Compuesto 5	7,0	5,2	5	737	229	5	60 %	G282	1
Compuesto 6	0,1	0,0	5	1107	251	5	90 %	G282	1
TSS	0,1	0,0	5	905	230	5	100 %	G282	2
Compuesto 1	24,9	5,1	5	563	113	5	62 %	G282	2
Compuesto 1	21,5	6,8	5	658	99	5	73 %	G282	2
Compuesto 7	0,2	0,1	5	940	142	5	104 %	G282	2
Compuesto 8	0,1	0,0	5	962	138	5	106 %	G282	2
Compuesto 10	0,5	0,2	5	871	136	5	96 %	G282	2
Compuesto 11	16,8	3,1	5	706	91	5	78 %	G282	2
Compuesto 12	20,3	8,2	5	736	131	5	81 %	G282	2
Compuesto 13	12,0	1,7	5	837	173	5	93 %	G282	2
TSS	0,0	0,1	5	865	81	5	100 %	G282	3
Compuesto 1	32,0	9,9	5	498	145	5	58 %	G282	3
Compuesto 9	0,1	0,1	5	865	117	5	100 %	G282	3
Compuesto 23	8,6	6,2	5	716	101	5	83 %	G282	3
Compuesto 24	34,2	8,0	5	397	50	5	46 %	G282	3
TSS	0,1	0,1	5	1035	179	5	100 %	G282	4
Compuesto 1	20,5	6,4	5	742	172	5	72 %	G282	4
Compuesto 14	0,2	0,1	5	908	136	5	88 %	G282	4
Compuesto 17	12,0	3,6	5	727	75	5	70 %	G282	4
Compuesto 18	2,1	0,7	5	849	98	5	82 %	G282	4
Compuesto 20	24,5	12,3	5	476	164	5	46 %	G282	4
Compuesto 21	0,8	0,3	5	897	124	5	87 %	G282	4

Compuesto 22	11,5	2,9	5	634	60	5	61 %	G282	4
TSS	0,1	0,0	5	904	150	5	100 %	G282	5
Compuesto 1	14,4	5,8	5	743	96	5	82 %	G282	5
Compuesto 25	3,9	1,5	5	1013	268	5	112 %	G282	5
Compuesto 26	8,2	2,1	5	1008	93	5	112 %	G282	5
Compuesto 27	0,4	0,1	5	841	166	5	93 %	G282	5
Compuesto 28	9,9	1,5	5	661	138	5	73 %	G282	5
Compuesto 32	28,8	8,2	5	388	150	5	43 %	G282	5
TSS	0,1	0,0	5	801	115	5	100 %	G282	6
Compuesto 1	14,7	9,5	5	865	197	5	108 %	G282	6
Compuesto 36	0,2	0,1	5	795	136	5	99 %	G282	6
Compuesto 37	1,6	0,2	5	617	117	5	77 %	G282	6
Compuesto 38	0,2	0,1	5	481	137	5	60 %	G282	6
Compuesto 39	2,5	1,1	5	656	327	5	82 %	G282	6
Compuesto 41	9,0	3,7	5	758	33	5	95 %	G282	6
TSS	0,1	0,0	5	1114	135	5	100 %	G282	7
Compuesto 1	18,3	6,4	4	784	175	5	70 %	G282	7
Compuesto 42	5,2	2,4	5	902	77	5	81 %	G282	7
Compuesto 44	3,8	1,6	5	910	219	5	82 %	G282	7
Compuesto 45	4,0	0,8	5	1096	155	5	98 %	G282	7

Compuesto 47	0,1	0,0	5	1075	185	5	96 %	G282	7
Compuesto 48	0,1	0,0	5	915	163	5	82 %	G282	7
Compuesto 51	13,5	5,3	5	843	95	5	76 %	G282	7
Compuesto 52	6,4	1,3	5	935	77	5	84 %	G282	7
TSS	0,1	0,0	5	875	92	5	100 %	G282	8
Compuesto 1	22,6	9,7	5	687	137	5	78 %	G282	8
Compuesto 53	28,2	8,5	5	413	152	5	47 %	G282	8
Compuesto 54	46,7	10,9	5	270	142	5	31 %	G282	8
Compuesto 55	31,5	6,4	5	442	123	5	51 %	G282	8
Compuesto 56	15,5	4,4	4	576	67	4	66 %	G282	8
TSS	0,1	0,1	4	884	113	5	100 %	G282	9
Compuesto 1	33,5	8,9	5	388	103	5	44 %	G282	9
Compuesto 40	42,1	15,7	4	393	262	5	44 %	G282	9
TSS	0,2	0,0	5	ND	ND	ND	ND	G282	10
Compuesto 1	29,4	4,6	5	ND	ND	ND	ND	G282	10
Compuesto 24	43,2	9,1	5	ND	ND	ND	ND	G282	10
Compuesto 29	18,4	6,6	5	ND	ND	ND	ND	G282	10
Compuesto 31	26,7	14,5	5	ND	ND	ND	ND	G282	10
TSS	0,0	0,1	5	ND	ND	ND	ND	G650	11
Compuesto 1	13,6	6,1	5	ND	ND	ND	ND	G650	11
Compuesto 24	25,8	8,1	5	ND	ND	ND	ND	G650	11

Compuesto 29	19,7	6,3	5	ND	ND	ND	ND	G650	11
Compuesto 31	24,5	5,6	5	ND	ND	ND	ND	G650	11
TSS	0,1	0,1	5	ND	ND	ND	ND	G650	12
Compuesto 1	10,2	2,8	4	ND	ND	ND	ND	G650	12
Compuesto 57	10,0	2,2	5	ND	ND	ND	ND	G650	12
Compuesto 58	14,9	3,0	5	ND	ND	ND	ND	G650	12
Compuesto 59	19,7	2,8	5	ND	ND	ND	ND	G650	12
Compuesto 97	5,1	2	5	ND	ND	ND	ND	G650	12
TSS	0,1	0,1	5	ND	ND	ND	ND	G650	13
Compuesto 1	15,7	5,5	5	ND	ND	ND	ND	G650	13
Compuesto 60	23,7	10,5	5	ND	ND	ND	ND	G650	13
Compuesto 61	20,2	9,5	5	ND	ND	ND	ND	G650	13
TSS	0,1	0,0	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
Compuesto 1	16,1	2,8	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
Compuesto 62	6,5	1,1	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
Compuesto 63	15,0	1,6	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
Compuesto 64	19,3	4,8	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
Compuesto 65	4,7	2,0	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
Compuesto 66	0,8	0,3	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
Compuesto 67	3,1	1,0	5	ND	ND	ND	ND	G650	14

Compuesto 68	2,9	0,8	5	ND	ND	ND	ND	G650	14
TSS	0,7	1,3	5	ND	ND	ND	ND	G650	15
Compuesto 1	14,8	4,1	5	ND	ND	ND	ND	G650	15
Compuesto 54	27,6	9,5	5	ND	ND	ND	ND	G650	15
Compuesto 55	30,2	13,4	5	ND	ND	ND	ND	G650	15
Compuesto 69	21,3	3,0	5	ND	ND	ND	ND	G650	15
Compuesto 70	9,7	2,5	5	ND	ND	ND	ND	G650	15
TSS	0,1	0,1	5	907	92	5	100 %	G282	16
Compuesto 1	35,4	6,1	5	446	63	5	49 %	G282	16
Compuesto 1	14,9	3,0	5	607	85	5	67 %	G282	16
Compuesto 54	27,0	5,9	5	574	144	5	63 %	G282	16
Compuesto 59	39,0	12,0	5	367	168	5	40 %	G282	16
Compuesto 76	7,0	3,3	5	735	134	5	81 %	G282	16
Compuesto 77	30,4	9,5	5	478	157	5	53 %	G282	16
Compuesto 79	40,3	11,6	5	351	140	5	39 %	G282	16
Compuesto 83	26,4	8,2	5	488	87	5	54 %	G282	16
Compuesto 84	13,3	5,3	5	648	124	5	71 %	G282	16
Compuesto 85	3,5	1,3	5	762	42	5	84 %	G282	16
Compuesto 86	22,6	13,6	5	582	172	5	64%	G282	16
TSS	0,1	0,0	5	756	169	5	100 %	G282	17

Compuesto 1	27,2	5,7	5	490	90	5	65 %	G282	17
Compuesto 1	25,0	5,2	5	505	113	5	67 %	G282	17
Compuesto 59	31,8	8,2	5	431	105	5	57 %	G282	17
Compuesto 80	10,3	2,2	5	873	220	5	116 %	G282	17
Compuesto 82	5,0	1,5	5	953	185	5	126 %	G282	17
Compuesto 87	26,2	8,7	5	511	107	5	68 %	G282	17
Compuesto 88	32,1	5,5	5	582	145	5	77 %	G282	17
Compuesto 89	9,2	3,2	5	774	76	5	102 %	G282	17
Compuesto 90	26,0	6,7	5	504	100	5	67 %	G282	17
Compuesto 91	13,9	4,4	5	633	54	5	84 %	G282	17
Compuesto 92	26,6	5,6	5	470	102	5	62 %	G282	17
Compuesto 93	15,0	2,3	5	669	154	5	88 %	G282	17
Compuesto 94	39,4	6,6	5	286	95	5	38 %	G282	17
Compuesto 95	30,3	7,7	5	408	88	5	54 %	G282	17
TSS	0,1	0,0	5	919	230	5	100 %	G282	18
Compuesto 1	41,6	9,0	5	431	270	5	47 %	G282	18
Compuesto 1	32,0	9,9	4	587	121	4	64 %	G282	18
Compuesto 59	35,6	8,4	5	604	229	5	66 %	G282	18
Compuesto 71	52,4	4,0	4	462	156	5	50 %	G282	18

Compuesto 72	42,4	7,4	5	479	188	5	52 %	G282	18
Compuesto 73	41,6	8,8	4	550	187	3	60 %	G282	18
Compuesto 74	42,8	12,9	5	406	144	5	44 %	G282	18
Compuesto 75	25,4	4,3	4	623	201	5	68 %	G282	18
TSS	0,1	0,0	5	777	89	5	100 %	G282	19
Compuesto 1	30,4	5,1	5	311	76	5	40 %	G282	19
Compuesto 1	38,6	8,0	5	247	82	5	32 %	G282	19
Compuesto 96	15,3	8,2	5	449	95	5	58 %	G282	19
TSS	0,08	0,04	5	ND	ND	ND	ND	G282	20
Compuesto 1	20,5	10,6	5	ND	ND	ND	ND	G282	20
Compuesto 98	10,56	5,37	5	ND	ND	ND	ND	G282	20
Compuesto 99	26,38	15,2	5	ND	ND	ND	ND	G282	20

Ejemplo 122 – Respuesta a la dosis de la edición en hígado

Para evaluar si la edición respondía a la dosis, se realizaron experimentos *in vivo* en varios niveles de dosis de LNP. Se formuló el ARNm de Cas9 del Ejemplo 120 como LNP con un ARNg que se dirige a TTR (G282; SEQ ID NO: 1; o G502, SEQ ID NO: 4). Alternativamente, se formuló el ARNm de Cas9 del Ejemplo 120 como LNP con un ARNg que se dirige a B2M (G650; SEQ ID NO: 2). Se formularon estas LNP en un cociente de p/p de ARNg y ARNm de Cas9 como se indica en la Tabla 4. Se formularon las LNP mediante el uso del procedimiento de flujo cruzado con composiciones molares lipídicas de lípidos de amina % en moles/DSPC/PEG-2k-DMG de 50/9/38/3 y un cociente de N/P de 6,0.

Se analizaron las composiciones de LNP para determinar el tamaño de partícula promedio, la polidispersión (PDI), el contenido de ARN total y la eficiencia de encapsulación de ARN tal como se describe en el Ejemplo 120.

El análisis del tamaño promedio de partículas, la polidispersión (PDI), el contenido total de ARN y la eficiencia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Analítica de la composición

Compuesto	gs:ARNm	%E	Z prom (nm)	PDI	Promedio numérico (nm)	Experimento
Compuesto 1	1:1	97	79,18	0,047	63,19	101
Compuesto 29	1:1	99	84	0,003	70	101
Compuesto 31	1:1	99	76	0,04	61	101
Compuesto 1	1:1	98	84,93	0,007	69,51	102
Compuesto 40	1:1	95	83,69	0,014	66,92	102
Compuesto 53	1:1	99	70,47	0,019	56,05	102
Compuesto 54	1:1	98	96,98	0,032	77,96	102
Compuesto 1	1:1	99	79,83	0,015	62,86	103
Compuesto 59	1:1	98	87,31	0,012	72,60	103
Compuesto 1	1:1	98	82,71	0,056	64,97	104
Compuesto 59	1:1	96	83,42	0,024	67,12	104
Compuesto 1	1:2	99	88,60	0,033	73,15	105
Compuesto 24	1:2	99	88,39	0,029	72,95	105
Compuesto 59	1:2	99	96,76	0,041	79,11	105
Compuesto 61	1:2	98	99,25	0,033	79,73	105
Compuesto 94	1:2	99	98,90	0,032	80,04	105

Se administró por i.v. a ratones hembra CD-1 como se especifica en la Tabla 5 y se evaluó para edición en el hígado. Los resultados se muestran en las FIG. 1A-1D y la Tabla 5.

Tabla 5: Edición hepática de TTR y niveles de TTR en suero para respuesta a la dosis que proporcionan % de formación de indel para experimentos G282, G502 y G650 y niveles de TTR en suero para experimentos G282 y G502.

Compuesto	Edición				TTR en suero				Guía	Experimento
	Dosis (mg/kg)	% medio de Indel	SD	N	TTR en suero (ug/ml)	SD	N	%TSS		

TSS	TSS	0,1	0,0	5	1369	387	5	100 %	G282	101
Compuesto 1	0,1	23,1	10,3	5	1083	665	5	79 %	G282	101
Compuesto 1	0,3	58,3	6,5	5	271	135	5	20 %	G282	101
Compuesto 29	0,1	31,4	6,1	5	663	348	5	48 %	G282	101
Compuesto 29	0,3	54,8	4,5	5	205	122	5	15 %	G282	101
Compuesto 31	0,1	13,5	3,6	5	976	457	5	71 %	G282	101
Compuesto 31	0,3	50,7	10,2	5	226	99	5	17 %	G282	101
TSS	TSS	0,2	0,1	4	918	100	5	100 %	G282	102
Compuesto 1	0,1	36,4	13,0	4	500	263	4	54 %	G282	102
Compuesto 1	0,3	67,4	5,9	5	123	61	5	13 %	G282	102
Compuesto 40	0,1	30,2	19,1	5	443	164	5	48 %	G282	102
Compuesto 40	0,3	68,0	5,5	5	80	46	5	9 %	G282	102
Compuesto 53	0,1	8,6	2,0	5	619	133	5	67 %	G282	102
Compuesto 53	0,3	48,2	8,7	5	231	69	5	25 %	G282	102
Compuesto 54	0,1	28,3	5,0	4	449	12	4	49 %	G282	102
Compuesto 54	0,3	64,8	4,9	5	97	51	5	11 %	G282	102
TSS	TSS	0,1	0,1	5	608	118	5	100 %	G282	103
Compuesto 1	0,1	21,6	10,4	5	462	181	5	76 %	G282	103
Compuesto 1	0,3	54,9	2,4	5	82	24	5	13 %	G282	103
Compuesto 59	0,1	32,4	6,2	5	300	76	5	49 %	G282	103
Compuesto 59	0,3	63,9	7,8	5	43	50	3	7 %	G282	103
Compuesto 1	0,1	17,8	4,2	5	ND	ND	0	ND	G650	104
Compuesto 1	0,3	50,3	6,6	5	ND	ND	0	ND	G650	104
Compuesto 59	0,1	21,2	6,1	5	ND	ND	0	ND	G650	104
Compuesto 59	0,3	51,6	10,4	5	ND	ND	0	ND	G650	104
TSS	TSS	0,14	0,1	5	1098	84	5	100 %	G502	105
Compuesto 1	0,03	9,24	4,1	5	931	41	5	85 %	G502	105
Compuesto 1	0,1	47,62	9,7	5	294	135	5	27 %	G502	105
Compuesto 24	0,03	11,34	5,4	5	772	126	5	70 %	G502	105
Compuesto 24	0,1	40,54	12,4	5	420	178	5	38 %	G502	105
Compuesto 59	0,03	11,8	6,2	5	909	115	5	83 %	G502	105
Compuesto 59	0,1	35,64	8,2	5	467	166	5	42 %	G502	105
Compuesto 61	0,03	7,78	2,9	5	711	66	5	65 %	G502	105
Compuesto 61	0,1	36,06	12,6	5	472	143	5	43 %	G502	105

Compuesto 94	0,03	19,76	6,8	5	605	93	5	55 %	G502	105
Compuesto 94	0,1	43,52	14,9	5	352	201	5	32 %	G502	105

Ejemplo 123: edición de hígado de TTR y niveles de TTR en suero que proporcionan el % de formación de indel para experimentos con G502

Se evaluó la administración in vivo mediante la medición de la eficiencia de la edición para los materiales administrados con las formulaciones que incluían varios compuestos lipídicos con amina. ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 6) se formuló como LNP con un ARNgs dirigido al gen de ratón TTR (SEQ ID NO: 4). Las LNP se formularon en un cociente 1:2 p/p de ARNgs a ARNm de Cas9, y en un cociente N/P de alrededor de 6. Las concentraciones molares de lípidos en el componente lipídico de las LNP se usan a % molar de lípido con amina/DSPC/colesterol/PEG-2k-DMG de 50/9/38/3. Las composiciones finales de LNP se caracterizaron y analizaron como se describe en el Ejemplo 120. El análisis del tamaño promedio de partículas, la polidispersión (PDI), el contenido total de ARN y la eficiencia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6 – Analítica de la composición

Compuesto	gs:ARNm	%E	Z prom (nm)	PDI	Promedio numérico (nm)	Experimento
Compuesto 1	1:2	99	88	0,04	71	106
Compuesto 100	1:2	99	89	0,04	70	106
Compuesto 101	1:2	99	73	0,04	58	106
Compuesto 102	1:2	98	71	0,02	57	106
Compuesto 103	1:2	99	65	0,05	50	106
Compuesto 1	1:2	99	91	0,002	76	107
Compuesto 114	1:2	96	87	0,02	72	107
Compuesto 115	1:2	97	93	0,01	76	107
Compuesto 116	1:2	99	90	0	74	107

Se administraron dosis i.v. a ratones hembra CD-1 a 0,1 mg/kg, evaluados para su edición en el hígado, y se midieron los niveles de TTR circulantes. Los resultados se muestran en las FIG. 2, 3 y la Tabla 7.

Tabla 7. Eficiencia de edición en ratón, que proporciona % formación de indel para los experimentos G502 y niveles de TTR en suero.

Compuesto	Edición		TTR en suero			Guía	Experimento		
	% medio de Indel	SD	N	TTR en suero (ug/ml)	SD	N	%TSS		
TSS	0,1	0,0	5	1168,5	326,6	5	100	G502	106
Compuesto 1	42,9	3,6	5	442	107,9	5	37,8	G502	106
Compuesto 100	12	5,1	5	1017,4	187,4	5	81,3	G502	106
Compuesto 101	25,9	1,9	5	655,8	118,7	5	56,1	G502	106
Compuesto 102	19,6	6,2	5	728,1	170,4	5	62,3	G502	106
Compuesto 103	4,2	1,0	5	1043,8	154,9	5	89,3	G502	106
TSS	0,1	0,0	5	1105,5	229,9	5	100	G502	107
Compuesto 1	32,8	4,2	5	593,76	174,5	5	53,7	G502	107
Compuesto 114	18,04	7,8	5	978,01	276,8	5	88,4	G502	107
Compuesto 115	19,68	3,3	5	816,3	128,2	5	73,8	G502	107
Compuesto 116	34,48	4,0	5	567,09	68,1	5	51,3	G502	107

Ejemplo 124 edición de hígado de TTR y niveles de TTR en suero que proporcionan el % de formación de indel para experimentos con G650

La administración in vivo al hígado, el bazo y la médula ósea se evaluó midiendo la eficiencia de edición de los materiales administrados con formulaciones que incluyen varios compuestos de lípidos de amina. ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 6) se formuló como LNP con un ARNg dirigidos al gen de ratón TTR (G650, SEQ ID: 2). Las LNP se formularon en un cociente 1:2 p/p de ARNg a ARNm de Cas9 y en un cociente de N/P de alrededor de 6. Las concentraciones molares de lípidos en el componente lipídico de las LNP se usan a % molar de lípido con amina/DSPC/colesterol/PEG-2k-DMG de 50/9/38/3. Las composiciones finales de LNP se caracterizaron y analizaron como se describe en el Ejemplo 120. El análisis del tamaño promedio de partículas, la polidispersión (PDI), el contenido total de ARN y la eficiencia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Analítica de la composición

Compuesto	gs:ARNm	%E	Z prom (nm)	PDI	Promedio numérico (nm)	Experimento
Compuesto 1	1:2	98	86	0,03	70	108

Compuesto 107	1:2	94	84	198 0,07	65	108
---------------	-----	----	----	-------------	----	-----

Se administraron dosis i.v. a ratones hembra CD-1 a 0,1, 0,3 o 1 mg/kg y se evaluaron para su edición en hígado, bazo y médula ósea. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Eficiencia de edición en ratón, proporcionando % de formación de indel para experimentos con G650

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Edición en el hígado (%)	% de edición en el bazo	% de edición en la médula ósea	Experimento
TSS	-	0,1	0,1	NA	108
Compuesto 1	0,1	23,74	0,62	NA	108
	0,3	58,48	2,2	NA	108
	1	73,6	6,26	2,66	108
Compuesto 107	0,1	0,52	0,08	NA	108
	0,3	1,04	0,12	NA	108
	1	5,92	0,3	0,32	108

Ejemplo 125 Estudios de administración en ratas

La administración in vivo en un modelo de rata se evaluó midiendo la eficiencia de edición de los materiales administrados con formulaciones que incluyen varios compuestos de lípidos de amina. ARNm de Cas9 (SEQ ID NO: 6) se formuló como LNP con un ARNg dirigido al gen de rata TTR (G534, SEQ ID NO: 5). Las LNP se formularon y caracterizaron como se describe en el Ejemplo 123. El análisis del tamaño promedio de partículas, la polidispersión (PDI), el contenido total de ARN y la eficiencia de encapsulación del ARN se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10 – Analítica de la composición

Compuesto	gs:ARNm	%E	Z prom (nm)	PDI	Promedio numérico (nm)	Experimento
Compuesto 1	1:2	98	88	0,01	73	109
Compuesto 12	1:2	97	80	0,06	62	109
Compuesto 59	1:2	98	91	0,04	75	109

Compuesto 94	1:2	97	95	0,02	77	109
--------------	-----	----	----	------	----	-----

Se administraron dosis i.v. a ratas hembra Sprague Dawley a 0,1 o 0,3 mg/kg y se evaluaron para su edición en hígado. Los resultados se muestran en la FIG. 4 y la Tabla 11.

Tabla 11. Eficiencia de edición en ratas, que proporciona % formación de indel para los experimentos G534 y niveles de TTR en suero.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Edición		TTR en suero			Guía		Experimento	
		% medio de Indel	SD	N	TTR en suero (ug/ml)	SD	N	%TSS		
TSS	0	0,1	0,0	5	1620,7	165,6	5	100,0	G534	109
Compuesto 1	0,1	21,1	6,7	5	916,9	141,1	5	56,6	G534	109
Compuesto 1	0,3	61,3	2,3	5	114,3	27,4	5	7,1	G534	109
Compuesto 12	0,1	37,6	9,8	4	744,2	196,4	4	45,9	G534	109
Compuesto 12	0,3	62,5	2,4	5	89,1	25,5	5	5,5	G534	109
Compuesto 59	0,1	12,4	6,1	5	1124,0	225,9	5	69,4	G534	109
Compuesto 59	0,3	46,2	7,9	5	337,9	95,2	5	20,9	G534	109
Compuesto 94	0,1	31,7	19,6	5	639,5	264,1	5	39,5	G534	109
Compuesto 94	0,3	60,0	9,1	5	132,9	115,3	5	8,2	G534	109

TABLA DE SECUENCIAS

Descripción	Secuencia	SEQ ID No.
G000282 ARNgs dirigido a TTR de ratón	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	1
G000650 ARNgs dirigido a B2M humano	mG*mA*mC*AAGCACCAGAAAGACCAGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	2
ARNm que codifica Cas9	GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUC GUGUGUGUGUCGUUGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCA CCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGA ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACA CAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCA CUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAA GAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACG AAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUG GAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGA AAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCG CAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAA AGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGA CUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAG AGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACA ACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAG ACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCA AGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACU GAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGC UGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUG	3

	AUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAG CAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGA GCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUG GCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGC AGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACA UCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUG AGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCA GGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGC UGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGC AAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAG CCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGG AAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUG AACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGA CAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAAC UGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCG UUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCCU GACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAA GAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGC GAAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGU CGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAA UGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUC CUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGU CUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAG GAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAA GGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUC GAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGA CCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACA ACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUG ACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGG UCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGG GGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGA CAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGA	
--	---	--

	GCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC CACGACGACAGCCUGACAUUAAGGAAGACAUCCAGAA GGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAAC ACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCCGGCAAUCAAGAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGU CAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCA UCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGA CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAA GGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACA CCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGU ACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUC GACCAGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGA CGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAG AACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGU CGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGA ACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUG ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAA GGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGAC AGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGA AUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGA GAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAG AAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGA ACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCG AAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGU CUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGG AAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGC AACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCA AACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAAC GGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGA CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGA UUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGA CAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGA	
--	---	--

	AGUACGGAGGAUUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGC GUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAA GAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAA UCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCCUGGAAGCAAAGGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGA CCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAC UGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGA GAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAA GUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAA AGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAG CUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAU CAUCGAACAGAUCAAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCC UGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUAC AACAAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGA AAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAG CACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGAC AGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGC AACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAA CAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGA GGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUUCUAGCUAGCCAU CACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAG AAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUC UUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAA CAUAAAUUUCUUUAAUCAUUUUUGCCUCUUUUCUCUGUG CUUCAAUUAAUAAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAUCUAG	
ARNgs G000502 dirigido a TTR de ratón	mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	4

ARNgs de G000534 dirigido a TTR de rata	mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	5
ARNm de Cas9	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCAC CAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUAC AAGGUGCCCUCCAAGAAGUUAAGGUGCUGGGCAACAC CGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCC UGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCG GCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGG AAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAA CGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCGG CUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGC ACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAG GUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCACCU GCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACC UGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUUGGCCACAUGAUC AAG UUCCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACCUGAACC CCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG GUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAU CAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCC GCCC GG CUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGA UCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUU CGGCAACCUGAUCGCCCGUGCCCGUGGGCCUGACCCCC AACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAA GCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGG ACAACCUGCUGGCCCGAGAUCGGCGACCAGUACGCCGAC CUGUUCUGGCCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCU GCUGUCCGACAUCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCA AGGCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUC AAGCGGUACGAC GAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCCUUGU GCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCU UCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGAC GGCGGCGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCA	6

	GCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUG CUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGC AGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCACCAGAUC CACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGG AGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAG AUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGU GGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGG AUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCUGGAA CUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCAG UCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCU GCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGU ACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUG AAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUC UGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUUCGUGGACCUGCU GUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGA AGGAGGACUACUUCAAGAAGAUUCGAGUGCUUCGACUCC GUGGAGAUUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCU CCCUGGGCACC UACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAG GACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAU CCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAG GACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACG CCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAG CGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGA AGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAG ACCAUCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAA CCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGA CCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGC CAGGGCGACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGC CGGCUCCCCCGCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCG UGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCG GCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGG AGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGG GAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGC UGGGCUCCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAAC ACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCU	
--	---	--

	GCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUG GACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAU CGUGCCCCAGUCCUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACA ACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAG UCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAU GAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGA UCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAG CGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCA UCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAG CACGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAA GUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGG UGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGG AAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAA CUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGG UGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAG UCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACG UGC GGAAGAUGAU CGCCAAGUCCGAGCAGGAGAU CGG CAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCA UGAACUUCUUAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGC GAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAU CGAGACCAACGGCGA GACCGGCGAGAU CGUGUGGACAAGGGCCGGGACUUC GCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGA ACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUC UCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAA GCUGAUCGCCC GGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGU ACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGU GCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAG AAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAU CAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACU UCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGAC CUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCU GGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGC GAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCCUCCCUCCAA GUACGUGAACUUCUGUACCUGGCCUCCACUACGAGA AGCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAG	
--	---	--

	CUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCACUACCUGGACGAGAU CAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCC UGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUA CAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCG AGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGC GCCCCGCGCCGUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGA CCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGAC GCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGA GACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGC GGCGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUGA	
--	--	--

Las modificaciones y enlaces de fosforotioato 2'-O-metilo son tal como se representa más adelante (m = 2'-OMe; * = fosforotioato).