LÍPIDOS CATIÓNICOS IONIZABLES RESTRINGIDOS Y NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de los EE. UU. número 63/588.282, presentada el 5 de octubre de 2023; solicitud provisional de los EE. UU. número 63/632.931, presentada el 11 de abril de 2024; y solicitud provisional de los EE. UU. número 63/654.744, presentada el 31 de mayo de 2024; las descripciones de cada una de las cuales se incorporan expresamente como referencia en la presente.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS ELECTRÓNICO

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha enviado electrónicamente y se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. El listado de secuencias se creó el 27 de septiembre de 2024, se denomina “24-0221-WO.xml”, y tiene un tamaño de 11.729 bytes.

ANTECEDENTES

Las formulaciones lipídicas se han usado en el laboratorio para el suministro de ácidos nucleicos a las

células. Las formulaciones tempranas basadas en el lípido catiónico 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP, por sus siglas en inglés) y el lípido ionizable fusogénico dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE, por sus siglas en inglés) presentaron un gran tamaño de partícula y fueron problemáticas cuando se usaron in vivo, exhibiendo un aclaramiento demasiado rápido, tropismo para el pulmón, y toxicidad. Se han desarrollado nanopartículas lipídicas (LNP, por sus siglas en inglés) que comprenden lípidos catiónicos ionizables para abordar estos problemas en la medida en que los productos basados en ARN, tal como el ARNpi ONPATTRO® y dos vacunas contra el SARS-CoV-2 basadas en ARNm, han recibido aprobación regulatoria y han ingresado al mercado.

Sin embargo, existe una capacidad limitada para controlar qué tejidos o células absorben la LNP una vez administrada. Las LNP administradas por vía intravenosa se absorben principalmente en el hígado, pulmón o bazo dependiendo en un grado significativo en la carga neta y el tamaño de partícula. Es posible dirigir > 90 % de la LNP al hígado mediante una combinación de formulación y administración intravenosa, por ejemplo. La administración intramuscular puede proporcionar un nivel clínicamente útil de suministro y expresión local. La LNP puede redirigirse a otros tejidos o tipos celulares conjugando a la LNP una entidad de unión con especificidad para el tejido diana o tipo celular, por ejemplo, conjugando un polipéptido que

contiene un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo. No obstante, evitar la captación por el hígado sigue siendo un desafío. Además, con los sistemas actuales, solo una porción menor del ácido nucleico encapsulado se suministra con éxito a las células de interés y al citoplasma. Las formulaciones actuales pueden liberar solo 2-5 % del ARN administrado en el citoplasma (ver, por ejemplo, Gilleron *et al*., 2013, *Nat. Biotechnol*. 31:638-646 and Munson *et al*., 2021, *Commun. Biol.* 4:211-224). Existen aún problemas de suministro fuera de la diana, baja eficiencia de liberación de ácido nucleico en el citoplasma y toxicidad asociada con la acumulación de los lípidos componentes.

Existe aún una necesidad de abordar problemas de suministro fuera de la diana, baja eficiencia de liberación de ácido nucleico en el citoplasma y toxicidad asociada con la acumulación de los lípidos componentes.

SUMARIO

Esta descripción se dirige a satisfacer las necesidades para abordar problemas de suministro fuera de la diana, baja eficiencia de liberación de agentes terapéuticos y proporciona otras ventajas relacionadas.

En ciertos aspectos, esta descripción proporciona lípidos catiónicos ionizables restringidos que tienen una estructura de la Fórmula M2 expuesta en la presente.

En algunas modalidades, esta descripción proporciona lípidos catiónicos ionizables CICL-207, CICL-215, CICL-216, CICL-217, CICL-218, CICL-219, CICL-220, CICL-221, CICL-222, CICL-223, CICL-224, CICL-225, CICL-238, CICL-239, CICL-242, CICL-243, CICL-244, CICL-245, CICL-246, CICL-247, CICL-248, y CICL-249 se establecen en la presente.

En ciertos aspectos, esta descripción proporciona métodos para sintetizar lípidos catiónicos ionizables como se describe en la presente, p. ej., CICL-207, CICL-215, CICL-216, CICL-217, CICL-218, CICL-219, CICL-220, CICL-221, CICL-222, CICL-223, CICL-224, CICL-225, CICL-238, CICL-239, CICL-242, CICL-243, CICL-244, CICL-245, CICL-246, CICL-247, CICL-248, y CICL-249 se establecen en la presente.

En ciertos aspectos, esta descripción proporciona nanopartículas lipídicas (LNP) y nanopartículas lipídicas dirigidas (tLNP) que incorporan los lípidos catiónicos ionizables descritos en esta descripción.

En ciertos aspectos, esta descripción proporciona métodos para preparar las LNP y tLNP como se describe en la presente.

En ciertas modalidades, esta descripción proporciona métodos para suministrar una carga útil biológicamente activa (p. ej., moléculas de ácido nucleico que codifican un agente terapéutico) en una célula que comprende poner en contacto la célula con una LNP o tLNP de esta descripción.

Estas y otras características, objetos y ventajas de esta descripción se entenderán mejor a partir de la descripción que sigue. En la descripción, se hace referencia a las figuras adjuntas, que forman parte de la presente y en los que se muestran a manera de ilustración, no de limitación, modalidades de esta descripción. La descripción de las modalidades preferidas no pretende limitar esta descripción de cubrir todas las modificaciones, equivalentes, y alternativas. Por lo tanto, debe hacerse referencia a las reivindicaciones enumeradas en la presente para interpretar el alcance de la descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La descripción se entiende mejor y las características, aspectos y ventajas distintas de las establecidas anteriormente se harán evidentes cuando se tenga en cuenta la siguiente descripción de las figuras.

Las Figuras 1A-1C representan la tasa de transfección (porcentaje de células que expresan el ARNm) versus el nivel de expresión (como moléculas de fluorocromo soluble equivalente (MESF)) para cuatro composiciones de tLNP que varían en el lípido catiónico ionizable y/o el componente PEG-lípido, como se indica. Las composiciones lipídicas completas se describen en la Tabla 7. Se muestran los resultados en células T esplénicas (Figura 1A), células

hepáticas $CD45^-$ (Figura 1B) y células hepáticas Kupffer (células hepáticas $CD45^+/CD11^+$; Figura 1C) de ratones C57BL/6 a los que se les administraron las tLNP. La entidad de unión de las tLNP era un anticuerpo anti-CD5 y la carga útil era un ARNm que codificaba mCherry.

Las Figuras 2A-2C representan la tasa de transfección (porcentaje de células que expresan el ARNm) versus el nivel de expresión (como moléculas de fluorocromo soluble equivalente (MESF)) para dos composiciones de tLNP que varían solo en el componente lipídico catiónico ionizable, como se indica. Las composiciones lipídicas completas se describen en la Tabla 7. Se muestran los resultados en células T esplénicas (Figura 2A), células hepáticas $CD45^-$ (Figura 2B) y células hepáticas Kupffer (células hepáticas $CD45^+/CD11^+$; Figura 2C) de ratones C57BL/6 a los que se les administraron las tLNP. La entidad de unión de las tLNP era un anticuerpo anti-CD5 y la carga útil era un ARNm que codificaba mCherry.

Las Figuras 3A-3B representan los datos de tasa de transfección compilados (porcentaje de células que expresan el ARNm; Figura 3A) y el nivel de expresión (MESF; Figura 3B) para tLNP que incorpora diversos lípidos catiónicos ionizables, o diferentes cantidades de lípido catiónico ionizable, normalizado al resultado obtenido para tLNP que comprende 58 % de CICL-207 como el lípido catiónico ionizable en cada experimento. La entidad de

unión de las tLNP era un anticuerpo anti-CD5 y la carga útil era un ARNm que codificaba mCherry.

Las Figuras 4A-4C representan la tasa de transfección para tLNP que incorpora diversos lípidos catiónicos ionizables versus pKa medida de la tLNP para células T esplénicas (Figura 4A), células hepáticas $CD45^-$ (Figura 4B) y células hepáticas Kupffer (células hepáticas $CD45^+/CD11^+$; Figura 4C) de ratones C57BL/6 a los que se administraron las tLNP. Las composiciones lipídicas completas se describen en la Tabla 7. La entidad de unión de las tLNP era un anticuerpo anti-CD5 y la carga útil era un ARNm que codificaba mCherry.

Las Figuras 5A-5C representan la tasa de transfección (porcentaje de células que expresan el ARNm) versus el nivel de expresión (como MESF o intensidad media de fluorescencia (MFI)) para composiciones de tLNP que varían solo en el componente lipídico catiónico ionizable, como se indica. La composición lipídica completa fue CICL:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL {58:10:30,5:1,4:0,1}. Se muestran los resultados en células T esplénicas (Figura 5A), células hepáticas $CD45^-$ (Figura 5B) y células hepáticas Kupffer (células hepáticas $CD45^+/CD11^+$; Figura 5C) de ratones C57BL/6 a los que se les administraron las tLNP. La entidad de unión de las tLNP era un anticuerpo anti-CD5 y la carga útil era un ARNm que codificaba mCherry.

Las Figuras 6A-6C representan la tasa de transfección (porcentaje de células que expresan el ARNm) para tLNP que comprende diferentes cantidades de lípido catiónico ionizable para dos lípidos catiónicos ionizables y cambios compensatorios en el contenido de colesterol. Las composiciones lipídicas completas se describen en la Tabla 7. Se muestran los resultados en células T esplénicas (Figura 6A), células hepáticas $CD45^-$ (Figura 6B) y células hepáticas Kupffer (células hepáticas $CD45^+/CD11^+$; Figura 6C) de ratones C57BL/6 a los que se les administraron las tLNP.

Las Figuras 7A-7H retratan los resultados de estudios en ratones NCG injertados con células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humana y dosificados con la composición tLNP 58 % de CICL-1 (F9) y 58 % de CICL-207 (F50) dirigidos a CD8 y encapsulando un ARNm que codifica ya sea mCherry o un CAR anti-CD19. Las Figuras 7A-7B representan la tasa de ingeniería de CAR mCherry o anti-CD19 en gráficos de barras para células T $CD8^+$ en bazo y sangre de ratones NCG injertados con PBMC humanas después de la administración de tLNP dirigida a células $CD8^+$. Los resultados para la tasa de ingeniería en células T esplénicas y sanguíneas se muestran en las Figuras 7A y 7B, respectivamente. Las Figuras 7C-7F representan la expresión de CAR anti-CD19 como moléculas MFI y CAR por célula (basadas en MESH) en gráficos de barras para células T $CD8^+$ en bazo y sangre de ratones NCG injertados con PBMC humanas después de

la administración de tLNP dirigida a células $CD8^+$. Los resultados para la expresión de CAR MFI en células T esplénicas y sanguíneas se muestran en las Figuras 7C y 7D, respectivamente. Los resultados para moléculas CAR por célula en células T esplénicas y células sanguíneas se muestran en las Figuras 7E y 7F, respectivamente. Las Figuras 7G-7H representan el agotamiento de las células B en gráficos de barras en el bazo durante 6 horas después de que los ratones recibieron la dosis de tLNP. El número de células B por µl de suspensión de células del bazo y el porcentaje de células B se muestran en las Figuras 7G y 7H respectivamente.

Las Figuras 8A-8E presentan imágenes de animales integrales (Figuras 8A-8B, propensas y supinas, respectivamente) e imágenes de bioluminiscencia de órganos individuales recogidas a las 6 y 24 horas después de la inyección (Figuras 8C-8D, respectivamente) y cuantificación de bioluminiscencia de órganos individuales (Figura 8E) para ratones C57BL/6 a los que se administraron BF1 LNP, BF1 tLNP dirigidas a CD5, F50 LNP, o F50 tLNP dirigidas a CD5 a las 6 horas y 24 horas después de la administración.

La Figura 9 representa la eficiencia de transfección in vivo como % de células positivas mCherry en células de médula ósea $CD34^+$(panel izquierdo) y células $CD34^+CD117^+$ (panel derecho) en ratones $CD34^+$ NCG humanizados después de la administración/transfección con ARNm de mCherry usando una tLNP decorada con un anticuerpo

monoclonal anti-CD117. Las tLNP comprendían composiciones lipídicas CICL-1 (F9) o CICL-207 (F50) y células madre hematopoyéticas y progenitoras $CD117^+$ dirigidas (HSPC, por sus siglas en inglés). Las barras representan la media a partir de los resultados de tres ratones (grupos F9 tLNP mCherry y F50 tLNP mCherry), o un ratón (grupo PBS).

La Figura 10 representa la eficiencia de transfección como % de células positivas mCherry después de la transfección de tLNP dirigida a CD117 en ratones NCG $CD34^+$. Las tLNP comprendían las composiciones lipídicas CICL-1 (F9) o CICL-207 (F50) y ARNm mCherry encapsulado y células madre hematopoyéticas y progenitoras $CD117^+$ dirigidas. Los datos se grafican para células de médula ósea $CD34^+CD38^{bajo}$ (panel superior izquierdo), células $CD117^+CD34^+CD388^{bajo}$ (panel superior derecho) y células $CD117^-CD34^+CD388^{bajo}$ (panel inferior).

La Figura 11 representa el porcentaje de inactivación de B2M (beta-2-microglobulina) en la médula ósea $CD34^+$ (panel izquierdo) o $CD34^+CD38^{bajo}$ en ratones $CD34^+$ NCG humanizados después de la administración/transfección de tLNP dirigidas a CD117 que encapsulan cargas útiles de edición de genes (ARNm SpCas9+ ARNgu dirigido al locus B2M), dado en 30 µg o 60 µg de las tLNP. Las tLNP comprendían composiciones lipídicas CICL-1 (F9) o CICL-207 (F50). Las barras representan la media de uno a tres ratones con los símbolos que indican resultados de ratones

injertados con HSPC $CD34^+$ humano de tres donantes diferentes (triángulos, cuadrados y círculos).

Las Figuras 12A-12L representan los niveles de diversas enzimas hepáticas, proteínas de fase aguda y citocinas en ratas a las que se les administró la F50 LNP. Las Figuras 12A-12B grafican los niveles medios de enzimas hepáticas en suero de rata a las 24 horas después de la dosificación de la composición de F50 LNP para aspartato aminotransferasa (AST, por sus siglas en inglés) (Figura 12A) y alanina amino transferasa (ALT, por sus siglas en inglés) (Figura 12B). Las figuras 12C-12E representan los niveles de tres proteínas de fase aguda en plasma de rata después de la administración de las dosis indicadas de la F50 LNP a las 6 y 24 horas después de la administración, específicamente α1-glicoproteína ácida (Figura 12C), α2-macroglobulina (Figura 12D) y haptoglobina (Figura 12E). Las Figuras 12F-12H muestran los niveles de tres citocinas proinflamatorias en plasma de rata después de la administración de las dosis indicadas de la F50 LNP a las 6 y 24 horas después de la administración, específicamente interleucina-6 (Figura 12F), interleucina-1β (Figura 12G), factor de necrosis tumoral α (Figura 12H).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta descripción proporciona lípidos catiónicos ionizables restringidos, denominados lípidos catiónicos ionizables en todo momento, métodos para sintetizarlos, así como intermedios útiles en la síntesis de estos lípidos y métodos de síntesis de los intermedios. Esta descripción proporciona lípidos catiónicos ionizables como un componente de nanopartículas lipídicas (LNP) que pueden usarse para suministrar una carga útil biológicamente activa (p. ej., moléculas de ácido nucleico que codifican un agente terapéutico) en células *in vivo* o *ex vivo*. Las composiciones de LNP también se describen en la presente, que incluyen LNP que comprenden un PEG-lípido funcionalizado para permitir la conjugación de una entidad de unión para generar LNP dirigidas (tLNP), es decir, LNP que contienen un entidad de unión que dirige la tLNP a un tejido o tipo celular deseado (p. ej., células inmunitarias tales como células T o células madre tales como células madre hematopoyéticas (HSC)). También se describen en la presente métodos para suministrar un ácido nucleico en una célula que comprenden poner en contacto la célula con una LNP o tLNP de esta descripción. La LNP y tLNP de esta descripción pueden usarse para transfección *in vivo, ex vivo*, o extracorpórea. También se describen en la presente

métodos para preparar LNP y tLNP que comprenden los lípidos catiónicos ionizables como se describe en la presente.

Antes de establecer esta descripción en mayor detalle, puede ser útil proporcionar abreviaturas y definiciones de ciertos términos que se usarán en la presente. Se establecen abreviaturas adicionales a lo largo de esta descripción.

Abreviaturas

Las abreviaturas usadas en la presente incluyen:

BOC_2O – dicarbonato de di-terc-butilo

$CDCl_3$ – Deuterocloroformo

CDI – carbonildiimidazol

CH_3CN – Acetonitrilo

CHOL – Colesterol

DMAP – 4-Dimetilaminopiridina

DMG — Dimiristoil glicerol

DSG — Distearoil glicerol

DSPC – Distearoilfosfatidilcolina

DSPE – Distearoilfosfatidiletanolamina

EDC-HCl – 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida · HCl

EtOAc – Acetato de etilo

EtOH – Etanol

Et_2O – Dietil éter

Et_3N – Trietilamina

MAL – Maleimida

Me_3N – Trimetilamina

MeOH – Metanol

MeOTf — trifluorometanosulfonato de metilo

Pd/C – Paladio sobre carbono

PEG — Polietilenglicol

$PhCH_3$ – Tolueno

TFA – Ácido trifluoroacético

THF – Tetrahidrofurano

Aunque esta descripción puede materializarse en diversas formas, la siguiente descripción de varias modalidades se realiza con el entendimiento de que la descripción debe considerarse como una ejemplificación de las innovaciones descritas en la presente y no pretende limitar la descripción a las modalidades específicas ilustradas.

Los títulos se proporcionan únicamente por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de las modalidades de ninguna manera. Las modalidades ilustradas bajo cualquier título pueden combinarse con modalidades ilustradas bajo cualquier otro encabezado.

En la medida en que cualquier material incorporado en la presente como referencia entre en conflicto con la descripción, rige la presente descripción.

Definiciones

Antes de establecer esta descripción en mayor detalle, se proporcionan las definiciones de ciertos términos que se usarán en la presente. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de esta descripción.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Debe entenderse que los términos “un” y “una” tal como se usan en la presente se refieren a “uno o más” de los componentes enumerados.

El uso de la alternativa (p. ej., “o”) debe entenderse como una, ambas, o cualquier combinación de estas de las alternativas.

El término “aproximadamente” como se usa en la presente en el contexto de un número se refiere a un rango centrado en ese número y que abarca un 10 % menos que ese número y un 10 % más que ese número. El término “aproximadamente” usado en el contexto de un rango se refiere a un rango extendido que abarca 10 % menos que del número más bajo listado en el rango y 10 % más que el número más grande listado en el rango.

A lo largo de esta descripción, cualquier rango de concentración, rango porcentual, rango de relación o rango entero debe entenderse que incluye el valor de cualquier número entero dentro del rango indicado y, cuando

sea apropiado, fracciones de este (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique lo contrario. Además, cualquier rango numérico de esta descripción relacionado con cualquier característica física, tal como subunidades poliméricas, tamaño o grosor, debe entenderse que incluye cualquier número entero dentro del rango indicado, a menos que se indique lo contrario. A lo largo de esta descripción, los rangos numéricos incluyen sus criterios de valoración citados, a menos que se indique específicamente lo contrario.

A menos que el contexto requiera otra cosa, a lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, la palabra “comprende” y las variaciones de esta, tales como, “comprende” y “que comprende”, deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como “que incluye, pero no se limita a”. Tal como se usa en la presente, los términos “incluir” y “comprender” se usan como sinónimos.

La frase “al menos uno de” cuando va seguida de una lista de artículos o elementos se refiere a un conjunto de extremo de uno o más de los elementos de la lista, que puede, pero no necesariamente, incluir más de uno de los elementos.

“Derivado”, como se usa en la presente, se refiere a una versión modificada química o biológicamente de un compuesto que es estructuralmente similar a un compuesto parental y (real o teóricamente) derivable de ese compuesto

parental. Generalmente, un “derivado” difiere de un “análogo” en que un compuesto parental puede ser el material de partida para generar un “derivado”, mientras que el compuesto parental no se usa necesariamente como material de partida para generar un “análogo”. Un derivado puede tener propiedades químicas o físicas diferentes que el compuesto parental. Por ejemplo, un derivado puede ser más hidrófilo o hidrófobo, o puede tener reactividad alterada en comparación con el compuesto parental. Aunque se puede obtener un derivado mediante modificación física (por ejemplo, biológica o química) del compuesto parental, un derivado también se puede derivar conceptualmente, por ejemplo, como cuando se diseña una secuencia proteica basada en una o más secuencias conocidas, se construye un ácido nucleico codificante, y la proteína derivada se obtiene por expresión del ácido nucleico codificante.

Como se usa en la presente, “expansión” se refiere a la proliferación de células aumentando su número. Los agentes activadores pueden ser usados para estimular la proliferación (entre otros cambios metabólicos) pero también pueden resultar en la muerte inducida por activación tras la exposición inicial de manera que no hay expansión inmediata. Para las células T tratadas *in vitro* con agentes activadores como los activadores de IL-2 o CD3/CD28, el tiempo de duplicación puede ser de

aproximadamente 24 horas (lo cual es bastante típico de las células de mamíferos *in vitro* en general); el tiempo de duplicación *in vivo* puede ser sustancialmente más corto, dependiendo de la presencia y el tipo de estimulación. En consecuencia, durante un tiempo limitado de manipulación extracorpórea, incluso cuando se usan agentes activadores, tales protocolos serán efectivamente sin expansión.

Como se usa en la presente, una “proteína exógena” se refiere a un péptido o proteína sintética, recombinante u otro que no es producido por una célula de tipo silvestre de ese tipo o se expresa a un nivel inferior en una célula de tipo silvestre que en una célula que contiene el polipéptido exógeno. En algunas modalidades, un péptido exógeno es un péptido o proteína codificada por un ácido nucleico que se introdujo en la célula, cuyo ácido nucleico opcionalmente no es retenido por la célula. Como se usa en la presente, “péptido” se refiere a una cadena de aminoácidos de menos de 50 aminoácidos de longitud, mientras que “proteína” y “polipéptido” se refieren a una cadena de aminoácidos de al menos 50 aminoácidos de longitud.

Como se usa en la presente, “extracorpóreo” se usa en referencia a células, tales como células de sangre periférica o médula ósea, recolectadas o extraídas del cuerpo y la manipulación o modificación de esas células antes de su retorno pretendido (reinfusión). La manipulación y modificación de células generalmente se

relaciona con procedimientos de separación y lavado celular y exposición a agentes de activación (p. ej., modificadores de respuesta biológica (BRM)) y agentes de transfección *(p. ej.*, LNP, tLNP), durante un intervalo de tiempo de varias horas, por ejemplo, menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas, o menos de 1 hora; y en el espacio a una sola institución. Extracorpóreo se usa en contraposición a *ex vivo* que, como se usa en la presente, incluye una manipulación más extensa que incluye períodos prolongados de cultivo y expansión celular, y/o almacenamiento o envío refrigerado o criogénico, durante varios días o más.

Como se usa en la presente, “transfección” o “transfectar” se refiere a la introducción de ácidos nucleicos en células por métodos no virales. La transfección puede estar mediada por fosfato de calcio, polímeros catiónicos, perlas magnéticas, electroporación y reactivos basados en lípidos. En modalidades preferidas descritas en la presente, la transfección está mediada por nanopartículas lipídicas sólidas (LNP) que incluyen LNP dirigida (tLNP) (que también se puede usar para suministrar cargas útiles no de ácido nucleico a las células). El término transfección se usa en distinción a la transducción -transferencia de material genético de célula a célula o de virus a célula- y transformación -la captación de material genético extracelular por los procesos naturales de una célula. Como

se usa en la presente, frases tales como “suministrar un ácido nucleico a una célula” son sinónimos de transfección.

“Reprogramación”, como se usa en la presente con respecto a las células inmunitarias, se refiere a cambiar la funcionalidad de una célula inmunitaria con respecto a la especificidad antigénica al causar la expresión de un receptor de células T exógeno (TCR), un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un acoplador de células inmunitarias (“agentes de reprogramación”). En general, los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK) podrían reprogramarse con un TCR, un CAR o un acoplador de células inmunitarias mientras que solo se usaría un CAR o un acoplador de células inmunitarias en la reprogramación de monocitos. Como se usa en la presente con respecto a las células madre, por ejemplo células madre hematopoyéticas (HSC) o células madre mesenquimales (MSC), “reprogramación” se refiere a la corrección o mejoramiento de un defecto genético (por ejemplo, una hemoglobinopatía) de manera que el gen modificado o corregido y el producto génico son los agentes de reprogramación. La reprogramación puede ser transitoria o duradera dependiendo de la naturaleza del agente de ingeniería.

“Agente de ingeniería”, como se usa en la presente, se refiere a agentes que confieren la expresión de un agente de reprogramación por una célula inmunitaria, particularmente

un linfocito no B o monocito. Los agentes de ingeniería pueden incluir ácidos nucleicos, que incluyen ARNm, que codifican el agente de reprogramación. Los agentes de ingeniería también pueden incluir ácidos nucleicos que son o codifican componentes de sistemas de edición de genes tales como nucleasas guiadas por ARN, ARN guía y plantillas de ácido nucleico para inactivar un agente de reprogramación o inactivar un receptor de antígeno endógeno. Los sistemas de edición de genes comprenden editores de bases, editores principales o Gene writer. Las nucleasas guiadas por ARN incluyen nucleasas CRISPR tales como Cas9, Cas12, Cas13, Cas3, CasMINI, Cas7-11, y CasX. Para la expresión transitoria de un agente de reprogramación, tal como un CAR, se puede usar un ARNm que codifica el agente de reprogramación como el agente de ingeniería. Para una expresión duradera del agente de reprogramación, tal como un gen exógeno, modificado o corregido (y su producto génico), el agente de ingeniería puede comprender nucleasas dirigidas a ARN codificadas por ARNm, ARN guía, plantillas de ácidos nucleicos y otros componentes de sistemas de edición de genes/genomas.

Los ejemplos de componentes de edición de genes que están codificados por una molécula de ácido nucleico incluyen un ARNm que codifica una nucleasa guiada por ARN, una proteína de edición de genes o bases, una proteína de edición principal, una proteína Gene Writer (p. ej., un retrotransposón de repetición terminal no larga (LTR)

modificado o modularizado), una retrotransposasa, un escritor de ARN, una nucleasa de dedo de zinc (ZFN), una nucleasa efectora tipo activador de la transcripción (TALEN), una meganucleasa, una transposasa, un retrotransposón, una transcriptasa inversa (*p. ej.,* transcriptasa inversa M-MLV), una nickasa o nucleasa inactiva (*p. ej.,* Cas9, nCas9, dCas9), una recombinasa de ADN, una nucleasa CRISPR (*p. ej.,* Cas9, Cas12, Cas13, Cas3, CasMINI, Cas7-11, CasX), una nickasa de ADN, una nickasa Cas9 (*p. ej.,* D10A o H840A), o cualquier fusión o combinación de estas. Otros componentes incluyen un ARN guía (ARNg), un ARN de guía única (ARNgu), un ARN guía de edición principal (ARNgep), un ARN de repetición palindrómica corta agrupada y regularmente interespaciada (CRISPR) (ARNri), un ARN de repetición palindrómica corta agrupada y regularmente interespaciada (CRISPR) transactivador (tracrARN) o una molécula de ADN que se insertará o servirá como plantilla para la reparación de una rotura de doble cadena (DSB) en un locus genómico específico. Se revisa la tecnología de edición de genomas, genes y bases en Anzalone *et al*., *Nature Biotechnology* 38:824-844, 2020, Sakuma, *Gene and Genome Editing* 3-4:100017, 2022, y Zhou *et al*., MedComm 3(3):e155, 2022, cada una de las cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los componentes y usos de esta tecnología en la medida que no entra en conflicto con la presente descripción.

“Agente acondicionador”, como se usa en la presente, se refiere a un modificador de respuesta biológica (BRM, por sus siglas en inglés) que mejora la eficiencia de la ingeniería de una célula inmunitaria, expande el número de células inmunitarias disponibles para ser modificado por ingeniería genética o el número de células diseñadas en un tejido diana (por ejemplo, un tumor, tejido fibrótico o tejido que sufre un ataque autoinmunitario), promueve la actividad de la célula modificada por ingeniería genética en un tejido diana, o amplía la gama de mecanismos operativos que contribuyen a una reacción inmunitaria terapéutica. Se puede proporcionar un agente acondicionador mediante la administración de un ácido nucleico codificador en una tLNP. Los BRM ilustrativos incluyen citocinas, tales como IL-7, IL-15 o IL-18.

“Célula inmunitaria”, como se usa en la presente, puede referirse a cualquier célula del sistema inmunitario. Sin embargo, aspectos particulares pueden excluir leucocitos polimorfonucleares y/o células B, o estar limitados a linfocitos no B tales como células T y/o células NK, o a monocitos tales como células dendríticas y/o macrófagos en sus diversas formas.

Como se usa en la presente, “nanopartícula lipídica” (LNP) significa una partícula sólida, a diferencia de un liposoma que tiene un lumen acuoso. El

núcleo de una LNP, como el lumen de un liposoma, está rodeado por una capa de lípido que puede ser, pero no necesariamente, una monocapa lipídica continua, una bicapa, o multicapa que tiene tres o más capas lipídicas.

Como se usa en la presente, una “entidad de unión” o “entidad de direccionamiento” se refiere a una proteína, polipéptido, oligopéptido, péptido, carbohidrato, ácido nucleico, o combinaciones de estos que es capaz de unirse específicamente a una diana o múltiples dianas. Un dominio de unión incluye cualquier compañero de unión natural, sintético, semisintético o producido recombinantemente para una molécula biológica u otra diana de interés. Las entidades de unión ilustrativas de esta descripción incluyen un anticuerpo, un Fab′, $F(ab')_2$,Fab, Fv, rIgG, scFv, hcAb (anticuerpos de cadena pesada), un anticuerpo de dominio único, VHH, VNAR, sdAb, nanocuerpo, ectodominios receptores o porciones de unión a ligando de este, o ligandos (p. ej., citocinas, quimiocinas). Un “Fab” (fragmento de unión al antígeno) es la parte de un anticuerpo que se une a antígenos e incluye la región variable y CH1 de la cadena pesada enlazada a la cadena ligera a través de un enlace disulfuro entre cadenas. En otras modalidades, una entidad de unión comprende un dominio de unión a ligando de un receptor o un ligando de receptor. En algunas modalidades, una entidad de unión puede tener más de una especificidad que incluye, por

ejemplo, aglutinantes biespecíficos o multiespecíficos. Se conoce una variedad de ensayos para identificar las entidades de unión de esta descripción que se unen específicamente a una diana particular, que incluye transferencia Western, ELISA, y análisis Biacore®. Una entidad de unión, tal como una entidad de unión que comprende dominios variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina (p. ej., scFv), puede incorporarse en una variedad de supercóntigos o estructuras de proteínas como se describe en la presente, tales como un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este, una proteína de fusión scFv-Fc, o una proteína de fusión que comprende dos o más de tales dominios de unión a inmunoglobulina.

Como se usa en la presente, “anticuerpo” se refiere a una proteína que comprende un dominio de inmunoglobulina que tiene regiones hipervariables que determinan la especificidad con la que el anticuerpo se une al antígeno; las denominadas regiones determinantes de complementariedad individual (CDR). Por lo tanto, el término anticuerpo puede referirse a anticuerpos intactos o completos, así como a fragmentos de anticuerpos y construcciones que comprenden una porción de unión al antígeno de un anticuerpo completo. Si bien el anticuerpo natural canónico tiene un par de cadenas pesadas y ligeras, los camélidos (camellos, alpacas, llamas, etc.) producen anticuerpos tanto con la estructura canónica como

anticuerpos que comprenden únicamente cadenas pesadas. La región variable del anticuerpo camélico solo de cadena pesada tiene una estructura distinta con una CDR3 alargada denominada VHH o, cuando se produce como un fragmento, un nanocuerpo. Los fragmentos de unión al antígeno y construcciones de anticuerpos incluyen $F(ab)_2$, F(ab), minicuerpos, Fv, Fv (scFv) monocatenario, diacuerpos y VH. Tales elementos pueden combinarse para producir reactivos bi y multiespecíficos, tales como los acopladores biespecíficos de células T (BiTE, por sus siglas en inglés). El término “anticuerpo monoclonal” surgió de la tecnología de hibridoma pero ahora se usa para referirse a cualquier especie molecular singular de anticuerpo independientemente de cómo se originó o se produjo. Los anticuerpos se pueden obtener mediante inmunización, selección de una genoteca sin exposición previa o inmunizada (por ejemplo, mediante presentación en fagos), alteración de una secuencia codificante de anticuerpos aislada, o cualquier combinación de estas. En la técnica se conocen numerosos anticuerpos que podrían usarse como entidades de unión. Se ha propuesto o recomendado una excelente fuente de información sobre anticuerpos para un Nombre Internacional No Exclusivo (INN), que incluye información de secuencia, es Wilkinson & Hale, 2022, *MAbs* 14(1):2123299, que incluye sus Tablas Suplementarias, que se incorpora en la presente como referencia por todo lo que enseña sobre anticuerpos

individuales y los diversos formatos de anticuerpos que se pueden construir. La patente de los EE. UU. núm. 11.326.182 y especialmente su Tabla 9 titulada “Anticuerpos contra el cáncer, la inflamación y el sistema inmunitario”, es una fuente de secuencia y otra información para un amplio rango de anticuerpos que incluyen muchos que no tienen un INN y se incorpora en la presente como referencia para todo lo que enseña sobre anticuerpos individuales.

Un anticuerpo u otra entidad de unión (o una proteína de fusión de este) “se une específicamente” a una diana si se une a la diana con una afinidad o Ka (es decir, una constante de asociación de equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de 1/M) igual o mayor que 10^5 M^{-1}, mientras que no se une significativamente a otros componentes presentes en una muestra de prueba. Los dominios de unión (o proteínas de fusión de los mismos) pueden clasificarse como dominios de unión de “alta afinidad” (o proteínas de fusión de los mismos) y dominios de unión de “baja afinidad” (o proteínas de fusión de los mismos). Los dominios de unión de “alta afinidad” se refieren a aquellos dominios de unión con una Ka de al menos 10^8 M^{-1}, al menos 10^9 M^{-1}, al menos 10^{10} M^{-1}, al menos 10^{11} M^{-1}, al menos 10^{12} M^{-1}, o al menos 10^{13} M^{-1}, preferentemente al menos 10^8 M^{-1} o al menos 10^9 M^{-1}. Los dominios de unión de “baja afinidad” se refieren a aquellos dominios de unión con una Ka de hasta

10^8 M^{-1}, de hasta 10^7 M^{-1}, de hasta 10^6 M^{-1}, de hasta 10^5 M^{-1}. Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de disociación en equilibrio (Kd) de una interacción de unión particular con unidades de M (p. ej., 10^{-5} M to 10^{-13} M). Las afinidades de los polipéptidos del dominio de unión y las proteínas de fusión de acuerdo con esta descripción pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales (ver, p. ej., Scatchard *et al.*, 1949, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y patente de los EE. UU. núms. 5.283.173, 5.468.614, o el equivalente).

Como se usa en la presente, “carga útil” se refiere a un agente biológicamente activo cargado negativamente que puede interactuar con lípidos catiónicos, tales como los lípidos catiónicos ionizables de esta descripción, para quedar encapsulado dentro de nanopartículas lipídicas que comprenden el lípido catiónico. El agente biológicamente activo cargado negativamente puede ser una molécula orgánica pequeña, o una macromolécula tal como un ácido nucleico, un carbohidrato, o un péptido o polipéptido. En muchas modalidades, la carga útil puede ser una o más moléculas de ácido nucleico, ARN o ADN, incluidas moléculas de ARNm y ARN guía (ARNg).

Como se usa en la presente, “agente biológicamente activo” se refiere a cualquier sustancia, o un componente de una combinación de sustancias, que afecte

una respuesta metabólica o fisiológica en un organismo vivo o células cultivadas del mismo.

Como se usa en la presente, “agente terapéutico” es una sustancia cuya actividad biológica puede potencialmente curar, mejorarse, estabilizar, prevenir o impactar de cualquier otra manera beneficiosamente una enfermedad, afección patológica, u otro trastorno.

Por simplicidad, los grupos químicos se definen y se denominan en todo momento principalmente como entidades químicas univalentes (p. ej., alquilo, arilo, y lo similar). Sin embargo, tales términos también pueden usarse para transmitir las correspondientes entidades multivalentes bajo las circunstancias estructurales apropiadas claras para los expertos en la técnica. Por ejemplo, mientras que una entidad “alquilo” generalmente se refiere a un radical monovalente (*p. ej.*, CH_3-CH_2-), en ciertas circunstancias una entidad de enlace bivalente puede ser “alquilo”, en cuyo caso los expertos en la técnica entenderán que el alquilo es un radical divalente (*p. ej.*, -CH_2-CH_2-), que es equivalente al término “alquileno”. (Similarmente, en circunstancias en las que se requiere una entidad divalente y se afirma que es “arilo”, los expertos en la técnica entenderán que el término “arilo” se refiere a la entidad divalente correspondiente, arileno). Se entiende que todos los átomos tienen su número

normal de valencias para la formación de enlace (*es decir*, 4 para carbono, 3 para N, 2 para O y 2, 4, o 6 para S, dependiendo del estado de oxidación de la S).

El término “alquilo” tal como se usa en la presente se refiere a grupos alifáticos saturados de cadena recta y ramificada que tienen de 1 a 12 átomos de carbono. Como tal, “alquilo” abarca los grupos C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11} y C_{12}.

El término “alquenilo” como se usa en la presente significa un grupo alifático insaturado de cadena recta o ramificada con uno o más dobles enlaces carbono-carbono, que tiene de 2 a 12 átomos de carbono. Como tal, “alquenilo” abarca los grupos C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11} y C_{12}.

En algunas modalidades, la cadena de hidrocarburo no está sustituta. En otras modalidades, uno o más hidrógenos del grupo alquilo o alquenilo pueden estar sustituidos con el mismo o diferentes sustituyentes.

Alquinoico se refiere a una entidad de ácido carboxílico que comprende uno o más triples enlaces carbono-carbono. En algunas modalidades, los hidrógenos están no sustituidos. En otras modalidades, uno o más hidrógenos del grupo alquinoico pueden sustituirse con el mismo o diferentes sustituyentes.

La amida se refiere a un derivado de ácido carboxílico que comprende un grupo carbonilo de un ácido carboxílico unido a una entidad amina.

Éster se refiere a un derivado de ácido carboxílico que comprende un enlace del grupo carbonilo a un grupo alquiloxi para formar un enlace éster -C(=O)-O-.

El grupo de cabeza se refiere a la porción hidrofílica o polar de un lípido.

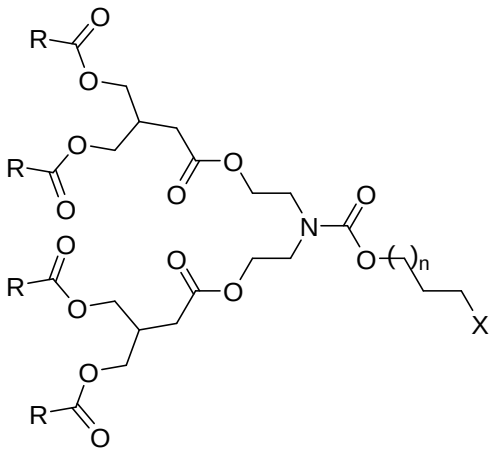
El esterol se refiere a un subgrupo de esteroides que contienen al menos un grupo hidroxilo (OH). Los ejemplos de esteroles incluyen, sin limitación, colesterol, ergosterol, β-sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, 20-hidroxicolesterol, 22-hidroxicolesterol, y lo similar.

Como estándar, el enlace representado como una cuña sólida se extiende por encima del plano y el enlace representado como una cuña punteada se extiende por debajo del plano cuando se representa la estereoquímica absoluta, en todo momento.

En comparación con moléculas similares en las que dos colas ramificadas están desconectadas entre sí, en los lípidos ionizables restringidos descritos en la presente, un anillo que comprende un átomo de nitrógeno de punto de ramificación central conecta los dos grupos de cola ramificada entre sí, reduciendo su libertad de movimiento. Como se usa en la presente, “restringido” se refiere a esta libertad de movimiento limitada de los dos grupos de cola que se extienden desde un anillo que comprende un átomo de nitrógeno.

Lípidos catiónicos ionizables

Al diseñar familias de compuestos químicos, es común tener un núcleo constante o casi constante y variar los grupos colgantes adheridos a él. Se ha adoptado un enfoque diferente con los lípidos catiónicos ionizables descritos en la presente. Se proporciona una familia de lípidos catiónicos ionizables dentro de la estructura general de la Fórmula 1b donde R representa colas hidrófobas del lípido, n representa un número entero de 0 a 4, y X constituye el grupo de cabeza polar que comprende una amina ionizable.

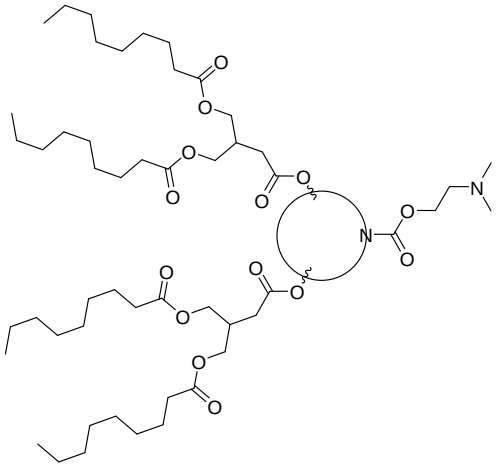


Fórmula 1b

Tales lípidos son útiles como componente de nanopartículas lipídicas (LNP) para el suministro de ácidos nucleicos a las células. Es conveniente dibujar la estructura de los lípidos como se muestra aquí tanto por compacidad como porque ilustra la forma cónica que se entiende promueve el escape endosómico de los contenidos de las LNP que comprenden tales lípidos. No obstante, esta es solo una posible

conformación que pueden adoptar los lípidos. La entropía favorecerá la adopción de conformaciones múltiples.

La orientación de los tres grupos que se extienden desde el átomo de nitrógeno de punto de ramificación central en la Fórmula 1b puede restringirse formando un anillo que comprende ese átomo de nitrógeno y al que están unidos los dos grupos de cola ramificados, por ejemplo, la Fórmula 1c:



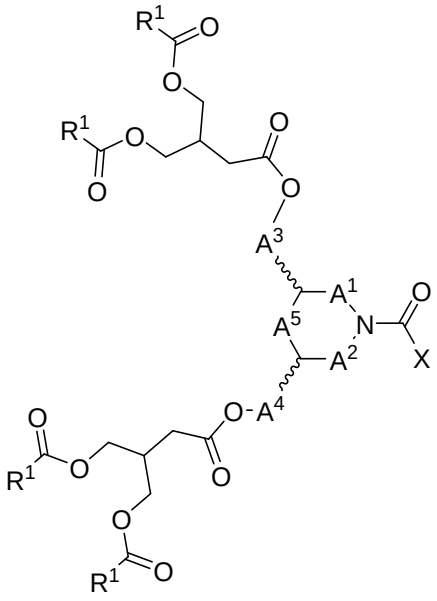
Fórmula 1c

Al introducir esta restricción, se reduce el número de conformaciones que pueden adoptar los lípidos. Esto puede aumentar la estabilidad física de las LNP o tLNP que incorporan tales lípidos restringidos en comparación con las LNP o tLNP que incorporan lípidos similares que carecen de un anillo de restricción.

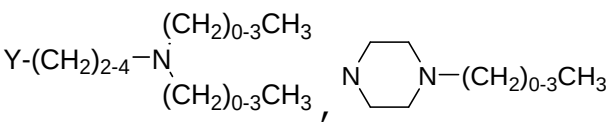
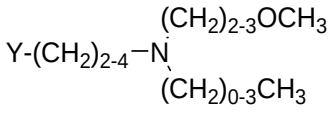
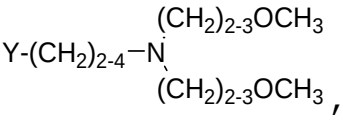
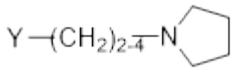
El tamaño del anillo puede variarse al igual que el posicionamiento de las posiciones de acoplamiento de los grupos de cola, si los grupos de cola se acoplan directamente al anillo o si se interponen carbonos

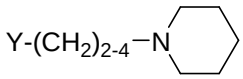
adicionales, si los grupos de cola son cis o trans de manera que los sustituyentes son axiales o ecuatoriales, o si los grupos de cola se unen simétrica o asimétricamente en el anillo. Sin embargo, estas variaciones deben preservar el alto grado de biodegradabilidad que se cree que es conferido por estos grupos de cola ramificados, y el grupo de cabeza puede alterarse para lograr una c-pKa y cLogD favorables.

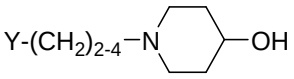
En ciertos aspectos, los lípidos catiónicos ionizables restringidos de esta descripción tienen una estructura de fórmula M2:

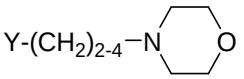


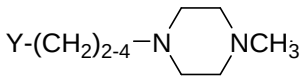
M2,

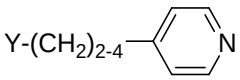
en donde X es     ,

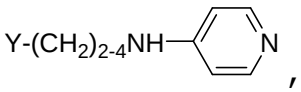


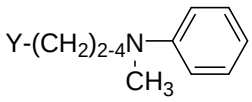
,


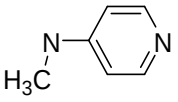
,


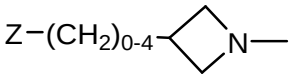
,


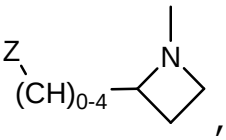
,


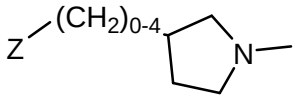
,


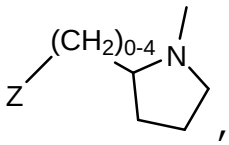
,


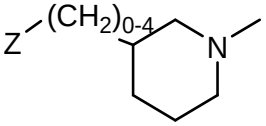
,


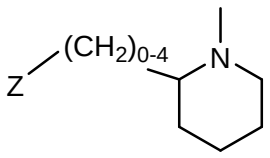
,


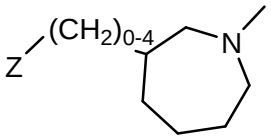
,


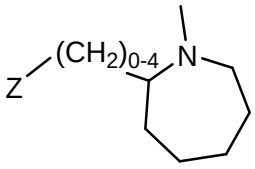
,


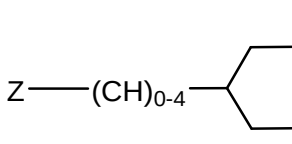
,


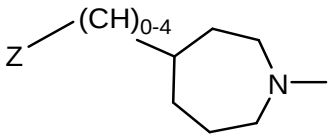
,


,


,


,


,


, o


;

Y es O, S, NH, o NCH_3;

Z es O, NH, o NCH_3;

cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11} o alquenilo C_7-C_{11};

cada A^1, A^2, A^3, y A^4 se selecciona independientemente de $(CH_2)_0$ y $(CH_2)_1$, y

A^5 se selecciona de $(CH_2)_{0-4}$, CH=CH, y CH_2-CH=CH-CH_2; y

un enlace ondulado indica que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o una mezcla de estereoconfiguraciones.

En diversas modalidades, A^1 a A^4 se seleccionan de tal manera que solo haya dos átomos de cadena principal entre el nitrógeno del anillo y cada oxígeno éster más cercano en el grupo de cola más cercano.

En ciertas modalidades, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_{1-4}$ o CH_2-CH=CH-CH_2.

En ciertas modalidades, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_0$ y A^5 es $(CH_2)_1$.

En ciertas modalidades, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_0$.

En ciertas modalidades, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$ y A^5 es $(CH_2)_1$.

En ciertas modalidades, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$ o CH=CH.

Los lípidos catiónicos ionizables de esta descripción tienen una estructura ramificada para dar al lípido una forma cónica en lugar de una forma tridimensional cilíndrica y tal estructura ayuda a promover la actividad endosomolítica. Cuanto mayor sea la actividad endosomolítica, más eficiente será la liberación de la carga nucleotídica.

En ciertas modalidades, el lípido catiónico ionizable es sustancialmente enantiomericamente puro (*p. ej.*, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente

99 % puro). En ciertas modalidades, el lípido catiónico ionizable es una mezcla racémica. En ciertas modalidades, el lípido catiónico ionizable es una mezcla de dos o más estereoisómeros. En ciertas modalidades, al menos dos de los dos o más estereoisómeros son diastereómeros. En ciertas modalidades, al menos dos de los dos o más estereoisómeros son enantiómeros.

Los lípidos catiónicos ionizables como se describe en la presente, pueden ser útiles como un componente de nanopartículas lipídicas para suministrar ácidos nucleicos, que incluyen ADN, ARNm o ARNpi a las células. Los lípidos catiónicos ionizables pueden tener una c-pKa (pKa calculada) en el rango de aproximadamente 6, 7 u 8 a aproximadamente 9, 10 u 11. Por ejemplo, en diversas modalidades como se describe en la presente, los lípidos catiónicos ionizables tienen una c-pKa que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, aproximadamente 7 a aproximadamente 10, aproximadamente 8 a aproximadamente 10, aproximadamente 8 a aproximadamente 9, 6 a 10, 7 a 10, 8 a 10, u 8 a 9. En ciertas modalidades, los lípidos catiónicos ionizables tienen una c-pKa que varía de aproximadamente 8,2 a aproximadamente 9,0 o de 8,2 a 9,0. En ciertas modalidades, los lípidos catiónicos ionizables tienen una c-pKa que varía de aproximadamente 8,4 a aproximadamente 8,7 o de 8,4 a 8,7. Los lípidos catiónicos ionizables como se describe en la presente pueden tener cLogD que varía de aproximadamente 9 a aproximadamente 18, por ejemplo, que

varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 18, o aproximadamente 10 a aproximadamente 16, a aproximadamente 10 a aproximadamente 14, o de aproximadamente 11 a aproximadamente 18, o aproximadamente 11 a aproximadamente 15, o aproximadamente 11 a aproximadamente 14. Los lípidos catiónicos ionizables como se describen en la presente pueden tener cLogD que varía de 9 a 18, por ejemplo, que varía de 10 a 18, o 10 a 16, a 10 a 14, o 11 a 18, o 11 a 15, o 11 a 14. En ciertas modalidades, los lípidos catiónicos ionizables tienen un cLogD que varía de aproximadamente 13,6 a aproximadamente 14,4 o de 13,6 a 14,4. En ciertas modalidades, los lípidos catiónicos ionizables como se describe en la presente pueden tener una c-pKa que varía de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 o de 8 a 11 y un cLogD que varía de aproximadamente 9 a aproximadamente 18 o de 9 a 18. Por ejemplo, en ciertas modalidades, los lípidos catiónicos ionizables tienen una c-pKa que varía de aproximadamente 8,4 a aproximadamente 8,7 o de 8,4 a 8,7 y cLogD que varía de aproximadamente 13,6 a aproximadamente 14,4 o de 13,6 a 14,4. Estos rangos pueden conducir a una pKa medida en la LNP que va de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 o de 6 a 7, lo que facilita la ionización en un endosoma después del suministro a una célula.

En algunas modalidades, puede ser deseable una basicidad algo mayor y puede obtenerse a partir de lípidos catiónicos ionizables con c-pKa y cLogD en los rangos

mencionados. En algunas modalidades, el cLogD es aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, o en un rango unido por cualquier par de estos valores. El diseño de lípidos también tiene en cuenta las posibles vías de biodegradabilidad de los lípidos diana, usando esterasas en plasma, hígado y otros tejidos. Otra consideración en el diseño de lípidos es el destino de fragmentos de lípidos ionizables resultantes después de la escisión de esterasa. Preferentemente, los fragmentos resultantes se eliminan rápidamente del cuerpo sin la intervención de metabolismo oxidativo hepático.

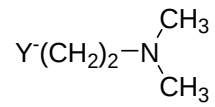
Como se usa en la presente, cLogD es una medida calculada de lipofilicidad que da cuenta del estado de ionización de la molécula a un pH particular, que es un predictor de la partición del lípido entre agua y octanol en función del pH. Más específicamente, cLogD se calcula a un pH especificado basado en cLogP y c-pKa. (LogP es el coeficiente de partición de una molécula entre las fases acuosa (p. ej., agua) y lipofílica (p. ej., octanol)). Numerosos paquetes de software están disponibles para proporcionar valores de cLogD. Cuando se desea mayor basicidad del lípido ionizable, debe equilibrarse con una mayor lipofilicidad representada por un mayor valor de cLogD. El equilibrio de basicidad y lipofilicidad es necesario para

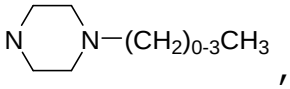
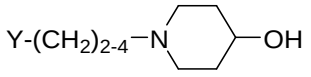
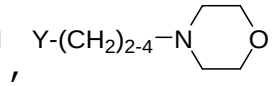
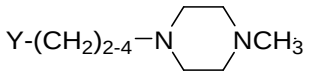
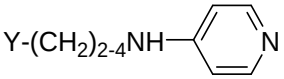
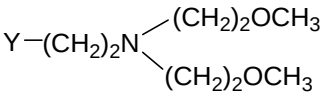
el funcionamiento óptimo de la LNP tanto para la estabilidad de la partícula como para la liberación de la carga útil biológicamente activa (p. ej., una o más especies de moléculas de ácido nucleico que pueden codificar un agente terapéutico) tras la captación por una célula. En consecuencia, a medida que R^1 aumenta de C6-C10, aumentará la lipofilicidad global del lípido catiónico ionizable, como lo representa el cLogD. Esto puede equilibrarse con alteraciones en X, que dan como resultado una c-pKa más alta basada en la basicidad del grupo de cabeza. Cada una de las especies lipídicas catiónicas ionizables descritas en la presente tiene un valor de cLogD y c-pKa dentro del(los) rango(s) deseado(s), como se describe en la presente. Los valores específicos de cLogD y c-pKA se han calculado usando ACD Labs Structure Designer v 12.0 para lípidos catiónicos iónicos de la descripción. cLogP se calculó usando ACD Labs Versión B; El cLogD se calculó a pH 7,4. En el Tabla 1 se muestran cLogD y c-pKA para CICL-207, CICL-215, CICL-216, CICL-217, CICL-218, CICL-219, CICL-220, CICL-221, CICL-222, CICL-223, CICL-224, y CICL-225.

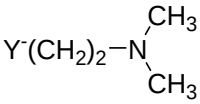
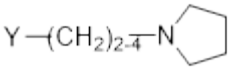
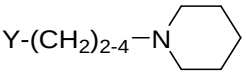
Tabla 1. cLogD y c-pKa para CICL-207, CICL-215, CICL-216, CICL-217, CICL-218, CICL-219, CICL-220, CICL-221, CICL-222, CICL-223, CICL-224, CICL-225, CICL-238, CICL-239,

CICL-242, CICL-243, CICL-244, CICL-245, CICL-246, CICL-247, CICL-248, y CICL-249.

Lípido	c-LogD (pH 7,4)	c-pKa
CICL-207	13,75	8,42
CICL-215	13,67	8,42
CICL-216	13,67	8,42
CICL-217	14,34	8,62
CICL-218	13,71	8,49
CICL-219	13,71	8,49
CICL-220	13,80	8,50
CICL-221	13,67	8,42
CICL-222	13,67	8,42
CICL-223	13,75	8,42
CICL-224	13,75	8,42
CICL-225	13,75	8,42
CICL-238	13,80	8,50
CICL-239	14,77	7,16
CICL-242	13,95	8,42
CICL-243	13,95	8,42
CICL-244	14,50	8,50
CICL-245	14,50	8,50
CICL-246	14,95	8,49
CICL-247	14,95	8,49
CICL-248	14,94	8,50
CICL-249	14,94	8,50

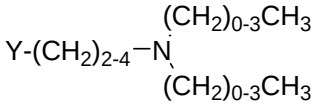
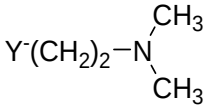
Diferentes constituyentes para X, Y y R^1 permiten el ajuste de cLogD y c-pKa para lograr un valor deseado de pKa medido dentro de una LNP o una tLNP. Por ejemplo, para hacer un lípido con un grupo de cabeza de  menos básico, se podrían usar en su lugar los siguientes grupos de

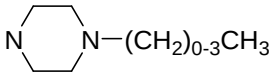
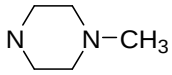
cabeza:  ,  ,  ,  ,  , o  .

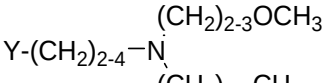
Por el contrario, para hacer un lípido con un grupo de cabeza de  más básico, podrían usarse en su lugar los siguientes grupos principales:  , o  .

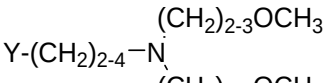
La adición de grupos CH_2 en X tenderá a aumentar la basicidad del lípido que a su vez tenderá a aumentar la pKa medida. La adición de grupos CH_2 en R^1 tenderá a aumentar la lipofilicidad (cLogD) del lípido que a su vez tenderá a disminuir la pKa medida de la LNP o tLNP.

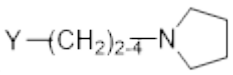
El uso de grupos de cabeza adicionales para modificar la pKa calculada y apuntar a un rango de pKa medida deseada se establece en el Ejemplo 65.

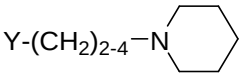
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . Por ejemplo, en algunas modalidades X es  .

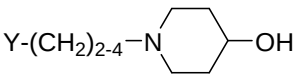
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .En algunas modalidades X es  .

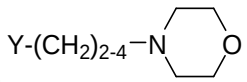
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

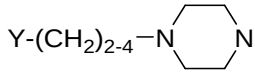
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

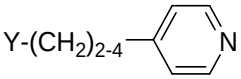
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

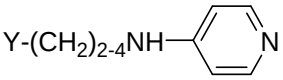
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

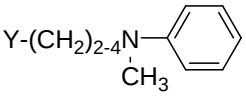
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

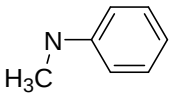
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

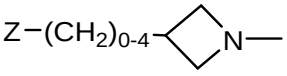
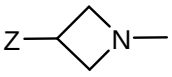
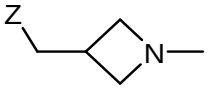
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

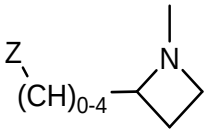
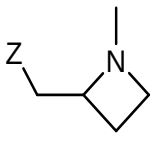
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

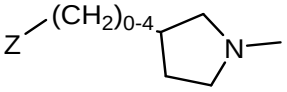
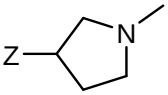
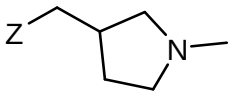
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

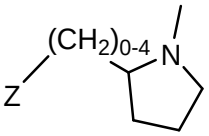
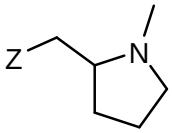
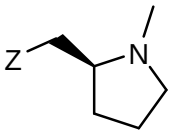
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

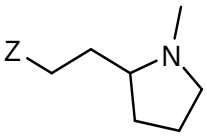
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

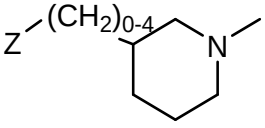
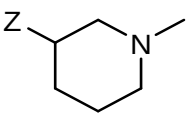
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

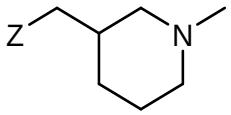
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

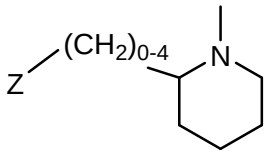
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

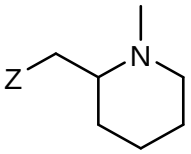
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

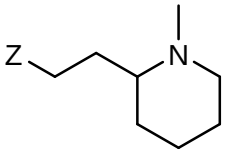
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas

modalidades como se describe en la presente, X es 

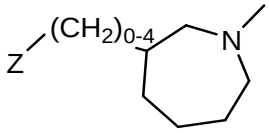
.

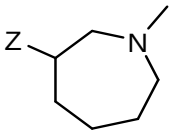
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es 

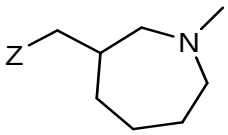
. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es 

. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es 

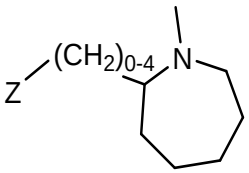
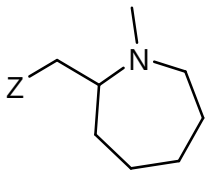
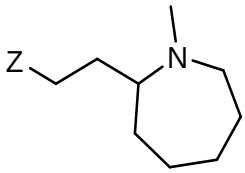
.

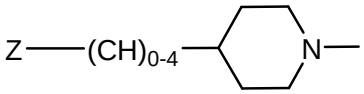
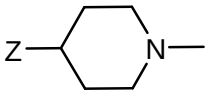
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es 

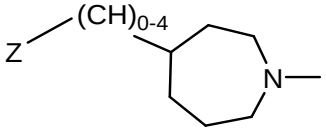
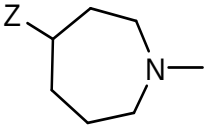
. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es 

. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es 

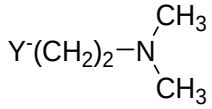
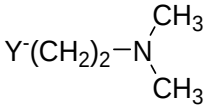
.

En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

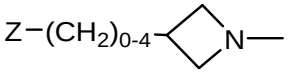
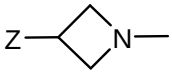
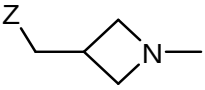
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

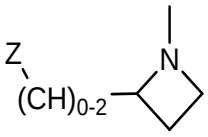
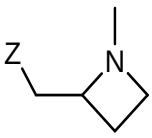
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  . En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  .

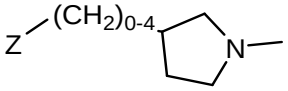
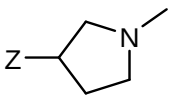
Como se describió anteriormente, Y puede seleccionarse de O, S, NH o NCH_3. En algunas modalidades, Y es O. En algunas modalidades, Y es S.

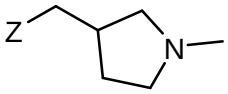
En algunas modalidades, X es  e Y es O. En algunas modalidades X es  e Y es S.

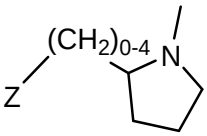
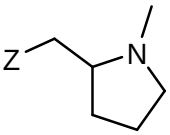
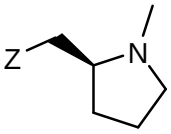
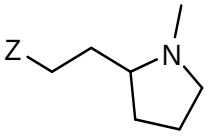
Como se describió anteriormente, Z puede seleccionarse de O, NH o NCH_3. En algunas modalidades, Z es O.

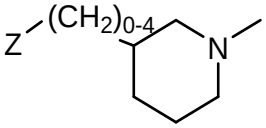
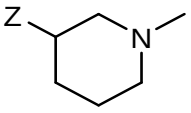
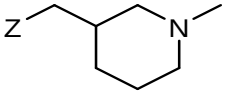
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

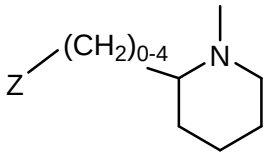
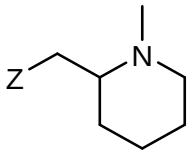
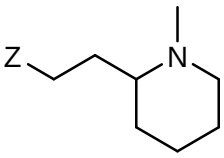
En algunas modalidades, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

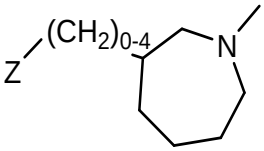
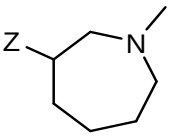
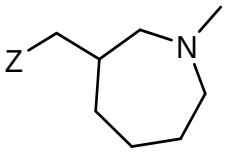
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es 

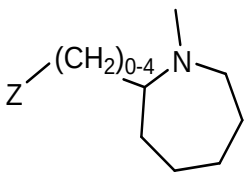
y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

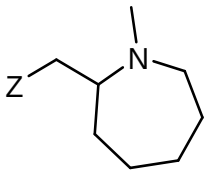
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

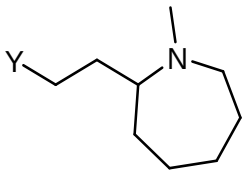
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

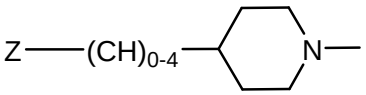
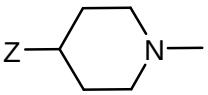
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

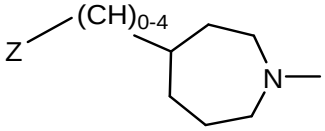
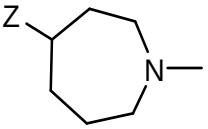
En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es



e Y es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O. En algunas modalidades como se describe en la presente, X es  y Z es O.

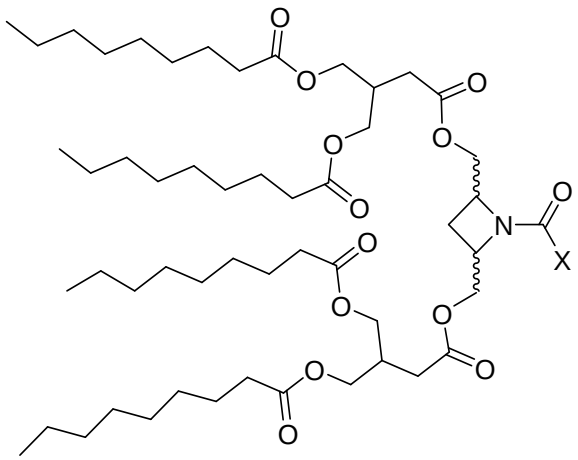
Como se describió anteriormente, cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11} o alqueno C_7-C_{11}. En algunas modalidades, cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11}, p. ej., alquilo C_7-C_{10}, o alquilo C_7-C_9. En ciertas modalidades, cada R^1 se selecciona independientemente de un alquilo C_7-C_{11} lineal, p. ej., un alquilo C_7-C_{10} lineal, o un alquilo C_7-C_9 lineal.

En algunas modalidades como se describe en la presente, cada R^1 se selecciona independientemente de $(CH_2)_{6-8}CH_3$. En algunas de estas y otras modalidades, R1 es $(CH_2)_7CH_3$. En algunas modalidades, cada R^1 se selecciona independientemente de un alquenilo C_7-C_{11} lineal, p. ej., un alquenilo C_7-C_{10} lineal, o un alquenilo C_7-C_9 lineal. Por ejemplo, en algunas modalidades, cada R^1 es un alquenilo C_8 lineal. En ciertas otras modalidades, cada R^1 se selecciona independientemente de un alquilo C_7-C_{11} ramificado, p. ej., alquilo C_7-C_{10}, o alquilo C_7-C_9. Por ejemplo, en algunas modalidades, cada R^1 es un alquilo C_8 ramificado. En ciertas modalidades, cada R^1 se selecciona independientemente de un alquenilo C_7-C_{11} ramificado, p. ej., alquenilo C_7-C_{10}, o alquenilo C_7-C_9. Por ejemplo, en algunas modalidades, cada R^1 es un alquenilo C_8 ramificado. En algunas modalidades, en donde R^1 es un alquilo o alquenilo ramificado, el punto de ramificación se posiciona de tal manera que los carbonilos de éster no estén en una posición α con relación al punto de ramificación, por ejemplo, están en una posición β con relación al punto de ramificación.

En ciertas modalidades como se describe en la presente, cada R^1 es igual. En ciertas modalidades, cada R^1 más cercano a un punto de ramificación común es el mismo, pero aquellos más cercanos a un primer punto de ramificación común difieren de aquellos más cercanos a un segundo punto de ramificación común. En ciertas

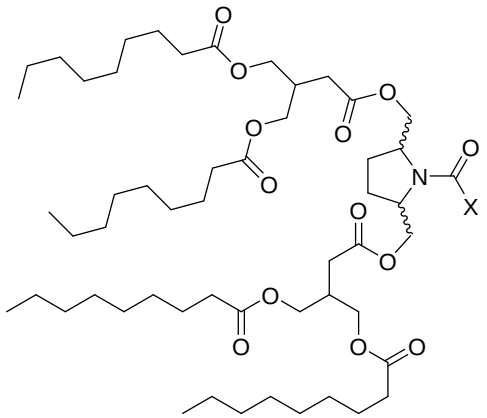
modalidades, cada R^1 más cercano a un punto de ramificación común es diferente, pero el par de R^1 más cercano a un primer punto de ramificación común es el mismo que el par más cercano a un segundo punto de ramificación común.

Como se describió anteriormente, en algunas modalidades como se describe en la presente, el lípido catiónico ionizable tiene una estructura de la Fórmula M2, en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_{1-4}$ o CH_2-CH=CH-CH_2. Por ejemplo, en algunas modalidades como se describe en la presente, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_1$. En algunas modalidades, como se describe en la presente, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



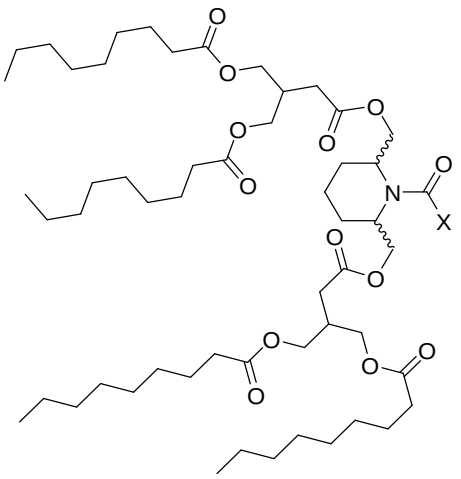
en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2 como se describe en la presente, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_2$. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



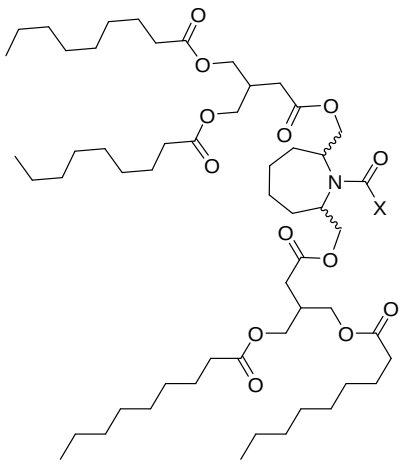
en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2 como se describe en la presente, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_3$. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



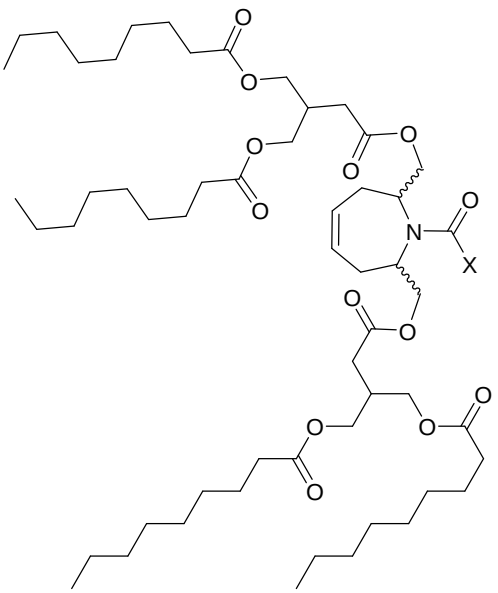
en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2 como se describe en la presente, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_4$. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

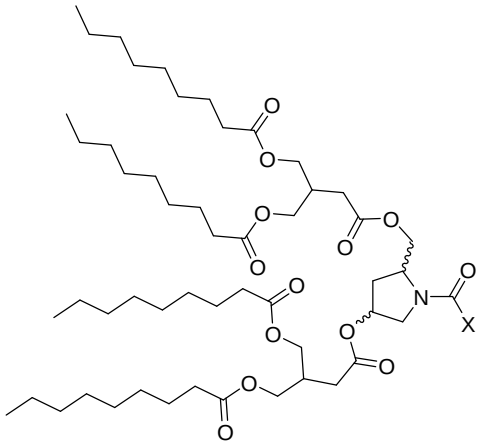
En ciertas modalidades de la Fórmula M2 como se describe en la presente, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es CH_2-CH=CH-CH_2. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

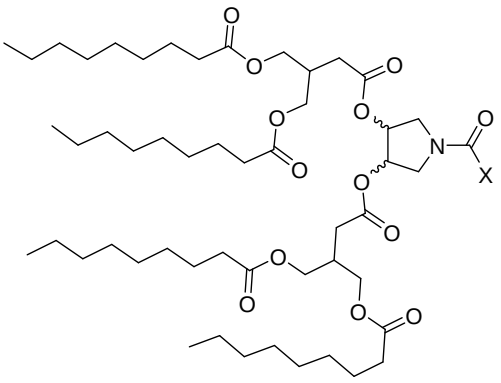
Como se describió anteriormente, en algunas modalidades como se describe en la presente, el lípido

catiónico ionizable tiene una estructura de la Fórmula M2, en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



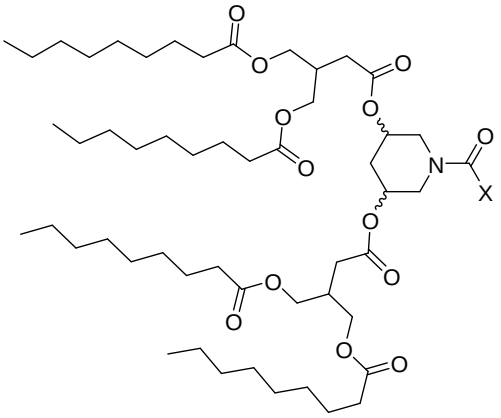
en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

Como se describió anteriormente, en algunas modalidades como se describe en la presente, el lípido catiónico ionizable tiene una estructura de la Fórmula M2, en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_0$. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



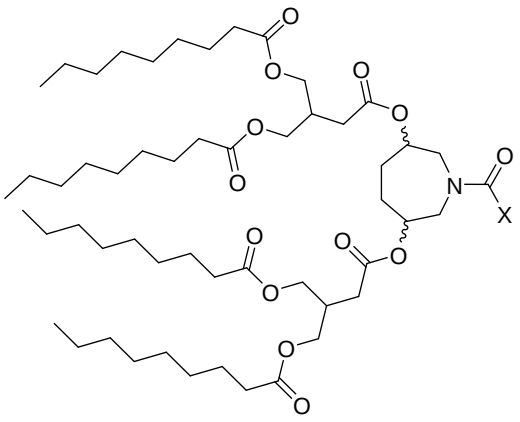
en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

Como se describió anteriormente, en algunas modalidades como se describe en la presente, el lípido catiónico ionizable tiene una estructura de la Fórmula M2, en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



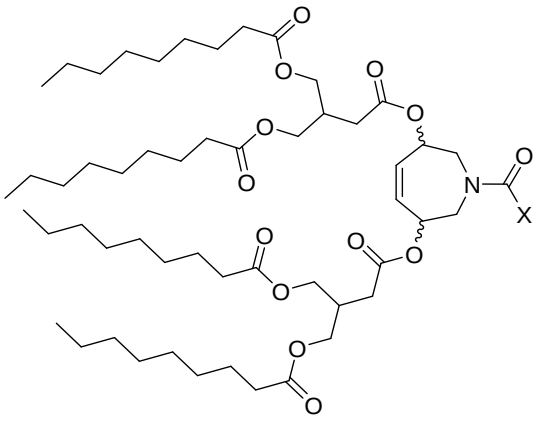
en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

Como se describió anteriormente, en algunas modalidades como se describe en la presente, el lípido catiónico ionizable tiene una estructura de la Fórmula M2, en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$ o CH=CH. Por ejemplo, en algunas modalidades como se describe en la presente, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$. En algunas modalidades, como se describe en la presente, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



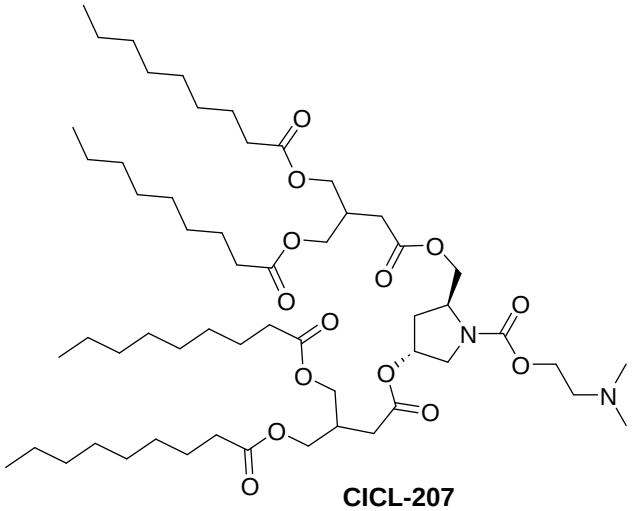
en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2 como se describe en la presente, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es CH=CH. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura:



en donde X es como se describe en la presente y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207:

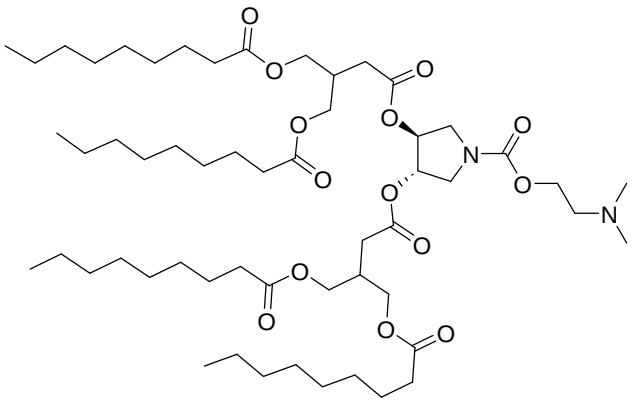


CICL-207

.

CICL-207 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones. Otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-223 y CICL-224) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

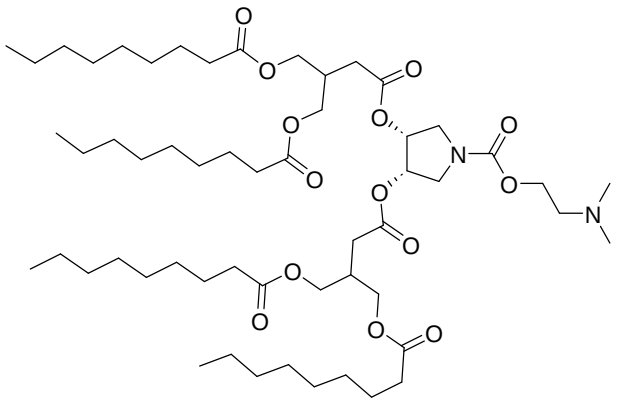
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-215:



CICL-215 .

CICL-215 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^3, A^4, y A^5 están ausentes,A^1 and A^2 son CH_2, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen su enantiómero y otras mezclas de estos. Aún otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-216) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-216:

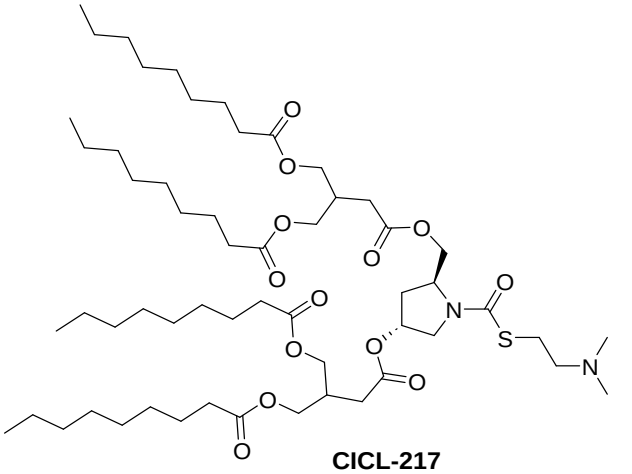


CICL-216

.

CICL-216 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^3, A^4, y A^5 están ausentes, A^1 and A^2 son CH_2, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-216 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-215) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-217:

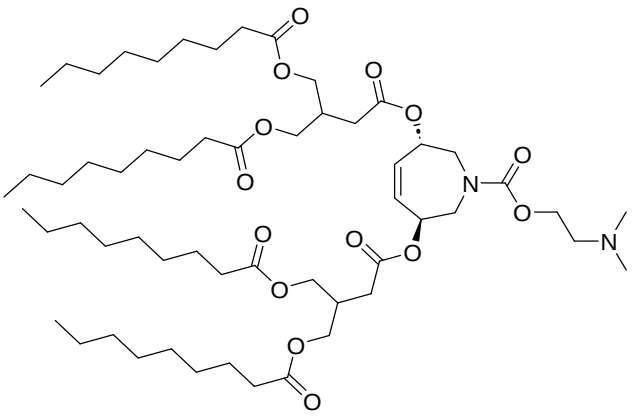


CICL-217

.

CICL-217 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. Este lípido difiere del CICL-207 en donde Y es S en lugar de O. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen enantiómero de CICL-217 y diastereómeros de este, y mezclas de estereoisómeros (p. ej., racemato u otras mezclas de diversos estereoisómeros con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-218:

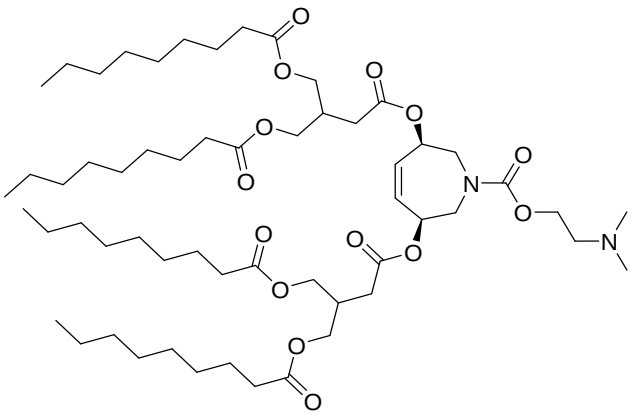


CICL-218

.

CICL-218 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^3 y A^4 están ausentes, A^1 y A^2 son CH_2, A^5 es CH=CH, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. CICL-218 se sintetizó como un racemato de tal manera que la estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica relativa para este lípido. Otras modalidades incluyen la estereoquímica absoluta dibujada anteriormente, su enantiómero y mezclas de estos. Aún otras modalidades son diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-219) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-219:

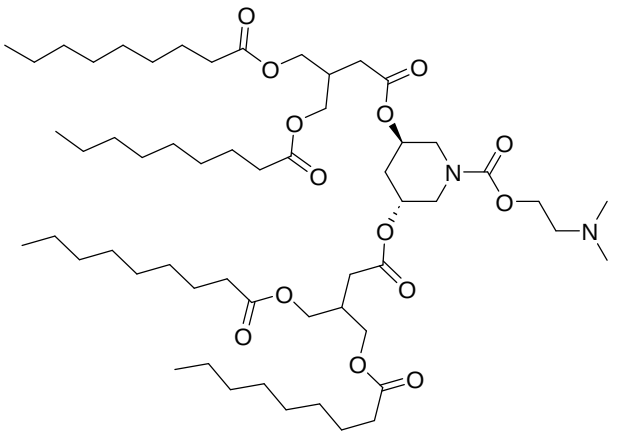


CICL-219

.

CICL-219 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^3 y A^4 están ausentes, A^1 y A^2 son CH_2, A^5 es CH=CH, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-219 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-218) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-220:

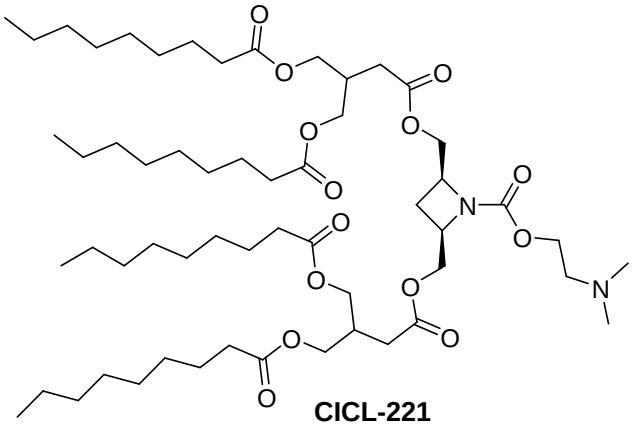


CICL-220

.

CICL-220 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^3 y A^4 están ausentes, A^1, A^2, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. CICL-220 y la estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen su enantiómero y otras mezclas de estos. Aún otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

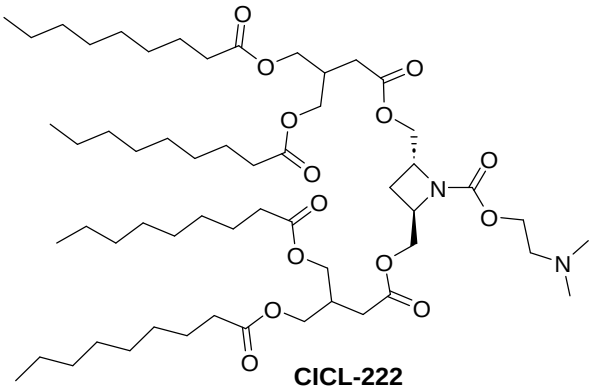
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-221:



CICL-221

CICL-221 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3, A^4, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-221 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-222) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

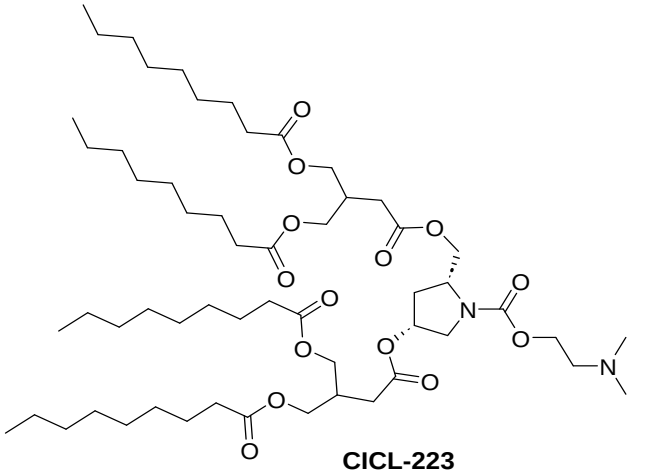
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-222:



CICL-222

CICL-221 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3, A^4, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. CICL-222 se sintetizó como un racemato de manera que la estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica relativa para este lípido. Otras modalidades incluyen la estereoquímica absoluta dibujada anteriormente, su enantiómero, y mezclas de estos. Aún otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-221) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-223:

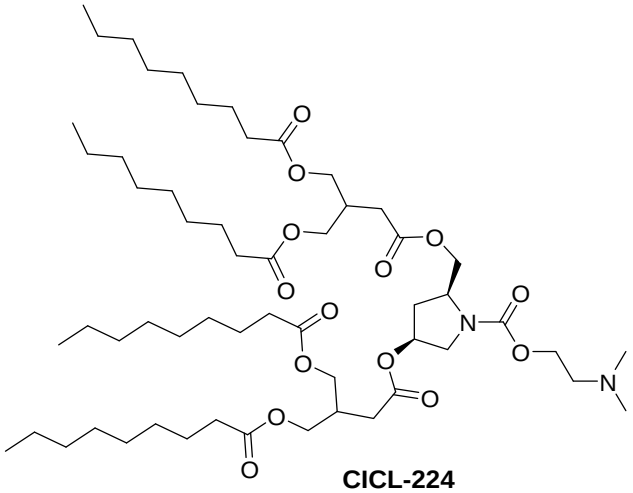


CICL-223

.

CICL-223 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración cis. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-223 (CICL-224) y mezclas de los enantiómeros (p. ej., racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (*p. ej.*, CICL-207 y CICL-225) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-224:

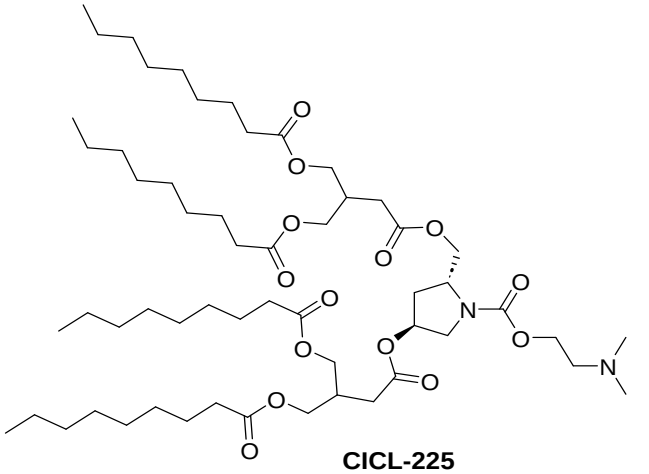


CICL-224

.

CICL-224 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración cis. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-224 (CICL-223) y mezclas de los enantiómeros (p. ej., racemato, u otras mezclas con diversas relaciones) Otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-207 y CICL-225) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

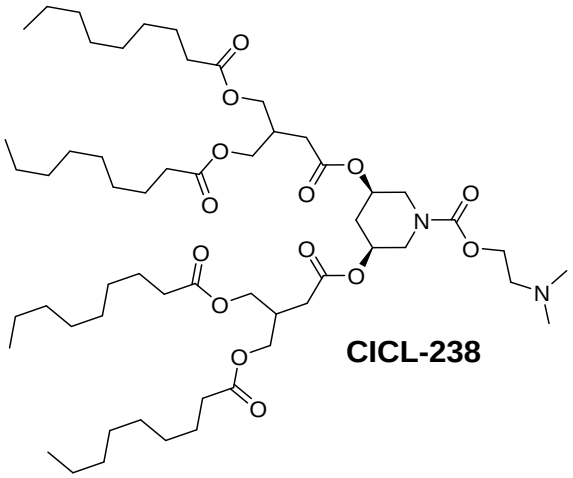
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-225:



CICL-225

CICL-225 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-225 (CICL-207) y mezclas de los enantiómeros (p. ej., racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-223 y CICL-224) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

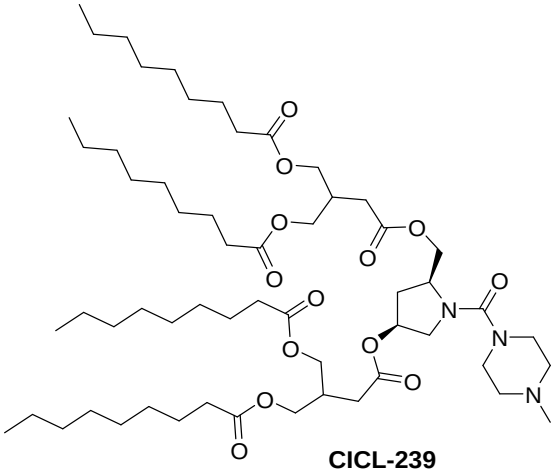
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-238:



CICL-238

CICL-238 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1, A^2 y A^5 son CH_2, A^3 y A^4 están ausentes, y los grupos de cola se colocan simétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-238 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-220) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

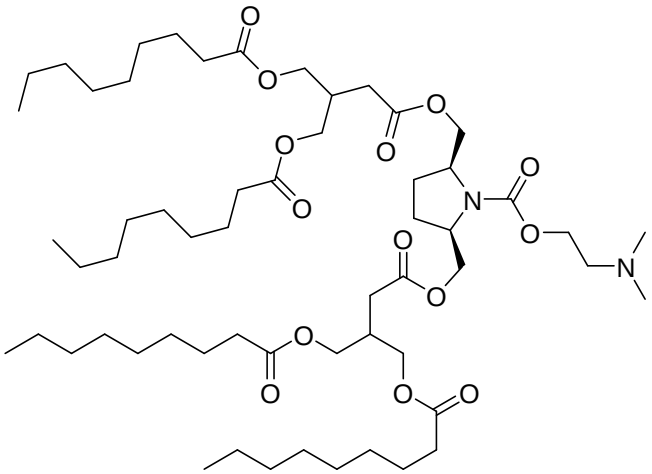
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-239:



CICL-239

CICL-239 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración cis. A diferencia de muchos de los lípidos ejemplificados, el grupo Y de CICL-239 es N-metil-piperazina. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-239 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

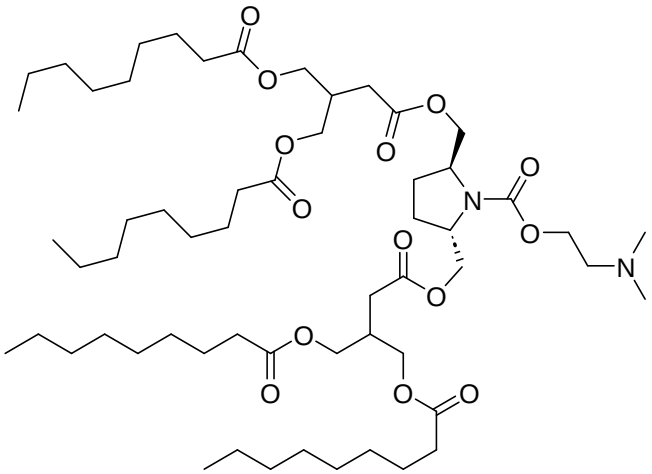
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-242:



CICL-242

CICL-242 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es CH_2CH_2, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-242 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-243) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

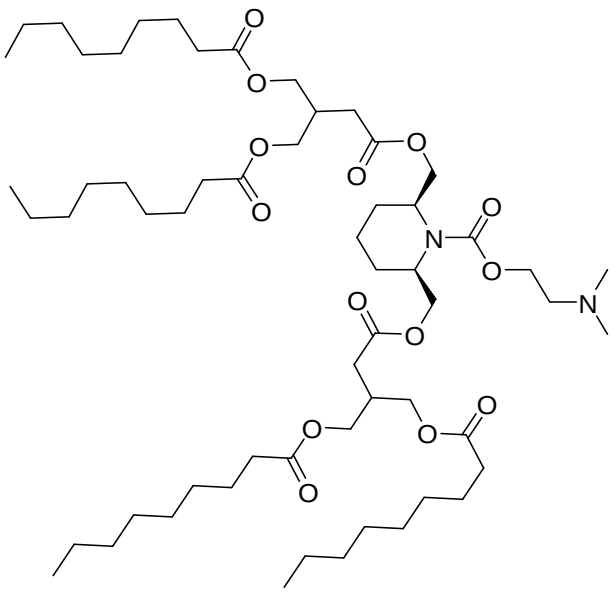
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-243:



CICL-243

CICL-243 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es CH_2CH_2, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración trans. CICL-243 es una antípoda óptica, de tal manera que la estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen: su enantiómero, y mezclas de los enantiómeros (p. ej., racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Aún otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-242) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

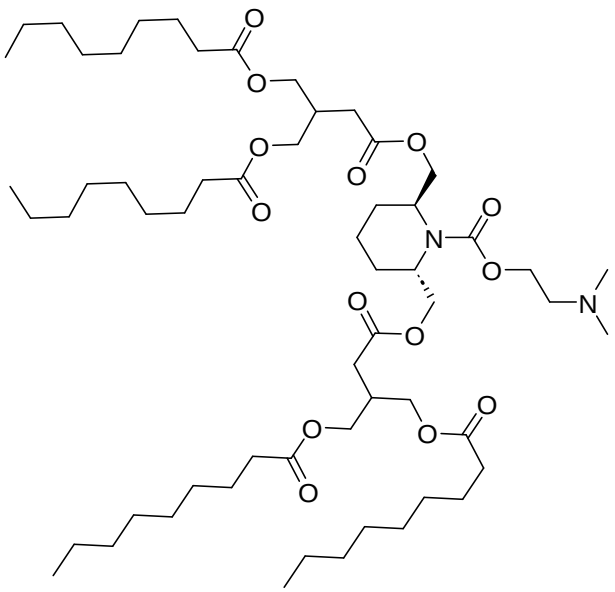
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-244:



CICL-244

CICL-244 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es $CH_2CH_2CH_2$, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-244 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-245) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

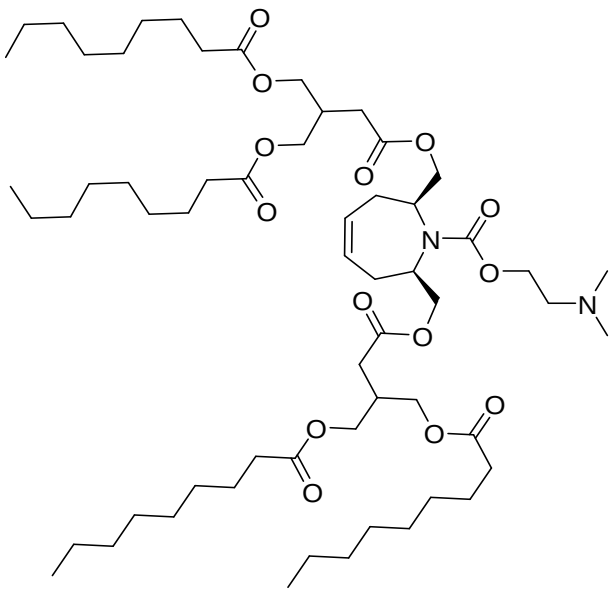
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-245:



CICL-245

CICL-245 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es $CH_2CH_2CH_2$, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración trans. CICL-245 es un racemato, de tal manera que la estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica relativa para este lípido. Otras modalidades incluyen: sus enantiómeros, y mezclas de estos. Aún otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-244) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

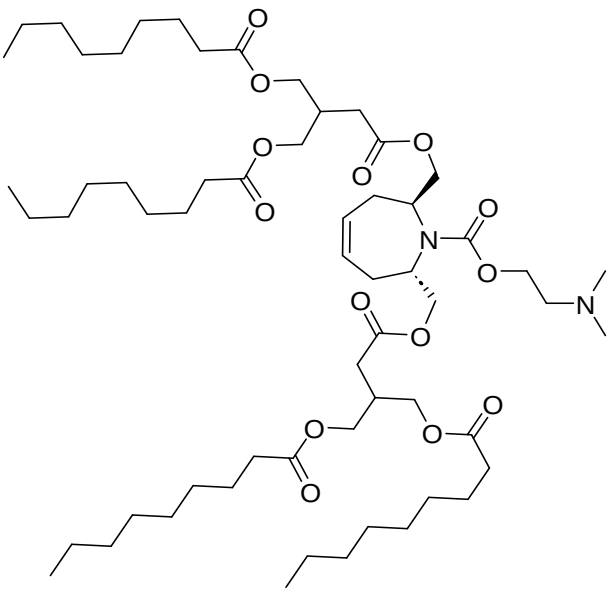
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-246:



CICL-246

CICL-246 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es $CH_2CH=CHCH_2$, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-246 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-247) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

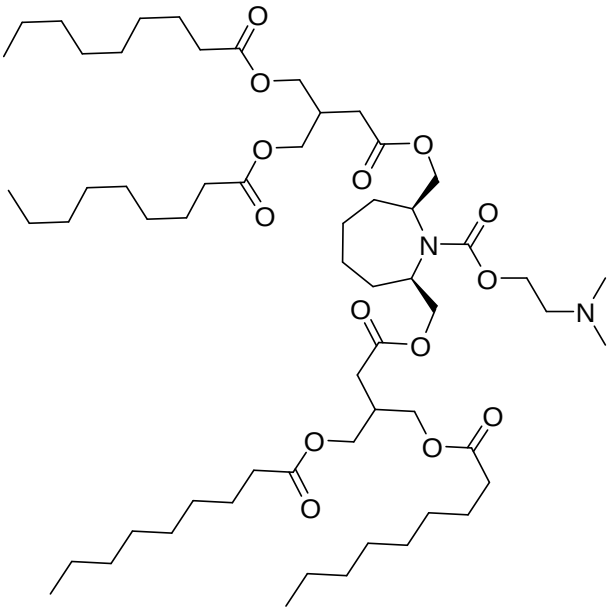
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-247:



CICL-247

CICL-247 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es $CH_2CH=CHCH_2$, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración trans. CICL-247 es un racemato, de tal manera que la estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica relativa para este lípido. Otras modalidades incluyen: sus enantiómeros, y mezclas de estos. Aún otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-246) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

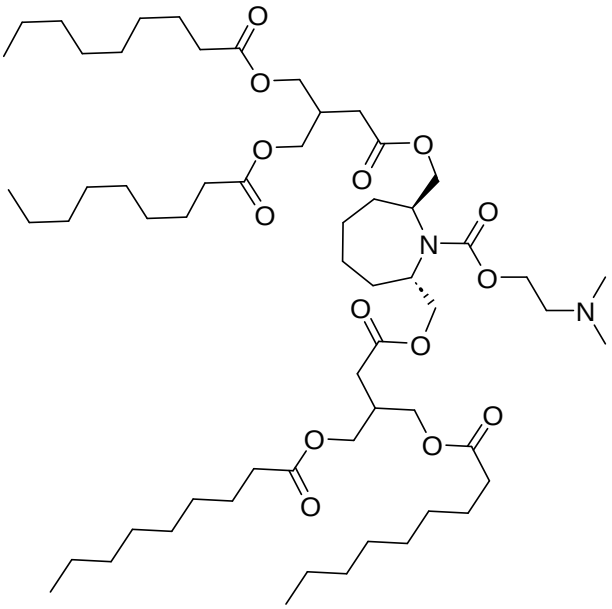
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-248:



CICL-248

CICL-248 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es $CH_2CH_2CH_2CH_2$, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración cis. CICL-248 es simétrico con las dos configuraciones cis nominales superponible, debido a que los grupos de cola son idénticos. Otras modalidades incluyen diastereómeros de este compuesto (p. ej., CICL-249) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

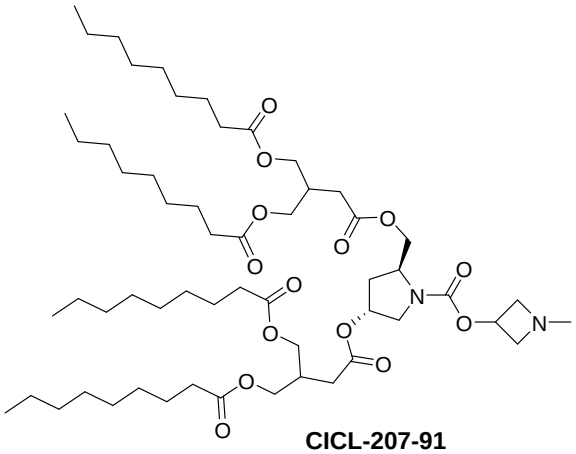
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-249:



CICL-249

CICL-249 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^2 están ausentes, A^3 y A^4 son CH_2, y A^5 es $CH_2CH_2CH_2CH_2$, y los grupos de cola se colocan simétricamente con respecto al nitrógeno del anillo en una configuración trans. CICL-249 es un racemato, de tal manera que la estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica relativa para este lípido. Otras modalidades incluyen: sus enantiómeros, y mezclas de estos. Aún otras modalidades incluyen diastereómeros de estos compuestos (p. ej., CICL-248) así como mezclas que incluyen dos o más de los diversos estereoisómeros.

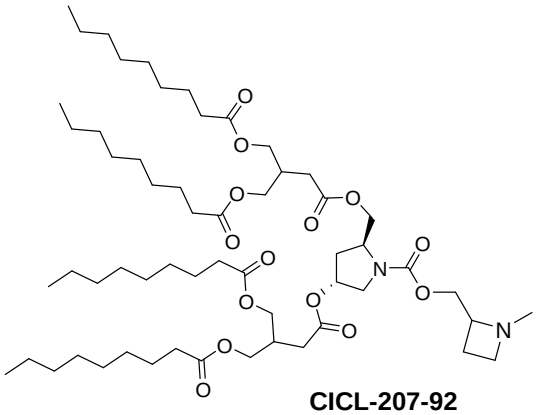
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-91:



CICL-207-91

CICL-207-91 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-91 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-91, y mezclas de estos.

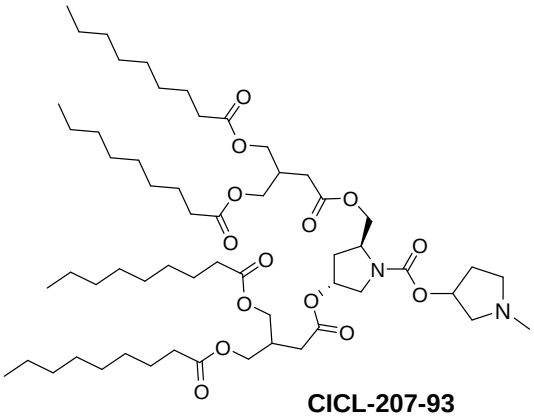
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-92:



CICL-207-92

CICL-207-92 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-92 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-92, y mezclas de estos.

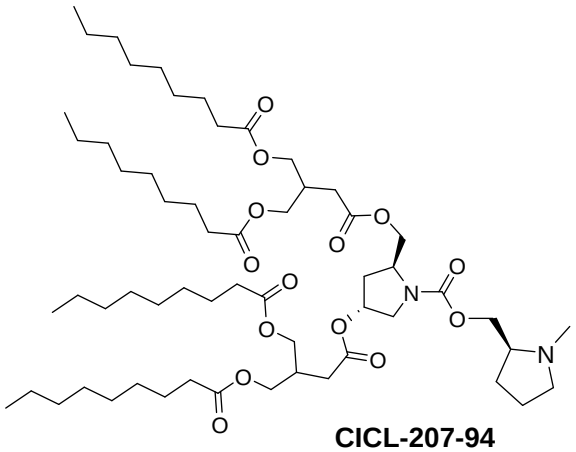
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-93:



CICL-207-93

CICL-207-93 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-93 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-93, y mezclas de estos.

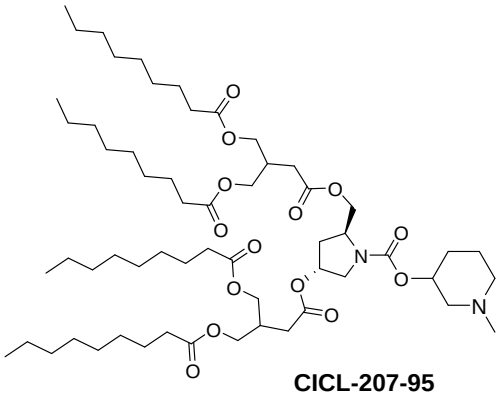
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-94:



CICL-207-94

CICL-207-94 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-94 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-94, y mezclas de estos.

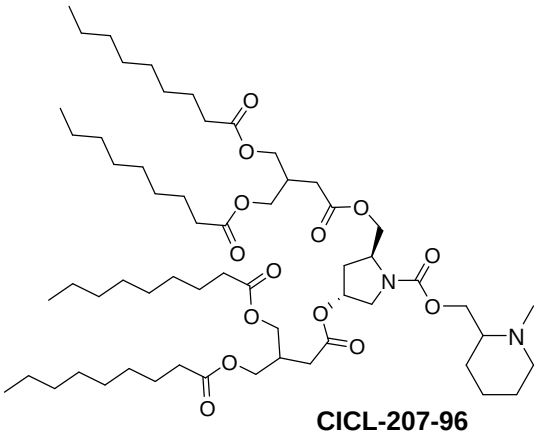
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-95:



CICL-207-95

CICL-207-95 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-95 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-95, y mezclas de estos.

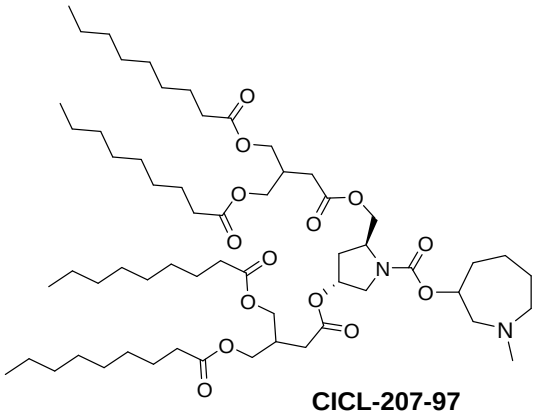
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-96:



CICL-207-96

CICL-207-96 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-96 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-96, y mezclas de estos.

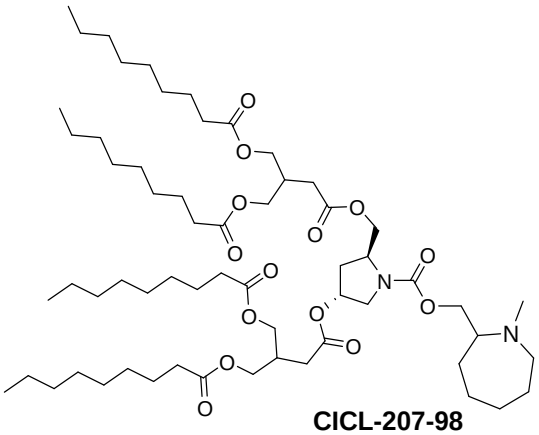
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-97:



CICL-207-97

CICL-207-97 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-97 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-97, y mezclas de estos.

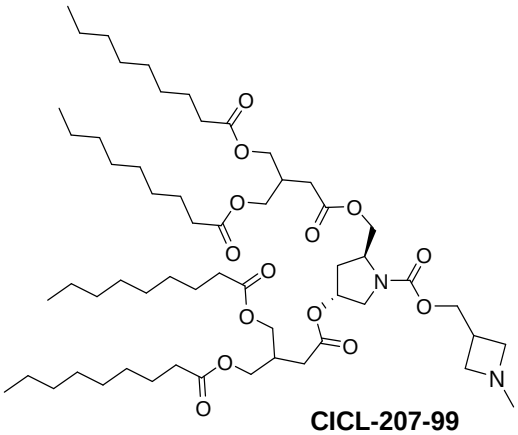
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-98:



CICL-207-98

CICL-207-98 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-98 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-98, y mezclas de estos.

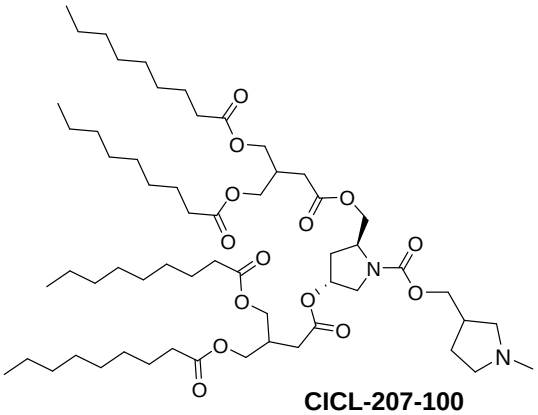
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-99:



CICL-207-99

CICL-207-99 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-99 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-99, y mezclas de estos.

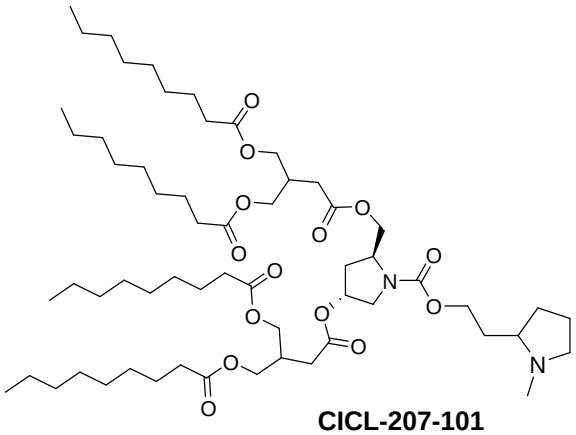
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-100:



CICL-207-100

CICL-207-100 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-100 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-100, y mezclas de estos.

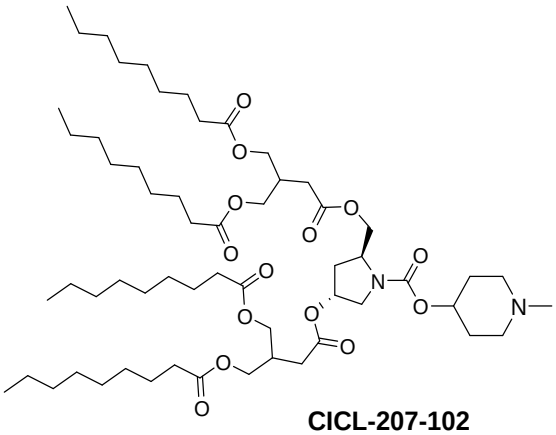
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-101:



CICL-207-101

CICL-207-101 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-101 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-101, y mezclas de estos.

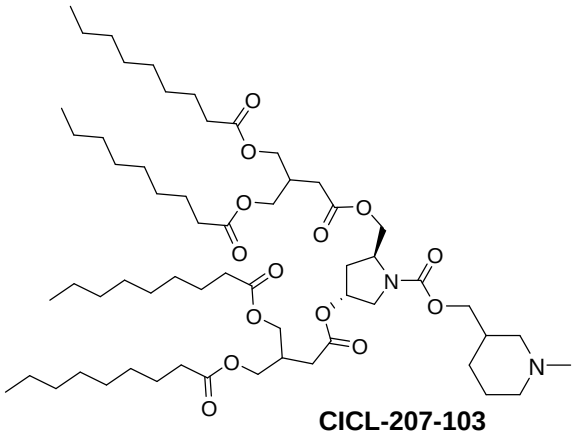
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-102:



CICL-207-102

CICL-207-102 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-102 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-102, y mezclas de estos.

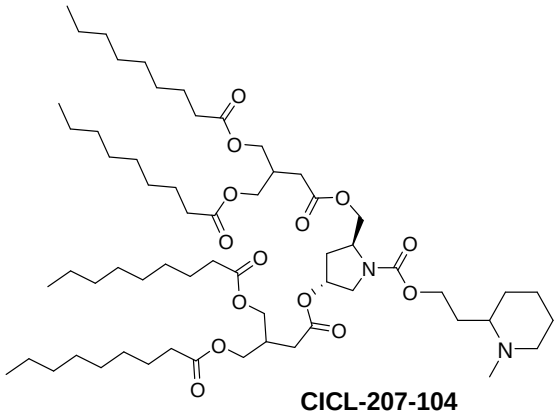
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-103:



CICL-207-103

CICL-207-103 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-103 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-103, y mezclas de estos.

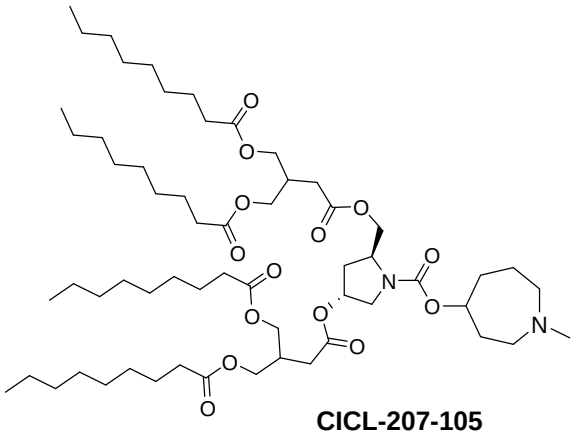
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-104:



CICL-207-104

CICL-207-104 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-104 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-104, y mezclas de estos.

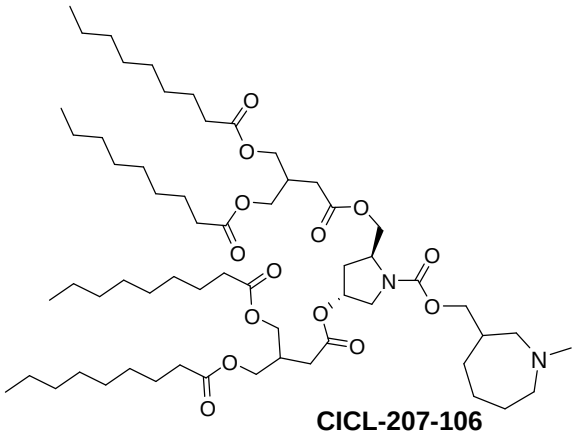
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-105:



CICL-207-105

CICL-207-105 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-105 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-105, y mezclas de estos.

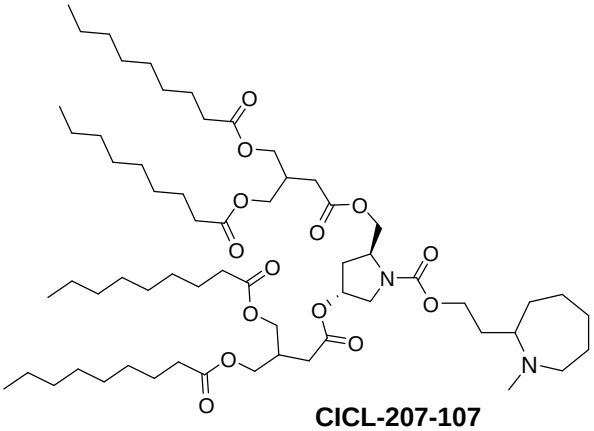
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-106:



CICL-207-106

CICL-207-106 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-106 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-106, y mezclas de estos.

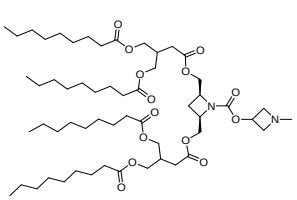
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-107:



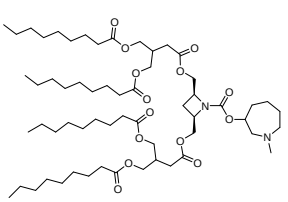
CICL-207-107

CICL-207-107 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-107 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-107, y mezclas de estos.

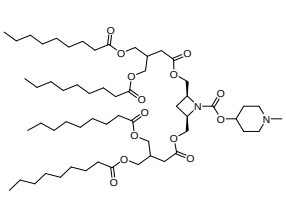
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene una estructura seleccionada de las siguientes:



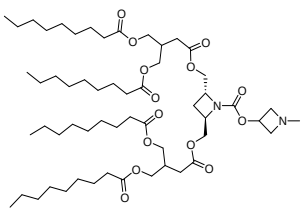
CICL-221-91



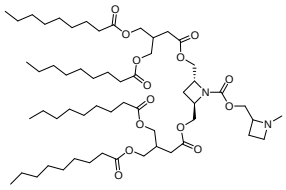
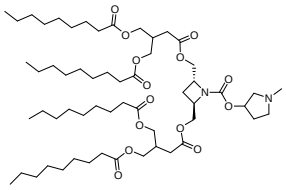
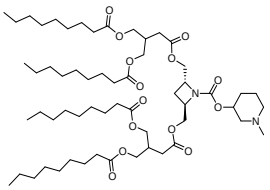
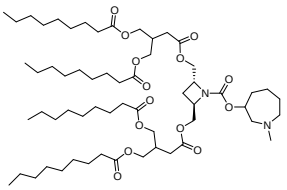
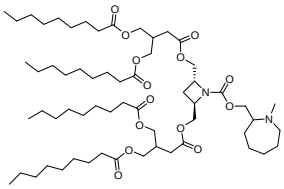
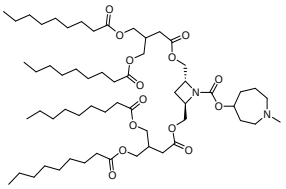
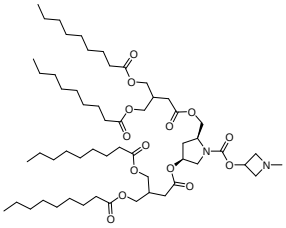
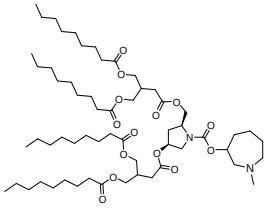
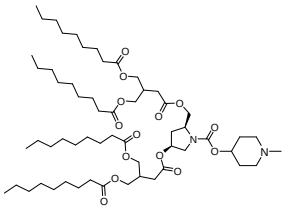
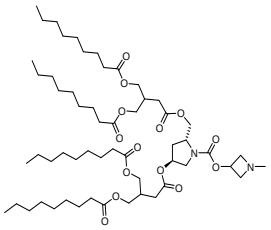
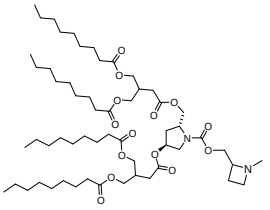
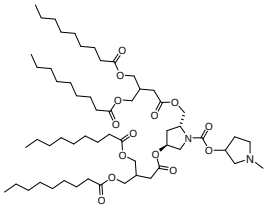
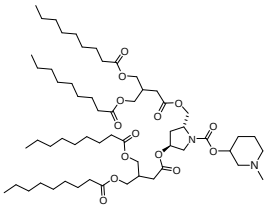
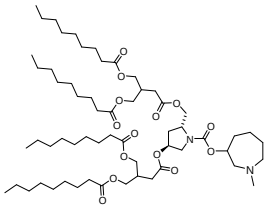
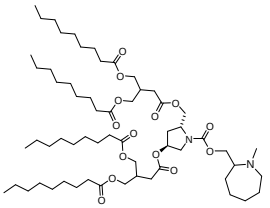
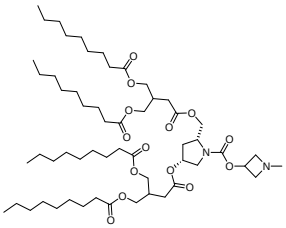
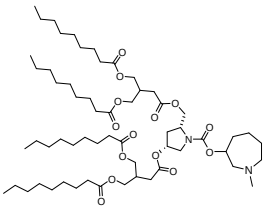
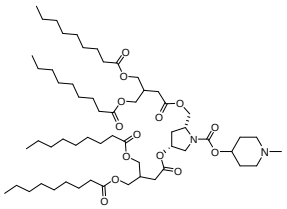
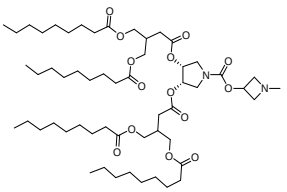
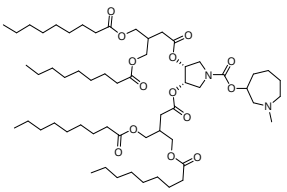
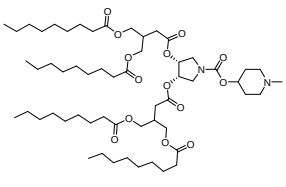
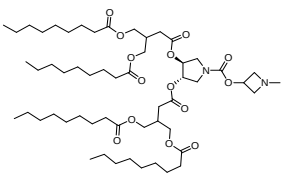
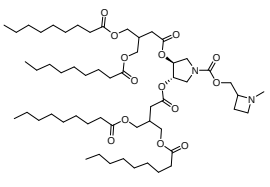
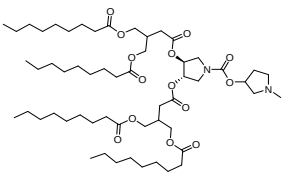
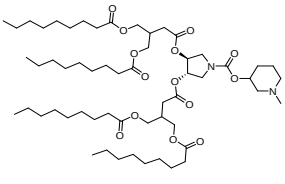
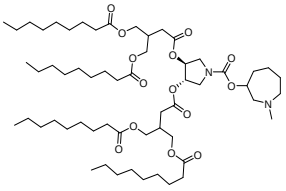
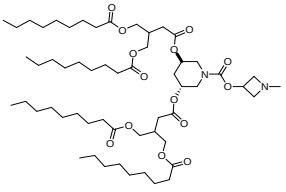
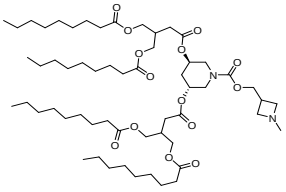
CICL-221-97

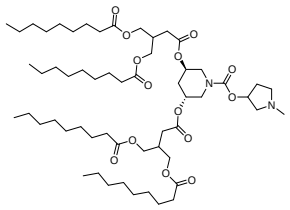
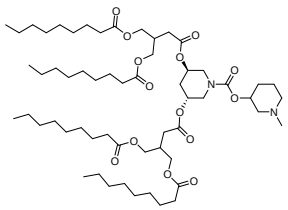
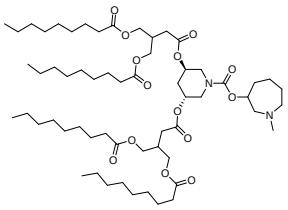
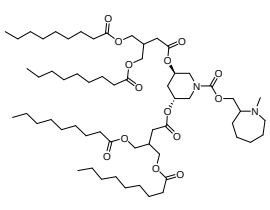
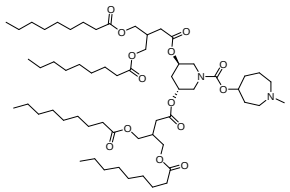
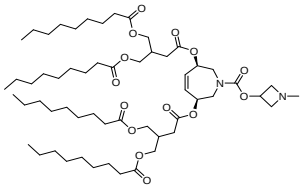
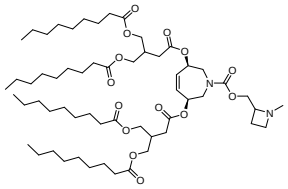
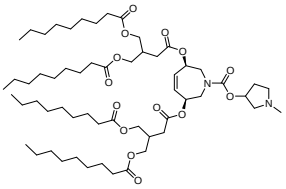
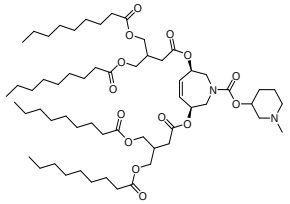
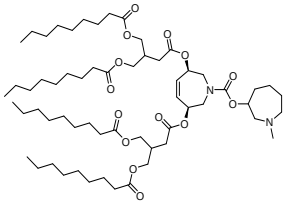
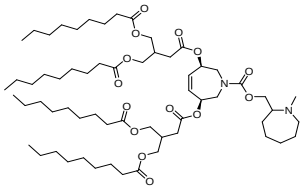
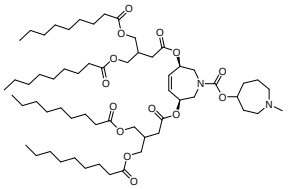
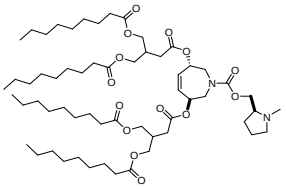
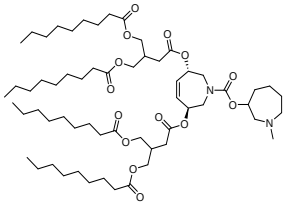
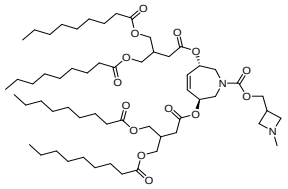
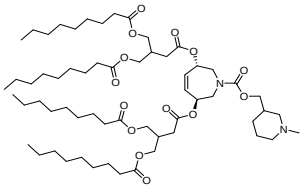
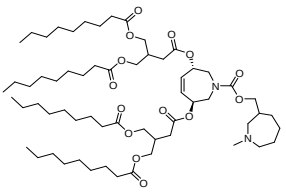
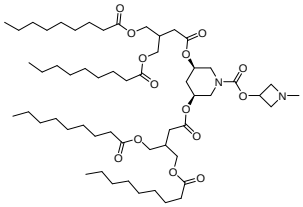
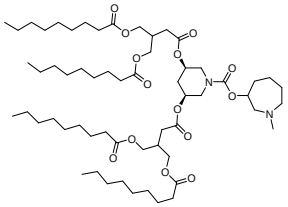
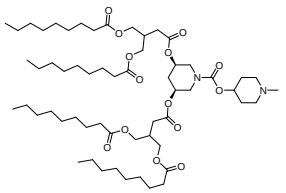
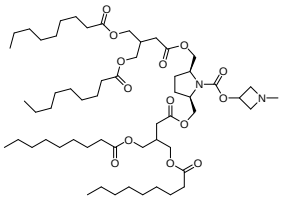
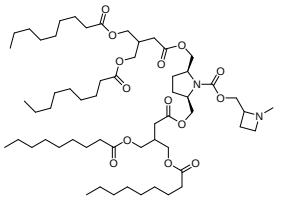
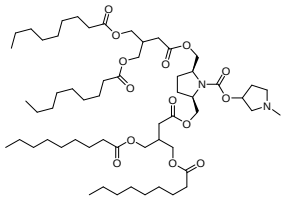
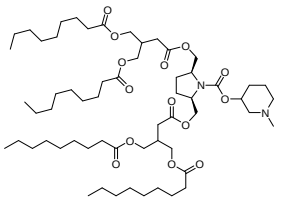
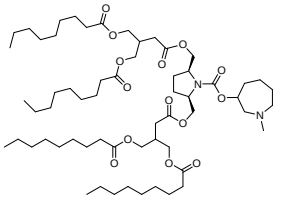
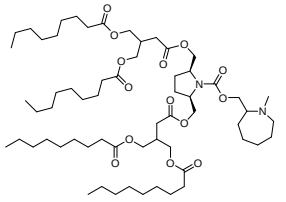
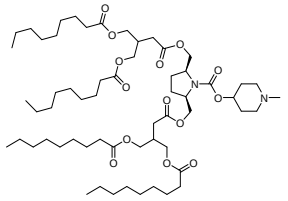
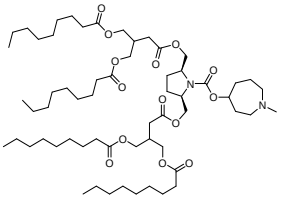


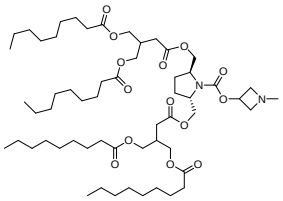
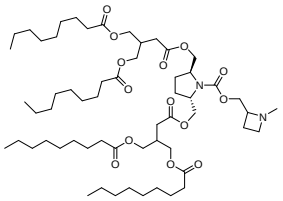
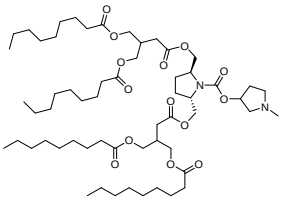
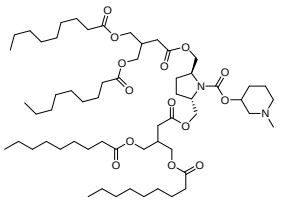
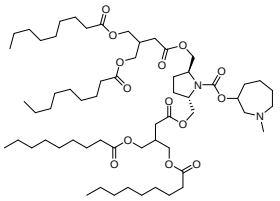
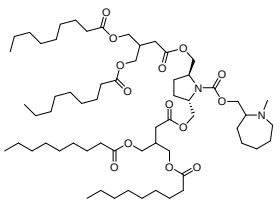
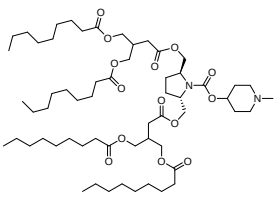
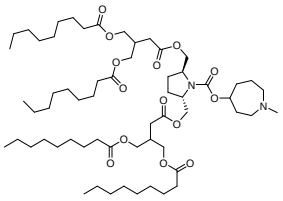
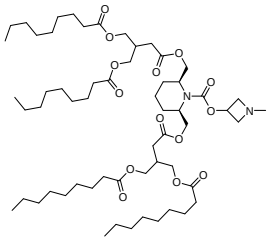
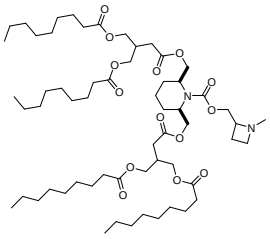
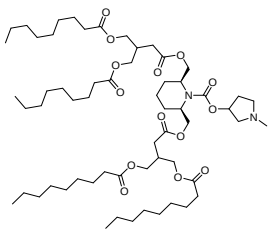
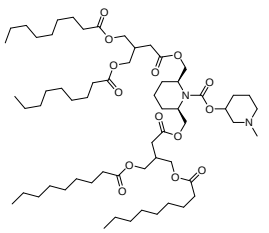
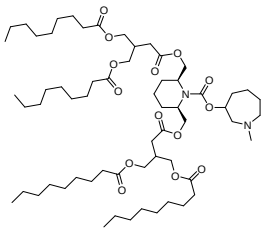
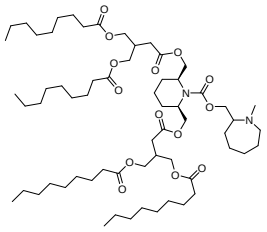
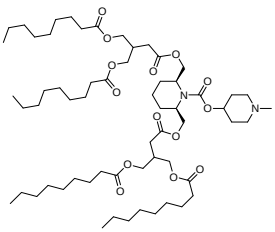
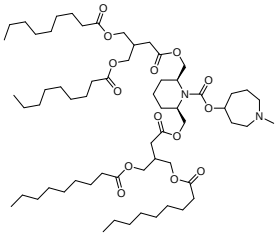
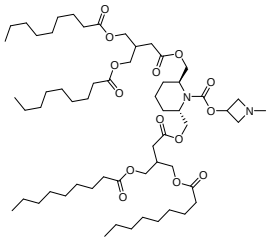
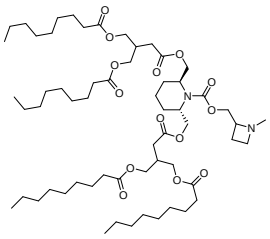
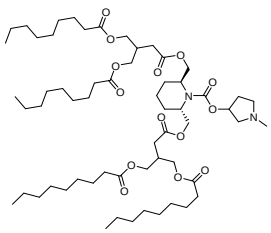
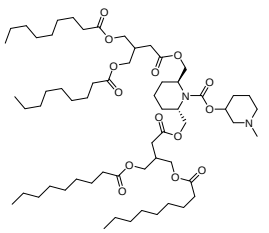
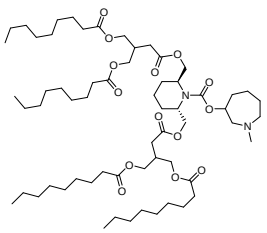
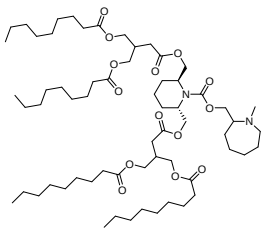
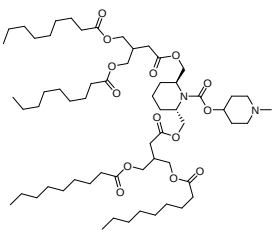
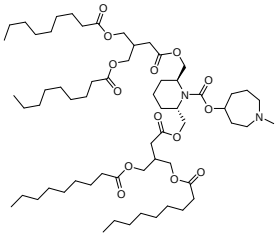
CICL-221-102

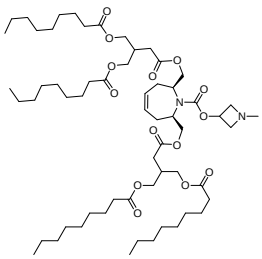
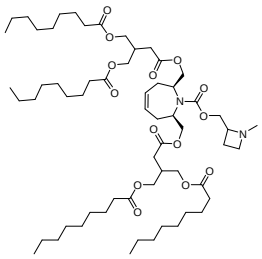
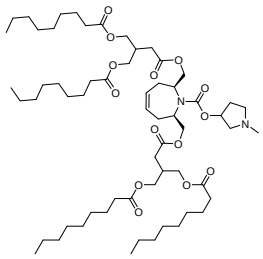
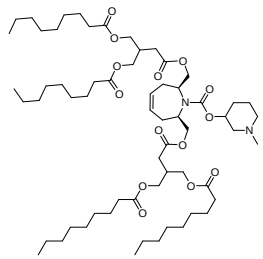
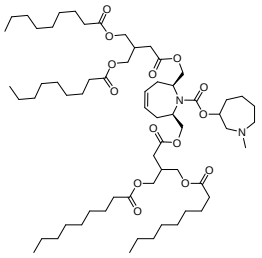
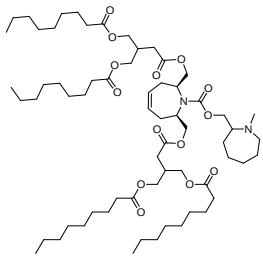
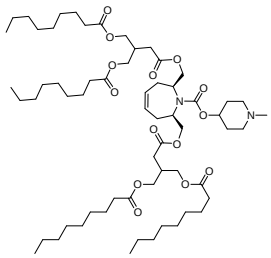
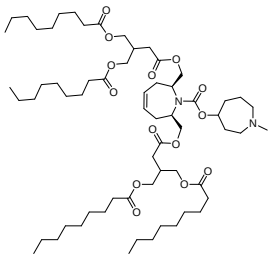
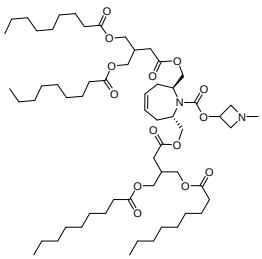
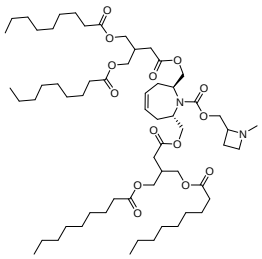
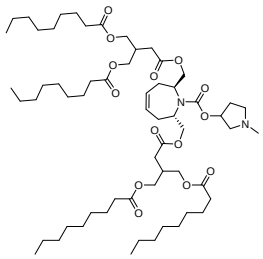
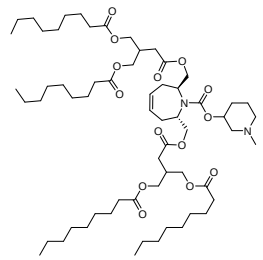
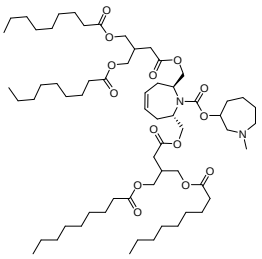
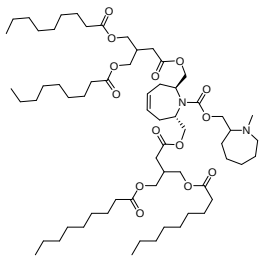
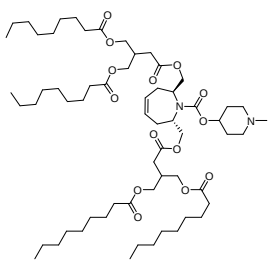
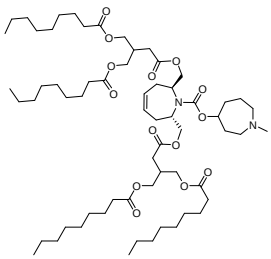
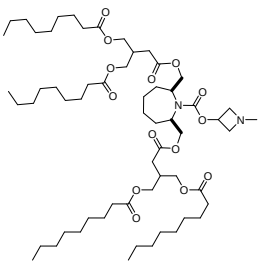
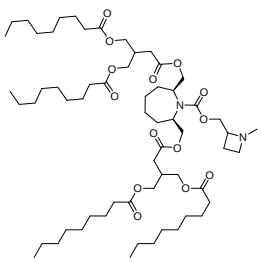
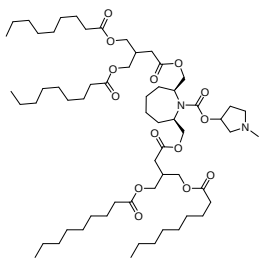
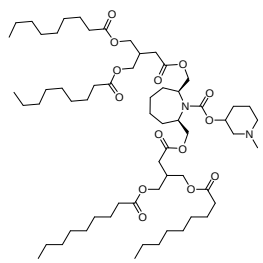


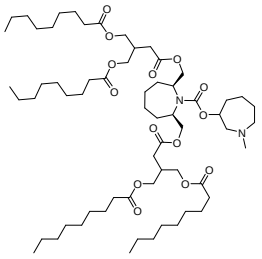
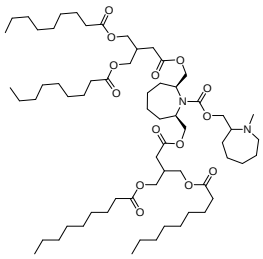
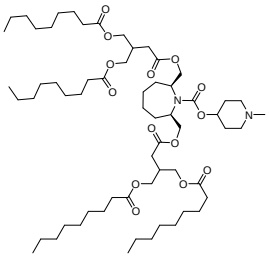
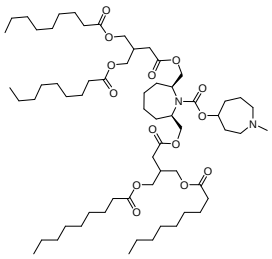
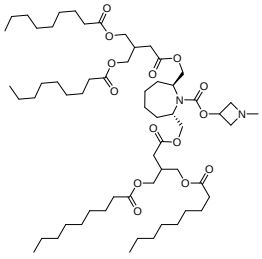
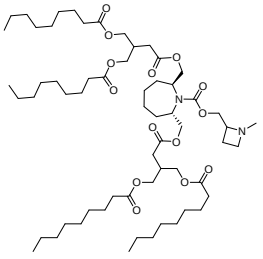
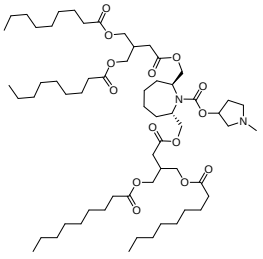
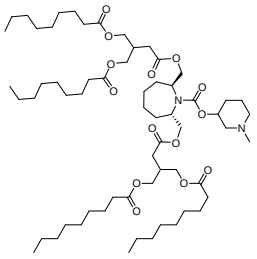
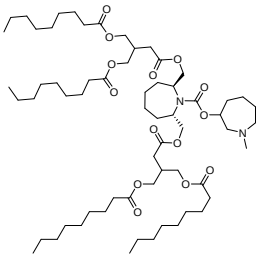
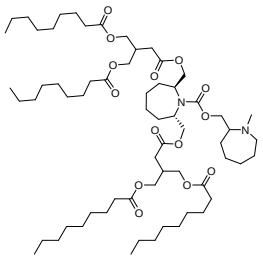
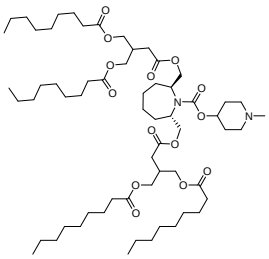
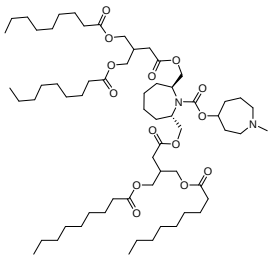
CICL-222-91

 **CICL-222-92**	 **CICL-222-93**	 **CICL-222-95**	 **CICL-222-97**
 **CICL-222-98**	 **CICL-222-105**	 **CICL-224-91**	 **CICL-224-97**
 **CICL-224-102**	 **CICL-225-91**	 **CICL-225-92**	 **CICL-225-93**
 **CICL-225-95**	 **CICL-225-97**	 **CICL-225-98**	 **CICL-223-91**
 **CICL-223-97**	 **CICL-223-102**	 **CICL-216-91**	 **CICL-216-97**
 **CICL-216-102**	 **CICL-215-91**	 **CICL-215-92**	 **CICL-215-93**
 **CICL-215-95**	 **CICL-215-97**	 **CICL-220-91**	 **CICL-220-92**

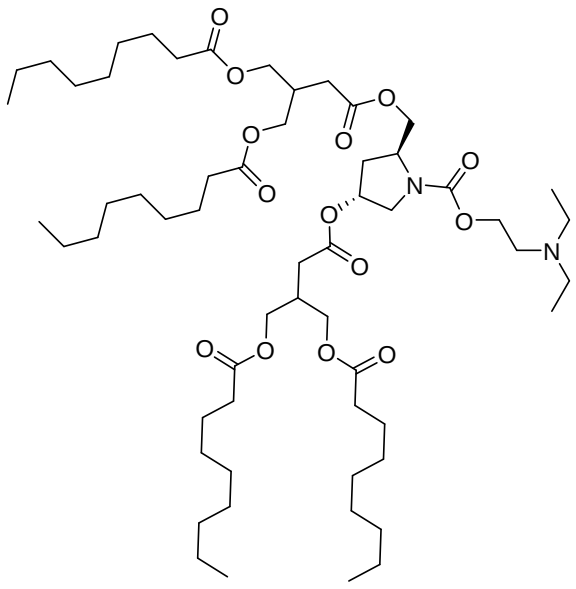
 **CICL-220-93**	 **CICL-220-95**	 **CICL-220-97**	 **CICL-220-98**
 **CICL-220-105**	 **CICL-219-91**	 **CICL-219-92**	 **CICL-219-93**
 **CICL-219-95**	 **CICL-219-97**	 **CICL-219-98**	 **CICL-219-105**
 **CICL-218-94**	 **CICL-218-96**	 **CICL-218-99**	 **CICL-218-103**
 **CICL-218-106**	 **CICL-238-91**	 **CICL-238-97**	 **CICL-238-102**
 **CICL-242-91**	 **CICL-242-92**	 **CICL-242-93**	 **CICL-242-95**
 **CICL-242-97**	 **CICL-242-98**	 **CICL-242-102**	 **CICL-242-105**

 **CICL-243-91**	 **CICL-243-92**	 **CICL-243-93**	 **CICL-243-95**
 **CICL-243-97**	 **CICL-243-98**	 **CICL-243-102**	 **CICL-243-105**
 **CICL-244-91**	 **CICL-244-92**	 **CICL-244-93**	 **CICL-244-95**
 **CICL-244-97**	 **CICL-244-98**	 **CICL-244-102**	 **CICL-244-105**
 **CICL-245-91**	 **CICL-245-92**	 **CICL-245-93**	 **CICL-245-95**
 **CICL-245-97**	 **CICL-245-98**	 **CICL-245-102**	 **CICL-245-105**

 **CICL-246-91**	 **CICL-246-92**	 **CICL-246-93**	 **CICL-246-95**
 **CICL-246-97**	 **CICL-246-98**	 **CICL-246-102**	 **CICL-246-105**
 **CICL-247-91**	 **CICL-247-92**	 **CICL-247-93**	 **CICL-247-95**
 **CICL-247-97**	 **CICL-247-98**	 **CICL-247-102**	 **CICL-247-105**
 **CICL-248-91**	 **CICL-248-92**	 **CICL-248-93**	 **CICL-248-95**

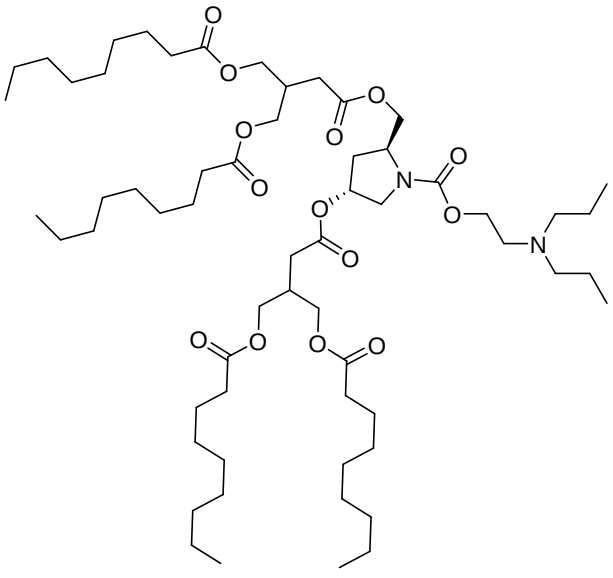
 **CICL-248-97**	 **CICL-248-98**	 **CICL-248-102**	 **CICL-248-105**
 **CICL-249-91**	 **CICL-249-92**	 **CICL-249-93**	 **CICL-249-95**
 **CICL-249-97**	 **CICL-249-98**	 **CICL-249-102**	 **CICL-249-105**

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-108:



CICL-207-108 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-108 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-108, y mezclas de estos.

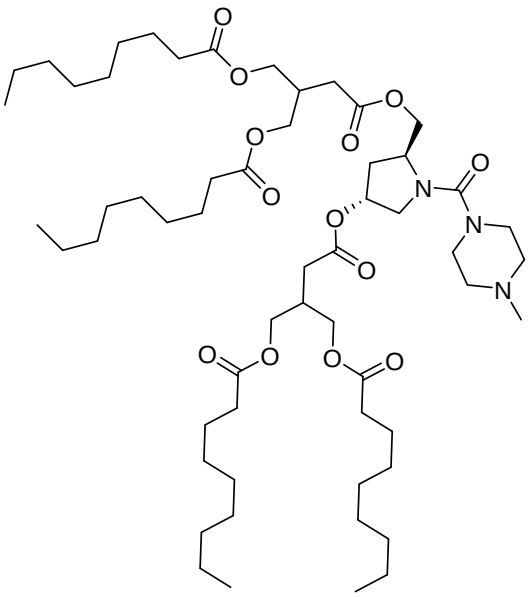
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-109:



CICL-207-109 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y

A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-109 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-109, y mezclas de estos.

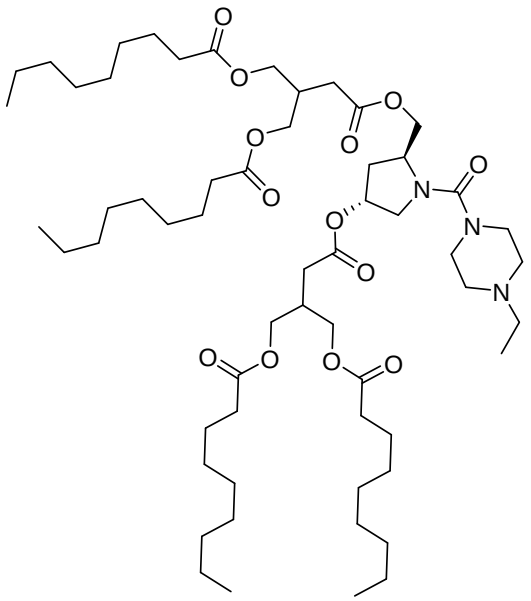
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-110.



CICL-207-110 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente

indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-110 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-110, y mezclas de estos.

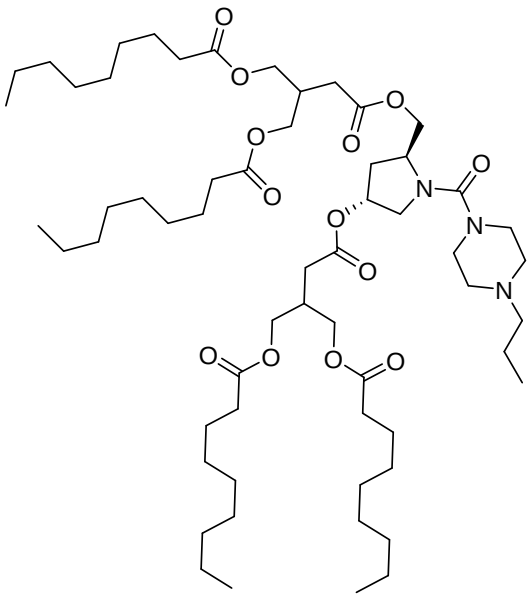
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-111:



CICL-207-111 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-111 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con

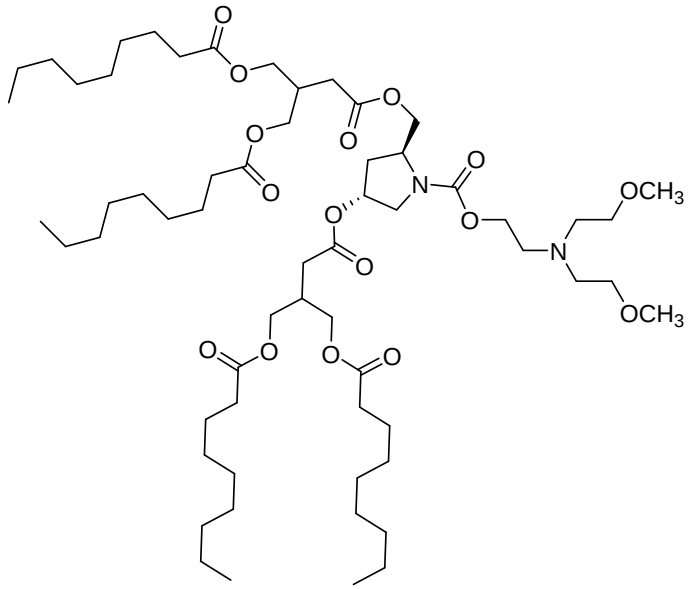
diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-111, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-297-112:



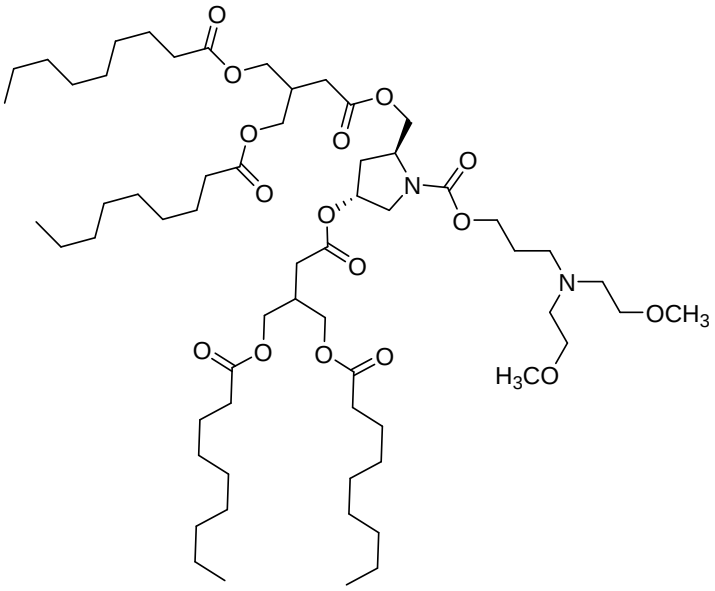
CICL-207-112 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-112 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-112, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-113:



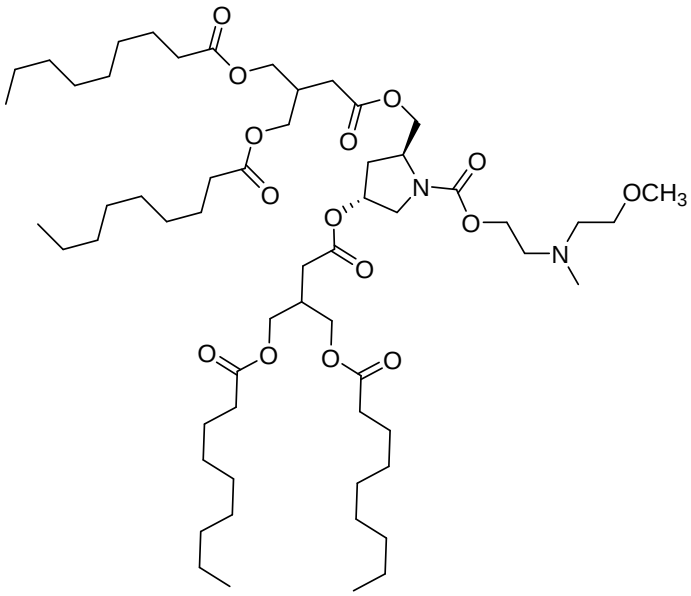
CICL-207-113 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-113 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-113, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-114:



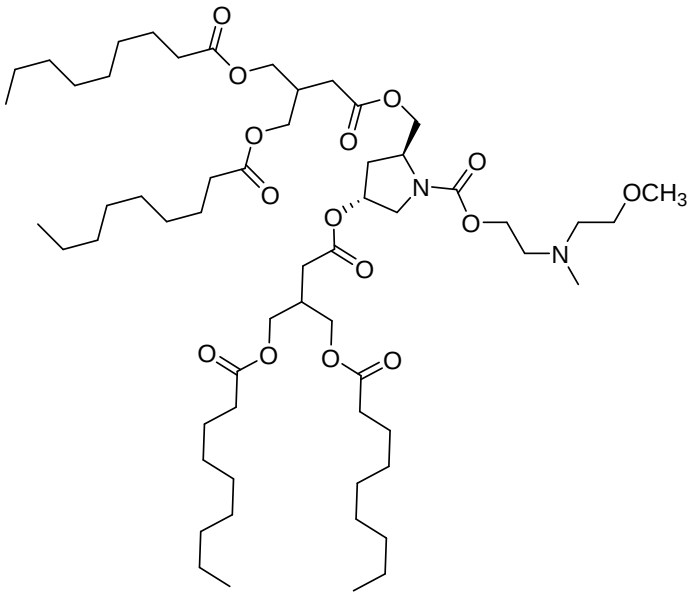
CICL-207-114 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-114 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-114, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-115:



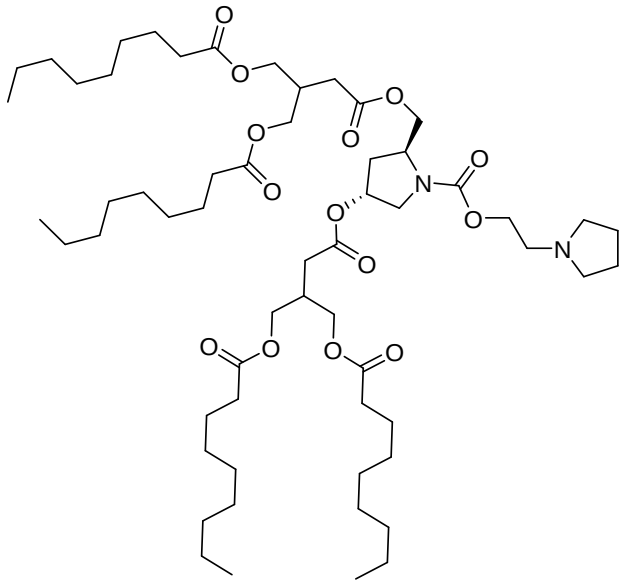
CICL-207-115 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-115 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-115, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-116:



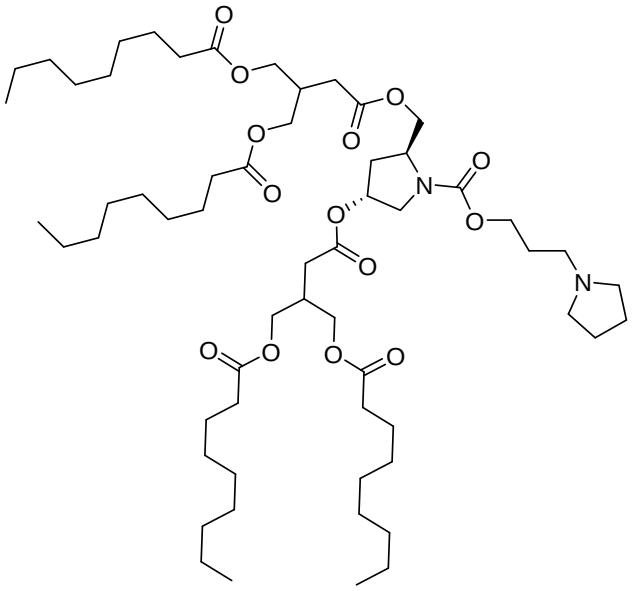
CICL-207-116 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-116 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-116, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-117:



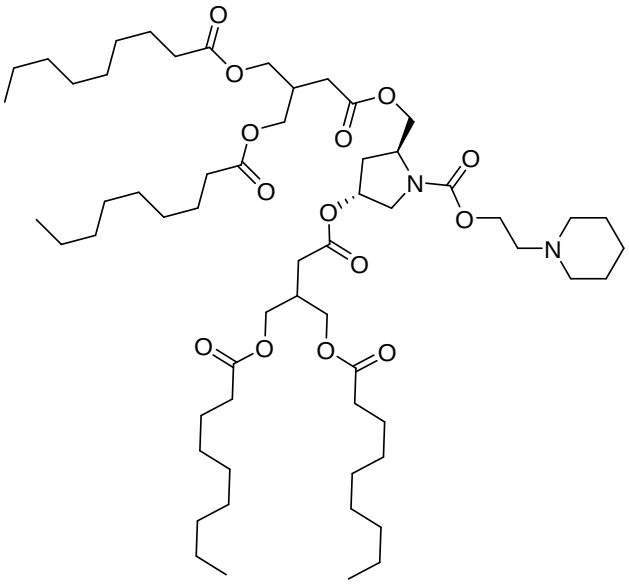
CICL-207-117 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-117 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-117, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-118:



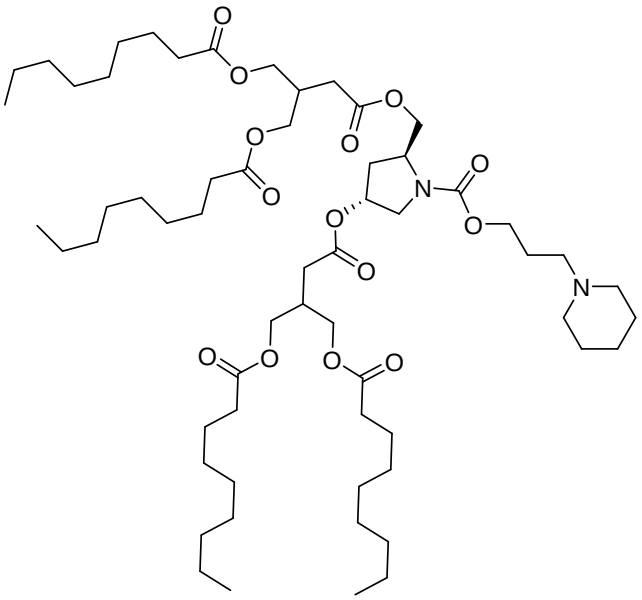
CICL-207-118 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-118 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-118, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-119:



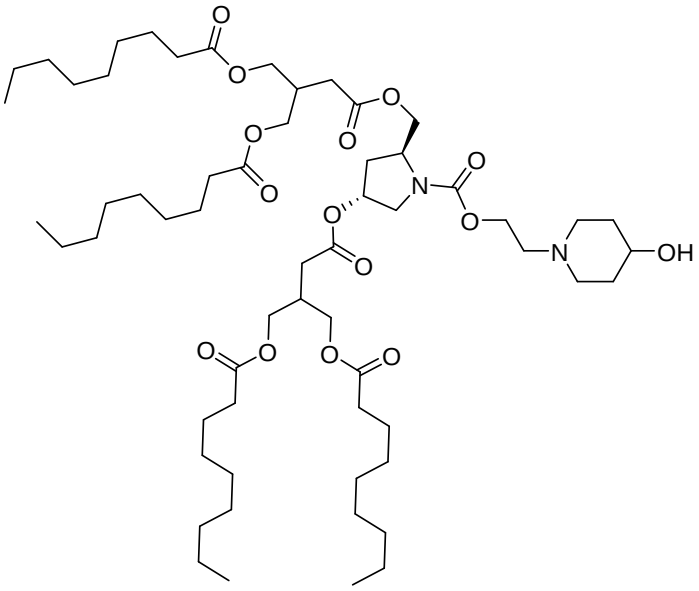
CICL-207-119 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-119 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-119, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-120:



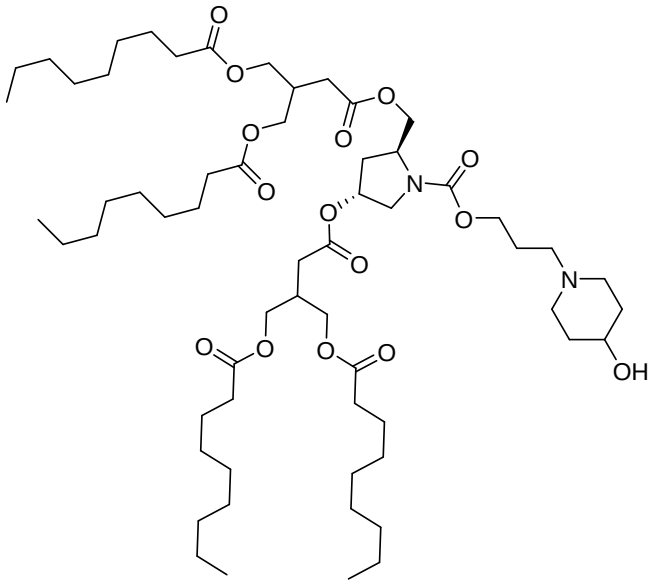
CICL-207-120 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-120 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-120, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-121:



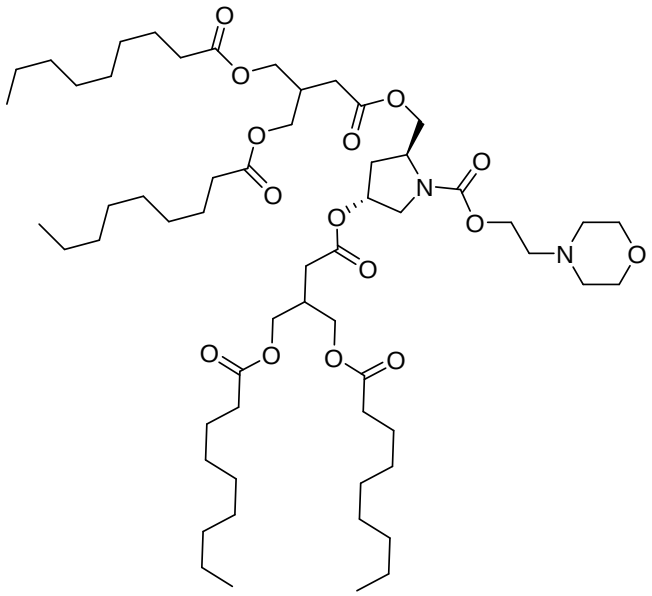
CICL-207-121 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-121 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-121, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-122:



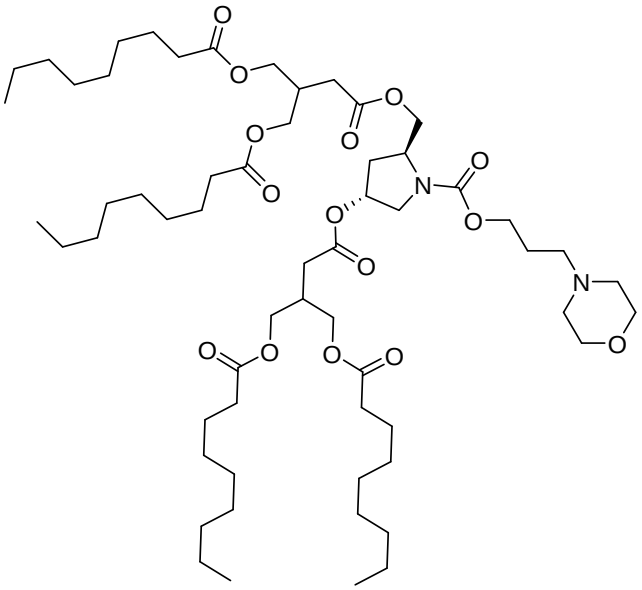
CICL-207-122 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-122 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-122, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-123:



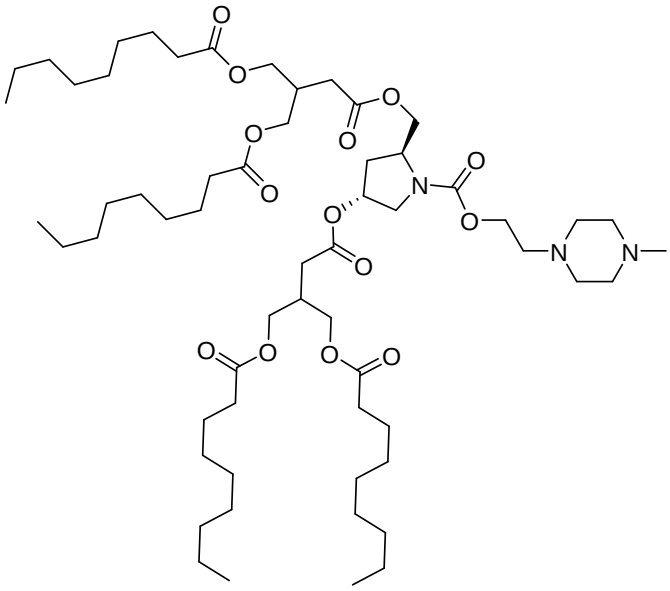
CICL-207-123 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-123 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-123, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-124:



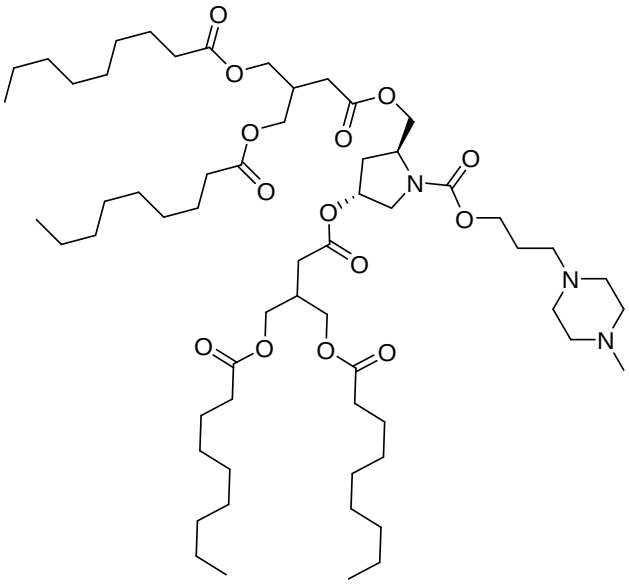
CICL-207-124 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-124 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-124, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-125:



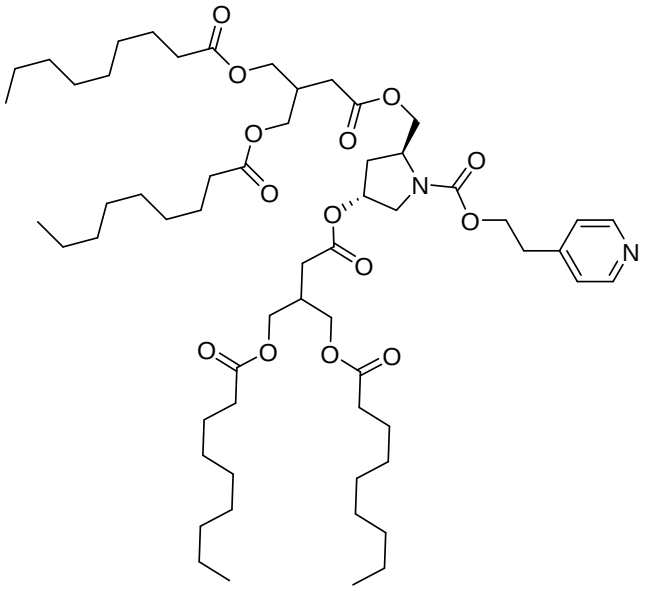
CICL-207-125 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-125 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-125, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-126:



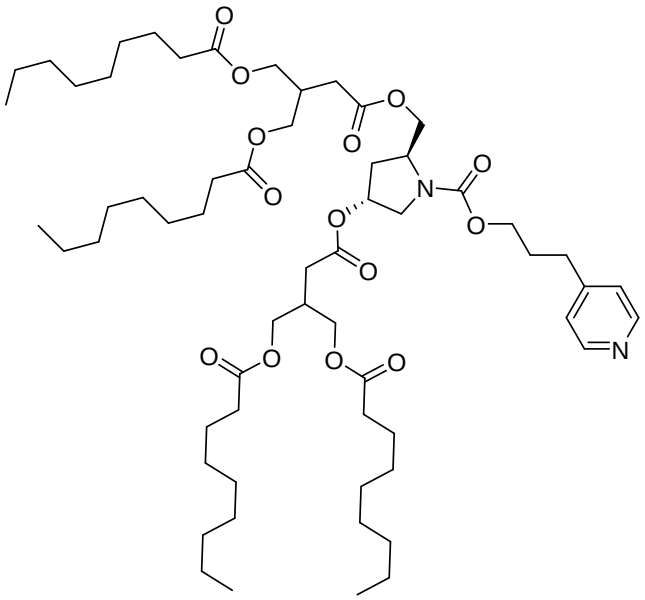
CICL-207-126 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-126 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-126, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-127:



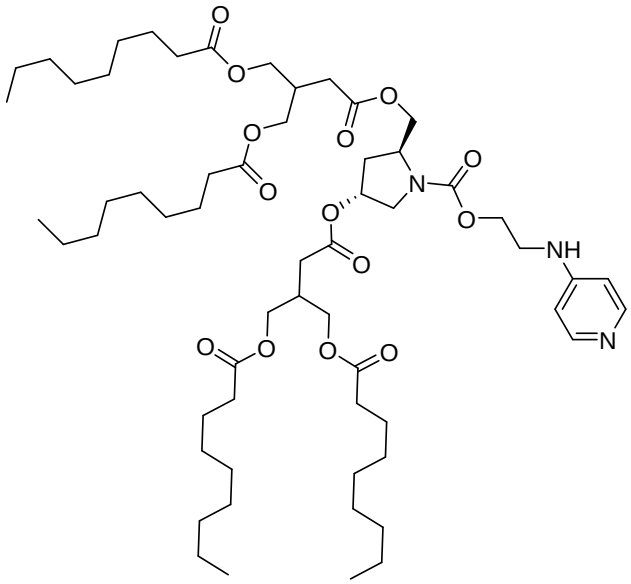
CICL-207-127 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-127 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-127, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-128:



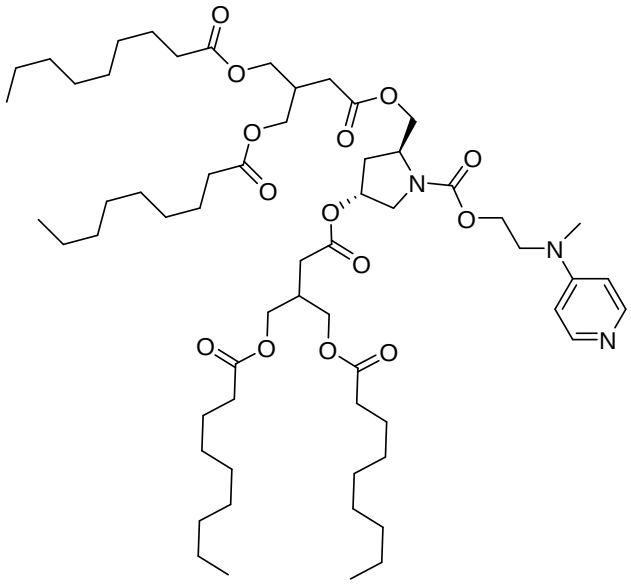
CICL-207-128 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-128 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-128, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-129:



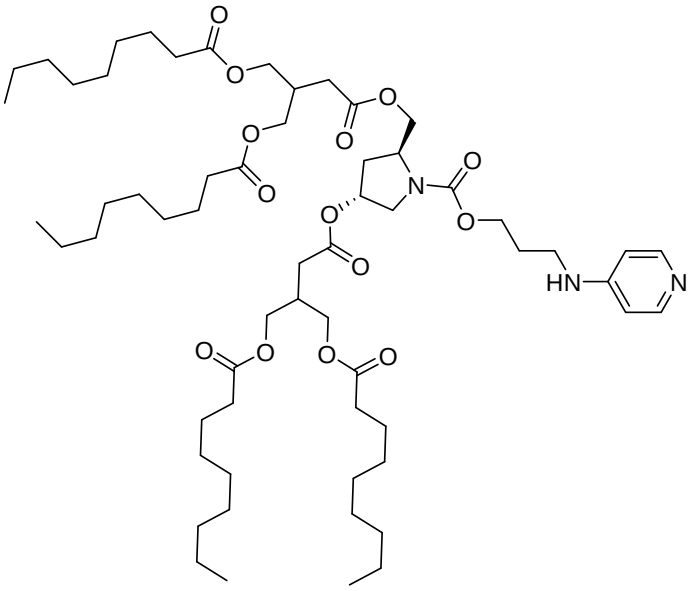
CICL-207-129 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-129 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-129, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-130:



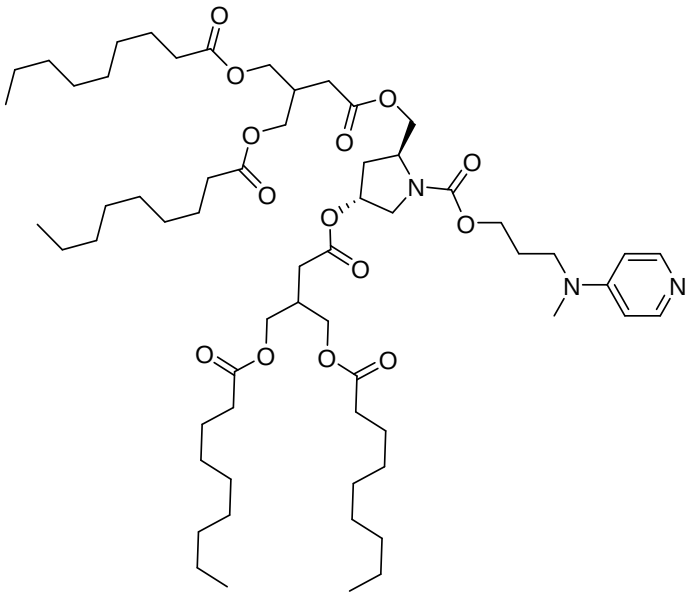
CICL-207-130 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-130 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-130, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-131:



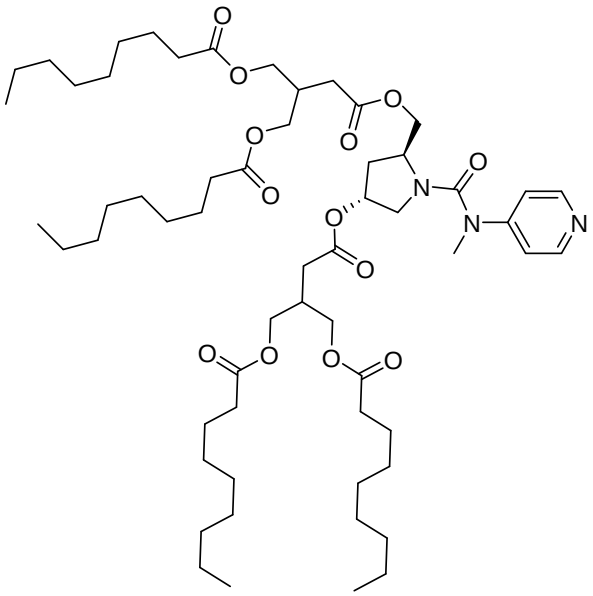
CICL-207-131 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-131 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-131, y mezclas de estos.

En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-132:



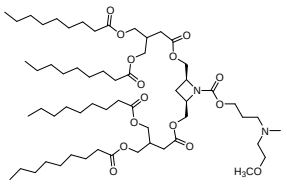
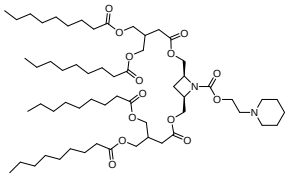
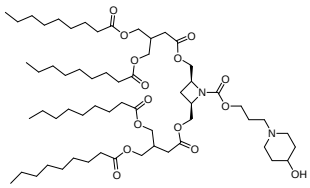
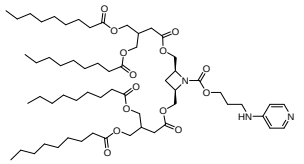
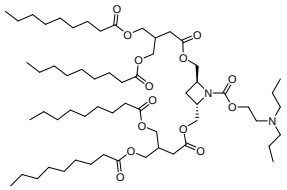
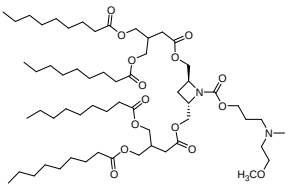
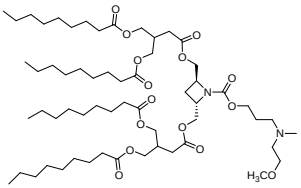
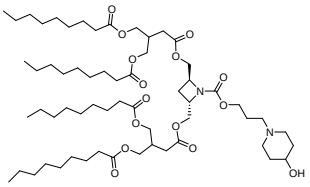
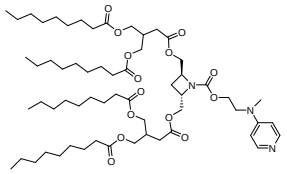
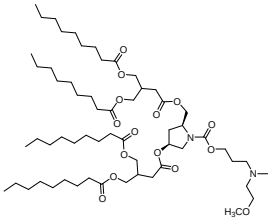
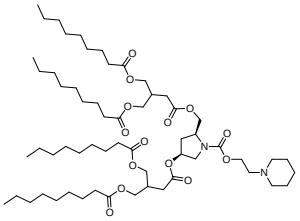
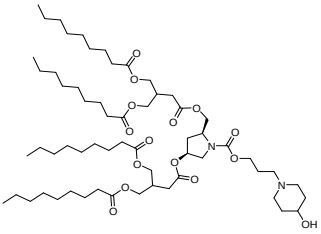
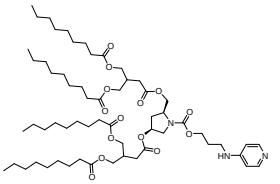
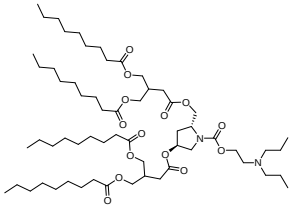
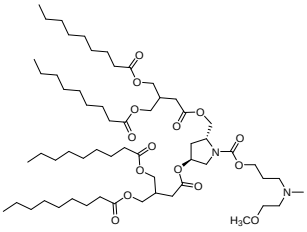
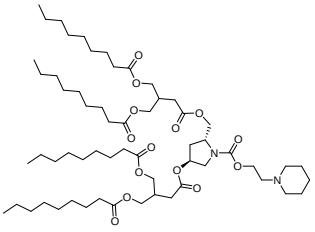
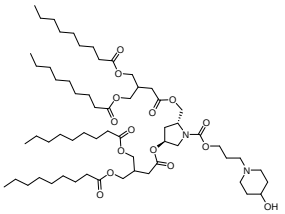
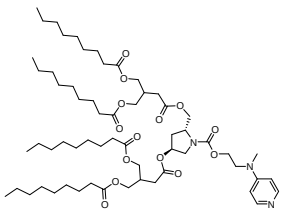
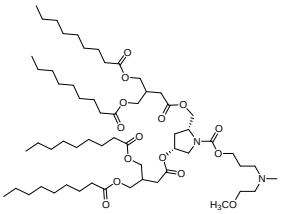
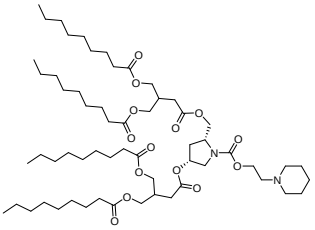
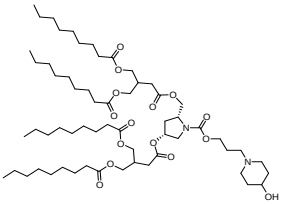
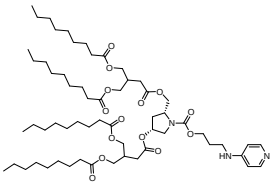
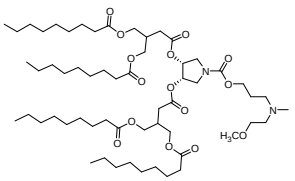
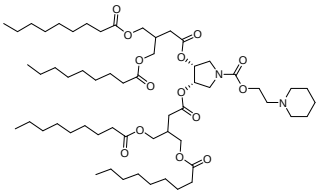
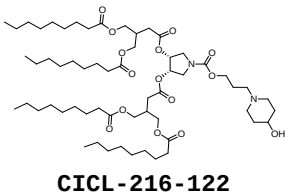
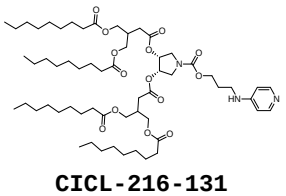
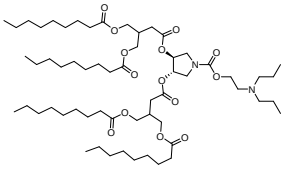
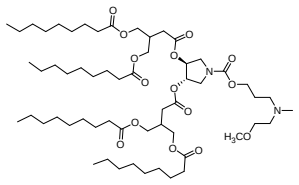
CICL-207-132 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-132 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-132, y mezclas de estos.

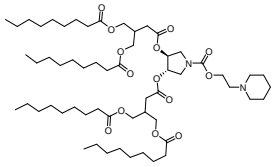
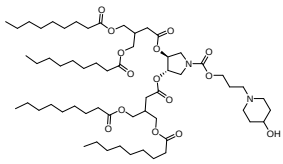
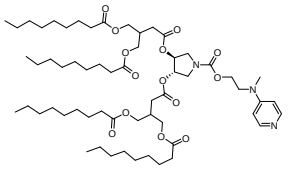
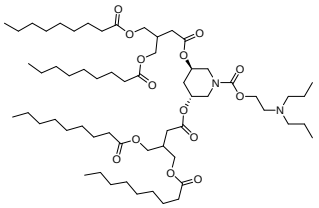
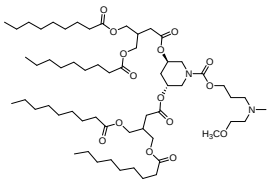
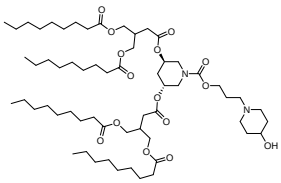
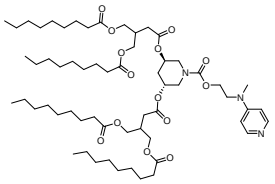
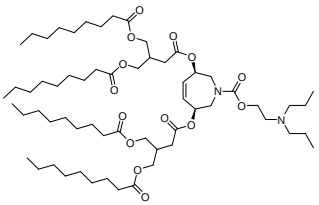
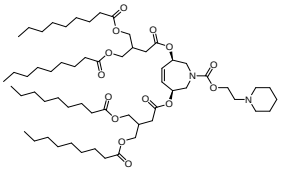
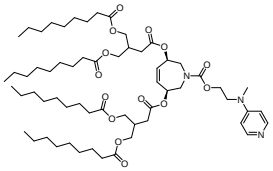
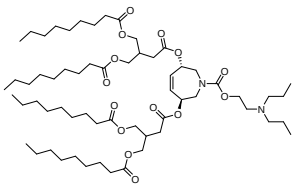
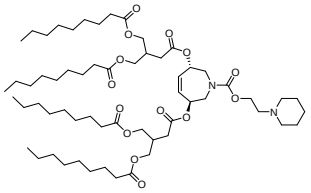
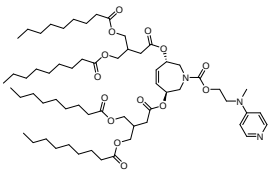
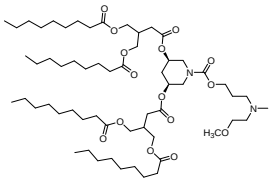
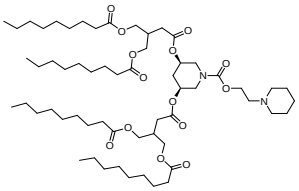
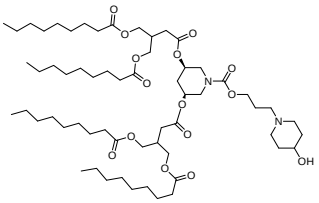
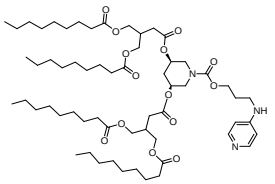
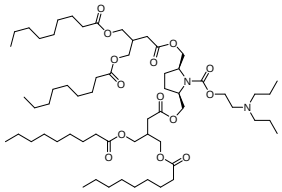
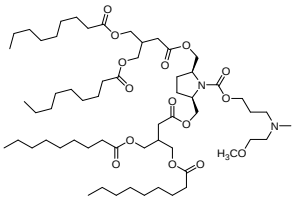
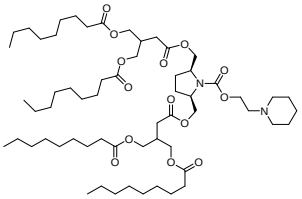
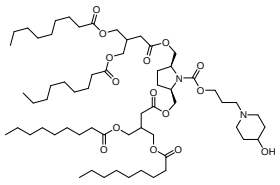
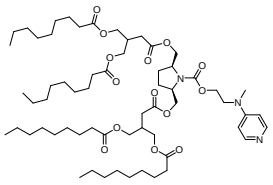
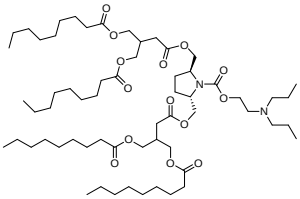
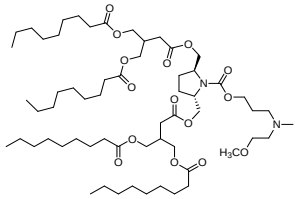
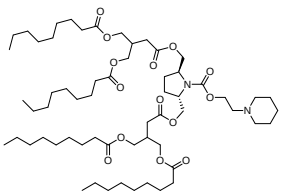
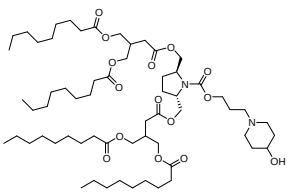
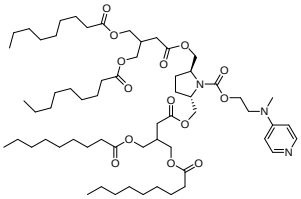
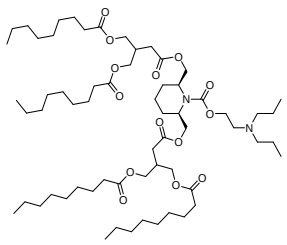
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene la estructura CICL-207-133:

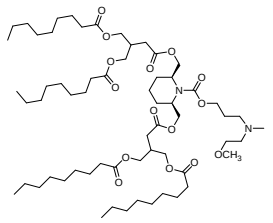


CICL-207-133 es un ejemplo de un lípido como se describe en la presente en el que A^1 y A^4 están ausentes, y A^2, A^3, y A^5 son CH_2, y los grupos de cola se colocan asimétricamente en relación con el nitrógeno del anillo en una configuración trans. La estructura dibujada anteriormente indica la estereoquímica absoluta para este lípido. Otras modalidades incluyen el enantiómero de CICL-207-133 y mezclas de los enantiómeros (p. ej., un racemato, u otras mezclas con diversas relaciones). Otras modalidades incluyen o son diastereómeros de CICL-207-133, y mezclas de estos.

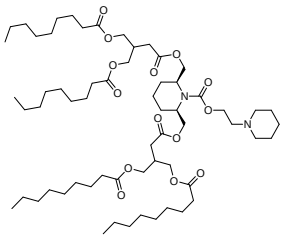
En algunas modalidades, el lípido catiónico ionizable tiene una estructura seleccionada de las siguientes:

 **CICL-221-116**	 **CICL-221-119**	 **CICL-221-122**	 **CICL-221-131**
 **CICL-222-109**	 **CICL-222-116**	 **CICL-222-119**	 **CICL-222-122**
 **CICL-222-130**	 **CICL-224-116**	 **CICL-224-119**	 **CICL-224-122**
 **CICL-224-131**	 **CICL-225-109**	 **CICL-225-116**	 **CICL-225-119**
 **CICL-225-122**	 **CICL-225-130**	 **CICL-223-116**	 **CICL-223-119**
 **CICL-223-122**	 **CICL-223-131**	 **CICL-216-116**	 **CICL-216-119**
 **CICL-216-122**	 **CICL-216-131**	 **CICL-215-109**	 **CICL-215-116**

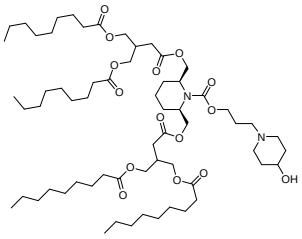
 **CICL-215-119**	 **CICL-215-122**	 **CICL-215-130**	 **CICL-220-109**
 **CICL-220-116**	 **CICL-220-122**	 **CICL-220-130**	 **CICL-219-109**
 **CICL-219-119**	 **CICL-219-130**	 **CICL-218-109**	 **CICL-218-119**
 **CICL-219-130**	 **CICL-238-116**	 **CICL-238-119**	 **CICL-238-122**
 **CICL-238-131**	 **CICL-242-109**	 **CICL-242-116**	 **CICL-242-119**
 **CICL-242-122**	 **CICL-242-130**	 **CICL-243-109**	 **CICL-242-116**
 **CICL-242-119**	 **CICL-242-122**	 **CICL-242-130**	 **CICL-244-109**



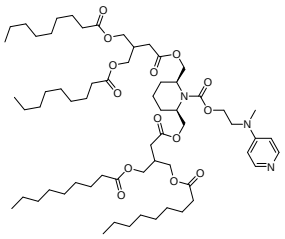
CICL-244-116



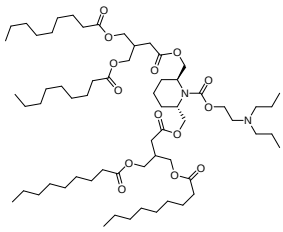
CICL-244-119



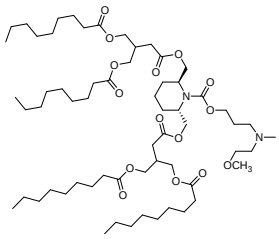
CICL-244-122



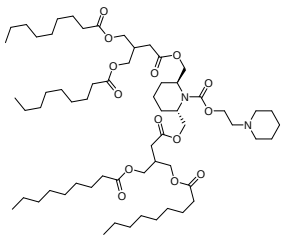
CICL-244-130



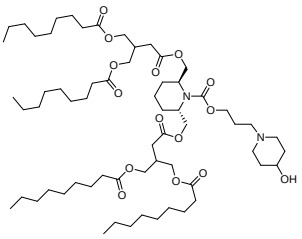
CICL-245-109



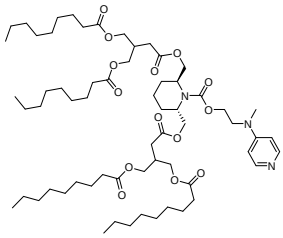
CICL-245-116



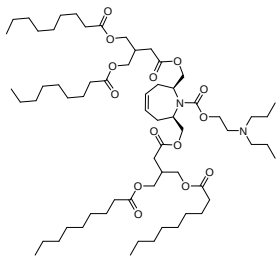
CICL-245-119



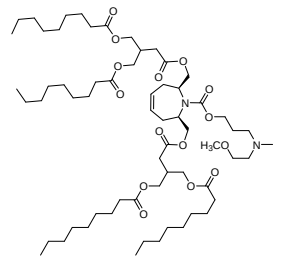
CICL-245-122



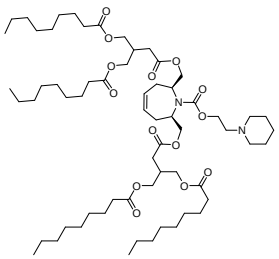
CICL-245-130



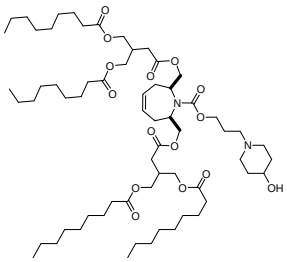
CICL-246-109



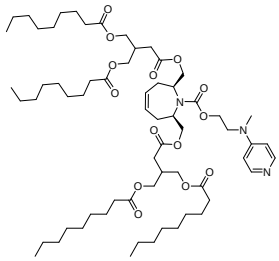
CICL-246-116



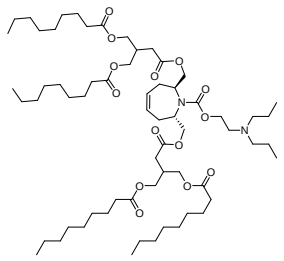
CICL-246-119



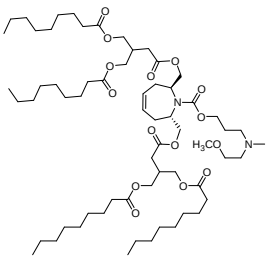
CICL-246-122



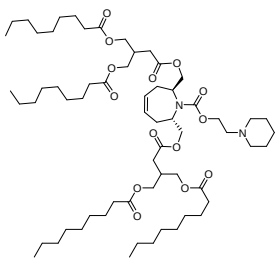
CICL-246-130



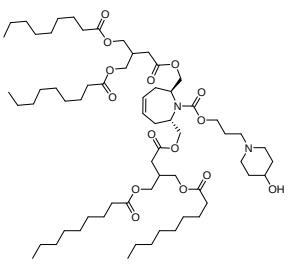
CICL-247-109



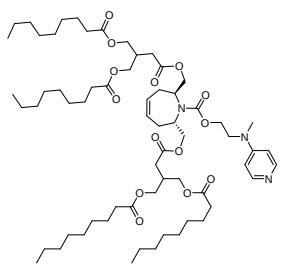
CICL-247-116



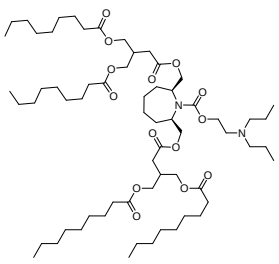
CICL-247-119



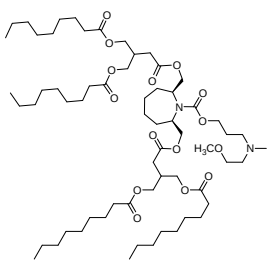
CICL-247-122



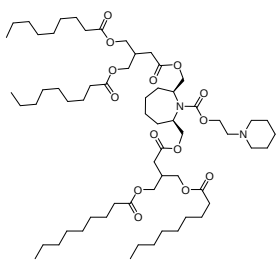
CICL-247-130



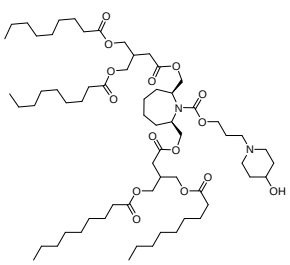
CICL-248-109



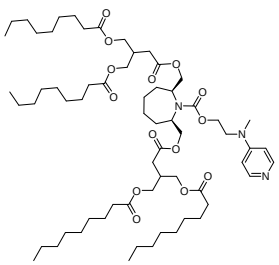
CICL-248-116



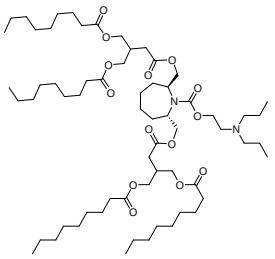
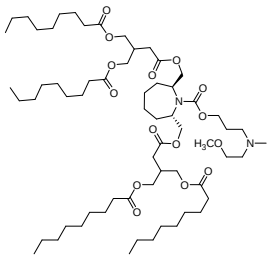
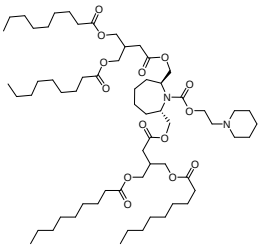
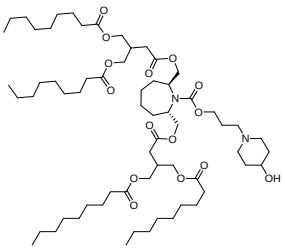
CICL-248-119



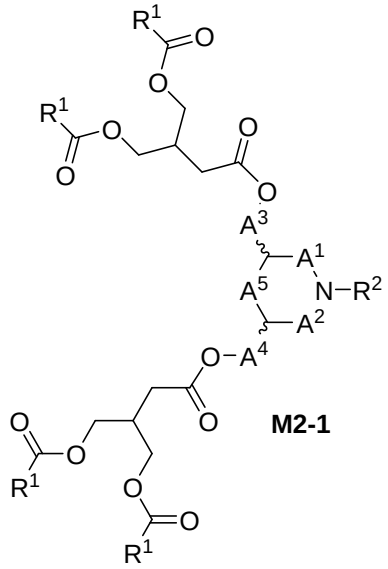
CICL-248-122



CICL-248-130

			
CICL-249-109	**CICL-249-116**	**CICL-249-119**	**CICL-249-122**

En otros aspectos de esta descripción se proporcionan lípidos intermedios de los lípidos catiónicos ionizables descritos en la presente. En ciertos aspectos, el lípido (*p. ej.*, lípido intermedio) de esta descripción tiene una estructura de la Fórmula M2-1:



M2-1

en donde

cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11} o alquenilo C_7-C_{11};

R^2 es H o un grupo protector;

cada A^1, A^2, A^3, y A^4 se selecciona independientemente de $(CH_2)_0$ y $(CH_2)_1$, y

A^5 se selecciona de $(CH_2)_{0-4}$, CH=CH, y CH_2-CH=CH-CH_2; y

enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

En diversas modalidades como se describe en la presente, R^2 es H.

En diversas modalidades como se describe en la presente, R^2 es un grupo protector (es decir, PG_1). PG_1 puede seleccionarse de grupos protectores lábiles a base o lábiles a ácidos como se conoce en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, R^2 es un grupo protector lábil al ácido tal como t-butoxicarbonilo (BOC) o benciloxicarbonilo (Cbz). En algunas otras modalidades, R^2 es un grupo protector lábil base tal como una entidad de trimetilsililetoxicarbonilo. En diversas modalidades de la Fórmula M2-1, R^1, A^1, A^2, A^3, A^4, y A^5 son como se describe de cualquier otra manera en la presente.

Por ejemplo, en diversas modalidades de la Fórmula M2-1, A^1 a A^4 se eligen de tal manera que solo haya dos átomos de cadena principal entre el nitrógeno del anillo y cada oxígeno éster más cercano en el grupo de cola más cercano.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2-1, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_{1-4}$ o CH_2-CH=CH-CH_2.

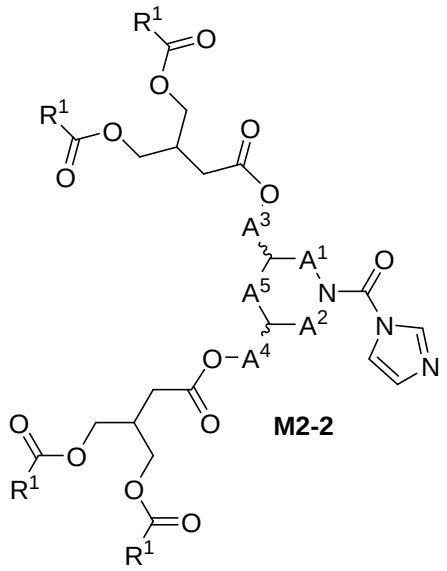
En ciertas modalidades de la fórmula M2-1, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_0$ y A^5 es $(CH_2)_1$.

En ciertas modalidades de la fórmula M2-1, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_0$.

En ciertas modalidades de la fórmula M2-1, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2-1, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$ o CH=CH.

En ciertos aspectos, el lípido (*p. ej.*, lípido intermedio) de esta descripción tiene una estructura de la Fórmula M2-2:



M2-2

cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11} o alquenilo C_7-C_{11};

cada A^1, A^2, A^3, y A^4 se selecciona independientemente de $(CH_2)_0$ y $(CH_2)_1$, y

A^5 se selecciona de $(CH_2)_{0-4}$, CH=CH, y CH_2-CH=CH-CH_2; y

enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

En diversas modalidades como se describe en la presente, R^1, A^1, A^2, A^3, A^4, y A^5 son como se describe de cualquier otra manera en la presente.

Por ejemplo, en diversas modalidades de la Fórmula M2-2, A^1 a A^4 se eligen de tal manera que solo haya dos átomos de cadena principal entre el nitrógeno del anillo y cada oxígeno éster más cercano en el grupo de cola más cercano.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2-2, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_{1-4}$ o CH_2-CH=CH-CH_2.

En ciertas modalidades de la fórmula M2-2, A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$.

En ciertas modalidades de la fórmula M2-2, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_0$.

En ciertas modalidades de la fórmula M2-2, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$.

En ciertas modalidades de la Fórmula M2-2, A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$ o CH=CH.

Para promover la biodegradabilidad y minimizar la acumulación de lípidos catiónicos ionizables de esta descripción, las colas de ácidos grasos se diseñan para comprender ésteres en una posición que minimice el impedimento estérico de la escisión del éster. Por ejemplo, mientras que una sola cola de ácidos grasos tenderá a extenderse lejos del carbonilo de éster para proporcionar la posición energéticamente más favorable, la presencia de dos colas conduce a que las colas se extiendan en direcciones opuestas para proporcionar la conformación energéticamente más favorable. En ciertas otras modalidades, las colas de ácidos grasos pueden estar en una posición energéticamente menos favorable. Por ejemplo, en ciertas modalidades, una de las colas se extiende hacia el carbonilo y obstaculiza estéricamente la escisión del éster. En consecuencia, se evitaron grandes ramificaciones inmediatamente adyacentes al carbonilo de éster en el diseño de los lípidos catiónicos descritos en la presente. En consecuencia, se evitaron las ramas grandes inmediatamente adyacentes al carbonilo de éster. En consecuencia, en algunas modalidades, los carbonilos de éster no están en una posición α con respecto al punto de ramificación, por ejemplo están en una posición β con respecto al punto de ramificación. Al posicionar el(los) éster(es) dentro del lípido, también se dio consideración a posibles productos de degradación para evitar la generación de compuestos tóxicos, como el formaldehído.

Una ventaja de confiar, al menos en parte, en lípidos catiónicos ionizables de esta descripción es que puede evitar la toxicidad asociada a lípidos catiónicos de amonio cuaternario. En consecuencia, en diversas modalidades como se describe en la presente, una LNP o tLNP no incluye un amonio cuaternario (p. ej., un grupo nitrógeno cuaternario). Algunos LNP que contienen tales lípidos, que son efectivamente permanentemente catiónicos, han mostrado una toxicidad hiperaguda fatal en animales de laboratorio. El uso de lípidos catiónicos ionizables de esta descripción en una LNP obvia la necesidad de lípidos catiónicos de amonio cuaternario y, por lo tanto, puede mitigar o evitar la toxicidad potencial de LNP. En ciertas modalidades, el uso de una LNP o tLNP de esta descripción no causa toxicidad detectable para las células o en un sujeto. En ciertas modalidades, el uso de una LNP o tLNP de esta descripción no causa más que una toxicidad leve a las células o en un sujeto que es asintomático o induce solo síntomas leves que no requieren intervención. En ciertas modalidades, el uso de una LNP o tLNP de esta descripción no causa más que una toxicidad moderada a las células o en un sujeto que puede perjudicar las actividades de la vida diaria que requieren solamente intervenciones mínimas, locales o no invasivas.

La relación entre la eficacia y toxicidad de un fármaco se expresa generalmente en términos de ventana terapéutica e índice terapéutico. La ventana terapéutica

es el rango de dosis desde la dosis más baja que exhibe un efecto terapéutico detectable hasta la dosis máxima tolerada (MTD, por sus siglas en inglés); la dosis más alta que tendrá el efecto terapéutico deseado sin producir toxicidad inaceptable. Más típicamente, el índice terapéutico se calcula como la relación de LD50:ED50 cuando se basa en estudios en animales y TD50:ED50 cuando se basa en estudios en humanos (aunque este cálculo también podría derivarse de estudios en animales y a veces se denomina índice protector), donde LD50, TD50 y ED50 son las dosis que son letales, tóxicas y efectivas en el 50 % de la población sometida a prueba, respectivamente. Estos conceptos son aplicables ya sea que la toxicidad se basa en el propio agente activo o algún otro componente del producto farmacológico, tal como, por ejemplo, la LNP o sus componentes. Para cualquier nivel inherente de toxicidad de los lípidos descritos o de las propias LNP, un aumento en la eficiencia de suministrar el ácido nucleico al citoplasma mejora la ventana o índice terapéutico, ya que una cantidad efectiva de una carga útil biológicamente activa (p. ej., una o más especies de molécula de ácido nucleico) sería suministrable con una dosis menor de LNP (y sus lípidos componentes).

Las toxicidades y eventos adversos a veces se califican de acuerdo con una escala de 5 puntos. Una toxicidad de grado 1 o leve es asintomática o induce solo

síntomas leves; puede caracterizarse únicamente por observaciones clínicas o diagnósticas; y no se indica la intervención. Una toxicidad de grado 2 o moderada puede perjudicar las actividades de la vida diaria (tal como preparar comidas, ir de compras, administrar dinero, usar el teléfono, etc.), pero solo se indican intervenciones mínimas, locales o no invasivas. Las toxicidades de grado 3 son médicamente significativas, pero no ponen en peligro inmediatamente la vida; se indica hospitalización o prolongación de la hospitalización; las actividades de la vida diaria relacionadas con el autocuidado (tal como bañarse, vestirse y desvestirse, alimentarse, ir al baño, tomar medicamentos y no estar postrado en cama) pueden verse afectadas. Las toxicidades de grado 4 son potencialmente mortales y está indicada una intervención urgente. La toxicidad de grado 5 produce una muerte relacionada con eventos adversos. Por lo tanto, en diversas modalidades, mediante el uso de la LNP y tLNP descritas, una toxicidad se limita al grado 2 o menos, grado 1 o menos, o no produce ninguna observación de la toxicidad.

Tolerabilidad

Las LNP convencionales se entregan principalmente al hígado. La toxicidad hepática ha sido el principal parámetro limitante de dosis observado con los productos farmacéuticos que contienen LNP. Por ejemplo, ONPATTRO®, que

comprende el lípido ionizable MC3, tiene un NOAEL (sin nivel de efecto adverso observado) de solo 0,3 mg/kg para dosis múltiples en ratas. Una LNP de referencia que comprende el lípido catiónico ionizable ALC-0315, usado en la vacuna contra el SARS-CoV-2 COMIRNATY®, provocó niveles elevados de enzimas hepáticas y proteínas de fase aguda a dosis únicas de ≥1 mg/kg en la rata. El mero hecho de adjuntar un anticuerpo a la LNP de referencia revierte parcialmente esa elevación y la reversión es mayor si el anticuerpo dirige la LNP a algún otro tejido (es decir, una tLNP). Sin embargo, el uso de un lípido catiónico ionizable altamente biodegradable, CICL-1, cuyo catabolismo debería ser similar a los descritos en la presente, redujo el suministro al hígado y los niveles asociados de enzima hepática y proteína de fase aguda en mayor medida para LNP, LNP conjugada con anticuerpos y tLNP. Las tLNP que comprenden CICL-207 descritas en la presente fueron generalmente bien tolerados en ratas a dosis únicas de hasta al menos 8 mg/kg.

Métodos para hacer lípidos catiónicos ionizables

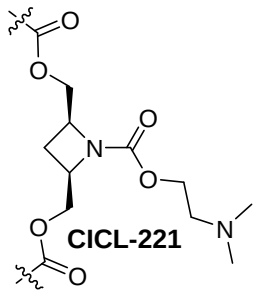
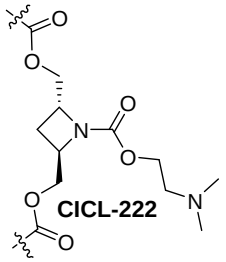
Pueden usarse simetrías estructurales y vías de síntesis convergentes en lugar de lineales para simplificar la síntesis de los lípidos ionizables.

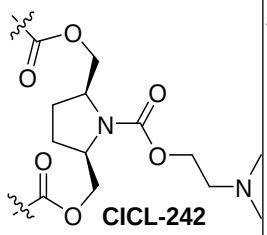
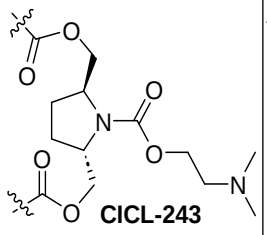
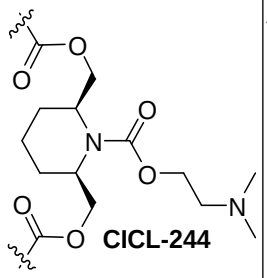
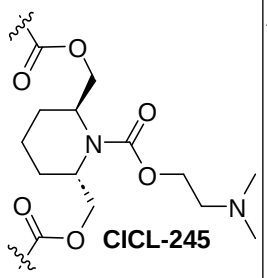
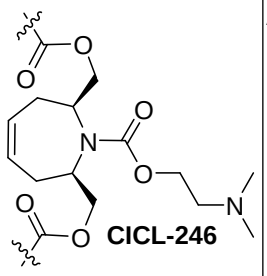
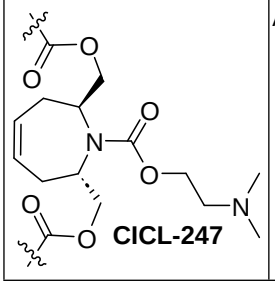
En ciertos aspectos, esta descripción proporciona un método para sintetizar un lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2 (*p. ej.*, sin limitarse a, CICL-207, CICL-215,

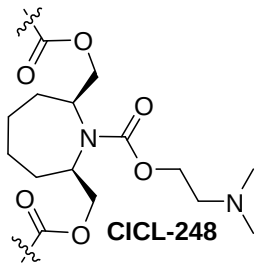
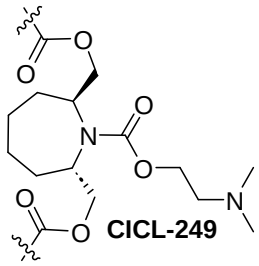
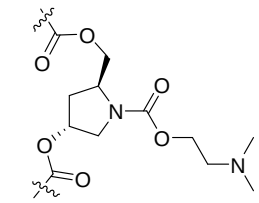
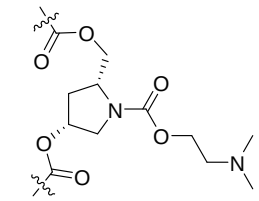
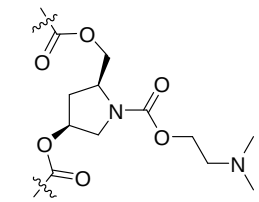
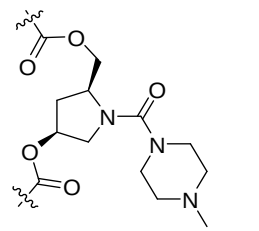
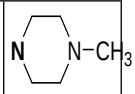
CICL-216, CICL-217, CICL-218, CICL-219, CICL-220, CICL-221, CICL-222, CICL-223, CICL-224, y CICL-225).

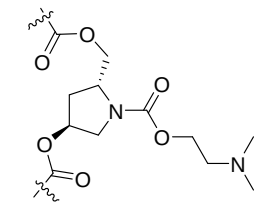
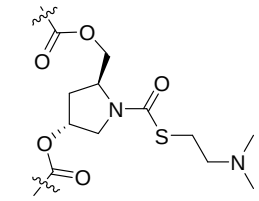
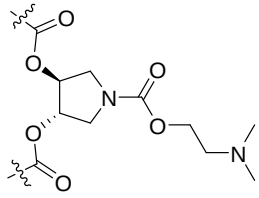
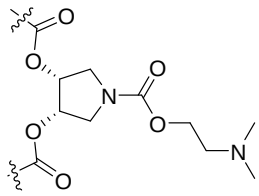
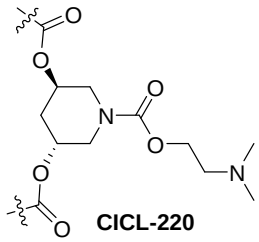
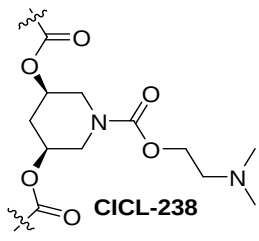
La Tabla 2 proporciona una síntesis de sustituyentes en la Fórmula M2 para las estructuras de anillo de CICL-207, CICL-215, CICL-216, CICL-217, CICL-218, CICL-219, CICL-220, CICL-221, CICL-222, CICL-223, CICL-224, CICL-225, CICL-238, CICL-239, CICL-242, CICL-243, CICL-244, CICL-245, CICL-246, CICL-247, CICL-248, y CICL-249.

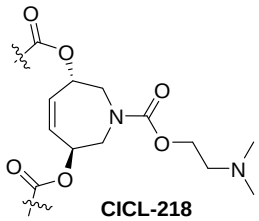
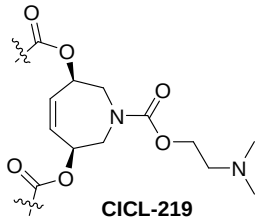
Tabla 2. Sustituyentes en la Fórmula M2 para las estructuras de cabeza y anillo de CICL-207, CICL-215, CICL-216, CICL-217, CICL-218, CICL-219, CICL-220, CICL-221, CICL-222, CICL-223, CICL-224, CICL-225, CICL-238, CICL-239, CICL-242, CICL-243, CICL-244, CICL-245, CICL-246, CICL-247, CICL-248, y CICL-249

Cabeza de lípido y estructura del anillo	**A^1**	**A^2**	**A^5**	**Tamaño del anillo**	**A^3**	**A^4**	**Y**
 **CICL-221**	Ausente	Ausente	CH_2	**4**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-222**	Ausente	Ausente	CH_2	**4**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$

Cabeza de lípido y estructura del anillo	**A^1**	**A^2**	**A^5**	**Tamaño del anillo**	**A^3**	**A^4**	**Y**
 **CICL-242**	Ausente	Ausente	CH_2CH_2	**5**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-243**	Ausente	Ausente	CH_2CH_2	**5**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-244**	Ausente	Ausente	CH_2CH_2 CH_2	**6**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-245**	Ausente	Ausente	CH_2CH_2 CH_2	**6**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-246**	Ausente	Ausente	CH_2CH= $CHCH_2$	**7**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-247**	Ausente	Ausente	CH_2CH= $CHCH_2$	**7**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$

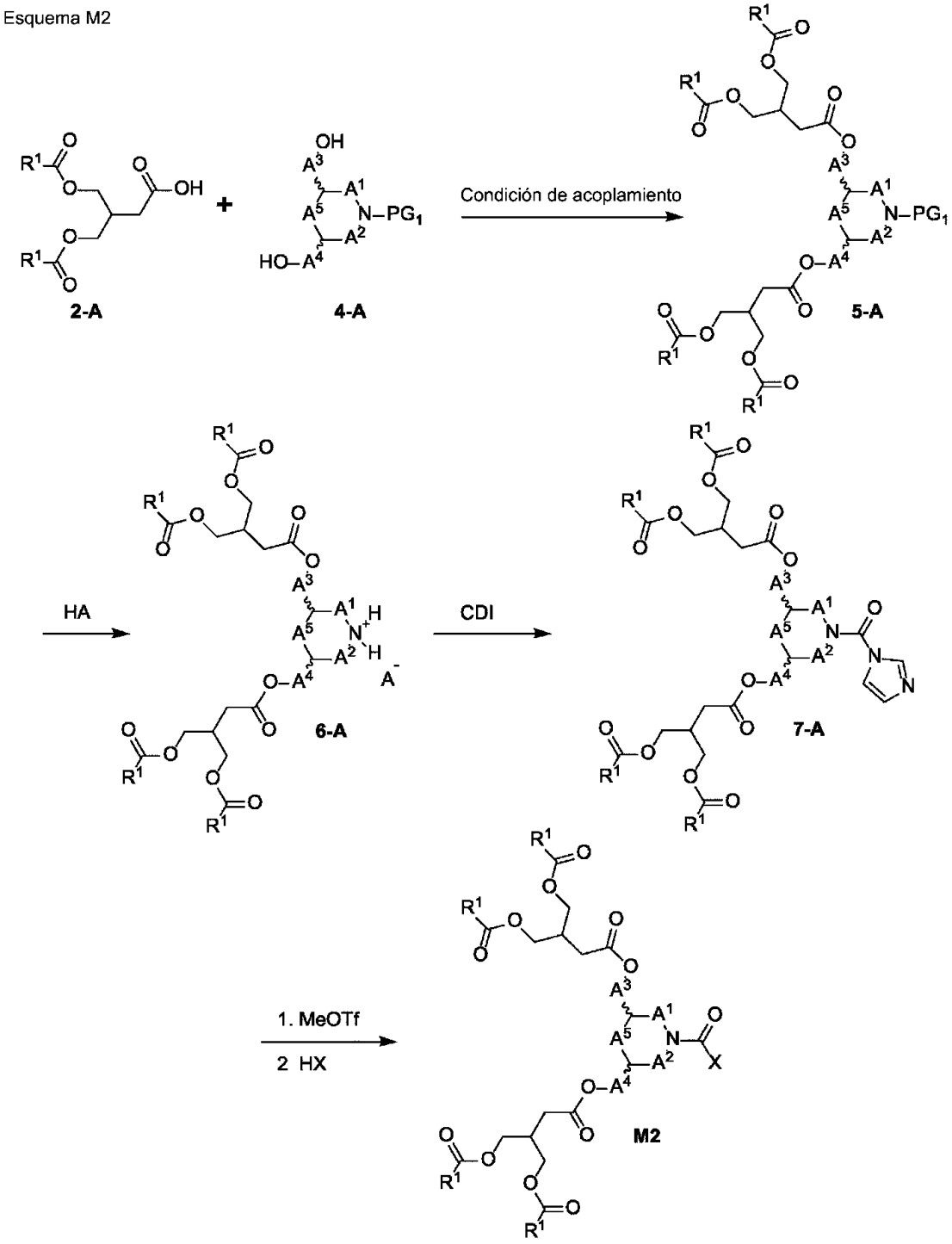
Cabeza de lípido y estructura del anillo	**A^1**	**A^2**	**A^5**	**Tamaño del anillo**	**A^3**	**A^4**	**Y**
 **CICL-248**	Ausente	Ausente	CH_2CH_2 CH_2CH_2	**7**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2- $N(CH_3)_2$
 **CICL-249**	Ausente	Ausente	CH_2CH_2 CH_2CH_2	**7**	CH_2	CH_2	**O**-CH_2 CH_2- $N(CH_3)_2$
 **CICL-207**	Ausente	CH_2	CH_2	**5**	CH_2	Ausente	**O**-CH_2 CH_2- $N(CH_3)_2$
 **CICL-223**	Ausente	CH_2	CH_2	**5**	CH_2	Ausente	**O**-CH_2 CH_2- $N(CH_3)_2$
 **CICL-224**	Ausente	CH_2	CH_2	**5**	CH_2	Ausente	**O**-CH_2 CH_2- $N(CH_3)_2$
 **CICL-239**	Ausente	CH_2	CH_2	**5**	CH_2	Ausente	

Cabeza de lípido y estructura del anillo	**A^1**	**A^2**	**A^5**	**Tamaño del anillo**	**A^3**	**A^4**	**Y**
 **CICL-225**	Ausente	CH_2	CH_2	**5**	CH_2	Ausente	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-217**	Ausente	CH_2	CH_2	**5**	CH_2	Ausente	**S**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-215**	CH_2	CH_2	Ausente	**5**	Ausente	Ausente	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-216**	CH_2	CH_2	Ausente	**5**	Ausente	Ausente	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-220**	CH_2	CH_2	CH_2	**6**	Ausente	Ausente	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-238**	CH_2	CH_2	CH_2	**6**	Ausente	Ausente	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$

Cabeza de lípido y estructura del anillo	**A^1**	**A^2**	**A^5**	**Tamaño del anillo**	**A^3**	**A^4**	**Y**
 **CICL-218**	CH_2	CH_2	CH=CH	**7**	Ausente	Ausente	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$
 **CICL-219**	CH_2	CH_2	CH=CH	**7**	Ausente	Ausente	**O**-CH_2 CH_2-$N(CH_3)_2$

En ciertas modalidades, esta descripción proporciona un método para sintetizar un lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2 que comprende la etapa de síntesis como se muestra en el **Esquema M2**, en donde A^- es un anión de un ácido AH, y el resto de los sustituyentes se definen de la misma manera que en la Fórmula M2. En ciertas modalidades, el método comprende además la etapa de síntesis mostrada en el **Esquema 4-A**. Un estereoisómero particular del lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2 puede prepararse de acuerdo con el método de síntesis descrito en la presente con materiales de partida y/o intermedios que tienen la misma estereoquímica.

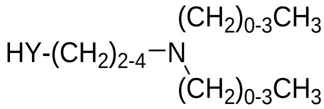
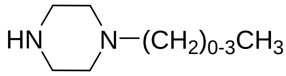
Esquema M2

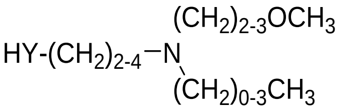
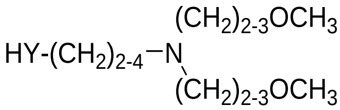
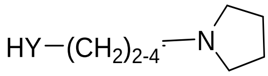


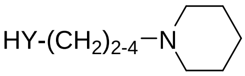
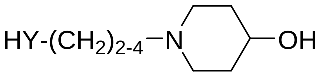
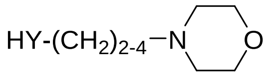
La etapa de síntesis mostrada en el **Esquema M2** comprende hacer reaccionar una diéster-amina 6-A con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) para proporcionar una imidazolecarboxiamida 7-A; y después de la activación de la

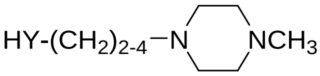
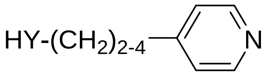
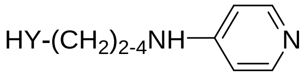
imidazolecarboxiamida **7-A** se acopla con un alcohol/tiol/amina (HX) deseado para proporcionar un carbamato/tiocarbamato/urea correspondiente que tiene la estructura de la Fórmula M2, todos los sustituyentes se definen igual que los de la Fórmula M2.

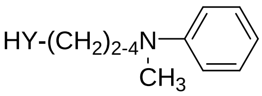
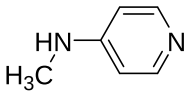
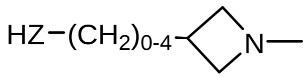
En ciertas modalidades, la síntesis de imidazolecarboxiamida **7-A** se realiza en un solvente orgánico (p. ej., sin limitarse a, CH_2Cl_2) en la presencia de un catalizador básico (p. ej., sin limitarse a, trimetilamina). En ciertas modalidades, la síntesis de carbamato/thiocarbamato/urea puede comprender primero hacer reaccionar la imidazolecarboxiamida **7-A** con trifluorometanosulfonato (MeOTf), después reaccionar con el alcohol/tiol/amina (HX) deseado en la presencia de una base (p. ej., trimetilamina). La reacción puede realizarse en un solvente orgánico (p. ej., acetonitrilo). En ciertas modalidades como se describe en la presente, HX es un alcohol, en donde X es como se describe en la presente. En ciertas modalidades como se describe en la presente, HX es un tiol, en donde X es como se describe en la presente. En ciertas modalidades como se describe en la presente, HX es una amina, en donde X es como se describe en la presente. Por consiguiente, en algunas modalidades, HX es un alcohol/tiol/amina que proporciona ese grupo X deseado a los lípidos de la fórmula **M2**. Por ejemplo, en diversas modalidades como se describe en la presente, HX se

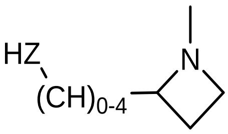
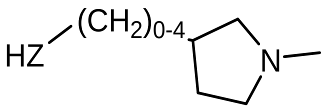
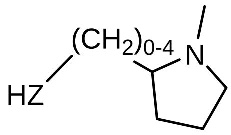
selecciona de  ,  ,

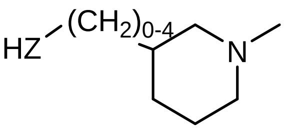
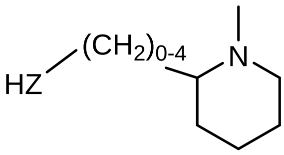
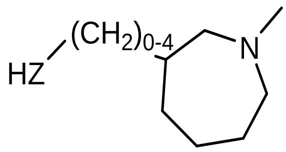
 ,  ,  ,

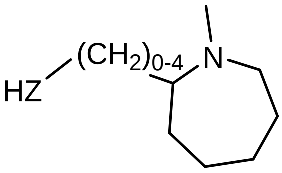
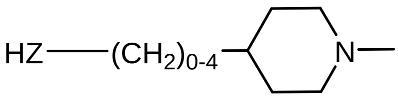
 ,  ,  ,

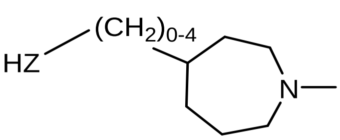
 ,  ,  ,

 ,  ,  ,

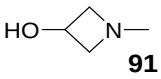
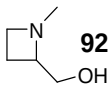
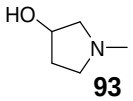
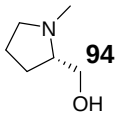
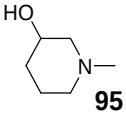
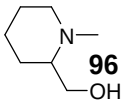
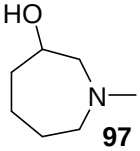
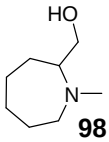
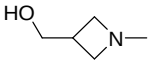
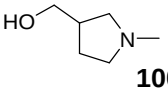
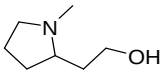
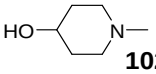
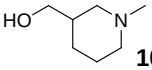
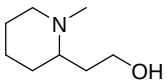
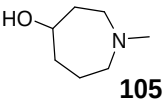
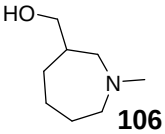
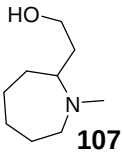
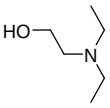
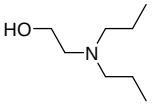
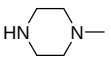
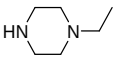
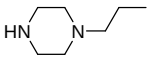
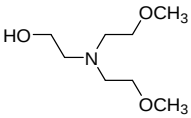
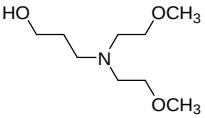
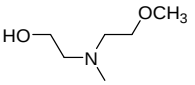
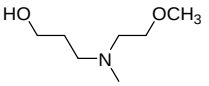
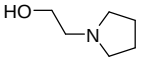
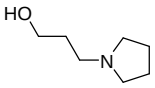
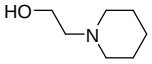
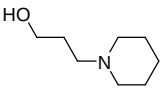
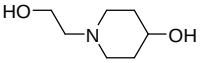
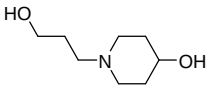
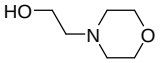
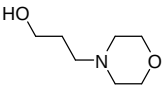
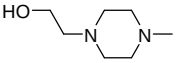
 ,  ,  ,

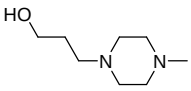
 ,  ,  ,

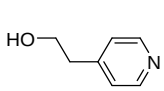
 ,  , o

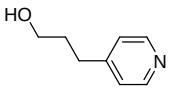
 , en donde Y es O, S, NH, de NCH_3 y Z es O, NH, NCH_3. Los diversos compuestos de HX descritos en la presente disponibles comercialmente, son conocidos en la literatura científica, o pueden hacerse usando procedimientos familiares para la persona con experiencia en la técnica, proporcionados a partir de fuentes

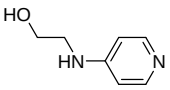
comerciales, o los procedimientos generales descritos en los Ejemplos a continuación.

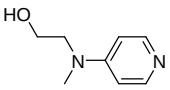
Por ejemplo, en diversas modalidades, HX se selecciona de una cualquiera de  **91**,  **92**,  **93**,  **94**,  **95**,  **96**,  **97**,  **98**,  **99**,  **100**,  **101**,  **102**,  **103**,  **104**,  **105**,  **106**,  **107**,  **108**,  **109**,  **110**,  **111**,  **112**,  **113**,  **114**,  **115**,  **116**,  **117**,  **118**,  **119**,  **120**,  **121**,  **122**,  **123**,  **124**,  **125**,



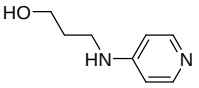
126, 

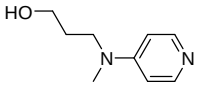
127, 

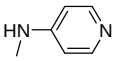
128, 

129, 

130,



131, 

132, o 

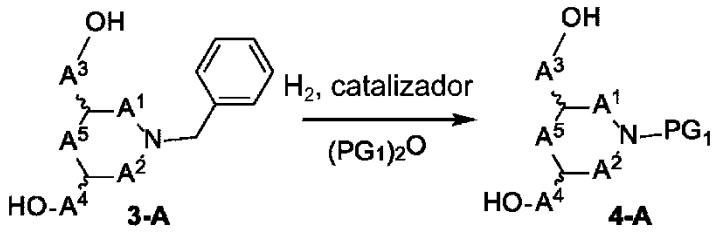
133.

En ciertas modalidades, el método puede comprender además la síntesis de la diéster-amina 6-A que comprende desproteger una diéster-amina 5-A protegida para proporcionar la diéster-amina 6-A desprotegida. La desprotección puede realizarse bajo condiciones ácidas o básicas, dependiendo del grupo protector (PG 1). Por ejemplo, la etapa de desprotección puede realizarse en condiciones ácidas (p. ej., en la presencia de un ácido AH, tal como ácido trifluoroacético, TFA, cuando los grupos protectores son un grupo protector lábil al ácido, p. ej., t-butoxicarbonilo (BOC)) en una solución orgánica (p. ej., CH_2Cl_2). Otras etapas de PG_1 y desprotección pueden usarse según sea conocido por la persona con experiencia en la técnica. Por ejemplo, PG_1 puede ser un benciloxicarbonilo (Cbz) que puede eliminarse en la presencia de hidrógeno y un catalizador de Pd/C. También puede usarse una base lábil PG_1 tal como una entidad de trimetilsililetoxicarbonilo, y puede eliminarse con nBuNH-$_4$ o HF-piridina.

En ciertas modalidades, el método comprende además la síntesis de la diéster-amina **5-A** protegida que comprende

acoplar un diéster-ácido **2-A** desprotegido con una diol-amina deseada protegida por un primer grupo protector (PG_1) (amina **4-A** protegida con diol) para formar la diéster-amina protegida **5-A.** En ciertas modalidades, la reacción de acoplamiento se realiza en un solvente orgánico (p. ej., acetonitrilo) en la presencia de un catalizador nucleofílico (p. ej., DMAP) y un catalizador ácido (p. ej., clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC-HCl)). En ciertas modalidades, PG_1 puede ser $-C(=O)-O-C(CH_3)_3$.

En ciertas modalidades, el método comprende además la síntesis de la amina protegida con diol **4-A** como se muestra en el **Esquema 4-A,** que comprende hacer reaccionar una bencil-diol-amina **3-A** con un dicarbonato (p. ej., $(PG_1)_2O$ tal como dicarbonato de di-terc-butilo (BOC_2O)) en la presencia de un catalizador (p. ej., $Pd(OH)_2$) e hidrógeno para proporcionar la amina protegida con diol **4-A**.



Esquema 4-A

Las síntesis se describen usando solventes específicos, pero en todos los casos, los solventes alternativos son conocidos por la persona experta en la

técnica. El THF puede sustituirse, por ejemplo, sin limitarse, por DMF, dietil éter, éter metil-terbutílico, dioxano o 2-metilo THF. El acetato de etilo puede sustituirse, por ejemplo, sin limitarse, por acetato de isopropilo, THF, 2-metilo THF, dioxano o éter metil-terbutílico. El diclorometano puede sustituirse, por ejemplo, sin limitarse, por acetato de etilo, acetato de isopropilo, THF, éter metil-terbutílico, 2-metilp THF, dioxano, o heptano. El metanol puede ser sustituido por, por ejemplo, sin limitación, etanol, o THF acuoso. El acetonitrilo puede sustituirse por, por ejemplo, por THF, 2-metilo THF, diclorometano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, éter metil-terbutílico, o tolueno.

Están disponibles muchas referencias generales que proporcionan esquemas sintéticos químicos comúnmente conocidos y condiciones útiles para sintetizar materiales/intermedios usados en la síntesis de los compuestos descritos (ver, p. ej., Smith, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Eight Edition, Wiley-Interscience, 2019; o Furniss, Hannaford, Smith, Tatchelll, Vogel’s Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis, Fifth Edition, New York: Longman, 1989).

Los compuestos como se describen en la presente pueden purificarse mediante cualquiera de los medios conocidos en la técnica, que incluyen medios cromatográficos,

tales como HPLC, cromatografía de capa fina preparativa, cromatografía ultrarrápida en columna y cromatografía de intercambio de iones. Puede usarse cualquier fase estacionaria adecuada, que incluye fases normales e invertidas así como resinas iónicas. Más típicamente, los compuestos descritos se purifican mediante cromatografía en gel de sílice y/o alúmina. Ver, p. ej., Still, Kahn, Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-292, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Edition, ed. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; y Thin Layer Chromatography, ed E. Stahl, Springer-Verlag, New York, 1969.

Durante cualquiera de los procesos para la preparación de los compuestos en cuestión, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos sobre cualquiera de las moléculas en cuestión. Esto puede lograrse por medio de grupos protectores convencionales como se describe en trabajos estándar, tales como J. F. W. McOmie, “Protective Groups in Organic Chemistry,” Plenum Press, London and New York 1973, in T P. G. M. Wuts, “Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis,” Firth edition, Wiley, New York 2014, in “The Peptides”; Volume 3 (editores: E. Gross and J. Meienhofer), Academic Press, London and New York 1981, in “Methoden der organischen Chemie,” Houben-Weyl, 4.sup.th edition, Vol. 15/l, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, in H.-D. Jakubke

and H. Jescheit, “Aminosauren, Peptide, Proteine,” Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, and Basel 1982, y/o Jochen Lehmann, “Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate,” Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Los grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior conveniente usando métodos conocidos de la técnica.

Los compuestos intermedios de los lípidos catiónicos ionizables descritos en la presente pueden elaborarse usando procedimientos familiares para la persona con experiencia en la técnica y como se describe en la presente. Por ejemplo, los compuestos de la Fórmula estructural M2 pueden prepararse de acuerdo con el Esquema M2, Esquema 4A, procedimientos generales (ver los Ejemplos a continuación) y/o procedimientos sintéticos análogos. Un experto en la técnica puede adaptar las secuencias de reacción de los Esquemas M2 y 4A, procedimientos generales y Ejemplos descritos para ajustarse a la molécula diana deseada. Por supuesto, en ciertas situaciones, un experto en la técnica usará diferentes reactivos para afectar a una o más de las etapas individuales o para usar versiones protegidas de ciertos de los sustituyentes. Adicionalmente, un experto en la técnica reconocería que los compuestos de la descripción pueden sintetizarse usando diferentes rutas en conjunto.

Nanopartículas lipídicas (LNP) y LNP dirigidas (tLNP)

En ciertos aspectos, esta descripción proporciona una LNP que comprende un lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2. En algunas modalidades, una LNP comprende un lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2 y un fosfolípido, un esterol, un colípido, un lípido PEGilado, o una combinación de estos. En ciertas modalidades, los PEG-lípidos no son PEG-lípidos funcionalizados. En otras modalidades, los PEG-lípidos son PEG-lípidos funcionalizados. En ciertas modalidades, la LNP comprende al menos un lípido de PEG que está funcionalizado y al menos un lípido de PEG que no está funcionalizado.

En aspectos adicionales, esta descripción proporciona una nanopartícula lipídica dirigida (tLNP) que comprende un lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2. En algunas modalidades, la tLNP mencionada anteriormente puede comprender además uno o más de un fosfolípido, un esterol, un colípido y un PEG-lípido, o una combinación de estos, y un PEG-lípido funcionalizado. Como se usa en la presente, “PEG-lípido funcionalizado” se refiere a un PEG-lípido en el que la entidad PEG se ha derivatizado con un grupo químicamente reactivo que puede usarse para conjugar una entidad de direccionamiento al PEG-lípido. El PEG-lípido funcionalizado puede hacerse reaccionar con una entidad de unión después de formar la LNP, de tal manera que la entidad de unión se conjuga con la entidad PEG del

lípido. La entidad de unión conjugada puede servir así como una entidad de direccionamiento para la tLNP.

En diversas modalidades, una entidad de unión de una LNP (o tLNP) comprende un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, un antígeno, un dominio de unión al ligando de un receptor, o un ligando receptor. En algunas modalidades, la entidad de unión que comprende un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo comprende un anticuerpo completo, un $F(ab)_2$, un Fab, un minicuerpo, un Fv (scFv) monocatenario, un diacuerpo, un dominio VH o un nanocuerpo, tal como un VHH o anticuerpo de dominio único. En algunas modalidades, el ligando receptor es un carbohidrato, por ejemplo, un carbohidrato que comprende unidades terminales de galactosa o N-acetilgalactosamina, que están unidas por el receptor de asialoglicoproteína. Estas entidades de unión constituyen medios para el direccionamiento de la LNP. Algunas modalidades incluyen específicamente una o más de estas entidades de unión. Otras modalidades excluyen específicamente una o más de estas entidades de unión.

Composiciones de LNP y tLNP

La composición de LNP contribuye a la formación de LNP y tLNP estables, encapsulación eficiente de una carga útil, protección de una carga útil de la degradación hasta que se entrega a una célula, y promoción del escape endosomal de una carga útil al citoplasma. Estas funciones

son principalmente independientes de la especificidad de la entidad (o entidades) de unión que sirven para dirigir o sesgan una tLNP a un tipo de célula particular. Las composiciones adicionales de LNP y tLNP se describen generalmente en PCT/US2024/032141, presentado el 31 de mayo de 2024 y titulado *Lipid Nanoparticle Formulations and Compositions,* que se incorpora como referencia para todo lo que enseña sobre el diseño, formación, caracterización, propiedades, y uso de LNP y tLNP.

Las LNP y/o las tLNP pueden incluir los diversos componentes en cantidades suficientes para proporcionar una nanopartícula con una forma, fluidez y bioaceptabilidad deseadas como se describe en la presente. Con respecto a las LNP o las tLNP de esta descripción, en algunas modalidades, la LNP (o tLNP) comprende al menos un lípido catiónico ionizable (p. ej., como se describe en la presente) en una cantidad en el rango de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 % en moles o cualquier subrango unido a un número entero de este, p. ej., en una cantidad de aproximadamente 40 a aproximadamente 65 % en moles, aproximadamente 40 a aproximadamente 60 % en moles o aproximadamente 40 % en moles a aproximadamente 62 % en moles. En algunas modalidades, la LNP o la tLNP comprende aproximadamente 58 % en moles, aproximadamente 60 % en moles, o aproximadamente 62 % en moles de lípido catiónico ionizable. En algunas modalidades, la LNP (o tLNP) comprende un fosfolípido en una cantidad en

el rango de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 % en moles o cualquier subrango unido a un número entero de este, p. ej., en una cantidad de aproximadamente 13 a aproximadamente 30 % en moles. En algunas modalidades, la LNP o tLNP comprende aproximadamente 10 % molar de fosfolípido. En algunas modalidades, la LNP (o tLNP) comprende un esterol en una cantidad en el rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 % en moles o cualquier subrango unido a un número entero de este, p. ej., en una cantidad en el rango de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 % en moles, o aproximadamente 30 a aproximadamente 50 % en moles, o aproximadamente 30 a aproximadamente 45 % en moles. En algunas modalidades, la LNP o tLNP comprende aproximadamente 30,5, 26,5, o 23,5 % molar de esterol. En algunas modalidades, la LNP (o tLNP) comprende al menos un colípido en una cantidad en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 % en moles. En algunas modalidades, una LNP o una tLNP comprende PEG-lípido total en una cantidad en el rango de aproximadamente 1 % en moles a aproximadamente 5 % en moles o cualquier subrango entero x 10^{-1} de este, p. ej., en una cantidad en el rango de aproximadamente 1 % en moles a aproximadamente 2 % en moles de PEG-lípido total. En algunas modalidades, la LNP (o tLNP) comprende al menos un PEG-lípido no funcionalizado en una cantidad de 0 a aproximadamente 5 % en moles o cualquier subrango entero x 10^{-1} unido de este, p. ej., en el rango de cantidad 0 a

aproximadamente 3 % en moles, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 % en moles, o aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 % en moles, o aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 % en moles. En algunas modalidades, la LNP o la tLNP comprende aproximadamente 1,4 % en moles de PEG-lípido no funcionalizado. En algunas modalidades, la LNP o la tLNP comprende al menos un PEG-lípido funcionalizado en una cantidad en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 % en moles o cualquier subrango entero x 10^{-1} unido de este, p. ej., en el rango de aproximadamente 0,1 a 0,3 % en moles. En ciertas modalidades, una LNP o una tLNP comprende aproximadamente 0,1 % en moles, aproximadamente 0,2 % en moles, o aproximadamente 0,3 % en moles de PEG-lípido funcionalizado. En algunas modalidades, la LNP o la tLNP comprende aproximadamente 0,1 % en moles de PEG-lípido funcionalizado. En algunas modalidades, el PEG-lípido funcionalizado se conjuga con una entidad de unión. En ciertos casos, una tLNP es una LNP que comprende además un anticuerpo (por ejemplo, una IgG completa) como la entidad de unión que está presente en una relación anticuerpo:ARNm (p/p) de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,0.

En ciertos aspectos, esta descripción proporciona una LNP o tLNP, en donde la LNP o tLNP comprende aproximadamente 35 % en moles a aproximadamente 65 % en moles de un lípido catiónico ionizable, aproximadamente 0,5 % en moles a aproximadamente 3 % en moles de un PEG-

lípido (que incluyen PEG-lípido no funcionalizado y opcionalmente un PEG-lípido funcionalizado), aproximadamente 7 % en moles a aproximadamente 13 % en moles de un fosfolípido, y aproximadamente 30 % en moles a aproximadamente 50 % en moles de un esterol. En algunas modalidades, una LNP o tLNP comprende una carga útil con una carga negativa neta, por ejemplo, un péptido, un polipéptido, una proteína, una molécula pequeña o una molécula de ácido nucleico, y combinaciones de estos. Una carga útil generalmente está abarcada por o en el interior de una LNP o tLNP. Como se describe en la presente, las dosificaciones siempre se refieren a la cantidad de carga útil que se proporciona. En algunas modalidades, una carga útil comprende una o más especies de molécula de ácido nucleico. Para tLNP encapsulando las dosis de ARNm están típicamente en el rango de 0,05 a 5 mg/kg sin tener en cuenta las especies receptoras. En algunas modalidades, la dosificación está en el rango de 0,1 a 1 mg/kg.

Con respecto a las LNP o tLNP de esta descripción, en algunas modalidades, la relación de lípido total a ácido nucleico es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 50:1 según el peso. En algunas modalidades, la relación de lípido total a ácido nucleico es aproximadamente 10:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 30:1, o aproximadamente 40:1 a aproximadamente 50:1, o 10:1 a 20:1, 30:1, 40:1 o 50:1, o cualquier rango unido por un par de

estas relaciones. La relación de lípido a ácido nucleico también puede informarse como una relación N/P, la relación de grupos amina lipídica cargables positivamente (N = nitrógeno) a grupos fosfato (P) de molécula de ácido nucleico cargados negativamente. En algunas modalidades, la relación N/P es de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, aproximadamente 3 a aproximadamente 7, aproximadamente 3 a aproximadamente 6, aproximadamente 4 a aproximadamente 6, aproximadamente 5 a aproximadamente 6, o aproximadamente 6. En algunas modalidades, la relación N/P es de 3 a 9, 3 a 7, 3 a 6, 4 a 6, 5 a 6, o 6. En ciertas modalidades como se describe en la presente, la LNP (o tLNP) comprende una entidad de unión, en donde la entidad de unión comprende un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo y en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo y la relación de un lípido a ácido nucleico está en el rango de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,0 p/p.

Debido a las limitaciones fisiológicas y de fabricación LNP o tLNP, las partículas con un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm son deseables para usar *in vivo.* Por consiguiente, en algunas modalidades, la LNP o tLNP tiene un diámetro hidrodinámico de 50 a 150 nm y en algunas modalidades el diámetro hidrodinámico es ≤120, ≤110, ≤100, o ≤90 nm. También es deseable la uniformidad del tamaño de partícula siendo aceptable un índice de polidispersidad (PDI) de ≤0,2

(en una escala de 0 a 1). Tanto el diámetro hidrodinámico como el índice de polidispersidad están determinados por la dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). El diámetro de partícula evaluado a partir de microscopía electrónica de criotransmisión (crio-TEM) puede ser menor que el valor determinado por DLS.

Fosfolípidos

Como se describió anteriormente, en diversas modalidades, las LNP y las tLNP incluyen un fosfolípido. Como entendería la persona o un experto en la técnica, los fosfolípidos son moléculas anfifílicas. Debido a la naturaleza anfifílica de los fosfolípidos, se sabe que estas moléculas forman bicapa y al incluirlas en las LNP y las tLNP, como se describe en la presente, pueden proporcionar formación de membranas, estabilidad y rigidez. Como se usa en la presente, los fosfolípidos incluyen un grupo de cabeza hidrófilo que incluye un grupo fosfato funcionalizado, y dos grupos de cola hidrófobos derivados de ácidos grasos. Por ejemplo, en diversas modalidades como se describe en la presente, los fosfolípidos incluyen un grupo fosfato funcionalizado con etanolamina, colina, glicerol, serina, o inositol. Como se describió anteriormente, el fosfolípido incluye dos grupos de cola hidrófobos derivados de ácidos grasos. Estos grupos de cola hidrófobos pueden derivarse de ácidos grasos insaturados o

saturados. Por ejemplo, los grupos de cola hidrófobos pueden derivarse de un ácido graso C_{12}-C_{20}. Con respecto a las LNP o las tLNP de esta descripción, en diversas modalidades, un fosfolípido comprende dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE, por sus siglas en inglés), dimiristoilfosfatidil colina (DMPC, por sus siglas en inglés), distearoilfosfatidilcolina (DSPC, por sus siglas en inglés), dimiristoilfosfatidil glicerol (DMPG, por sus siglas en inglés), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, por sus siglas en inglés), o 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC, por sus siglas en inglés), o una combinación de estos. En diversas modalidades, el fosfolípido es dioleoilfosfatidil etanolamina dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), dimiristoilfosfatidil colina (DMPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidil glicerol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC). En algunas modalidades, el fosfolípido es distearoilfosfatidilcolina (DSPC). Los fosfolípidos pueden contribuir a la formación de una membrana, ya sea monocapa, bicapa o multicapa, que rodea el núcleo de la LNP o tLNP. Adicionalmente, fosfolípidos tales como DSPC, DMPC, DPPC, DAPC imparten estabilidad y rigidez a la estructura de la membrana. Los fosfolípidos, como el DOPE, imparten fusogenicidad. Otros fosfolípidos, tal como DMPG, que alcanza carga negativa a

pH fisiológico, facilitan la modulación de carga. De esta manera, los fosfolípidos constituyen medios para facilitar la formación de membranas, medios para impartir estabilidad y rigidez a la membrana, medios para impartir fusogenicidad, y medios para la modulación de la carga.

En algunas modalidades, una LNP o tLNP tiene aproximadamente 7 % en moles a aproximadamente 13 % en moles de fosfolípido, aproximadamente 7 % en moles a aproximadamente 10 % en moles de fosfolípido, o aproximadamente 10 % en moles a aproximadamente 13 % en moles de fosfolípido. En ciertas modalidades, una LNP tiene aproximadamente 7 % en moles, aproximadamente 10 % en moles, o aproximadamente 13 % en moles de fosfolípido. En ciertas modalidades, el fosfolípido es DSPC. En ciertas modalidades, el fosfolípido es DAPC.

Esteroles

La LNP y tLNP descritas comprenden un esterol. El esterol se refiere a un subgrupo de esteroides que contienen al menos un grupo hidroxilo (OH). Más específicamente, un derivado de gonano con un grupo OH sustituido por una H en la posición 3, o dicho de manera diferente, pero equivalente, un esteroide con un grupo OH sustituido por una H en la posición 3. Los ejemplos de esteroles incluyen, sin limitación, colesterol, ergosterol, β-sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, 20-hidroxicolesterol, 22-

hidroxicolesterol, y lo similar. Con respecto a las LNP o las tLNP de esta descripción, en diversas modalidades, un esterol es colesterol, 20-hidroxicolesterol, 22-hidroxicolesterol, o un fitoesterol. En modalidades adicionales, el fitosterol comprende campesterol, sitosterol o estigmasterol, o combinaciones de estos. En modalidades preferidas, el colesterol no es de origen animal sino que se obtiene por síntesis usando un esterol vegetal como punto de partida. Se ha informado que las LNP que incorporan fitoesteroles de alquilo C-24 (tales como metilo o etilo) proporcionan una transfección génica mejorada. La longitud de la cola de alquilo, la flexibilidad del anillo de esterol y la polaridad relacionada con un grupo C-3 -OH retenido son importantes para obtener una alta eficiencia de transfección. Si bien el β-sitosterol y el estigmasterol tuvieron un buen desempeño, se deben evitar las vitaminas D2, D3 y calcipotriol, (análogos que carecen de cuerpo intacto de colesterol) y betulina, ácido lupeol ursólico y ácido olenólico (que comprende un quinto anillo). Los esteroles sirven para llenar el espacio entre otros lípidos en la LNP o tLNP e influir en la forma de la LNP o tLNP. Los esteroles también controlan la fluidez de las composiciones lipídicas, reduciendo la dependencia de la temperatura. De esta manera, los esteroles como colesterol, 20-hidroxicolesterol, 22-hidroxicolesterol, campesterol, fucosterol, β-sitosterol y estigmasterol constituyen medios para controlar la forma y

fluidez de la LNP o medios de esteroles para aumentar la eficiencia de la transfección. Al diseñar una composición lipídica para una LNP o una tLNP, en algunas modalidades, puede elegirse el contenido de esterol para compensar diferentes cantidades de otros tipos de lípidos, por ejemplo, lípido catiónico ionizable o fosfolípido.

En algunas modalidades, una LNP o tLNP tiene aproximadamente 27 % en moles o aproximadamente 30 % en moles a aproximadamente 50 % en moles de esterol, o aproximadamente 30 % en moles a aproximadamente 38 % en moles de esterol. En ciertas modalidades, una LNP o tLNP tiene aproximadamente 30,5 % en moles, aproximadamente 33,5 % en moles, o aproximadamente 37,5 % en moles de esterol. En ciertas modalidades, una LNP o una tLNP tiene 27 % en moles o 30 % en moles a 50 % en moles de esterol o 30 % en moles a 38 % en moles de esterol. En modalidades adicionales, una LNP o tLNP tiene 30,5 % en moles, 33,5 % en moles o 37,5 % en moles de esterol. En ciertos casos, el esterol es el colesterol. En ciertas modalidades el esterol es una mezcla de esteroles, por ejemplo, colesterol y β-sitosterol o colesterol y 20-hidroxicolesterol. En algunos casos, el componente de esterol es aproximadamente 25 % en moles de 20-hidroxicolesterol y aproximadamente 75 % en moles de colesterol. En algunos casos, el componente de esterol es aproximadamente 25 % en moles de β-sitosterol y aproximadamente 75 % en moles de colesterol. En algunos

casos, el componente de esterol es aproximadamente 50 % en moles de β-sitosterol y aproximadamente 50 % en moles de colesterol. En algunos casos, un componente de esterol es 25 % en moles de 20-hidroxicolesterol y 75 % en moles de colesterol. En casos adicionales, un componente de esterol es 25 % en moles de β-sitosterol y 75 % en moles de colesterol. En aún otros casos, un componente de esterol es 50 % en moles de β-sitosterol y 50 % en moles de colesterol.

Colípidos

Con respecto a las LNP o las tLNP de esta descripción, en algunas modalidades, un colípido está ausente o comprende un lípido ionizable, aniónico o catiónico. Puede usarse un colípido para ajustar diversas propiedades de una LNP o una tLNP, tales como carga superficial, fluidez, rigidez, tamaño, estabilidad y propiedades similares. En algunas modalidades, un colípido es un lípido ionizable, tal como hemisuccinato de colesterol (CHEMS, por sus siglas en inglés) o un lípido ionizable de esta descripción. En algunas modalidades, un colípido es un lípido cargado, tal como un grupo de cabeza de amonio cuaternario que contiene lípido. En algunas modalidades, un grupo de cabeza de amonio cuaternario que contiene lípidos comprende 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP), N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) o 3β-(N-(N',N'-

dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol (DC-Chol), o combinaciones de estos. En ciertas modalidades, estos compuestos son una sal de cloruro, bromuro, mesilato o tosilato. Como se describió anteriormente, cuando el grupo de cabeza de amonio cuaternario que contiene lípidos se incluye en las LNP o las tLNP, se ha observado toxicidad hiperaguda fatal en animales de laboratorio. En consecuencia, cuando el colípido es un grupo de cabeza de amonio cuaternario que contiene lípido, el grupo de cabeza de amonio cuaternario que contiene lípido está presente este no constituye más de 50 % en moles del lípido catiónico total, por ejemplo, de 5 a 50 % del lípido catiónico total. A manera de ilustración, si una LNP o tLNP tuviera un contenido lipídico catiónico de 70 % en moles y 5 a 50 % en moles del lípido catiónico total como lípido de amonio cuaternario, la LNP o la tLNP tendría de 3,5 % en moles de lípido de amonio cuaternario y 66,5 % en moles de lípido catiónico ionizable a 35 % en moles cada uno de lípido de amonio cuaternario y lípido catiónico ionizable.

Cuando los lípidos ionizables de la Fórmula M2 descritos tienen una pKa medido entre 6 y 7, pueden contribuir con una actividad sustancial de liberación endosómica a una LNP o una tLNP que contiene el lípido ionizable. Los lípidos ionizables más ácidos o básicos de la Fórmula M2 pueden contribuir con carga superficial y así servir como colípido como se describió inmediatamente

anteriormente. En tales casos, puede ser ventajoso incorporar otro lípido con actividad fusogénica en una LNP o tLNP de esta descripción. Se sabe que la carga superficial influye en el tropismo tisular de las LNP o las tLNP; por ejemplo, las LNP o las tLNP cargadas positivamente han mostrado un tropismo para el bazo y el pulmón.

Peg-Lípidos

Con respecto a una LNP o una tLNP de esta descripción, un PEG-lípido es un lípido conjugado con un polietilenglicol (PEG). En algunas modalidades como se describe en la presente, el PEG-lípido es un lípido C_{14}-C_{20} conjugado con un PEG. Por ejemplo, en diversas modalidades como se describe en la presente, el PEG-lípido es un lípido C_{14}-C_{20} conjugado con un PEG, o un lípido C_{14}-C_{18} conjugado con un PEG, o un lípido C_{14}-C_{16} conjugado con un PEG. En ciertas modalidades como se describe en la presente, el PEG-lípido es un ácido graso conjugado con un PEG. El ácido graso del PEG-lípido puede tener una variedad de longitudes de cadena. Para cada uno, en algunas modalidades, el PEG-lípido es un ácido graso conjugado con PEG, en donde la longitud de la cadena de ácido graso está en el rango de C_{14}-C_{20} (p. ej., en el rango de C_{14}-C_{18}, o C_{14}-C_{16}). Los PEG-lípidos con longitudes de cadena de ácidos grasos menores que C_{14} se pierden demasiado rápidamente de la LNP de tLNP,

mientras que aquellos con longitudes de cadena mayores que C_{20} son propensos a dificultades con la formulación.

PEG se puede hacer en una amplia gama de tamaños. En ciertas modalidades, el PEG de la LNP y tLNP descritas es PEG-1000 a PEG-5000. Es de entenderse que las preparaciones de polietileno de estos tamaños son polidispersas y que el tamaño nominal indica un peso molecular promedio aproximado de la distribución. Tomando el peso molecular de una unidad repetitiva individual de (OCH2CH2)n como 44, una molécula de PEG con n=22 tendría un peso molecular de 986, con n=45 un peso molecular de 1998, y con n=113 un peso molecular de 4990. $n \approx 22$ a 113 se usa para representar PEG-lípidos que incorporan entidades PEG en el rango de PEG-1000 a PEG-5000 tal como PEG-1000, PEG-1500, PEG-2000, PEG-2500, PEG-3000, PEG-3500, PEG-4000, PEG-4500, y PEG-5000, aunque algunas moléculas de preparaciones en los límites de peso molecular promedio tendrán un n fuera de ese rango. Para preparaciones individuales, $n \approx 22$ se usa para representar PEG-lípidos que incorporan entidades PEG de PEG-1000, $n \approx 45$ se usa para representar PEG-lípidos que incorporan entidades PEG de PEG-2000, $n \approx 67$ se usa para representar PEG-lípidos que incorporan entidades PEG de PEG-3000, $n \approx 90$ se usa para representar PEG-lípidos que incorporan entidades PEG de PEG-4000, $n \approx 113$ se usa para representar PEG G-lípidos que incorporan entidades PEG de PEG-5000. Algunas modalidades

incorporan entidades PEG en un rango limitado por cualquier par de los valores anteriores de n o peso molecular promedio. En algunas modalidades del PEG-lípido, un PEG es de 500-5000 o 1000-5000 Da de peso molecular (MW). Por ejemplo, en algunas modalidades, el PEG del PEG-lípido tiene un peso molecular en el rango de 1500-5000 Da o 2000-5000 Da. En algunas modalidades como se describe en la presente, el PEG-lípido tiene un peso molecular en el rango de 500-4000 Da, o 500-3000 Da, o 1000-4000 Da, o 1000-3000, o 1000-2500, o 1500-4000, o 1500-3000, o 1500-2500 Da. En algunas modalidades, la entidad PEG es PEG-500, PEG-1000, PEG-1500, PEG-2000, PEG-2500, PEG-3000, PEG-3500, PEG-4000, PEG-4500, y PEG-5000. En algunas modalidades, la entidad PEG tiene un MW de 2000 Da (en algún momento abreviado como PEG(2k)). Algunas modalidades incorporan entidades PEG de PEG-1000, PEG-2000 o PEG-5000. En algunos casos, la entidad PEG es PEG-2000. Ciertas modalidades comprenden un DSG-PEG, por ejemplo, DSG-PEG-2000. Ciertas modalidades comprenden un DSPE-PEG, por ejemplo, DSPE-PEG-2000. Ciertas modalidades comprenden tanto DSG-PEG-2000 y/o DSPE-PEG2000.

Los PEG-lípidos comunes se dividen en dos clases diacil gliceroles y diacilfosfolípidos. Los ejemplos de PEG-lípidos diacilglicerol incluyen DMG-PEG (1,2-dimiristoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol), DPG-PEG (1,2-dipalmitoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol), DSG-PEG (1,2-diestearoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol) y

DOG-PEG (1,2-dioleoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol). Los ejemplos de diacilfosfolípidos incluyen DMPE-PEG (1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol), DPPE-PEG (1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol), DSPE-PEG (1,2-diestearoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol) y DOPE-PEG (1,2-dioleoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol).

En algunas modalidades, el PEG-lípido MW2000 (p. ej., un PEG-lípido que comprende un PEG de un peso molecular de 2000 Da) que comprende DMG-PEG2000 (1,2-dimiristoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DPG-PEG2000 (1,2-dipalmitoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DSG-PEG2000 (1,2-diestearoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DOG-PEG2000 (1,2-dioleoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DMPE-PEG200 (1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DPPE-PEG2000 (1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DSPE-PEG2000 (1,2-diestearoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DOPE-PEG2000 (1,2-dioleoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000) o combinaciones de estos. En algunas modalidades, la unidad PEG tiene un MW de 2000 Da. En algunas modalidades, el PEG-lípido MW2000 comprende DMrG-PEG2000 (1,2-diestearoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DPrG-PEG2000 (1,2-

dipalmitoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DSrG-PEG2000 (1,2-distearoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DorG-PEG2000 (1,2-dioleoil-glicero-3-metoxipolietileno-rac-glicol-2000), DMPEr-PEG200 (1,2-diestearoil-rac-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DPPEr-PEG2000 (1,2-dipalmitoil-rac-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DSPEr-PEG2000 (1,2-distearoil-rac-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DOPEr-PEG2000 (1,2-dioleoil-rac-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), o combinaciones de estos. El glicerol en estos lípidos es quiral. De esta manera, en algunas modalidades, el PEG-lípido es racémico. Alternativamente, pueden emplearse antípodas ópticamente puras de la entidad glicerol, es decir, la entidad de glicerol es homoquiral. Como se usa en la presente con respecto a las entidades de glicerol, ópticamente puro significa ≥ 95 % de un solo enantiómero (D o L). En algunas modalidades, el exceso enantiomérico es ≥ 98 %. En algunas modalidades, el exceso enantiomérico es ≥ 99 %. En la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/362.502, presentada el 5 de abril de 2022, y PCT/US2023/017648 presentada el 5 de abril de 2023 (WO 2023/196445A1), ambas tituladas *PEG-Lipids and Lipid Nanoparticles*, que se incorporan como referencia en su totalidad, se describen PEG-lípidos adicionales, que

incluyen PEG-lípidos aquirales basados en un supercóntigo de dihidroxiacetona simétrico, un 2-(hidroximetil)butano-1,4-diol simétrico, o un supercóntigo de glicerol simétrico.

Los ejemplos de PEG-lípidos anteriores se presentan como metoxipolietilenglicoles, pero el término no necesita ser necesariamente metoxilo. Con respecto a cualquiera de los PEG-lípidos que no han sido funcionalizados, en modalidades alternativas, la entidad PEG de los lípidos PEG puede terminar con un grupo metoxilo, un benciloxilo, un 4-metoxibenciloxilo, o un hidroxilo (es decir, un alcohol). El hidroxilo terminal facilita la funcionalización. Los grupos metoxilo, benciloxilo y 4-metoxibenciloxilo se proporcionan ventajosamente para PEG-lípido que se usará como un componente de la LNP sin funcionalización. No obstante, las cuatro de estas alternativas son útiles como el componente PEG-lípido (no funcionalizado) de las LNP. El grupo 4-metoxibenciloxilo, a menudo usado como grupo protector durante la síntesis del PEG-lípido, se elimina fácilmente para generar el grupo hidroxilo correspondiente. Por lo tanto, el grupo 4-metoxibenciloxilo ofrece una trayectoria conveniente hacia el alcohol cuando no se sintetiza directamente. El alcohol es útil para ser funcionalizado, previo a la incorporación del PEG-lípido en una LNP, de manera que una entidad de unión puede conjugarse con él como una entidad de

direccionamiento para la LNP (convirtiéndola en una tLNP). Como se usa en la presente, el extremo de la entidad PEG, y construcciones similares, se refiere al extremo de la entidad PEG que no está unida al lípido.

Una entidad PEG proporciona una superficie hidrófila sobre la LNP, inhibiendo la agregación o fusión de la LNP, contribuyendo por lo tanto a su estabilidad y reduciendo la polidispersidad, *es decir*, reduciendo la heterogeneidad de una dispersión de las LNP. Adicionalmente, una entidad PEG puede impedir la unión por la LNP, que incluye la unión a proteínas plasmáticas. Estas proteínas plasmáticas incluyen apoE que se entiende que media la captación de LNP por el hígado de tal manera que la inhibición de la unión puede conducir a un aumento en la proporción de LNP, que llega a otros tejidos. Estas proteínas plasmáticas también incluyen opsoninas por lo que la inhibición de la unión reduce el reconocimiento por parte del sistema reticuloendotelial. La entidad PEG también puede funcionalizarse para servir como punto de acoplamiento para una entidad de direccionamiento. La conjugación de una entidad de unión celular o tisular específica con la entidad PEG permite que una tLNP evite el hígado y se una a su tejido diana o tipo celular, aumentando en gran medida la proporción de LNP que alcanza el tejido o tipo celular dirigido. Por lo tanto, el PEG-lípido puede servir como medio para inhibir la unión de

LNP, y el PEG-lípido conjugado con una entidad de unión puede servir como medio para el direccionamiento de LNP.

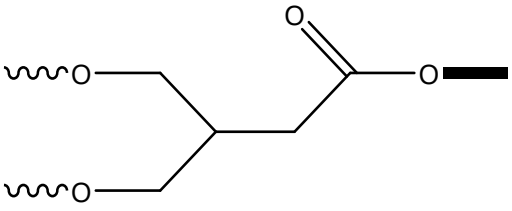
Como se usa en la presente, el término “PEG-lípido funcionalizado” y construcciones similares se refieren generalmente tanto a las entidades no reaccionadas como a las que reaccionaron. La composición lipídica de una LNP puede describirse con referencia a la especie reactiva incluso después de que haya tenido lugar la conjugación (formando una tLNP). Por ejemplo, una composición lipídica puede describirse como que comprende DSPE-PEG-maleimida y puede decirse que comprende además una entidad de unión sin señalar explícitamente que tras la reacción para formar el conjugado, la maleimida se habrá convertido en una succinimida (o succinimida hidrolizada). De igual manera, si el grupo reactivo es bromomaleimida, después de la conjugación será maleimida. Estas diferencias de nomenclatura química para las especies no reaccionadas y que reaccionan deben entenderse implícitamente incluso cuando no se establecen explícitamente. Ciertas modalidades comprenden un DSG-PEG, por ejemplo, DSG-PEG-2000. Ciertas modalidades comprenden un DSPE-PEG funcionalizado, por ejemplo, DSPE-PEG-2000 funcionalizado. Ciertas modalidades comprenden tanto DSG-PEG-2000 como DSPE-PEG-2000 funcionalizado. En algunos casos, el PEG-lípido funcionalizado se funcionaliza con una entidad maleimida, por ejemplo, DSPE-PEG-2000-MAL.

En ciertos aspectos, la LNP comprende uno o más PEG-lípidos y/o PEG-lípidos funcionalizados; cuando tanto un PEG-lípido funcionalizado como no funcionalizado, el PEG-lípido presente puede ser el mismo o diferente; y uno o más lípidos catiónicos ionizables; la LNP puede comprender además un fosfolípido, un esterol, un colípido, o cualquier combinación de estos. El término “PEG-lípido funcionalizado” se refiere a un PEG-lípido en el que la entidad PEG se ha derivatizado con un grupo químicamente reactivo que puede usarse para conjugar una entidad de direccionamiento al PEG-lípido. El PEG-lípido funcionalizado se puede hacer reaccionar con una entidad de unión de manera que la entidad de unión se conjuga con la entidad PEG del lípido. La entidad de unión conjugada puede servir así como una entidad de direccionamiento para que la LNP constituya una tLNP. En algunas modalidades, la entidad de unión se conjuga con el PEG-lípido funcionalizado después de que se forme una LNP que comprende el PEG-lípido funcionalizado. En otras modalidades, la entidad de unión se conjuga con el PEG-lípido y después el conjugado se inserta en una LNP previamente formada.

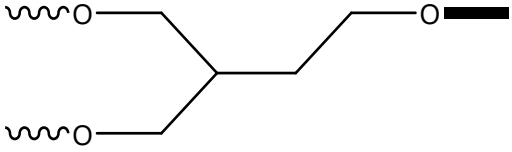
En ciertas modalidades, la LNP es una tLNP que comprende uno o más PEG-lípidos funcionalizados que se han conjugado con una entidad de unión. En ciertas modalidades, la tLNP también comprende PEG-lípidos no funcionalizados o conjugados con una entidad de unión. En algunas

modalidades, la funcionalización es una maleimida. En algunas modalidades, la funcionalización es una entidad bromomaleimida o bromomaleimida amida, alquinilamida o alquinilimida en el extremo hidroxilo terminal de la entidad PEG. En algunas modalidades, la entidad de unión comprende un anticuerpo o porción de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, la entidad de unión es un polipéptido que comprende un dominio de unión y una extensión N- o C-terminal que comprende un grupo tiol accesible. En algunas modalidades, el enlace de conjugación comprende un producto de reacción de un tiol en la entidad de unión con un PEG-lípido funcionalizado. En algunas modalidades la funcionalización es una maleimida, azida, alquino, dibenzociclooctino (DBCO), bromomaleimida o bromomaleimida amida, alquinilamida, o alquinilimida. En algunas modalidades, la entidad de unión comprende un anticuerpo o porción de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, la entidad de unión es un polipéptido que comprende un dominio de unión y una extensión N- o C-terminal que comprende un grupo tiol accesible.

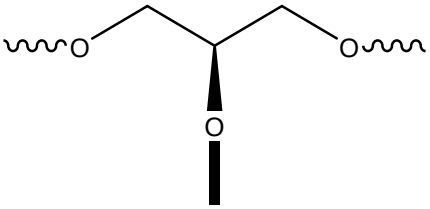
En ciertas modalidades, el PEG-lípido y/o PEG-lípido funcionalizado comprende un supercóntigo seleccionado de la Fórmula S1, Fórmula S2, Fórmula S3 o Fórmula S4:



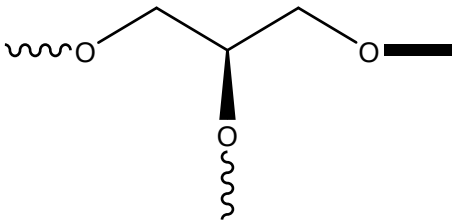
Fórmula S1



Fórmula S2



Fórmula S3



Fórmula S4

en donde  representa los puntos de conexión éster con un ácido graso, y  representa el punto de formación de éster (S1) o éter (S2, S3 y S4) con la entidad PEG. En algunas modalidades, los ésteres de ácidos grasos son ácidos grasos alquilo de cadena recta C_{14}-C_{20}. En algunas modalidades, la entidad PEG está funcionalizada y los ésteres de ácidos grasos son ácidos grasos alquilo de cadena recta C_{16}-C_{20}. Por ejemplo, el ácido graso alquilo de cadena recta es C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, o C_{20}. En algunas modalidades, los ésteres de ácidos grasos son ácidos grasos alquílicos de cadena ramificada simétricos C_{14}-C_{20}. Por ejemplo, el ácido graso alquilo de cadena ramificada es C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, o C_{20}. Por simétrico se entiende que cada rama alquilo tiene el mismo número de carbonos. En

algunas modalidades, la rama está en la posición 3, 4, 5, 6 o 7 del éster de ácido graso. La síntesis y uso de PEG-lípidos construidos sobre supercóntigos S1-S4 se da a conocer en WO2023/196445A1 que se incorpora como referencia por todo lo que enseña sobre los PEG-lípidos y su uso.

Algunas modalidades de los lípidos catiónicos ionizables descritos tienen grupos de cabeza con pequeñas (<250 Da) entidades PEG. Estos lípidos no son lo que se entiende por el término PEG-lípido como se usa en la presente. Esta pequeñas entidades PEG son generalmente demasiado pequeños para impedir la unión en un grado similar al de las entidades PEG más grandes de los PEG-lípidos descritos anteriormente, aunque afectarán la lipofilicidad del lípido catiónico ionizable. Además, se entiende que los lípidos PEG-se encuentran principalmente en una lámina orientada al exterior, mientras que gran parte del lípido catiónico ionizable se encuentra en el interior de la LNP.

En ciertas modalidades, un PEG-lípido funcionalizado de una LNP (o tLNP) comprende una o más colas de ácidos grasos, cada una que no es más corta que C_{16} ni más larga que C_{20} para ácidos grasos de cadena recta. Para los ácidos grasos de cadena ramificada, son aceptables colas no más cortas que los ácidos grasos C_{14} ni más largas que C_{20}. En algunas modalidades, las colas de ácidos grasos son C_{16}. En algunas modalidades, las colas de ácidos grasos son C_{18}. En algunas modalidades, el PEG-lípido

funcionalizado comprende un lípido dipalmitoílo. En algunas modalidades, el PEG-lípido funcionalizado comprende un lípido diestearoilo. Las colas de ácidos grasos sirven como medio para anclar el PEG-lípido en la tLNP para reducir o eliminar la desintegración del PEG-lípido de la tLNP. Esta es una propiedad útil para el PEG-lípido esté o no funcionalizado pero tiene mayor significación para el PEG-lípido funcionalizado ya que tendrá una entidad dirigida acoplada a él y la función de direccionamiento podría verse afectada si el PEG-lípido (con la entidad de unión conjugada) se desintegra de la tLNP.

En algunas modalidades, una LNP o tLNP comprende aproximadamente 0,5 % en moles a aproximadamente 3 % en moles o 0,5 % en moles a PEG-lípido 3 % en moles que comprende PEG-lípido funcionalizado y no funcionalizado. En ciertas modalidades, una LNP o tLNP comprende DSG-PEG. En otras modalidades, una LNP o tLNP comprende DMG-PEG o DPG-PEG. En ciertas modalidades, una LNP o tLNP comprende DSPE-PEG. En algunas modalidades, los PEG-lípidos funcionalizados y no funcionalizados no son el mismo PEG-lípido, por ejemplo, el PEG-lípido no funcionalizado puede ser un diacilglicerol y el PEG-lípido funcionalizado un diacilfosfolípido. Las tLNP con tales mezclas tienen expresión reducida en el hígado, posiblemente debido a una captación reducida. En ciertas modalidades, el PEG-lípido funcionalizado es DSPE-PEG y el PEG-lípido no funcionalizado es DSG-PEG. En algunas

modalidades, una LNP o tLNP comprende aproximadamente 0,4 % en moles a aproximadamente 2,9 % en moles o aproximadamente 0,9 % en moles a aproximadamente 1,4 % en moles de PEG-lípido no funcionalizado. En ciertas modalidades, una LNP o tLNP comprende aproximadamente 1,4 % en moles o 1,4 % en moles de lípido PEG no funcionalizado. En algunas modalidades, una LNP o tLNP comprende aproximadamente 0,1 % en moles a aproximadamente 0,3 % en moles o 0,1 % en moles a 0,3 % en moles de lípido funcionalizado. En algunos casos, el lípido funcionalizado es DSPE-PEG. En ciertos casos, una LNP o tLNP comprende aproximadamente 0,1 % en moles, aproximadamente 0,2 % en moles, o aproximadamente 0,3 % en moles de DSPE-PEG. En ciertos casos, una LNP o tLNP comprende 0,1 % en moles, 0,2 % en % en moles o 0,3 % en moles de DSPE-PEG. En ciertos casos, el PEG-lípido funcionalizado se conjuga con una entidad de unión. Como se usa en la presente, la frase “se conjuga a” y construcciones similares están destinadas a transmitir un estado de ser, es decir, una estructura, y no un proceso, a menos que el contexto dicte lo contrario.

Conjugación

Cualquier química adecuada puede usarse para conjugar la entidad de unión al PEG del PEG-lípido, que incluye químicas de maleimida (ver Parhiz et al., 2018, Journal of Controlled Release 291:106-115) y clic (ver Kolb et al., 2001, Angewandte Chemie International Edition

40(11):2004–2021; y Evans, 2007, Australian Journal of Chemistry 60(6):384–395). Los reactivos para tales reacciones incluyen lípido-PEG-maleimida, lípido-PEG-cisteína, lípido-PEG-alquino, lípido-PEG-dibenzociclooctino (DBCO) y lípido-PEG-azida. Otras reacciones de conjugación hacen uso de reacciones lípido-PEG-bromo maleimida, lípido-PEG-amida alquilnoica, imida PEG-alquinoica y lípido-PEG-alquino, como se describe en la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/362.502, presentada el 5 de abril de 2022, y PCT/US2023/017648 presentada el 5 de abril de 2023 (WO 2023/196445A1), ambas tituladas *PEG-Lipids and Lipid Nanoparticles*, que se incorporan como referencia en su totalidad. En el lado de la entidad de unión de la reacción puede usarse un sulfhidrilo de cisteína existente, o la proteína derivatizada añadiendo un ácido carboxílico que contiene azufre, por ejemplo, al amino épsilon de una lisina para hacer reaccionar con una maleimida, bromomaleimida, amida alquilnoica, o imida alquinoica. En ciertas modalidades, para modificar un amino épsilon de una entidad de unión lisina para que reaccione con un PEG-lípido funcionalizado con maleimida, la entidad de unión (p. ej., un anticuerpo) puede hacerse reaccionar con S-acetiltioacetato de N-succinimidil (SATA). A continuación, se desprotege SATA, por ejemplo, usando hidroxilamina 0,5 M seguida de la eliminación de los componentes sin reaccionar mediante columnas G-25 Sephadex Quick Spin Protein (Roche

Applied Science, Indianápolis, IN). El grupo sulfhidrilo reactivo en la entidad de unión se conjuga entonces con las entidades de maleimida en las LNP de la descripción usando química de conjugación de tioéter. Alternativamente, puede añadirse un alquino a un sulfhidrilo o un amino épsilon de una lisina para participar en una reacción química de clic.

La purificación puede realizarse usando columnas de filtración en gel Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich). Las tLNP (LNP conjugadas con un anticuerpo de direccionamiento) pueden almacenarse congeladas, por ejemplo, a -70 o -80 °C hasta que sea necesario. Otros han conjugado el anticuerpo contra el PEG-lípido funcionalizado libre y después han incorporado el lípido conjugado en la LNP preformada. No obstante, se encontró que el presente procedimiento es más controlable y produce resultados más consistentes.

También existen varios enfoques para la conjugación específica del sitio. Particularmente pero no exclusivamente adecuadas para formas truncadas de anticuerpo, se usan comúnmente extensiones C-terminales de secuencias nativas o artificiales que contienen un residuo de cisteína particularmente accesible. La reducción parcial de los enlaces de cisteína en un anticuerpo, por ejemplo, con tris(2-carboxi)fosfina (TCEP), también puede generar grupos tiol para la conjugación que pueden ser específicos del sitio bajo condiciones definidas con un fragmento de anticuerpo susceptible. Alternativamente, la extensión C-terminal puede

contener una secuencia de sustrato de sortasa A, LPXTG (sec. con núm. de ident.: 6) que después puede ser funcionalizada en una reacción catalizada por sortasa A y conjugada con el PEG-lípido, que incluye reacciones químicas clic (ver, por ejemplo, Moliner-Morro et al., Biomolecules 10 (12):1661, 2020 que se incorpora como referencia en la presente por todo lo que enseña sobre conjugaciones de anticuerpos mediadas por la reacción de sortasa A y/o química clic). El uso de la química clic para la conjugación de una entidad de direccionamiento, tal como diversas formas de anticuerpo, se da a conocer, por ejemplo, en WO2024/102.770 que se incorpora como referencia en su totalidad por todo lo que enseña sobre la conjugación de las entidades de direccionamiento a LNP que no es inconsistente con esta descripción.

Para el anticuerpo completo y otras formas que comprenden una región Fc, la conjugación específica del sitio con cualquiera (o ambos) de dos residuos de lisina específicos (Lys248 y Lys288) puede lograrse sin ningún cambio o extensión de la secuencia de anticuerpo nativo mediante el uso de uno de los reactivos AJICAP® (ver, por ejemplo, Matsuda *et al.*, Mol. Pharmaceutics 18:4058, 2021 and Fujii *et al.*, Bioconjugate Chem. 34:728, 2023, todos los cuales se incorporan como referencia en la presente por todo lo que enseñan acerca de la conjugación de anticuerpos con reactivos AJICAP). Los reactivos AJICAP son péptidos de afinidad modificados que se unen a loci específicos en la Fc

y reaccionan con un residuo de lisina adyacente para formar un conjugado de péptido de afinidad del anticuerpo. A continuación, el péptido se escinde con base para dejar un residuo de lisina funcionalizado con tiol que después puede experimentar conjugación a través de reacciones de maleimida o haloamida, por ejemplo). También es posible la funcionalización con azida o dibenzociclooctino (DBCO) para la conjugación por química clic. Esta y otras tecnologías similares se describen adicionalmente en US 2020/0190165 (correspondiente a WO 2018/199337), US 2021/0139549 (correspondiente a WO 2019/240287) y US 2023/0248842 (correspondiente a WO 2020/184944) que se incorporan como referencia en su totalidad por todo lo que enseñan sobre tales péptidos de afinidad modificados y su uso.

Por consiguiente, en algunas modalidades, la entidad de unión se conjuga con la entidad PEG del PEG-lípido a través de un residuo de lisina modificado con tiol. En algunas modalidades, la conjugación es a través de un residuo de cisteína en una secuencia de anticuerpo nativa o añadida. En algunas modalidades, un residuo de cisteína particular se hace reaccionar preferente o exclusivamente, por ejemplo, un residuo de cisteína en una región bisagra de anticuerpo. En otros casos, un entidad de unión con un residuo de cisteína conjugable en una región bisagra de anticuerpo es un Fab' o fragmento similar. En otras modalidades, la conjugación es a través de una secuencia de sustrato de sortasa A. En aún

otras modalidades, la conjugación es a través de un residuo de lisina específico (Lys248 o Lys288) en la región Fc.

Entidades vinculantes

La tLNP de los diversos aspectos descritos comprende una entidad de unión, tal como un anticuerpo o dominio de unión al antígeno de este o un ligando de receptor de superficie celular. Como se usa en la presente, una “entidad de unión” o “entidad de direccionamiento” se refiere a una proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido, carbohidrato, ácido nucleico, o combinaciones de estos capaces de unirse específicamente a una diana o múltiples dianas. Un dominio de unión incluye cualquier compañero de unión natural, sintético, semisintético o producido recombinantemente para una molécula biológica u otra diana de interés. Las entidades de unión ilustrativas de esta descripción incluyen un anticuerpo, un Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, rIgG, scFv, hcAb (anticuerpo de cadena pesada), un anticuerpo de dominio único, VHH, VNAR, sdAb, nanocuerpo, ectodominio receptor o porciones de unión a ligando de este, o ligando (p. ej., citocinas, quimiocinas). Un “Fab” (fragmento de unión al antígeno) es la parte de un anticuerpo que se une a antígenos e incluye la región variable y CH1 de la cadena pesada enlazada a la cadena ligera a través de un enlace disulfuro entre cadenas. En otras modalidades, una entidad de unión comprende un dominio de unión a ligando de

un receptor o un ligando de receptor. En algunas modalidades, una entidad de unión puede tener más de una especificidad que incluye, por ejemplo, aglutinantes biespecíficos o multiespecíficos. Se conoce una variedad de ensayos para identificar las entidades de unión de esta descripción que se unen específicamente a una diana particular, que incluye Western blot, ELISA, interferometría de bicapa y resonancia de plasmón superficial. Una entidad de unión, tal como una entidad de unión que comprende dominios variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina (*p. ej.*, scFv), puede incorporarse en una variedad de supercóntigos o estructuras de proteínas como se describe en la presente, tales como un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este, una proteína de fusión scFv-Fc, o una proteína de fusión que comprende dos o más de tales dominios de unión a inmunoglobulina.

La capacidad fundamental de la tLNP para entregar una carga útil al citoplasma de una célula es agnóstica con respecto a, y no depende de, una especificidad de unión particular. Por supuesto, una entidad de unión es un determinante de a qué células se entrega una carga útil. Hay muchos anticuerpos conocidos con especificidad para uno u otro marcador de superficie celular asociados con un tipo o tipos celulares particulares que podrían usarse como la diana de la entidad de unión en una tLNP descrita y hay varias fuentes que han compilado tal información. Una excelente

fuente de información sobre anticuerpos para los que se ha propuesto o recomendado un Nombre Internacional No Exclusivo (INN) es Wilkinson & Hale, *MAbs* 14(1):2123299, 2022, que incluye sus Tablas Suplementarias, que se incorpora en la presente como referencia por todo lo que enseña sobre anticuerpos individuales y los diversos formatos de anticuerpos que se pueden construir. US11.326.182 y especialmente su Tabla 9 Anticuerpos contra el cáncer, la inflamación y el sistema inmunitario, es una fuente de secuencia y otra información para una amplia gama de anticuerpos que incluyen muchos que no tienen un INN y se incorpora en la presente como referencia por todo lo que enseña sobre anticuerpos individuales. La información de secuencia no siempre está disponible fácilmente para los anticuerpos mencionados en la técnica, incluso cuando están disponibles comercialmente. Esto no es necesariamente un impedimento para su uso. Cuando el anticuerpo o una línea celular está disponible comercialmente u obtenible a partir de su creador, se puede usar como la entidad de unión de tLNP sin necesidad de información de secuencia. Incluso cuando se necesita información de secuencia, está dentro de las capacidades del experto en la técnica secuenciar la proteína del anticuerpo (o hacer que la realice un laboratorio contratado) de tal manera que la región variable del anticuerpo pueda incorporarse en un scFv, un diacuerpo, un minicuerpo, o algún otro formato de anticuerpo, o ser

humanizada. Al elegir entre los anticuerpos disponibles en la técnica para el desarrollo de un agente que se utilizará en seres humanos, se prefiere un anticuerpo humano a un anticuerpo humanizado a un anticuerpo no humano, siendo los demás factores iguales. Otros factores pueden incluir estabilidad y facilidad de producción del anticuerpo, afinidad del anticuerpo, la falta de unión al antígeno extracelulares y de superficie celular no diana, y reactividad cruzada para el antígeno afín en especies modelo que se usan en el desarrollo de productos.

En algunas modalidades, una entidad de unión puede ser un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este; un antígeno; un dominio de unión al ligando de un receptor; o un ligando de receptor. En algunas modalidades, una entidad de unión puede tener más de una especificidad que incluye, por ejemplo, aglutinantes biespecíficos o multiespecíficos.

En algunas modalidades, una entidad de unión comprende un anticuerpo o una porción de unión al antígeno de este. Como se usa en la presente, “anticuerpo” se refiere a una proteína que comprende un dominio de inmunoglobulina que tiene regiones hipervariables que determinan la especificidad con la que el anticuerpo se une al antígeno, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). Por lo tanto, el término anticuerpo puede referirse a anticuerpos intactos (*es decir*, completos), así como a fragmentos de anticuerpos y construcciones que comprenden una

porción de unión al antígeno de un anticuerpo completo. Si bien el anticuerpo natural canónico tiene un par de cadenas pesadas y ligeras, los camélidos (camellos, alpacas, llamas, etc.) producen anticuerpos tanto con la estructura canónica como anticuerpos que comprenden únicamente cadenas pesadas. La región variable del anticuerpo camélico solo de cadena pesada tiene una estructura distinta con una CDR3 alargada denominada VHH o, cuando se produce como un fragmento, un nanocuerpo. Los fragmentos de unión al antígeno y construcciones de anticuerpos incluyen $F(ab')_2$, F(ab'), F(ab), minicuerpos, Fv, Fv monocatenario (scFv), diacuerpos, y VH. Tales elementos pueden combinarse para producir reactivos bi- y multiespecíficos, que incluyen diversos acopladores de células inmunitarias, tales como BiTE (acopladores biespecíficos de células T). El término "anticuerpo monoclonal" surgió de la tecnología de hibridoma pero ahora se usa para referirse a cualquier especie molecular singular de anticuerpo independientemente de cómo se originó o se produjo. Los anticuerpos se pueden obtener mediante inmunización, selección de una genoteca sin exposición previa o inmunizada (por ejemplo, mediante presentación en fagos), alteración de una secuencia codificante de anticuerpos aislada, o cualquier combinación de estas. En la técnica se conocen numerosos anticuerpos que pueden usarse como entidades de unión. Se ha propuesto o recomendado una excelente fuente de información sobre

anticuerpos para un Nombre Internacional No Exclusivo (INN), que incluye información de secuencia, es Wilkinson & Hale, 2022, *MAbs* 14(1):2123299, que incluye sus Tablas Suplementarias, que se incorpora en la presente como referencia por todo lo que enseña sobre anticuerpos individuales y los diversos formatos de anticuerpos que se pueden construir. Patente de los EE. UU. núm. 11.326.182 y especialmente su Tabla 9 titulada Anticuerpos contra el cáncer, la inflamación y el sistema inmunitario, es una fuente de secuencia y otra información para una amplia gama de anticuerpos que incluyen muchos que no tienen un INN y se incorpora en la presente como referencia para todo lo que enseña sobre anticuerpos individuales y los antígenos a lo que se unen. WO2024040195A1 también es una fuente de secuencia y otra información para un amplio rango de anticuerpos con especificidad para diversos antígenos de superficie celular de células del sistema inmunitario y células cancerosas y se incorpora en la presente como referencia para todo lo que enseña sobre anticuerpos individuales y los antígenos a los que se unen.

Un anticuerpo u otra entidad de unión (o una proteína de fusión de este) “se une específicamente” a una diana si se une a la diana con una afinidad o Ka (*es decir*, una constante de asociación de equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de 1/Molar o 1/M) igual o mayor que 10^5 M^{-1}, mientras que no se une significativamente

a otros componentes presentes en una muestra de prueba. Los dominios de unión (o proteínas de fusión de los mismos) pueden clasificarse como dominios de unión de “alta afinidad” (o proteínas de fusión de los mismos) y dominios de unión de “baja afinidad” (o proteínas de fusión de los mismos). Los dominios de unión de “alta afinidad” se refieren a aquellos dominios de unión con una Ka de al menos 10^8 M^{-1}, al menos 10^9 M^{-1}, al menos 10^{10} M^{-1}, al menos 10^{11} M^{-1}, al menos 10^{12} M^{-1}, o al menos 10^{13} M^{-1}, preferentemente al menos 10^8 M^{-1} o al menos 10^9 M^{-1}. Los dominios de unión de “baja afinidad” se refieren a aquellos dominios de unión con una Ka de hasta 10^8 M^{-1}, de hasta 10^7 M^{-1}, de hasta 10^6 M^{-1}, de hasta 10^5 M^{-1}. Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de disociación en equilibrio (Kd) de una interacción de unión particular con unidades de M (p. ej., 10^{-5} M to 10^{-13} M). Las afinidades de los polipéptidos del dominio de unión y las proteínas de fusión de acuerdo con esta descripción pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales (ver, p. ej., Scatchard et al., 1949, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y patente de los EE. UU. núms. 5.283.173, 5.468.614, o el equivalente).

Un diacuerpo es un tipo de dímero scFv en el que cada cadena consiste en las regiones V_H y V_L conectadas por un pequeño enlazador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Esta disposición obliga a la V_H de una cadena

a emparejarse con la V_L de una segunda cadena formando de esta manera un dímero bivalente, y frecuentemente biespecífico. Un BiTE es una proteína de fusión que tiene dos scFvs de diferentes anticuerpos, generalmente un anticuerpo para un antígeno asociado a un tumor y un anticuerpo para CD3, en una sola cadena peptídica, formando de esta manera una sinapsis citolítica entre las células T y las células portadoras del antígeno diana. El término "porción de unión al antígeno" puede referirse a una porción de un anticuerpo como se describe que posee la capacidad de reconocer, asociar, unir o combinar específicamente con una molécula diana. Una porción de unión al antígeno incluye cualquier compañero de unión natural, sintético, semisintético o producido recombinantemente para un antígeno específico. Por lo tanto, los anticuerpos y las porciones de unión al antígeno de estos constituyen medios para unirse a la molécula de superficie en una célula. En diversas modalidades, la célula puede ser una célula inmunitaria, un leucocito, un linfocito, un monocito, una célula madre, una HSC o una MSC, de acuerdo con la especificidad del anticuerpo.

En algunas modalidades, el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este puede derivarse de una especie de mamífero, por ejemplo, ratones, ratas, o humanos. Las regiones variables de anticuerpos pueden ser aquellas que surgen de una especie o pueden ser quiméricas y contener

segmentos de múltiples especies posiblemente alterados para optimizar características tales como la afinidad de unión o la baja inmunogenicidad. Para aplicaciones humanas, es deseable que el anticuerpo tenga una secuencia humana. En los casos en los que el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este se deriva de una especie no humana, el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este puede humanizarse para reducir la inmunogenicidad en un sujeto humano. Por ejemplo, si no está disponible un anticuerpo humano con la especificidad deseada, pero sí lo está un anticuerpo de una especie no humana, el anticuerpo no humano se puede humanizar, por ejemplo, a través de un injerto de CDR, en el que los CDR del anticuerpo no humano se colocan en las posiciones respectivas en un marco de un anticuerpo humano compatible. Menos preferido es un anticuerpo en el que solo la región constante del anticuerpo no humano se reemplaza con la secuencia humana. Tales anticuerpos se denominan comúnmente anticuerpos quiméricos en distinción de anticuerpos humanizados.

En algunas modalidades, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno de este es no inmunogénico. En algunas modalidades, el anticuerpo puede modificarse en su región Fc para reducir o eliminar funciones secundarias, tales como el acoplamiento de FcR, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o la citotoxicidad

dependiente del complemento (CDC); esto frecuentemente se conoce como un anticuerpo silenciado Fc.

Una densidad de entidad de unión en la LNP (o tLNP) puede definirse de acuerdo con la relación de anticuerpo (aglutinante) a ARNm (p/p) ya sea en función de la cantidad de anticuerpo introducida en la reacción de conjugación o según lo medido en la LNP o (tLNP) después de la conjugación. Para un anticuerpo intacto (*p. ej.*, IgG completa), en algunas modalidades, las relaciones preferidas son aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,0, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0, y aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,7 para la relación de aglutinante medida de entrada o final. En ciertas modalidades, una LNP (o tLNP) tiene una relación de anticuerpos de 0,3 a 1,0, 0,3 a 0,7, 0,3 a 0,5, 0,5 a 1,0 y 0,5 a 0,7 para la relación de aglutinante medida de entrada o final. En algunas modalidades, si el aglutinante es diferente en tamaño de un anticuerpo intacto (por ejemplo, un scFv, diacuerpo o minicuerpo, etc.) la relación p/p se ajusta para el diferente tamaño del aglutinante.

En ciertas modalidades, una LNP o (tLNP) comprende una entidad de unión derivado de un anticuerpo anti-CD40*‡, un anticuerpo anti-LRRC15†‡, un anticuerpo anti-CTSK, un anticuerpo anti-ADAM12‡, un anticuerpo anti-ITGA11, un anticuerpo anti-FAP*†‡, un anticuerpo anti-NOX4,

un anticuerpo anti-SGCD, un anticuerpo anti-SYNDIG1, un anticuerpo anti-CDH11‡, un anticuerpo anti-PLPP4, un anticuerpo anti-SLC24A2, un anticuerpo anti-PDGFRB*‡, un anticuerpo anti-THY1‡, un anticuerpo anti-ANTXR1‡, un anticuerpo anti-GAS1, un anticuerpo anti-CALHM5, un anticuerpo anti-SDC1*‡, un anticuerpo anti-HER2*†‡, un anticuerpo anti-TROP2*†‡, un anticuerpo anti-MSLN*‡, un anticuerpo anti-Nectin4†‡, o un anticuerpo anti-MUC16*†‡. En modalidades adicionales, una LNP (o tLNP) comprende una entidad de unión específica para un antígeno de células inmunitarias seleccionado de CD1, CD2*†‡, CD3*†‡, CD4*†‡, CD5†‡, CD7†‡, CD8†, CD11b‡, CD14†‡, CD16, CD25†‡, CD26*‡, CD27*†‡, CD28*†‡, CD30*†‡, CD32*, CD38*†‡, CD39‡, CD40*†‡, CD40L (CD154)*†‡, CD44*‡, CD45†‡, CD64*‡, CD62†‡, CD68, CD69‡, CD73†‡, CD80*‡, CD83‡, CD86*‡, CD95‡, CD103‡, CD119‡, CD126‡, CD137 (4-1BB)†‡, CD150‡, CD153‡, CD161‡, CD166‡, CD183 (CXCR3)‡, CD183 (CXCR5)‡, CD223 (LAG-3)*†‡, CD254‡, CD275‡, CD45RA, CTLA-4*†*†, DEC205, OX40†, PD-1*†‡, GITR†, TIM-3*†‡, FasL*‡, IL18R1, ICOS (CD278)‡, leu-12, TCR†, TLR1, TLR2†‡, TLR3*‡, TLR4†‡, TLR6, TREM2‡, NKG2D‡, CCR, CCR1 (CD191)‡, CCR2 (CD192)*†‡, CCR4(CD194)*†‡, CCR6(CD196)‡, CCR7‡, receptor de IL-2†‡ de baja afinidad, receptor de IL-7‡, receptor de IL-12‡, receptor de IL-15‡, receptor de IL-18‡, y receptor de IL-2‡. En modalidades adicionales, una tLNP comprende una entidad de unión específico para una molécula de superficie de HSC seleccionada de CD117†,

CD34*‡, CD44*‡, CD90 (Thy1) ‡, CD105‡, CD133‡, BMPR2‡, y Sca-1; o específicas para moléculas de superficie MSC seleccionadas de CD70*‡, CD105‡, CD73‡, Stro-1‡, SSEA-3‡, SSEA-4‡, CD271‡, CD146‡, GD2*†‡, SUSD2, Stro-4, MSCA-1, CD56‡, CD200*†‡, PODXL‡, CD13‡, CD29*‡, CD44*‡, y CD10‡. En diversas modalidades, una entidad de unión es un anticuerpo o porción de unión al antígeno de este. (* indica que en la patente de los EE. UU. 11.326.182B2 Tabla 9 o 10, pueden encontrarse anticuerpos ilustrativos con la especificidad indicada a partir de la cual podría derivarse una entidad de unión. †indica que en Wilkinson & Hale, 2022 pueden encontrarse anticuerpos ilustrativos con la especificidad indicada a partir de los cuales podría derivarse una entidad de unión. Ambas referencias citadas e incorporadas como referencia anterior. ‡indica que en la Base de datos de anticuerpos terapéuticos (TABS) en tabs.craic.com pueden encontrarse anticuerpos ilustrativos con la especificidad indicada a partir de los cuales podría derivarse una entidad de unión. Otros anticuerpos adecuados pueden encontrarse en el Apéndice A o WO2024040195A1 cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia para todo lo que enseña sobre los anticuerpos individuales y los antígenos a los que se unen.

Los siguientes párrafos proporcionan ejemplos no exhaustivos de anticuerpos conocidos que se unen a marcadores/antígenos de superficie celular en células

inmunitarias (linfocitos y monocitos) y células madre (HSC y MSC). Estos anticuerpos o los dominios de unión al antígeno de estos pueden usarse como entidades de unión para dirigirse a la LNP descrita. Similarmente, estos anticuerpos pueden contribuir con sus dominios de unión al antígeno a agentes de reprogramación de células inmunitarias tales como CAR e ICE. Mientras que típicamente un agente de reprogramación de células inmunitarias se expresa en una célula inmunitaria, una llamada también expresa un modificador de la respuesta biológica (agente acondicionador) o un agente de reprogramación de células inmunitarias, tal como un ICE, en una célula tumoral. Los marcadores de superficie inmunitaria y de células madre que pueden servir como antígeno dirigido de una tLNP también pueden ser útiles como un objetivo de un agente de reprogramación de células inmunitarias cuando la célula que expresa ese antígeno tiene un papel en la patología de alguna enfermedad o afección. Colectivamente, estos anticuerpos y polipéptidos que comprenden los dominios de unión al antígeno de estos constituyen medios para unir marcadores de superficie celular o medios para unir células inmunitarias y madre.

En algunas modalidades, CD2 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD2. CD2 contiene tres epítopos bien caracterizados (T11.1, T11.2 y T11.3/CD2R). T11.3/CD2R son proximales a la

membrana y la exposición aumenta con la activación de las células T y el agrupamiento de CD2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno anti-CD2 se deriva de, RPA-2.10; OKT11, UMCD2, 0.1, and 3T4-8B5 (epítopo T11.1); 9.6 y 1OLD2-4C1 (epítopo T11.2); 1Mono2A6 (epítopo T11.3), siplizumab (epítopo T11.2/T11.3), HuMCD2, TS2/18, TS1/8, AB75, LT-2, T6.3, MEM-65, OTI4E4, o una porción de unión al antígeno de este. Adicionalmente, el ligando de CD2, CD58 (LFA-3) puede usarse como una entidad de unión a CD2 al igual que alefacept, una fusión CD58-Fc. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD2 (Li *et al.*, 1996, *J Mol Biol.* 263:209-26; Binder *et al.*, 2020, *Front Immunol.* 9:11:1090).

En algunas modalidades, CD3 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión a antígeno se deriva de muromonab-CD3 (OKT3), teplizumab, otelixizumab, visilizumab, cevostamab, teclistamab, elranatamab pavurutamab, vibecotamab, odronextamab, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD3.

En algunas modalidades, CD4 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD4. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el

dominio de unión a antígeno se deriva de ibalizumab, inezetamab, semzuvolimab, zanolimumab, tregalizumab, UB-421, priliximab, MTRX1011A, cedelizumab, clenoliximab, keliximab, M-T413, TRX1, hB-F5, MAX.16H5, IT208, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD4.

En algunas modalidades, CD5 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD5. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión a antígeno se deriva de 5D7, UCHT2, L17F12, H65, HE3, OKT1, MAT304, así como los descritos en WO1989006968, WO2008121160, US8.679.500, WO2010022737, WO2019108863, WO2022040608, o WO2022127844, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD5 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD5.

En algunas modalidades, CD7 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD7. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de TH-69, 3A1E, 3A1F, Huly-m2, WT1, YTH3.2.6, T3-3A1, grisnilimab, así como los descritos en US10.106.609, WO2017213979, WO2018098306, US11447548, WO2022136888, WO2020212710, WO2021160267,

WO2022095802, WO2022095803, WO2022151851, o WO2022257835 cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD7 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD7.

En algunas modalidades, CD8 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD8. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de crefmirlimab (IAB22M), 3B5, SP-16, LT8, 17D8, MEM-31, MEM-87, RIV11, UCHT4, YTC182.20, RPA-T8, OKT8, SK1, 51.1, TRX2, MT807-R1, HIT8α, C8/144B, RAVB3, SIDI8BEE, BU88, EPR26538-16, 2ST8.5H7, así como los descritos en US10.414.820, WO2015184203, WO2017134306, WO2019032661, WO2020060924, US10.730.944, WO2019033043, WO2021046159, WO2021127088, WO2022081516, US11.535.869, o WO2023004304 cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD8 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Además, los anticuerpos anti-CD8 humanizados se describen en la solicitud de patente provisional de los EE. UU. número 63/610.917, presentada el 15 de diciembre de 2023, y solicitud de patente provisional de los EE. UU. número (Expediente núm. 23-1742-US-PRO2), presentada el 31 de mayo de 2024, cada uno de los cuales se incorpora como

referencia para todo lo que enseña sobre estos anticuerpos anti-CD8 humanizados y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de los anticuerpos anti-CD8 anteriores constituye un medio para unirse a CD8.

En algunas modalidades, una tLNP se dirige a CD10 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD10. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva del producido por el hibridoma representado por el número de adhesión. NITE BP-02489 (descrito en WO2018235247 que se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD10 y sus propiedades), FR4D11, o REA877, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD10.

En algunas modalidades, CD11b es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD11b. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de ASD141 o MAB107 así como los descritos en US20150337039, US10.738.121, WO2016197974, US10.919.967, o WO2022147338 cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD11b y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD11b.

En algunas modalidades, CD13 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD13. CD13 también se conoce como aminopeptidasa N (APN). En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de MT95-4 o Nbl57 (descritos en WO2021072312 que se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD13 y sus propiedades), así como los descritos en WO2023037015 que se incorpora como referencia por todo lo que enseña sobre los anticuerpos anti-CD13 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD13.

En algunas modalidades, CD14 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD14. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de atibuclimab o r18D11 así como los descritos en WO2018191786 o WO2015140591, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD14 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD14.

En algunas modalidades, CD16a es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-

CD16a. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de AFM13, sdA1, sdA2, o hu3G8-5.1-N297Q así como los descritos en US11535672, WO2018158349, WO2007009065, US10385137, WO2017064221, US10.758.625, WO2018039626, WO2018152516, WO2021076564, WO2022161314, o WO2023274183 cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD16A y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD16a.

En algunas modalidades, CD25 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD25. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de daclizumab, basiliximab, camidanlumab, tesirina, inolimomab, RO7296682, HuMax-TAC, CYT-91000, STI-003, RTX-003, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD25.

En algunas modalidades, CD28 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD28. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de GN1412, acazicolcept, lulizumab, prezalumab, teralizumab, FR104CD y davoceticept, así como los descritos en US8.454.959, US8.785.604,

US11.548.947, US11.530.268, US11.453.721, US11.591.401, WO2002030459, WO2002047721, US20170335016, US20200181260, US11608376, WO2020127618, WO2021155071, o WO2022056199 cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD28 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD28.

En algunas modalidades, CD29 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD29. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de OS2966, 6D276, 12G10, REA1060, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD29.

En algunas modalidades, CD32A es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD32A. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de VIB9600, IV.3 humanizado, AT-10 o MDE-8 humanizado así como los descritos en US9.688.755, US9.284.375, US9.382.321, US11306145 o WO2022067394, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD32A y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD32A.

En algunas modalidades, CD34 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD34. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de h4C8, 9C5, 2E10, 5B12, REA1164, C5B12, C2e10, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD34.

En algunas modalidades, CD40 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD40. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de cifurtilimab, sotigalimab, iscalimab, dacetuzumab, selicrelumab, bleselumab, lucatumumab o mitazalimab así como los descritos en US10633444, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre anticuerpos anti-CD40 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD40.

En algunas modalidades, CD44 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD44. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de RO5429083, VB6-008, PF-03475952, o RG7356, así como los descritos en WO2008144890, US8.383.117, WO2008079246, US20100040540, WO2015076425,

US9.220.772, US20140308301, WO2020159754, WO2021160269, WO2021178896, WO2022022749, WO2022022720, o WO2022243838, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD44 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD44.

En algunas modalidades, CD45 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD45. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión a antígeno se deriva de apamistamab, BC8-B10, así como los descritos en WO2023183927, WO2023235772, US7.825.222, WO2017009473, WO2021186056, US9.701.756, US9.701.756, WO2020092654, WO2022040088, WO2022040577, WO2022064191, WO2022063853, o WO2024064771, cada uno de los cuales se incorpora por referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD45 y sus propiedades, o una porción de unión a antígeno de los mismos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD45.

En algunas modalidades, CD56 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD56. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de lorvotuzumab, adcitmer, o promiximab, así como los descritos en WO2012138537, US10.548.987, US10.730.941, o US20230144142,

cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD56 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD56.

En algunas modalidades, CD64 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD64. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de HuMAb 611 o H22 así como los descritos en US7.378.504, WO2014083379, US20170166638, o WO2022155608, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD64 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD64.

En algunas modalidades, CD68 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD68. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de Ki-M7, PG-M1, 514H12, ABM53F5, 3F7C6, 3F7D3, Y1/82A, EPR20545, CDLA68-1, LAMP4-824, o una porción de unión al antígeno de este. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD68.

En algunas modalidades, CD70 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD70.

En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de cusatuzumab, vorsetuzumab, MDX-1203, MDX-1411, AMG-172, SGN-CD70A, ARX305, PRO1160, así como los descritos en US9.765.148, US8.124.738, IS10.266.604, WO2021138264, US9.701.752, US10.108.123, WO2014158821, US10.689.456, WO2017062271, US11.046.775, US11.377.500, WO2021055437, WO2021245603, WO2022002019, WO2022078344, WO2022105914, WO2022143951, WO2023278520, WO2022226317, WO2022262101, US11.613.584, o WO2023072307, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD70 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD70.

En algunas modalidades, CD73 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD73. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de oleclumab, uliledlimab, mupadolimab, AK119, IBI325, BMS-986179, NZV930, JAB-BX102, Sym024, TB19, TB38, HBM1007, 3F7, mAb19, Hu001-MMAE, IPH5301, o INCA00186, así como los descritos en US9.938.356, US10.584.169, WO2022083723, WO2022037531, WO2021213466, WO2022083049, US10.822.426, WO2021259199, US10.100.129, US11.312.783, US11.174.319, US11.634.500, WO2021138467, WO2017118613, US9.388.249, WO2020216697, US11180554, US11.530.273, WO2019173692,

WO2019170131, US11.312.785, WO2020098599, WO2020143836, WO2020143710, US11.034.771, US11.299.550, WO2020253568, WO2021017892, WO2021032173, WO2021032173, WO2021097223, WO2021205383, WO2021227307, WO2021241729, WO2022096020, WO2022105881, WO2022179039, WO2022214677, o WO2022242758, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD73 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD73.

En algunas modalidades, CD90 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD90. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de REA897, OX7, 5E10, K117, L127, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD90.

En algunas modalidades, CD105 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD105. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de carotuximab, TRC205, o huRH105, así como los descritos en US8.221.753, US9.926.375, WO2010039873, WO2010032059, WO2012149412, WO2015118031, WO2021118955, US20220233591, o US20230075244, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD105 y sus propiedades, o una

porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD105.

En algunas modalidades, CD117 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD117. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de briquilimab, barzolvolimab, CDX-0158, LOP628, MGTA-117, NN2101, CK6, JSP191, Ab85, 104D2, o SR1, así como los descritos en US7.915.391, WO2022159737, US9540443, WO2015050959, US9.789.203, US8.552.157, US10.406.179, US9.932.410, WO2019084067, WO2020219770, US10.611.838, WO2020076105, WO2021107566, US11.208.482, WO2021044008, WO2021099418, WO2022187050, o WO2023026791, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD117 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD117.

En algunas modalidades, CD133 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD133. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de AC133, 293C3, CMab-43, o RW03, así como los descritos en WO2018045880, US8.722.858, US9.249.225, WO2014128185, US10.711.068, US10.106.623, WO2018072025, o WO2022022718, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que

enseñan sobre los anticuerpos anti-CD133 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD133.

En algunas modalidades, CD137 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD137. CD137 también se conoce como 4-1BB. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de YH004, urelumab (BMS-663513), utomilumab (PF-05082566), ADG106, LVGN6051, PRS-343, así como los descritos en WO2005035584, WO2012032433, WO2017123650, US11.203.643, US11.242.395, US11.555.077, US20230067770, US11.535.678, US11.440.966, WO2019092451, US10.174.122, US11.242.385, US10.716.851, WO2020011966, WO2020011964, o US11.447.558, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos CD137 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD137.

En algunas modalidades, CD146 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD146. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de imaprelimab, ABX-MA1, huAA98, M2H, o IM1-24-3, así como los descritos en US10.407.506, US10.414.825, US6.924.360, US9.447.190, WO2014000338, US9.782.500, WO2018220467, US11.427.648, WO2019133639,

WO2019137309, WO2020132190, o WO2022082073,cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos CD146 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD146.

En algunas modalidades, CD166 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD166. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de praluzatamab, AZN-L50, REA442, o AT002, así como los descritos en US10.745.481, US11.220.544, o WO2008117049, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos CD166 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD166.

En algunas modalidades, CD200 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD200. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de samalizumab, OX-104, REA1067, B7V3V2, HPAB-0260-YJ, o TTI-CD200, así como los descritos en WO2007084321 o WO2019126536, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos CD200 y sus propiedades,

o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD200.

En algunas modalidades, CD205 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD205. CD205 también se conoce como DEC205. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el anticuerpo comprende 3G9-2D2 (un componente de CDX-1401) o LY75_A1 (un componente de MEN1309) así como los descritos en US8.236.318, US10.081.682, o US11.365.258, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-CD205 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD205.

En algunas modalidades, CD271 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD271. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de REA844 o REAL709 así como los descritos en WO2022166802 que se incorpora como referencia por todo lo que enseña acerca de los anticuerpos anti-CD271 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CD271.

En algunas modalidades, BMPR2 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-

BMPR2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de TAB-071CL (Creative Biolabs catálogo núm.) así como los descritos en US11.292.846 o WO2021174198, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-BMPR2 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir BMPR2.

En algunas modalidades, claudina 18.2 (CLDN 18.2) es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-claudina 18.2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de zolbetuximab, osemitamab, RC118, IBI-343, AZD0901, M108, SYSA1801, TORL-2-307-ADC, LM-302, ASKB589, gresonitamab, SPX-101, SKB315, Q-1802, GIVASTOMIG, LCAR-C18S, SOT102, CT041 así como los descritos en WO2013167259, WO2021032157, WO2021254481, WO2022007808, WO2021008463, WO2022111616, WO2018006882, WO2020147321, WO2019219089, US20200040101, WO2020025792, WO2020139956, WO2020135201, US20240228610, WO2021218874, WO2021027850, WO2021129765, WO2022068854, WO2021111003, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti- claudina 18.2 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir claudina 18.2.

En algunas modalidades, CTLA-4 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CTLA-4. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de botensilimab, ipilimumab, nurulimab, quavonlimab, tremelimumab, zalifrelimab, ADG116, ADG126, ADU-1604, AGEN1181, BCD-145, BMS-986218, BMS-986249, BT-007, CS1002, GIGA-564, HBM4003, IBI310 JK08, JMW-3B3, JS007, KD6001, KN044, ONC-392, REGN4659, TG6050, XTX101, YH001, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir CTLA-4.

En algunas modalidades, GD2 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-GD2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de dinutuximab, ganglidiximab, naxitamab, nivatrotamab, EMD 273063, hu14.18k322A, MORAb-028, 3F8BiAb, BCD-245, KM666, ATL301, Ektomab, así como los descritos en US9.777.068, US9.315.585, WO2004055056, US9.617.349, US9.493.740, US20210002384, US8507657, WO2001023573, WO2012071216, WO2018010846, US8.951.524, WO2023280880, US9.856.324, WO2015132604, WO2017055385, WO2019059771, WO2020020194, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir GD2.

En algunas modalidades, GITR es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-GITR. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de ragifilimab, TRX518, MK-4166, AMG 228, MEDI1873, BMS-986156, REGN6569, ASP1951, MK-1248, FRA154, GWN323, JNJ-64164711, ATOR-1144, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir GITR.

En algunas modalidades, un receptor de IL-2 de baja afinidad es un antígeno de superficie celular diana (CD122 y/o CD132) y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo del receptor anti-IL-2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el anticuerpo anti-CD122 comprende ANV419, FB102, MiK-Beta-1 y los anticuerpos anti-CD122 descritos en WO2011127324, WO2017021540, WO2022212848, WO2022221409, WO2023078113, US20230272090, WO2024073723, o una porción de unión al antígeno de estos. Por consiguiente, en algunas de tales modalidades, el anticuerpo anti-CD132 comprende REGN7257 y los anticuerpos anti-CD132 descritos en WO2020160242, WO2017021540, WO2022212848, WO2023078113, US20230272089, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unirse al receptor de IL-2 de baja afinidad (CD122 o CD132, según corresponda),

En algunas modalidades, un receptor de IL-2 de alta afinidad es un antígeno de superficie celular diana (CD25) y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo receptor anti-IL-2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de daclizumab, basiliximab, camidanlumab, vopitug, inolimomab, HuMAx-TAC, Xenopax, STI-003, RA8, RTX-003, y los anticuerpos anti-CD25 descritos en WO2023031403, WO2006108670, WO2019175223, WO2019175215, WO2019175226, WO2004045512, WO2022104009, WO2020102591, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unirse al receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25).

En algunas modalidades, el receptor de IL-7 (CD127) es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo del receptor anti-IL-7. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva dePF-06342674, GSK2618960, OSE-127, lusvertikimab, bempikibart, y los anticuerpos anti-CD127 descritos en WO2011104687, WO2011094259, WO2013056984, WO2015189302, WO2017062748, WO2020154293, WO2020254827, WO2021222227, WO2023201316, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir el CD127.

En algunas modalidades, el receptor de IL-12 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un

anticuerpo del el receptor anti-IL-12. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de CBYY-I0413, REA333, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unirse al receptor de IL-12.

En algunas modalidades, el receptor de IL-15 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo del receptor anti-IL-15. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de MAB1472-100, MAB5511, JM7A4, 5E3E1, JM7A4, 2639B, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unirse al receptor α de IL-15.

En algunas modalidades, el receptor de IL-18 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo del receptor anti-IL-18. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de H44, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unirse al receptor α de IL-18.

En algunas modalidades, el receptor de IL-21 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo del receptor anti-IL-21. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al

antígeno se deriva de 1D1C2, 19F5, 18A5, REA233, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unirse al receptor α de IL-21.

En algunas modalidades, LAG-3 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-LAG-3. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de relatlimab, tebotelimab, favezelimab, fianlimab, miptenalimab, HLX26, ieramilimab, GSK2831781, INCAGN2385, RO7247669, encelimab, FS118, SHR-1802, Sym022, IBI110, IBI323, bavunalimab, EMB-02, ABL501, INCA32459, AK129, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir LAG-3.

En algunas modalidades, MSCA-1 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-MSCA-1. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de REAL219, W8B2, X9C3, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir MSCA-1.

En algunas modalidades, OX40 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-OX40. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de MEDI6469, ivuxolimab, rocatinlimab, GSK3174998, BMS-986178,

vonlerizumab, INCAGN1949, tavolimab, BGB-A445, INBRX-106, BAT6026, telazorlimab, ATOR-1015, MEDI6383, cudarolimab, FS120, HFB301001, EMB-09, HLX51, Hu222, ABM193, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir OX40.

En algunas modalidades, PD-1 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-PD-1. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de nivolumab, pembrolizumab, camrelizumab, torpalimab, sintilimab, tislelizumab, cemiplimab, spartalizumab, serplulimab, cadonilimab, penpulimab, dostarlimab, zimberelimab, retifanlimab, pucotenlimab, pidilizumab, pidilizumab, balstilimab, ezabenlimab, AK112, geptanolimab, cetrelimab, prolgolimab, tebotelimab, sasanlimab, SG001, vudalimab, MEDI5752, rulonilimab, peresolimab, IBI318, budigalimab, MEDI0680, pimivalimab, QL1706, AMG 404, RO7121661, lorigerlimab, nofazinlimab, sindelizumab, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir PD-1.

En algunas modalidades, PODXL es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-PODXL. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de MAI1738, HPAB-

3334LY, HPAB-MO612-YC, REA246, REA157, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir PODXL.

En algunas modalidades, Sca-1 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-Sca-1. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de CPP32 4-1-18, 2D4-C9-F1, AMM22070N, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir SCA-1.

En algunas modalidades, SSEA-3 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-SSEA-3. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de MC631, 2A9, 8A7, ND-742, 3H420, así como los descritos en US11.643.456 o WO2021138378, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-SSEA-3 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir SSEA-3.

En algunas modalidades, SSEA-4 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-SSEA-4. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de ch28/11, REA101, MC-813-70, ND-942-80, así como los descritos en US11.446.379,

US10.273.295, US11.643.456, WO2019190952, o WO2021044039, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-SSEA-4 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir SSEA-4.

En algunas modalidades, Stro-1 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-Stro-1. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de STRO-1, TUSP-2 así como los descritos en US20130122022 que se incorpora como referencia por todo lo que enseña acerca de los anticuerpos anti-Stro-1 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir Stro-1.

En algunas modalidades, Stro-4 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-Stro-4. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el anticuerpo comprende STRO-4, efungumab, 4C5, así como los descritos en US7.722.869, US20110280881, US9.115.192, US10.273.294, US10.457.726, WO2023091148, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan acerca de los anticuerpos anti-Stro-4 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de

estos constituye un medio para unir Stro-4 (también conocido como proteína de choque térmico-90).

En algunas modalidades, SUSD2 es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-SUSD2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de REA795, CBXS-3571, CBXS-1650, CBXS-1989, CBXS-1671, CBXS1990, CBXS-3676, 1279B, EPR8913(2), W5C5, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir SUSD2.

En algunas modalidades, TIM-3 es un antígeno de superficie de célula diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-TIM-3. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el anticuerpo comprende TQB2618, sabatolimab, cobolimab, RO7121661, INCAGN02390, AZD7789, surzebiclimab, LY3321367, Sym023, BMS-986258, SHR-1702, LY3415244, LB1410, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir TIM-3.

En algunas modalidades, TREM2 es un antígeno de superficie de célula diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-TREM2. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno se deriva de PI37012 así como los descritos en los documentos US10.508.148, US10.676.525, WO2017058866, US11.186.636, US11.124.567,

WO2020055975, US11.492.402, WO2020121195, WO2023012802, WO2021101823, WO2023047100, WO2022032293, WO2022241082, WO2023039450, o WO2023039612, cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-TREM2 y sus propiedades, o una porción de unión a antígeno de esto. Cada uno de estos constituye un medio para unir TREM2.

En algunas modalidades, el receptor acoplado a proteína G, clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D) es un antígeno de superficie celular diana y una entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-GPRC5D. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-GPRC5D se deriva de talquetamab, forimtamig, BMS-986393, IBI-3003, QLS32015, SIM0500 o EPR28376-41, o se describen en WO2018017786, WO2016090329, WO2022174813, WO2023236889, WO2018147245, WO2024079015, WO2019154890, WO2021018859, WO2021018925, WO2020092854, WO2024031091, WO2020148677, WO2022175255, WO2022222910, WO2022247804, WO2022247756, WO2023078382, WO2023125728, WO2023143537, WO2024046239, o WO2024131962. cada uno de los cuales se incorpora como referencia para todos lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-GPRC5D y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir GPRC5D.

En algunas modalidades, FCRL5 (CD307E) es un antígeno de superficie celular diana y la entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-FCRL5. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-FCRL5 se deriva de cevostamab, 2A10H7, 307307, 2A10D6, EPR27365-87, EPR26948-19, o EPR26948-67, o se describe en WO2016090337, WO2017096120, WO2022263855, o WO2024047558, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-FCRL5 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir FCRL5.

En algunas modalidades, LRRC15 es un antígeno de superficie de célula diana y entidad de unión comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-LRRC15. En consecuencia, en algunas de tales modalidades, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo anti-LRRC15 se deriva de samrotamab o DUNP19 o se describe en WO2005037999, WO2021022304, WO2024081729, WO2021102332, WO2021202642, WO2022157094, o WO2024158047, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre los anticuerpos anti-LRRC15 y sus propiedades, o una porción de unión al antígeno de estos. Cada uno de estos constituye un medio para unir LRRC15.

En otras modalidades adicionales, una tLNP se dirige a una célula tumoral. En algunas modalidades, la

célula tumoral expresa uno de los antígenos descritos anteriormente y la tLNP se dirige a tumores que expresan antígeno usando los mismos medios descritos anteriormente. En otras modalidades, la tLNP se dirige a algún otro antígeno tumoral, tal como los enumerados solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/371.742, presentada el 17 de agosto de 2022, titulada CONDITIONING FOR IN VIVO IMMUNE CELL ENGINEERING que se incorpora como referencia por todo lo que enseña sobre el suministro de ácidos nucleicos en células tumorales usando tLNP que no es inconsistente con la presente descripción.

Ácido nucleico

En ciertas modalidades, la LNP y tLNP descritas comprenden una carga útil que comprende o consiste en una o más especies de ácido nucleico. En algunas modalidades, la carga útil de LNP o tLNP comprende solo una especie de ácido nucleico mientras que en otras modalidades la carga útil de LNP o tLNP comprende múltiples especies de ácido nucleico, por ejemplo, 2, 3 o 4 especies de ácido nucleico. Por ejemplo, en modalidades en las que la carga útil comprende un ácido nucleico que codifica un CAR o un acoplador de células inmunitarias (ICE), la carga útil puede comprender o consistir en 1) una única especie de ácido nucleico que codifica una sola especie de CAR o ICE, 2) una única especie de ácido nucleico que codifica 2 o más

especies de CAR o ICE (o una mezcla de CAR e ICE) tal como un ARNm bicistrónico o multicistrónico en el que cada CAR y/o ICE tiene especificidad para un mismo antígeno diana, 3) una única especie de ácido nucleico que codifica 2 o más especies de CAR o ICE (o una mezcla de CAR e ICE) tal como un ARNm bicistrónico o multicistrónico en el que al menos un CAR y/o ICE tiene especificidad para un antígeno diana diferente que el(los) otro(s), 4) dos o más especies de ácidos nucleicos que codifican 2 o más especies de CAR o ICE (o una mezcla de CAR e ICE) en las que cada CAR y/o ICE tiene especificidad para un mismo antígeno diana, 5) dos o más especies de ácidos nucleicos que codifican 2 o más especies de CAR o ICE (o una mezcla de CAR e ICE) en las que al menos un CAR y/o ICE tiene especificidad para un antígeno diana diferente que el(los) otro(s). Cuando dos o más CAR y/o ICE tienen especificidad para un mismo antígeno diana, pueden tener especificidad para los mismos o diferentes epítopos del mismo antígeno diana. Otras variaciones serán evidentes para un experto en la técnica (p. ej., múltiples ácidos nucleicos bi- o multicistrónicos, ácidos nucleicos que codifiquen un TCR y lo similar). El ácido nucleico puede ser ARN o ADN. El ácido nucleico puede ser multicistrónico, por ejemplo, bicistrónico.

En algunas modalidades, las LNP o la tLNP de esta descripción comprenden además una carga útil de ácido nucleico. En diversas modalidades, un ácido nucleico es un

ARNm, un ARN autorreplicante, un ARN circular, un ARNip, un miARN, ADN, un componente de edición de genes (por ejemplo, un ARN guía, un ARN tracr, un ARNgu), un componente de escritura de genes, un ARNm que codifica una proteína de edición de genes o bases, una nucleasa de dedo de zinc, una TALEN, una nucleasa CRISPR, tal como Cas9, una molécula de ADN a insertar o servir como plantilla para su reparación), y lo similar, o una combinación de estas. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende ARN de interferencia pequeño (ARNpi), microARN (miARN), oligonucleótido antisentido (ASO). En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende un ARN autorreplicante o un ARN circular. En algunas modalidades, el ARNm codifica un agente de reprogramación o comprende o codifica un agente acondicionador. En algunas modalidades, el ARNm (lineal, circular o autorreplicante) comprende un sitio de unión de miARN. En algunas modalidades, un ARNm codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En otras modalidades, un ARNm codifica una proteína de edición de genes o edición de bases o escritura de genes. En algunas modalidades, un ácido nucleico es un ARN guía. En algunas modalidades, una LNP o tLNP comprende tanto un ARNm que codifica proteínas de edición de genes o bases o escritura de genes como uno o más ARN guía. Las nucleasas CRISPR pueden tener actividad alterada, por ejemplo, modificando la nucleasa de tal manera que sea una nickasa en lugar de hacer cortes

bicatenarios o de tal manera que se une a la secuencia especificada por el ARN guía pero no tiene actividad enzimática. Las proteínas de edición de bases son frecuentemente proteínas de fusión que comprenden un dominio desaminasa y un dominio de unión a ADN específico de secuencia (tal como una nucleasa CRISPR inactiva).

En algunas modalidades, el agente de reprogramación comprende un receptor inmunitario (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico o un receptor de células T) o un acoplador de células inmunitarias (por ejemplo, un enlazador de células T biespecífico (BiTE), un acoplador de células asesinas biespecífico (BiKE), un acoplador de células asesinas triespecífico (TriKE), un anticuerpo de redireccionamiento de afinidad dual (DART), un TRIDENT (que une dos unidades DART o una unidad DART y un dominio Fab), un acoplador de macrófagos (p. ej., BiME), un acoplador de células innatas, y lo similar).

En algunas modalidades, el ácido nucleico es un ARN, por ejemplo, ARNm, y el ARN comprende al menos un nucleósido modificado. En algunas modalidades, el nucleósido modificado es pseudouridina, N^1-metilpseudouridina, 5-metilcitosina, 5-metiluridina, N^6-metiladenosina, 2′-O-metiluridina o 2-tiouridina. En ciertas modalidades todas las uridinas se sustituyen con un nucleósido modificado. La descripción adicional de nucleósidos modificados y su uso puede encontrarse en la

patente de los EE. UU. núm. 8.278.036 que se incorpora en la presente como referencia para esas enseñanzas.

En algunas modalidades, el agente de reprogramación codifica o es un componente de edición de genes/genoma. En algunas modalidades, el componente de edición de gen/genoma es un ARN guía para una nucleasa dirigida a ARN u otra enzima de edición de ácidos nucleicos, ARN de repetición palindrómica corta agrupada y regularmente interespaciada (ARNcrispr), un ARN de repetición palindrómica corta, agrupada y regularmente interespaciada, transactivador (ARNtrans). En algunas modalidades, el componente de edición de genes/genoma es una enzima codificada por ácido nucleico, tal como nucleasa guiada por ARN, una proteína de edición de genes o bases, una nucleasa de dedo de zinc (ZFN), una nucleasa efectora de tipo activador de transcripción (TALEN), una meganucleasa, una transposasa o una nucleasa CRISPR (p. ej., Cas9 o Cas 12, etc.). En algunas modalidades, el componente de edición de genes/genoma es ADN que se va a insertar o que sirve como plantilla en la edición de genes o genomas, por ejemplo, una plantilla para la reparación de una rotura de doble hebra.

En algunas modalidades que comprenden múltiples agentes, el ácido nucleico puede ser multicistrónico. En otras modalidades que comprenden múltiples agentes o componentes, cada agente o componente está codificado o contenido es una especie de ácido nucleico separada. En

algunas modalidades que implican múltiples especies de ácido nucleico de carga útil, dos o más especies de ácidos nucleicos se empaquetan juntas en una sola especie de LNP. En otras modalidades, un subconjunto de las especies de ácido nucleico de carga útil a suministrar, (p. ej., una única especie de ácido nucleico) se empaqueta en una especie de LNP o tLNP mientras que otro subconjunto de las especies de ácido nucleico se empaqueta en otra especie de LNP o tLNP. Las diferentes especies de (t)LNP pueden diferir solo por la carga útil que contienen. Las diferentes especies de (t)LNP pueden combinarse en una sola formulación o composición farmacéutica para su administración.

Métodos para elaborar una LNP o tLNP

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para elaborar una LNP o tLNP que comprende la mezcla de una solución acuosa de un ácido nucleico (u otra carga útil cargada negativamente) y una solución alcohólica de los lípidos en proporciones descritas en la presente. En modalidades particulares, la mezcla es rápida.

La solución acuosa es regularse a pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, por ejemplo, sin limitarse a, con citrato o acetato. En diversas modalidades, el alcohol puede ser etanol, isopropanol, t-butanol, o una combinación de estos. En algunas

modalidades, la mezcla rápida se logra bombeando las dos soluciones a través de una unión en T o con un mezclador de chorro de impacto. También se puede usar mezcla microfluídica a través de un mezclador escalonado de espina (SHM) o un mezclador hidrodinámico (enfoque hidrodinámico microfluídico), mezcladores bifurcantes microfluídicos y mezcladores deflactores microfluídicas. Después de que se forman las LNP se diluyen con regulador, por ejemplo fosfato, HEPES, o Tris, en un rango de pH de 6 a 8,5 para reducir la concentración de alcohol (etanol). Las LNP diluidas se purifican ya sea por diálisis o ultrafiltración o diafiltración usando filtración de flujo tangencial (TFF) contra un regulador en un rango de pH de 6 a 8,5 (por ejemplo, fosfato, HEPES o Tris) para eliminar el alcohol. Alternativamente, se puede usar cromatografía de exclusión por tamaño. Una vez que el alcohol se elimina por completo, el regulador se intercambia con regulador similar que contiene un crioprotector (por ejemplo, glicerol o un azúcar como sacarosa, trehalosa o manosa). Las LNP se concentran a una concentración deseada, seguida de una filtración de 0,2 μm a través de, por ejemplo, un filtro de poliétersulfona (PES) o PES modificado y se llenan en viales de vidrio, con tapón, tapados y almacenados congelados. En modalidades alternativas, se usa un lioprotector y la LNP liofilizar para almacenamiento en lugar de como un líquido congelado. Pueden encontrarse

metodologías adicionales para elaborar LNP, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. núms. US2020/0297634, US2013/0115274, y en la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO2017/048770, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre la producción de LNP.

Algunos aspectos son un método para hacer una tLNP que comprende la mezcla rápida de una solución acuosa de un ácido nucleico (u otra carga útil cargada negativamente) y una solución alcohólica de los lípidos como se describe para LNP. En algunas modalidades, la mezcla lipídica incluye PEG-lípido funcionalizado, para su posterior conjugación con una entidad de direccionamiento. Como se usa en la presente, PEG-lípido funcionalizado se refiere a un PEG-lípido en el que la entidad PEG se ha derivatizado con un grupo químicamente reactivo (tal como maleimida, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), Cys, azida, alquino y lo similar) que puede usarse para conjugar una entidad de direccionamiento al PEG-lípido y, por lo tanto, a la LNP que comprende el PEG-lípido. En otras modalidades, el PEG-lípido funcionalizado se inserta en una LNP posterior a la formación inicial de una LNP a partir de los otros componentes. En cualquier tipo de modalidad, la entidad dirigida se conjuga con PEG-lípido funcionalizado después de que se forme la LNP que contiene el PEG-lípido funcionalizado. Los protocolos para la

conjugación pueden encontrarse, por ejemplo, en Parhiz et al., 2018, *J. Controlled Release* 291:106-115 y Tombacz et al., 2021, *Molecular Therapy* 29(11):3293-3304, cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseña sobre la conjugación de PEG-lípidos a las entidades de unión. Alternativamente, la entidad de direccionamiento puede conjugarse con el PEG-lípido antes de la inserción en la LNP preformada.

En ciertas modalidades de los métodos de preparación de tLNP, el método comprende:

i). formar una LNP inicial mezclando todos los componentes de la tLNP, en proporciones descritas en la presente, excepto por el uno o más PEG-lípidos funcionalizados y la una o más entidades de direccionamiento;

ii). formar una tLNP de preconjugación mezclando la LNP inicial con uno o más PEG-lípidos funcionalizados; y

iii). formar la tLNP conjugando la tLNP de preconjugación con la una o más entidades de direccionamiento.

En ciertas modalidades de los métodos de preparación de tLNP, el método comprende:

i). formar una tLNP de preconjugación mezclando todos los componentes de la tLNP, en proporciones descritas en la presente, que

incluyen uno o más PEG-lípidos funcionalizados, excepto para una o más entidades de direccionamiento; y

ii). formar la tLNP al conjugar la tLNP de preconjugación con la una o más entidades de direccionamiento.

En ciertas modalidades de los métodos de preparación de tLNP, el método comprende:

i). formar uno o más PEG-lípidos funcionalizados conjugados mediante la conjugación de uno o más PEG-lípidos funcionalizados con una o más entidades de direccionamiento; y

ii) formar la tLNP mezclando todos los componentes de la tLNP, en proporciones descritas en la presente, que incluyen uno o más PEG-lípidos funcionalizados conjugados.

En ciertas modalidades de los métodos de preparación de tLNP, el método comprende:

i). formar uno o más PEG-lípidos funcionalizados conjugados mediante la conjugación de uno o más PEG-lípidos funcionalizados con una o más entidades de direccionamiento;

ii) formar una LNP mezclando todos los componentes de la tLNP, excepto el uno o más PEG-lípidos funcionalizados conjugados; y

iii) formar la tLNP mezclando la LNP inicial con uno o más PEG-lípidos conjugados funcionalizados.

Después de la conjugación, las tLNP se purifican por diálisis, filtración de flujo tangencial, o cromatografía de exclusión por tamaño, y se almacenan, como se ha descrito anteriormente para las LNP.

La eficiencia de encapsulación del ácido nucleico por la LNP o tLNP se determina típicamente con un colorante fluorescente de unión a ácido nucleico añadido a alícuotas intactas y lisadas de la preparación final de LNP o tLNP para determinar las cantidades de ácido nucleico no encapsulado y total, respectivamente. La eficiencia de encapsulación se expresa típicamente como un porcentaje y se calcula como 100 x (T-U)/T donde T es la cantidad total de ácido nucleico y U es la cantidad de ácido nucleico no encapsulado. En diversas modalidades, la eficiencia de encapsulación es ≥ 80 %, ≥ 85 %, ≥ 90 % o ≥ 95 %.

Métodos de entrega de una carga útil en una célula

En otros aspectos, en la presente se describen métodos para suministrar un ácido nucleico (u otra carga útil cargada negativamente) en una célula que comprenden poner en contacto la célula con la tLNP o la tLNP como se describe en la presente. Por consiguiente, cada uno de los géneros, subgéneros y/o especies de LNP o tLNP descritos

en la presente, incluidos aquellos basados en la inclusión o exclusión de lípidos particulares, composiciones lipídicas particulares, cargas útiles particulares y/o entidades específicas de direccionamiento pueden usarse para definir el alcance de los métodos de entrega de una carga útil a una célula. En algunas modalidades, el contacto tiene lugar *ex vivo*. En algunas modalidades, el contacto tiene lugar de manera extracorpórea. En algunas modalidades, el contacto tiene lugar *in vivo*. En algunas modalidades, una LNP o tLNP se pone en contacto con células diana *in vivo*, por administración sistémica o local. En algunos modalidades, el contacto *in vivo* comprende administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intralesional, intranodal o intralinfática. En una modalidad, la administración es mediante infusión o inyección intravenosa o subcutánea. En algunas modalidades, la administración es mediante inyección de infusión intraperitoneal o intralesional. En otros casos, la transfección de hepatocitos se reduce en comparación con las tLNP que comprenden un lípido catiónico ionizable convencional, tal como ALC-0315. En algunas modalidades, una LNP o tLNP se administra 1-3 veces a la semana durante 1, 2, 3 o 4 semanas. En algunas modalidades, la toxicidad se limita (o se limita en gran medida) a grados de 0 o 1 o 2, como se analizó anteriormente.

Las composiciones y formulaciones de LNP y tLNP descritas en la presente tienen toxicidad reducida en comparación con las composiciones de LNP de técnicas anteriores ampliamente usadas tales como las que contienen ALC-0315. En diversas modalidades, la toxicidad puede describirse como una toxicidad observable, una toxicidad sustancial, una toxicidad grave, o una toxicidad aceptable, o una toxicidad limitante de la dosis (tal como, pero sin limitarse a, una dosis máxima tolerada (MTD)). Por una toxicidad observable se entiende que mientras se observa un cambio el efecto es insignificante o leve. Por toxicidad sustancial se entiende que existe un impacto negativo en la salud general o calidad de vida del paciente. En algunos casos, una toxicidad sustancial puede mitigarse o resolverse con otra intervención médica en curso. Por una toxicidad severa se entiende que el efecto requiere intervención médica aguda y/o reducción de dosis o suspensión del tratamiento. La aceptabilidad de una toxicidad estará influenciada por la enfermedad particular que se esté tratando y su gravedad y la disponibilidad de intervención médica mitigadora. En algunas modalidades, la toxicidad se limita (o se limita en gran medida) a una toxicidad observable. En algunas modalidades, la toxicidad se limita (o se limita en gran medida) a grados de 0 o 1 o 2.

En algunas modalidades, la carga útil es un ácido nucleico y el método de administración es un método de

transfección. En algunas modalidades, la carga útil de ácido nucleico comprende un ARNm, ARN circular, ARN autoamplificante o ARN guía. Las estructuras de ácidos nucleicos y especialmente las estructuras de ARNm, así como las moléculas de ARN individuales que codifican polipéptidos particulares, que se adaptan bien para el suministro por LNP o tLNP se describen en la solicitud de patente provisional de los EE. UU. número 63/595.753 presentada el 2 de noviembre de 2023, la solicitud de patente provisional de los EE. UU. número 63/611.092 presentada el 15 de diciembre de 2023 y la solicitud de patente provisional de los EE. UU. número (expediente número 23-1871-US-PRO3), presentada el 31 de mayo de 2024, cada una de las cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseña sobre las cargas útiles de ácidos nucleicos para la transfección *in vivo* y su diseño.

En algunas modalidades, la carga útil comprende un ácido nucleico que codifica un receptor inmunitario o un acoplador de células inmunitarias y el método de administración también es un método de reprogramación de una célula inmunitaria. En algunas modalidades, la carga útil comprende un ácido nucleico que codifica, o es, un BRM y el método de administración es también un método para proporcionar un agente acondicionador. En diversas modalidades, el BRM o agente acondicionador es una citocina receptora de cadena gamma tal como IL-2, IL-7, IL-15, IL-15/15Ralfa, IL-21; una citocina inmunomoduladora tal como

IL-12, IL-18; una quimiocina tal como RANTES, IP10, MIG; u otro BRM tal como Flt3, GM-CSF, y G-CSF.

En algunas modalidades, la carga útil comprende un ácido nucleico que codifica una enzima de edición de genes/genoma y/o un ARN guía u otro componente de un sistema de edición de genes/genoma y el método de administración también es un método de reprogramación de una célula. En algunos casos, la célula es una célula inmunitaria. En algunos casos, la célula es una HSC. En algunos casos, la célula es una MSC.

En ciertas modalidades que comprenden suministrar la carga útil a una célula inmunitaria, la entidad de unión se une a una molécula de superficie de linfocitos o una molécula de superficie de monocitos. Las moléculas de superficie de linfocitos incluyen CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD28, 4-1BB (CD137), CD166, CTLA-4, OX40, PD-1, GITR, LAG-3, TIM-3, CD25, receptor IL-2 de baja afinidad, receptor IL-7, receptor IL-12, receptor IL-15, receptor IL-18 y receptor IL-21. Las moléculas de superficie de monocitos incluyen CD5, CD14, CD16a, CD32, CD40, CD11b (Mac-1), CD64, DEC205, CD68 y TREM2. Los anticuerpos ilustrativos que pueden proporcionar dominios de unión al antígeno para unirse a estas moléculas de superficie se describen en la presente. Tales anticuerpos, individual y colectivamente, constituyen medios para unirse a una célula inmunitaria (o leucocito) - o a un linfocito o monocito, como se indica.

En ciertas modalidades que comprenden suministrar la carga útil a una célula madre, la entidad de unión se une a una molécula de superficie de HSC o una molécula de superficie MSC. Las moléculas de superficie de HSC incluyen CD117, CD34, CD44, CD90 (Thy1), CD105, CD133, BMPR2 y Sca-1. Las moléculas de superficie MSC incluyen CD70, CD105, CD73, Stro-1, SSEA-4, CD271, CD146, GD2, SSEA-3, SUSD2, Stro-4, MSCA-1, CD56, CD200, PODXL, CD13, CD29, CD44, y CD10 Los anticuerpos ilustrativos que pueden proporcionar dominios de unión al antígeno para unirse a estas moléculas de superficie se han descrito anteriormente en la presente. Tales anticuerpos, individual y colectivamente, constituyen medios para unirse a una célula madre - o a una HSC o MSC, como se indica.

Métodos de tratamiento

En ciertos aspectos, esta descripción proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno que comprenden administrar una tLNP de esta descripción a un sujeto que lo necesita. Cada uno de los géneros, subgéneros y/o especies de LNP o tLNP descritos en la presente, que incluyen aquellos basados en la inclusión o exclusión de lípidos particulares, composiciones lipídicas particulares, cargas útiles particulares y/o entidades de direccionamiento específicas pueden usarse para definir el alcance de los métodos de tratamiento.

En algunas modalidades, un sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, una tLNP se administra de manera sistémica. En una modalidad, una tLNP se administra mediante infusión o inyección intravenosa o subcutánea. En algunas modalidades, una tLNP se administra localmente. En algunas modalidades, una tLNP se administra por inyección de infusión intraperitoneal o intralesional.

En modalidades adicionales, una tLNP puede administrarse en combinación con el estándar de atención para una indicación particular, tal como corticosteroides (p. ej., prednisona) para el manejo de la miositis o la nefritis lúpica. En ciertos casos, la miositis también se trata con metotrexato, que puede combinarse con agentes inmunosupresores (p. ej., azatioprina, micofenolato mofetil, tacrolimus), que generalmente se requieren además de los corticosteroides. Para la nefropatía membranosa, se podrían usar esteroides cíclicos y ciclofosfamida en combinación con tLNP de esta descripción. En otros casos, también puede usarse un anti-IL-6, tal como tocilizumab, como pretratamiento o en combinación con tLNP de esta descripción. Estas combinaciones pueden administrarse de forma concurrente o secuencial.

En otra modalidad, la enfermedad o trastorno es una enfermedad antoinmunitaria. Los ejemplos de enfermedad antoinmunitaria incluyen, sin limitarse a, miocarditis, púrpura trombocitopénica idiopática aguda, púrpura

trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, alveolitis fibrosante, esclerosis múltiple, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, agranulocitosis, anemias hemolíticas autoinmunes, penfigoide ampolloso, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis de progresión rápida, nefropatía por IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, reacciones alérgicas, diabetes insulino-resistente, psoriasis, diabetes mellitus, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves, diabetes, endometriosis, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, púrpura de Henoch-Schonlein, colitis ulcerosa, síndrome de Goodpasture, tromboangitis ubiteras, síndrome de Sjögren, anemia aplásica, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleritis, autoinmunidad mediada por células T o autoinmunidad mediada por células B, enfermedad autoinmune mediada por células B (mediada por anticuerpos), miopatía necrosante, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), miositis por neuromielitis óptica (NMO), trastornos del espectro de la neuromielitis óptica, pénfigo vulgar, esclerosis sistémica, síndrome antisintetasa (miopatía inflamatoria idiopática), nefritis lúpica, nefropatía membranosa, anemia de Fanconi, y vasculitis.

En algunas modalidades, la enfermedad autoinmune es una autoinmunidad mediada por células T o una autoinmunidad mediada por células B. En algunos casos, la enfermedad autoinmunitaria mediada por células B es miositis (tal como miositis antisintetasa), nefritis lúpica, nefropatía membranosa, lupus eritematoso sistémico, vasculitis de anticuerpos citoplasmáticos antineutrofílicos (ANCA), trastorno del espectro de la neuromielitis óptica (NMOSD), miastenia gravis, pénfigo vulgar, artritis reumatoide, dermatomiositis, miopatía necrosante inmunomediada (IMNM), síndrome antisintetasa, polimiositis, esclerosis sistémica, esclerosis sistémica cutánea difusa, esclerosis sistémica cutánea limitada, síndrome antisintetasa (miopatía inflamatoria idiopática), síndrome de la persona rígida, enfermedad asociada a anticuerpos contra la glicoproteína de los oligodendrocitos mieloides (MOGAD), amiloidosis por cadenas ligeras amiloides, esclerosis múltiple, esclerosis múltiple recurrente-remitente, esclerosis múltiple progresiva secundaria, esclerosis múltiple progresiva primaria, esclerosis múltiple progresiva secundaria no activa, síndrome de Sjörgen, nefropatía por IgA, enfermedad relacionada con IgG4, o anemia de Fanconi. En ciertas modalidades, la enfermedad autoinmune mediada por células B es miositis, nefritis lúpica, neuropatía membranosa, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, vasculitis

ANCA, esclerosis múltiple o pénfigo vulgar. En ciertas modalidades, la enfermedad autoinmune mediada por células B es miositis, nefritis lúpica, neuropatía membranosa o esclerodermia. En ciertas modalidades, la enfermedad autoinmune mediada por células B es miositis. En algunos casos, la miositis es miositis antisintetasa. En ciertas modalidades, la enfermedad autoinmune mediada por células B es lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, vasculitis ANCA, esclerosis múltiple o pénfigo vulgar.

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es el rechazo de un órgano alogénico o injerto de tejido. Los anticuerpos y/o células B preexistentes, en su papel como células presentadoras de antígenos, pueden facilitar el rápido rechazo inmune a través de mecanismos conocidos, por lo que agotar una gran cantidad de células B puede ayudar a prevenir el rechazo del aloinjerto.

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es un cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, sin limitación, carcinomas, sarcomas y cánceres hematológicos. En algunas modalidades, el cáncer hematológico es un linfoma, leucemia o mieloma. En algunos casos, el cáncer hematológico es un cáncer de linaje B o linaje T. En algunos casos, el cáncer del linaje B es mieloma múltiple, linfoma difuso de células B grandes, leucemia mieloide aguda, linfoma de células del manto, linfoma folicular, leucemia linfoblástica aguda B, leucemia linfocítica crónica o

síndrome mielodisplásico. En algunas modalidades, el cáncer es un sarcoma. En algunas modalidades, el cáncer es un carcinoma, tal como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer testicular o cáncer pancreático. En algunas modalidades, el cáncer es melanoma.

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno genético tal como una enfermedad genética monogénica. En algunos casos, la enfermedad o trastorno genético es una hemoglobinopatía, por ejemplo, drepanocitosis o β-talasemia.

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno fibrótico. En algunos casos, la enfermedad fibrótica es fibrosis cardíaca, artritis, fibrosis pulmonar idiopática y esteatohepatitis no alcohólica (también conocida como esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica). En otros casos, el trastorno involucra fibroblastos asociados a tumores.

En algunas modalidades, una tLNP de esta descripción comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). Los receptores son quiméricos porque combinan tanto funciones de unión al antígeno como de activación de células T en un solo receptor. En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica un CAR se refiere a una o más especies de ácido nucleico que codifican uno o más CAR; por ejemplo, una sola o múltiples especies de ácido nucleico que codifica una sola especie CAR,

o múltiples especies de ácido nucleico que codifican múltiples especies de CAR. En algunos casos, estas múltiples especies CAR tienen una misma especificidad mientras que en otros casos tienen múltiples especificidades. En algunas modalidades, un CAR de esta descripción es multiespecífico, por ejemplo, biespecífico, que comprende múltiples fracciones de unión al antígeno, cada una específica para antígenos separados. Por ejemplo, el CAR en LCARAIO se dirige a tres antígenos: CD19, CD20 y CD22 (ver, *Blood* (2021) 138 (Supplement 1): 1700). En algunas modalidades, un CAR puede comprender un dominio de unión extracelular que se une específicamente a un antígeno diana, un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular. En algunas modalidades, un CAR puede comprender además uno o más elementos adicionales, que incluyen uno o más péptidos señal, uno o más dominios bisagra extracelulares, o uno o más dominios coestimuladores intracelulares. Los dominios pueden estar directamente adyacentes entre sí, o puede haber uno o más aminoácidos que unan los dominios. El péptido señal puede derivarse de un anticuerpo, un TCR, CD8 u otras proteínas de membrana de tipo 1, preferentemente una proteína expresada en una célula T u otra célula inmunitaria. El dominio transmembrana puede estar asociado con cualquiera de los dominios intracelulares potenciales o de otra proteína de membrana tipo 1, tal como TCR cadena alfa, beta o zeta, CD3 épsilon, CD4, CD8 o CD28, entre otras posibilidades conocidas

en la técnica. El dominio transmembrana puede comprender además un dominio bisagra ubicado entre el dominio de unión extracelular y la región hidrofóbica que abarca la membrana del dominio transmembrana. En algunas modalidades pero no en todas, el dominio bisagra y el dominio transmembrana son secuencias contiguas en la misma proteína fuente. En algunos casos, los dominios de bisagra y de extensión de membrana se derivan de CD28. En otros casos, los dominios bisagra y que abarcan la membrana se derivan de CD8α. El dominio de señalización intracelular puede derivarse de la cadena zeta CD3, DAP10, DAP12, FcγRIII, FcsRI, o un motivo de activación basado en tirosina-inmunorreceptor (ITAM) que lleva dominio citoplasmático, entre otras posibilidades conocidas en la técnica. El dominio coestimulador intracelular puede derivarse de CD27, CD28, 4-1BB, OX40, o ICOS, entre otras posibilidades conocidas en la técnica.

En ciertas modalidades, los CAR se usan para tratar una enfermedad o afección asociada con una célula diana que expresa el antígeno dirigido por el CAR. Por ejemplo, en algunas modalidades, se puede usar un CAR anti-CD19 o anti-CD20 para dirigir y tratar tumores malignos de células B o afecciones o enfermedades autoinmunes mediadas por células B (p. ej., que tiene una entidad de direccionamiento de células inmunitarias, tal como un anticuerpo anti-CD8). En otras modalidades, se puede usar un CAR anti-FAP para dirigirse y tratar tumores sólidos o

fibrosis (p. ej., fibrosis cardíaca, fibroblastos asociados al cáncer), que también pueden tener un resto dirigido a células inmunitarias, tal como un anticuerpo anti-CD8. Los ejemplos de CAR que pueden usarse de acuerdo con las modalidades descritas en la presente incluyen los descritos en US 7.446.190, US 9.328.156, US 11.248.058, US20190321404, WO2019119822, WO2019159193, WO2020011706, WO2022125837, y WO2024086190 (anti-CD19), US 10.287.35 (anti-CD19), US 10.442.867 y US2021/0363245 (anti-CD19 and anti-CD20), US 10.543.263 (anti-CD22), WO2016149578 (anti-CD19 y anti-CD22), US 10.316.101, US 11.623.961 WO2015052538, WO2016166630, WO2017130223, WO2017173256, WO2019085102, WO2019241426, WO2020065330, WO2020038146, WO2020190737, WO2021091945 (anti-BCMA), WO2016130598 (anti-BCMA y sindecán-1), US 10.426.797 (anti-CD33), US 10.844.128 (anti-CD123), US 10.428.141, US 10.752.684, US 11.723.925, WO2016187216, WO2017156479, WO2018197675, WO2020014366, and WO2020198531 (anti-ROR1), WO2022247756, WO2020148677, WO2020092854, & US20230331872 (anti-GPRC5D), WO2016090337, WO2022263855, & WO2024047558 (anti-FCRL5), y US2021/0087295 (anti-FAP), cada uno de los cuales se incorpora como referencia por todo lo que enseña sobre CAR y funcionan genéricamente y con respecto a los CAR especificidad antigénica e indicaciones de diana en la medida en que no sea inconsistente con la presente. Cada

CAR constituye un medio para apuntar una célula inmune, por ejemplo, una célula T, al antígeno indicado.

Los antígenos diana ilustrativos contra los cuales un CAR, TCR o ICE puede tener especificidad incluyen, pero no se limitan a, el agente de maduración de células B (BCMA)†‡, CA9†‡, CD4†‡, CD5†‡, CD19*†‡, CD20 (MS4A1)*†‡, CD22*†‡, FCRL5†‡, GPRC5D†‡, CD23*†‡, CD30 (TNFRSF8)*†‡, CD33*†‡, CD38*†‡, CD44*‡, CD70*†‡, CD133‡, CD174, CD274 (PD-L1)*†‡, CD276 (B7-H3)†‡, CEACAM5*†‡, CLL1‡, CSPG4*‡, EGFR*†‡, EGFRvIII*, EPCAM*†‡, EPHA2*‡, ERBB2*‡, FAP*†‡, FOLH1, FOLR1*†‡, GD2*†‡, GPC3*†‡, GPNMB*‡, IL1RAP†‡, IL3RA*‡, IL13RA2*‡, Kappa*, KDR (VEGFR2)*‡, CD171 (L1CAM)*‡, Lambda*, MET*‡, MSLN (mesothelin)* †‡, MUC1*†‡, NCAM1 (CD56)*‡, PD-1 (CD279)†‡, PSCA‡, ROR1†‡, CD138 (SDC1)*‡, CD319 (SLAMF7)*†‡, CD248 (TEM1)‡, ULBP1, ULBP2, y miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a la proteína G (GPRC5D)†‡ (asociado con leucemias); CD319 (SLAMF7)*†‡, CD38*†‡, CD138†‡, GPRC5D†‡, CD267 (TACI)‡, y BCMA†‡ (asociados con mielomas); y GD2*†‡, GPC3*†‡, HER2*†‡, EGFR*†‡, EGFRvIII*, CD276 (B7H3)†‡, PSMA*†‡, PSCA‡, CAIX (CA9)†‡, CD171 (L1-CAM)*‡, CEA*‡, CSPG4*‡, EPHA2*‡, FAP*†‡, LRRC15†‡, FOLR1*†‡, IL-13Rα*†‡, Mesothelin*†‡, MUC1*†‡, MUC16*†‡, TROP2*†‡, claudina 18,2†‡, y ROR1†‡(asociados con tumores sólidos). (* indica que en la patente de los EE. UU. 11.326.182B2 Tabla 9 o 10, pueden encontrarse anticuerpos ilustrativos con la especificidad indicada a

partir de la cual podría derivarse una entidad de unión. †indica que en Wilkinson & Hale, 2022 pueden encontrarse anticuerpos ilustrativos con la especificidad indicada a partir de los cuales podría derivarse una entidad de unión. Ambas referencias citadas e incorporadas como referencia anterior. ‡indica que en la Base de datos de anticuerpos terapéuticos (TABS) en tabs.craic.com pueden encontrarse anticuerpos ilustrativos con la especificidad indicada a partir de los cuales podría derivarse una entidad de unión. Otros anticuerpos adecuados pueden encontrarse en el Apéndice A, los cuales se incorporan en la presente como referencia para todo lo que enseña sobre los anticuerpos individuales y los antígenos a los que se unen. Muchos de estos antígenos diana son en sí mismos receptores que podrían unirse a su ligando si se expresan en una célula inmunitaria. Por consiguiente, en algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR comprende un ligando de un receptor expresado en la célula diana. En otras modalidades adicionales, el dominio de unión extracelular del CAR comprende un dominio de unión a ligando de un receptor para un ligando expresado en la célula diana. Las ventajas de los aspectos y modalidades descritos en la presente son independientes de la especificidad de la entidad de unión. Como tales, los aspectos y modalidades descritos son generalmente agnósticos a la especificidad

de unión. En ciertas modalidades, puede requerirse una especificidad de unión particular.

En algunas modalidades, la tLNP comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR). En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende ARNm. Los ejemplos de CAR anti-CD19 incluyen aquellos que incorporan una entidad de unión a CD19 derivada del anticuerpo humano 47G4 o el anticuerpo de ratón FMC63. FMC63 y el scFv derivado se han descrito en Nicholson et al., Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165 (1997) y la publicación de solicitud PCT núms. WO 2018/213337 y WO 2015/187528, el contenido completo de cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia por todo lo que enseñan sobre los CAR anti-CD19 y su uso. Los CAR basados en 47G4 se describen en la patente de los EE. UU. núm. 10.287.350 que se incorpora como referencia en la presente por todo lo que enseña acerca de los CAR anti-CD19 y su uso. En algunos casos, el CAR anti-CD19 es el CAR que se encuentra en tisagenlecleucel, lisocabtagene maraleucel, axicabtagene ciloleucel, o brexucabtagene autoleucel. Cada uno de estos CAR constituye un medio para dirigirse a una célula inmune, por ejemplo, una célula T, a CD19. Todo el contenido de cada una de las referencias anteriores en este párrafo se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre el diseño, estructura y actividad de los CAR anti-CD19. En

cualquiera de las modalidades de tLNP mencionadas anteriormente, ciertas modalidades incluyen tLNP que encapsulan una carga útil de CAR CD19 codificada por ARN y que tienen una entidad de direccionamiento a células T, tal como un anticuerpo anti-CD8.

En algunas modalidades, la tLNP comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD20. CD20 es un antígeno que se encuentra en la superficie de las células B ya en la fase pro-B y progresivamente a niveles crecientes hasta la madurez de las células B, así como en las células de la mayoría de las neoplasias de células B. Las células CD20 positivas también se encuentran a veces en casos de enfermedad de Hodgkin, mieloma y timoma. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende ARNm. Los ejemplos de CAR anti-CD20 incluyen aquellos que incorporan una entidad de unión a CD20 derivada de un anticuerpo específico para CD20, que incluye, por ejemplo, Leu16, IF5, 1.5.3, rituximab, obinutuzumab, ibritumomab, ofatumumab, tositumumab, odronextamab, veltuzumab, ublituximab, y ocrelizumab. En algunas modalidades, el CAR anti-CD20 se deriva de un CAR específico para CD20, que incluye, por ejemplo, MB-106 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, ver Shadman et al., Blood 134(Suppl.1):3235 (2019)) UCART20 (Cellectis, www.cellbiomedgroup.com), o C-CAR066 (Cellular Biomedicine Group, ver Liang et al., J. Clin. Oncol. 39(15) suppl:2508

(2021)). En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR anti-CD20 comprende un scFv derivado del anticuerpo monoclonal Leu16, que comprende la región variable de cadena pesada (V_H) y la región variable de cadena ligera (V_L) de Leu16 conectada por un enlazador. Véase Wu et al., Ingeniería de proteínas. 14(12):1025-1033 (2001). Cada uno de estos CAR constituye un medio para dirigirse a una célula inmunitaria, por ejemplo, una célula T, a CD20. El contenido completo de cada una de las referencias anteriores en este párrafo se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre el diseño, estructura y actividad de los CAR anti-CD20. En cualquiera de las modalidades de tLNP mencionadas anteriormente, ciertas modalidades incluyen tLNP que encapsulan una carga útil de CAR CD20 codificada por ARN y que tienen una entidad de direccionamiento a células T, tal como un anticuerpo anti-CD8.

En algunas modalidades, la tLNP comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-BCMA. BCMA es un miembro del receptor de la familia de necrosis tumoral (TNFR) expresado en células del linaje de células B, con mayor expresión en células B diferenciadas terminalmente o linfocitos B maduros. El BCMA interviene en mediar la supervivencia de las células plasmáticas para mantener la inmunidad humoral a largo plazo. La expresión de BCMA se ha relacionado recientemente con una serie de cánceres, como mieloma

múltiple, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, diversas leucemias y glioblastoma. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende ARNm. Los ejemplos de CAR anti-BCMA incluyen aquellos que incorporan una entidad de unión a BCMA derivada de C11D5.3, un anticuerpo monoclonal de ratón como se describe en Carpenter et al., Clin. Cáncer Res. 19(8):2048-2060 (2013). Ver también la publicación de solicitud PCT núm. WO 2010/104949. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR BCMA comprende un scFv derivado de otro anticuerpo monoclonal de ratón, C12A3.2, como se describe en Carpenter et al., Clin. Cáncer Res. 19(8):2048-2060 (2013) y la publicación de solicitud PCT núm. WO2010104949. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del BCMA CAR comprende un scFv derivado de un anticuerpo monoclonal de ratón con alta especificidad para BCMA humano, denominado BB2121 en Friedman *et al.,* Hum. Gene Other. 29(5):585-601 (2018). Véase también la publicación de solicitud PCT núm. WO2012163805. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del BCMA CAR comprende fragmentos variables individuales de dos cadenas pesadas (VHH) que pueden unirse a dos epítopos de BCMA como se describe en Zhao et al., J. Hematol. Oncol. 11(1):141 (2018), también conocido como LCAR-B38M. Ver también la publicación de solicitud PCT núm. WO 2018/028647. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR BCMA comprende un dominio

variable de cadena pesada (FHVH) completamente humano como se describe en Lam et al., Nat. Comun. 11(1):283 (2020), también conocido como FHVH33. Ver también la publicación de solicitud PCT núm. WO 2019/006072. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR BCMA comprende un scFv derivado de CT103A (o CAR0085) como se describe en la patente de los EE. UU. núm. 11.026.975 B2. Otros CAR anti-BCMA se describen en las Publicaciones de la Solicitud de los EE. UU. núms. 2020/0246381 y 2020/0339699. Otros CAR anti-BCMA incluyen Allo-605 (descrito en la publicación de patente de los EE. UU. núm. 20200261503), CT053 (descrito en la patente de los EE. UU. núm. US11.525.006), Descartes-08 (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 10.934.337), LCAR-B38M (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 10.934.363), PersonGen anti-BCMA CAR (descrito en CN114763383), Pregene Bio anti-BCMA CAR (descrito en la publicación de patente de los Estados Unidos núm. US20220218746), el CAR en ciltacabtageno autoleucel (entidad de unión descrita en US20170051068), y el CAR en idecabtageno vicleucel (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 10.383.929). Cada uno de estos CAR constituye un medio para dirigirse a una célula inmune, por ejemplo, una célula T, a BCMA. Otros anticuerpos que comprenden dominios de unión al antígeno anti-BCMA que pueden usarse en la construcción de un CAR incluyen AMG224 (descrito con otros anticuerpos anti-BCMA en la patente de

los EE. UU. núm. 9.243.058), EMB-06 (descrito con otros anticuerpos anti-BCMA en la publicación de patente de Estados Unidos núm. US20230002489), HPN217 (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.136.403), MEDI2228 (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 10.988.546), REGN5459 (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.384.153), SAR445514 (descrito en la publicación de la patente de los EE. UU. núm. 20240034816), SEA-BCMA (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.078.291), TNB-383B (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.505.606), TQB2934 (descrito en la publicación de la patente de los EE. UU. núm. 20230193292), WV078 (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.492.409), alnuctamab (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 10.683.369), belantamab (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 9.273.141), elranatamab (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.814.435), ispectamab (descrito en la publicación de la patente de los EE. UU. núm. 20210130483), linvoseltamab (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.919.965), pavurutamab (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 11.419.933), y teclistamab (descrito en la patente de los EE. UU. núm. 10.072.088). Un CAR anti-BCMA, anti-CD19 biespecífico se describe en WO2022007650. El contenido completo de cada una de las referencias anteriores en este párrafo se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre el diseño, estructura y actividad de los CAR anti-BCMA y

anticuerpos anti-BCMA que pueden proporcionar un dominio de unión al antígeno para un CAR o un acoplador de células inmunitarias. En cualquiera de las modalidades de tLNP mencionadas anteriormente, ciertas modalidades incluyen tLNP que encapsulan una carga útil BCMA CAR codificada por ARN y que tienen entidad de direccionamiento a células T, tal como un anticuerpo anti-CD8.

En algunas modalidades, la tLNP comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-GPRC5D (CAR). GPRC5D es un receptor acoplado a proteína G sin ligandos conocidos y de función poco clara en tejido humano. No obstante, este receptor se expresa en líneas celulares de mieloma y en células plasmáticas de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. GPRC5D ha sido identificado como diana inmunoterapéutica en mieloma múltiple y linfomas de Hodgkin. Los ejemplos de CAR anti-GPRC5D incluyen aquellos que incorporan una entidad de unión a GPRC5D tal como MCARH109 (Mailankody *et al*., N Engl J Med. 387(13): 1196-1206 (2022)), BMS-986393, o OriCAR-017 (Rodriguez-Otero *et al*., Blood Cancer J. 14(1): 24 (2024)). Los ejemplos de CAR anti-GPRC5D incluyen aquellos que incorporan una entidad de unión a GPRC5D derivada de un anticuerpo específico para GPRC5D, por ejemplo, talquetamab (Pillarisetti et al., Blood 135:1232-43 (2020)), o forimtamig. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR anti-GPRC5D comprende un scFv derivado

de un anticuerpo de ratón 6D9 con especificidad para GPRC5D humano (ver creative-biolabs.com/car-t/anti-gprc5d-6d9-h-41bb-cd3-car-pcdcar1-26380.htm). En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR GPRC5D comprende un scFv del anticuerpo anti-GPRC5D unido al dominio coestimulador 4-1BB o CD28 y al dominio de señalización CD3ζ como se describe en Mailankody *et al.,* N Engl J Med. 387(13): 1196-1206 (2022); creative-biolabs.com/car-t/anti-gprc5d-6d9-h-41bb-cd3-car-pcdcar1-26380.htm; y Rodriguez-Otero *et al*., Blood Cancer J. 14(1): 24 (2024). El contenido completo de cada una de las referencias anteriores en este párrafo se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre el diseño, estructura y actividad de los CAR anti-GPRC5D y anticuerpos anti-GPRC5D que pueden proporcionar un dominio de unión al antígeno para un CAR o un acoplador de células inmunitarias, y cada ejemplo constituye un medio para unir GPRC5D. En cualquiera de las modalidades de tLNP mencionadas anteriormente, ciertas modalidades incluyen tLNP que encapsulan una carga útil de CAR anti-GPRC5D codificada por ARN y que tienen una entidad de direccionamiento a células T, tal como un anticuerpo anti-CD8.

En algunas modalidades, la tLNP comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-FCRL5 (CAR). FCRL5 (receptor Fc tipo 5), también conocido como FCRH5, BXMAS1, CD307, CD307E e IRTA2, es un marcador proteico expresado en la superficie de las

células plasmáticas en pacientes con mieloma múltiple. Además, el contacto con FCRL5 estimula la proliferación de células B; por lo tanto, se ha identificado FCRL5 como diana inmunoterapéutica para esta enfermedad. Los ejemplos de CAR anti-FCRL5 incluyen aquellos que incorporan una entidad de unión a FCRL5, tales como los descritos en WO2016090337, WO2017096120, WO2022263855, y WO2024047558. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR anti-FCRL5 comprende un scFv con especificidad para FCRL5, tal como ET200-31, ET200-39, ET200-69, ET200-104, ET200-105, ET200-109 o ET200-117. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR anti-FCRL5 comprende un scFv derivado de un anticuerpo de ratón con especificidad para FCRL5 humano. Tales anticuerpos incluyen 7D11, F25, F56 y F119, como se describe en Polson et al., Int. Immunol., 18(9): 1363-1373 (2006); Franco *et al*., J. Immunol. 190(11): 5739-5746 (2013); Ise *et al*., Clin. Cáncer Res. 11(1): 87-96 (2005); y Ise *et al*., Clin. Chem. Lab. Med. 44(5): 594-602 (2006), todos los cuales se incorporan en la presente como referencia. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR anti-FCRL5 comprende una entidad de unión derivada del dominio de unión al antígeno de un anticuerpo o nanocuerpo anti-FCRL5, que incluye cevostamab, 2A10H7, 307307, 2A10D6, 13G9, 10A8, 509f6, EPR27365-87, EPR26948-19 o EPR26948-67, o como se describe en WO2016090337, WO2017096120,

WO2022263855, o WO2024047558. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR anti-FCRL5 comprende una entidad de unión derivada de un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a FCRL5, tal como los descritos en Elkins et al., Mol. Cancer Ther. 11(10): 2222-2232 (2012). En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR anti-FCRL5 se une a un dominio coestimulador, tal como un dominio coestimulador 4-1BB o CD28, y un dominio de señalización, tal como un dominio de señalización CD3ζ. El contenido completo de cada una de las referencias anteriores en este párrafo se incorpora como referencia por todo lo que enseñan sobre el diseño, estructura, propiedades, y actividad de los CAR anti-FCRL5 y anticuerpos anti-FCRL5 que pueden proporcionar un dominio de unión al antígeno para un CAR o un acoplador de células inmunitarias. Cada ejemplo constituye un medio para unir FCRL5. En cualquiera de las modalidades de tLNP mencionadas anteriormente, ciertas modalidades incluyen tLNP que encapsulan una carga útil de CAR FCRL5 codificada por ARN y que tienen una entidad de direccionamiento a células T, tal como un anticuerpo anti-CD8.

En algunas modalidades, la tLNP comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más CAR que se dirigen a múltiples antígenos. En algunas modalidades, la tLNP comprende ARNm distintos que están encapsulados juntos en una sola tLNP, cada ARNm que codifica un CAR

monoespecífico. Por ejemplo, la tLNP puede comprender un ARNm que codifica un CAR anti-CD19 y un ARNm que codifica un CAR anti-CD20, un ARNm que codifica un CAR anti-CD19 y un ARNm que codifica un CAR anti-BCMA, un ARNm que codifica un CAR anti-GPRC5D y un ARNm que codifica un CAR anti-BCMA, o un ARNm que codifica un CAR anti-BCMA. En algunas modalidades, la tLNP comprende un solo ARNm que codifica un ARNm bicistrónico que codifica dos CAR monoespecíficos. Por ejemplo, el ARNm bicistrónico puede codificar un CAR anti-CD19 y un CAR anti-CD20, un CAR anti-CD19 y un CAR anti-BCMA, un CAR anti-GPRC5D y un CAR anti-BCMA, o un CAR anti-FCRL5 y un CAR anti-BCMA. En algunas modalidades, la tLNP comprende un solo ARNm que codifica un ARNm que codifica un CAR multiespecífico. En algunas modalidades, la tLNP comprende un solo ARNm que codifica un ARNm que codifica un CAR biespecífico. Por ejemplo, el ARNm puede codificar un CAR biespecífico anti-CD19 y anti-CD20, un CAR biespecífico anti-CD19 y anti-BCMA, un CAR biespecífico anti-GPRC5D y anti-BCMA, o un CAR biespecífico anti-FCRL5 y anti-BCMA. En algunas modalidades, múltiples tLNP pueden coformularse en una combinación con cada tLNP que comprende un ARNm. En algunos casos, el único ARNm codifica un CAR monoespecífico. Por ejemplo, dos tLNP pueden coformularse con una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-CD19 y la otra tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-CD20,

una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-C19 y la otra tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-BCMA, una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-GPRC5d y la otra tLNP que comprende un ARNm que comprende un CAR anti-GPRC5d y la otra tLNP que comprende un ARNm. El ADN que codifica un CAR anti-BCMA, o una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-FcRL5 y la otra tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-BCMA. En algunas modalidades, pueden coadministrarse múltiples tLNP en una combinación, ya sea simultánea o secuencialmente, en donde cada uno comprende un ARNm. En algunos casos, el único ARNm codifica un CAR monoespecífico. Por ejemplo, dos tLNP pueden coadministrarse en una combinación, ya sea simultánea o secuencialmente, con una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-CD19 y la otra tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-CD20, una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-C19 y la otra tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-BCMA, una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-GPRC5d y la otra tLNP que comprende un ARNm que comprende un CAR anti-GPRC5d y la otra tLNP que comprende un ARNm. El ADN que codifica un CAR anti-BCMA, o una tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-FcRL5 y la otra tLNP que comprende un ARNm que codifica un CAR anti-BCMA. El direccionamiento puede mediarse mediante cualquiera de los

CAR descritos en la presente. Además de combinaciones de dos especificidades, también son posibles combinaciones de orden superior, especialmente con el uso de CAR biespecíficos y triespecíficos. Siguiendo estos patrones, modalidades adicionales están constituidas *mutatis mutandis* por otras tLNP o combinaciones de tLNP que comprenden un(os) ácido(s) nucleico(s) que codifica uno o más CAR que se dirigen a múltiples antígenos que implican estas y otras especificidades CAR descritas en la presente.

La terapia celular que implica la administración de células modificadas genéticamente a un paciente generalmente ha requerido un acondicionamiento agotador o ablativo para facilitar el injerto de las células modificadas genéticamente (por ejemplo, células T o HSC). En el contexto de la ingeniería *in vivo* y la reprogramación tal acondicionamiento sería contraproducente ya que el condicionamiento eliminaría las mismas células que se diseñarán. En su lugar, se puede utilizar el condicionamiento activador y/o adyuvante para aumentar el número de células susceptibles de ingeniería, para movilizarlas al locus de patología, para hacer que el locus de patología (por ejemplo, un microambiente tumoral) sea más susceptible al tratamiento, para aumentar el efecto terapéutico, etc., según sea apropiado para la enfermedad particular y el tratamiento primario. Los agentes acondicionadores incluyen modificadores de respuesta biológica (BRM) que pueden

suministrarse directamente a un sujeto o codificarse en moléculas de ácido nucleico, que incluye como ARNm, y suministrarse a un sujeto usando las composiciones y formulaciones de LNP y tLNP descritas en la presente.

Por consiguiente, ciertos aspectos son métodos de acondicionamiento de un sujeto que recibe un agente de ingeniería que comprenden proporcionar una tLNP que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un agente acondicionador para el sujeto antes, simultáneamente con, o después de la administración del agente de ingeniería. En diversas modalidades, un agente acondicionador codificado comprende un agonista del receptor de cadena γ-cadena, una quimiocina inflamatoria, una citocina pan-activadora, un potenciador de la actividad celular presentadora de antígeno, un inhibidor del punto de control inmunitario o un anticuerpo anti-CCR4. En algunas modalidades, la citocina del receptor de cadena γ comprende IL-15, IL-2, IL-7, o IL-21. En algunas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario comprende un anticuerpo anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-TIM-3 o anti-LAG-3. En algunas modalidades, la quimiocina inflamatoria comprende CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL1, CXCL2, CXCL-8, CXCL9, CXCL10 o CXCL11. En algunas modalidades, el potenciador de la actividad celular presentadora de antígeno comprende ligando Flt-3, gm-CSF, o IL-18. En algunas modalidades, una citocina pan-activadora comprende IL-12 de IL 18. En ciertas modalidades, un agente

acondicionador comprende un factor de transcripción, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en factor nuclear de células T activadas (NFAT), NF-κB, T-bet, transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT4), Blimp-1, c-Jun y eomesodermina (Eomes) y la tLNP está dirigido a una célula T. En algunas modalidades, una tLNP que encapsula el agente acondicionador codificado por ácido nucleico se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante infusión o inyección intravenosa o subcutánea. En otras modalidades, la tLNP se administra localmente, por ejemplo, mediante inyección o infusión intralesional o intraperitoneal. En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico que codifican el agente acondicionador y el agente de ingeniería están encapsuladas en la misma tLNP mientras que en otras modalidades están encapsuladas en tLNP separadas. Estos dos modos de suministro de agentes acondicionadores se describen con mayor detalle en la solicitud PCT PCT/US 2023/072426 que se incorpora como referencia por todo lo que enseña sobre los agentes acondicionadores y su suministro de LNP o tLNP que no sea incompatible con la presente descripción. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende ARNm.

El término “tratar” o “tratamiento” incluye ampliamente cualquier tipo de actividad de tratamiento, que incluye la mitigación, cura o prevención de la enfermedad, o un aspecto de esta, en el hombre u otros animales, o

cualquier actividad que de otra manera afecte la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre u otros animales. La actividad de tratamiento incluye la administración de los medicamentos, formas de dosificación y composiciones farmacéuticas descritas en la presente a un paciente, especialmente de acuerdo con los diversos métodos de tratamiento descritos en la presente, ya sea por un profesional sanitario, el propio paciente o cualquier otra persona. Las actividades de tratamiento incluyen las órdenes, instrucciones y consejos de profesionales de la salud, como médicos, asistentes médicos, enfermeras practicantes y similares, que después son atendidos por cualquier otra persona, incluidos otros profesionales de la salud o el propio paciente. En algunas modalidades, el aspecto de órdenes, instrucciones y consejos de la actividad de tratamiento también puede incluir alentar, inducir u ordenar que se elija un medicamento particular, o una combinación de estos, para el tratamiento de una condición -y que el medicamento se use realmente- aprobando la cobertura del seguro para el medicamento, negando la cobertura de un medicamento alternativo, que incluye el medicamento en, o excluyendo un medicamento alternativo, de un formulario de medicamentos, u ofreciendo un incentivo financiero para usar el medicamento, como podría hacerlo una compañía de seguros o una compañía de administración de beneficios farmacéuticos, y lo similar. En algunas

modalidades, la actividad de tratamiento también puede incluir alentar, inducir u ordenar que un medicamento particular se elija para el tratamiento de una afección, y el medicamento se use realmente, mediante una norma de política o práctica como podría ser establecido por un hospital, clínica, organización de mantenimiento de la salud, práctica médica o grupo de médicos, y lo similar. Todas esas órdenes, instrucciones y consejos deben verse como condicionantes de la recepción del beneficio del tratamiento al cumplimiento de la instrucción. En algunos casos, el paciente también recibe un beneficio económico por el cumplimiento de dichas órdenes, instrucciones y consejos. En algunos casos, el profesional de la salud también recibe un beneficio financiero por el cumplimiento de tales órdenes, instrucciones y consejos.

Algunas modalidades de estos métodos de tratamiento comprenden la administración de una cantidad efectiva de un compuesto o una composición descrita en la presente. Algunos casos se refieren a una cantidad terapéuticamente (o profilácticamente) efectiva. Una cantidad terapéuticamente efectiva no es necesariamente una cantidad clínicamente efectiva, es decir, si bien puede haber beneficio terapéutico en comparación con ningún tratamiento, un método de tratamiento puede no ser equivalente o superior a un tratamiento estándar de atención existente en algún momento. Otros casos se refieren a una cantidad

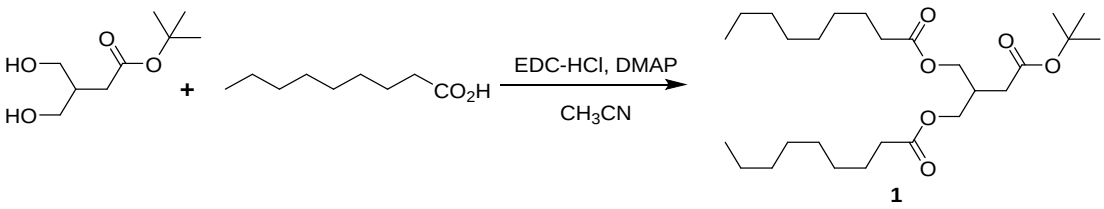
farmacológicamente efectiva, es decir, una cantidad o dosis que produce un efecto que se correlaciona con o es razonablemente predictivo de la utilidad terapéutica (o profiláctica). Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" es sinónimo de "dosis terapéuticamente efectiva" y significa al menos la dosis mínima de un compuesto o composición divulgada en la presente necesaria para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado. De manera similar, una dosis farmacológicamente efectiva significa al menos la dosis mínima de un compuesto o composición descrita en la presente necesaria para lograr el efecto farmacológico deseado. Algunas modalidades se refieren a una cantidad suficiente para prevenir o interrumpir un proceso de enfermedad, o para reducir la extensión o duración de la patología. Algunas modalidades se refieren a una dosis suficiente para reducir un síntoma asociado con la enfermedad o afección que se está tratando.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar diversas modalidades. Como tal, las modalidades específicas analizadas no deben construirse como limitaciones en el alcance de esta descripción. Es evidente para un experto en la técnica que pueden realizarse diversos equivalentes, cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de esta descripción, y se entiende que tales modalidades equivalentes deben incluirse en la presente. Además, todas las referencias citadas en la descripción se

incorporan en la presente como referencia en su totalidad, como si se hubieran expuesto completamente en la presente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (1)



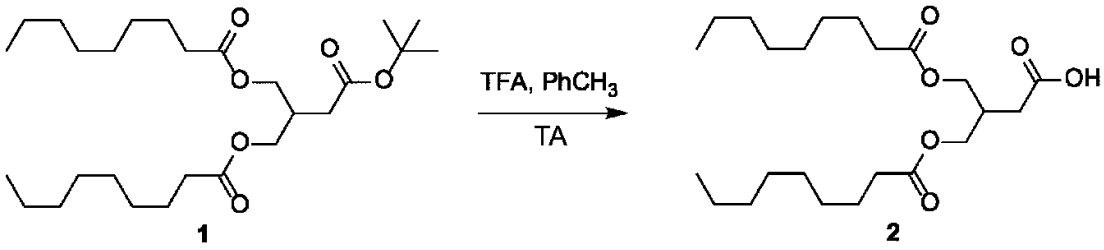
1

A una solución de 4-hidroxi-3-(hidroximetil)butanoato de terc-butilo (Org. Proc. Res. Dev. 2011, 15, 515; 44,0 g, 0,231 mol), en acetonitrilo (900 ml), enfriado en un baño de agua helada bajo nitrógeno, se añadió ácido nonanoico (76,86 g, 0,486 mol), seguido de la adición de DMAP (28,22 g, 0,231 mol) y EDC-HCl (97,8 g, 0,513 mol). La mezcla se agitó durante 1 h, después se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 12 horas. La solución se fundió en n-heptano (1,40 l) y agua (0,9 l) y la fase orgánica se separó. La fase orgánica se lavó dos veces con MeOH: 10 % de ácido cítrico ac. (0,90 l), seguido de dos veces de lavado con una mezcla de MeOH:H2O:trietilamina (0,90 l, 3:1:0,1). La capa

orgánica se lavó con 10 % de NaCl ac., se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró in vacuo para proporcionar dinonanoato de 2-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil 1(90,20 g, 96,3 % de pureza por HPLC, 0,185 mol, 80 % de rendimiento) como un líquido viscoso amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,12 (m, 4H), 2,53 (m, 1H), 2,29-2,34 (6H), 1,52-1,64 (4H), 1,46 (s, 9H), 1,16-1,37 (24H), 0,89 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H); **LCMS:** RT = 1,748, calc. para $C_{27}H_{50}O_6$ menos t-butilo + H^+: 415,31. Encontrado: 415,20.

Ejemplo 2: Síntesis de ácido 4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoico (2)



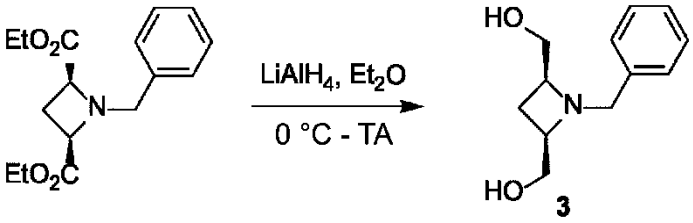
1 2

A una solución de 1 (90,0 g, 96,3 % de pureza, 0,184 mol) en tolueno (0,41 l), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno, se añadió TFA (208,46 g, 1,83 mol, 140 ml) durante un período de 30 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla se calentó hasta 15° y la mezcla se agitó durante 18 horas. La solución enfriada se fundió en n-heptano (1,50 l) y la solución resultante se extrajo con 5 % de fosfato de potasio ac. (2,0 l) y se recogió la fase acuosa.

La fase orgánica se extrajo con MeOH:H2O:trietilamina (2,0 l, 5:1:0,1), y las fases ac. combinadas se fundieron en n-heptano (1,80 l) y 1,2 M de HCl ac. (1,0 l). La capa orgánica se separó, se lavó con MeOH:agua (1,0 l, 1:1), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró in vacuo para proporcionar ácido 2 (69,0 g, 96,1 % de pureza por HPLC, 0,177 mol, 96 % de rendimiento) como un aceite viscoso amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,13 (m, 4H), 2,58 (m, 1H), 2,48 (m, 2H), 2,32 (m, 4H), 1,63 (m, 4H), 1,20-1,37 (24H), 0,89 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H); **LCMS:** RT = 1,723, calculado para $C_{23}H_{42}O_6$+H^+ 415,31. Encontrado 415,30.

Ejemplo 3: Síntesis de *rel*-((2S,4R)-1-bencilazetidina-2,4-diil)dimetanol (3)



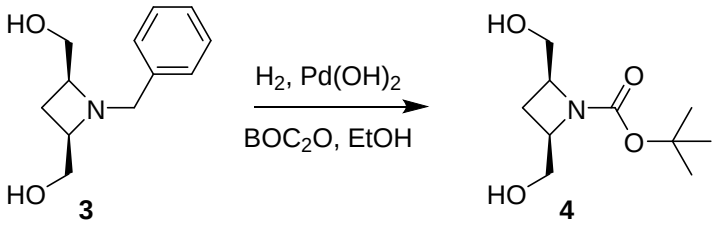
3

A una solución de rel-(2S,4R)-1-bencilazetidina-2,4-dicarboxilato de dietilo disponible comercialmente (10,0 g, 34,32 mmol) en éter (200 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno, se añadió LiAlH4 (2,74 g, 74,08 mmol) en porciones durante un período de 15 minutos. El baño de enfriamiento se retiró, y la mezcla se dejó

calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 5 horas. La mezcla se enfrió en un baño de agua helada y la reacción se apagó cuidadosamente mediante agua helada (200 ml). La fase orgánica se separó, la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 300 ml), las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 300 ml), se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron in vacuo para proporcionar 3 crudo (4,00 g, 83,3 % de pureza HPLC, 16,1 mmol, 47 % de rendimiento) como un líquido viscoso amarillo.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7,26-7,33 (5H), 4,03 (m, 1H), 3,62-3,77 (3H), 3,49-3,63 (4H), 2,26 (brs, 2H), 2,13 (m, 2H); **LCMS:** RT = 0,91, calculado para $C_{12}H_{17}NO_2 + H^+$ 208,13. Encontrado 208,10.

Ejemplo 4: Síntesis de rel-(2S,4R)-2,4-bis(hidroximetil)azetidina-1-carboxilato de terc-butilo (4)

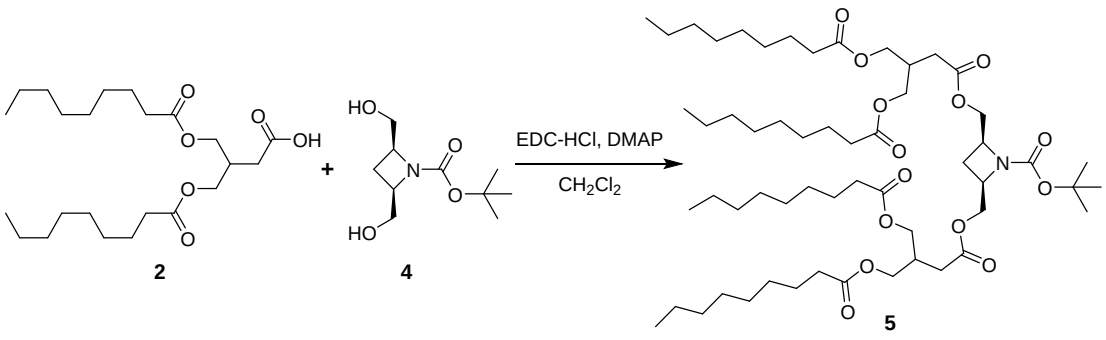


A una solución de 3 (4,00 g, 16,1 mmol) en EtOH (200 ml) se añadió $Pd(OH)_2$ (0,80 g, 20 % p/p y BOC_2O (5,27 g, 2,15 mmol), y la mezcla se colocó bajo 30 psi de

hidrógeno. La mezcla se sacudió bajo 30 psi de hidrógeno durante 20 horas, después el catalizador se retiró por filtración a través de una almohadilla de Celite, la torta filtrante se enjuagó con EtOH (50 ml) y los filtrados combinados se concentraron in vacuo para dar crudo 4 como un aceite amarillo. El crudo 4 se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice (250 g, malla 100-200), se empaquetó y se eluyó con éter de petróleo-EtOA (4:1). Las fracciones que contenían 4 se agruparon y se concentraron in vacuo para proporcionar 4 (2,10 g, 97,9 % de pureza HPLC, 9,20 mmol, 57 % de rendimiento) como un aceite transparente amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,31 (m, 2H), 3,80 (dd, *J* = 11,7, 2,7 Hz, 2H), 3,67 (dd, *J* = 11,7, 5,7 Hz, 2H), 2,93 (brs, 2H), 2,22 (m, 1H), 1,94 (m, 1H), 1,49 (s, 9H).

Ejemplo 5: Síntesis de tetranonanoato de ((((*rel*-(2S,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)azetidina-2,4-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (5)

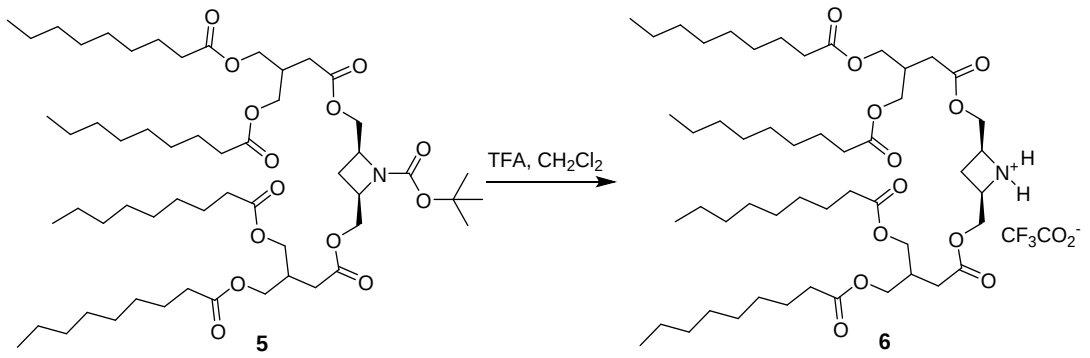


2 4 5

A la solución de 4 (2,00 g, 9,205 mmol) en diclorometano (100 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (8,01 g, 19,331 mmol), DMAP (1,12 g, 9,205 mmol) y EDC-HCl (4,41 g, 23,012 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (500 ml). La solución resultante se lavó con MeOH/agua (10:1, 2 x 200 ml) y la fase orgánica se concentró in vacuo para proporcionar el crudo 5. El crudo 5 se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice (500 g, malla 100-200, empaquetado con n-heptano, eluido con un gradiente de n-heptano:EtoAc 100:0 a 90:10). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para dar 5 (7,00 g, 97,33 % de pureza HPLC, 6,93 mmol, 75,3 % de rendimiento) como un aceite amarillo claro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,25-4,37 (6H), 4,18 (m, 8H), 2,62 (m, 2H), 2,50 (m, 4H), 2,42 (m, 1H), 2,33 (t, *J* = 7,0 Hz, 8H), 1,83 (m, 1H), 1,52-1,60 (8H), 1,45 (s, 9H), 1,18-1,37 (40H), 0,89 (t, *J* = 7,9 Hz, 12H); **LCMS:** RT = 2,24, calculado para $C_{56}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1032,70, encontrado 1032,70.

Ejemplo 6: Síntesis de trifluoroacetato de *rel*-(2S,4R)-2,4-bis(((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)metil)azetidin-1-io (6)

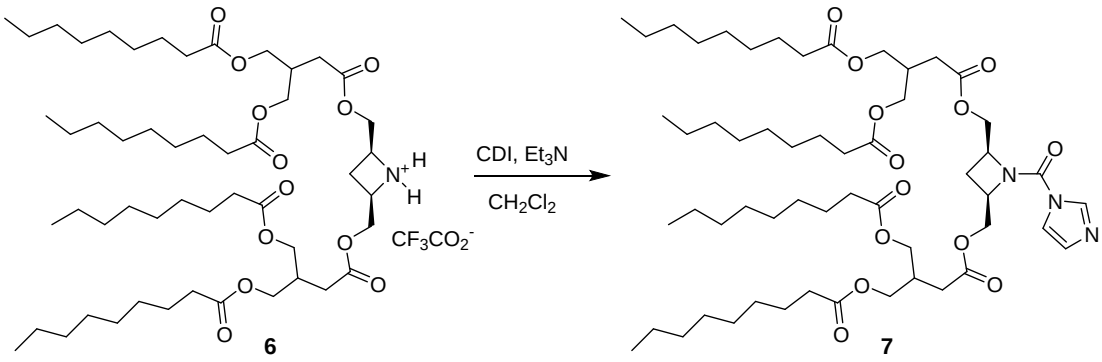


5 **5** **6**

A una solución de 5 (7,00 g, 6,928 mmol) en diclorometano (35 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió ácido trifluoroacético (14 ml, 20,85 g, 10 0,183 mol) durante un período de 10 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 3 horas a temperatura ambiente, después se concentró in vacuo para proporcionar crudo 6. La sal de amonio 6 se disolvió en n-heptano (500 ml) y la solución se lavó con salmuera (2 x 200 ml), agua (200 ml), después la 15 solución se concentró in vacuo para proporcionar 6 como un aceite amarillo claro (6,80 g, HPLC 91,82 % de pureza).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,77 (brs, 2H), 4,44 (m, 4H), 4,02-4,25 (9H), 2,72 (brm, 1H), 2,38-2,5 (8H), 2,33 (m, 8H), 1,51-1,62 (8H), 1,20-1,37 (40H), 0,88 (m, 20 12H); **LCMS:** RT = 1,72, calculado para $C_{51}H_{92}NO_{12}$ 910,55. Encontrado 910,70.

Ejemplo 7: Síntesis de tetranonanoato de ((((*rel*-(2S,4R)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)azetidina-2,4-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (7)



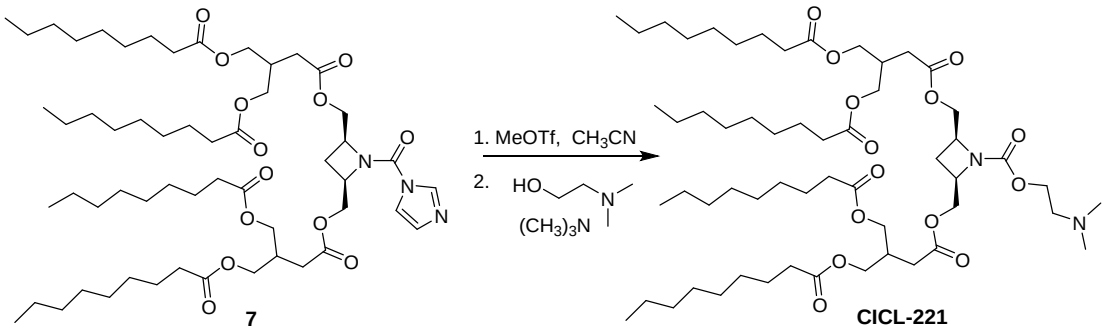
6 7

A una solución de 6 (6,50 g, 91,82 % puro por HPLC) en diclorometano (180 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno, se añadió CDI (10,44 g, 64,44 mmol) y Et3N (3,26 g, 32,27 mmol), la mezcla se dejó agitar durante 1 hora, después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La reacción se inactivó con 0,5 M de HCl ac. (150 ml) y la fase orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 300 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron in vacuo y el aceite residual se disolvió en n-heptano (300 ml). La solución de n-heptano se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 200 ml) y el solvente se eliminó in vacuo para proporcionar 7 (6,00 g,

97,24 % de pureza HPLC, 5,97 mmol, 92 % de rendimiento en 2 etapas) como un aceite amarillo claro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,09 (s, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,11 (s, 1H), 4,52 (m, 2H), 4,44 (m, 4H), 4,12 (m, 8H), 2,75 (m, 1H), 2,57 (m, 2H), 2,43 (m, 4H), 2,28 (m, 8H), 2,07 (m, 1H), 1,52-1,64 (8H), 1,18-1,32 (40H), 0,88 (t, *J* = 7,20 Hz, 12H); **LCMS:** RT = 1,74, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,68. Encontrado 1004,70.

Ejemplo 8: Síntesis de tetranonanoato de ((((*rel*-(2S,4R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)azetidina-2,4-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-221)

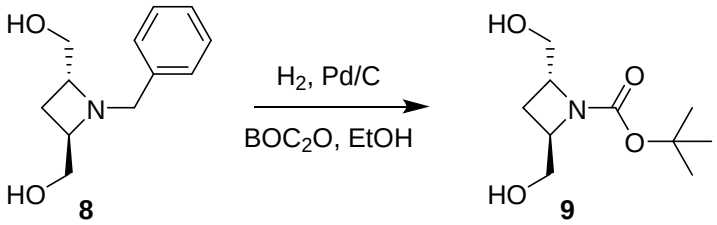


A una solución de 7 (5,80 g, 5,775 mmol), en CH3CN (120 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió trifluorometanosulfonato de metilo (MeOTf, 1,14 g, 6,947 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en CH_3CN

(2,4 M, 11,55 ml, 27,7 mmol) durante un período de 10 minutos seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,77 g, 8,638 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante 1 minutos a 0 °C, después se dejó calentar a 60 °C y se agitó durante 120 horas. La mezcla de reacción se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (400 ml). La solución se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 150 ml), y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. La filtración proporcionó una solución en heptano de CICL-221 crudo a la que se añadió gel de sílice (15 g, tipo: ZCX-2, malla 100-200). El solvente se eliminó a vacío y el gel de sílice impregnado se colocó encima de una columna en gel de sílice combi-flash (150 g, tipo: ZCX-2, malla 100-200). La columna se eluyó con un gradiente de n-heptano:acetato de etilo de 100:0 a 35:65. Las fracciones calificadas (eluidas a 50:50) se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar CICL-221 (1,876 g, 1,83 mmol, 32 %) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,27 (m, 8H), 4,13 (m, 8H), 2,58 (m, 4H), 2,40-2,52 (5H), 2,23-2,34 (14H), 1,89 (m, 1H), 1,60 (m, 8H), 1,18-1,38 (40H), 0,88 (t, *J* = 6,90 Hz, 12H); HPLC (RT = 20,11) 96,57 % de pureza; **LCMS:** RT = 1,215, calculado para $C_{56}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,70.

Ejemplo 9: Síntesis de *rel*-(2R,4R)-2,4-bis(hidroximetil)azetidina-1-carboxilato de terc-butilo (9)

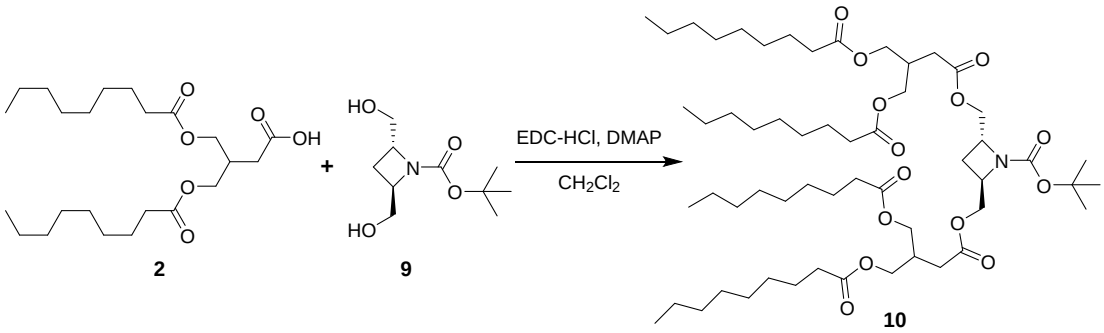


A una solución de 8 (7,90 g, 38,11 mmol, Tetrahedron Asymmetry 2001, 12, 605) en EtOH (240 ml) se añadió 10 % de Pd/C (1,60 g, 20 % p/p y BOC2O (12,48 g, 57,16 mmol), y la mezcla se colocó bajo 30 psi de hidrógeno. La mezcla se sacudió bajo 30 psi de hidrógeno durante 30 horas, después el catalizador se retiró por filtración a través de una almohadilla de Celite, la torta filtrante se enjuagó con EtOH (100 ml) y los filtrados combinados se concentraron in vacuo para dar crudo 9 como un aceite amarillo. El crudo 9 se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice (300 g, malla 100-200), se empaquetó y se eluyó con éter de petróleo-EtOA (4:1). Las fracciones que contenían 9 se agruparon y se concentraron in vacuo para proporcionar 9 (6,90 g, 98,05 % de pureza HPLC, 31,63 mmol, 83 % de rendimiento) como un aceite transparente amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,58–4,23 (3H), 3,93–3,62 (4H), 2,32 (brs, 1H), 2,00 (brm, 2H), 1,47 (s, 9H);

LCMS: RT = 0,897, calculado para $C_{10}H_{19}NO_4$ + H^+ 218,14. Encontrado 218,10.

Ejemplo 10: Síntesis de tetranonanoato de ((((*rel*-(2R,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)azetidina-2,4-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (10)

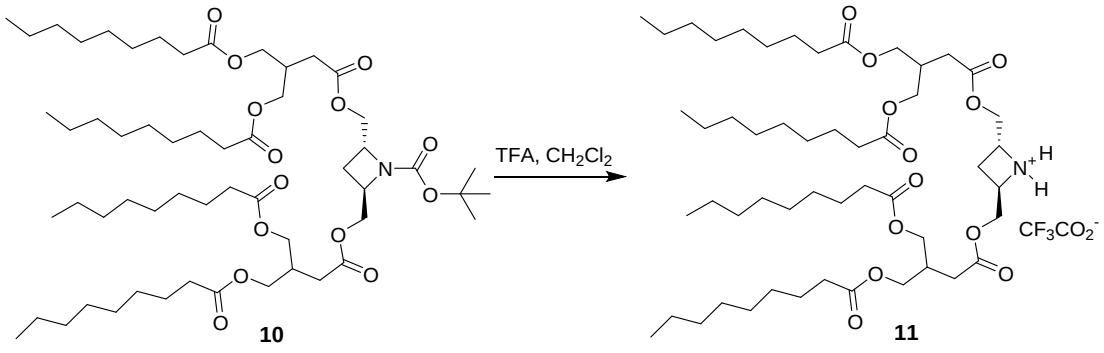


A la solución de 9 (2,00 g, 9,205 mmol) en diclorometano (100 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (8,01 g, 19,331 mmol), DMAP (1,12 g, 9,205 mmol) y EDC-HCl (4,41 g, 23,012 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (500 ml). La solución resultante se lavó con MeOH/agua (10:1, 2 x 200 ml) y la fase orgánica se concentró in vacuo para proporcionar el crudo 10. El crudo 10 se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice (500 g, malla 100-200, empaquetado con n-heptano, eluido con un gradiente de n-

heptano:EtoAc 100:0 a 90:10). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para dar 10 (7,00 g, 95,94 % de pureza HPLC, 6,93 mmol, 75,3 % de rendimiento) como un aceite amarillo claro.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,20-4,52 (5H), 4,13 (m, 8H), 2,60 (m, 2H), 2,46 (m, 4H), 2,30 (t, *J* = 7,5 Hz, 8H), 2,19 (m, 2H), 1,52-1,65 (9H), 1,40 (s, 9H), 1,18-1,30 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT = 2,235, calculado para $C_{56}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1032,70, encontrado 1032,80.

Ejemplo 11: Síntesis de trifluoroacetato de *rel*-(2R,4R)-2,4-bis(((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)metil)azetidin-1-io (11)



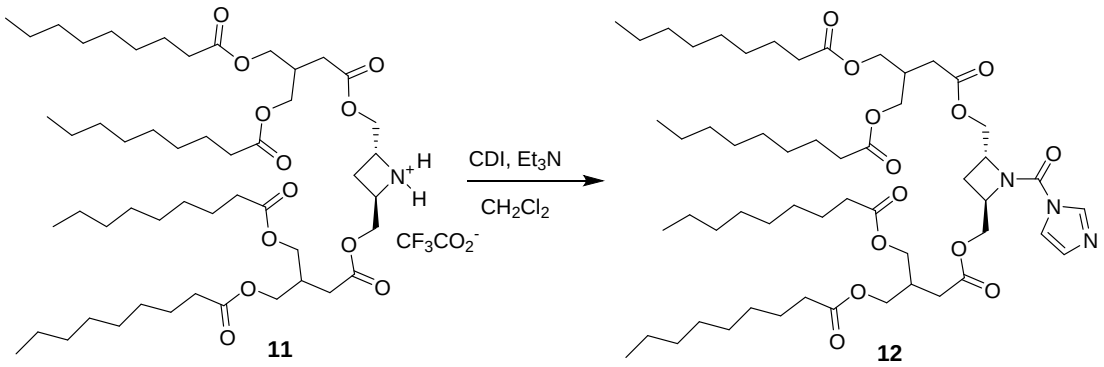
10 **11**

A una solución de 10 (7,00 g, 6,928 mmol) en diclorometano (35 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió ácido trifluoroacético (14 ml, 20,85 g, 0,183 mol) durante un período de 10 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 3 horas a temperatura

ambiente, después se concentró in vacuo para proporcionar crudo 11. La sal de trifluoroacetato de amonio 11 se disolvió en n-heptano (500 ml) y la solución se lavó con salmuera (2 x 200 ml), agua (200 ml), después la solución se concentró in vacuo para proporcionar 6 como un aceite amarillo claro (6,80 g, 91,63 % de pureza HPLC).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,66 (brm, 2H), 4,46 (m, 4H), 4,16 (m, 8H), 2,42-2,65 (9H), 2,30 (t, *J* = 7,4 Hz, 8H), 1,55-1,65 (9H), 1,20-1,40 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT = 1,724, calculado para $C_{51}H_{92}NO_{12}$ 910,66, encontrado 910,70.

Ejemplo 12: Síntesis de tetranonanoato de ((((*rel*-(2R,4R)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)azetidina-2,4-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (12)



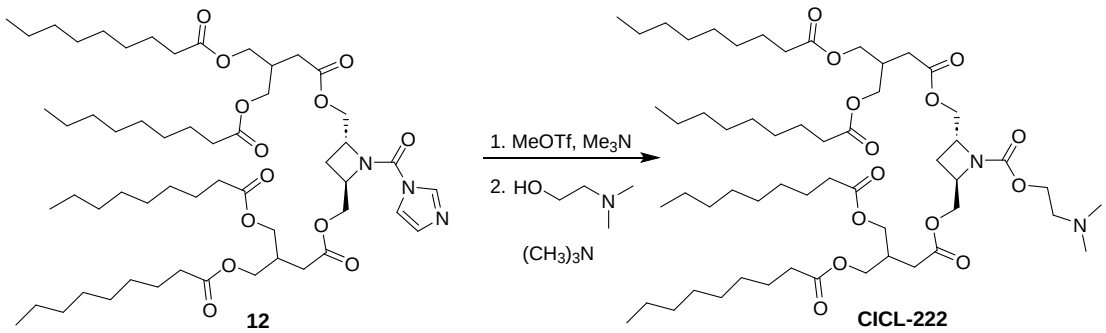
11 **12**

A una solución de 11 (6,50 g, 91,63 % puro por HPLC) en diclorometano (180 ml), enfriada en un baño de agua

helada bajo nitrógeno, se añadió CDI (10,44 g, 64,44 mmol) y Et3N (3,26 g, 32,27 mmol), la mezcla se dejó agitar durante 1 hora, después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La reacción se inactivó con 0,5 M de HCl ac. (150 ml) y la fase orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 300 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron in vacuo y el aceite residual se disolvió en n-heptano (300 ml). La solución de n-heptano se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 200 ml) y el solvente se eliminó in vacuo para proporcionar 12 (6,00 g, 96,67 % de pureza HPLC, 5,97 mmol, 93 % de rendimiento en 2 etapas) como un aceite amarillo claro.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 0,87 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 4,85 (brm, 2H), 4,08-4,30 (12H), 2,57 (m, 2H), 2,26-2,51 (14H)1,62 (m, 8H), 1,23-1,40 (40H), 0,89 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,743, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,68, encontrado 1004,70.

Ejemplo 13: Síntesis de tetranonanoato de ((((*rel*-(2S,4R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)azetidina-2,4-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-222)

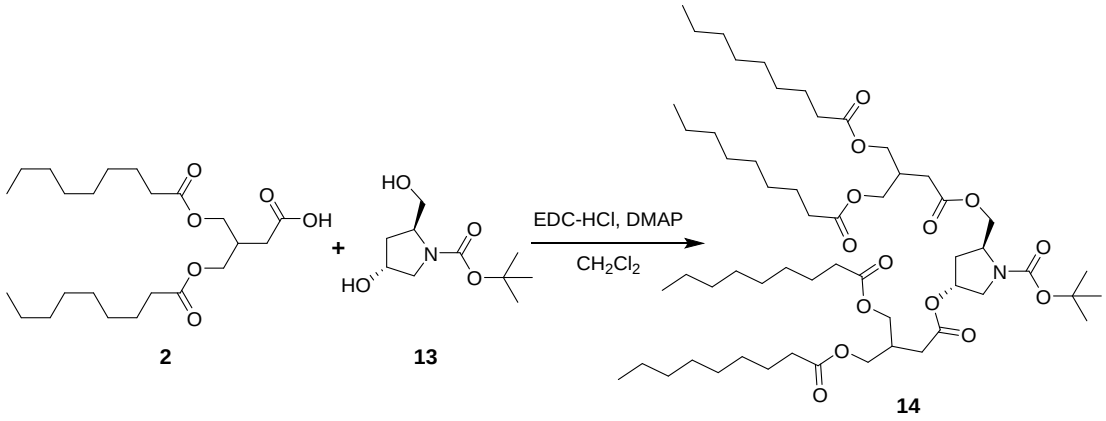


Una solución de 12 (5,80 g, 5,78 mmol), en acetonitrilo (120 ml) bajo nitrógeno, se enfrió en un baño de agua helada, después se añadió MeOTf (1,14 g, 6,95 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 horas, después se añadió trimetilamina (11,55 ml, 2M en THF, 23,10 mmol) durante un período de 5 minutos, seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,77 g, 8,64 mmol) en una porción. La solución resultante se agitó durante 1 hora a 0 °C, después se calentó a temperatura ambiente, seguido de calentamiento en un baño de aceite a 75 °C durante 8 días. Después de enfriar a temperatura ambiente, el solvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en n-heptano (400 ml). La solución de n-heptano se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 150 ml), y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo produjeron CICL-222 crudo, que se disolvió en CH_3CN (10 ml), y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna XB-fenilo 19x250 mm, 5 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH_3CN; velocidad de flujo 20 ml/min; gradiente 50 % B a 90 % B en 18 minutos; longitud

de onda 200 nM). Las fracciones calificadas se concentraron al vacío, para eliminar CH_3CN, y el pH del El residuo se ajustó a 8,0 con 2 % de Na_2CO_3 ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (3 x 100 ml), las fases orgánicas combinadas se lavaron después con MeOH/agua (5:1, 2 x 100 ml), agua (200 ml), y se secaron (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-222 (1,26 g, 1,23 mmol, 97 % de pureza por HPLC, 21 % de rendimiento) como un aceite transparente, incoloro, viscoso.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,31-4,57 (5H), 4,08-4,22 (11H), 2,61 (brm, 4H), 2,49 (m, 4H), 2,22-2,35 (16H), 1,63 (m, 8H), 1,20-1,40 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,6 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,588, calculado para $C_{56}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,70.

Ejemplo 14: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (14)



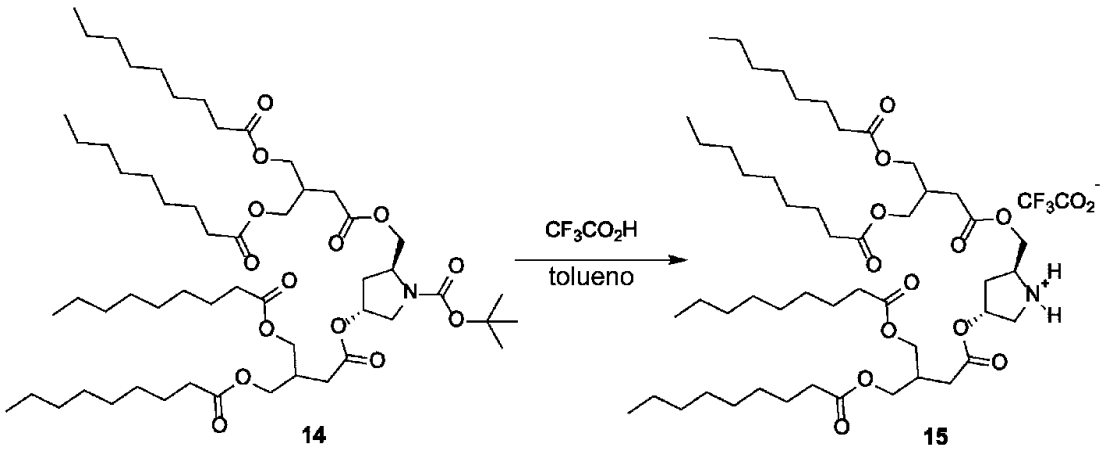
2 **13** **14**

A una solución de 13 (3,10 g, 14,27 mmol, TCI America núm. B3662) en CH_3CN (60 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (12,0 g, 28,94 mmol), DMAP (1,80 g, 14,73 mmol), y EDC-HCl (7,00 g, 36,70 mmol). La mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se concentró in vacuo para proporcionar crudo 14. El crudo 14 se disolvió en n-heptano (60 ml), se lavó con MeOH/10 % de ácido cítrico ac. (5:1, 2 x 60 ml) y agua (60 ml). La fase orgánica se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (20 ml). A la solución de 14 crudo se añadió gel de sílice (25 g, tipo ZCX-2, malla 200-300) y el solvente se retiró a vacío para proporcionar gel de sílice impregnado con crudo 14. Este gel de sílice se colocó encima de una columna en gel de sílice combi-flash (210 g, tipo ZCX-2, malla 200-300) y la columna se eluyó con un gradiente de CH_2Cl_2/MeOH (100:0 a 90:10). Las fracciones calificadas se combinaron y se

concentraron in vacuo para producir 14 (5,80 g, 5,82 mmol, 41 %) como un aceite viscoso, amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,28 (brm, 1H), 4,04-4,37 (8H), 3,61 (brm, 1H), 2,55 (m, 2H), 2,42 (m, 4H), 2,32 (t, *J* = 7,5 Hz, 8H), 2,18 (brm, 2H), 1,60-1,75 (10H), 1,5 (9H), 1,22-1,38 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 2,017, calculado para $C_{55}H_{97}NO_{14}$ + Na+ 1032,70. Encontrado 1032,60.

Ejemplo 15: Síntesis de trifluoroacetato de (2S,4R)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)-2-(((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)metil)pirrolidin-1-io (15)

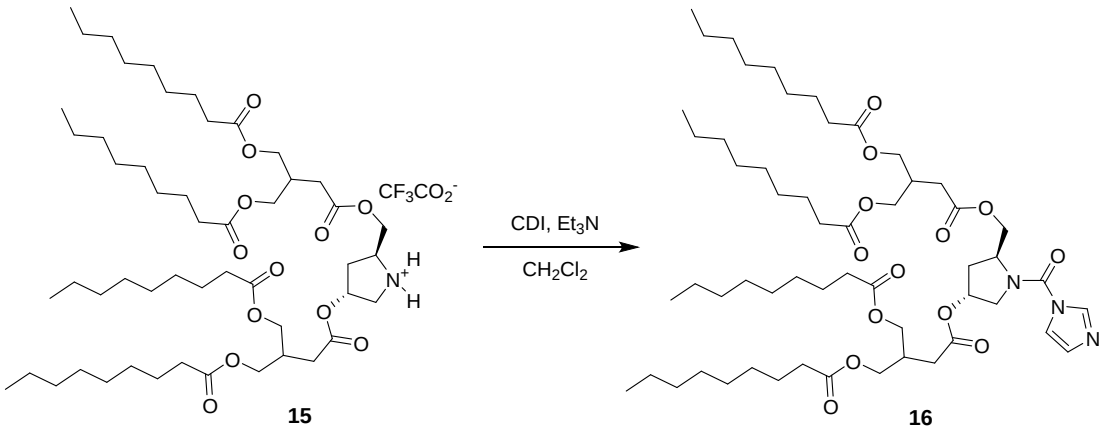


A una solución de 14 (5,80 g, 5,74 mmol) en tolueno (36 ml), enfriada a 20 °C bajo nitrógeno, se añadió TFA (12 ml, 17,87 g, 157 mmol) durante un período de 15 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas, después se concentró in vacuo

para dar crudo 15. La sal de trifluoroacetato de amonio crudo 15 se disolvió en n-heptano (60 ml) y la solución resultante se lavó con 10 % de K_2HPO_4 ac. (30Ml) y agua (2 x 60 ml). La capa orgánica se concentró in vacuo para dar 15 (5,50 g, 85 % de pureza HPLC, 5,37 mmol, 94 % de rendimiento) como un aceite viscoso, amarillo.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,50 (m, 1H), 4,62 (m, 1H), 4,26-4,36 (3H), 4,08-4,24 (8H), 3,89 (m, 1H), 3,72 (m, 1H), 2,61 (m, 2H), 2,25-2,49 (15H), 1,63 (m, 8H), 1,20-1,43 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,6 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,679, calculado para $C_{51}H_{92}NO_{12}$ 910,66, encontrado 910,60.

Ejemplo 16: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4R)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (16)

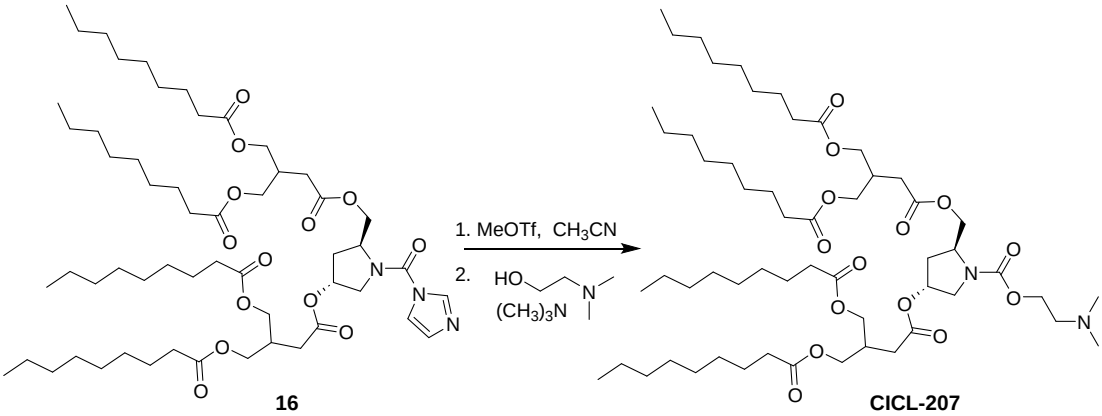


15 16

A una solución de 15 (5,50 g, 5,37 mmol) en CH_2Cl_2 (60 ml), enfriada a 20 °C bajo nitrógeno, se añadió en orden CDI (3,48 g, 21,48 mmol) y Et_3N (1,09 g, 10,74 mmol). La solución se calentó a temperatura ambiente después de que se completaran las adiciones, y la mezcla se dejó agitar durante 20 horas. La solución se fundió en 1 M de HCl ac. (70 ml), la fase orgánica se separó. La capa ac. se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 70 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron in vacuo para proporcionar crudo 16. El crudo 16 se disolvió en n-heptano (150 ml) y la solución se lavó con MeOH/agua (2 x 150 ml), salmuera (150 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 16 (4,80 g, 4,78 mmol, 89 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,75 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 5,37 (m, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,68 (m, 2H), 3,99-4,28 (10H), 3,75 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 2,38-2,60 (4H), 2,25-2,37 (11H), 1,62 (m, 8H), 1,24-1,40 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,6 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,709, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,68. Encontrado 1004,60.

Ejemplo 17: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (CICL-207)

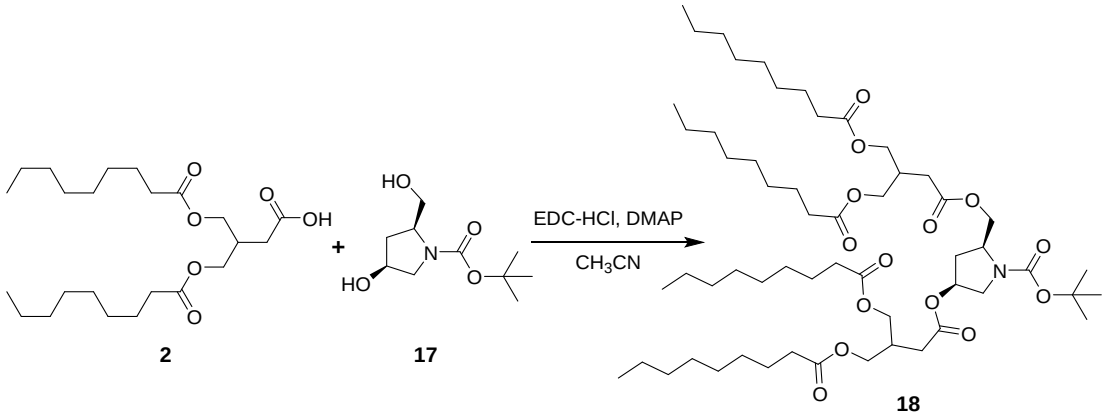


A una solución de 16 (4,80 g, 4,78 mmol), en CH3CN (50 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (0,862 g, 5,25 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en THF (2,0 M, 7,20 ml, 14,40 mmol) durante un período de 10 minutos seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,638 g, 7,16 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante 1 minutos a 0 °C, después se dejó calentar a 60 °C y se agitó durante 120 horas. La mezcla de reacción se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (100 ml). La solución se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 100 ml), MeOH/ 5,6 % de ácido cítrico ac. (10:1). La fase orgánica se separó, la de ácido cítrico ac./MeOH se extrajo con n-heptano (5 x 50 ml). A la fase de MeOH/ácido cítrico ac. se añadió n-heptano (200 ml) y 4,6 % de Na_2CO_3 ac. (100 ml), y la fase orgánica se separó, se lavó con MeOH/agua (5:1, 100 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4, y se filtró.

El filtrado se concentró in vacuo para producir CICL-207 (4,00 g, 84,1 % de pureza por HPLC) que se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa. CICL-207 se disolvió en CH_3CN (10 ml), y se purificó mediante cromatografía (columna Xselect CSH Fenil-Hexilo 19x250 mm, 5 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH_3CN; velocidad de flujo 20 ml/min; gradiente 65 % B a 85 % B en 10 minutos; Longitud de onda 200nM; RT (min): 9,5). Las fracciones calificadas se concentraron in vacuo, para eliminar CH_3CN, y el pH del El residuo se ajustó a 7,0 con Ac. Na_2CO_3 ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (3 x 100 ml), y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-207 (2,11 g, 2,06 mmol, 99 % de pureza por HPLC, 43 % de rendimiento) como un aceite transparente, incoloro, viscoso.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,29 (m, 1H), 4,18-4,40 (5H), 4,11 (m, 8H), 3,60 (m, 2H), 2,48-2,70 (4H), 2,02-2,45 (20H), 1,61 (m, 8H), 1,19-1,39 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,127, calculado para $C_{56}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,80.

Ejemplo 18: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4S)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (18)



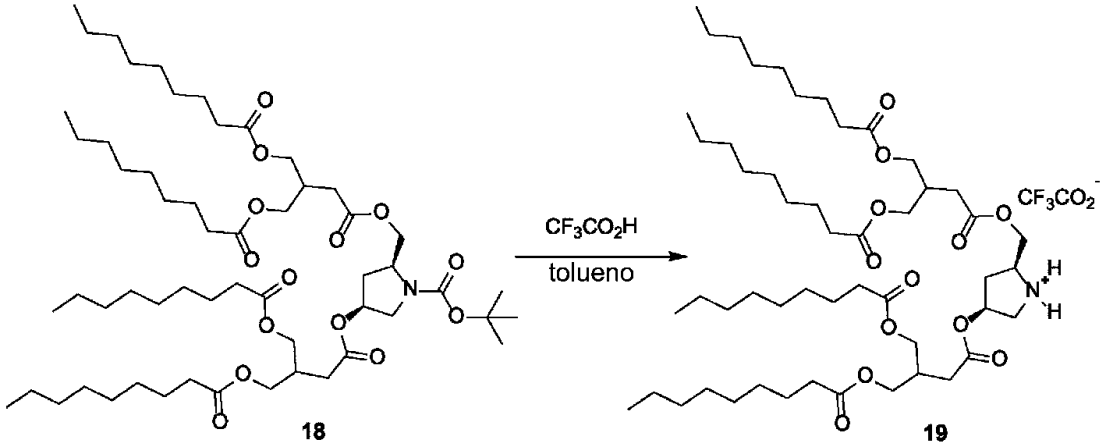
2 **17** **18**

A una solución de 17 (2,00 g, 9,21 mmol, ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5, 56) en CH_3CN (115 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (7,63 g, 18,42 mmol), DMAP (1,14 g, 9,33 mmol), y EDC-HCl (3,89 g, 20,40 mmol). La reacción de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después la reacción se inactivó mediante la adición de agua (115 ml). La mezcla resultante se fundió en n-heptano (200 ml) y la fase orgánica se separó. La capa orgánica se lavó con MeOH/10 % de ácido cítrico ac. (75:25, 2 x 200 ml), MeOH/agua/Et_3N (70:22:8, 2 x 100 ml), MeOH/agua (75:25,21 x 100 ml), salmuera (100 ml), y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo dieron 18 (6,65 g, 6,58 mmol, 93 % de pureza HPLC, 71,5 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,33 (m, 1H), 4,18-4,40 (2H), 4,02-4,18 (10H), 3,72 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 2,58 (m, 2H), 2,43 (m, 4H), 2,20-2,37 (10H), 1,62 (m, 8H), 1,50 (m, 8H), 1,22-1,40 (40H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H);

LCMS: RT 1,997, calculado para $C_{56}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1032,70. Encontrado 1032,70.

Ejemplo 19: Síntesis de trifluoroacetato de (2S,4S)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)-2-(((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)metil)pirrolidin-1-io (19)

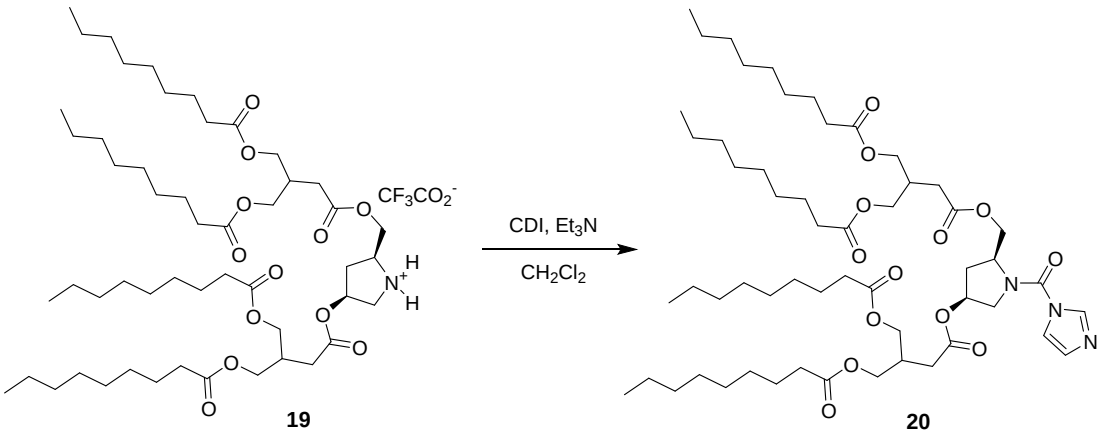


A una solución de 18 (6,50 g, 6,43 mmol) en tolueno (65 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió TFA (20 ml, 29,78 g, 261 mmol) durante un período de 15 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, después se concentró in vacuo para dar crudo 19. La sal de trifluoroacetato de amonio crudo 19 se disolvió en n-heptano (200 ml) y la solución resultante se lavó con salmuera (2 x 200 ml) y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo

proporcionaron 19 (6,30 g, 93 % de pureza HPLC, 6,24 mmol, 97 % de rendimiento) como un aceite viscoso, amarillo.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10,44 (brs, 1H), 9,98 (brs, 1H), 5,31 (m, 1H), 4,42 (m, 4H), 4,02-4,21 (8H), 3,60 (m, 2H), 2,37-2,60 (4H), 2,35 (m, 8H), 2,10 (m, 1H), 1,62 (m, 8H), 1,21-1,38 (40H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,622, calculado para $C_{51}H_{92}NO_{12}$ 910,66. Encontrado 910,60.

Ejemplo 20: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4S)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (20)



19 **20**

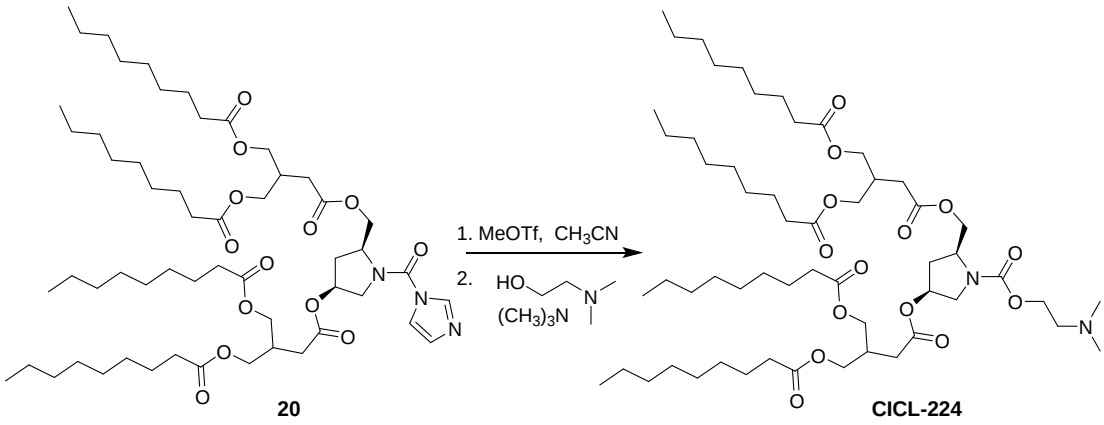
A una solución de 19 (6,20 g, 6,20 mmol) en CH_2C_{l2} (100 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió CDI (9,96 g, 61,50 mmol) y Et_3N (3,11 g, 30,80 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 18 hora a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl ac. (100 ml).

La fase orgánica se separó, después se lavó con 0,5 M de HCl ac. (100 ml), salmuera (2 x 100 ml), y se secaron sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 20 bruto que se disolvió en CH_3CN y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo 50x250 mm, 10 m; fase móvil A: agua (0,1 % de F_3CO_2H), fase móvil B: CH_3CN; Caudal: 90 ml/min; Gradiente: 50 % de B a 85 % de B durante 10 minutos, 85 % recogido; Longitud de onda: 220 nM). Las fracciones calificadas se agruparon, el acetonitrilo se retiró in vacuo y se añadió n-heptano (150 ml) a la mezcla resultante. La fase orgánica se separó, se lavó con 5 % de $NaHCO_3$ ac.(200 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron 20 (4,95 g, 4,93 mmol, 95 % de pureza por HPLC, 80 % de rendimiento) como un aceite amarillo claro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,07 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 5,31 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 4,33 (m, 2H), 4,22 (m, 1H), 4,08-4,18 (7H), 4,02 (m, 1H), 3,78 (m, 1H), 2,58 (m, 2H), 2,34-2,51 (5H), 2,26-2,31 (8H), 2,08 (m, 1H), 1,61 (m, 8H), 1,21-1,37 (40H), 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,735, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,68. Encontrado 1004,60.

Ejemplo 21: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-

((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (CICL-224)



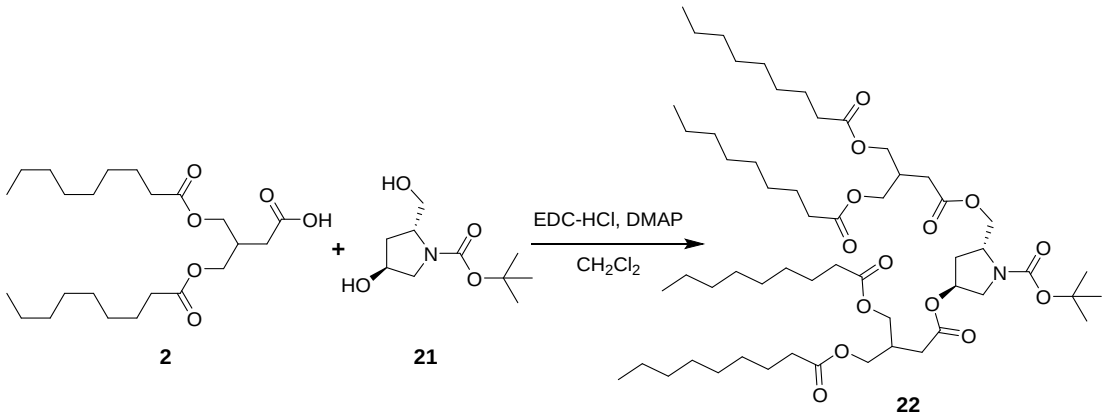
A una solución de 20 (4,00 g, 4,00 mmol), en CH_3CN (80 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (0,784 g, 4,80 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en THF (2,0 M, 6,00 ml, 12,00 mmol) durante un período de 10 minutos seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,532 g, 6,00 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante 1 minuto a 0 °C, después se dejó calentar a 60 °C y se agitó durante 72 horas. La mezcla de reacción se fundió en n-heptano (160 ml) y agua (160 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con MeOH/agua (4:1, 3 x 100 ml), MeOH/5 % de Ácido cítrico (10:1). La fase orgánica se separó, la fase de ácido cítrico ac./MeOH se diluyó con 10 % de NaCl ac. (320 ml) y se extrajo con n-heptano (5 x 160 ml). Las

fase orgánicas combinadas se lavaron con 5 % de $NaHCO_3$ ac. (2 x 100 ml), y la fase orgánica se separó y se lavó con agua (2 x 100 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na_2SO_4, y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en CH_3CN (10 ml), y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna XB CSH Fenilo-Hexilo 50x250 mm, 10 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH_3CN; velocidad de flujo 90 ml/min; gradiente 60 % B a 90 % B en 10 minutos; Longitud de onda: 200 nM; RT (min): 12). Las fracciones calificadas se concentraron al vacío, para eliminar CH_3CN, y el pH del residuo acuoso se ajustó a 9,0 con 5 % acuoso $NaHCO_3$ sat. ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (200 ml), y la fase orgánica se lavó con MeOH/agua (5:1, 100 ml), agua (100 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-224 (1,50 g, 1,46 mmol, 97 % de pureza por HPLC, 37 % de rendimiento) como un aceite transparente, incoloro, viscoso.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,32 (m, 1H), 4,03-4,38 (13H), 3,78 (brm, 1H), 3,48 (brd, *J* = 12,8 Hz, 1H), 2,55 (m, 4H), 2,43 (m, 4H), 2,20-2,37 (14H), 2,07 (m, 2H), 1,61 (m, 8H), 1,21-1,36 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,588; Calc. para $C_{58}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,60.

Ejemplo 22: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2R,4S)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-

((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (22)



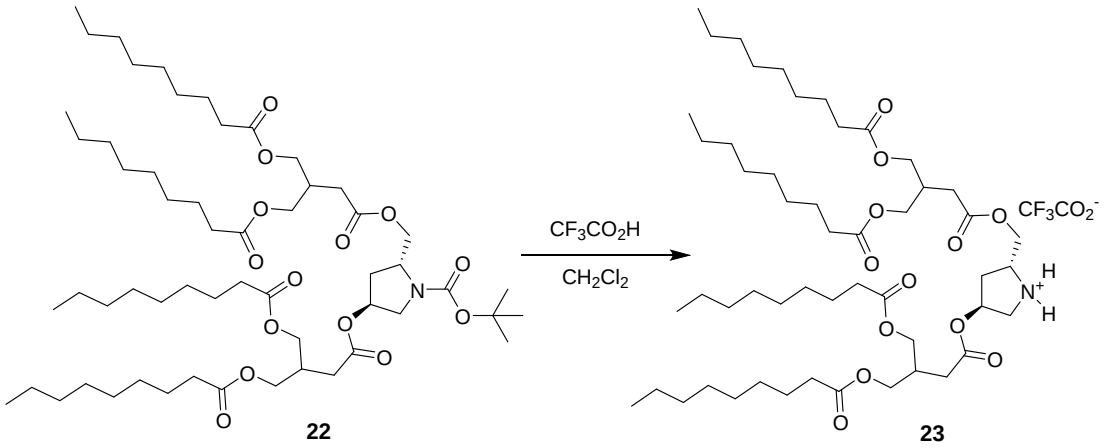
2 **21** **22**

A una solución de 21 (2,20 g, 10,10 mmol, ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5, 56) en CH_2Cl_2 (160 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (8,40 g, 20,30 mmol), DMAP (1,25 g, 10,10 mmol), y EDC-HCl (4,28 g, 22,30 mmol). La mezcla se agitó durante 18 horas, después se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en n-heptano (500 ml), después la solución de n-heptano se lavó con MeOH/agua y se secó sobre Na_2SO_4. (4:1, 3 x 150 ml). La filtración proporcionó una solución de crudo 22 a la que se añadió gel de sílice (25 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200) y el solvente se retiró entonces in vacuo (temperatura < 35 °C). El gel de sílice impregnado 22 resultante se colocó encima de una columna combi-flash cargada con gel de sílice (250 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200), y la columna combi-flash se eluyó con un gradiente de n-heptano/acetato de

etilo (100:0 a 90:10). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar 22 (8,30 g, 8,21 mmol, 98,5 % de pureza HPLC, 81 % de rendimiento como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,26 (m, 1H), 4,00-4,30 (11H), 3,54 (m, 1H), 2,54 (m, 2H), 2,40 (m, 4H), 2,25-2,38 (7H), 2,17 (m, 2H), 1,63 (m, 8H), 1,50 (m, 8H), 1,21-1,38 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 2,478, calculado para $C_{56}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1032,70. Encontrado 1032,70.

Ejemplo 23: Síntesis de trifluoroacetato de (2R,4S)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)-2-(((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)metil)pirrolidin-1-io (23)

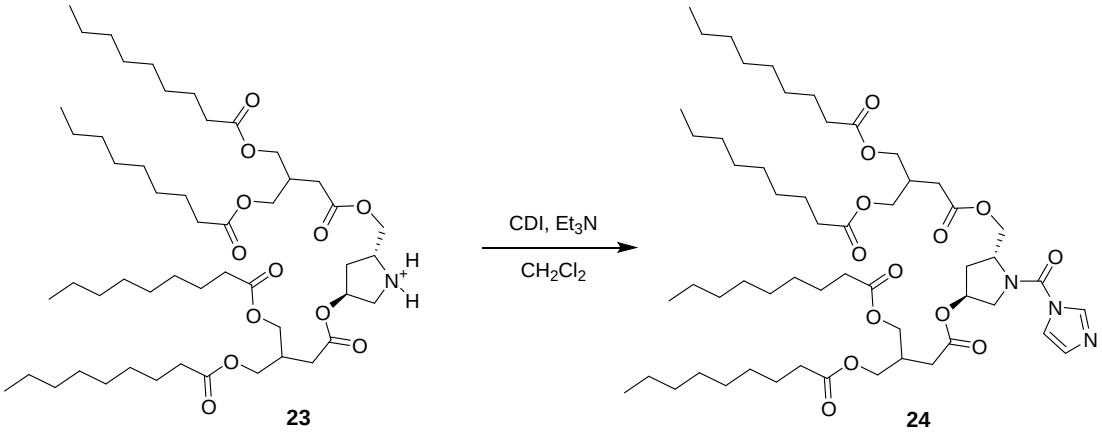


A una solución de 22 (8,30 g, 8,22 mmol) en diclorometano (50 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió TFA (16 ml, 23,82 g, 209 mmol)

durante un período de 15 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, después se concentró in vacuo para dar crudo 23. La sal de trifluoroacetato de amonio crudo 23 se disolvió en n-heptano (400 ml) y la solución resultante se lavó con salmuera (2 x 200 ml) y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 23 (8,10 g, 92 % de pureza HPLC, 7,90 mmol, 96 % de rendimiento) como un aceite viscoso, amarillo claro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10,44 (brs, 1H), 9,98 (brs, 1H), 5,40 (m, 1H), 4,65 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,13 (m, 8H), 3,78 (m, 1H), 3,49 (m,1H), 2,40-2,62 (6H), 2,24-2,37 (10H), 1,61 (m, 8H), 1,21-1,34 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,612, calculado para $C_{51}H_{92}NO_{12}$ 910,66. Encontrado 910,60.

Ejemplo 24: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2R,4S)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (24)



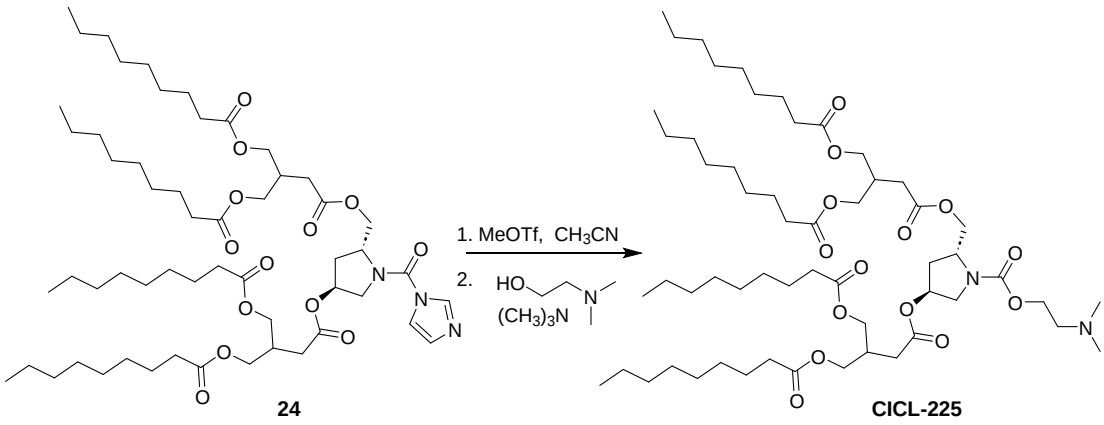
23 24

A una solución de 23 (8,10 g, 8,03 mmol) en CH_2C_{l2} (250 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió CDI (13,03 g, 80,33 mmol) y Et_3N (4,06 g, 40,17 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 18 hora a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl (300 ml). La fase orgánica se separó, después se lavó con 0,5 M de HCl ac. (300 ml), salmuera (2 x 300 ml), y se secaron sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 24 bruto que se disolvió en CH_3CN (30 ml)y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo 50x250 mm, 10 m; fase móvil A: agua (0,1 % de CF_3CO_2H), fase móvil B: CH3CN; Caudal: 90 ml/min; Gradiente: 50 % de B a 85 % de B durante 10 minutos, 85 % recogido; Longitud de onda: 220 nM). Las fracciones calificadas se agruparon, el acetonitrilo se retiró in vacuo y se añadió n-heptano (150 ml) a la mezcla resultante. La fase orgánica se separó, se lavó con 5 % de $NaHCO_3$ ac.(150 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron

24 que se disolvió en n-heptano (400 ml) y la solución se extrajo con MeOH/agua (4:1, 150 ml), y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 24 (8,00 g, 7,96 mmol, 97,6 % de pureza por HPLC, 99 % de rendimiento) como un aceite viscoso amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,14 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,14 (s, 1H), 5,36 (m, 1H), 4,54-4,75 (2H), 4,01-4,27 (9H), 3,90 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 2,57 (m, 2H), 2,20-2,49 (14H), 1,61 (m, 8H), 1,22-1,38 (40H), 0,90 (t, *J* = 7,20 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,878, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,68. Encontrado 1004,60.

Ejemplo 25: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2R,4S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (CICL-225)

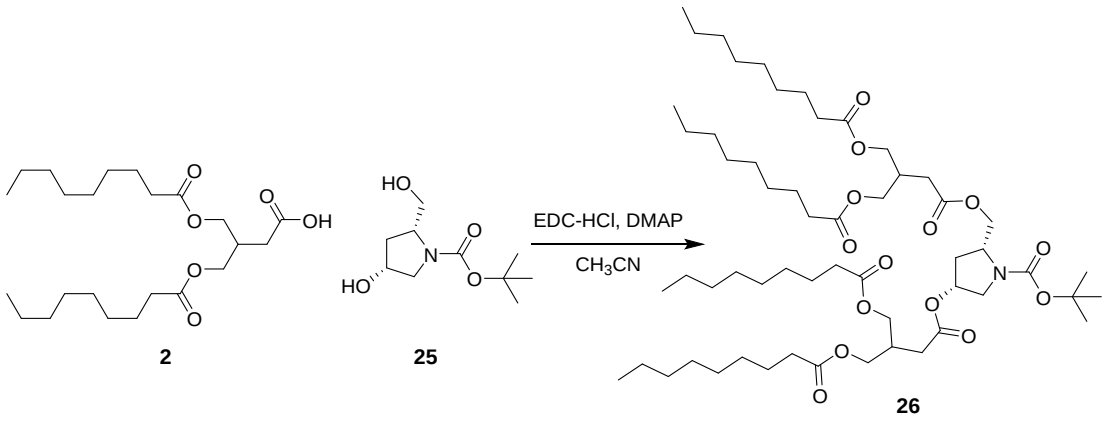


A una solución de 24 (8,00 g, 7,97 mmol), en CH_3CN (80 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (1,57 g, 9,57 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en THF (2,0 M, 12,00 ml, 24,00 mmol) durante un período de 10 minutos seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (1,06 g, 11,91 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante 1 minutos a 0 °C, después se dejó calentar a 60 °C y se agitó durante 120 horas. La mezcla de reacción se fundió en n-heptano (400 ml) y se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 150 ml), la fase orgánica se secó después sobre Na_2SO_4, y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en CH_3CN (15 ml), y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna XB Fenilo 50x250 mm, 10 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH_3CN; velocidad de flujo 90 ml/min; gradiente 60 % B a 90 % B en 10 minutos; Longitud de onda: 200 nM; RT (min): Las fracciones calificadas 12 se concentraron in vacuo, para eliminar CH_3CN, y el pH del residuo acuoso se ajustó a 9,0 con 5 % acuoso $NaHCO_3$ sat. ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (300 ml), y la fase orgánica se lavó con MeOH/agua (5:1, 200 ml), agua (200 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-225 (2,017 g,

1,97 mmol, 97 % de pureza por HPLC, 25 % de rendimiento) como un aceite transparente, amarillo pálido, viscoso.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,30 (brm, 1H), 4,19-4,40 (5H), 4,12 (m, 8H), 3,62 (brm, 2H), 2,50-2,68 (4H), 2,42 (m, 4H), 2,27-2,38 (14H), 2,21 (brm, 2H), 1,63 (m, 8H), 1,20-1,38 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); **LCMS:** Calc. para $C_{58}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,60.

Ejemplo 26: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2R,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (26)



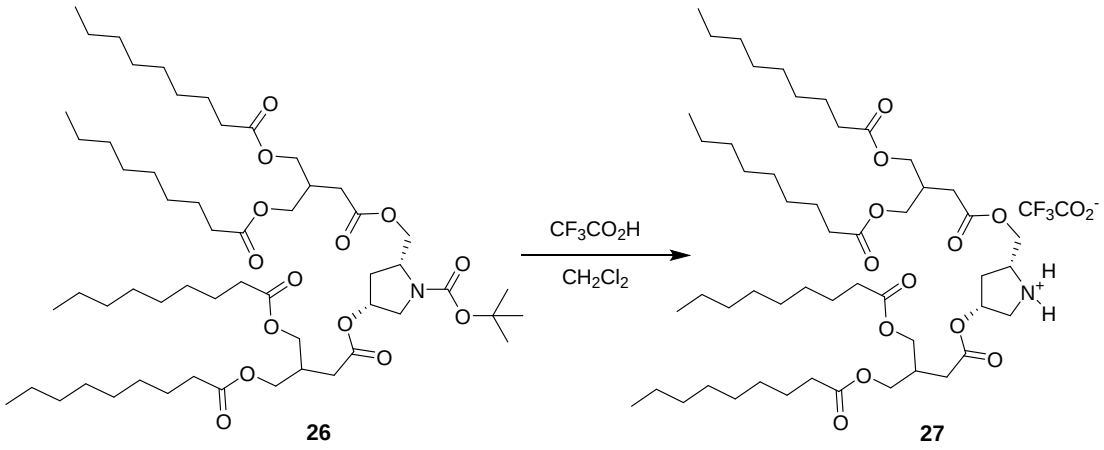
2 **25** **26**

A una solución de 25 (1,83 g, 8,42 mmol, ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5, 56) en CH_3CN (700 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (7,00 g, 16,88 mmol), DMAP (1,04 g, 8,51 mmol), y EDC-HCl (3,56 g, 18,67 mmol). La reacción de reacción se agitó durante 18

horas, después la reacción se inactivó mediante la adición de agua (140 ml). La mezcla se extrajo con n-heptano (140 ml), y la fase orgánica se separó. La capa orgánica se lavó con MeOH/10 % de ácido cítrico ac. (3:1, 2 x 70 ml), salmuera (70 ml) y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 26 (5,65 g, 5,59 mmol, 92,7 % de pureza por HPLC, 66 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,33 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 4,06-4,21 (12H), 3,75 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 2,62 (m, 2H), 2,43 (m, 4H), 2,24 (m, 1H), 2,32 (m, 8H), 1,62 (m, 8H), 1,51 (m, 8H), 1,25-1,40 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,608, calculado para $C_{56}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1032,70. Encontrado 1032,70.

Ejemplo 27: Síntesis de trifluoroacetato de (2R,4R)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)-2-(((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)metil)pirrolidin-1-io (27)

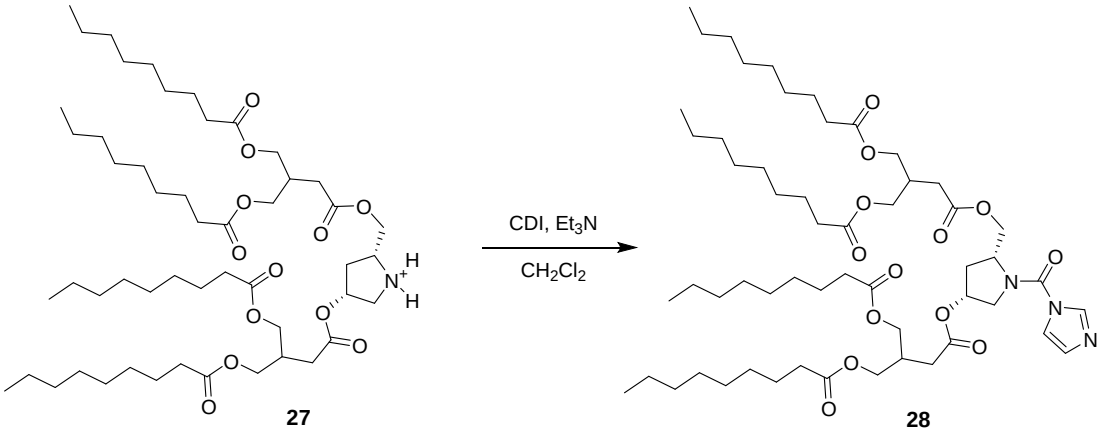


26 **27**

A una solución de 26 (5,60 g, 5,54 mmol) en diclorometano (35 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió TFA (11 ml, 16,38 g, 144 mmol) durante un período de 15 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, después se concentró in vacuo para dar crudo 27. La sal de trifluoroacetato de amonio crudo 23 se disolvió en n-heptano (200 ml) y la solución resultante se lavó con salmuera (2 x 100 ml) y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 27 (5,55 g, 88 % de pureza HPLC, 5,42 mmol, 98 % de rendimiento) como un aceite viscoso, amarillo claro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 10,21 (brs, 1H), 9,28 (brs, 1H), 5,45 (m, 1H), 4,38-4,52 (2H), 4,08-4,25 (9H), 3,50 (brs, 2H), 2,70 (m, 1H), 2,58 (m, 2H), 2,28-2,45 (12H), 2,14 (m, 1H), 1,63 (m, 8H), 1,22-1,37 (40H), 0,90 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,602, calculado para $C_{51}H_{92}NO_{12}$ 910,66. Encontrado 910,60.

Ejemplo 28: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2R,4R)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (28)



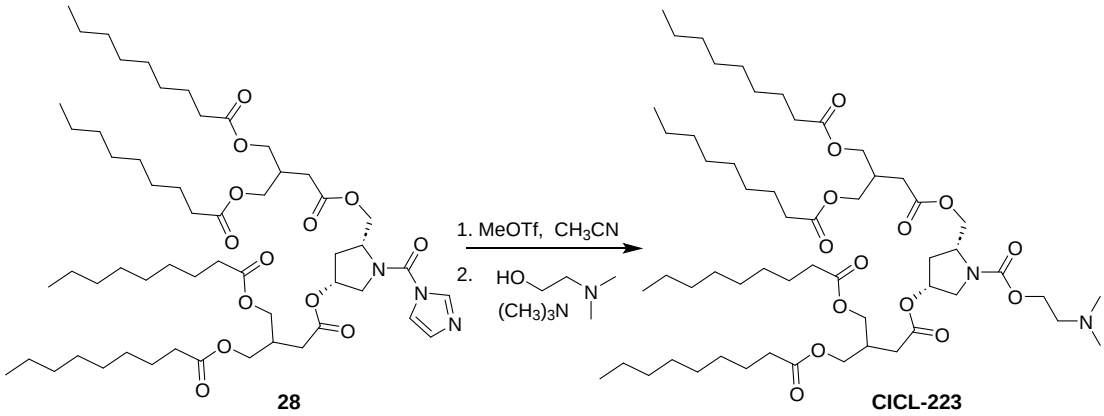
27 28

A una solución de 27 (5,55 g, 5,42 mmol) en CH_2C_{l2} (55 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió CDI (8,92 g, 55,01 mmol) y Et3N (1,67 g, 16,50 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl ac. (40 ml). La fase orgánica se separó, después se lavó con 0,5 M de HCl ac. (2 x 40 ml), agua (3 x 2 ml), y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 28 bruto que se disolvió en CH_3CN (30 ml)y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo 50x250 mm, 10 m; fase móvil A: agua (0,1 % de CF_3CO_2H), fase móvil B: CH_3CN; Caudal: 90 ml/min; Gradiente: 50 % de B a 85 % de B durante 10 minutos, 85 % recogido; Longitud de onda: 220 nM). Las fracciones calificadas se agruparon, el acetonitrilo se retiró in vacuo y se añadió n-heptano (150 ml) a la mezcla resultante. La fase orgánica se separó, se lavó con 5 % de $NaHCO_3$ ac.(150 ml), agua (150 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo

dieron 28 (3,75 g, 3,73 mmol, 96,5 % de pureza por HPLC, 69 % de rendimiento) como un aceite viscoso amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,07 (s, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 5,31 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 4,33 (m, 2H), 4,22 (m, 1H), 4,08-4,18 (7H), 4,02 (m, 1H), 3,78 (m, 1H), 2,58 (m, 2H), 2,34-2,51 (5H), 2,26-2,31 (8H), 2,08 (m, 1H), 1,61 (m, 8H), 1,21-1,37 (40H), 0,89 (t, *J* = 6,6 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,868, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,68. Encontrado 1004,60.

Ejemplo 29: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2R,4R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (CICL-223)



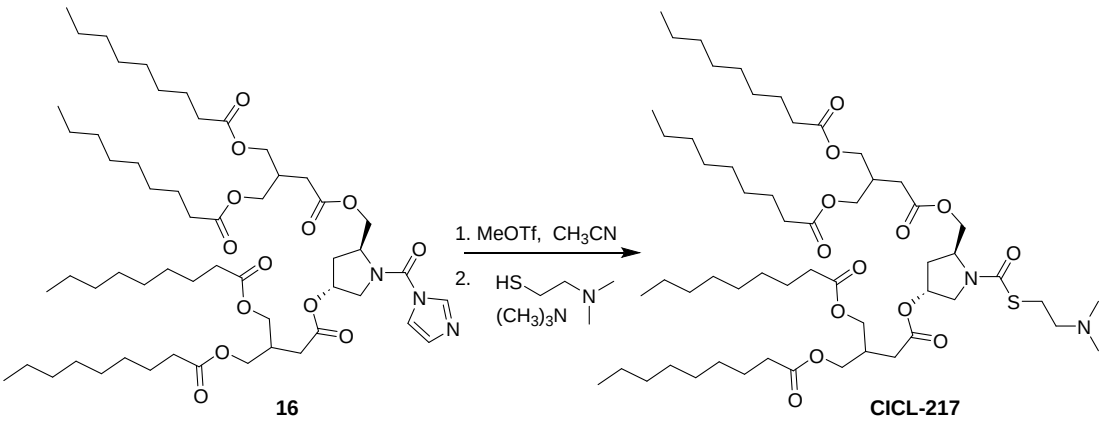
A una solución de 28 (3,75 g, 3,73 mmol), en CH_3CN (75 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (0,73 g, 4,45 mmol) durante un período de 5

minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en THF (2,0 M, 5,60 ml, 11,2 mmol) durante un período de 10 minutos seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,50 g, 5,61 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante 1 minutos a 0 °C, después se dejó calentar a 60 °C y se agitó durante 100 horas. La mezcla de reacción se fundió en n-heptano (200 ml) y se lavó con 10 % de ácido cítrico ac. (100 ml), agua (300 ml), salmuera (300 ml), la fase orgánica se secó después sobre Na_2SO_4, y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en i-PrOH (5 ml), y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna XB Fenilo 50x250 mm, 10 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH3CN; velocidad de flujo 90 ml/min; gradiente 55 % B a 95 % B en 32 minutos; Longitud de onda: 205 nM; RT (min): 17). Las fracciones calificadas se concentraron al vacío, para eliminar CH_3CN, y el pH del residuo acuoso se ajustó a 9,0 con 2 % acuoso Na_2CO_3 ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (3 x 300 ml), y las fases orgánicas se lavaron con MeOH/agua (5:1, 2 x 300 ml), agua (300 ml) y se secaron (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-223 (1,38 g, 1,35 mmol, 98 % de pureza por HPLC, 36 % de rendimiento) como un aceite transparente, amarillo pálido, viscoso.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,33 (brm, 1H), 4,03-4,40 (13H), 3,79 (brm, 1H), 3,50 (brd, *J* = 13,2 Hz, 1H),

2,52-2,68 (4H), 2,46 (m, 4H), 2,20-2,34 (14H), 2,07 (brm, 2H), 2,63 (m, 8H), 1,21-1,40 (40H), 0,90 (m, 12H); **LCMS:** RT 0,905, calculado para $C_{58}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,60.

Ejemplo 30: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4R)-1-(((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (CICL-217)

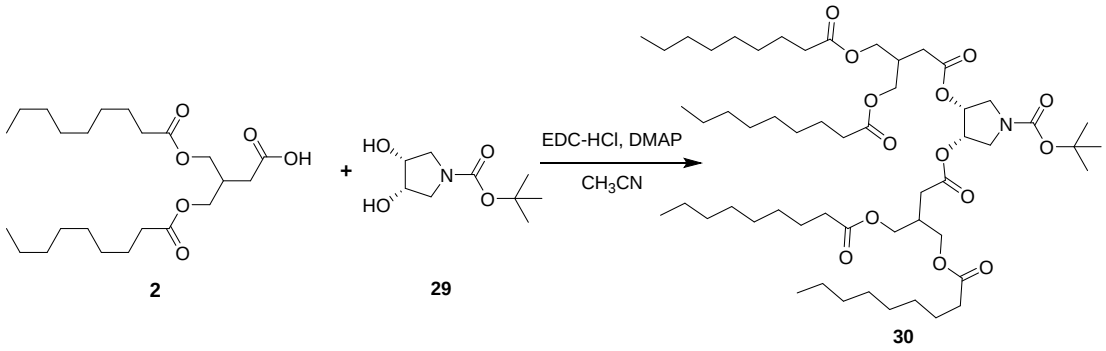


A una solución de 16 (7,00 g, 6,83 mmol), en CH_3CN (70 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (1,37 g, 8,35 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en THF (2,0 M, 10,50 ml, 21,00 mmol) durante un período de 10 minutos seguido por la adición de 2-dimetilaminoetano tiol (1,10 g, 10 g, 10,46 mmol) en una

porción. La mezcla se agitó durante 1 hora a 0 °C, después, se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La mezcla de reacción se concentró in vacuo, el residuo se disolvió con n-heptano (400 ml) y la solución resultante se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 150 ml), la fase orgánica se secó después sobre Na_2SO_4, y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en CH_3CN (15 ml), y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna XB Fenilo 50x250 mm, 10 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH_3CN; velocidad de flujo 90 ml/min; gradiente 50 % B a 90 % B en 18 minutos; Longitud de onda: 200 nM). Las fracciones calificadas se concentraron in vacuo, para eliminar CH_3CN, y el pH del residuo acuoso se ajustó a 8,0 con 2 % de Na_2CO_3 ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (300 ml), y la fase orgánica se lavó con MeOH/agua (5:1, 200 ml), agua (200 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-217 (2,11 g, 2,03 mmol, 98 % de pureza por HPLC, 30 % de rendimiento) como un aceite transparente, amarillo pálido, viscoso.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,35 (m, 1H), 4,42 (m, 2H), 4,26 (m, 1H), 4,11 (m, 8H), 3,66 (brm, 2H), 3,13 (m, 2H), 2,49-2,71 (4H), 2,18-2,48 (20H), 1,63 (m, 8H), 1,20-1,39 (40H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,638, calculado para $C_{56}H_{100}N_2O_{13}S + H^+$ 1041,70. Encontrado 1041,60.

Ejemplo 31: Síntesis de tetranonanoato de (((*rel*-(3S,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (30)



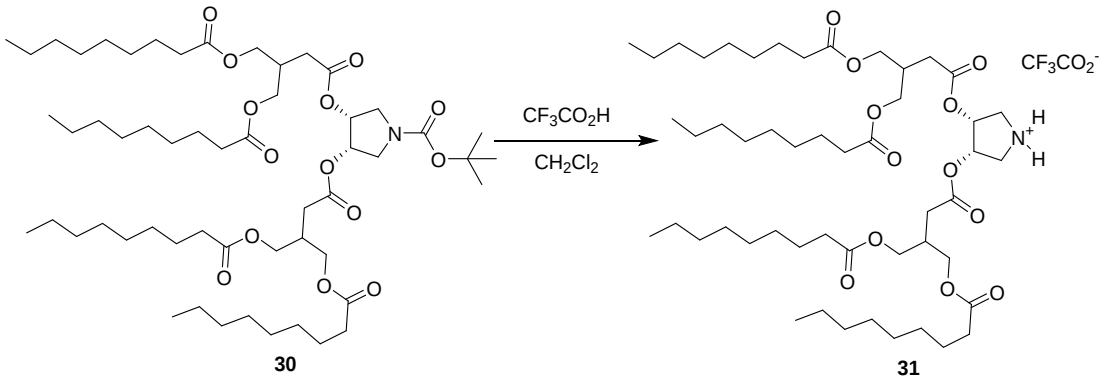
2 29 30

A una solución de 29 (Nature Communications 2019, 10, 21, 2,20 g, 10,84 mmol), en CH_3CN (44 ml) bajo nitrógeno a temperatura ambiente, se añadió en orden2 (9,20 g, 22,22 mmol), DMAP (1,32 g, 10,84 mmol), y EDC-HCl (5,20 g, 27,09 mmol). La mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente después de que se completaran las adiciones, después se eliminó el solvente al vacío. El residuo se disolvió en n-heptano (440 ml) y la solución se lavó con MeOH/agua (8:1, 2 x 110 ml). El solvente se eliminó in vacuo para proporcionar crudo 30 que se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo 50x250 mm, 10 m; fase móvil A: agua (0,1 % de CF_3CO_2H), fase móvil B: CH_3CN; Caudal: 90 ml/min; Gradiente: 50 % de B a 95 % de B durante 10 minutos, 85 % recogido; Longitud de onda: 205 nM). Las fracciones calificadas se agruparon, el

acetonitrilo se retiró in vacuo y la solución resultante se extrajo con n-heptano (440 ml). La fase orgánica se lavó con MeOH/agua (4:1, 2 x 110 ml), agua (110 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron 30 (6,80 g, 6,82 mmol, 97 % de pureza HPLC, 63 % de rendimiento) como un aceite viscoso, incoloro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,37 (brm, 2H), 4,13 (m, 8H), 3,73 (m, 2H), 3,28-3,51 (2H), 2,58 (m, 2H), 2,45 (m, 4H), 2,32 (t, *J* = 6,0 Hz, 8H), 1,63 (m, 8H), 1,49 (s, 9H), 1,21-1,40 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,991, calculado para $C_{55}H_{97}NO_{14}$ + Na+ 1018,68. Encontrado 1018,60.

Ejemplo 32: Síntesis de trifluoroacetato de *rel*-(3S,4R)-3,4-bis((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-1-io (31)



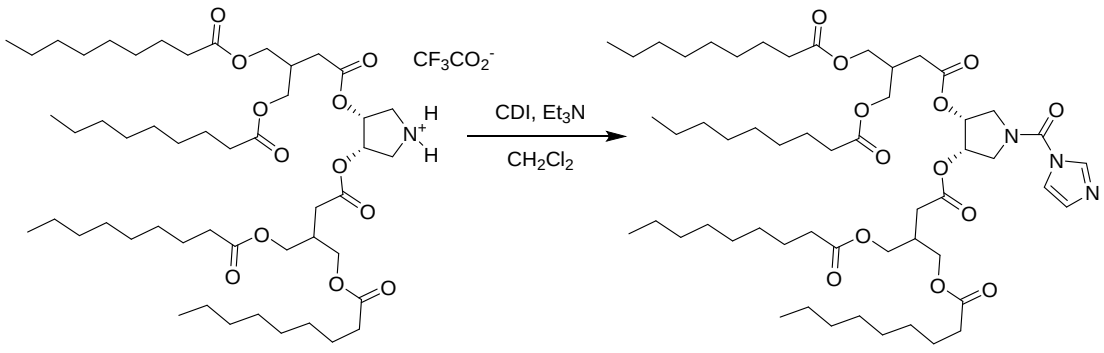
30 31

A una solución de 30 (6,60 g, 6,63 mmol), en CH_2Cl_2 (33 ml) bajo nitrógeno a temperatura ambiente, se añadió

CF_3CO_2H (13,2 ml, 19,65 g, 172 mmol) durante un período de 10 minutos. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 2 horas después de que se completara la adición, y después se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en n-heptano (660 ml) y la solución se extrajo con salmuera (2 x 110 ml). La fase orgánica se concentró in vacuo para proporcionar 31 (6,20 g, 6,14 mmol, 97 % de pureza HPLC, 93 % de rendimiento) como un aceite viscoso, amarillo claro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,48 (brm, 2H), 4,10-4,23 (8H), 3,72 (m, 2H), 3,49 (m, 2H), 2,56 (m, 2H), 2,47 (m, 4H), 2,32 (m, 8H), 1,63 (m, 8H), 1,23-1,37 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,601, calculado para $C_{50}H_{90}NO_{12}$ 896,65. Encontrado 896,60.

Ejemplo 33: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3S,4R)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)pirrolidina-3,4-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (32)

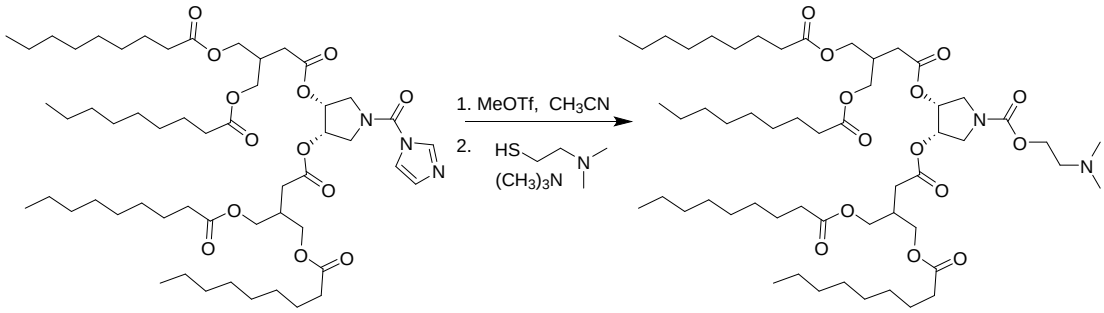


31 **32**

A una solución de 31 (6,00 g, 6,04 mmol) en diclorometano (120 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: CDI (9,78 g, 60,36 mmol) y Et_3N (4,88 g, 48,29 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 hora a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl ac. (200 ml). La fase orgánica se separó, la fase ac. se extrajo con diclorometano (2 x 240 ml) y las capas orgánicas combinadas se concentraron in vacuo para producir crudo 32. El crudo 32 se disolvió en ne-heptano (600 ml) y la solución resultante se extrajo con MeOH/agua (5:1, 2 x 240 ml)) y agua (240 ml). El solvente se eliminó in vacuo para proporcionar 32 (5,60 g, 5,65 mmol, 96 % de pureza HPLC, 94 % de rendimiento) como un aceite amarillo claro.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,27 (brm, 1H), 7,44 (brs, 1H), 7,18 (brs, 1H), 5,48 (brm, 2H), 3,92-4,23 (10H), 3,82 (brm, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,46 (m, 4H), 2,32 (m, 8H), 1,63 (m, 8H), 1,23-1,37 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,760, calculado para $C_{54}H_{91}N_3O_{13}$ + H^+ 990,66. Encontrado 990,50.

Ejemplo 34: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3S,4R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)pirrolidina-3,4-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-216)



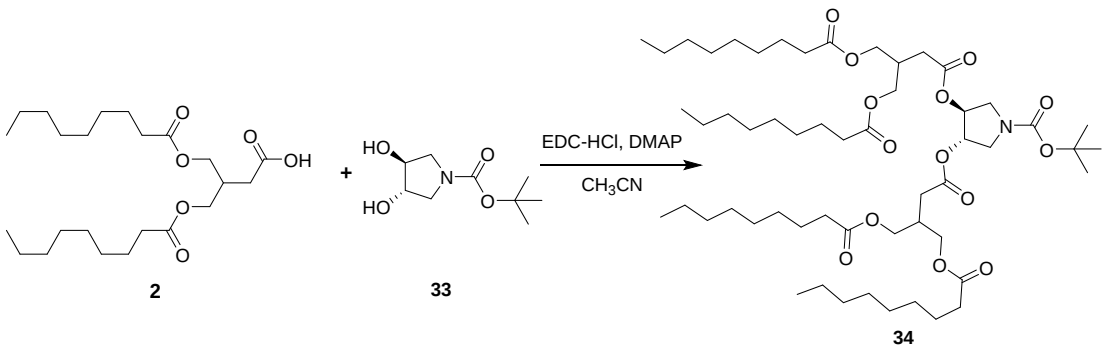
32 CICL-216

A una solución de 32 (5,50 g, 5,55 mmol), en CH_3CN (55 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (1,09 g, 6,66 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en THF (1,0 M, 22,20 ml, 22,20 mmol) durante un período de 10 minutos seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,743 g, 8,33 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante 1 hora a 0 °C, después, se calentó en un baño de aceite a 60 °C y se agitó durante 120 horas. La mezcla de reacción se concentró in vacuo, el residuo se disolvió con n-heptano (550 ml) y la solución resultante se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 100 ml), acetonitrilo/agua (5:1, 2 x 100 ml), después la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4, y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en CH_3CN (15 ml), y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna XB Fenilo 50x250 mm, 10 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH3CN; velocidad de flujo 90 ml/min; gradiente 55 % B a 90 % B en 12 minutos; Longitud de onda: 205 nM).

Las fracciones calificadas se concentraron al vacío, para eliminar CH_3CN, y el pH del residuo acuoso se ajustó a 9,0 con 2 % acuoso Na_2CO_3 ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (2 x 275 ml), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con MeOH/agua (4:1, 3 x 110 ml), agua (145 ml) y se secaron (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-216 (2,22 g, 2,20 mmol, 98 % de pureza por HPLC, 40 % de rendimiento) como un aceite transparente, incoloro, viscoso.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,37 (m, 2H), 4,20 (m,2H), 4,11 (m, 8H), 3,78 (m, 2H), 3,48 (m, 2H), 2,50-2,65 (4H), 2,42 (m, 4H), 2,25-2,35 (14H), 1,59 (m, 8H), 1,20-1,38 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,575, calculado para $C_{55}H_{98}N_2O_{14}$ + H^+ 1011,71. Encontrado 1011,70.

Ejemplo 35: Síntesis de tetranonanoato de ((((3S,4S)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidina-3,4-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (34)

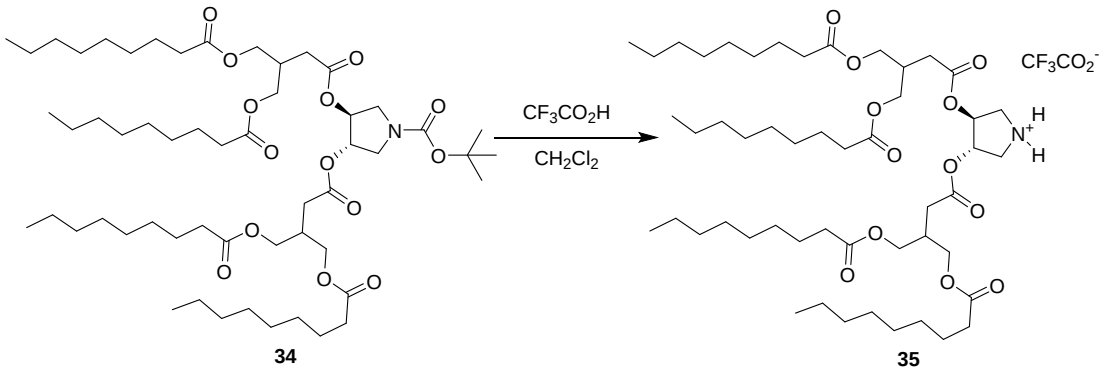


2 33 34

A una solución de 33 (Combi-Blocks núm. QE-0378, 2,35 g, 11,56 mmol) en acetonitrilo (94 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (10,00 g, 24,12 mmol), DMAP (1,42 g, 11,62 mmol), y EDC-HCl (5,55 g, 29,10 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente después se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en n-heptano (200 ml) y la solución resultante se extrajo con MeOH/agua (10:1, 2 x 100 ml). El solvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en diclorometano (25 ml) y se añadió gel de sílice (25 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200). El solvente se eliminó después in vacuo (temperatura < 35 °C). El gel de sílice impregnado 34 resultante se colocó encima de una columna combi-flash cargada con gel de sílice (120 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200), y la columna combi-flash se eluyó con un gradiente de n-heptano/acetato de etilo (40:1 a 25:1). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar 34 (8,20 g, 8,23 mmol, 95 % de pureza HPLC, 71 % de rendimiento como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,20 (brm, 2H), 4,13 (m, 8H), 3,73 (m, 2H), 3,40-3,62 (2H), 2,58 (m, 2H), 2,42 (m, 4H), 2,37 (m, 8H), 1,62 (m, 8H), 1,50 (s, 9H), 1,24-1,38 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 2,144, calculado para $C_{55}H_{97}NO_{14}$ + Na+ 1018,68. Encontrado 1018,80.

Ejemplo 36: Síntesis de trifluoroacetato de (3S,4S)-3,4-bis((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-1-io (35)

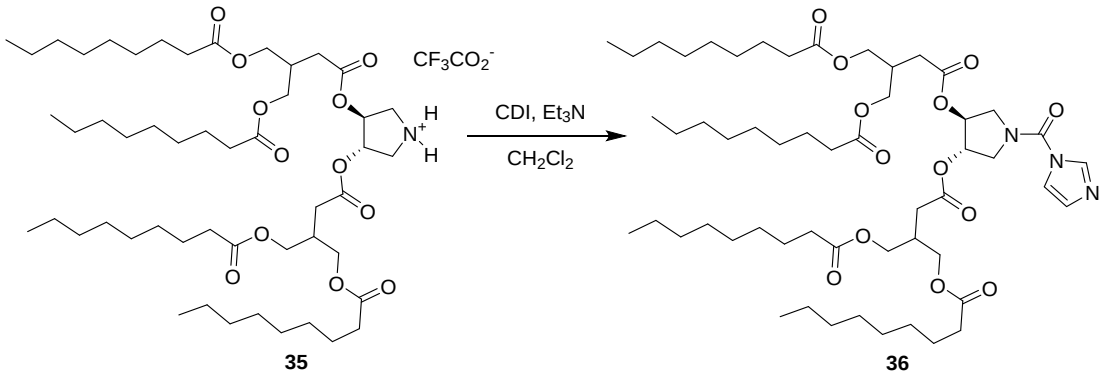


34 35

A una solución de 34 (8,00 g, 8,03 mmol), en CH_2Cl_2 (80 ml) bajo nitrógeno a temperatura ambiente, se añadió CF_3CO_2H (20 ml, 29,78 g, 261 mmol) durante un período de 15 minutos. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 3 horas después de que se completara la adición, después la solución se fundió en un 6,5 % de K_2HPO_4 ac. (160 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (2 x 80 ml), y se secó Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 35 (7,60 g, 7,52 mmol, 94 % de pureza HPLC, 94 % de rendimiento) como un aceite amarillo claro.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 10,48 (brs, 2H), 5,35 (M, 2H), 4,18 (m, 8H), 3,75 (m, 2H), 3,62 (m, 2H), 2,42-2,62 (6H), 2,35 (m, 8H), 1,62 (m, 8H), 1,21-1,33 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,59, calculado para $C_{50}H_{90}NO_{12}$ 895,65. Encontrado 896,6.

Ejemplo 37: Síntesis tetranonanoato de ((((3S,4S)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)pirrolidina-3,4-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (36)

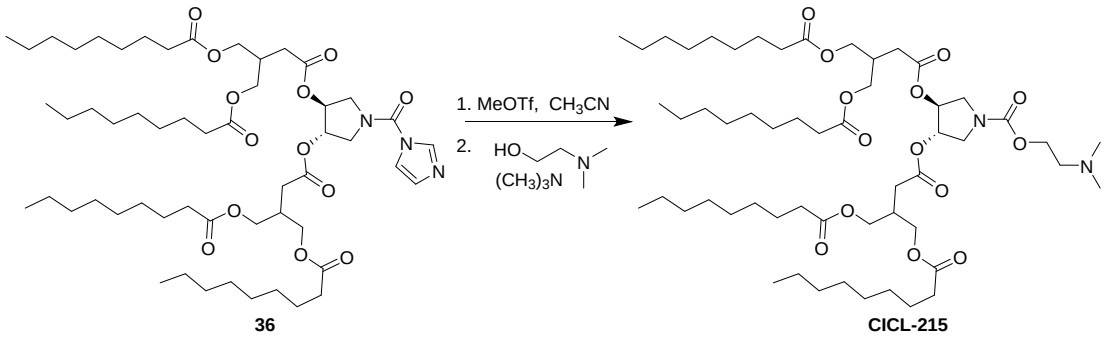


35 36

A una solución de 35 (7,50 g, 7,42 mmol) en diclorometano (150 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: CDI (12,22 g, 75,36 mmol) y Et_3N (6,10 g, 60,28 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl ac. (150 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera (150 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron 36 que se disolvió en n-heptano (300 ml), la fase orgánica se lavó con MeOH/agua (4:1, 75 ml), agua (75 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron 36 (7,00 g, 7,07 mmol, 93 % de pureza por HPLC, 95 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,11 (brs, 1H), 7,42 (brs, 1H), 7,13 (brs, 1H), 5,29 (m, 2H), 4,06-4,25 (10H), 3,82 (m, 2H), 2,60 (m,2H), 2,42 (m, 4H), 2,33 (m, 8H), 1,62 (m, 8H), 1,23-1,38 (40H), 0,90 (t, *J* = 6,9 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,755, calculado para $C_{54}H_{91}N_3O_{13}$ + H^+ 990,66. Encontrado 990,60.

Ejemplo 38: Síntesis de tetranonanoato de ((((3S,4S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)pirrolidina-3,4-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-215)



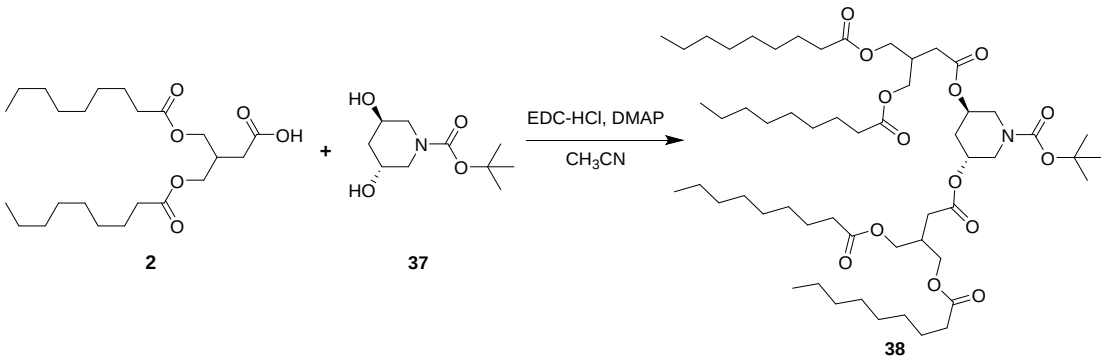
36 **CICL-215**

A una solución de 36 (5,00 g, 5,05 mmol), en CH3CN (100 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (0,91 g, 5,55 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadió una solución de trimetilamina en THF (2,0 M, 7,57 ml, 22,20 mmol) durante un período de 10 minutos seguido de la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,81 g, 9,09 mmol) en una porción. La mezcla se agitó durante 1

hora a 0 °C, después, se calentó en un baño de aceite a 70 °C, y se agitó durante 48 horas. La mezcla de reacción se concentró in vacuo, el residuo se disolvió con n-heptano (550 ml) y la solución resultante se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 100 ml), después la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4, y se filtró. El filtrado se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en CH_3CN (15 ml), y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (columna XB Fenilo 50x250 mm, 10 µm; Fase móvil A: agua/0,1 % de TFA; Fase móvil B: CH_3CN; velocidad de flujo 90 ml/min; gradiente 55 % B a 90 % B en 12 minutos; Longitud de onda: 205 nM). Las fracciones calificadas se concentraron in vacuo, para eliminar CH_3CN, y el pH del residuo acuoso se ajustó a 9,0 con 2 % Na_2CO_3 ac. La fase ac. se extrajo con n-heptano (2 x 275 ml), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con MeOH/agua (4:1, 3 x 110 ml), agua (145 ml) y se secaron (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-215 (2,02 g, 2,00 mmol, 97 % de pureza por HPLC, 40 % de rendimiento) como un aceite transparente, incoloro, viscoso.

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 5,22 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 4,11 (m, 8H), 3,76 (dd, *J* = 12,9, 4,2 Hz, 2H), 3,59 (m, 2H), 2,49-2,64 (4H), 2,43 (m, 4H), 2,28-2,38 (14H), 1,62 (m, 8H), 1,21-1,39 (40H), 0,90 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,575, calculado para $C_{55}H_{98}N_2O_{14}$ + H^+ 1011,71. Encontrado 1011,60.

Ejemplo 39: Tetranonanoato de ((((3R,5R)-1-(terc-butoxicarbonil)piperidina-3,5-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (38)



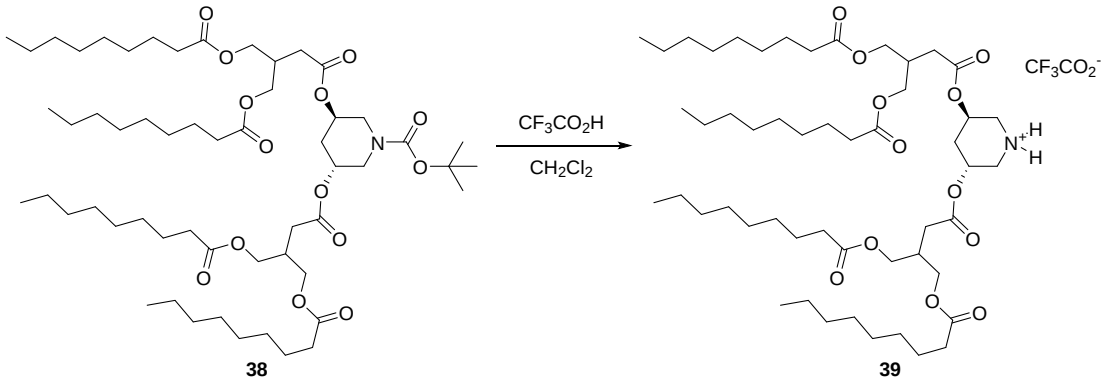
2 37 38

A una solución de 37 (Tetrahedron 2011, 67, 1485, 2,20 g, 10,14 mmol) en acetonitrilo (44 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: 2 (8,60 g, 20,78 mmol), DMAP (1,24 g, 10,14 mmol), y EDC-HCl (4,87 g, 23,34 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en n-heptano (440 ml) y la solución resultante se extrajo con MeOH/agua (10:1, 2 x 110 ml). El solvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en diclorometano (44 ml) y se añadió gel de sílice (20 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200). El solvente se eliminó después al vacío (temperatura < 35 °C). El gel de sílice impregnado 38 resultante se colocó encima de una columna combi-flash cargada con gel de sílice (120 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200), y la columna combi-flash se eluyó con un gradiente de

n-heptano/acetato de etilo (100:0 a 90:10). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar 38, que se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo 50x250 mm, 10 m; fase móvil A: agua (0,1 % de CF3CO2H), fase móvil B: CH_3CN; Caudal: 90 ml/min; Gradiente: 50 % de B a 95 % de B durante 10 minutos; Longitud de onda: 205 nM). Las fracciones calificadas se agruparon, el acetonitrilo se retiró in vacuo y la solución resultante se extrajo con n-heptano (440 ml). La fase orgánica se lavó con MeOH/agua (4:1, 2 x 110 ml), agua (110 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron 38 (7,10 g, 7,02 mmol, 98 % de pureza HPLC, 69 % de rendimiento) como un aceite viscoso, incoloro.

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 5,05 (brs, 2H), 4,12 (m, 8H), 3,30-3,75 (4H), 2,58 (m, 2H), 2,40 (m, 4H), 2,34 (m, 8H), 2,00 (brm, 2H), 1,62 (m, 8H), 1,49 (s, 9H), 1,20-1,37 (40H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 2,017, calculado para $C_{56}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1032,70. Encontrado 1032,60.

Ejemplo 40: Síntesis de trifluoroacetato de (3R,5R)-3,5-bis((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)piperidin-1-io (39)

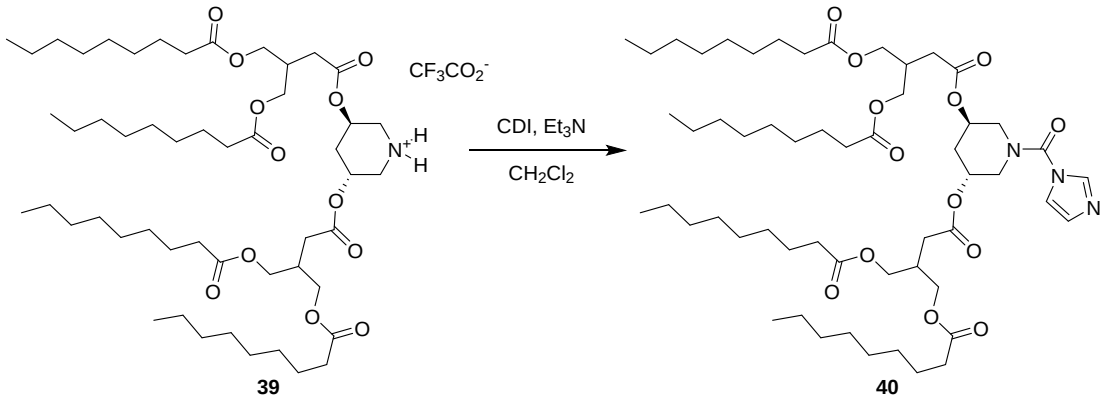


38 39

A una solución de 38 (6,00 g, 5,94 mmol), en CH_2Cl_2 (30 ml) bajo nitrógeno, enfriada a 20 °C, se añadió CF_3CO_2H (12 ml, 17,87 g, 157 mmol) durante un período de 15 minutos. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 3 horas a 20 °C después de que se completara la adición, después la solución se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (600 ml). La solución resultante se lavó con salmuera (2 x 120 ml), después la fase orgánica se concentró in vacuo para proporcionar 39 (5,40 g, 5,27 mmol, 97 % de pureza HPLC, 89 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 5,30 (m, 2H), 4,11 (m, 8H), 3,38 (dd, *J* = 13,6, 3,6 Hz, 2H), 3,23 (m, 2H), 2,40-2,58 (6H), 2,38 (m, 8H), 2,18 (m, 2H), 1,63 (m, 8H), 1,23-1,38 (40H), 0,90 (t, *J* = 7,2 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,611, calculado para $C_{51}H_{92}NO_{12}$ 910,66. Encontrado 910,60.

Ejemplo 41: Síntesis de tetranonanoato de ((((3R,5R)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)piperidina-3,5-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (40)



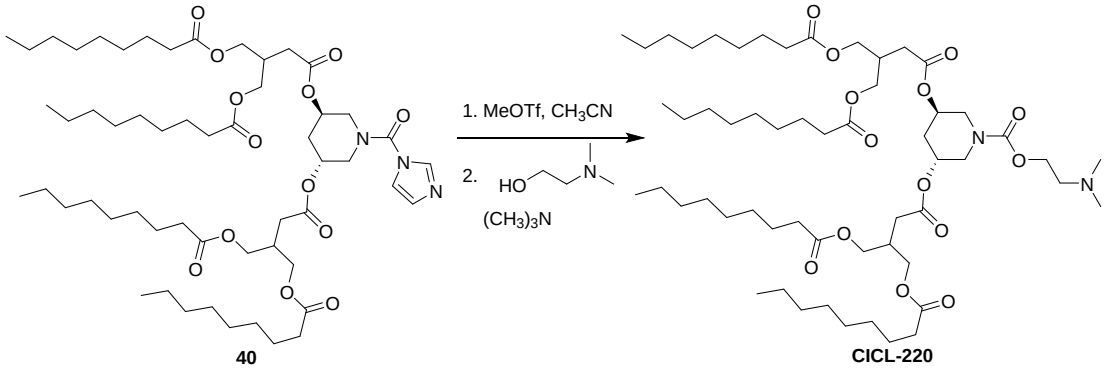
39 40

A una solución de 39 (5,40 g, 5,33 mmol) en diclorometano (108 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: CDI (8,64 g, 53,60 mmol) y Et_3N (4,33 g, 42,86 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl ac. (125 ml). La capa ac. se extrajo con diclorometano (2 x 270 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron in vacuo para proporcionar crudo 40 que se disolvió en n-heptano (675 ml). La fase orgánica se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 270 ml), y se concentró in vacuo, proporcionando 40 (4,90 g, 4,68 mmol, 94 % de pureza por HPLC, 88 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 7,98 (brs, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,14 (s, 1H), 5,18 (m, 2H), 4,10 (m, 8H), 3,80 (m, 2H), 3,62 (m, 2H), 2,54 (m, 2H), 2,46 (m, 4H), 2,32

(m, 8H), 2,14 (m, 2H), 1,62 (m, 8H), 1,22-1,38 (40H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,800, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,68. Encontrado 1004,60.

Ejemplo 42: Síntesis de tetranonanoato de ((((3R,5R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)piperidina-3,5-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-220)



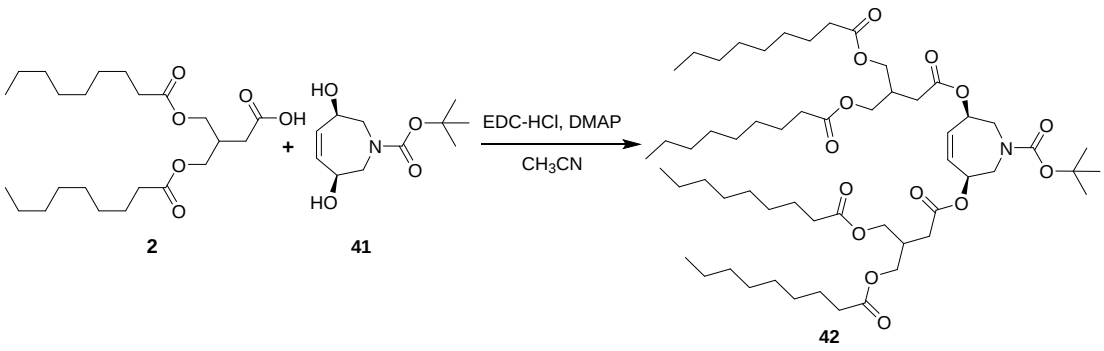
Una solución de 40 (5,50 g, 6,57 mmol) en acetonitrilo (75 ml), bajo nitrógeno, se enfrió en un baño de agua helada. A esta solución enfriada se añadió MeOTf (1,08 g, 6,57 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se agitó durante 2 horas, después se añadió Me_3N (2 M en THF, 10,9 ml, 21,8 mmol) durante un período de 10 minutos, esto fue seguido por la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,73 g, 8,22 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C, después se colocó en un baño de aceite a 60 °C y se agitó durante

120 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (550 ml). La solución se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 100 ml), y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron CICL-220 crudo (4,80 g) que se purificó por HPLC preparativa de fase inversa (columna Waters C18; fase móvil A (0,1 % de TFA en agua), fase móvil B (acetonitrilo); con un gradiente de 50 % a 90 % de B durante 12 minutos; UV 205 nM). Las fracciones calificadas se combinaron, y el acetonitrilo se retiró al vacío. La mezcla resultante se ajustó a pH 8 con 2 % de Na_2CO_3 ac. y se extrajo con n-heptano (2 x 275 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con MeOH/agua (4:1, 3 x 110 ml), agua (110 ml) y se secaron (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron CICL-220 (2,35 g, 2,29 mmol, 97 % de pureza por HPLC, 35 % de rendimiento) como un aceite transparente e incoloro.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 5,06 (brm, 2H), 4,22 (m, 2H), 4,10 (m, 8H), 3,73 (brm, 1H), 3,58 (brm, 2H), 3,41 (brm, 1H), 2,58 (m, 4H), 2,41 (m, 4H), 2,24-2,34 (14H), 1,99 (brm, 2H), 1,62 (m, 8H), 1,20-1,37 (40H), 0,87 (t, *J* = 6,6 Hz, 12H); **LCMS:** RT 1,588, calculado para $C_{56}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,70.

Ejemplo 43: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel-(*3R,6S)-1-(terc-butoxicarbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-

3,6-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (42)



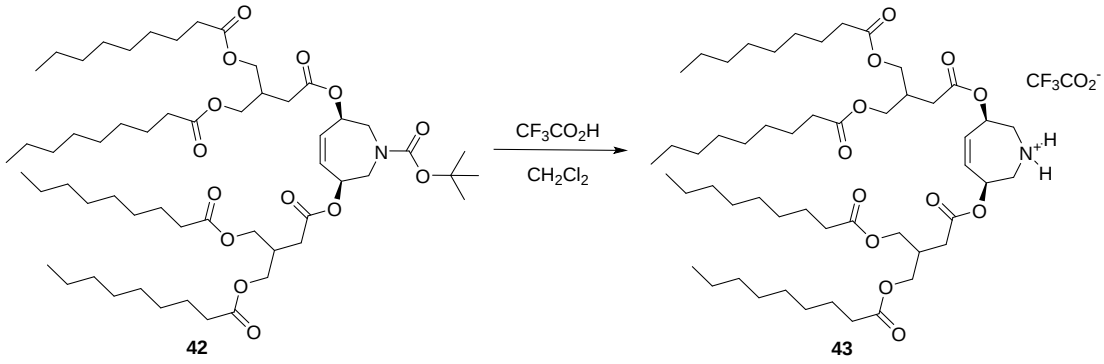
2 41 42

A una solución de 41 (Nature Communications 2019, 10, 21, 1,42 g, 6,20 mmol) en acetonitrilo (50 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió orden: 2 (5,26 g, 12,68 mmol), DMAP (0,76 g, 6,20 mmol), y EDC-HCl (2,98 g, 15,50 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en n-heptano (200 ml) y la solución resultante se extrajo con MeOH/agua (10:1, 2 x 100 ml). El solvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en diclorometano (15 ml) y se añadió gel de sílice (20 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200). El solvente se eliminó después al vacío (temperatura < 35 °C). El gel de sílice impregnado 42 resultante se colocó encima de una columna combi-flash cargada con gel de sílice (120 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200), y la columna combi-flash se eluyó con un gradiente de n-heptano/acetato de etilo (40:1 a 25:1). Las

fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar 42 (5,20 g, 5,09 mmol, 92 % de pureza HPLC, 84 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 5,69 (s, 2H), 5,48 (m, 2H), 4,12 (m, 8H), 4,08 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 3,17 (m, 2H), 2,59 (m, 2H), 2,48 (m, 4H), 2,31 (m, 8H), 1,63 (m, 8H), 1,50 (s, 9H), 1,22-1,35 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 2,230, calculado para $C_{57}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1044,70. Encontrado 1044,80.

Ejemplo 44: Síntesis de trifluoroacetato de *rel*-(3R,6S)-3,6-bis((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepin-1-io (43)

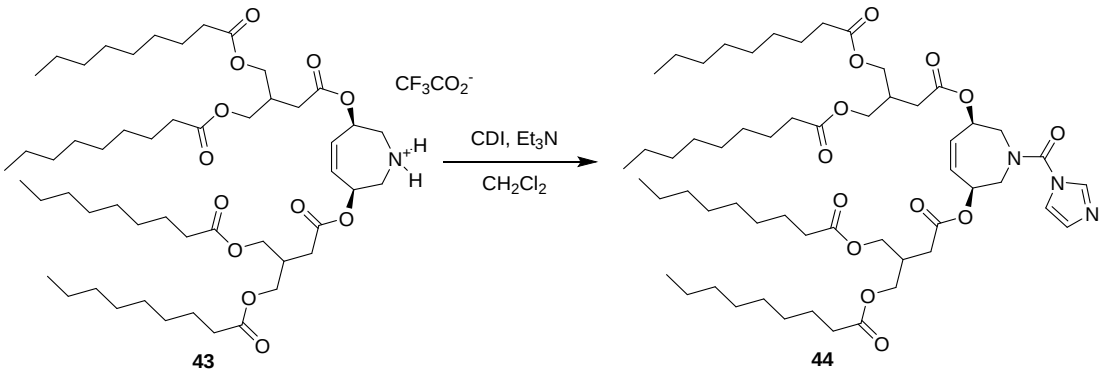


A una solución de 42 (5,10 g, 5,10 mmol), en CH_2Cl_2 (75 ml) bajo nitrógeno a temperatura ambiente, se añadió CF_3CO_2H (25 ml, 37,23 g, 326 mmol) durante un período de 15 minutos. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 18 horas a temperatura ambiente después de que se

completara la adición, después la solución se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (500 ml). La solución resultante se lavó con salmuera (2 x 200 ml), después la fase orgánica se concentró in vacuo para proporcionar 43 (5,03 g, 4,85 mmol, 93 % de pureza HPLC, 95 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 6,00 (s, 2H), 5,74 (m, 2H), 4,13 (m, 8H), 3,52 (m, 4H), 2,57 (m, 2H), 2,46 (m, 4H), 2,32 (m, 8H), 1,62 (m, 8H), 1,20-1,37 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,77, calculado para $C_{52}H_{92}NO_{12}$ 922,66. Encontrado 922,8.

Ejemplo 45: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3R,6S)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-3,6-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (44)



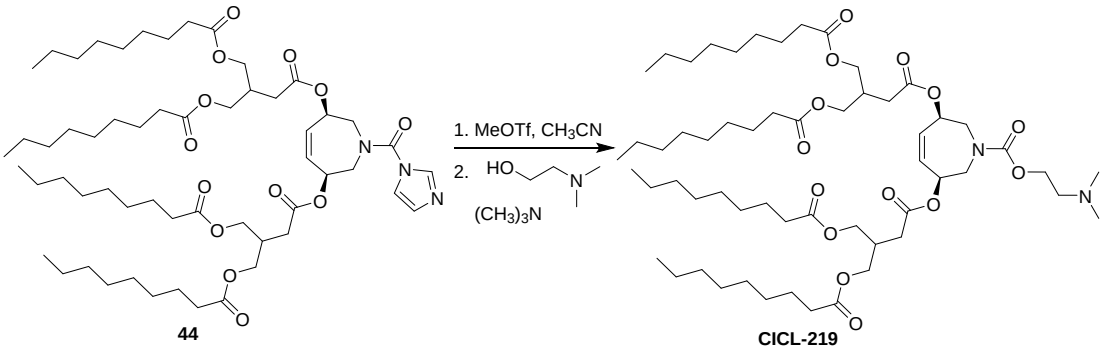
43 44

A una solución de 43 (5,00 g, 4,82 mmol) en diclorometano (100 ml), a temperatura ambiente bajo

nitrógeno, se añadió en orden: CDI (7,94 g, 49,00 mmol) y Et_3N (3,97 g, 39,20 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl ac. (125 ml). La capa ac. se extrajo con diclorometano (2 x 200 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron in vacuo para proporcionar crudo 44 que se disolvió en n-heptano (300 ml). La fase orgánica se lavó con MeOH/agua (8:1, 2 x 200 ml), y se concentró in vacuo, proporcionando 44 (4,30 g, 4,23 mmol, 96 % de pureza por HPLC, 88 % de rendimiento) como un aceite amarillo.

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 8,01 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,15 (s, 1H), 5,85 (m, 2H), 5,61 (m, 2H), 4,00-4,22 (10H), 3,61-3,73 (2H), 2,48 (m, 2H), 2,45 (m, 4H), 2,27-2,38 (8H), 1,61 (m, 8H), 1,20-1,39 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,777, calculado para $C_{56}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ a 1016,68. Encontrado 1016,70.

Ejemplo 46: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3R,6S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-3,6-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-219)

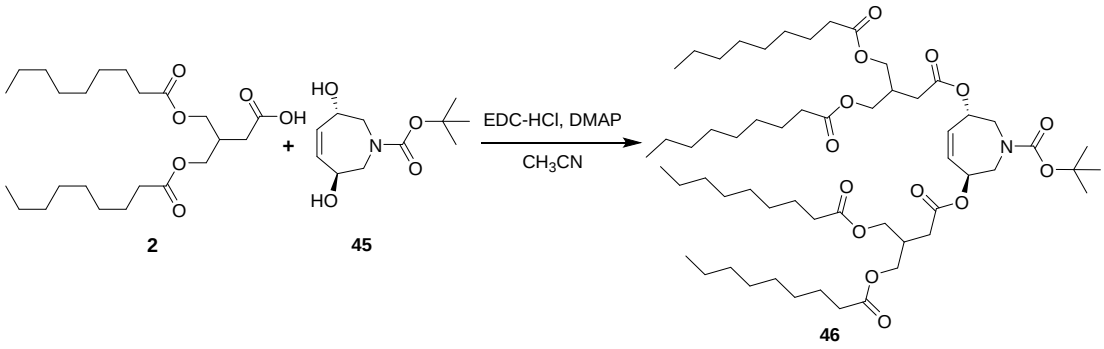


Una solución de 44 (4,20 g, 4,13 mmol) en acetonitrilo (60 ml), bajo nitrógeno, se enfrió en un baño de agua helada. A esta solución enfriada se añadió MeOTf (0,81 g, 5,00 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se agitó durante 2 horas, después se añadió Me_3N (2 M en THF, 6,20 ml, 12,40 mmol) durante un período de 10 minutos, y esto fue seguido por la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,55 g, 6,20 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C, después se colocó en un baño de aceite a 60 °C y se agitó durante 48 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (300 ml). La solución se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 50 ml), y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron CICL-219 crudo que se disolvió en diclorometano (20 ml), y gel de sílice (20 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200). El solvente se eliminó después al vacío (temperatura < 35 °C). El gel de sílice impregnado CICL-219 resultante se colocó encima

de una columna combi-flash cargada con gel de sílice (120 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200), y la columna combi-flash se eluyó con un gradiente de n-heptano/acetato de etilo (100:0 a 40:70). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar CICL-219 que se disolvió en n-heptano (300 ml), se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 50 ml), agua (2 x 50 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron CICL-219 (1,49 g, 1,44 mmol, 98 % de pureza por HPLC, 35 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 5,69 (s, 2H), 5,52 (brm, 2H), 4,27 (m, 2H), 3,98-4,20 (10H), 3,23 (m, 2H), 2,62 (m, 4H), 2,45 (m, 4H), 2,28-2,38 (14H), 1,64 (m, 8H), 1,21-1,39 (40H), 0,90 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,652, calculado para $C_{57}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1037,72. Encontrado 1037,60.

Ejemplo 47: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3S,6S)-1-(terc-butoxicarbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-3,6-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (46)

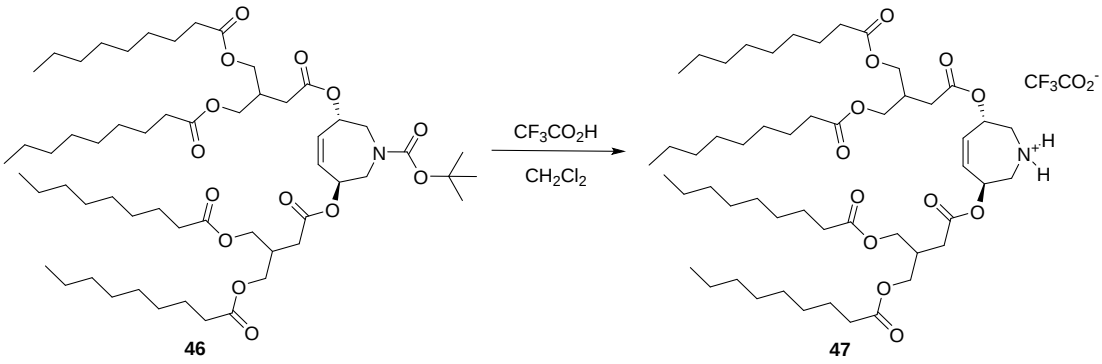


2 45 46

A una solución de 45 (Nature Communications 2019, 10, 21, 1,45 g, 6,32 mmol) en acetonitrilo (50 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió orden: 2 (5,37 g, 13,00 mmol), DMAP (0,78 g, 6,30 mmol), y EDC-HCl (3,04 g, 15,80 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en n-heptano (100 ml) y la solución resultante se extrajo con MeOH/agua (10:1, 2 x 100 ml). El solvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en diclorometano (15 ml) y se añadió gel de sílice (20 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200). El solvente se eliminó después al vacío (temperatura < 35 °C). El gel de sílice impregnado 46 resultante se colocó encima de una columna combi-flash cargada con gel de sílice (120 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200), y la columna combi-flash se eluyó con un gradiente de n-heptano/acetato de etilo (40:1 a 25:1). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar 46 (5,32 g, 5,20 mmol, 95 % de pureza HPLC, 82 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 5,78-5,88 (2H), 5,52 (brm, 1H), 5,42 (brm, 1H), 4,13 (m, 8H), 3,90 (m, 1H), 3,82 (m, 1H), 3,49 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 2,59 (m, 2H), 2,44 (m, 4H), 2,33 (m, 8H), 1,62 (m, 8H), 1,49 (s, 9H), 1,21-1,38 (40H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 12H); **LCMS:** RT 2,037, calculado para $C_{57}H_{99}NO_{14}$ + Na+ 1044,70. Encontrado 1044,70.

Ejemplo 48: Síntesis de trifluoroacetato de *rel*-(3S,6S)-3,6-bis((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepin-1-io (47)

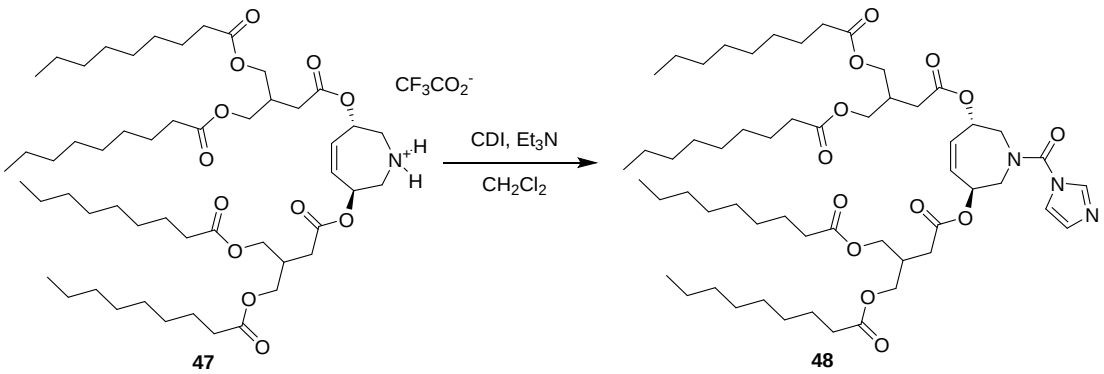


A una solución de 46 (5,20 g, 5,10 mmol), en CH_2Cl_2 (75 ml) bajo nitrógeno a temperatura ambiente, se añadió CF_3CO_2H (25 ml, 37,23 g, 326 mmol) durante un período de 15 minutos. La mezcla de reacción se dejó agitar durante 18 horas a temperatura ambiente después de que se completara la adición, después la solución se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (500 ml). La

solución resultante se lavó con salmuera (2 x 200 ml), después la fase orgánica se concentró in vacuo para proporcionar 47 (5,16 g, 4,98 mmol, 90 % de pureza HPLC, 98 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 6,10-6,18 (2H), 5,62 (m, 2H), 5,31 (s, 2H), 4,10 (m, 8H), 3,54 (m, 4H), 2,47-2,62 (6H), 2,30 (m, 8H), 1,63 (m, 8H), 1,20-1,37 (40H), 0,90 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,767, calculado para $C_{52}H_{92}NO_{12}$ 922,66. Encontrado 922,8.

Ejemplo 49: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3S,6S)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-3,6-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (48)



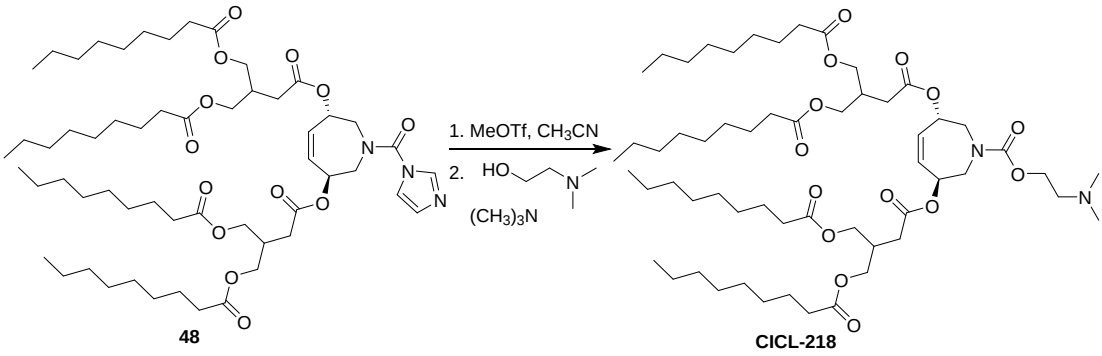
47 48

A una solución de 47 (5,10 g, 4,92 mmol) en diclorometano (100 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden: CDI (8,10 g, 50,00 mmol) y Et_3N (4,05 g, 40,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó

durante 18 horas a temperatura ambiente, después se fundió en 0,5 M de HCl ac. (125 ml). La capa ac. se extrajo con diclorometano (2 x 300 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentraron in vacuo para proporcionar crudo 48 que se disolvió en n-heptano (300 ml). La fase orgánica se lavó con MeOH/agua (8:1, 2 x 200 ml), agua (200 ml), y se concentró in vacuo, proporcionando 48 (4,30 g, 4,23 mmol, 95 % de pureza por HPLC, 86 % de rendimiento) como un aceite amarillo.

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl3): δ = 7,99 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,14 (s, 1H), 5,80-5,90 (2H), 5,68 (m, 2H), 4,12 (m, 8H), 3,95 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,41 (m, 4H), 2,32 (m, 8H), 1,62 (m, 8H), 1,20-1,40 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,945, calculado para $C_{56}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ a 1016,68. Encontrado 1016,70.

Ejemplo 50: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3S,6S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-3,6-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-218)

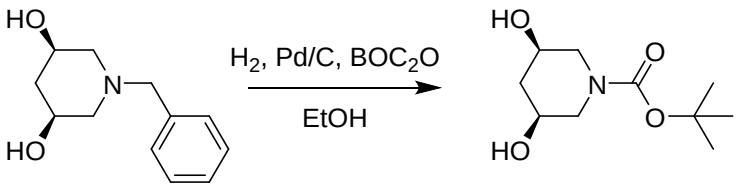


Una solución de 48 (4,20 g, 4,13 mmol) en acetonitrilo (60 ml), bajo nitrógeno, se enfrió en un baño de agua helada. A esta solución enfriada se añadió MeOTf (0,81 g, 5,00 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se agitó durante 2 horas, después se añadió Me_3N (2 M en THF, 6,20 ml, 12,40 mmol) durante un período de 10 minutos, y esto fue seguido por la adición de 2-dimetilaminoetanol (0,55 g, 6,20 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C, después se colocó en un baño de aceite a 60 °C y se agitó durante 48 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se concentró in vacuo y el residuo se disolvió en n-heptano (300 ml). La solución se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 50 ml), y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron CICL-218 crudo que se disolvió en n-heptano (300 ml). La fase orgánica se lavó con MeOH/agua 5:1, 2 x 50 ml), agua (50 ml) y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo dieron CICL-218 crudo que se disolvió con

diclorometano (20 ml), y gel de sílice (20 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200). El solvente se eliminó después al vacío (temperatura < 35 °C). El gel de sílice impregnado CICL-218 resultante se colocó encima de una columna combi-flash cargada con gel de sílice (120 g, Tipo: ZCX-2, malla 100-200), y la columna combi-flash se eluyó con un gradiente de n-heptano/acetato de etilo (100:0 a 40:70). Las fracciones calificadas se combinaron y se concentraron in vacuo para proporcionar CICL-218 que se disolvió en n-heptano (300 ml), se lavó con MeOH/agua (5:1, 2 x 50 ml), agua (2 x 50 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración in vacuo proporcionaron CICL-218 (1,16 g, 1,12 mmol, 97 % de pureza por HPLC, 27 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ = 5,77-5,89 (2H), 5,50 (m, 2H), 4,27 (m, 1H), 4,07-4,20 (9H), 3,83 (m, 2H), 3,64 (m, 1H), 3,53 (m, 1H), 2,60 (m, 4H), 2,42 (m, 4H), 2,24-2,33 (14H), 1,62 (m, 8H), 1,21-1,37 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,652, calculado para $C_{57}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1037,72. Encontrado 1037,70.

Ejemplo 51: Síntesis de *rel*-(*3R,5S*)-3,5-dihidroxipiperidina-1-carboxilato de terc-butilo (50)

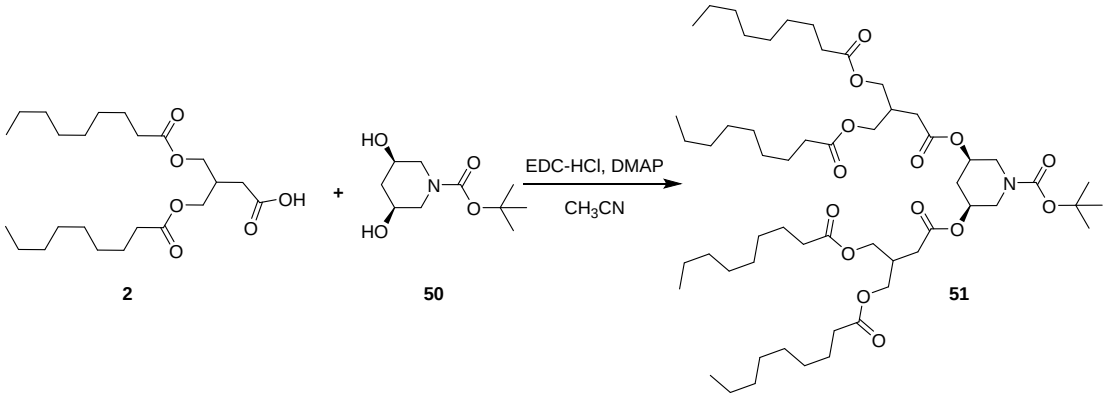


49 **50**

A una solución de 49 (WO2013149362, 8,00 g, 38,6 mmol) en EtOH (160 ml) se añadió BOC_2O (12,64 g, 57,9 mmol) y Pd/C (1,60 g, 20 % en peso). La solución resultante se colocó bajo hidrógeno (15 atm) a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite®, la torta filtrante se enjuagó con EOH (3 x 50 ml) y los filtrados combinados se concentraron in vacuo para proporcionar 50 crudo como un aceite amarillo pálido. El crudo 50 se disolvió en THF (30 ml) y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo, 50x250 mm, 10μm; fase móvil A: agua (0,1 % de TFA), fase móvil B: acetonitrilo; Velocidad de flujo: 90 ml/min; Gradiente: 0 % de B a 50 % de B en 10 min, 50 % de B recogido; Longitud de onda: 200 nM). Las fracciones calificadas se agruparon y se concentraron in vacuo para producir 50 (4,20 g, 19,33 mmol, 50 % de rendimiento), como un aceite transparente, incoloro.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4,31 (brt, *J* = 5,00 Hz, 1H), 4,17 (brs, 2H), 3,91-4,20 (2H), 3,41-3,63 (3H), 2,35 (m, 1H), 1,89 (brd, *J* = 14,1 Hz, 1H).

Ejemplo 52: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-(3R,5S)-1-(terc-butoxicarbonil)piperidina-3,5-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (51)



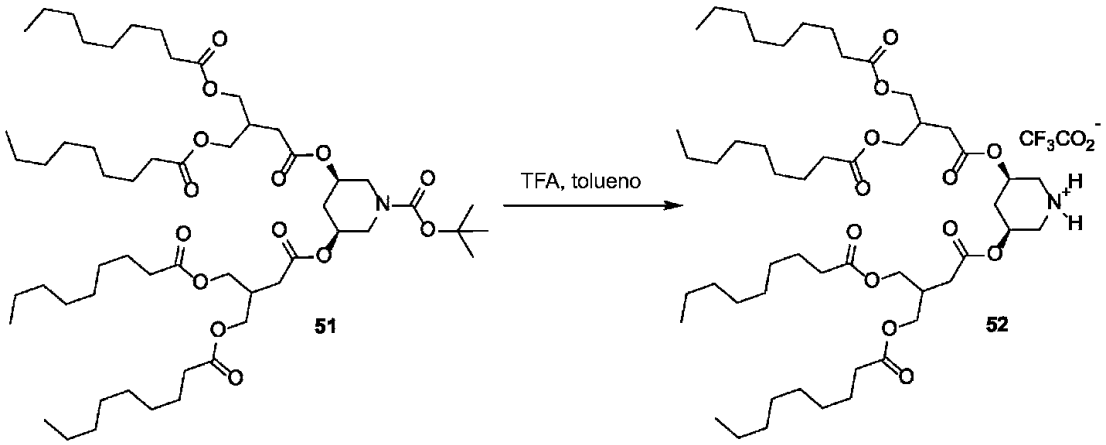
2 **50** **51**

A una solución de **50** (2,50 g, 11,50 mmol) en acetonitrilo (200 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió en orden **2** (10,00 g, 24,12 mmol), DMAP (1,40 g, 11,50 mmol), y EDC-HCl (5,53 g, 28,85 mmol). La solución resultante se dejó agitar durante 18 horas a temperatura ambiente, después se concentró *in vacuo*. El residuo se trató con n-heptano (500 ml) y MeOH/H_2O (150 ml, 4:1). La fase n-heptano se separó, se lavó con MeOH/H_2O (2 x 150 ml, 4:1) y después se secó sobre Na_2SO_4. La mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado, la torta filtrante se enjuagó con n-heptano (50 ml) y los filtrados combinados se concentraron *in vacuo* para proporcionar crudo **51** como un aceite viscoso, amarillo. El crudo **51** se disolvió en acetonitrilo (30 ml) y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo, 50x250 mm,

10µm; fase móvil A: agua (0,1 % de TFA), fase móvil B: acetonitrilo; Velocidad de flujo: 90 ml/min; Gradiente: 60 % de B a 95 % de B en 10 min, 50 % de B recogido; Longitud de onda: 200 nM). Las fracciones calificadas eluyeron a 95 % de B y se concentraron *in vacuo*. El residuo se extrajo con n-heptano (500 ml). La fase n-heptano se extrajo entonces con MeOH/H_2O (4:1, 200 ml), H_2O (200 ml), y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración *in vacuo* dieron **51** (10,50 g, 10,39 mmol, 90 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido, viscoso.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,30 (brm, 1H), 3,98-4,42 (8H), 3,73 (brm, 1H), 3,42 (brm, 1H), 2,56 (m, 2H), 2,42 (m, 4H), 2,20-2,37 (12H), 2,00 (m, 1H), 1,53-1,68 (8H), 1,49 (s, 9H), 1,20-1,38 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 2,004, calculado para $C_{56}H_{99}NO_{14}$ + Na^+ 1032,70. Encontrado 1032,60.

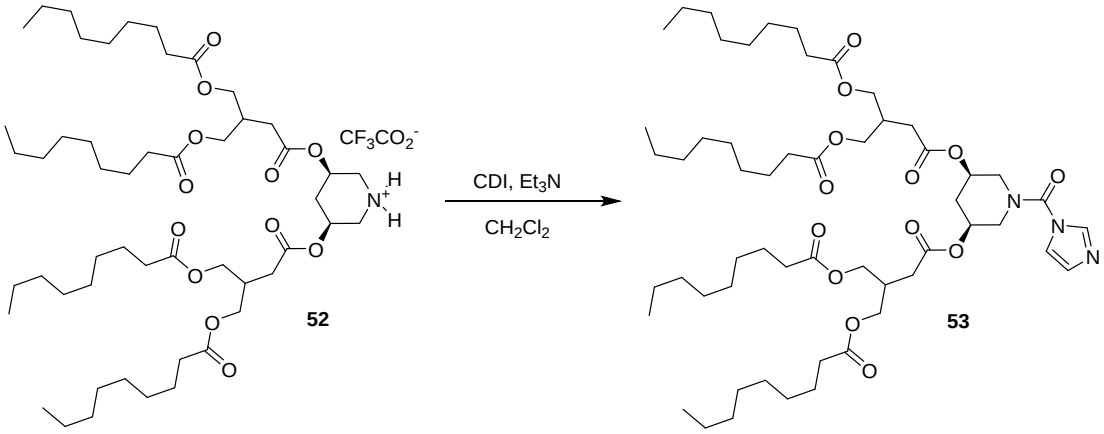
Ejemplo 53: Trifluoroacetato de *Rel*-(3R,5S)-3,5-bis((4-(nonanoiloxi)-3 ((nonanoiloxi)metil) butanoil)oxi)piperidin-1-io (52)



A una solución de 51 (10,50 g, 10,30 mmol) en tolueno (47 ml), a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió TFA (16 ml, 23,84 g, 0,21 mol) durante un período de 10 minutos. La mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, después se diluyó con n-heptano (105 ml). La solución resultante se lavó con 10 % de K_2HPO_4 ac. (200 ml), MeOH/H_2O (5:1, 2 x 100 ml), salmuera (200 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración *in vacuo* proporcionaron 52 crudo (9,80 g, 9,57 mmol, 89 % de pureza HPLC, 73 % de rendimiento) como un aceite viscoso, amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,38 (brm, 1H) 4,40 (brm, 2H), 3,90-4,20 (9H), 3,49-3,62 (2H), 2,40-2,70 (7H), 2,31 (m, 8H), 2,07 (m, 1H), 1,56 (m, 8H), 1,19-1,37 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,610, calculado para $C_{51}H_{91}NO_{12}$ + Na+ 932,64. Encontrado 932,60.

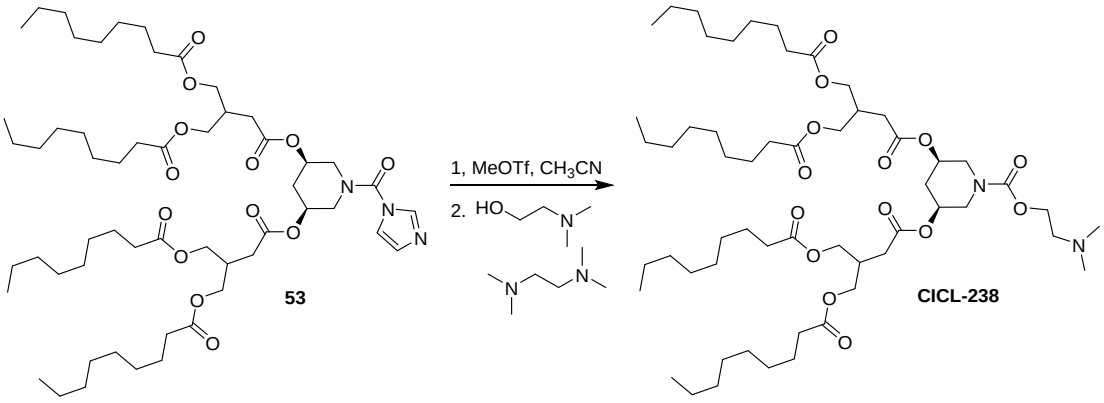
Ejemplo 54: Tetranonanoato de (((*Rel*-(3R,5S)-1-(1H-imidazol-1-carbonil)piperidina-3,5-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (53)



A una solución de 52 (9,80 g, 9,57 mmol) en CH_2Cl_2 (200 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno, se añadió CDI (15,75 g, 97,13 mmol) seguido de Et_3N (4,84 g, 47,9 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora a 0 °C, después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. La solución se lavó con 0,5 M de HCl ac. (2 x 200 ml), salmuera (200 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración, y la concentración in vacuo proporcionaron **53** crudo que se disolvió en n-heptano (400 ml), y la solución resultante se lavó con MeOH/H_2O (5:1, 2 x 100 ml), y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración *in vacuo* proporcionaron **53** crudo (9,30 g, 9,26 mmol, 92 % de pureza HPLC, 96 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,06 (brs, 1H), 7,35 (brs, 1H), 7,11 (brs, 1H), 5,27 (m, 1H), 4,70 (m, 1H), 3,90-4,37 (12H) 2,37-2,57 (7H), 2,29 (m, 8H), 2,03 (m, 1H), 1,62 (m, 8H), 1,20-1,37 (40H), 0,88 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,746, calculado para $C_{55}H_{93}N_3O_{13}$ + H^+ 1004,67. Encontrado 1004,60.

Ejemplo 55: Tetranonanoato de (((*Rel*-(3R,5S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)piperidina-3,5-diil)bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-238)



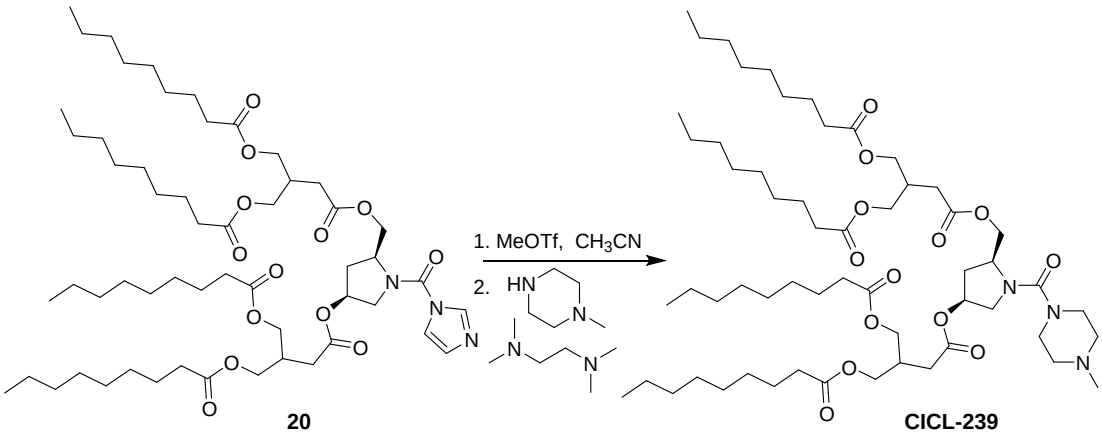
A una solución de 53 (6,00 g, 5,97 mmol), en CH_3CN (60 ml), enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno se añadió MeOTf (1,18 g, 7,19 mmol) durante un período de 5 minutos. La mezcla se dejó agitar durante 2 horas después de que se completara la adición, después se añadieron tetrametil-etilendiamina (2,10 g, 18,1 mmol) y dimetiamino-etanol (0,798 g, 8,95 mmol) en orden. La mezcla se agitó durante 1 hora a 0 °C, después se calentó a

temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas adicionales. El solvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se disolvió en n-heptano (500 ml) y la solución resultante se lavó con MeOH/H_2O (5:1, 2 x 150 ml), y se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración *in vacuo* proporcionaron **CICL-238** crudo que se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo, 50x250 mm, 10µm; fase móvil A: agua (0,1 % de TFA), fase móvil B: acetonitrilo; Velocidad de flujo: 90 ml/min; Gradiente: 50 % de B a 90 % de B en 10 min, 90 % de B recogido; Longitud de onda: 200 nM). Las fracciones calificadas se agruparon, y el acetonitrilo se eliminó *in vacuo* para dar **CICL-238** que se disolvió en n-heptano (400 ml), y la fase acuosa se trató a pH 8 con Na_2CO_3 ac. La fase orgánica se separó, se lavó con MeOH/H_2O (5:1, 2 x 100 ml), agua (200 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración *in vacuo* proporcionaron **CICL-238** (2,04 g, 1,99 mmol, 97 % de pureza HPLC, 33 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,33 (brm,1H), 4,01-4,41 (13H), 3,77 (brm, 1H), 3,49 (brd, *J* = 12,6 Hz, 1H), 2,57 (m, 4H), 2,42 (m, 4H), 2,18-2,39 (15H), 2,04 (brm, 1H), 1,62 (m, 8H), 1,18-1,39 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 0,835, calculado para $C_{56}H_{100}N_2O_{14}$ + H^+ 1025,73. Encontrado 1025,60.

Ejemplo 56: Dinonanoato de 2-(2-(((2S,4S)-1-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-

((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil (CICL-239)

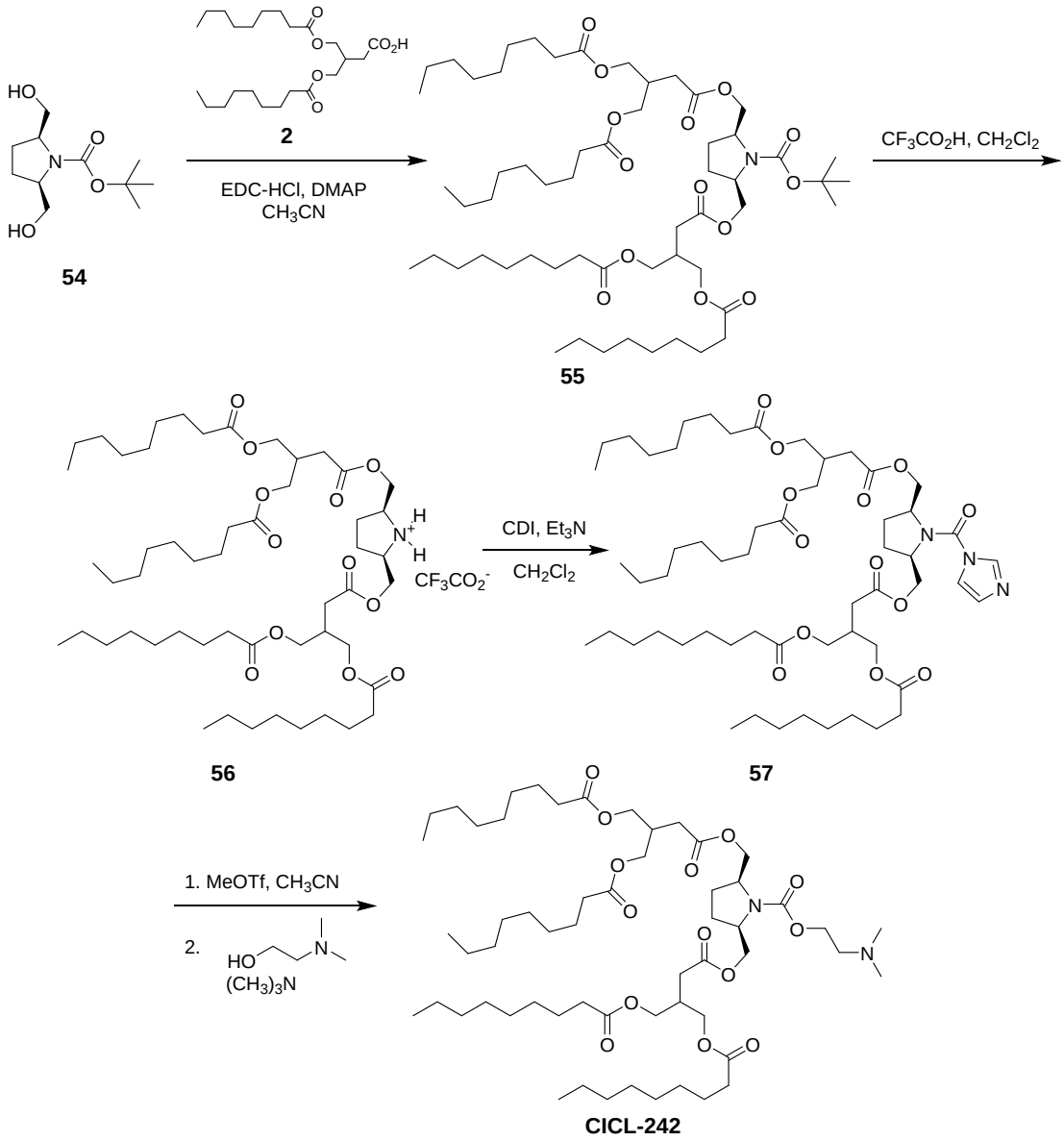


A una solución de **20** (6,00 g, 5,97 mmol), en acetonitrilo (60 ml) enfriada en un baño de agua helada bajo nitrógeno, se añadió MeOTf (1,18 g, 7,19 mmol) en una porción. La solución se dejó agitar durante 2 horas a 0 °C, después se añadieron terametiletilendiamina (2,10 g, 18,1 mmol) y N-metilpiperazina (0,90 g, 9,00 mmol) en orden. La mezcla se agitó durante 1 hora a 0 °C, después se calentó a temperatura ambiente y se continuó agitando durante 18 horas adicionales. El solvente se eliminó *in vacuo*, el residuo se disolvió en n-heptano (500 ml), y la solución resultante se lavó con MeOH/H_2O (5:1, 2 x 150 ml), después la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4. La filtración y la concentración *in vacuo* proporcionaron **CICL-239** crudo, el cual se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: XB Fenilo, 50x250 mm, 10µm; fase móvil

A: agua (0,1 % de TFA), fase móvil B: acetonitrilo; Velocidad de flujo: 90 ml/min; Gradiente: 50 % de B a 90 % de B en 10 min, 90 % de B recogido; Longitud de onda: 200 nM). Las fracciones calificadas se agruparon, y el acetonitrilo se eliminó *in vacuo* para dar **CICL-239** que se disolvió en n-heptano (400 ml), la fase acuosa se trató a pH 8 con Na_2CO_3 ac. La fase orgánica se separó, se lavó con $MeOH/H_2O$ (5:1, 2 x 100 ml), agua (200 ml), y se secó (Na_2SO_4). La filtración y la concentración *in vacuo* proporcionaron **CICL-239** (2,06 g, 1,99 mmol, 96 % de pureza HPLC, 33 % de rendimiento) como un aceite amarillo pálido.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5,13 (m, 1H), 4,52 (m, 1H), 4,04-4,17 (10H), 3,72 (m, 1H), 3,14-3,47 (5H), 2,55 (m, 2H), 2,24-2,50 (20H), 1,81 (m, 1H), 1,63 (m, 8H), 1,18-1,39 (40H), 0,89 (m, 12H); **LCMS:** RT 1,582, calculado para $C_{57}H_{101}N_3O_{13}$ + H^+ 1036,74. Encontrado 1036,60.

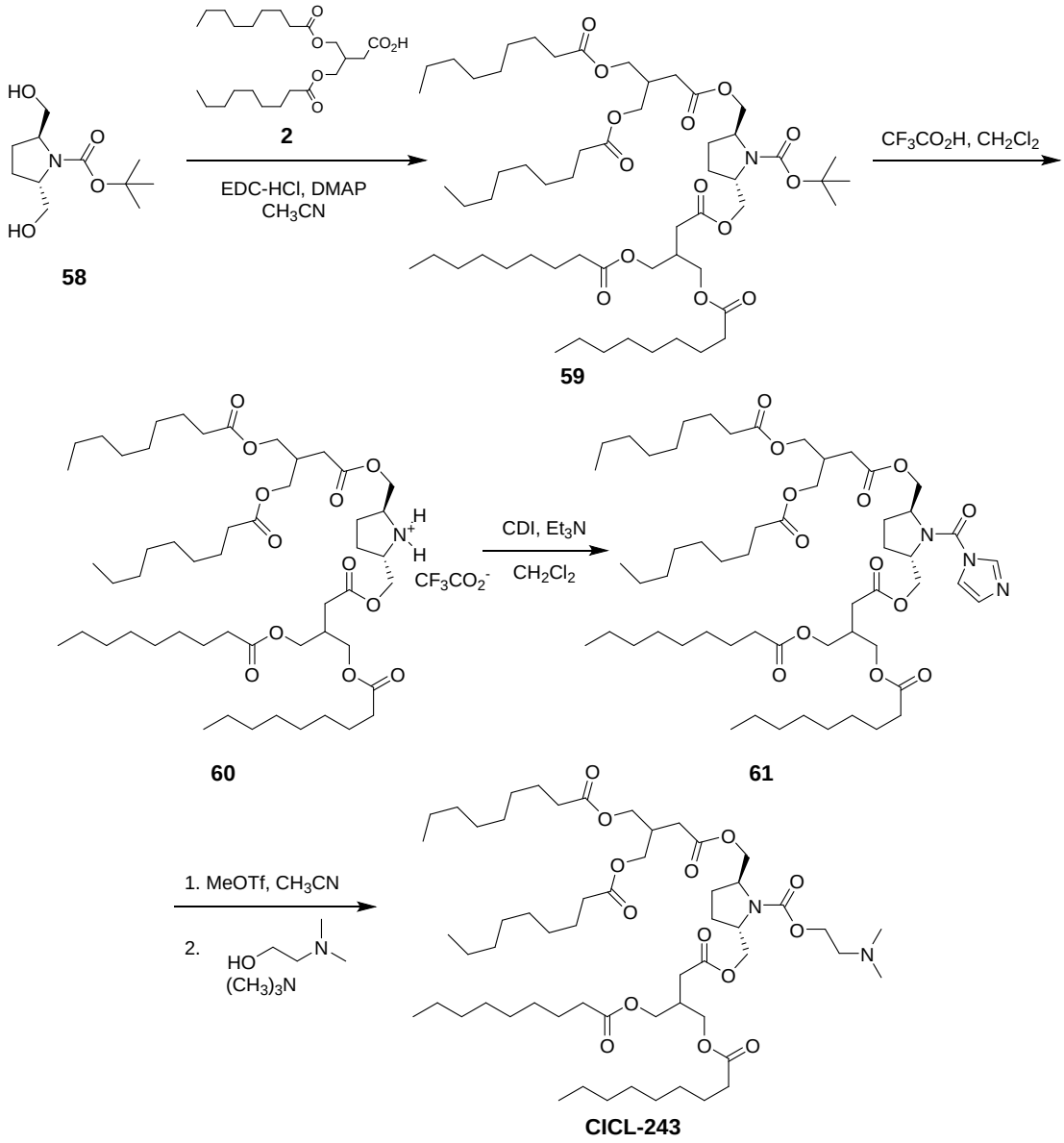
Ejemplo 57: Síntesis de tetranonanoato de ((((*Rel*-(2R,5S)-1-((2-dimetilamino)etoxi)carbonil)pirrolidina-2,5-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-242)



Rel-(2R,5S)-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo **54** (*Synthesis* **2013**, *45*, 2966-2970) se acopla con **2** utilizando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **55**. La desprotección de la BOC-amina en **55** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **56**. Tratamiento de **56** con carbonil-di-imidazol y Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimidazol **57**. La alquilación de **57** con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal

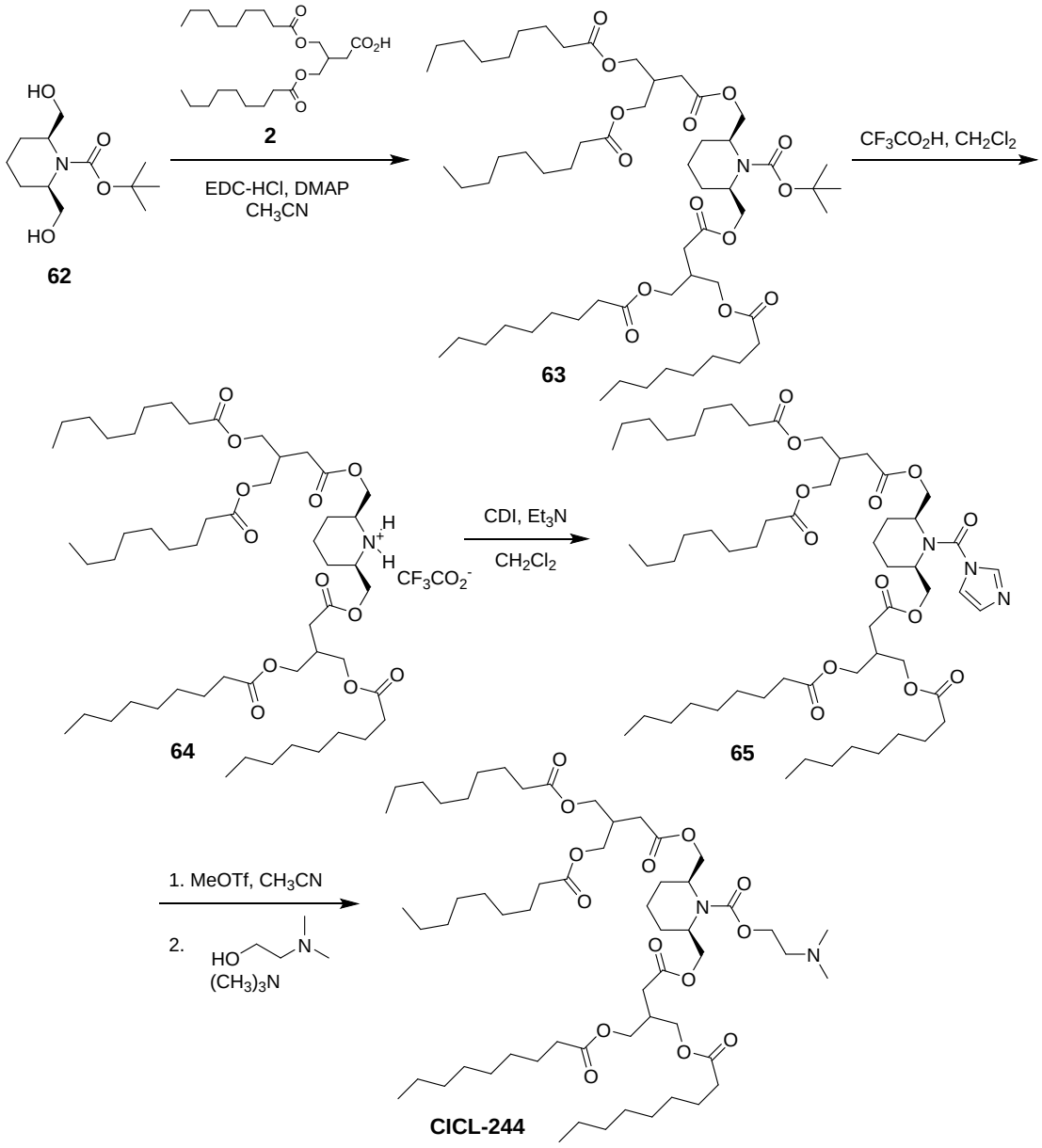
de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-242**.

Ejemplo 58: Síntesis de tetranonanoato de (((((2S,5S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)pirrolidina-2,5-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-243)



(2S,5S)-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo **58** (WO2023141570, Tetrahedron Lett. **1989**, *29*, 3805) se acopla con **2** usando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **59**. La desprotección de la BOC-amina en **59** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **60**. Tratamiento de **60** con carbonil-di-imidazol y Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimizadol **61**. La alquilación de **61** con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-243**.

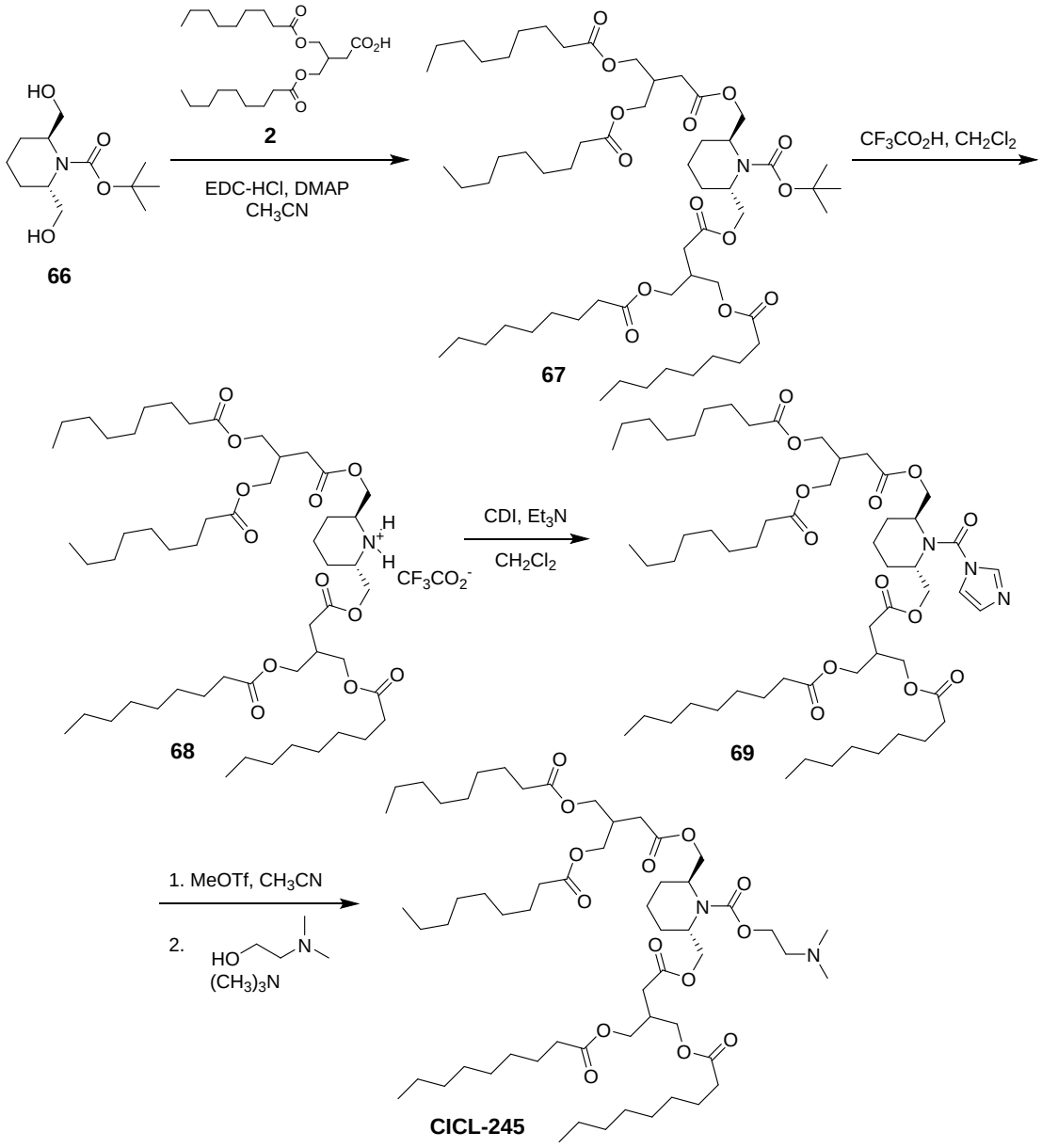
Ejemplo 59: Síntesis de tetranonanoato de (((*Rel*-((2S,6R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)piperidina-2,6-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-244)



Rel-(2S,6R)-2,6-bis(hidroximetil)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo **62** (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3584) se acopla con **2** usando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **63**. La desprotección de la BOC-amina en **63** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **64**. Tratamiento de **64** con carbonil-di-imidazol y Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimizadol **65**. La

alquilación de **65** con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-244**.

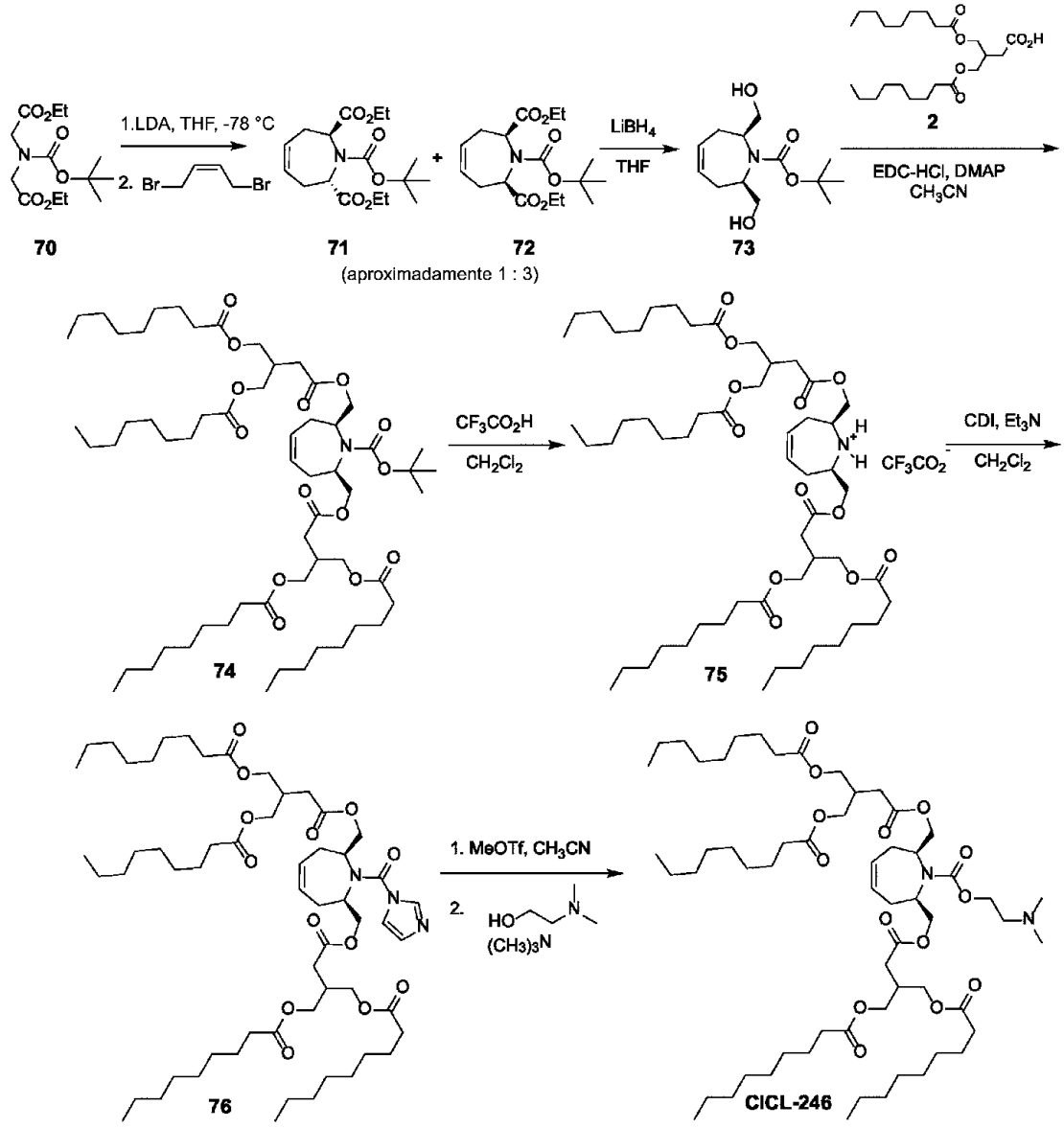
Ejemplo 60: Síntesis de tetranonanoato de ((((*Rel*-(2S,6S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)piperidina-2,6-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-245)



Rel-(2S,6S)-2,6-bis(hidroximetil)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo **66** (*Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6077) se acopla con **2** usando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **67**. La desprotección de la BOC-amina en **67** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **68**. Tratamiento de **68** con carbonil-di-imidazol y Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimizadol **69**. La alquilación de **692**

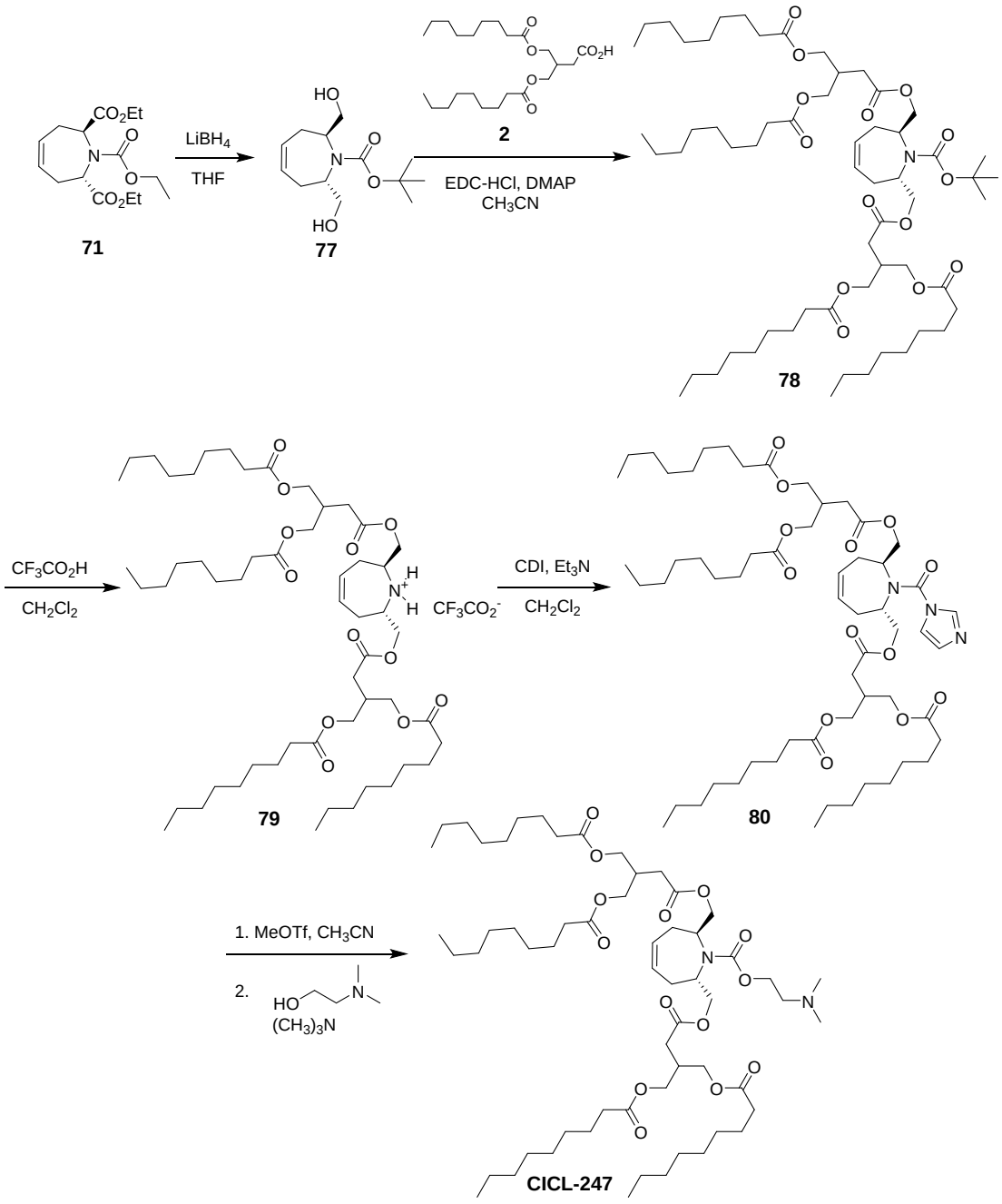
con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-245**.

Ejemplo 61: Síntesis de tetranonanoato de ((((*Rel*-(2R,7S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-2,7-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-246)



Como se describe en Synlett **1994**, 1093, alquilación del dianión de 70 con Z-1-4-dibromo-2-buteno (*J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 5787) conduce a una mezcla de diésteres **71** y **72** en una relación aproximadamente de 1:3. La separación de los diésteres, y la reducción de **72** ($LiBH_4$, THF) conduce al diol **73**. El diol **73** se acopla con **2** usando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **74**. La desprotección de la BOC-amina en **74** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **75**. Tratamiento de **75** con carbonil-di-imidazol y Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimizadol **76**. La alquilación de **76** con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-246**.

Ejemplo 62: Síntesis de tetranonanoato de ((((*Rel*-(2S,7S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)-2,3,6,7-tetrahidro-1H-azepina-2,7-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-247)

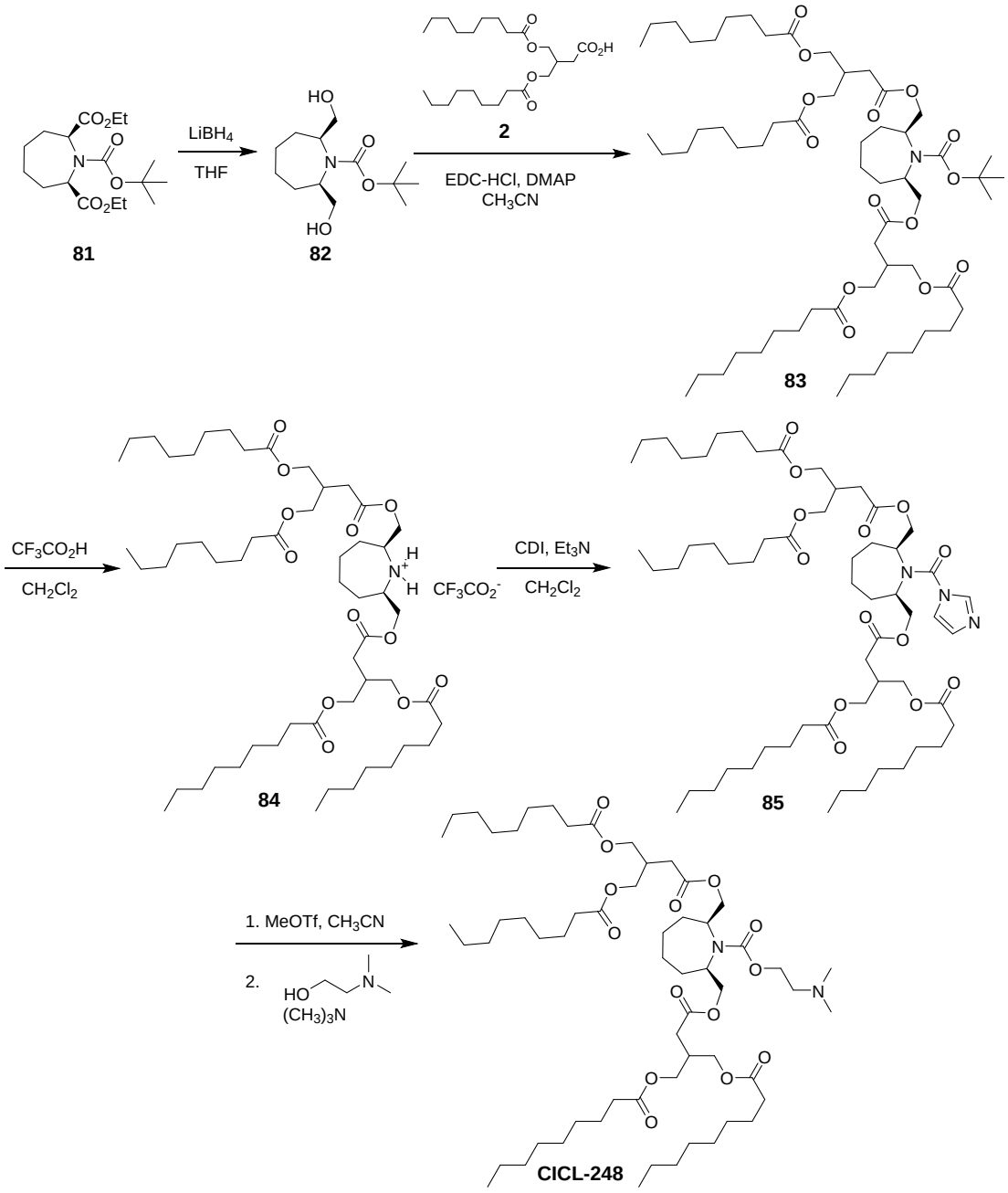


71 **77** **2** **78** **79** **80** **CICL-247**

La reducción del diéster **71**, preparado como se describe en el Ejemplo 62, con $LiBH_4$ en THF, conduce al diol **77**. El diol **77** se acopla con **2** usando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **78**. La desprotección de la BOC-amina en **78** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **79**. Tratamiento de **79** con carbonil-di-imidazol y

Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimizadol **80**. La alquilación de **80** con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-247**.

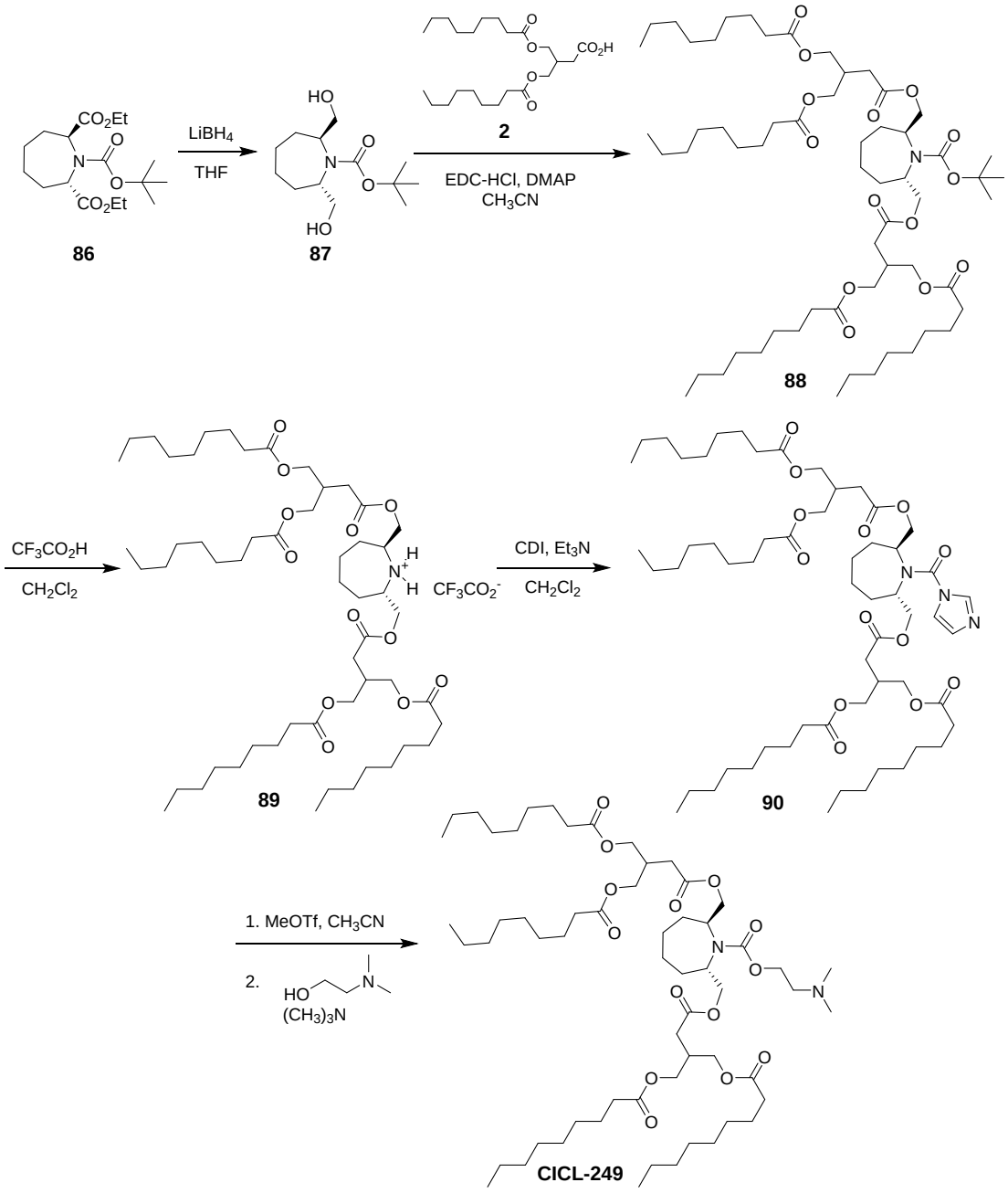
Ejemplo 63: Síntesis de tetranonanoato de ((((*Rel*-(2S,7R)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)azepano-2,7-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-248)



El 1-(terc-butil) 2,7-dietil Rel-(2S,7R)-azepano-1,2,7-tricarboxilato **81** (*Synlett* **1994**, 1023) se reduce con $LiBH_4$ en THF, para dar diol **82**. El diol **82** se acopla con **2** usando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **83**. La desprotección de la BOC-amina en **83** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **84**.

Tratamiento de **84** con carbonil-di-imidazol y Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimizadol **85**. La alquilación de **85** con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-248**.

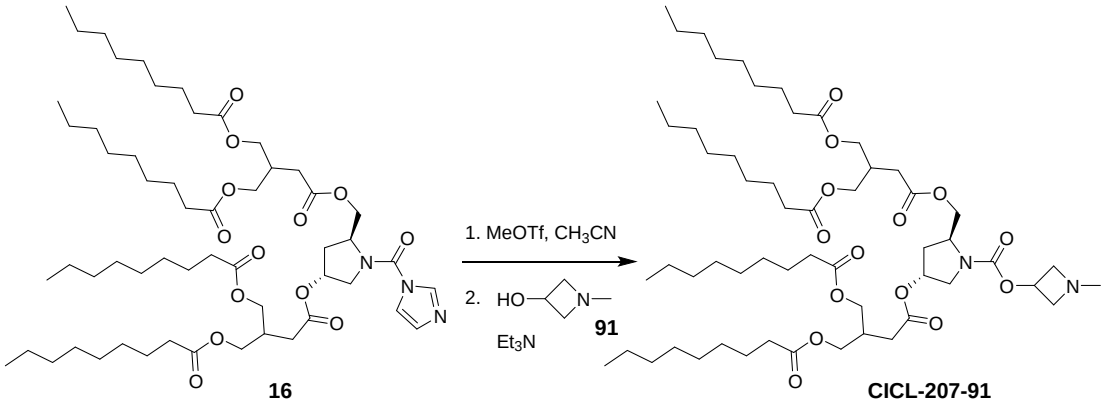
Ejemplo 64: Síntesis de tetranonanoato de ((((*Rel*-(2S,7S)-1-((2-(dimetilamino)etoxi)carbonil)azepano-2,7-diil)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-oxoetano-2,1-diil))bis(propano-2,1,3-triil) (CICL-249)



El 1-(terc-butil) 2,7-dietil Rel-(2S,7S)-azepano-1,2,7-tricarboxilato **86** (*Synlett* **1994**, 1023) se reduce con $LiBH_4$ en THF, para dar diol **87**. El diol **87** se acopla con **2** usando EDC-HCl y DMAP en CH_3CN para dar **88**. La desprotección de la BOC-amina en **88** con CF_3CO_2H en CH_2Cl_2, proporciona sal de trifluoroacetato de amonio **89**.

Tratamiento de **89** con carbonil-di-imidazol y Et_3N, en CH_2Cl_2, después da acilimizadol **90**. La alquilación de **90** con MeOTf en CH_3CN, seguida de la reacción de la sal de acilimidazolio derivada con 2-dimetilaminoetanol y $(CH_3)_3N$ da como resultado **CICL-249**.

Ejemplo 65: Síntesis de dinonanoato de 2-(2-(((2S,4R)-1-(((1-metilazetidin-3-il)oxi)carbonil)-4-((4-(nonanoiloxi)-3-((nonanoiloxi)metil)butanoil)oxi)pirrolidin-2-il)metoxi)-2-oxoetil)propano-1,3-diil: CICL-207-91



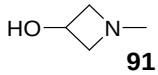
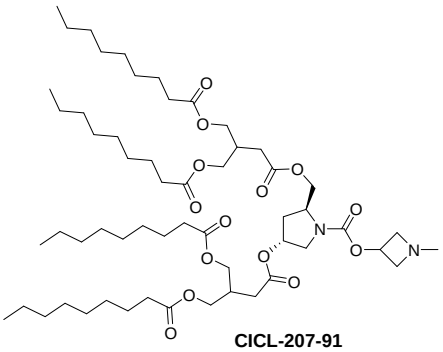
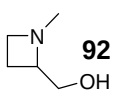
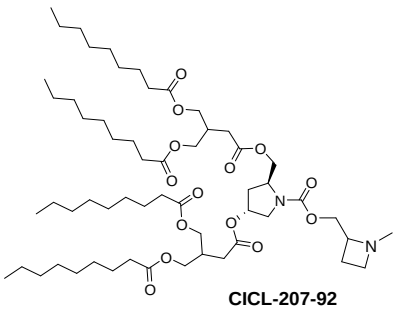
La acilimidazolida 16, al reaccionar con MeOTf proporciona una especie de acilimidazolio activado. La reacción de la especie de acilimidazolio activado con alcohol 91 (CombiBlocks núm. JL-5330), en la presencia de trietil amina conduce a CICL-207-91.

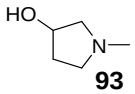
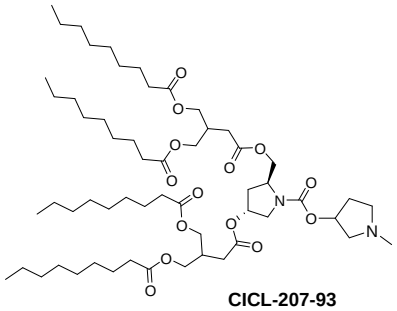
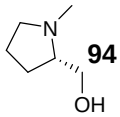
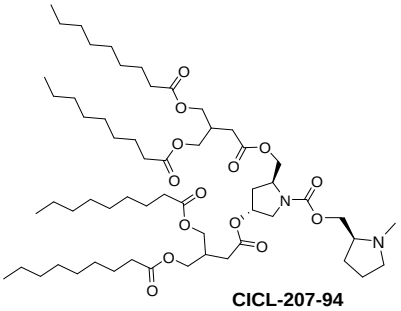
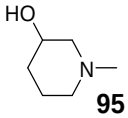
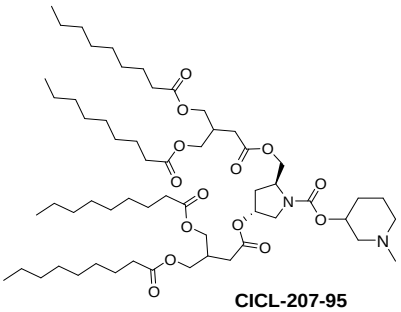
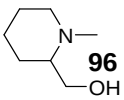
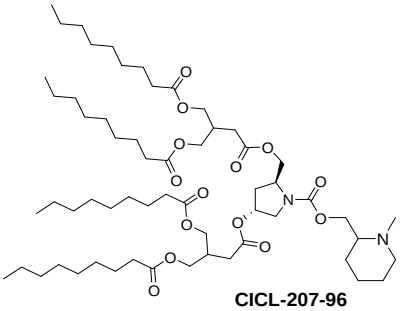
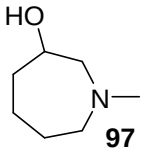
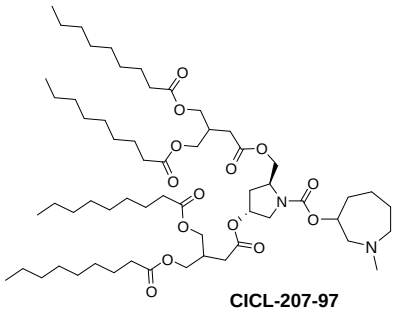
El paradigma de numeración utilizado para los grupos cabeza cíclico-amino-alcohol se basa en un lípido catiónico ionizable descrito anteriormente que se generó

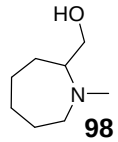
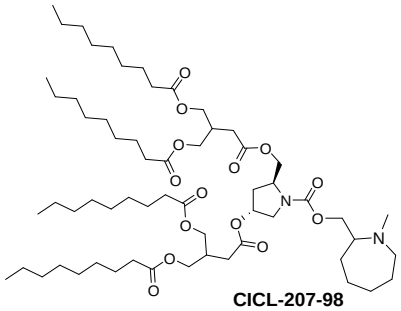
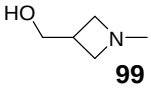
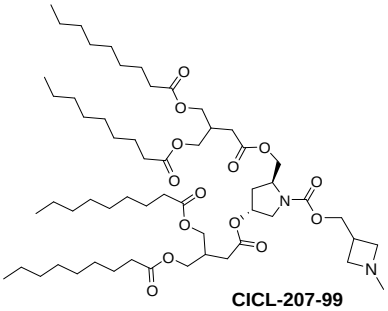
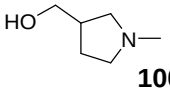
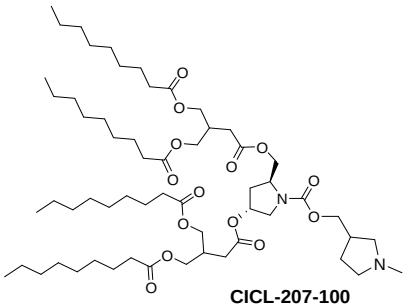
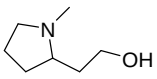
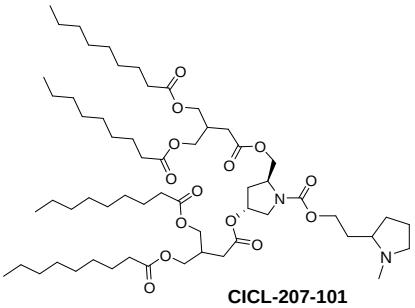
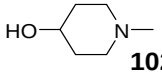
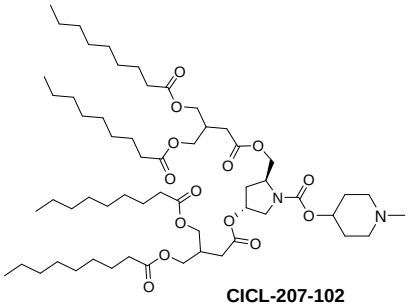
a partir de una acilimidazolida, en este caso 16, cuando se hizo reaccionar con 2-dimetilaminoetanol, con el número del alcohol formador de grupo de cabeza añadido, en este caso 91. La acilimidazolida 16 se convirtió en lípido CICL-207 en el Ejemplo 17.

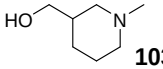
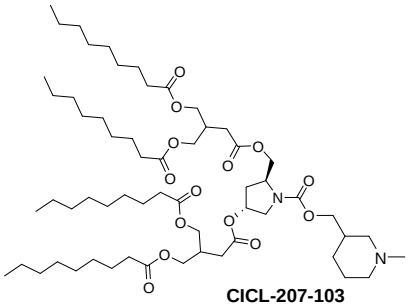
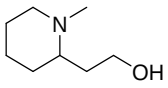
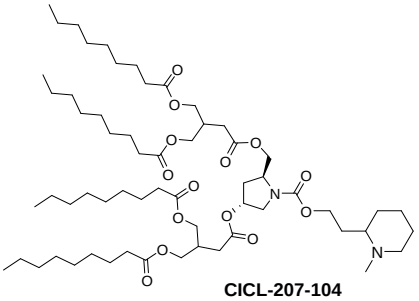
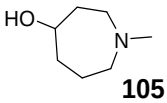
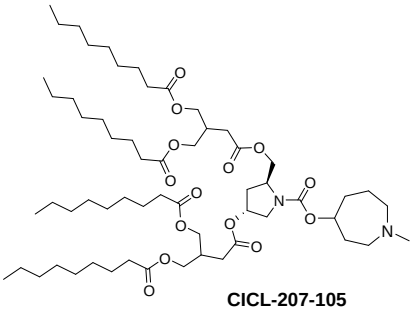
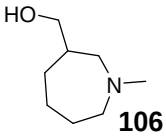
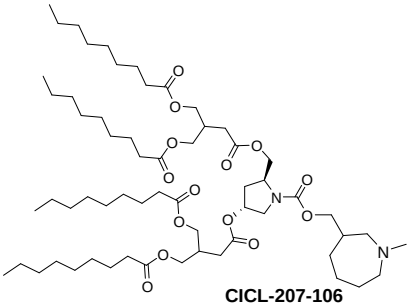
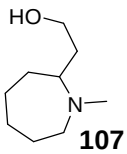
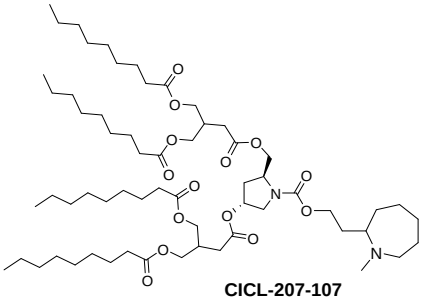
La utilización de la química descrita en este Ejemplo 65 para generar las especies activas de imidazolio, permite la síntesis de una selección de lípidos que contienen grupos de cabeza cíclicos por sustitución del alcohol 91 (vide supra) con los alcoholes que aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3: CICL-207-91 y Sustitución del Alcohol 91 por Alcoholes 92-107 para Preparar Lípidos CICL-207-92 a CICL-207-107

Alcohol	Fuente	Lípido	c-pKa*
 **91**	CombiBlocks núm. JL-5330	 **CICL-207-91**	8,39
 **92**	CombiBlocks núm. JL-5446	 **CICL-207-92**	8,62

Alcohol	Fuente	Lípido	c-pKa*
 **93**	CombiBlocks núm. AM-2015	 **CICL-207-93**	8,70
 **94**	CombiBlocks núm. OR-0903	 **CICL-207-94**	9,47
 **95**	*J. Med. Pharm. Chem.* **1960**, *2*, 107	 **CICL-207-95**	8,83
 **96**	CombiBlocks núm. OR-1501	 **CICL-207-96**	9,24
 **97**	CombiBlocks núm. ST-4233 **WO2008022979** *J. Med. Pharm. Chem.* **1960**, *2*, 107	 **CICL-207-97**	8,44

Alcohol	Fuente	Lípido	c-pKa*
 **98**	CombiBlocks núm. JA-4992 *J. Med. Pharm. Chem.* **1960**, *2*, 107	 **CICL-207-98**	8,88
 **99**	CombiBlocks núm. QV-6461	 **CICL-207-99**	9,23
 **100**	CombiBlocks núm. QH-5249	 **CICL-207-100**	9,83
 **101**	CombiBlocks núm. ST-1090	 **CICL-207-101**	10,28
 **102**	CombiBlocks núm. AM-2246	 **CICL-207-102**	8,03

Alcohol	Fuente	Lípido	c-pKa*
 **103**	CombiBlocks núm. OR-1504	 **CICL-207-103**	9,20
 **104**	CombiBlocks núm. QZ-3821	 **CICL-207-104**	9,75
 **105**	CombiBlocks núm. SS-2386	 **CICL-207-105**	8,81
 **106**	Enamina núm. EN300-147890 *J. Med. Pharm. Chem.* **1960**, *2*, 107	 **CICL-207-106**	9,34
 **107**	Enamina núm. EN300 -202111 *J. Med. Pharm. Chem.* **1960**, *2*, 107	 **CICL-207-107**	9,52

De una manera similar, utilizando la química de este Ejemplo 65, los diversos acilimidazolidos con núcleo

restringidos: 7, 12, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 53, 57, 61, 65, 69, 76, 80, 85 y 90 se hacen reaccionar con los alcoholes 91-107 para crear los congéneres que tienen los diversos grupos de cabeza cíclicos en cada uno de los núcleos restringidos descritos anteriormente. Dado un rango deseado de pKa medida de 6-7, es probable que se necesite una restricción del rango de pKa calculada (c-pKa) para lograr ese rango objetivo de pKa medida. Los alcoholes que se anexan a la acilimidazolida 16 para proporcionar lípidos CICL-207-91 a CICL-207-107, que dan como resultado un pKa (c-pKA) calculado de aproximadamente 8 a 9 (Tabla 3), se utilizan para formar lípidos con las acilimidazolidas con núcleo restringidos 7, 12, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 53, 57, 61, 65, 69, 76, 80, 85 y 90. Los alcoholes así seleccionados son: 91, 92, 93, 95, 97, 98, 102, y 105.

Para obtener lípidos que confieran un rendimiento ventajoso de transfección *in vivo* a las tLNP que incorporan el lípido, los alcoholes deben seleccionarse para alterar los valores de pKa medidos para las imidazolidas centrales anexadas con N, N-dimetilamino etanol en la Tabla 10 hacia el punto medio del rango objetivo de 6-7. Para mantener o reducir la basicidad de los lípidos preparados a partir de la estructura central de acilimidazolida 7 (usada en la síntesis de CICL-221), se seleccionan los alcoholes 91, 97 y 102 para generar CICL-221-91, CICL-221-97, y CICL-221-102. La acilimidazolida con núcleo 12 (usada en la síntesis

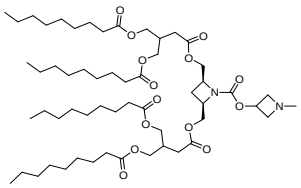
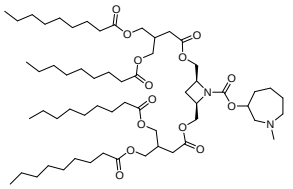
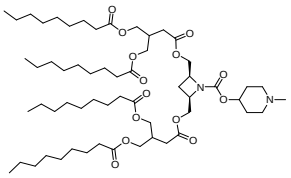
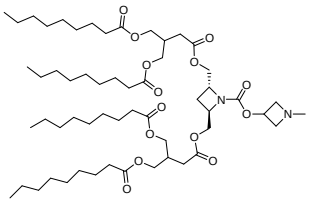
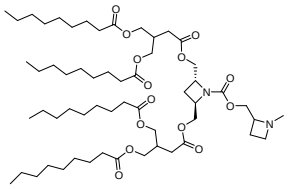
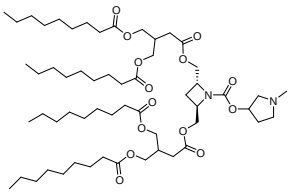
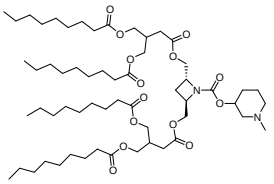
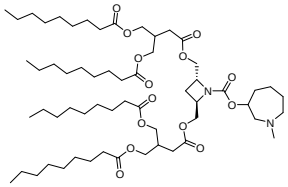
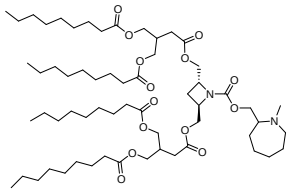
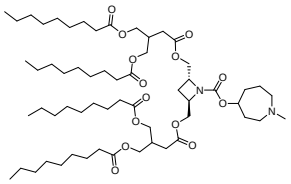
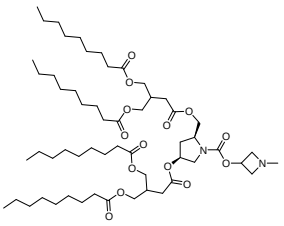
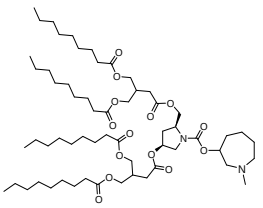
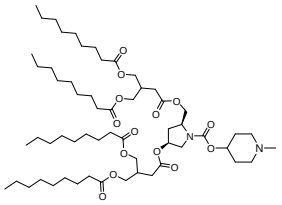
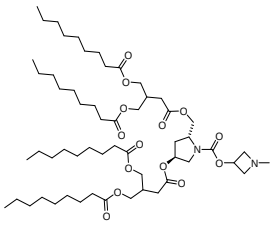
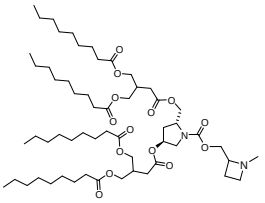
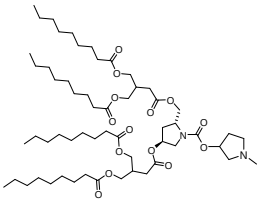
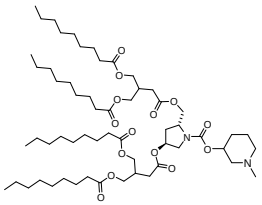
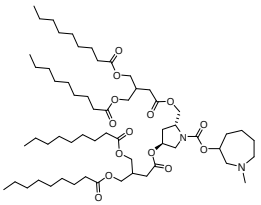
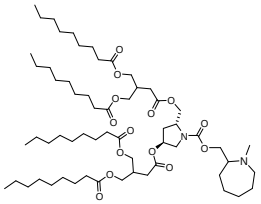
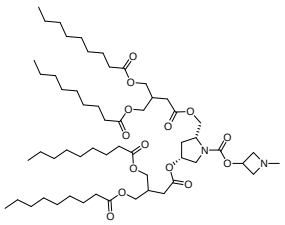
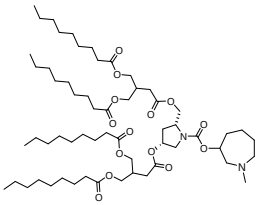
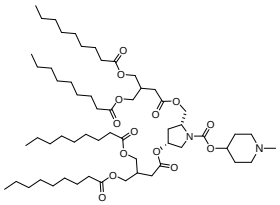
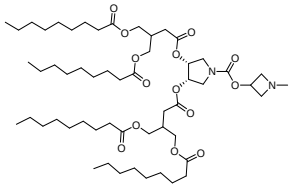
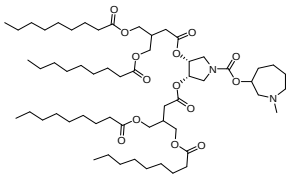
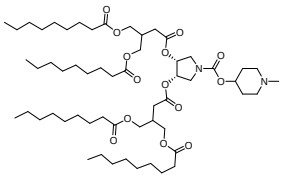
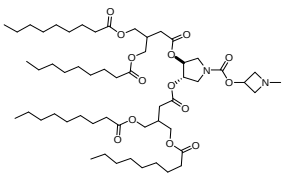
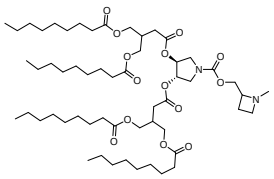
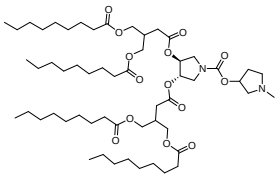
de CICL-222) se combina con alcoholes 91, 92, 93, 95, 97, 98 y 105 para mantener o elevar la pKa medida como se describe para generar congéneres de CICL-222. La acilimidazolida con núcleo 20 (usada en la síntesis de CICL-224) se combina con alcoholes 91, 97 y 102 para mantener o reducir la pKa medida hacia el rango objetivo y generar CICL-224-91, CICL-224-97 y CICL-224-102. La combinación de acilimidazolida con núcleo 24 (usada en la síntesis de CICL-225) con alcoholes 91, 92, 93, 95, 97 y 98 se selecciona para mantener o elevar la pKa medida hacia el rango objetivo deseado para generar congéneres de CICL-225. La acilimidazolida 28, (usada en la síntesis de CICL-223) cuando se combina con alcoholes 91, 97 y 102, da como resultado lípidos (CICL-223-91, CICL-223-97, y CICL-223-102) que se acercan a los valores objetivos de pKa medidos manteniendo o reduciendo la basicidad. La acilimidazolida 32 (utilizada en la síntesis de CICL-216) se combina con alcoholes 91, 97 y 102 para proporcionar lípidos (CICL-216-91, CICL-216-97 y CICL-216-102) en el rango objetivo de pKa manteniendo o reduciendo la basicidad. La acilimidazolida con núcleo 36 (usada en la síntesis de CICL-215) se combina con alcoholes 91, 92, 93, 95 y 97 para crear lípidos (congéneres de CICL-215) con basicidad similar y un pKa en el rango objetivo de pKa. La acilimidazolida 40, (usada en la síntesis de CICL-220) cuando se combina con alcoholes 91, 92, 93, 95, 97, 98 y 105 da lípidos (congéneres de

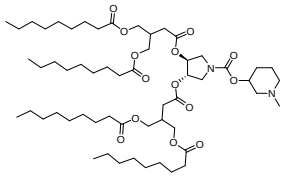
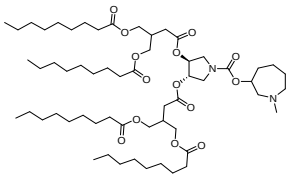
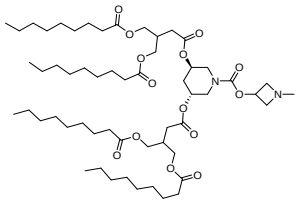
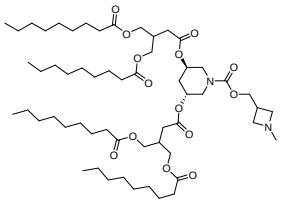
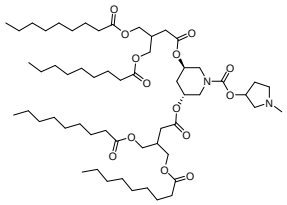
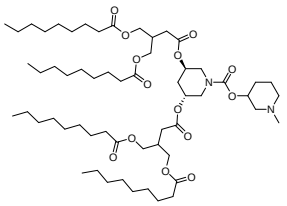
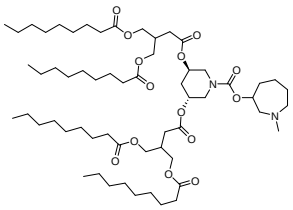
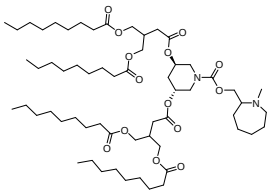
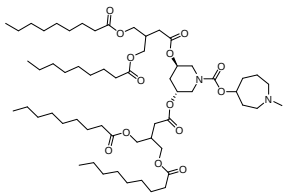
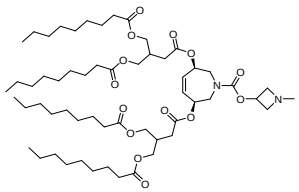
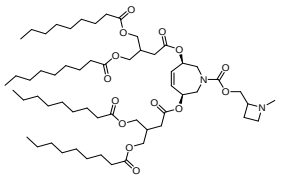
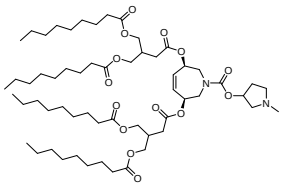
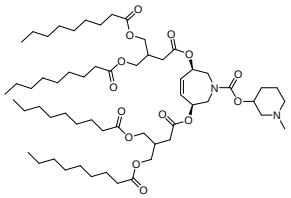
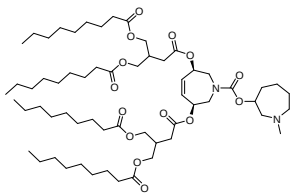
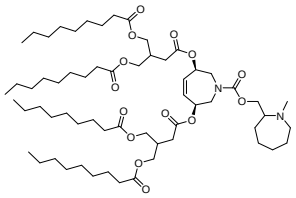
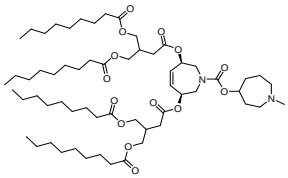
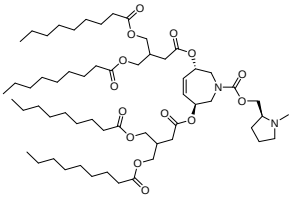
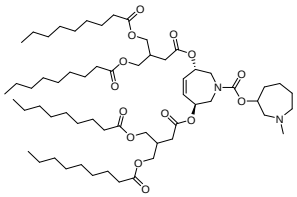
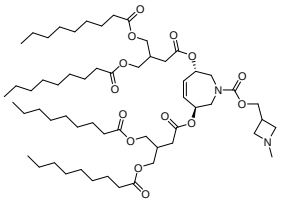
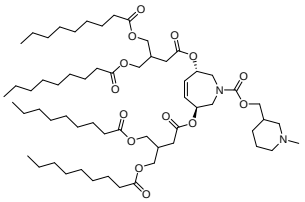
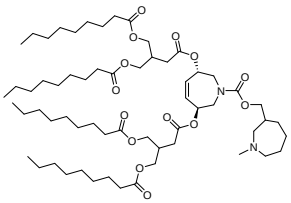
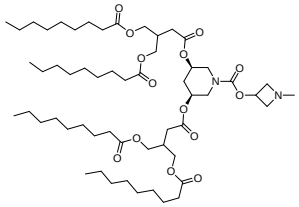
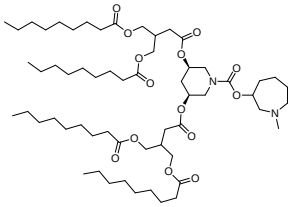
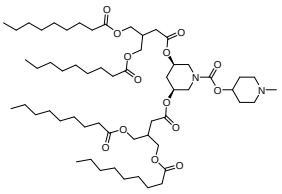
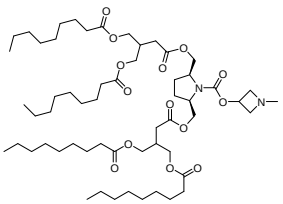
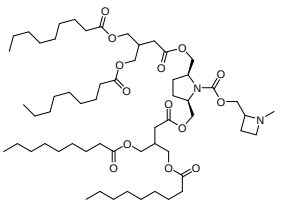
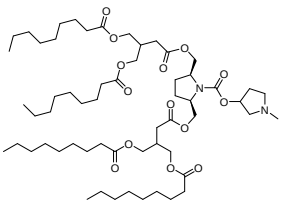
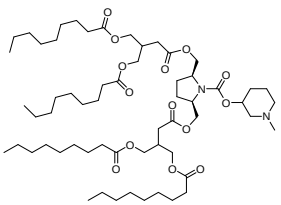
CICL-220) con una basicidad mantenida o elevada moviendo pKa hacia el rango objetivo deseado. Similarmente, la combinación de acilimidazolida 44 (usada en la síntesis de CICL-219) con alcoholes 91, 92, 93, 95, 97, 98 y 105 proporciona lípidos (congéneres de CICL-219) con una basicidad mantenida o elevada moviendo pKa hacia el rango objetivo de pKa deseado. La reacción de la acilimidazolida 48 (usada en la síntesis de CICL-218) con alcoholes 94, 96, 99, 103 y 106 proporciona lípidos (congéneres de CICL-218) con una basicidad mantenida o elevada moviendo pKa hacia el rango objetivo de pKa. La combinación de acilimidazolida 53 (usada en la síntesis de CICL-238) con alcoholes 91, 97 y 102 conduce a lípidos (CICL-238-91, CICL-238-97, y CICL-238-102) con basicidad mantenida o reducida y valores de pKa medidos, dentro de la zona objetivo. La concatenación de acilimidazolida 57 (usada en la síntesis de CICL-242), que no está asociada con un valor de pKa medido en la Tabla 10, con alcoholes 91, 92, 93, 95, 97, 98, 102, y 105 proporciona lípidos (congéneres de CICL-242) dirigidos a valores de pKa medidos dentro del rango deseado al tener una basicidad similar a CICL-207. Similarmente, la reacción de acilimidazolidas 61, 65, 69, 76, 80, 85 y 90 (usadas para sintetizar CICL-243, CICL-244, CICL-245, CICL-246, CICL-247, CICL-248 y CICL-249, respectivamente) con alcoholes 91, 92, 93, 95, 97, 98, 102 y 105 proporciona

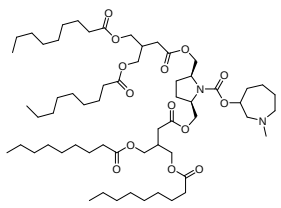
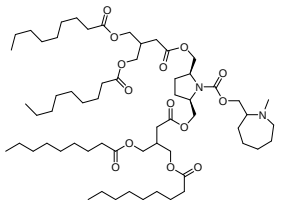
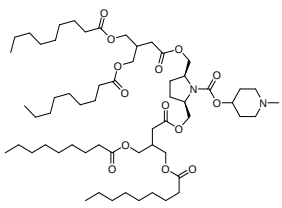
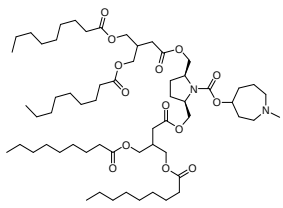
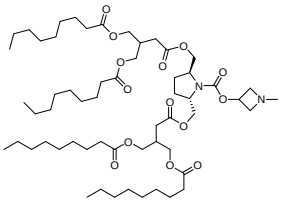
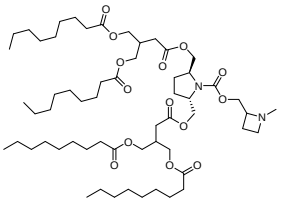
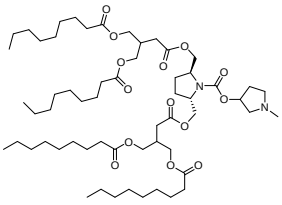
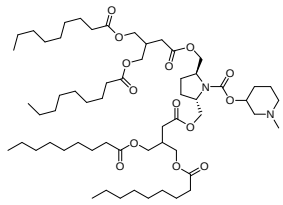
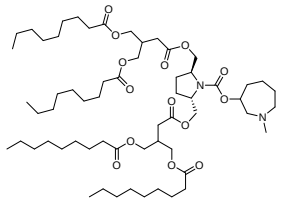
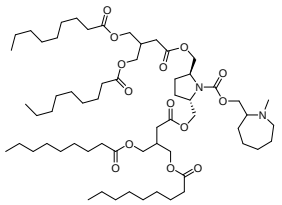
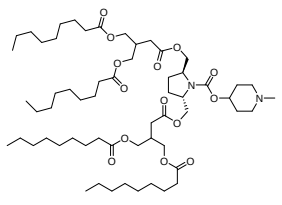
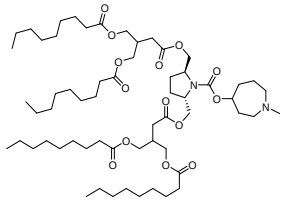
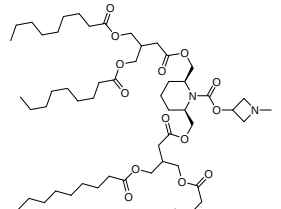
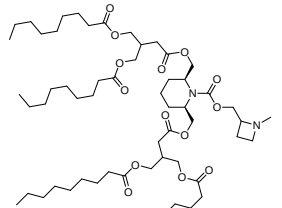
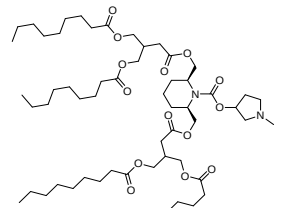
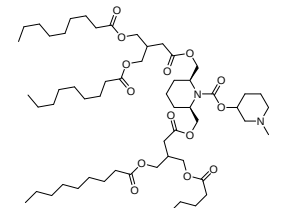
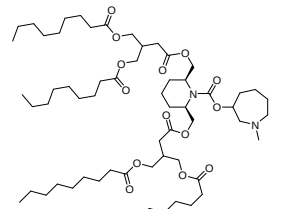
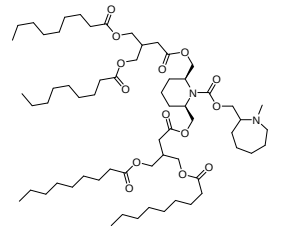
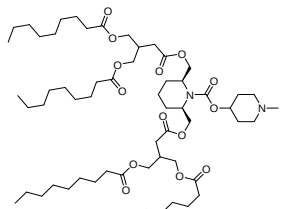
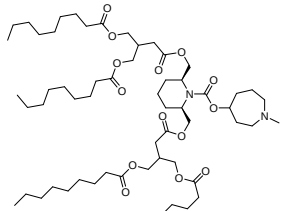
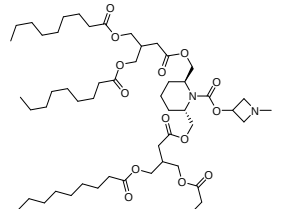
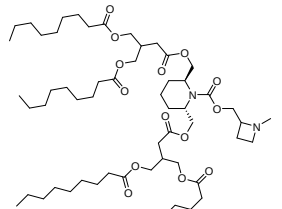
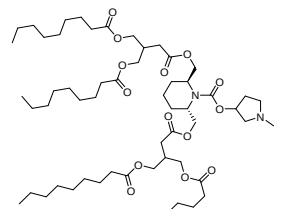
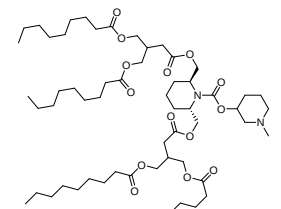
lípidos dirigidos para valores de pKa medidos dentro del rango deseado al tener una basicidad similar a la CICL-207.

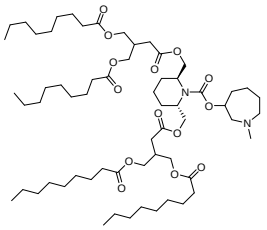
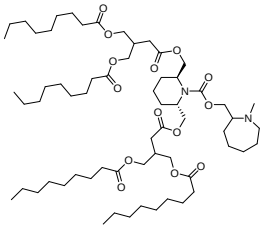
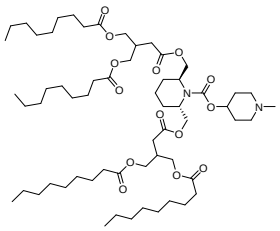
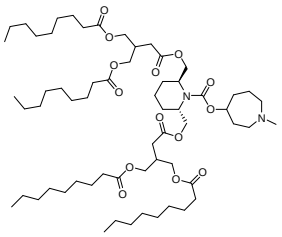
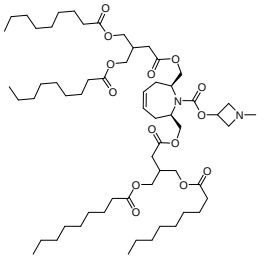
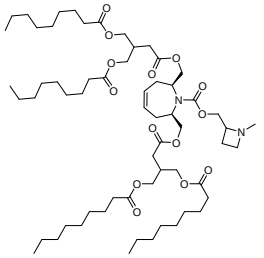
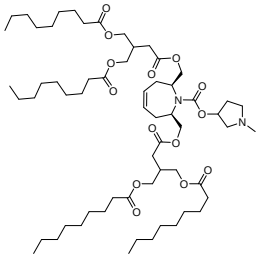
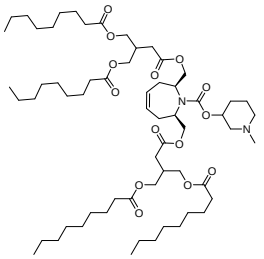
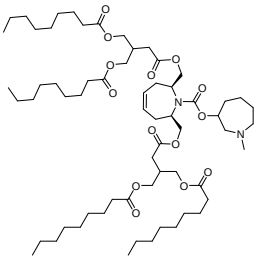
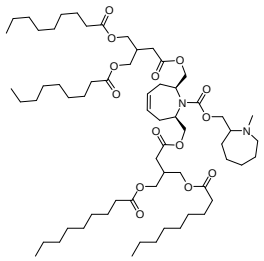
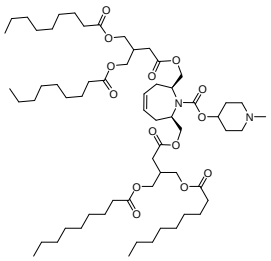
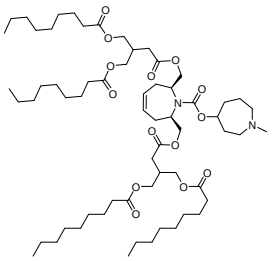
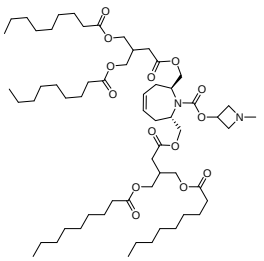
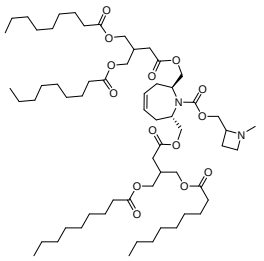
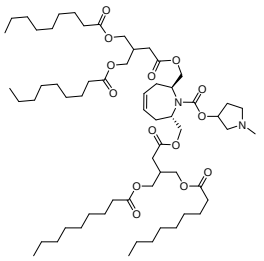
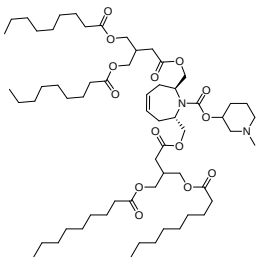
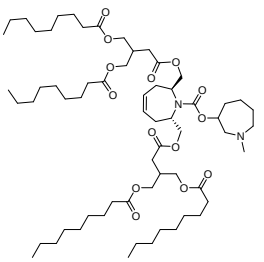
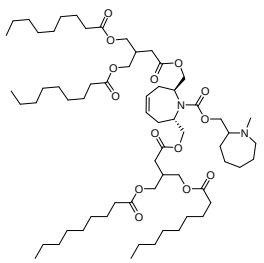
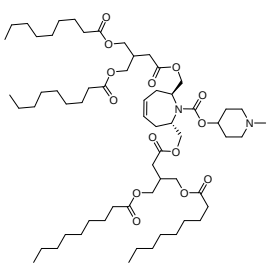
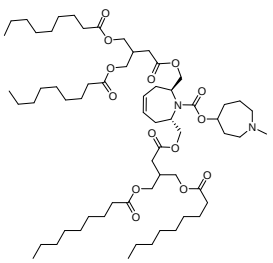
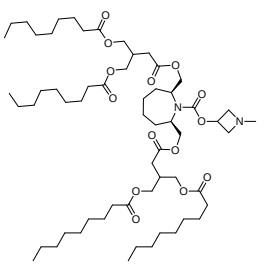
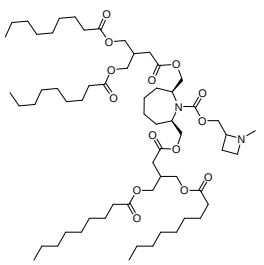
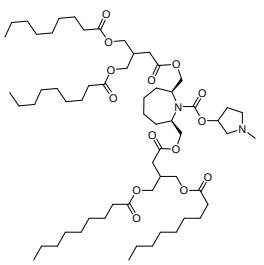
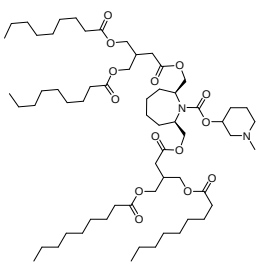
En la Tabla 4 se presentan las estructuras que resultan de la combinación de estructuras centrales de acilimidazolida: 7, 12, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 53, 57, 61, 65, 69, 76, 80, 85 y 90 con los alcoholes antes mencionados (91, 92, 93, 95, 97, 98, 102, y 105) que se espera den como resultado lípidos con valores calculados de pKa en el rango de 8-9. El convenio de numeración aplicado a las estructuras de la Tabla 4, como se describió anteriormente, se toma de la estructura lipídica inicial creada a partir de la acilimidazolida con núcleo listada, ahora combinada con los alcoholes seleccionados enumerados anteriormente, por ejemplo 7 que conducen a CICL-221, cuando 7 podría combinarse con alcohol 91, el número que aparece en la Tabla 4 se enumera como: CICL-221-91.

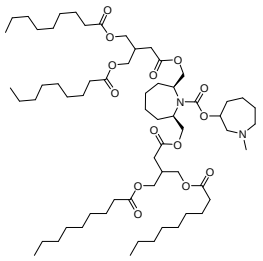
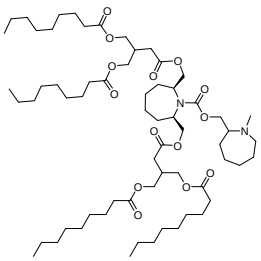
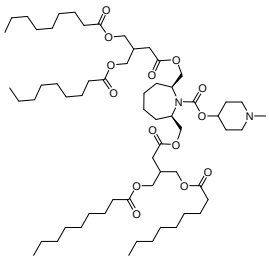
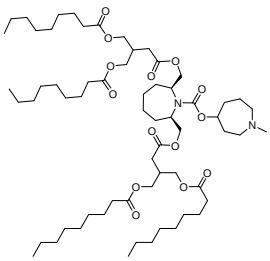
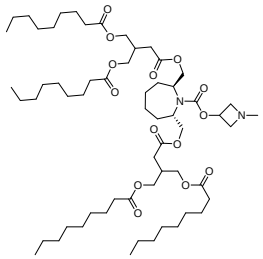
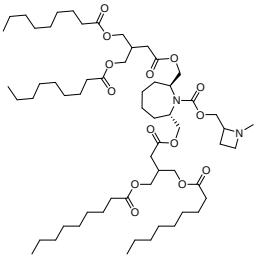
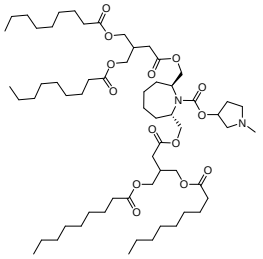
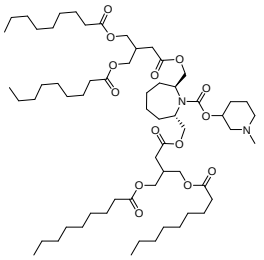
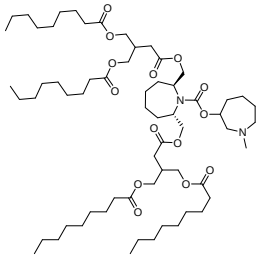
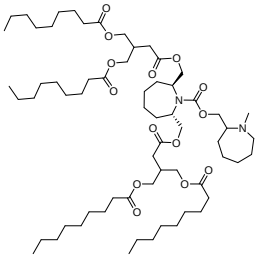
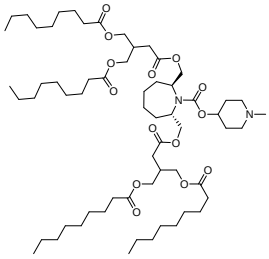
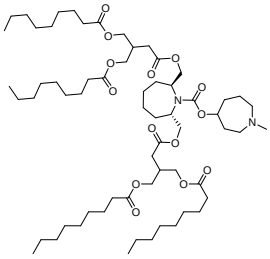
Tabla 4. Lípidos formados a partir de la combinación de acilimidazolidas con núcleo 7, 12, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 53, 57, 61, 65, 69, 76, 80, 85 y 90 con alcoholes seleccionados de 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 103, 105, y 106.

 **CICL-221-91**	 **CICL-221-97**	 **CICL-221-102**	 **CICL-222-91**
 **CICL-222-92**	 **CICL-222-93**	 **CICL-222-95**	 **CICL-222-97**
 **CICL-222-98**	 **CICL-222-105**	 **CICL-224-91**	 **CICL-224-97**
 **CICL-224-102**	 **CICL-225-91**	 **CICL-225-92**	 **CICL-225-93**
 **CICL-225-95**	 **CICL-225-97**	 **CICL-225-98**	 **CICL-223-91**
 **CICL-223-97**	 **CICL-223-102**	 **CICL-216-91**	 **CICL-216-97**
 **CICL-216-102**	 **CICL-215-91**	 **CICL-215-92**	 **CICL-215-93**

 **CICL-215-95**	 **CICL-215-97**	 **CICL-220-91**	 **CICL-220-92**
 **CICL-220-93**	 **CICL-220-95**	 **CICL-220-97**	 **CICL-220-98**
 **CICL-220-105**	 **CICL-219-91**	 **CICL-219-92**	 **CICL-219-93**
 **CICL-219-95**	 **CICL-219-97**	 **CICL-219-98**	 **CICL-219-105**
 **CICL-218-94**	 **CICL-218-96**	 **CICL-218-99**	 **CICL-218-103**
 **CICL-218-106**	 **CICL-238-91**	 **CICL-238-97**	 **CICL-238-102**
 **CICL-242-91**	 **CICL-242-92**	 **CICL-242-93**	 **CICL-242-95**

 **CICL-242-97**	 **CICL-242-98**	 **CICL-242-102**	 **CICL-242-105**
 **CICL-243-91**	 **CICL-243-92**	 **CICL-243-93**	 **CICL-243-95**
 **CICL-243-97**	 **CICL-243-98**	 **CICL-243-102**	 **CICL-243-105**
 **CICL-244-91**	 **CICL-244-92**	 **CICL-244-93**	 **CICL-244-95**
 **CICL-244-97**	 **CICL-244-98**	 **CICL-244-102**	 **CICL-244-105**
 **CICL-245-91**	 **CICL-245-92**	 **CICL-245-93**	 **CICL-245-95**

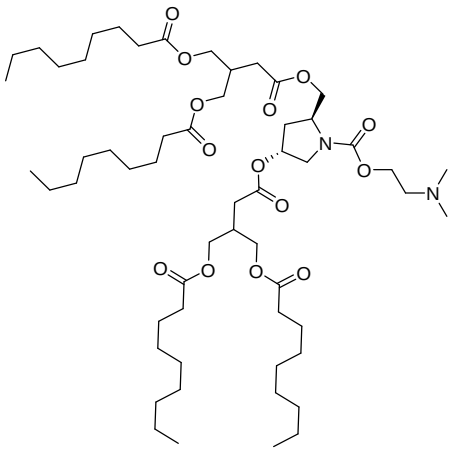
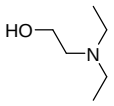
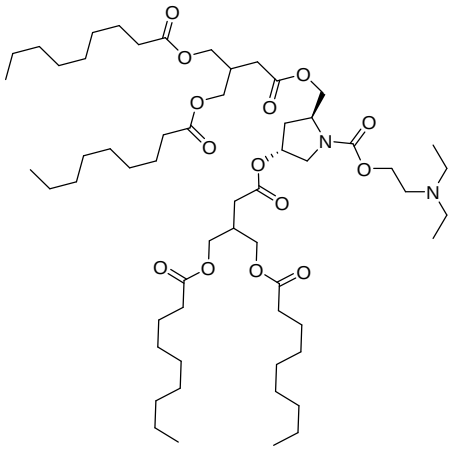
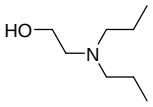
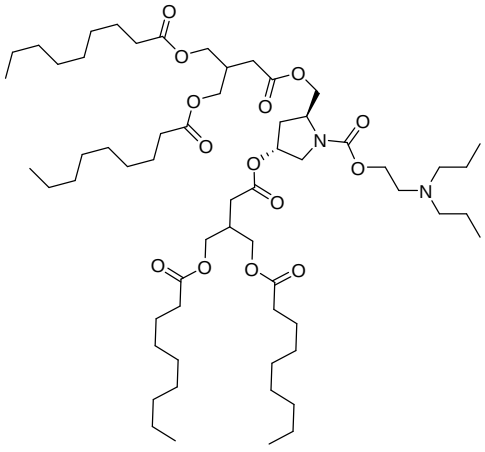
 **CICL-245-97**	 **CICL-245-98**	 **CICL-245-102**	 **CICL-245-105**
 **CICL-246-91**	 **CICL-246-92**	 **CICL-246-93**	 **CICL-246-95**
 **CICL-246-97**	 **CICL-246-98**	 **CICL-246-102**	 **CICL-246-105**
 **CICL-247-91**	 **CICL-247-92**	 **CICL-247-93**	 **CICL-247-95**
 **CICL-247-97**	 **CICL-247-98**	 **CICL-247-102**	 **CICL-247-105**
			

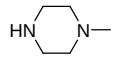
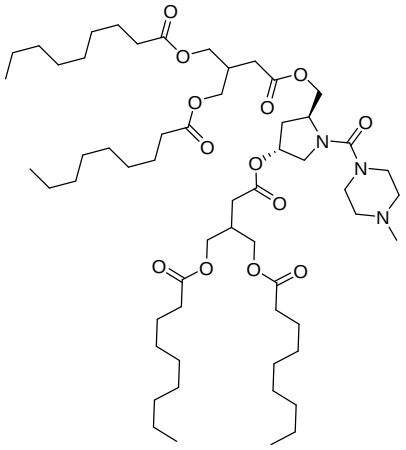
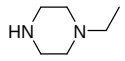
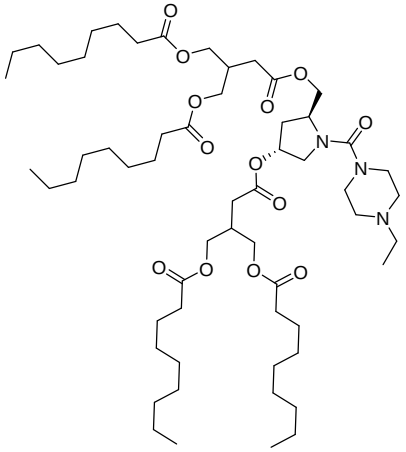
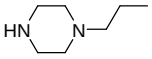
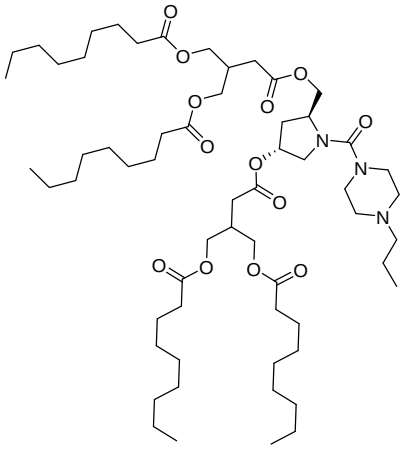
CICL-248-91	CICL-248-92	CICL-248-93	CICL-248-95
			
CICL-248-97	**CICL-248-98**	**CICL-248-102**	**CICL-248-105**
			
CICL-249-91	**CICL-249-92**	**CICL-249-93**	**CICL-249-95**
			
CICL-249-97	**CICL-249-98**	**CICL-249-102**	**CICL-249-105**

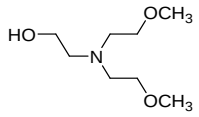
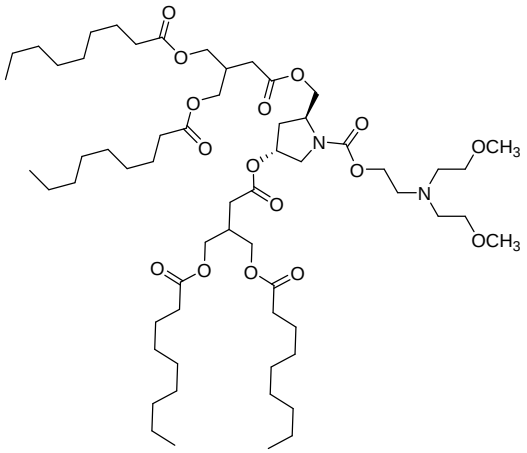
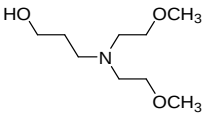
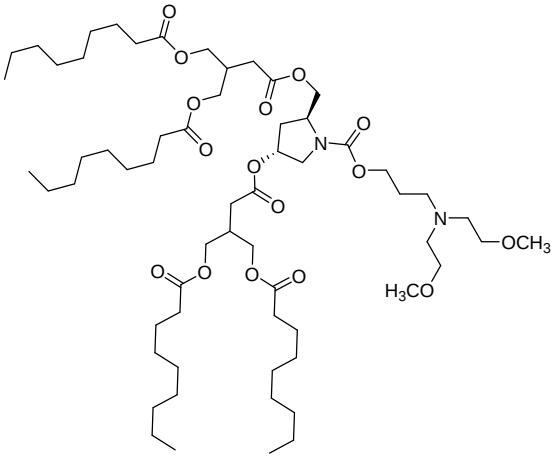
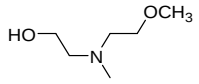
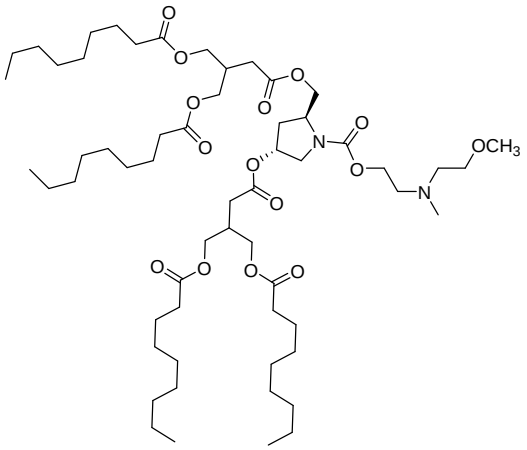
Los datos presentados en las Tablas 8, 9 y 10 ilustran el impacto de la estructura de la acilimidazolida con núcleo sobre la pKa medida en la formulación de lípidos como tLNP todos construidos por la adición de N, N-dimetilamino etanol para formar el grupo de cabeza básico. Los valores de pKa medidos van de 6,11 (CICL-218) a 7,09 (CICL-238). Como se describió anteriormente, se anexaron grupos de cabeza cíclicos la acilimidazolida con núcleo 16 (usado en la síntesis de CICL-207) y se determinaron los valores calculados (c-pKA). Se seleccionaron alcoholes para mover los valores de pKa medidos para estructuras

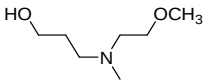
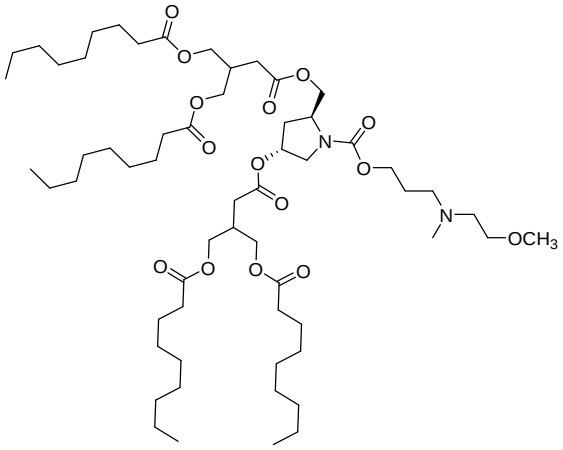
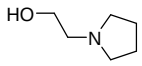
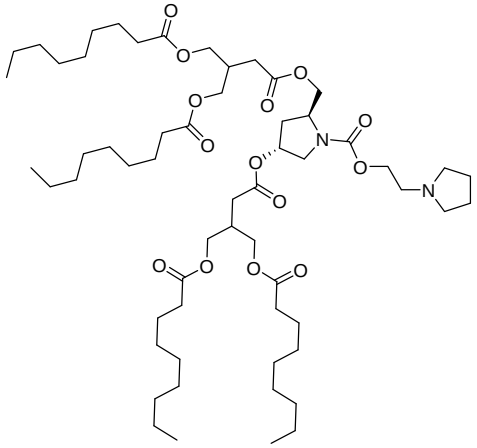
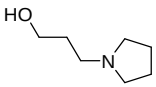
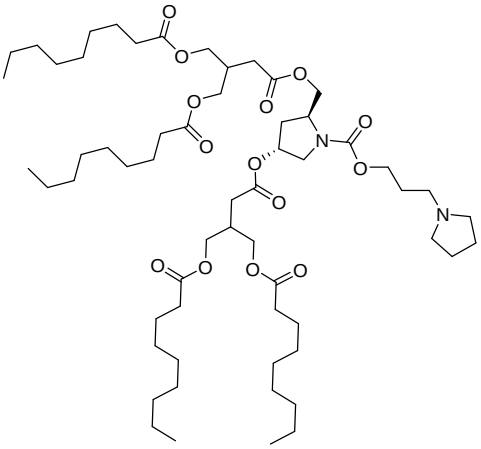
centrales alternativas asociadas a los datos de la Tabla 10, hacia el punto medio del rango objetivo de 6-7 (Tabla 4). En la descripción de la Fórmula M2 (anterior) la definición de grupos X incluye sustituyentes adicionales que pueden agregarse a una estructura central para formar lípidos ionizables M2. El examen de la conexión de un subconjunto de los grupos X, cuando se anexa a la acilimidazolida 16, instruye la selección de los grupos X que se van a anexar al núcleo de acilimidazolidas 7, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 53, 57, 61, 65, 69, 76, 80, 85 y 90 para apuntar al punto medio del rango de pKa medido de 6-7 para la construcción de lípidos catiónicos ionizables ventajosos. La Tabla 5 ilustra los productos de la combinación de acilimidazolida 16 con grupos de cabeza 108-133 (seleccionados de la definición de X en la definición de la Fórmula M2) para formar lípidos CICL-207-108 a CICL-207-133, con datos de c-pKA asociados.

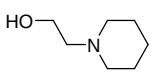
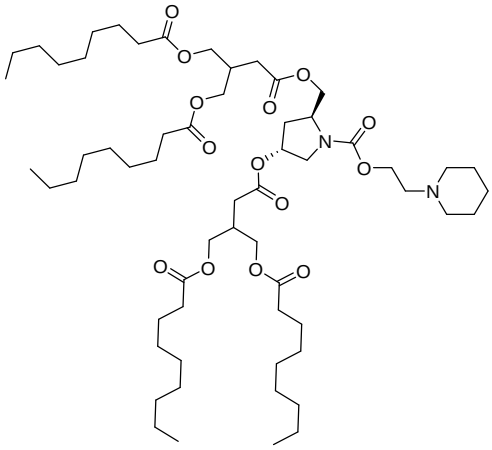
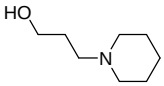
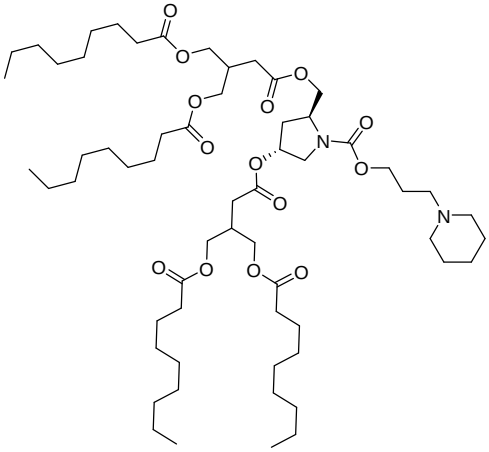
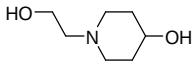
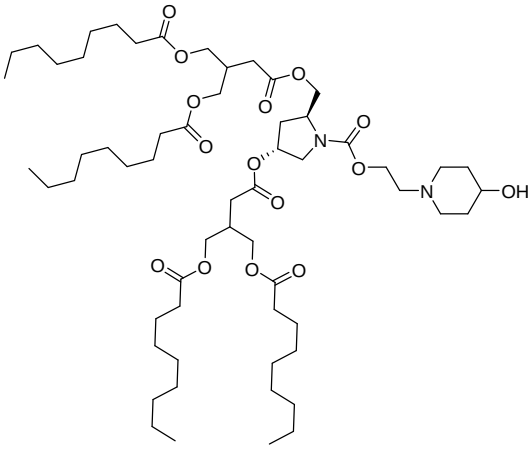
Tabla 5. Lípidos formados a partir de la combinación de la acilimidazolida con núcleo 7 con grupos de cabeza seleccionados de 108 a 133.

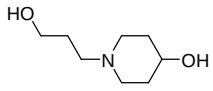
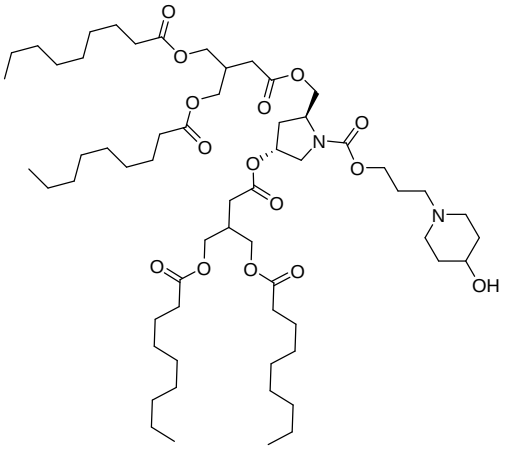
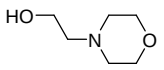
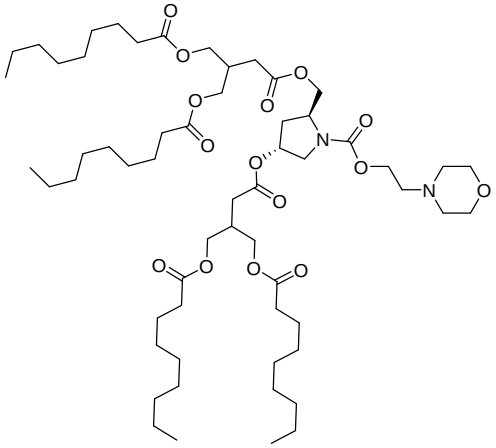
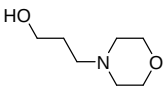
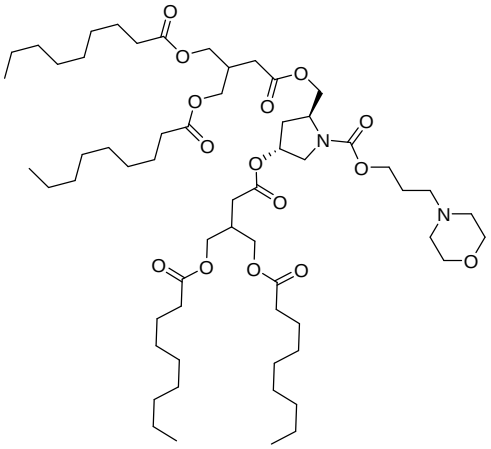
Precursor X	Lípido	c-pKa
	 **CICL-207**	**8,42**
 **108**	 **CICL-207-108**	**9,39**
 **109**	 **CICL-207-109**	**8,58**

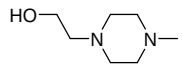
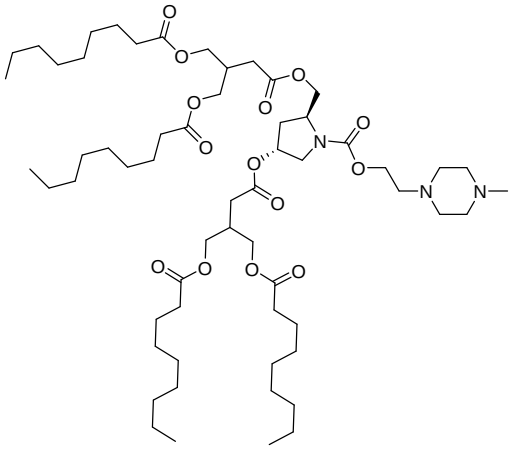
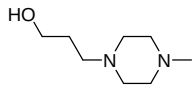
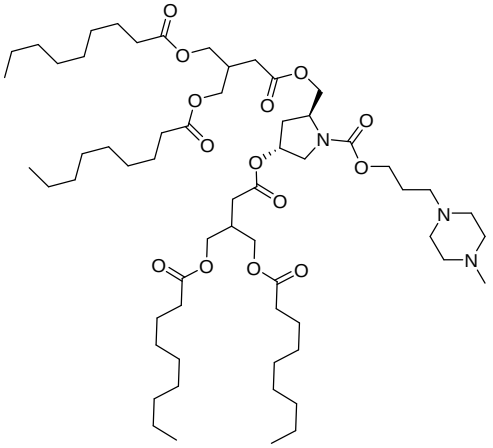
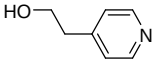
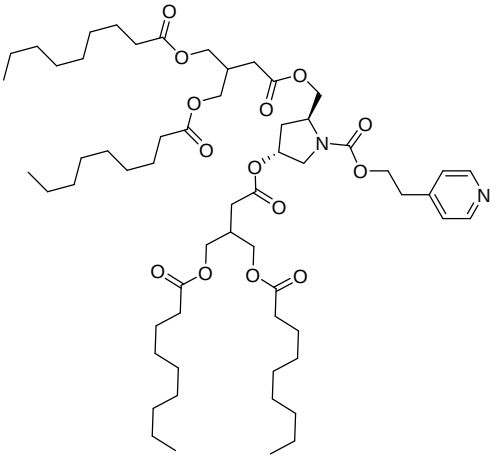
Precursor X	Lípido	c-pKa
 **110**	 **CICL-207-110**	**7,16**
 **111**	 **CICL-207-111**	**7,65**
 **112**	 **CICL-207-112**	**7,59**

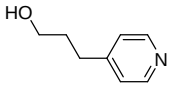
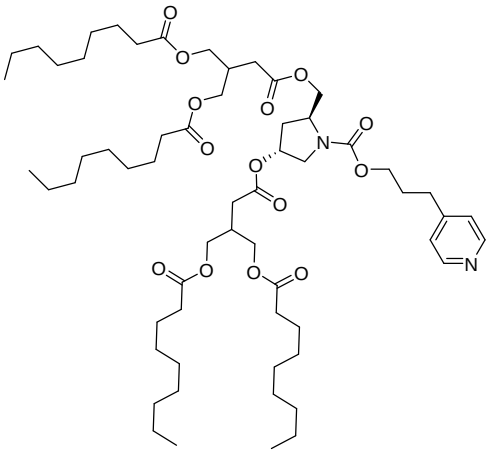
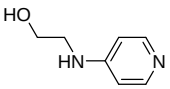
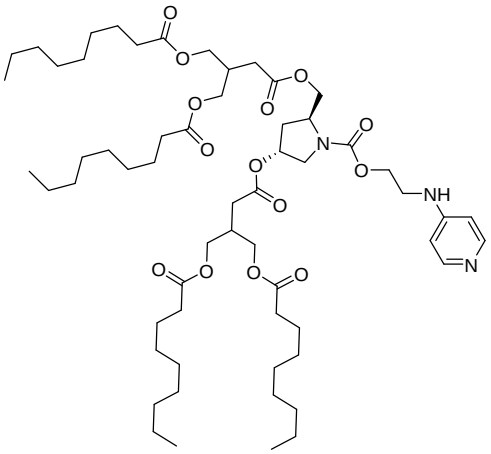
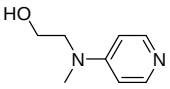
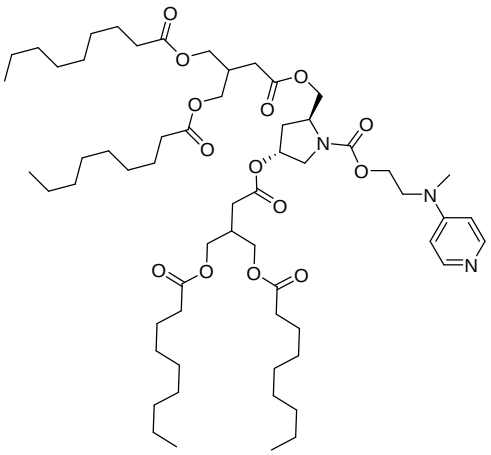
Precursor X	Lípido	c-pKa
 **113**	 **CICL-207-113**	**6,68**
 **114**	 **CICL-207-114**	**7,50**
 **115**	 **CICL-207-115**	**7,55**

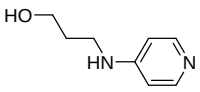
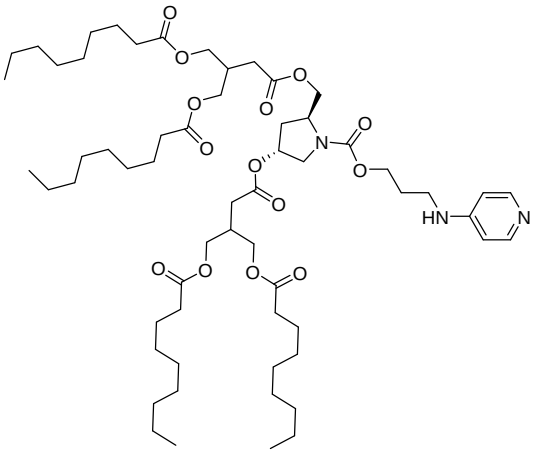
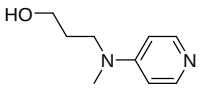
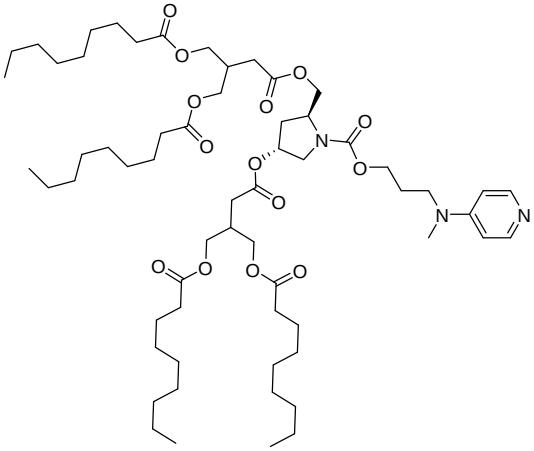
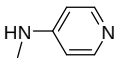
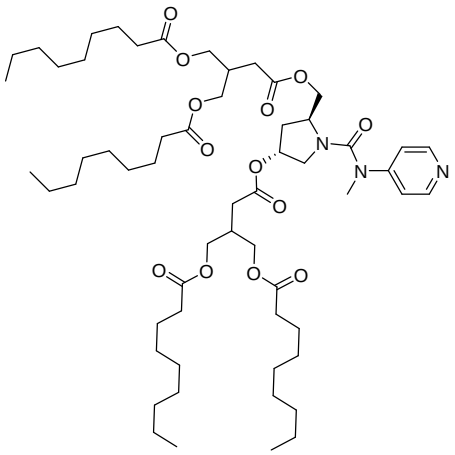
Precursor X	Lípido	c-pKa
 **116**	 **CICL-207-116**	**8,37**
 **117**	 **CICL-207-117**	**9,43**
 **118**	 **CICL-207-118**	**10,12**

Precursor X	Lípido	c-pKa
 **119**	 **CICL-207-119**	**8,44**
 **120**	 **CICL-207-120**	**9,21**
 **121**	 **CICL-207-121**	**7,77**

Precursor X	Lípido	c-pKa
 **122**	 **CICL-207-122**	**8,38**
 **123**	 **CICL-207-123**	**6,17**
 **124**	 **CICL-207-124**	**7,04**

Precursor X	Lípido	c-pKa
 **125**	 **CICL-207-125**	**7,56**
 **126**	 **CICL-207-126**	**7,64**
 **127**	 **CICL-207-127**	**5,64**

Precursor X	Lípido	c-pKa
 **128**	 **CICL-207-128**	**5,93**
 **129**	 **CICL-207-129**	**7,90**
 **130**	 **CICL-207-130**	**8,65**

Precursor X	Lípido	c-pKa
 **131**	 **CICL-207-131**	**8,14**
 **132**	 **CICL-207-132**	**9,18**
 **133**	 **CICL-207-133**	**7,33**

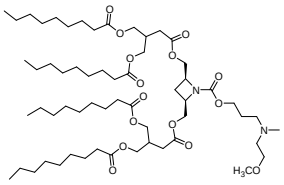
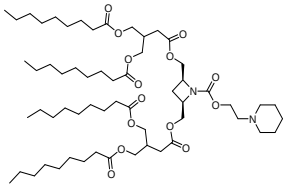
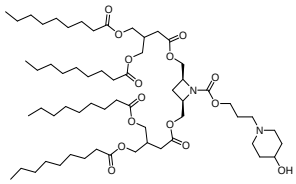
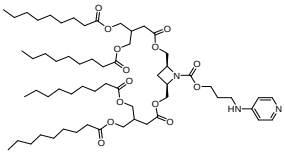
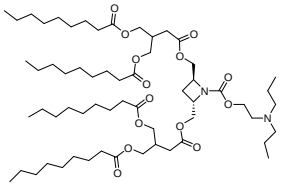
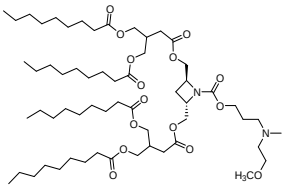
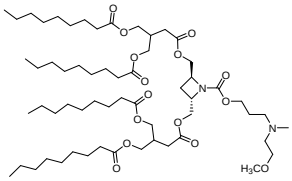
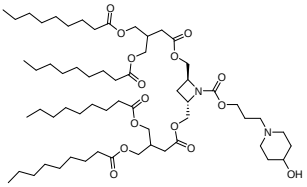
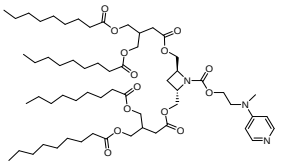
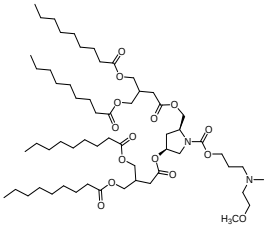
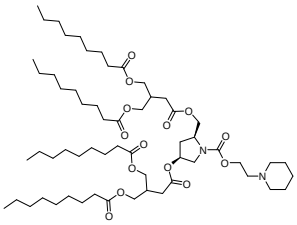
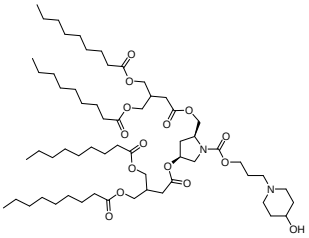
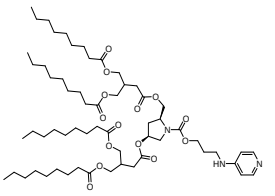
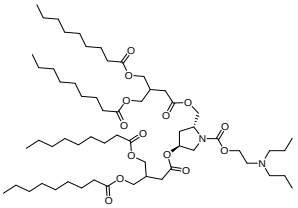
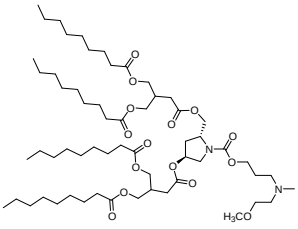
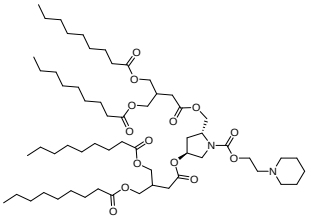
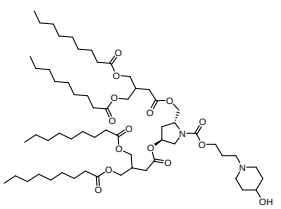
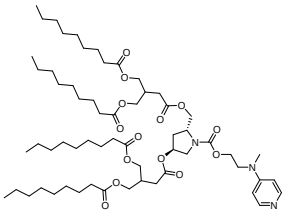
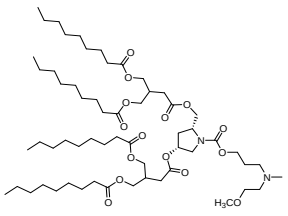
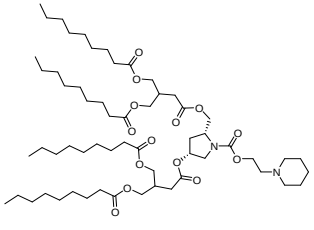
Los datos de pKa medidos asociados con CICL-207 en la Tabla 9 y los datos de pKa calculados para CICL-207-108 a CICL-207-133 permiten predecir que las combinaciones

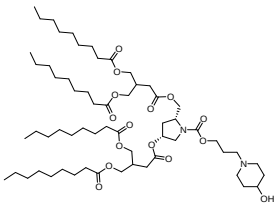
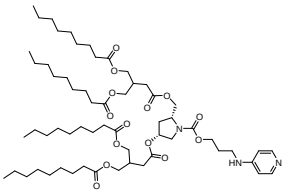
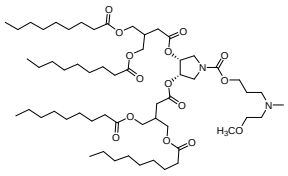
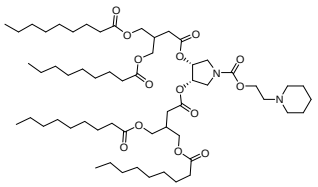
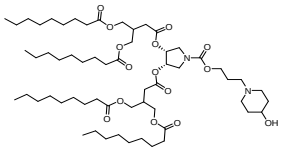
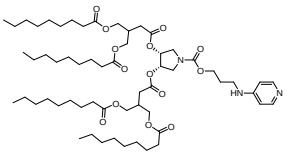
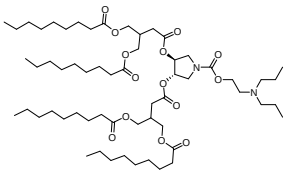
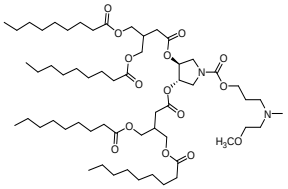
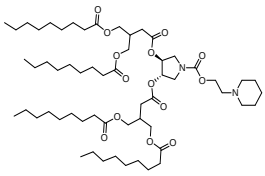
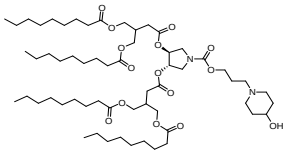
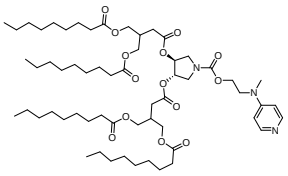
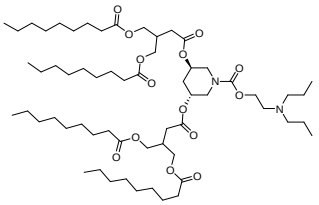
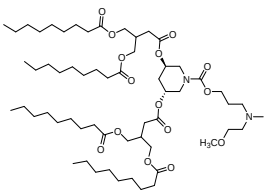
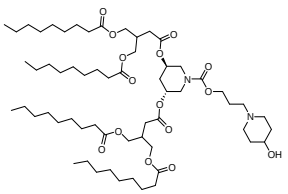
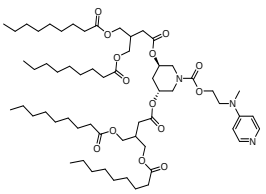
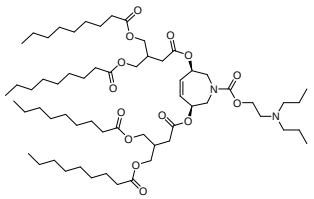
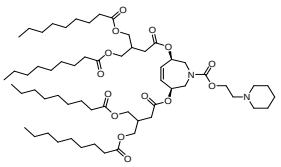
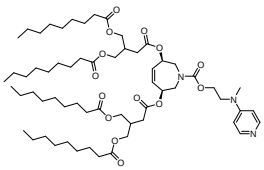
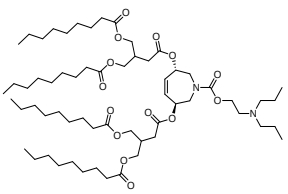
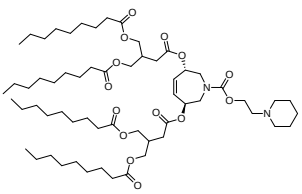
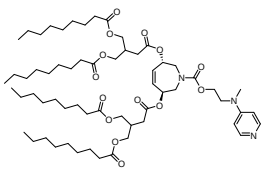
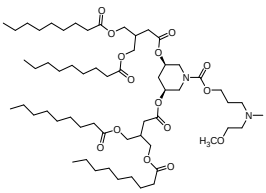
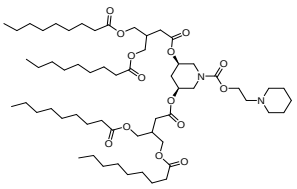
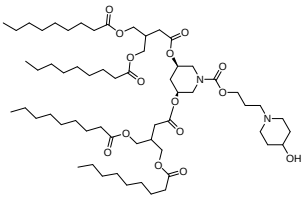
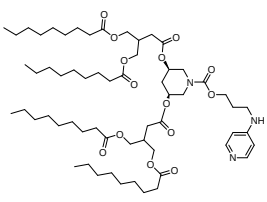
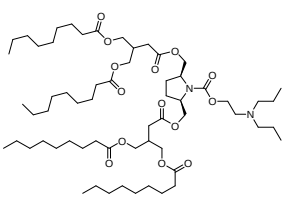
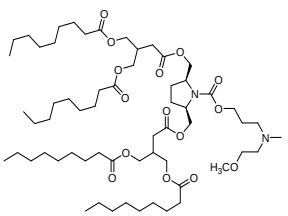
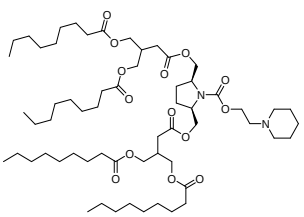
CICL-207-109, CICL-207-116, CICL-207-119, CICL-207-122 y CICL-207-130 deberían haber medido datos pKa en formulación cercana al punto medio pKa deseado = 6-7.

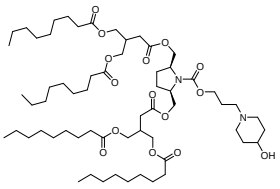
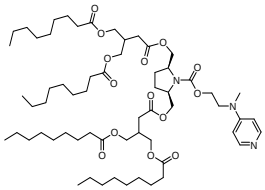
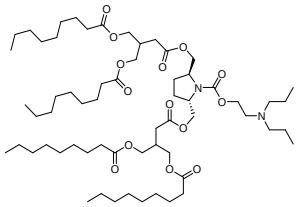
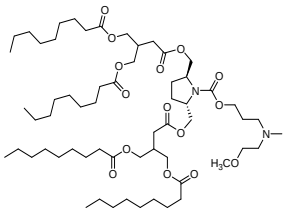
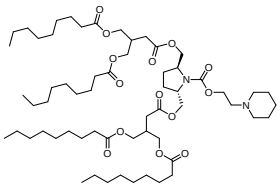
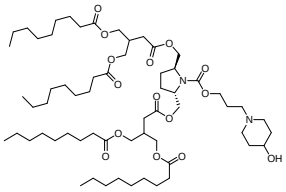
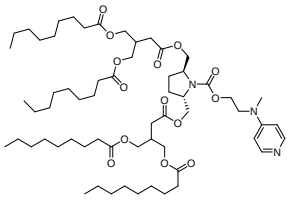
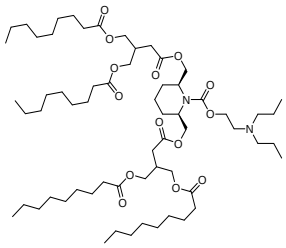
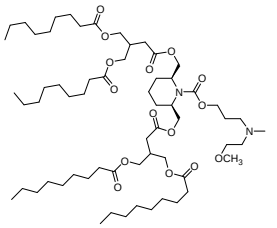
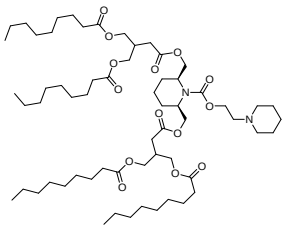
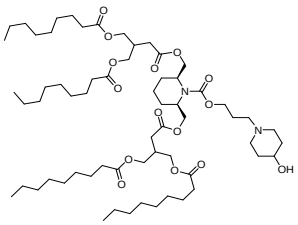
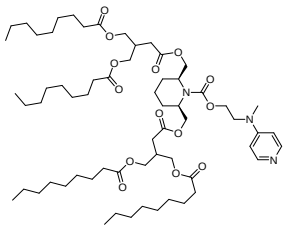
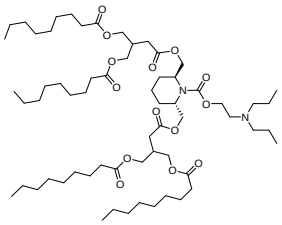
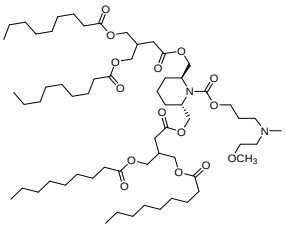
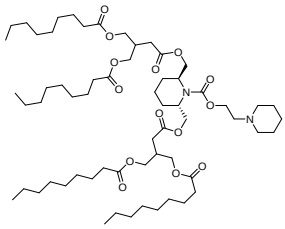
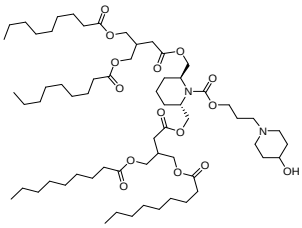
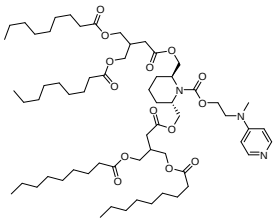
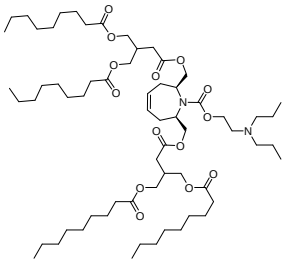
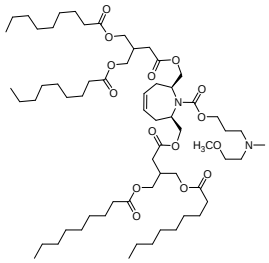
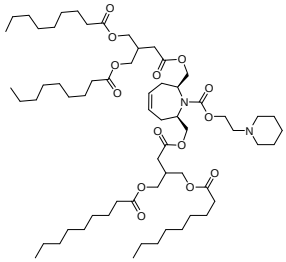
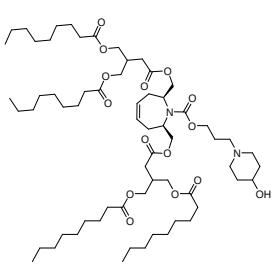
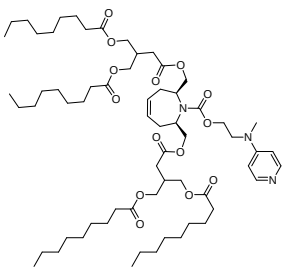
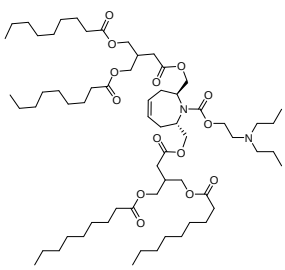
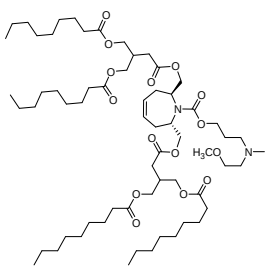
Para mover la pKa medida de lípidos que resultan de la combinación de acilimidazolidas 7, 12, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 53 para apuntar al punto medio del rango de pKa medido de 6-7 cuando se combina con los grupos X 108-133, la c-pKa de la Tabla 5 y los datos de pKa medidos de las Tablas 8, 9 y 10 informarán las elecciones realizadas. Las acilimidazolidas 7, 20, 28, 32 y 53 (usadas en la síntesis de CICL-221, CICL-224, CICL-223, CICL-216 y CICL-238, respectivamente) se combinarán con grupos X: 116, 119, 122 y 131. Las acilimidazolidas 12, 24 y 36 (usadas en la síntesis de CICL-222, CICL-225 y CICL-215, respectivamente) se acercarán al punto medio pKa 6-7 cuando se combinan con los grupos X 109, 116, 119, 122 y 130. La combinación de acilimidazolida 40 (usada en la síntesis de CICL-220) con los grupos X 109, 116, 122 y 130 se acercará al objetivo del punto medio, así como la concatenación de acilimidazoides 44 y 48 (usados en la síntesis de CICL-219 y CICL-218, respectivamente) con grupos X: 109, 119, y 130. Los lípidos previamente derivados de acilimidazolidas 57, 61, 65, 69, 76, 80, 85 no se han asociado con valores de pKa medidos. Estas acilimidazolidas se combinarán con los grupos de cabeza 109, 116, 119, 122 y 130 para apuntar a lípidos de rango medio (pKa 6-7). En la Tabla 6 se presentan

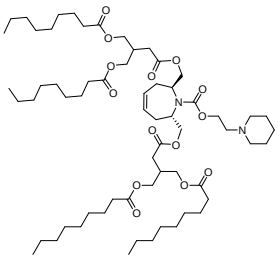
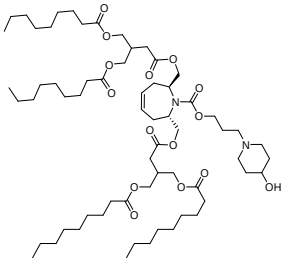
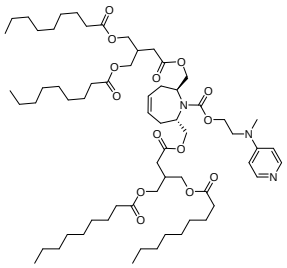
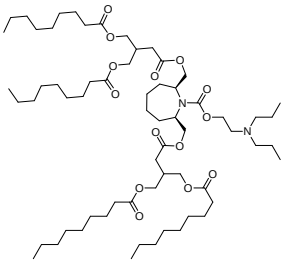
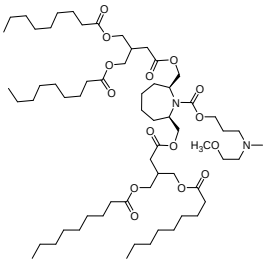
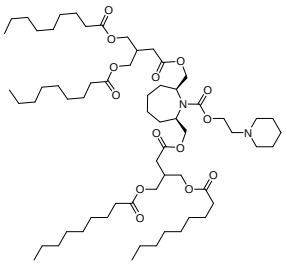
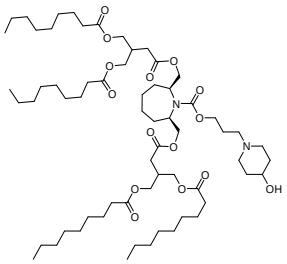
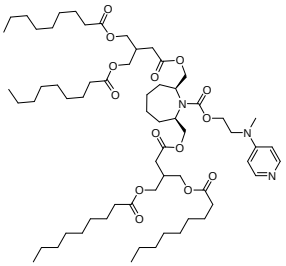
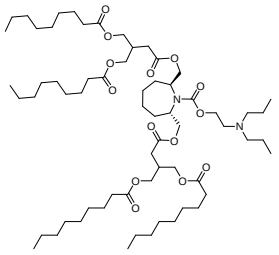
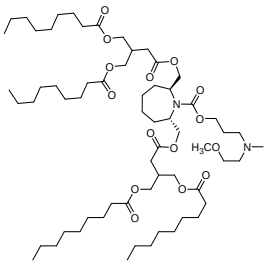
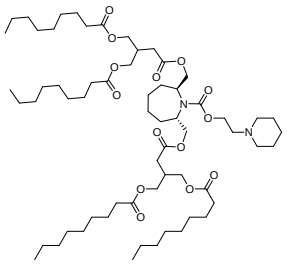
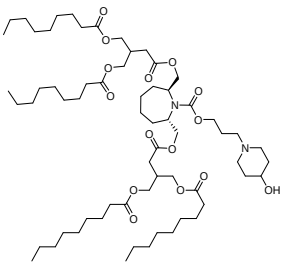
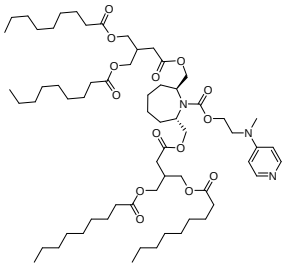
las estructuras de los lípidos catiónicos ionizables que resultan de las combinaciones citadas anteriormente.

Tabla 6. Lípidos formados a partir de la Combinación de acilimidazolida con núcleo 7, 12, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 53 con grupos de cabeza seleccionados de 108 a 133.

 **CICL-221-116**	 **CICL-221-119**	 **CICL-221-122**	 **CICL-221-131**
 **CICL-222-109**	 **CICL-222-116**	 **CICL-222-119**	 **CICL-222-122**
 **CICL-222-130**	 **CICL-224-116**	 **CICL-224-119**	 **CICL-224-122**
 **CICL-224-131**	 **CICL-225-109**	 **CICL-225-116**	 **CICL-225-119**
 **CICL-225-122**	 **CICL-225-130**	 **CICL-223-116**	 **CICL-223-119**

 **CICL-223-122**	 **CICL-223-131**	 **CICL-216-116**	 **CICL-216-119**
 **CICL-216-122**	 **CICL-216-131**	 **CICL-215-109**	 **CICL-215-116**
 **CICL-215-119**	 **CICL-215-122**	 **CICL-215-130**	 **CICL-220-109**
 **CICL-220-116**	 **CICL-220-122**	 **CICL-220-130**	 **CICL-219-109**
 **CICL-219-119**	 **CICL-219-130**	 **CICL-218-109**	 **CICL-218-119**
 **CICL-219-130**	 **CICL-238-116**	 **CICL-238-119**	 **CICL-238-122**
 **CICL-238-131**	 **CICL-242-109**	 **CICL-242-116**	 **CICL-242-119**

 **CICL-242-122**	 **CICL-242-130**	 **CICL-243-109**	 **CICL-242-116**
 **CICL-242-119**	 **CICL-242-122**	 **CICL-242-130**	 **CICL-244-109**
 **CICL-244-116**	 **CICL-244-119**	 **CICL-244-122**	 **CICL-244-130**
 **CICL-245-109**	 **CICL-245-116**	 **CICL-245-119**	 **CICL-245-122**
 **CICL-245-130**	 **CICL-246-109**	 **CICL-246-116**	 **CICL-246-119**
 **CICL-246-122**	 **CICL-246-130**	 **CICL-247-109**	 **CICL-247-116**

 **CICL-247-119**	 **CICL-247-122**	 **CICL-247-130**	 **CICL-248-109**
 **CICL-248-116**	 **CICL-248-119**	 **CICL-248-122**	 **CICL-248-130**
 **CICL-249-109**	 **CICL-249-116**	 **CICL-249-119**	 **CICL-249-122**
 **CICL-249-130**			

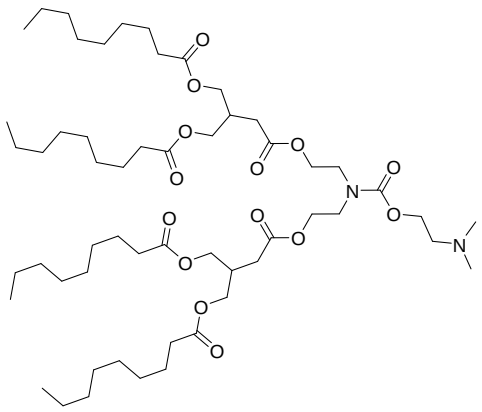
La siguiente tabla proporciona las composiciones lipídicas específicas de las LNP y tLNP usadas en los siguientes Ejemplos (Ejemplos 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72).

Tabla 7. Composiciones de LNP y tLNP usadas en los Ejemplos 66-72

Composición	Código de composición
ALC-0315:DSPC:CHOL:DMG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [50:10:38,5:1,4:0,1]	BF1
CICL-1:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F9
CICL-1:DSPC:CHOL:DMG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F30
CICL-207:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F50
CICL-207:DSPC:CHOL:DMG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F51
CICL-207:DSPC:CHOL:DMG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [50:10:38,5:1,4:0,1]	F52
CICL-207:DSPC:CHOL: DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [62:10:26,5:1,4:0,1]	F53
CICL-215:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F54
CICL-216:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F55
CICL-217:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F56
CICL-218:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F57
CICL-219:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F58
CICL-220:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F59
CICL-221:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F60
CICL-222:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F61
CICL-223:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F62
CICL-224:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F63
CICL-225:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F64
CICL-225:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [62:10:26,5:1,4:0,1]	F65
CICL-225:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [65:10:23,5:1,4:0,1]	F66
CICL-238:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F67
CICL-239:DSPC:CHOL:DSG-PEG(2k):DSPE-PEG(2k)-MAL [58:10:30,5:1,4:0,1]	F68

Ejemplo 66. Suministro *in vivo* de ARNm por tLNP que incorpora CICL-207 como lípido catiónico ionizable

Para evaluar la capacidad de unos lípidos catiónicos ionizables restringidos para facilitar la transfección *in vivo* de células T con ARNm mCherry (sec. con núm. de ident. 5), se prepararon y administraron tLNP que incorpora CICL-207, o para comparación, CICL-1, y conjugado a un anticuerpo anti-CD5 de ratón y se administraron a ratones C57BL/6. La tLNP comprendía ya sea CICL-207 o CICL-1, DSPC, colesterol, ya sea DMG-PEG (2000) o DSG-PEG (2000), y DSPE-PEG (2000)-maleimida en las proporciones indicadas en la Tabla 7 (a continuación) y una relación N/P de 6. CICL-1 tiene la estructura:



CICL-1

Brevemente, para preparar la tLNP, se encapsuló ARNm mCherry sustituido N1-metilpseudouridina (m1ψ) en la LNP usando un proceso de autoensamblaje en el que una solución acuosa de ARNm a pH=3,5 se mezcló rápidamente con

una solución de lípidos disueltos en etanol, seguida después por dilución de fosfato y regulador Tris por etapas y purificación por filtración de flujo tangencial (TFF). Después, el mAb anti-CD5 se conjugó con la LNP anterior para generar tLNP. El anticuerpo CD5 antirratón purificado de rata, clon 53-7.3 (BioLegend), se acopló a LNP mediante química de conjugación N-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA)-maleimida. Brevemente, se formularon LNP con DSPE-PEG(2000)-maleimida incorporada y se almacenaron a 4 °C el día de la conjugación. El anticuerpo se modificó con SATA (Sigma-Aldrich) para introducir grupos sulfhidrilo en residuos de lisina accesibles permitiendo la conjugación con maleimida. SATA se desprotegió usando hidroxilamina 0,5 M seguida de la eliminación de los componentes sin reaccionar mediante columnas G-25 Sephadex Quick Spin Protein (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). El grupo sulfhidrilo reactivo en el anticuerpo se conjugó entonces con las entidades de maleimida en las LNP usando química de conjugación de tioéter. La purificación se realizó usando columnas de filtración en gel Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich). Las tLNP (LNP conjugadas con un anticuerpo diana) se congelaron a -80 °C.

El tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico) y el índice de polidispersidad de las nanopartículas lipídicas dirigidas se determinaron usando dispersión dinámica de luz (DLS) en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments,

Worcestershire, UK). La medición del tamaño se realizó en regulador Tris de pH 7,4 a 25 °C en células capilares desechables. Se usó un sistema de retrodispersión no invasivo (NIBS) con un ángulo de dispersión de 173 ° para las mediciones de tamaño. el contenido de ARNm se determinó usando un kit de ensayo de ARN Quant-iT™ RiboGreen (Invitrogen™). La eficiencia de encapsulación se calculó determinando el contenido de ARNm no encapsulado midiendo la intensidad de fluorescencia (Fi) tras la adición del reactivo RiboGreen® a la LNP y comparando este valor con la intensidad de fluorescencia total (Ft) del contenido de ARN que se obtiene tras la lisis de las LNP en 1 % Triton X-100, donde el % de encapsulación=(Ft - Fi)/Ft×100). Después de la conjugación, se determinó la relación en peso de anticuerpo tLNP a ARNm (densidad del aglutinante) con el ensayo de proteína total BCA (ácido bicinconínico) y el ensayo Ribogreen® de contenido de ARNm.

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de la tLNP

Composición	Tamaño (nm)	PDI	Eficiencia de encapsulación (%)	Relación AB:ARNm (p:p) por BCA
F51	91	0,09	96	0,76
F50	85	0,11	96	0,71
F52	75	0,14	96	0,65
F30	81	0,07	97	0,50

Como se observa en la Tabla 8, todas estas composiciones de tLNP tenían diámetros hidrodinámicos e índices de polidispersidad dentro de los rangos aceptables de 50-150 nm y ≤0,2 para PDI. La eficiencia de encapsulación es aceptable a ≥ 80 % aunque se prefieren ≥ 85 % y ≥ 90 %. La densidad del aglutinante (relación ab:ARNm (peso:peso)) es aceptable en proporciones de 0,3 a 1,0. Adicionalmente, se encontró que la estabilidad de estas tLNP a -20°C era superior a la de las tLNP que incorporan un lípido similar carente de un anillo de restricción.

La pKa aparente o medida del lípido ionizable en la nanopartícula lipídica se determinó usando sal sódica del ácido 6-(p-toluidino)-2-naftalenosulfónico (sal TNS, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canadá). Las nanopartículas lipídicas se diluyeron en PBS 1 x Dulbecco a una concentración de lípidos totales 1 mM. La sal de TNS se preparó como una solución madre de 1 mg/ml en DMSO y después se diluyó adicionalmente usando agua destilada a una solución de trabajo de 60 µg/ml (179 mM). Las muestras diluidas de nanopartículas lipídicas se diluyeron adicionalmente a 90 µm de lípidos totales en 165 µl de solución regulada que contenía 10 mM de HEPES, 10 mM de MES, 10 mM de acetato de amonio, NaCl 130 mM, y concentración final de TNS de 1,33 µg/ml (4 µm) con el pH que variaba de 3,5 a 12,2. Después de mezclar la pipeta e incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante

15 min, se midió la intensidad de fluorescencia a temperatura ambiente en un lector de placas BioTek Synergy H1 usando longitudes de onda de excitación y emisión de 321 y 445 nm, respectivamente. La señal de fluorescencia se restó en blanco y se trazó en función del pH, después se analizó usando un análisis de regresión no lineal (Boltzmann) con la pKa aparente determinada como el pH dando lugar a la intensidad de fluorescencia media máxima calculada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

A los ratones se les administraron tLNP que contenían 10 µg de ARNm mediante inyección en la vena de la cola y se recolectó tejido 24 horas después. Como se ve en la Figura 1A, la tLNP que comprende DMG-PEG (2000) y ya sea CICL-207 o CICL-1 tuvo un desempeño similar en células T esplénicas tanto para la tasa de transfección como para el nivel de expresión (medido como equivalente molecular de fluorocromo soluble (MESF)). Al reducir la cantidad de CICL-207 de 58 % a 50 % disminuyó el rendimiento, mientras que al reemplazar DMG-PEG (2000) por DSG-PEG (2000) aumentó el rendimiento, con respecto tanto a la tasa de transfección como a la expresión. Estas mismas tendencias se han observado con tLNP que comprende CICL-1 como lípido ionizable (datos no mostrados). La tLNP que comprende 58 % de lípido catiónico ionizable tuvo tasas de transfección igualmente bajas (< 4 %) para células hepáticas $CD45^-$ (hepatocitos) (Figura 1B). La tLNP que incorporaba CICL-207 presentaba niveles igualmente

bajos en células Kupffer hepáticas (células hepáticas $CD45^+/CD11^+$) aunque la tLNP que incorporaba CICL-1 (y DMG-PEG) presentaba una tasa de transfección que era algo mayor (~ 6 %) para las células Kupffer (Figura 1C).

La composición de mejor desempeño fue la que comprende CICL-207 (58 %) y DSG-PEG (2000) – que es alta tasa de transfección y nivel de expresión en células T esplénicas y baja tasa de transfección y nivel de expresión en hígado. No obstante, no hubo tLNP preparadas con CICL-1 y DSG-PEG (2000) para una comparación cara a cara. Por lo tanto, se prepararon tLNP con 58 % de lípido catiónico ionizable, 10 % de DSPC, 30,5 % de colesterol, 1,4 % de DSG-PEG (2000), y 0,1 % de DSPE-PEG (2000)-MAL como se describió anteriormente. Como se observa en la Tabla 9, sus propiedades fisicoquímicas se encontraban dentro de los rangos aceptables.

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de la tLNP

Composición	Tamaño (nm)	PDI	Eficiencia de encapsulación (%)	Relación AB:ARNm (p:p) por BCA	pKa medida (Ensayo de TNS)
F9	89	0,10	98	0,69	6,58
F50	82	0,05	99	0,52	6,51

El desempeño de estas tLNP que difieren solo en el componente lipídico ionizable fue similar en los tres tipos celulares evaluados (Figuras 2A-2C). En todos los casos la tLNP que comprende CICL-207 tuvo tasas de

transfección algo más deseables (mayores en células T esplénicas, menores en células hepáticas) y niveles de expresión algo más deseables en células T esplénicas y células hepáticas $CD45^-$. En consecuencia, la tLNP que comprende el lípido catiónico ionizable restringido CICL-207 como el lípido catiónico ionizable se desempeñó de manera similar a tLNP que comprende CICL-1 en su lugar.

Ejemplo 67. Suministro *in vivo* de ARNm por LNP que incorpora más lípidos catiónicos ionizables

Se incorporaron lípidos catiónicos ionizables adicionales de acuerdo con la Fórmula M2 en la tLNP y la capacidad de la tLNP para transfectar células *in vivo* se evaluó esencialmente como se describe en el Ejemplo anterior. Sus propiedades fisicoquímicas determinadas en diversos experimentos se recopilan en la Tabla 10.

Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas de la tLNP

Composición	Tamaño (nm)	PDI	Eficiencia de encapsulación (%)	Relación AB:ARNm (p:p) por BCA	pKa medida (Ensayo de TNS)
F54	88	0,02	99	0,72	6,61
F55	115	0,01	99	0,78	7,05
F56	87	0,04	97	0,69	5,87
F57	92	0,04	97	0,71	6,11
F58	86	0,04	98	0,55	6,20
F59	84	0,06	98	0,55	6,34
F60	99	0,07	95	0,61	6,97
F61	82	0,05	98	0,58	6,40

Composición	Tamaño (nm)	PDI	Eficiencia de encapsulación (%)	Relación AB:ARNm (p:p) por BCA	pKa medida (Ensayo de TNS)
F62	110	0,01	96	0,6	6,96
F63	112	0,03	93	0,79	6,99
F64	88	0,07	93	0,70	6,47
F67	104	0,03	97	0,57	7,09
F68	87	0,03	95	0,52	6,26

Tamaño, PDI, la eficiencia de encapsulación y relación anticuerpo:ARNm estuvieron todos dentro de límites aceptables. La pKa medida para tLNP que comprende tres de estos lípidos, CICL-216, -217 y -238, cayó fuera del rango de 6 a 7. No obstante, todos estos lípidos catiónicos ionizables fueron capaces de formar tLNP y suministrar ARNm a las células. Para fines de comparación, la tasa de transfección y el nivel de expresión (como equivalentes medios del fluorocromo soluble) se normalizaron a los resultados obtenidos con tLNP que incorpora CICL-207 como el lípido catiónico ionizable el cual se usó como control en cada experimento (Figuras 3A-3B). Las tLNP que comprenden CICL-216, -217, o -238 fueron 3 de los 4 tLNP de desempeño deficiente.

Una gráfica de puntos de datos representativos para cada uno de estos lípidos catiónicos ionizables para la tasa de transfección de células T esplénicas versus pKa medida (Figura 4A) mostró una tasa de transfección creciente a medida que la pKa se acercaba a aproximadamente 6,6, que después cayó a medida que la pKa se acercaba y

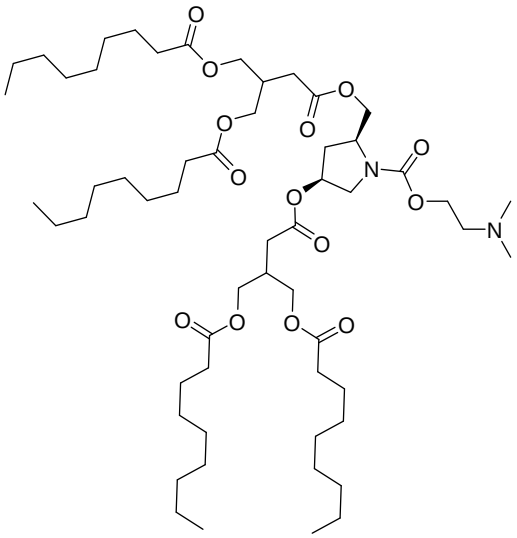
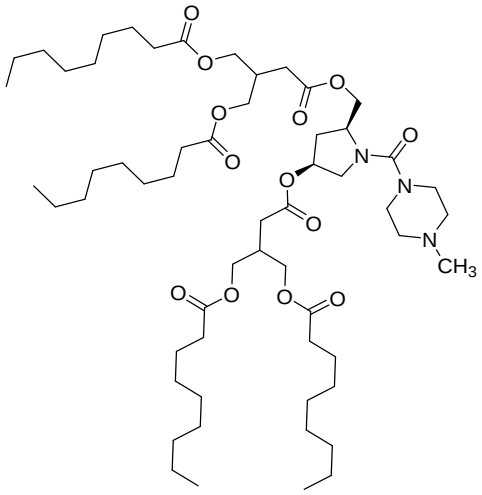
excedía 7,0. Las células hepáticas, tanto $CD45^-$ (hepatocitos) como $CD45^+/CD11^+$ (células Kupffer), presentaron tasas de transfección generalmente bajas, inferiores al 5 % para las células $CD45^-$ y, con la excepción de la tLNP que incorporó CICL-216, por debajo del 10 % para las células $CD45^+/CD11^+$. Las tasas de transfección para las células hepáticas se incrementaron al aumentar la pKa incluso cuando la pKa medida excedió 7,0 (Figuras 4B-4C).

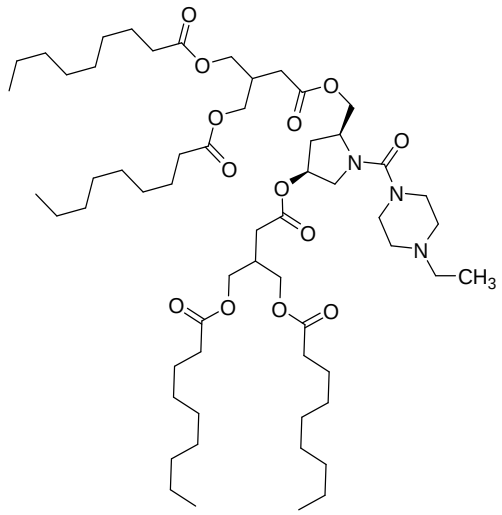
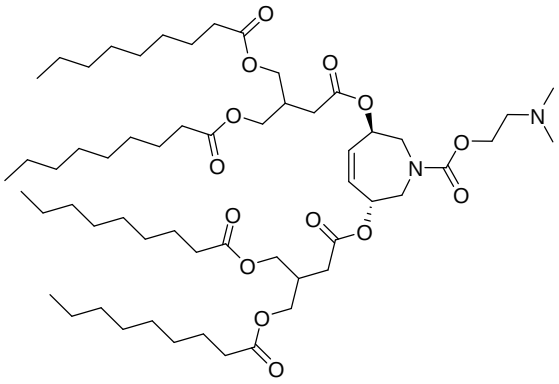
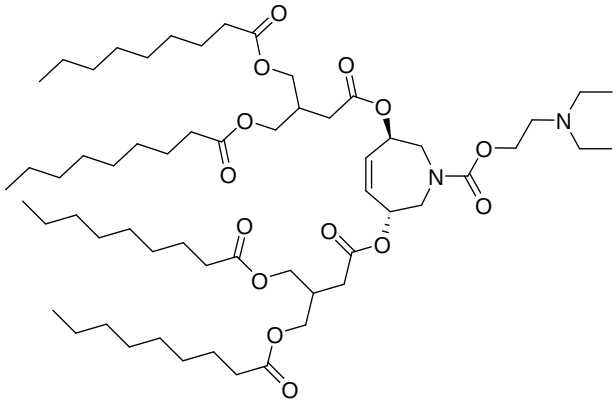
La tasa de transfección y el nivel de expresión tendieron a aumentar juntos en las células T esplénicas y las células hepáticas $CD45^+/CD11^+$ (Kupffer) (Figuras 5A y 5C, respectivamente), pero no hubo una correlación clara entre la tasa de transfección y el nivel de expresión en células hepáticas $CD45^-$ (hepatocitos; Figura 5B).

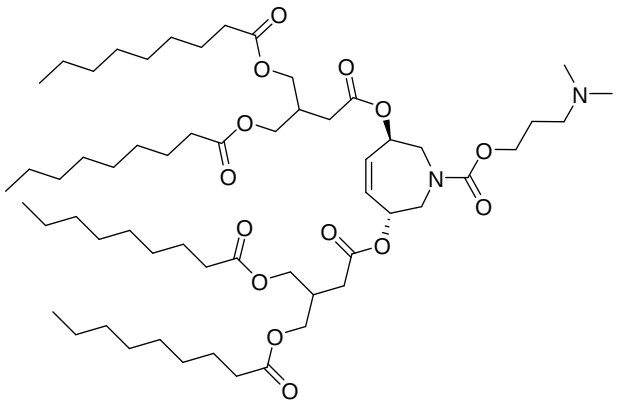
Los datos de la Figura 4A indicaron que se realizó una tasa de transfección en células T del bazo de aproximadamente 50 % a una pKa medida en la formulación de tLNP de aproximadamente pKa = 6,6. A pKa más básica medida, como en el caso del **CICL-224** (pKa medida ca. 7,0), la tasa de transfección cayó por debajo del 40 %. A pKa menos básica medida, como en el caso de **CICL-218** (pKa medida ca. 6,20), la tasa de transfección cayó a ca. 20 %. Se diseñaron alteraciones en el grupo de cabeza básico para disminuir o aumentar la basicidad calculada de algunos de los lípidos catiónicos ionizables, con cambios concomitantes en pKa medida en tLNP para mover el lípido hacia una pKa medida más

preferida de ca. 6,6. En la Tabla 11 se presentan modificaciones a **CICL-224** y **CICL-218** las cuales modularon la pKa calculada así como la pKa medida para algunos de estos lípidos. **CICL-224** tiene un pKa calculada (c-pKa) de 8,42 y una pKa medida (en formulación de tLNP) de 6,98. Al cambiar el grupo de cabeza básico a N-metilpiperazina (**CICL-239**) se redujo la pKa calculada a 7,16 y se midió la pKa a 6,25. Los valores de pKa medidos para **CICL-224** y **CICL-239** encorvaron el valor pKa = ca. 6,60 de los lípidos con las tasas de transfección más altas que se muestran en la Figura **4A**. Cambiar el grupo de cabeza básico a N-etilpiperazina para **CICL-305** dio como resultado una c-pKa de 7,65, entre las c-pKa de **CICL-224 y CICL-239** lo que debería mover la pKa medida hacia el valor 6,6 asociado a mayores tasas de transfección. La pKa medida para **CICL-218** (c-pKa = 8,49, pKa = 6,07) es menor que la asociada con un rendimiento óptimo. **CICL-306** y **CICL-307** fueron diseñados para elevar pKa mediante la adición de un grupo CH_2 entre el éster O y el N básico si el grupo dimetilamina o alterando el grupo básico de dimetilamina a una dietilamina y efectivamente estos lípidos tienen valores de c-pKa de 9,45 y 9,27, respectivamente. Todos los lípidos de la Tabla 11 exhiben valores de cLogD en un rango aceptable de 13-15. A medida que el cLogD aumenta para cualquier valor establecido de c-pKa, la pKa medida de la tLNP tenderá a disminuir.

Tabla 11. Modificaciones del pKa modulador CICL-224 y CICL-218

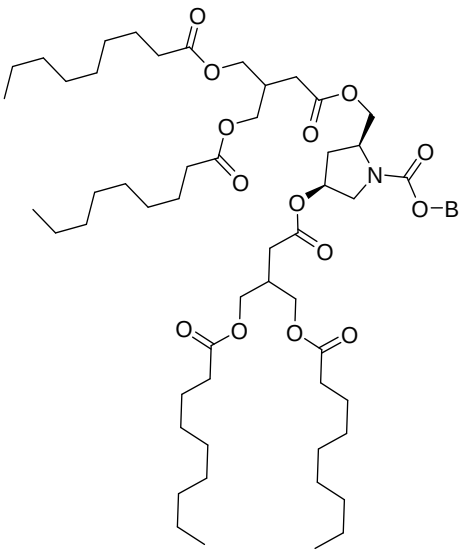
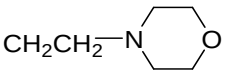
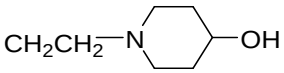
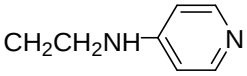
Estructura	cLogD	c-pKa	pKa medida
 **CICL-224**	**13,75**	**8,42**	**6,98**
 **CICL-239**	**14,77**	**7,16**	**6,25**

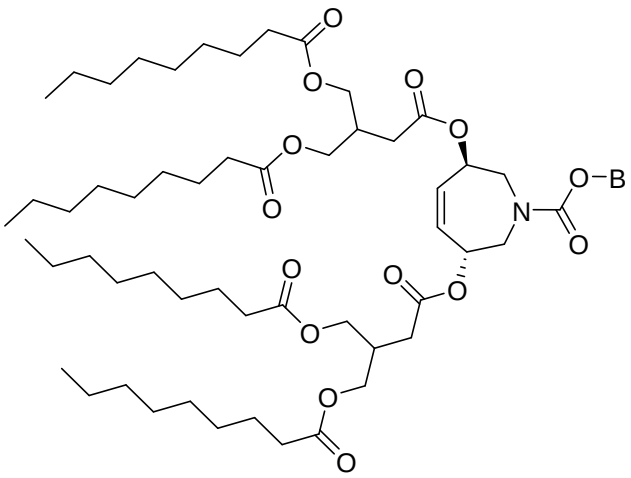
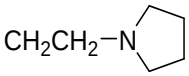
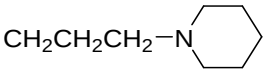
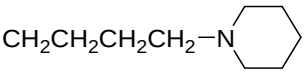
Estructura	cLogD	c-pKa	pKa medida
 **CICL-304**	**14,79**	**7,65**	**NT**
 **CICL-218**	**13,71**	**8,49**	**6,07**
 **CICL-305**	**13,84**	**9,45**	**NT**

Estructura	cLogD	c-pKa	pKa medida
 **CICL-306**	**13,18**	**9,27**	**NT**

Se diseñaron modificaciones adicionales de **CICL-224** y **CICL-218** alterando sus grupos de cabeza básicos para bajar y elevar pKa, respectivamente, hacia una pKa medida= ca. 6,6 y c-pKa calculada como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Modificaciones adicionales de CICL-224 y CICL-218 para modular pKa

Estructura	B	c-pKa
	 **para CICL-224-123**	**6,17**
	 **para CICL-224-121**	**7,77**
	 Para CICL-224-129	**7,90**

Estructura	B	c-pKa
	 **para CICL-218-117**	**9,42**
	 **para CICL-218-120**	**9,24**
	 **para CICL-218-134**	**9,61**

Ejemplo 68. Evaluación de tLNP con mayor contenido de lípidos catiónicos ionizables

Como se observa en el Ejemplo 60 (anterior), el aumento del contenido de lípido catiónico ionizable en tLNP tendió a aumentar la tasa de transfección y el nivel de expresión. Para evaluar aún más esta tendencia se hicieron tLNP conteniendo 62 % de CICL-207 o CICL 225, o 65 % de CICL-225. Sus propiedades fisicoquímicas determinadas en diversos experimentos se recopilan en la Tabla 13.

Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas de la tLNP

Composición	Tamaño (nm)	PDI	Eficiencia de encapsulación (%)	Relación AB:ARNm (p:p) por BCA	pKa medida (Ensayo de TNS)
F50	81,87	0,05	98,73	0,52	6,51
F53	95,19	0,06	97,58	0,64	6,36
F64	88	0,07	93	0,7	6,47
F65	95,11	0,02	96,24	0,65	6,56
F66	105	0,00	85,13	0,66	6,40

Aumentar el contenido de lípidos catiónicos ionizables de las tLNP a 62 % aumentó la tasa de transfección en los tres tipos celulares ensayados (Figuras 6A-6C). Al aumentar aún más el contenido de lípidos catiónicos ionizables de las tLNP a 65 % disminuyó la tasa de transfección en células T esplénicas y células hepáticas Kupffer indicando que se había excedido el contenido óptimo de lípido catiónico ionizable para esta composición de LNP. En contraste, aumentar aún más el contenido de lípido catiónico ionizable de las tLNP a 65 % aumentó aún más la tasa de transfección para las células hepáticas $CD45^-$ (hepatocitos), aunque se mantuvo por debajo del 5 %. En este conjunto de datos, el aumento en la tasa de transfección asociado a elevar el contenido de lípidos catiónicos ionizables de 58 % a 62 % fue mayor para CICL-207 que para CICL-225 en células T esplénicas mientras que el aumento de la tasa de transfección para CICL-225 fue mayor en ambos tipos de células hepáticas. En algunas modalidades, puede preferirse 58 % de lípido catiónico ionizable sobre 62 % para minimizar la transfección de células hepáticas.

Ejemplo 69: Evaluación de tLNP F9 y tLNP F50 en ratones NCG

Las LNP con la composición F9 y F50 se prepararon como se describe en el Ejemplo 66, excepto que las tLNP se generaron conjugando un anticuerpo anti-CD8 humanizado

mediante el uso de un reactivo AJICAP. Específicamente, un anticuerpo con las cadenas pesada y ligera CBD1033 (sec. con núms. de ident.: 1 y 2, respectivamente). El tLNP encapsuló ARNm sustituido con N1-metilpseudouridina que codifica un CAR anti-CD19 (sec. con núm. de ident.: 3).

A ratones NCG hembra (~10 semanas de edad, Charles River Laboratories) se les inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola 10 millones de PBMC humanas. Después de 14 días de injerto de células T a los ratones se les inyectó por vía intravenosa las tLNP indicadas. Los ratones fueron sacrificados 6 horas después de la inyección, y la sangre y el bazo se analizaron para determinar la expresión de CAR y el agotamiento de células B mediante citometría de flujo.

Las F9 y F50 tLNP decoradas con los anticuerpos anti-CD8 lograron tasas de transfección similares en células T $CD8^+$ de sangre y bazo. Ambas tLNP mostraron tasas de ingeniería CAR comparables (Figura 7A-B) y expresión de CAR (como MFI; Figura 7C-D) en células T $CD8^+$ de sangre y bazo, así como las moléculas CAR comparables/célula (Figura 7E-F). Ambas tLNP también indujeron el agotamiento completo de las células B 6 horas después de la administración (Figura 7G-H).

Ejemplo 70: Evaluación de BF1 LNP, BF1 tLNP, F50 LNP, F50 tLNP mediante biodistribución de luciferasa

Se prepararon LNP y tLNP con la composición F9 y F50 como se describe en el ejemplo 66, excepto que la carga útil consistió en ARNm que codifica luciferasa (sec. con núm. de ident. 4).

A ratones C57Bl/6 hembras de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) se les inyectó por vía intravenosa BF1 o F50 LNP o tLNP dirigidas a CD5 que encapsulaban ARNm que codificaban luciferasa a una dosis de 2 µg de ARNm/animal a través de la vena de la cola. A las 6 horas posteriores a la inyección, se recogieron imágenes de bioluminiscencia boca abajo y en posición supina de todos los ratones (Figura 8A-8B). Tras la obtención de imágenes de animales integrales, se sacrificaron los ratones, y se recogieron los siguientes tejidos: hígado, bazo, pulmón, riñones (ambos), corazón, médula ósea (fémur), ganglios linfáticos (inguinal izquierdo y derecho), y cerebro. Los tejidos se colocaron en placas de poliestireno negro precargadas de luciferina con espaciamiento entre tejidos, y se recogieron imágenes bioluminiscentes a las 6 horas y 24 horas después de la inyección (Figuras 8C-8D, respectivamente). Los resultados cuantitativos (Figura 8E) muestran que el uso de CICL-207 redujo la bioluminiscencia en el hígado aproximadamente 2 log en comparación con las composiciones de BF1 pero para

la tLNP que incorpora la bioluminiscencia CICL-207 en el bazo fue similar o mayor que las composiciones de BF1 y aproximadamente 1 log mayor que en el hígado.

Estas composiciones exhibieron el patrón general que la bioluminiscencia en bazo >ganglio linfático > pulmón > riñón>corazón>cerebro, y la composición de tLNP que contenía CICL-207 generalmente produjo la menor bioluminiscencia en cada uno de los órganos no diana.

Ejemplo 71: Suministro de componentes de edición de genes CRISPR In vivo

Para evaluar la capacidad de la tLNP descrita para suministrar componentes de edición de genes a células madre hematopoyéticas humanas (CD34+ CD117+) *in vivo*, a ratones NCG hembra injertados con células CD34+ humanas (~25-29 semanas después del injerto, Charles River Laboratories) se les administró por vía intravenosa tLNP dirigidas a CD117 encapsulando la carga útil de ARNm que codifican la proteína indicadora mCherry (sec. con núm. de ident. 5). Tanto F9 como F50 tLNP fueron capaces de suministrar carga útil mCherry a todos los subconjuntos analizados de células CD34+ (Figuras 9-10).

A ratones NCG hembras injertados con células CD34+ humanas (~25-29 semanas después del injerto Charles River Laboratories) se les administraron por vía intravenosa tLNP dirigidas a CD117. La tLNP usó la composición lipídica F50

con una relación N/P global de 6 y una carga útil 1:1 (p/p) SpCas9:ARNgu. El ARNgu se dirigió al locus B2M y la edición génica exitosa se midió como pérdida de expresión de B2M. Ocho días después de la infusión, se recogió médula ósea y se analizó mediante citometría de flujo para determinar el nocaut B2M en poblaciones indicadas de células CD34+. Los resultados se presentan en la Figura 11 y demuestran el suministro efectivo de SpCas9 y el ARNgu en células CD34+ *in vivo*. La edición de células de médula ósea $CD34^+$ o $CD34^+CD38^{bajo}$ en los ratones $CD34^+$ NCG humanizados por F50 tLNP fue de aproximadamente 10 %, tanto para dosis de 30 ug como de 60 ug, con una sola dosis de tLNP dirigidas a CD117.

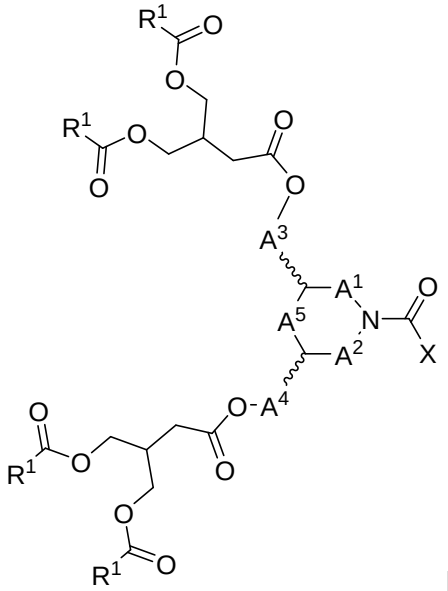
Ejemplo 72: Tolerabilidad de F50 LNP

Estudio en el que se administraron por vía intravenosa diversas dosis de ARNm mCherry encapsulante de F50 LNP sin decorar (hasta 8 mg/kg) a ratas Sprague Dawley macho de 8 semanas de edad (Charles River Laboratories). Se determinaron enzimas hepáticas en suero (Figuras 12A-B). Los niveles de proteína en fase aguda (Figuras 12C-E) y citocina (Figuras 12F-H) se evaluaron en plasma mediante ensayo Luminex. Sólo hubo incrementos mínimos en los niveles de enzimas hepáticas. Las proteínas de fase aguda se elevaron ligeramente a las 24 horas. Las elevaciones de citocina fueron transitorias y se resolvieron a las 24 horas. Ninguno de estos llevó a ninguna observación clínica. Existe una

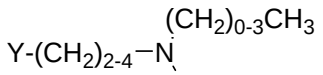
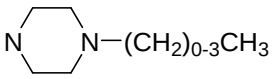
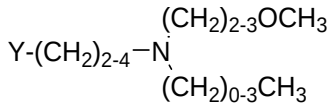
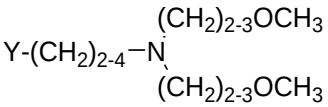
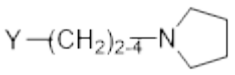
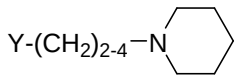
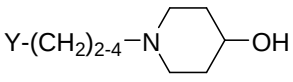
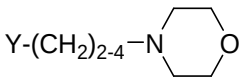
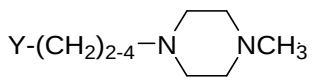
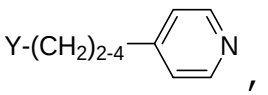
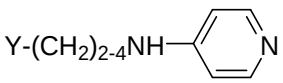
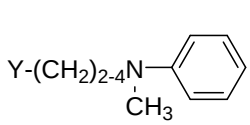
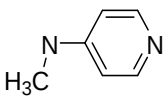
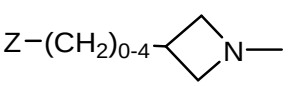
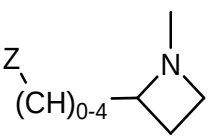
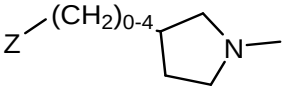
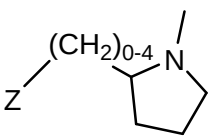
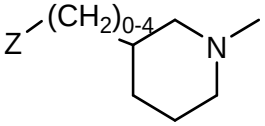
falta de capacidad de respuesta a la dosis en las elevaciones de las proteínas y citocinas en fase aguda, lo que sugiere que es una respuesta general a la infusión de LNP y no indica una falta de tolerabilidad de los componentes de la LNP. Estos datos demuestran que incluso a estas dosis altas, las LNP que incorporan CICL-207 fueron bien toleradas. La experiencia previa también indica que la adición de un anticuerpo a una LNP, especialmente uno que se dirige a un tejido no hepático como en una tLNP, conduce a una reducción en cualquier elevación de las enzimas hepáticas.

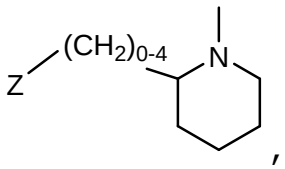
Los aspectos adicionales de la descripción son proporcionados por las siguientes modalidades enumeradas, que pueden combinarse en cualquier número y en cualquier combinación que no sea técnica o lógicamente inconsistente. Esta no es una lista exhaustiva de las modalidades descritas que incluyen modalidades similares dirigidas a especies y géneros diferentes a las ejemplificadas aquí. Además, debe entenderse que las modalidades de la invención descritas en la presente son ilustrativas de los principios de la presente invención. Otras modificaciones que pueden emplearse están dentro del alcance de la invención. Por lo tanto, a manera de ejemplo, pero sin limitarse, pueden utilizarse configuraciones alternativas de la presente invención de acuerdo con las enseñanzas de la presente. En consecuencia, la presente invención no se limita a eso precisamente como se muestra y se enumera a continuación.

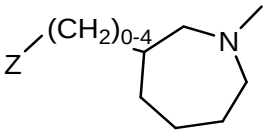
Modalidad 1. Un lípido catiónico ionizable que tiene una estructura de la Fórmula M2,

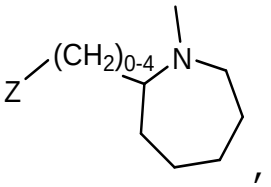


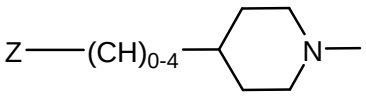
M2

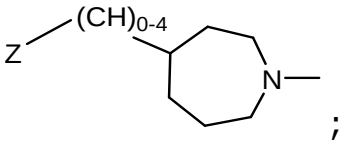
en donde X es  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,



,


,


,


, o


;

Y es O, S, NH, o NCH_3;

Z es O, NH, o NCH_3;

cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11} o alquenilo C_7-C_{11}; y

A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_{1-4}$ o CH_2-CH=CH-CH_2; o

A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$; o

A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_0$; o

A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$; o

A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$ o CH=CH, y

en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 2. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_{1-4}$ o CH_2-CH=CH-CH_2.

Modalidad 3. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 2, en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_1$.

Modalidad 4. -El lípido catiónico ionizable de la modalidad 2, en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_2$.

Modalidad 5. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 2, en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_3$.

Modalidad 6. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 2, en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es $(CH_2)_4$.

Modalidad 7. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 2, en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_0$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_1$, y A^5 es CH_2-CH=CH-CH_2

Modalidad 8. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 en donde A^1 es $(CH_2)_0$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_1$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$.

Modalidad 9. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_0$.

Modalidad 10. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_1$.

Modalidad 11. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$ o CH=CH.

Modalidad 12. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 11, en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es $(CH_2)_2$.

Modalidad 13. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 11, en donde A^1 es $(CH_2)_1$, A^2 es $(CH_2)_1$, A^3 es $(CH_2)_0$, A^4 es $(CH_2)_0$, y A^5 es CH=CH.

Modalidad 14. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{10} o alquilo C_7-C_9.

Modalidad 15. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 se selecciona independientemente de un alquilo C_7-C_{11} lineal, p. ej., un alquilo C_7-C_{10} lineal, o un alquilo C_7-C_9 lineal.

Modalidad 16. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 se selecciona independientemente de $(CH_2)_{6\text{-}8}CH_3$.

Modalidad 17. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde R^1 es $(CH_2)_7CH_3$.

Modalidad 18. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 se selecciona independientemente de un alquenilo C_7-C_{11} lineal, p. ej., un alquenilo C_7-C_{10} lineal, o un alquenilo C_7-C_9 lineal.

Modalidad 19. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 es un alquenilo C_8 lineal.

Modalidad 20. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 se selecciona independientemente de un alquilo C_7-C_{11} ramificado, p. ej., alquilo C_7-C_{10}, o alquilo C_7-C_9.

Modalidad 21. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 es un alquilo C_8 ramificado.

Modalidad 22. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 se selecciona independientemente de un alquenilo C_7-C_{11} ramificado, p. ej., alquenilo C_7-C_{10}, o alquenilo C_7-C_9.

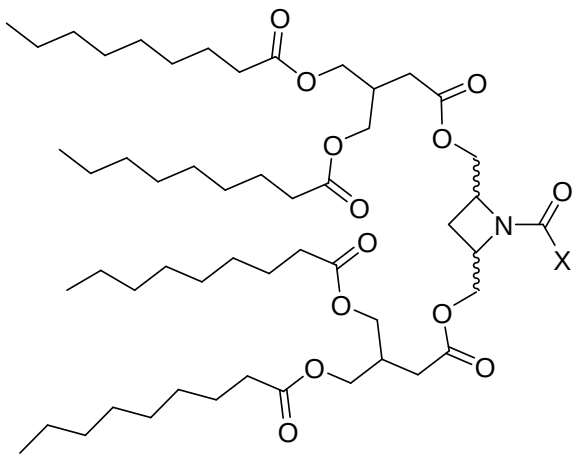
Modalidad 23. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde cada R^1 es un alquenilo C_8 ramificado.

Modalidad 24. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 13, en donde R^1 es un alquilo o alquenilo ramificado, el punto de ramificación se posiciona de manera que los carbonilos de éster no estén

en una posición α con respecto al punto de ramificación, por ejemplo están en una posición β con respecto al punto de ramificación.

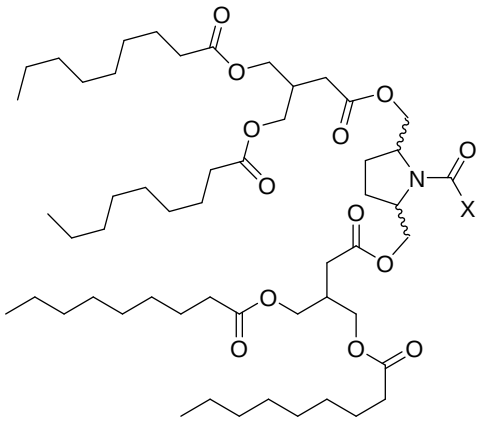
Modalidad 25. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 24, en donde cada R^1 es igual.

Modalidad 26. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



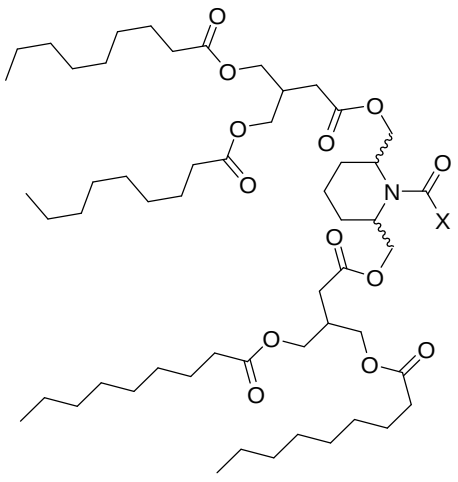
en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

Modalidad 27. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

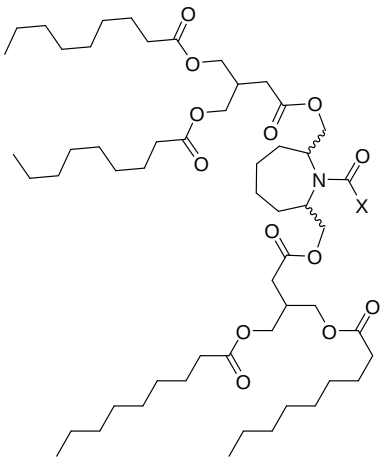
Modalidad 28. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo

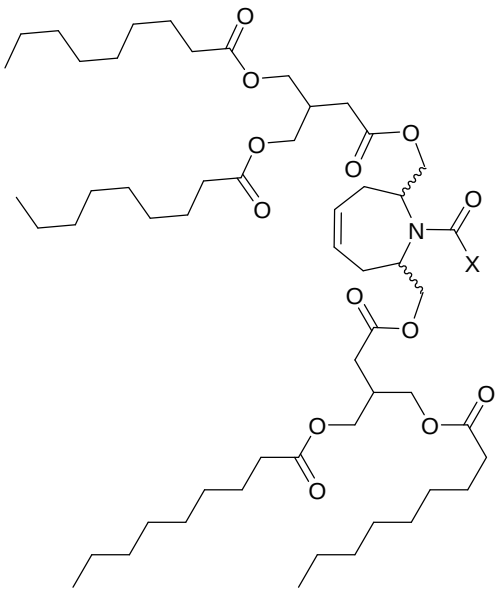
del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 29. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



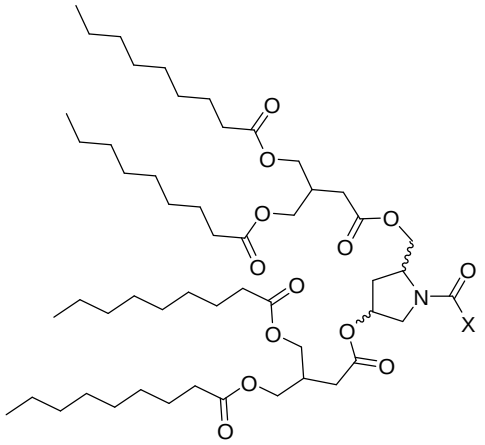
en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 30. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



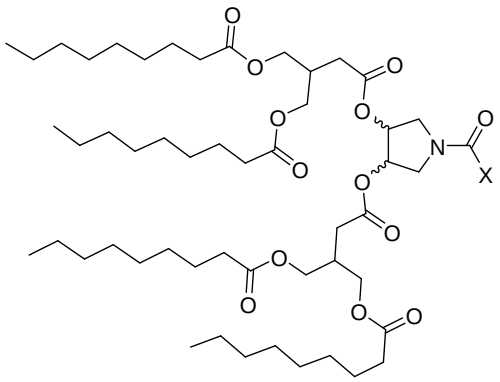
en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 31. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



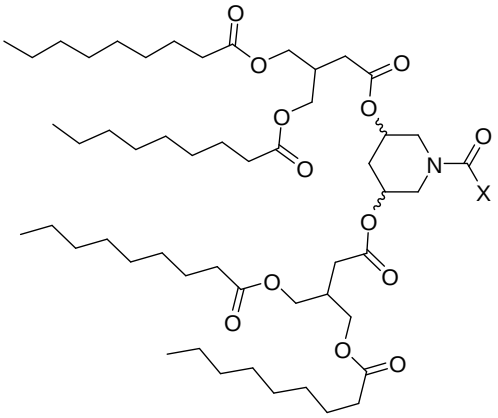
en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 32. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



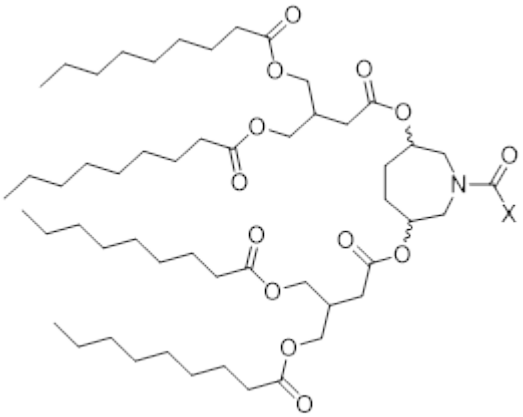
en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 33. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

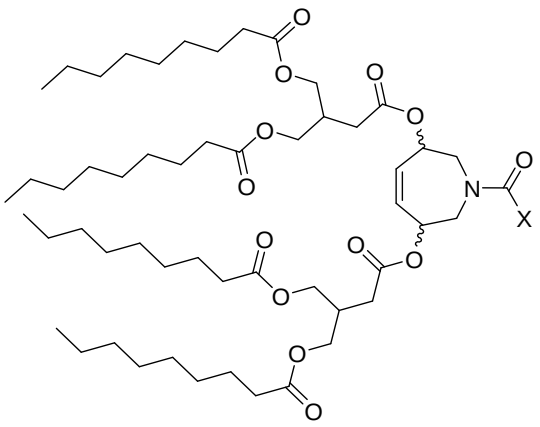
Modalidad 34. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo

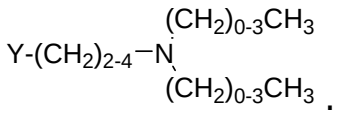
del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 35. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 25 que tiene la estructura:



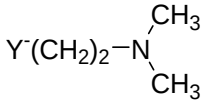
en donde enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente, o mezclas de estereoconfiguraciones.

Modalidad 36. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35 en donde X es



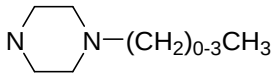
.

Modalidad 37. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35 en donde X es



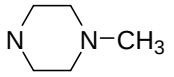
.

Modalidad 38. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



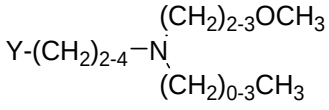
.

Modalidad 39. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



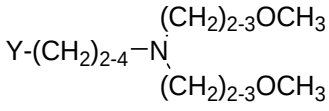
.

Modalidad 40. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



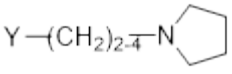
.

Modalidad 41. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



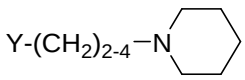
.

Modalidad 42. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



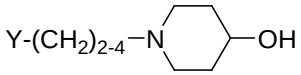
.

Modalidad 43. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



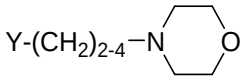
.

Modalidad 44. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



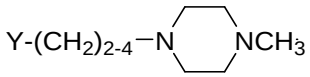
.

Modalidad 45. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



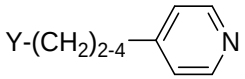
.

Modalidad 46. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



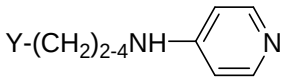
.

Modalidad 47. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



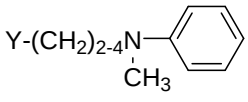
.

Modalidad 48. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



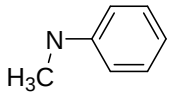
.

Modalidad 49. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



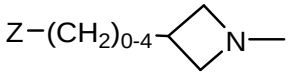
.

Modalidad 50. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



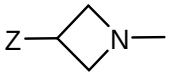
.

Modalidad 51. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



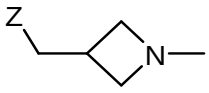
.

Modalidad 52. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



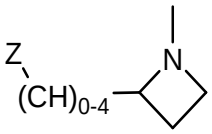
.

Modalidad 53. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



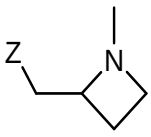
.

Modalidad 54. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 a 35, en donde X es



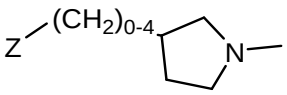
.

Modalidad 55. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



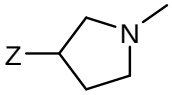
.

Modalidad 56. El lípido catiónico ionizable de cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



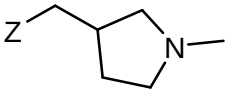
.

Modalidad 57. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



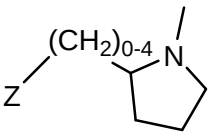
.

Modalidad 58. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



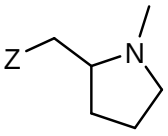
.

Modalidad 59. El lípido catiónico ionizable de cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



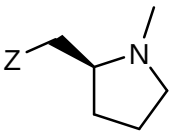
.

Modalidad 60. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



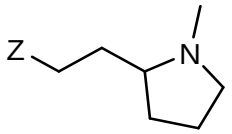
.

Modalidad 61. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



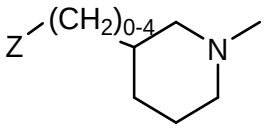
.

Modalidad 62. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



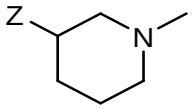
.

Modalidad 63. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



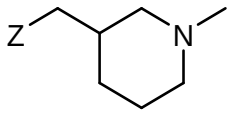
.

Modalidad 64. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



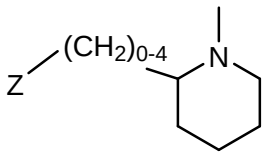
.

Modalidad 65. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



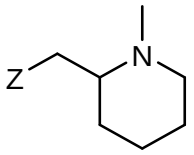
.

Modalidad 66. El lípido catiónico ionizable de cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



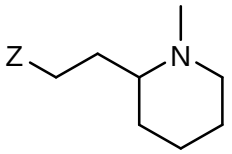
.

Modalidad 67. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



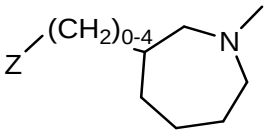
.

Modalidad 68. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



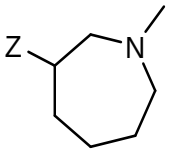
.

Modalidad 69. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



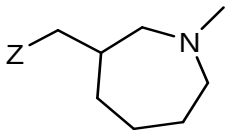
.

Modalidad 70. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



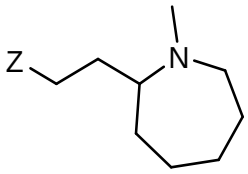
.

Modalidad 71. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



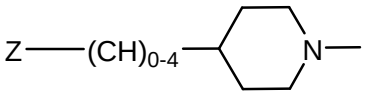
.

Modalidad 72. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



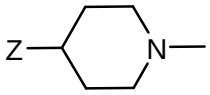
.

Modalidad 73. El lípido catiónico ionizable de cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



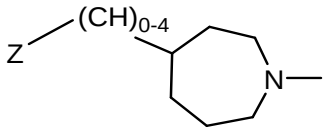
.

Modalidad 74. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



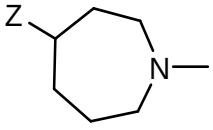
.

Modalidad 75. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



.

Modalidad 76. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35, en donde X es



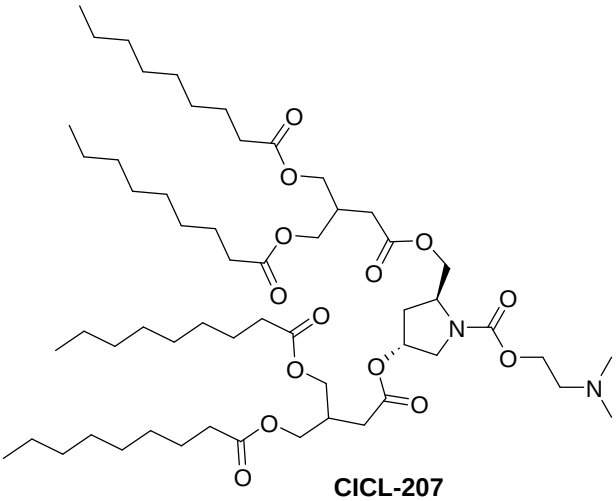
.

Modalidad 77. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 49 en donde Y es O.

Modalidad 78. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 49 en donde Y es S.

Modalidad 79. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 35 o 51-76, en donde Z es O.

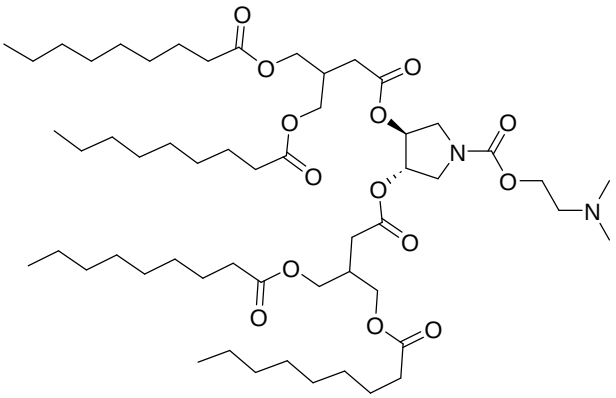
Modalidad 80. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-207:



CICL-207

o un racemato u otra mezcla que comprende CICL-225.

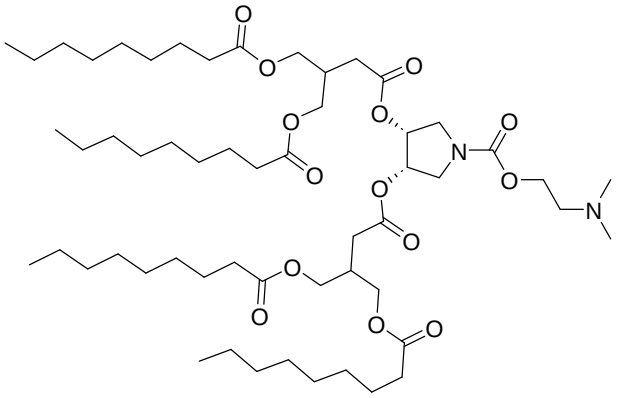
Modalidad 81. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-215:



CICL-215

, su enantiómero o un racemato, u otra mezcla que comprende CICL-216.

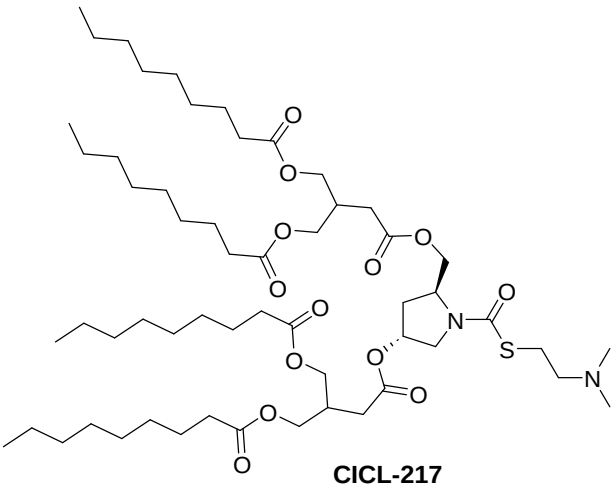
Modalidad 82. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-216:



CICL-216

.

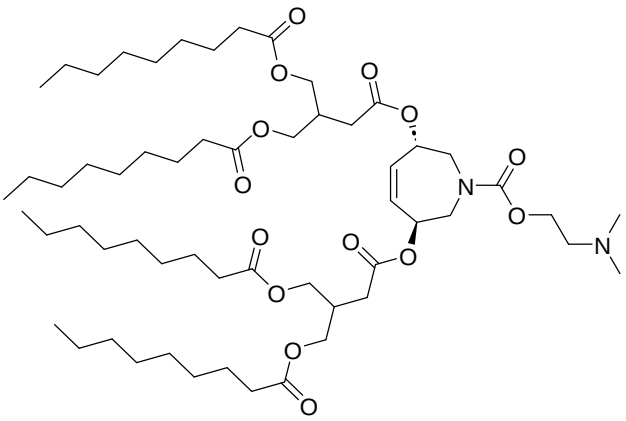
Modalidad 83. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-217:



CICL-217

, su enantiómero, un racemato o cualquier otra mezcla de estos.

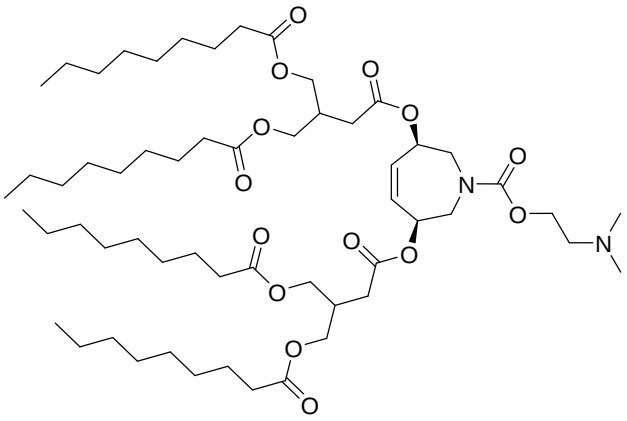
Modalidad 84. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-218:



CICL-218

, como un racemato, cualquier otra mezcla de enantiómeros, o cualquiera de los enantiómeros individuales.

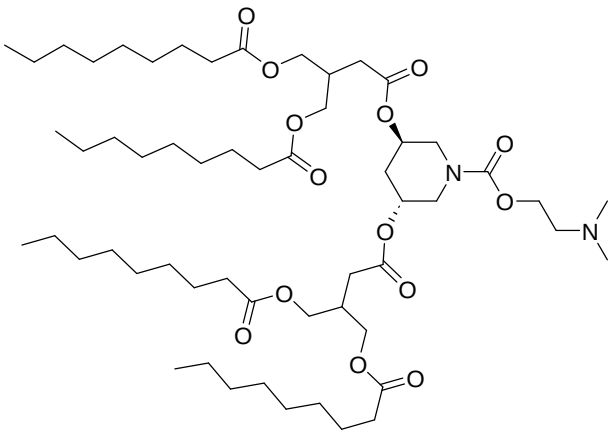
Modalidad 85. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-219:



CICL-219

.

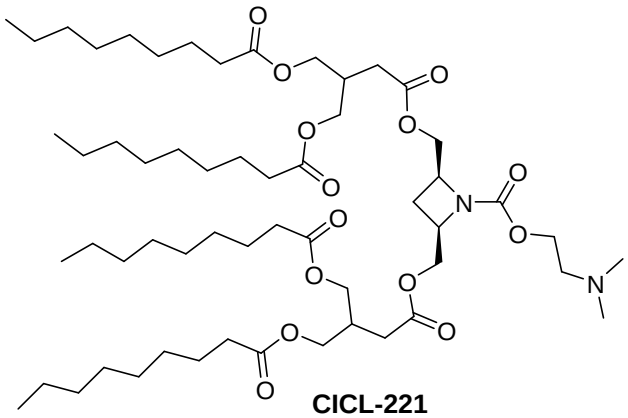
Modalidad 86. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-220:



CICL-220

, su enantiómero, un racemato, cualquier otra mezcla de enantiómeros.

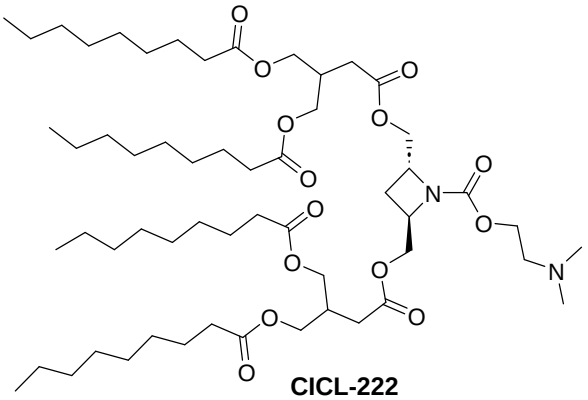
Modalidad 87. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-221:



CICL-221

.

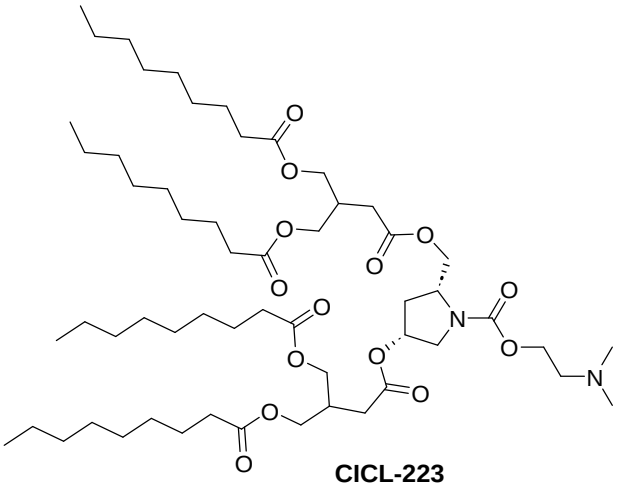
Modalidad 88. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-222:



CICL-222

, como un racemato, cualquier otra mezcla de enantiómeros, o cualquiera de los enantiómeros individuales.

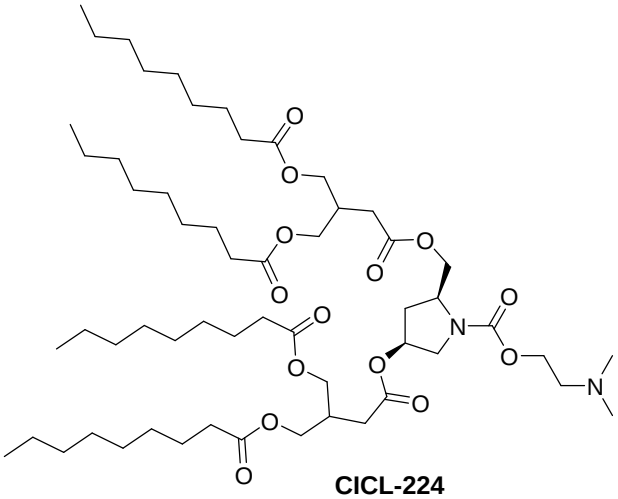
Modalidad 89. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-223:



CICL-223

, o un racemato u otra mezcla que comprende CICL-224.

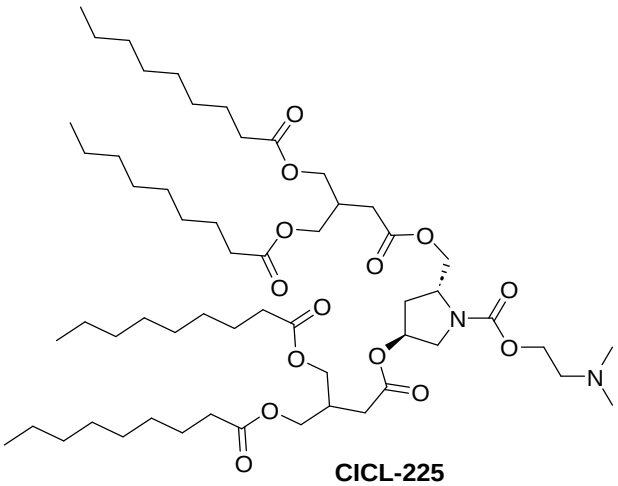
Modalidad 90. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-224:



CICL-224

.

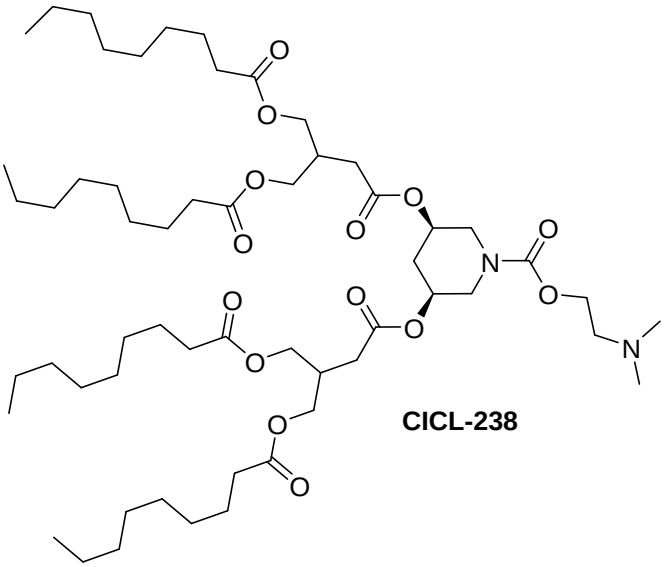
Modalidad 91. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-225:



CICL-225

.

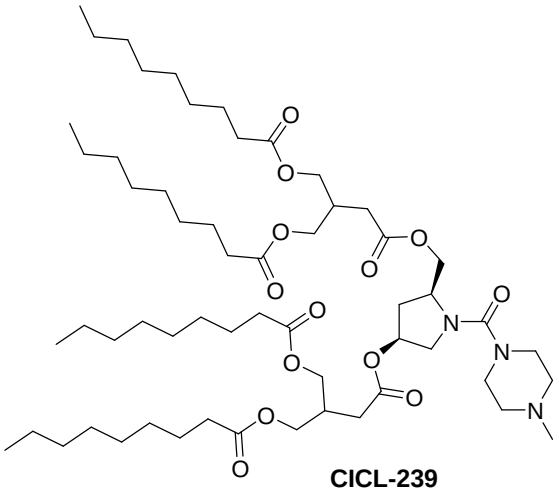
Modalidad 92. El lípido ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-238:



CICL-238

.

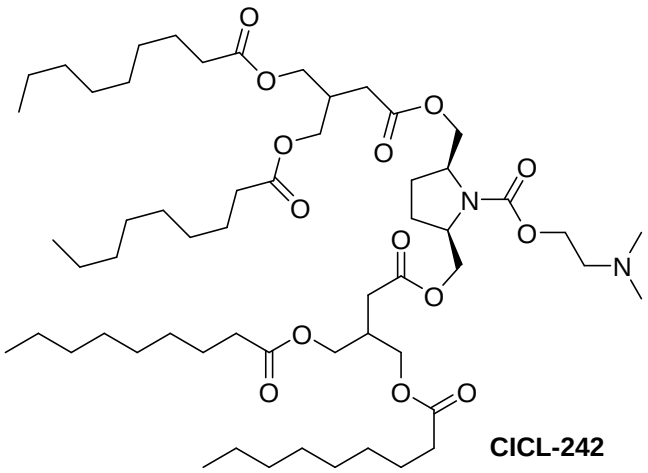
Modalidad 93. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-239:



CICL-239

, su enantiómero, o un racemato o cualquier otra mezcla de estos.

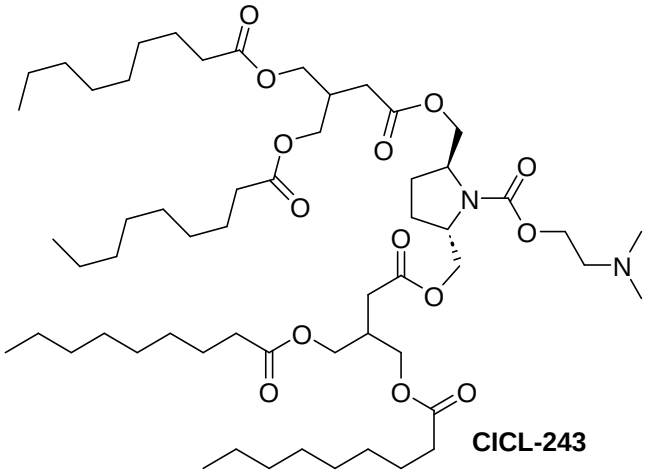
Modalidad 94. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-242:



CICL-242

.

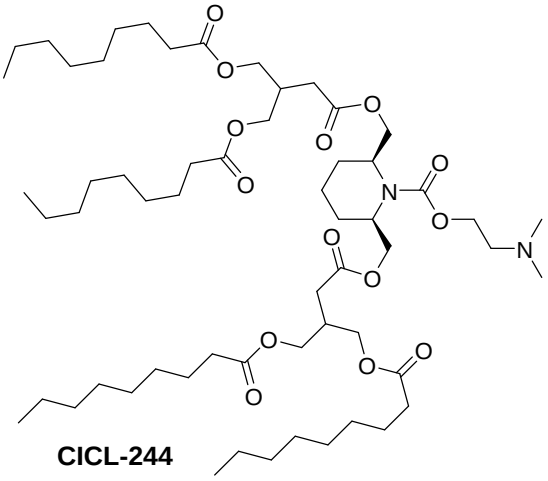
Modalidad 95. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-243:



CICL-243

, su enantiómero, o un racemato o cualquier otra mezcla de estos.

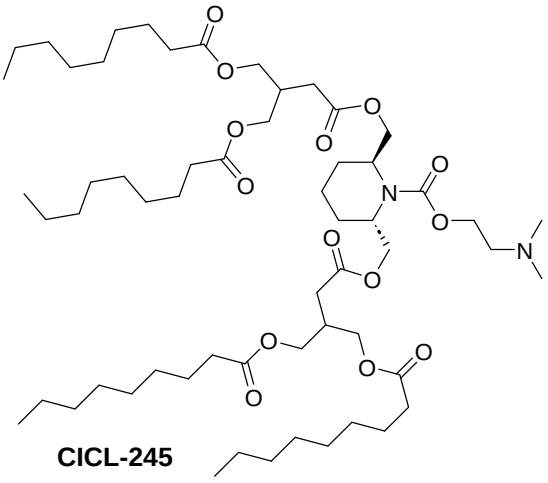
Modalidad 96. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-244:



CICL-244

.

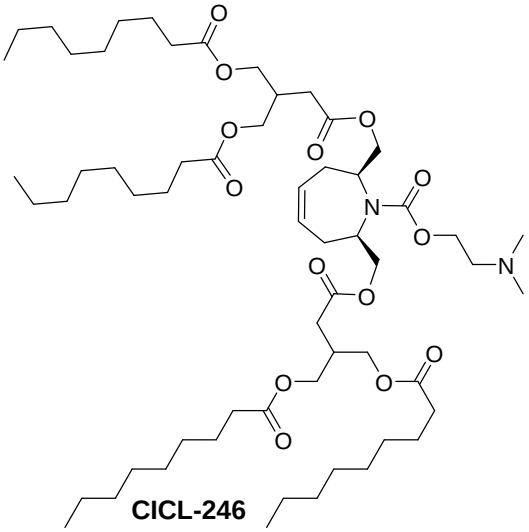
Modalidad 97. El lípido ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-245:



CICL-245

, un racemato, cualquier otra mezcla de enantiómeros, o cualquiera de los enantiómeros individuales.

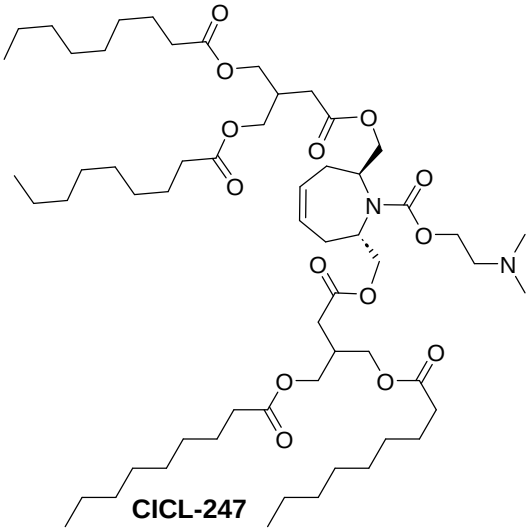
Modalidad 98. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-246:



CICL-246

.

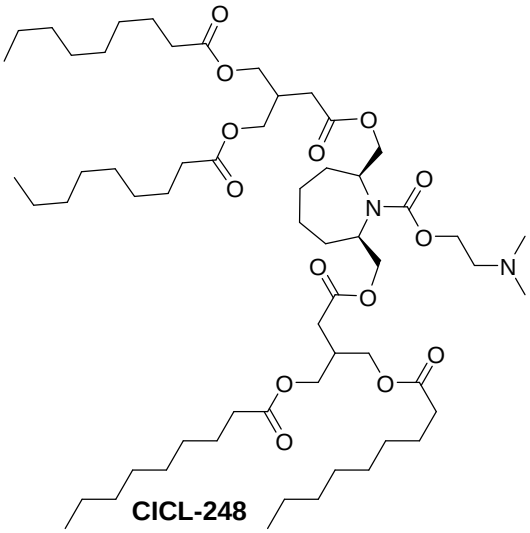
Modalidad 99. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-247:



CICL-247

, un racemato, cualquier otra mezcla de enantiómeros, o cualquiera de los enantiómeros individuales.

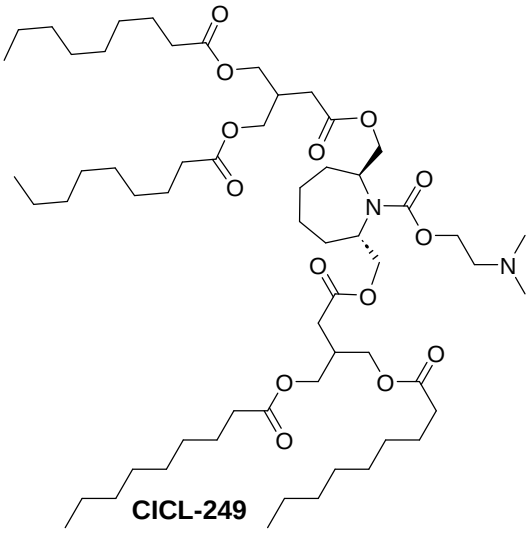
Modalidad 100. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-248:



CICL-248

.

Modalidad 101. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene la estructura CICL-249:



CICL-249

, un racemato, cualquier otra mezcla de enantiómeros, o cualquiera de los enantiómeros individuales.

Modalidad 102. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene una estructura como se muestra en la Tabla 4.

Modalidad 103. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene una estructura como se muestra en la Tabla 5.

Modalidad 104. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene una estructura como se muestra en la Tabla 6.

Modalidad 105. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene una estructura como se muestra en la Tabla 11.

Modalidad 106. El lípido catiónico ionizable de la modalidad 1 que tiene una estructura como se muestra en la Tabla 12.

Modalidad 107. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 106 que tiene una c-pKa (pKa calculada) en el rango de aproximadamente 6, 7, u 8 a aproximadamente 9, 10, u 11.

Modalidad 108. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 106 que tiene una c-pKa que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, aproximadamente 7 a aproximadamente 10, aproximadamente 8 a aproximadamente 10, aproximadamente 8 a aproximadamente 9, 6 a 10, 7 a 10, 8 a 10, u 8 a 9.

Modalidad 109. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 106 que tiene una c-pKa que varía de aproximadamente 8,2 a aproximadamente 9,0 o de 8,2 a 9,0.

Modalidad 110. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 106 que tiene una c-pKa que varía de aproximadamente 8,4 a aproximadamente 8,7 o de 8,4 a 8,7.

Modalidad 111. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 110 que tiene un cLogD que varía de aproximadamente 9 a aproximadamente 18, por ejemplo, que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 18, o aproximadamente 10 a aproximadamente 16, a aproximadamente 10 a aproximadamente 14, o de aproximadamente 11 a aproximadamente 18, o aproximadamente 11 a aproximadamente 15, o aproximadamente 11 a aproximadamente 14.

Modalidad 112. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 110 que tiene un cLogD que varía de 9 a 18, por ejemplo, que varía de 10 a 18, o 10 a 16, a 10 a 14, u 11 a 18, o 11 a 15, u 11 a 14.

Modalidad 113. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 110 que tiene un cLogD que varía de aproximadamente 13,6 a aproximadamente 14,4 o de 13,6 a 14,4.

Modalidad 114. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 110 que tiene una c-pKa que varía de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 o de 8 a 11 y un cLogD que varía de aproximadamente 9 a aproximadamente 18 o de 9 a 18.

Modalidad 115. El lípido catiónico ionizable de cualquiera de las modalidades 1 a 110 que tiene una c-pKa que varía de aproximadamente 8,4 a aproximadamente 8,7 o de 8,4 a 8,7 y cLogD que varía de aproximadamente 13,6 a aproximadamente 14,4 o de 13,6 a 14,4.

Modalidad 116. El lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1 a 110 que tiene un cLogD es aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, o aproximadamente 18.

Modalidad 117. Una nanopartícula lipídica (LNP) o nanopartícula lipídica dirigida (tLNP), que comprende al menos un lípido catiónico ionizable de una cualquiera de las modalidades 1-116.

Modalidad 118. La LNP o tLNP de la modalidad 117, que comprende además uno o más de un fosfolípido, un esterol, un colípido, un PEG-lípido, o combinaciones de estos.

Modalidad 119. La LNP o tLNP de la modalidad 118, que comprende un PEG-lípido no funcionalizado.

Modalidad 120. La LNP o tLNP de la modalidad 118 o la modalidad 119, que comprende un PEG-lípido funcionalizado.

Modalidad 121. La tLNP de la modalidad 120, en donde el PEG-lípido funcionalizado se ha conjugado con una entidad de unión.

Modalidad 122. La tLNP de la modalidad 120 o 121, en donde la entidad de unión comprende un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo.

Modalidad 123. La tLNP de la modalidad 120 o 121, en donde la entidad de unión comprende un antígeno, un dominio de unión a ligando de un receptor, o un ligando receptor.

Modalidad 124. La LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-123, que comprende al menos un fosfolípido, en donde el fosfolípido comprende dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), dimiristoilfosfatidil colina (DMPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidil glicerol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), o 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), o una combinación de estos.

Modalidad 125. La LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-124, que comprende al menos un esterol, en donde el esterol comprende colesterol, campesterol, sitosterol, estigmasterol, o combinaciones de estos.

Modalidad 126. La LNP o la tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-125, que comprende al menos un colípido, en donde el colípido comprende hemisuccinato de colesterol (CHEMS) o un grupo de cabeza de amonio cuaternario que contiene lípido.

Modalidad 127. La LNP o tLNP de la modalidad 126, en donde el lípido que contiene el grupo de cabeza de amonio cuaternario comprende 1,2-dioleoil-3-

trimetilamonio propano (DOTAP), N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), o 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol (DC-Chol), o combinaciones de estos.

Modalidad 128. La LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 119-127, que comprende al menos un PEG-lípido funcionalizado o no funcionalizado, en donde el PEG-lípido funcionalizado o no funcionalizado comprende un entidad PEG de peso molecular (MW) 1000-5000 Da.

Modalidad 129. La LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 119-128, que comprende al menos un PEG-lípido funcionalizado o no funcionalizado, en donde el PEG-lípido funcionalizado o no funcionalizado comprende ácidos grasos con una longitud de cadena de ácidos grasos de C_{14}-C_{18}.

Modalidad 130. La LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 119-129, que comprende al menos un PEG-lípido funcionalizado o no funcionalizado, en donde el PEG-lípido funcionalizado o no funcionalizado comprende DMG-PEG2000 (1,2-dimiristoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DPG-PEG2000 (1,2-dipalmitoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DSG-PEG2000 (1,2-diestearoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DOG-PEG2000 (1,2-dioleoil-glicero-3-metoxipolietilenglicol-2000), DMPE-PEG200 (1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DPPE-PEG2000 (1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-

metoxipolietilenglicol-2000), DSPE-PEG2000 (1,2-diestearoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), DOPE-PEG2000 (1,2-dioleoil-glicero-3-fosfoetanolamina-3-metoxipolietilenglicol-2000), o combinaciones de estos.

Modalidad 131. La LNP o la tLNP de una cualquiera de las modalidades 117-130, en donde el al menos un lípido catiónico ionizable está presente en una cantidad en el rango de 40 a 65 % en moles.

Modalidad 132. La LNP o la tLNP de una cualquiera de las modalidades 124-131, que comprende un fosfolípido en una cantidad en el rango de 7 a 30 % en moles.

Modalidad 133. La LNP o la tLNP de una cualquiera de las modalidades 125-132, que comprende un esterol en una cantidad en el rango de 20 a 45 % en moles.

Modalidad 134. La LNP o la tLNP de una cualquiera de las modalidades 126-133, que comprende al menos un colípido en una cantidad en el rango de 1 a 30 % en moles.

Modalidad 135. La LNP o la tLNP de una cualquiera de las modalidades 118, o 121-134, que comprende al menos un PEG-lípido no funcionalizado en una cantidad en el rango de 0,1 a 5 % en moles.

Modalidad 136. La LNP o la tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-135, que comprende al menos un PEG-lípido funcionalizado en una cantidad en el rango de 0,1 a 5 % en moles.

Modalidad 137. La LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 117-136, que comprende además un ácido nucleico de carga útil biológicamente activo.

Modalidad 138. La LNP o tLNP de la modalidad 137, en donde la relación en peso de lípido total a ácido nucleico es 10:1 a 50:1.

Modalidad 139. La LNP o tLNP de la modalidad 137, en donde la relación N/P es de 3 a 9.

Modalidad 140. La LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 137-139, en donde la carga útil de ácido nucleico es ARNm.

Modalidad 141. La tLNP de una cualquiera de las modalidades 120-122 o 124-140, en donde la entidad de unión es un anticuerpo completo y la relación de anticuerpo a ácido nucleico es de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 1,0 (p/p).

Modalidad 142. La tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-141, en donde la tLNP se dirige a una célula T.

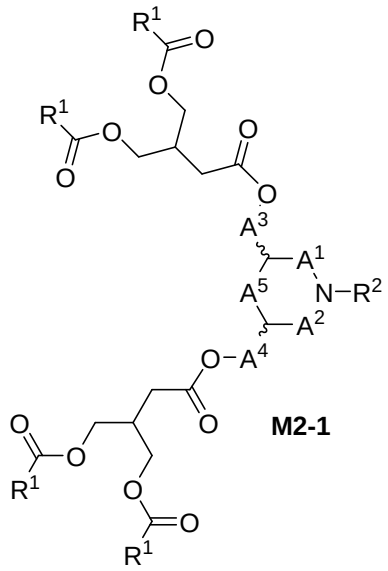
Modalidad 143. La tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-141, en donde la tLNP se dirige a una células T CD8+.

Modalidad 144. La tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-141, en donde la tLNP se dirige a una HSC.

Modalidad 145. La tLNP de una cualquiera de las modalidades 118-141, en donde la tLNP se dirige a una célula CD117+.

Modalidad 146. Un método para suministrar un ácido nucleico en una célula que comprende poner en contacto la célula con la LNP o tLNP de una cualquiera de las modalidades 137 a 145.

Modalidad 147. Un lípido que tiene la estructura de la Fórmula M2-1,



M2-1

en donde

cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11} o alquenilo C_7-C_{11};

R^2 es H de un grupo protector;

cada A^1, A^2, A^3, y A^4 se selecciona independientemente de $(CH_2)_0$ y $(CH_2)_1$, y

A^5 se selecciona de $(CH_2)_{0-4}$, CH=CH, y CH_2-CH=CH-CH_2; y los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

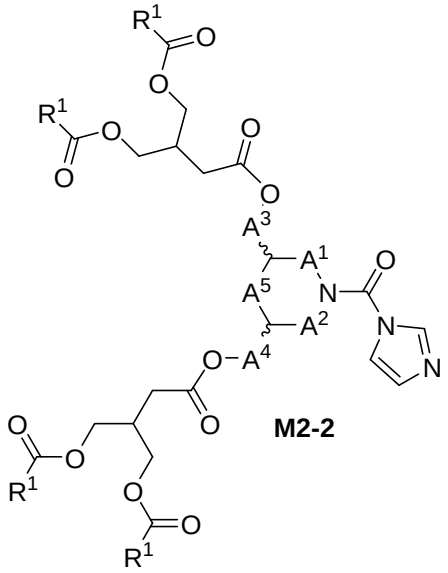
Modalidad 148. El lípido de la modalidad 147, en donde R^1 es como se describe en una cualquiera de las modalidades 14-25.

Modalidad 149. El lípido de las modalidades 147 o 148, en donde A^1, A^2, A^3, A^4, y A^5 - son como se describe en una cualquiera de las modalidades 2 a 13.

Modalidad 150. El lípido de una cualquiera de las modalidades 147 a 149, en donde R^2 es H.

Modalidad 151. El lípido de una cualquiera de las modalidades 147 a 150, en donde R^2 es un grupo protector (p. ej., t-butoxicarbonilo (BOC), bencioxicarbonilo (Cbz), o una entidad de trimetilsililetoxicarbonilo.

Modalidad 152. Un lípido que tiene la estructura de la fórmula M2-2,



M2-2

cada R^1 se selecciona independientemente de alquilo C_7-C_{11} o alquenilo C_7-C_{11};

cada A^1, A^2, A^3, y A^4 se selecciona independientemente de $(CH_2)_0$ y $(CH_2)_1$, y

A^5 se selecciona de $(CH_2)_{0-4}$, CH=CH, y CH_2-CH=CH-CH_2; y

los enlaces ondulados indican que puede suponerse cualquier estereoconfiguración relativa o absoluta del átomo del anillo correspondiente.

Modalidad 153. El lípido de la modalidad 152, en donde R^1 es como se describe en una cualquiera de las modalidades 14-25.

Modalidad 154. El lípido de las modalidades 152 o 153, en donde A^1, A^2, A^3, A^4, y A^5 son como se describe en una cualquiera de las modalidades 2-13.

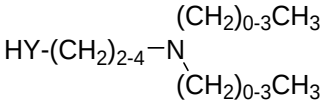
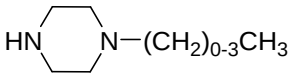
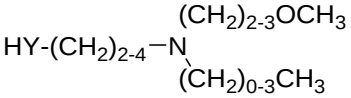
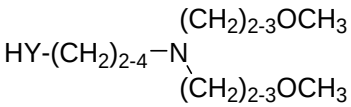
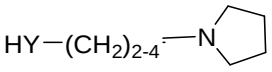
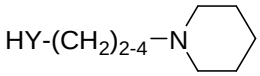
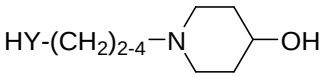
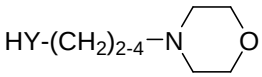
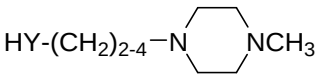
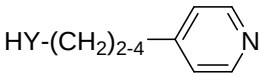
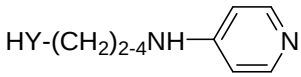
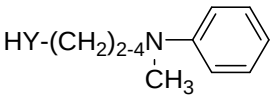
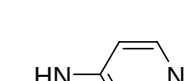
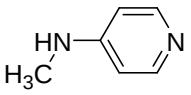
Modalidad 155. Un método de síntesis de un lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2, el método comprende:

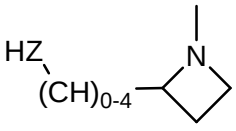
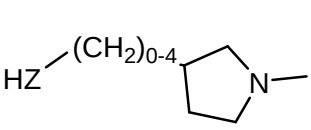
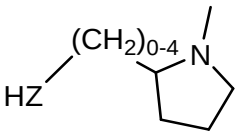
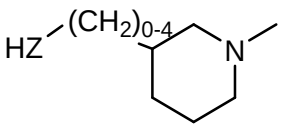
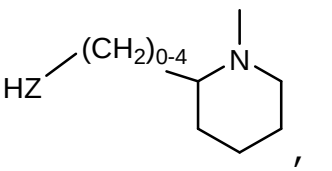
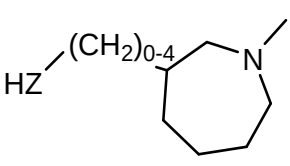
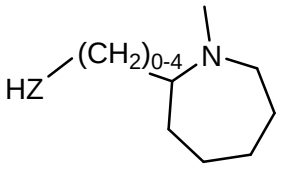
proporcionar un lípido de la Fórmula M2-1;

hacer reaccionar el lípido de la Fórmula M2-1 con carbonildiimidazol para proporcionar un lípido de la Fórmula M2-2; y

acoplar el lípido de la Fórmula M2-2 con H-X en la presencia de una base para proporcionar el lípido catiónico ionizable de la Fórmula M2;

en donde H-X se seleccionó del grupo que consiste en: de

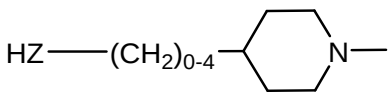

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

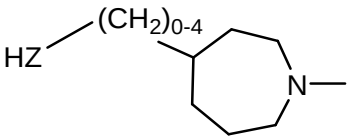
,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



, o 

, en donde Y es O, S, NH, de NCH_3 y Z es O, NH, NCH_3

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan por la presente como referencia en la misma medida como si cada publicación, patente y solicitud de patente individual estuviera indicada específica e individualmente para incorporarse como referencia.

Si bien algunas modalidades se han ilustrado y descrito en detalle en los dibujos anexos y la descripción anterior, tal ilustración y descripción deben considerarse ilustrativas y no restrictivas. Otras variaciones de las modalidades descritas pueden entenderse y efectuarse en la práctica de las reivindicaciones, a partir de un estudio de las figuras, la descripción y las reivindicaciones adjuntas. El mero hecho de que determinadas medidas o características se mencionen en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que la combinación de esas medidas o características no pueda usarse. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no debe interpretarse como limitante del alcance.

A_4 y A^4 se destinan a representar la misma entidad variable dondequiera que se use en la presente

ANEXO A

Anticuerpo	Antígeno/ Diana	Fuente(s) comercial(es) (si está(n) disponible(s))		Información de publicación
		Nombre del producto	Proveedor y número de catálogo	
1.5.3	CD20			Gazit-Bornstein et al., 2010, Invest. New Drugs 28: 561-574.
1C5	CD117	Anticuerpo CD117/c-Kit (1C5)	ThermoFisher, núm. MA5-15894	
1D1C2	IL-21Rα	IL21R Anticuerpos monoclonales (1D1C2)	ThermoFisher, núm. 66319-1-IG	
1F5	CD20	Anti-CD20 [1F5]	Absolute Antibody, núm. Ab01133	
1mono2A6 (T113)	CD2	Ellis Reinherz, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA		
1OLD2-4C1 (T112)	CD2	Ellis Reinherz, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA		US 2022/0073639 (sec. con núm. de ident.: 51 y 52)
11B1H1B4	CD150	Anticuerpo monoclonal CD150 (11B1H1B4), Invitrogen™	Fisher Scientific, núm. 16384654	
158-4D3	CD45	Anticuerpo monoclonal CD45 (158-4D3)	ThermoFisher, núm. MA1-7636	
190-2F2.5	CD45RO	Anticuerpo monoclonal CD45RO (marcador de células T) (190-2F2.5)	ThermoFisher, núm. 5788-MSM12-P0	
2.1.2	CD20	Anticuerpo recombinante anti-MS4A1 humano (2.1.2)	Creative Biolabs, núm. TAB-1645CL	US 2007/0014720
22HCLC	CD117	Antianticuerpo policlonal recombinante (22HCLC) Phospho-c-Kit (Tyr703), Invitrogen™	Fisher Scientific, núm. PI710762	
2A9	SSEA-3	Anticuerpo anti-SSEA-3/GalGb4 (2A9)	AntibodySystem, núm. RGK27501	
2A10D6	FCRL5	Anticuerpo monoclonal CD307e (FcRL5)	ThermoFisher, núm. MA5-48789	
2A10H7	FCRL5	Anticuerpo monoclonal CD307e (FcRL5)	ThermoFisher, núm. MA5-38483	

2A11D6	CD43	Anticuerpo monoclonal CD43 (2A11D6)	ThermoFisher, núm. 66224-1-IG	
2B8	CD117	Anticuerpo monoclonal (2B8) CD117 (c-Kit), eBioscience™	ThermoFisher, núm. 14-1171-82	
2B8/BM	CD117	Anticuerpo monoclonal (2B8/BM) CD117 (c-Kit)	ThermoFisher, núm. MA5-28270	
2D4-C9-F1	Sca-1	anti-Casp3-1 de ratón (138-157) (2D4-C9-F1)	Biocat, núm. 130-10623-20-RB	
2E10	CD34	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anti-CD34 [2E10]	Anticuerpo absoluto, núm. Ab01129	
		Anticuerpo recombinante anti-CD34 humano (clon 2E10)	Creative Biolabs, núm. FAMAB-1049CQ	
2ST8.5H7	CD8β	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo CD8 Beta | 2ST8.5H7	Bio-Rad, núm. MCA1723	
		Anticuerpo CD8 (2ST8.5H7)	Novus Biologicals, núm. NB100-65928	
307307	FCRL5	Anticuerpo monoclonal CD307e (FcRL5)	ThermoFisher, núm. MA5-24020	
3A1E	CD7	Anticuerpo monoclonal recombinante quimérico de conejo CD7 (3A1E)	TermoFisher, núm. MHCD0800	
3A1F	CD7	Anti-CD7 [3A1F]	Absolute Antibody, núm. Ab03052	
3B5	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		CD8 Anticuerpos monoclonales (3B5)	TermoFisher, núm. MHCD0800	
			Aviva Systems Biology, núm. OAAI00153	

3B8-2C2	CD48	Anticuerpo monoclonal CD48 (3B8-2C2)	ThermoFisher, núm. H00000962-M01	
3F7	CD73			Qiao et al., 2019, Int. J. Mol. Sci. 20 (5): 1057.
3F7C6	CD68	Anticuerpo monoclonal CD68, clon 3F7C6	Abnova, núm. MAB12263	
3F7D3	CD68	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD68, clon 3F7D3	Abnova, núm. MAB12260	
		Anticuerpo anti-CD68 [3F7D3]	Abcam, núm. ab201973	
3F8BiAb	GD2 CD3			Yankelevich et al., 2012, Pediatr. Blood Cancer 59(7): 1198–1205.
3G9-2D2	CD205			Cheong et al., 2010, Blood 116 (19): 3828–3838.
3H420	SSEA-3	Anticuerpo SSEA-3 (3H420)	Santa Cruz Biotechnology, núm. c-73066	
3T4-8B5 (T111)	CD2	Ellis Reinherz, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA		
4C5	Stro-4			Thomaidou and Patsavoudi, 1993, Neuroscience 53: 813–827.
4G5	FAP			WO 2021/061708; WO 2021/061778
4G7	CD19			Meeker et al., 1984, Hybridoma 3: 305-320.
4KB5	CD45RA	Anti-CD45RA anticuerpo [4KB5]	Abcam, núm. ab755	
47G4	CD19			US 2010/0104509
51.1	CD8	Anti-CD8 [51.1]	Absolute Antibody, núm. Ab04357	
53H8L29	CD117	Anticuerpo monoclonal de conejo recombinante Phospho-c-Kit (Tyr703) (53H8L29)	ThermoFisher, núm. 700135	
5B4G1	CD150	Anticuerpo monoclonal SLAM/CD150 (5B4G1)	ThermoFisher, núm. 60043-1-IG	

5B12	CD34	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anti-CD34 [5B120	Absolute Antibody, núm. Ab00422	
		Anticuerpo recombinante anti-CD34 humano (clon 5B12)	Creative Biolabs, núm. FAMAB-1047CQ	
5D7	CD5	CD5 Anticuerpos monoclonales (CD5-5D7), APC	ThermoFisher, núm. MHCD0505	
5E3E1	IL-15Rα	Anticuerpo monoclonal IL-15RA (5E3E1)	ThermoFisher, núm. MHCD0505	
5E10	CD90	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		CD90 (Thy-1) Anticuerpo monoclonal (eBio5E10 (5E10)), eBioscience™	ThermoFisher, núm. 14-0909-82	
		Anti-anticuerpo CD90 humano, Clon 5E10	Stemcell Technologies, núm. 60045	
509F6	FCRL5	CD307e (FcRL5) Anticuerpos monoclonales (509F6), eFluor™ 660, eBioscience™	ThermoFisher, núm. 50-3078-42	
6D276	CD29 CD49b	Anticuerpo monoclonal de ratón complejo anti-CD49b, CD29 [clon: 6D276]	VWR, núm. USBIC2404-07W	
6D9	GPRC5D	Anti-GPRC5D (6D9) h(41BB-CD3ζ) CAR, pCDCAR1	Creative Biolabs, núm. CAR-LY1362	
6F2	CD117	Anticuerpo monoclonal KIT (6F2)	ThermoFisher, núm. H00003815-M02	
7D11	FCRL5	Anti-FcRH5 (clon 7D11)-SMCC-DM1 ADC	Creative Biolabs, núm. ADC-161CL	
7E1	CD48	Anticuerpo monoclonal recombinante de conejo CD48 (7E1)	ThermoFisher, núm. MA5-38301	
8A7	SSEA-3	Anticuerpo anti-SSEA-3/GalGb4 (8A7)	AntibodySystem, núm. RGK27504	
8D7	CD117	Anticuerpo monoclonal c-Kit (8D7)	ThermoFisher, núm. MA5-15327	

9.1	CD2	Peter Linsley, Benaroya Research Institute, Seattle, WA		Connelly et al., 1998, Int. Immunol., 10 (12): 1863–1872.
9.6	CD2	Peter Linsley, Benaroya Research Institute, Seattle, WA		Connelly et al., 1998, Int. Immunol., 10 (12): 1863–1872.
9C5	CD34			US 8.399.249
9D1	CD150	Anticuerpo monoclonal CD150 (9D1), PE, eBioScience™	ThermoFisher, núm. 12-1501-82	
10A8	FCRL5	ADC anti-FcRL5 (10A8)-SPDB-DM4	Creative Biolabs, núm. ADC-117LCT	
12G10	CD29	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD29 (Marcador de células madre) (12G10)	ThermoFisher, núm. 3688-MSM2-P0	
		anticuerpo CD29 | 12G10	Bio-Rad, núm. MCA2028	
13G9	FCRL5	Anticuerpo recombinante anti-FCRL5 de ratón	Creative Biolabs, núm. MOB-057CQ	
17D8	CD8	Anticuerpo monoclonal CD8 (17D8)	ThermoFisher, núm. MA1-12027	
18A5	IL-21Rα	Anticuerpo recombinante anti-IL21R humano	Creative Biolabs, núm. HPAB-0668-CN	
84-3C1	CD43	Anticuerpo monoclonal CD43 (PE, eBioscience™)	ThermoFisher, núm. 12-0439-42	
104D2	CD117	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo CD117 antihumano purificado (c-kit)	BioLegend, núm. 313201	
		Anticuerpo CD117 antihumano (c-Kit), Clon 104D2	Stemcell Tech-nologies, núm. 60087	
		CD117 ANTIHUMANO DE RATÓN	Bio-Rad, núm. MCA1841	
		c-Kit anticuerpo monoclonal (104D2)	ThermoFisher, núm. MA1-10072	

131-I-apamistamab	CD45			Seropian et al., 2023, Blood 142 (Supplement 1): 2159.
131-I-omburtamab (131-I-8H9)	B7H3			Kramer et al., 2022, J. Hematol. Oncol. 15: 165.
177-Lu-DTPA-omburtamab	B7H3			Khatua et al., 2021, Ann. Oncol. 32 (Suppl. 5): S528-S529.
156-4H9	CD48	Anticuerpo monoclonal CD48 (eBio156-4H9 (156-4H9)), eBioscience™	ThermoFisher, núm. 14-0489-82	
293C3	CD133	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-CD133 [293C3]	Abcam, núm. ab252553	
		Anticuerpo CD133/2, antihumano, puro	Miltenyi Biotec, núm. 130-090-851	
341	CD48	Anticuerpo monoclonal recombinantes de conejo CD48 (341)	ThermoFisher, núm. MA5-29675	
514H12	CD68	Anticuerpos monoclonales CD68 (514H12)	ThermoFisher, núm. MA1-80133	
1279B	SUSD2	Anticuerpo SUSD2 (1279B)	Novus Biologicals, núm. MAB90564	
2639B	IL-15Rα	Anticuerpo alfa IL-15R humano	R&D Systems, núm. MAB10900	
A7R34	CD127	Anticuerpo monoclonal CD127 (A7R34), eBioScience™	ThermoFisher, núm. 14-1271-82	
A12 (7D4)	CD150	Anticuerpo monoclonal CD150 (A12 (7D4)), PE, eBioScience™	ThermoFisher, núm. 12-1509-42	
AB75	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpos monoclonales CD2 (AB75)	ThermoFisher, núm. MA5-11373	
		Anticuerpo monoclonal anti-CD2 de ratón [clon: AB75]	Avantor (VWR), núm. GTX75367 (89365-772)	
Ab85	CD117			WO 2019/084053

ABL501	LAG-3 PD-L1			Park et al., 2021, Cancer Res. 81 (13_Supplement): 1633.
ABM53F5	CD68	Anticuerpo monoclonal a CD68 (Clon: ABM53F5)	Abeomics, núm. 10-4171	
ABX-MA1	CD146	Anti-CD146 [ABX-MA1 (3.19.1)]	Absolute Antibody, núm. Ab02820	
AC133	CD133	Anticuerpo CD133/1, antihumano, puro	Miltenyi Biotec, núm. 130-090-422	
acazicolcept	CD28	Acazicolcept	MedChemExpress, núm. HY-P99420	
ACK2	CD117	Anticuerpo monoclonal CD117 (C-Kit) (ACK2), APC, eBioScience™	ThermoFisher, núm. 17-1172-82	
ACK4	CD117	Anticuerpo monoclonal c-Kit (ACK4)	ThermoFisher, núm. MA1-70079	
Adcitmer®	CD56			Esnault et al., 2022, Br. J. Dermatol. 186 (2): 295-306.
ADG106	CD137			Ma et al., 2024, Cell Rep. Med. 5 (2): 101414.
ADG116	CTLA-4			Park et al., 2022, J. Immunother. Cancer 10 (Suppl 2): A1–A1603.
ADG126	CTLA-4			Richardson et al., 2022, Ann. Oncol. 33 (suppl 7): S882-S883.
ADU-1604	CTLA-4			De Velasco Oria de Rueda et al., 2023, J. Immunother. Cancer 11 (Suppl 1): A1–A1731.
AFM13	CD16a	Anti-FcgR3a / CD16a (AFM13)	Selleckchem, núm. A2750	
AGEN1181	CTLA-4			El-Khoueiry, et al., 2021, J. Immunother. Cancer 9 (Suppl 2): A1–A1054.
AK112	PD-1 VEGF	Ivonescimab de grado de investigación	AntibodySystem, núm. DHD12605	

AK119	CD73	Dresbuxelimab de grado de investigación	Cell Sciences, núm. DHD46603A	
AK129	LAG-3			Huang et al., 2022, Cancer Res. 82 (12_Supplement): 5520.
alefacept	CD2	Alefacept	MedChemExpress, núm. HY-P99429	
Anticuerpo de detección anti-hIgG Fc AlexaFluor647	IgG	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		IgG antihumana de cabra Alexa Fluor® 647 AffiniPure™, específico de fragmento Fcγ	Jackson ImmunoResearch Laboratories, núm. 109-605-098	
		Anticuerpo conjugado con Alexa Fluor® 647 de IgG humana	R&D Systems, núm. FAB110R	
alirocumab	PCSK9	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Alirocumab	MedChemExpress, núm. HY-P9928	
		Biosimilar de alirocumab – mAb anti-PCSK9	Proteogenix, núm. PX-TA1287	
		Alirocumab (anti-PCSK9)	SelleckChem, núm. A2047	
alnuctumab	BCMA			US 10.683.369
AMG-172	CD70			Massard et al., 2019, Cancer Chemother. Pharmacol. 83(6):1057-63.
AMG 224	BCMA			US 9.243.058
AMG 228	GITR			Tran et al., 2017, J. Clin. Oncol. 35 (15_suppl): 2521.
AMG 404	PD-1	Zeluvalimab	MedChemExpress, núm. HY-P99957	
AMM22070N	Sca-1	mAb de caspasa-3 de ratón	Leading Biology, núm. AMM22070N	
CAR anti-BCMA	BCMA			US 2020/0246381; US 2020/0339699

Conjugado de anticuerpo FITC anti-CD3	CD3	Anti-CD3ε humano de ratón FITC BD Pharmingen™	BD Biosciences, núm. 556611	
Anticuerpo conjugado anti-CD3 SP34-2 Alexa Fluor 700	CD3	CD3 antihumano de ratón BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 700	BD Biosciences, núm. 557917	
Anti-CD3 V450	CD3	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		CD3 antihumano de ratón BD Horizon™ V450	BD Biosciences, núm. 560366	
		violetFluor™ 450 CD3 antihumano (UCHT1)	Cytek, núm. 75-0038-T025	
anti-CD4 (PerCP-Cy5.5)	CD4	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Antihumano CD4 de ratón BD Pharmingen™ PerCP-Cy™5.5	BD Biosciences, núm. 560650	
		Anticuerpo monoclonal CD4 (RM4-5), PerCP-Cyanine5.5, eBioscience™	ThermoFisher, núm. 45-0042-82	
Anticuerpo conjugado anti-CD4 BV 421	CD4	Anticuerpo anti-CD4 humano Brilliant Violet 421™	BioLegend, núm. 317434	
Anticuerpo conjugado anti-CD4 OKT4 BV650	CD4	Anticuerpo anti-CD4 humano Brilliant Violet 650™	BioLegend, núm. 317436	
anti-CD8a (APC-H7)	CD8α	Antihumano CD8 de ratón BD Pharmingen™ APC-H7	BD Biosciences, núm. 560179	
anticuerpos anticlaudina 18.2	CLDN18.2			WO 2013/167259, WO 2021/032157, WO 2021/254481, WO 2022/007808, WO 2021/008463, WO 2022/111616, WO 2018/006882, WO 2020/147321, WO 2019/219089, US 2020/0040101, WO 2020/025792, WO 2020/139956, WO 2020/135201, US 2024/0228610, WO 2021/218874, WO 2021/027850, WO 2021/129765, WO 2022/068854, WO 2021/111003

CAR anti-FAP	FAP			WO 2021/061778
CAR y ADC anti-FCRL5	FCRL5			WO 2016/090337, WO 2017/096120, WO 2022/263855, WO 2024/047558, Elkins et al., Mol. Cancer Ther. 11(10): 2222-2232 (2012)
Anticuerpo anti-G4S PE	G4S	Enlazador G4S (E7O2V) mAb de conejo (conjugado PE)	Cell Signaling Technology, núm. 38907	
Anticuerpo secundario anti-Fc humano (conjugado con fluoróforo BV421)	Fc	Anticuerpo Fc de IgG antihumana Brilliant Violet 421™	BioLegend, núm. 410704	
Anticuerpo PE de enlazador anti-scFv	Enlazador scFv	Cocktail anti-scFv de conejo MonoRab™ [PE]	GenScript, núm. A02285	
anticuerpo anti-siglec-15	Siglec-15			US 8.575.531
Anticuerpo PE de enlazador anti-Whitlow		Enlazador Whitlow/218 (E3U7Q) mAb de conejo (Conjugado PE)	Cell Signaling Technology, núm. 62405	
ANV419	CD122			Joerger et al., 2023, J. Immunother. Cancer 11 (11): e007784.
ARC0672	CD127	Anticuerpo monoclonal recombinante de conejo CD127 (ARC0672)	ThermoFisher, núm. MA5-35152	
ARX305	CD70			Skidmore et al., 2023, Ann. Oncol. 34 (Suppl. 2): S208.
ASD141	CD11b			Chang et al., 2021, J. Immunother. Cancer 9 (Suppl. 2): A1-A1054.
ASKB589	CLDN18.2			Zhang et al., 2023, J. Clin. Oncol. 41 (4 suppl.), 397.
ASP1951	GITR			Seidel-Dugan et al., 2018, J. Immunother. Cancer 6 (115).
AT002	CD166	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		

		Anticuerpo anti-CD166 recombinante	Antibodies.com, núm. A323924	
		CD166/ALCAM antihumano de grado de investigación	AntibodySystem, núm. DHG64002	
atibuclimab	CD14	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Atibuclimab	MedChemExpress, núm. HY-P99008	
		Atibuclimab (Anti-CD14)	SelleckChem, núm. A2566	
ATL301	GD2	Anti-Gangliosida GD2 (ATL301) de grado de investigación	AntibodySystem, núm. DHK07801	
ATOR-1015	OX40			Veitonmäki et al., 2018, Cancer Res. 78 (13_Supplement): 3623.
ATOR-1144	GITR			Fritzell et al., 2019, Cancer Res. 79 (13_Supplement): 4077.
axicabtagene ciloleucel	CD19			Neelapu et al., 2017, *N. Engl. J. Med.* 377: 2531-44.
AZD0901	CLDN18.2			Raufi et al., 2024, J. Clin. Oncol. 42 (16 Suppl.), TPS3163.
AZD7789	TIM-3			Clancy-Thompson et al., J. Immunother. Cancer 10 (Suppl. 2): A1-A1603.
AZN-L50	CD166	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		CD166, Humano, mAB AZN-L50	Hycult Biotech, núm. HM2002	
		Anticuerpo CD166 [AZN-L50]	GeneTex, núm. GTX18159	
B4	CD19			Freedman et al., 1987, Blood 70: 418-427.

B4 HB12b	CD19			Kansas & Tedder, 1991, J. Immunol. 147: 4094-4102; Yazawa et al., 2005, PNAS 102: 15178-15183; Herbst et al., 2010, J. Pharmacol. Exp. Ther. 335: 213-222.
B7V3V2	CD200	Anticuerpo CD200 antihumano (B7V3V2)	AntibodySystem, núm. FHE30310	
B43	CD19			Bejcek et al., 1995, Cancer Res. 55 (11):2346-2351.
balstilimab	PD-1			Moore et al., 2018, J. Clin. Oncol. 36 (15 suppl.): 3086.
barzolvolimab	CD117	CDX 0159	MedChemExpress, núm. HY-P99462	
basiliximab (STI-003)	CD25	Anticuerpo monoclonal humano recombinante de basiliximab	ThermoFisher, núm. MA5-41768	Onrust et al., 1999, Drugs 57, 207-213.
BAT6026	OX40			Liang et al., 2023, Front. Oncol., 13: 1211759.
bavunalimab	LAG-3	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Bavunalimab	MedChemExpress, núm. HY-P99354	
		Bavunalimab	ChemScene, núm. CS-0621488	
BB2121	BCMA			WO 2012/163805
BC8-B10	CD45			Li et al., 2018, PLoS One 13(10): e0205135.
BCD-145	CTLA-4	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Nurulimab	MedChemExpress, núm. HY-P99760	
		Nurulimab	AbMole, núm. M24967	

BCD-245	GD2			Clinical Trial ID: NCT05782959
belantamab	BCMA			US 9.273.141
BGB-A445	OX40			Jiang et al., 2023, Front. Med. 17(6): 1170-1185.
bleselumab	CD40	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Bleselumab	MedChemExpress, núm. HY-P99257	
		Bleselumab	SelleckChem, núm. A2634	
BL-178-12C7	CD45	Anticuerpo anti-CD45	Abcam, núm. ab243869	
BLY3	CD19			Bejcek et al., 1995, Cancer Res. 55 (11): 2346-2351.
BMS-986156	GITR			Siu et al., 2017, J. Clin. Oncol. 35 (15_suppl): 104.
BMS-986178	OX40			Gutierrez et al., 2021, Clin. Cáncer Res. 27 (2): 460-472.
BMS-986179	CD73			Siu et al., 2018, Cancer Res. 78(13_Suppl): CT180.
BMS-986218	CTLA-4			Engelhardt et al., 2020, Cancer Res. 80 (16_Supplement): 4552.
BMS-986249	CTLA-4			Gutierrez et al., 2020, J. Clin. Oncol. 38 (15_suppl): 3058.
BMS-986258	TIM-3			Clinical Trial ID: NCT03446040
BMS-986393	GPRC5D			Bal et al. (2023). Blood 142 (Suppl. 1): 219.
bococizumab	PCSK9	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Bococizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99187	
		Bococizumab (Anti-PCSK9)	SelleckChem, núm. A2788	

		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de bococizumab	ThermoFisher, núm. MA5-42019	
bococizumab NEI	PCSK9			Dyson et al. (2020). MAbs 12: 1829335.
botensilimab	CTLA-4			Wilky et al., 2022, J. Immunother. Cancer, 10 (Suppl. 2): A1-A1603.
BP-02489	CD10	núm. de acceso. NITE BP-02489 (JP)		WO 2018/235247
brexucabtagene autoleucel	CD19			Anderson et al., 2022, Ann. Pharmacother. 56(5): 609-619.
briquilimab (JSP-191)	CD117	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Briquilimab	MedChemExpress, núm. HY-P99488	
		Briquilimab de grado de investigación	Cell Sciences, núm. DHC83102A	
BTI-322	CD2	Anticuerpo recombinante anti-CD2 humano (BTI-322)	Creative Biolabs, núm. TAB-110CL	
BU12	CD19			Callard et al., 1992, J. Immunology, 148(10): 2983-2987
Bu88	CD8	Anticuerpo Alfa anti-CD8	Abcam, núm. ab316355	
budigalimab	PD-1	Budigalimab	MedChemExpress, núm. HY-P99489	
C2e10	CD34	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo recombinante anti-CD34 de ratón (clon C2e10); Fragmento scFv	Creative Biolabs, núm. HPAB-1044-FY-F(E)	
		Anti-CD34 [2E10], IgG1 humana, Kappa	Anticuerpo absoluto, núm. Ab01129	
C5B12	CD34	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		

		Anticuerpo recombinante anti-CD34 humano (clon C5B12); Fragmento Fab	Creative Biolabs, núm. HPAB-1043-FY-S(P)	
		Anti-CD34 [5B12], IgG1 humana, Kappa	Absolute Antibody, núm. Ab00422	
C8/144B	CD8α	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal alfa CD8 (C8/144B)	ThermoFisher, núm. MA5-13473	
		Anticuerpo alfa anti-CD8 [C8/144B]	Abcam, núm. ab17147	
C11D5.3	BCMA			WO 2010/104949
C12A3.2				
C363.16A	CD45RB	Anticuerpo monoclonal CD45RB (PE, eBioscience™)	ThermoFisher, núm. 12-0455-82	
cadonilimab	PD-1			Pang et al., 2023, MAbs 15(1): 2180794.
camidanlumab tesirina	CD25			Puzanov et al., 2020, Ann. Oncol. 31(suppl. 4), S710-S711.
camrelizumab	PD-1	Camrelizumab (anti-PD-1)	SelleckChem, núm. A2016	
carotuximab	CD105	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Carotuximab	MedChemExpress, núm. HY-P99494	
		Carotuximab (anti-endoglina / CD105)	SelleckChem, núm. A2514	
CBXS-1620	SUSD2	Anticuerpo recombinante de conejo anti-SUSD2 (CBXS-1620)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-S4469-CQ	
CBXS-1671	SUSD2	Anticuerpo recombinante de conejo anti-SUSD2 (CBXS-1671)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-S0094-CQ	
CBXS-1989	SUSD2	Anticuerpo recombinante de ratón anti-SUSD2 (CBXS-1989)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-S4758-CQ	

CBXS-1990	SUSD2	Anticuerpo recombinante anti-SUSD2 de ratón (CBXS-1990)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-S0156-CQ	
CBXS-3571	SUSD2	Anticuerpo recombinante anti-SUSD2 humano (CBXS-3571)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-S0386-CQ	
CBXS-3676	SUSD2	Anticuerpo recombinante anti-SUSD2 de conejo (CBXS-3676)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-S0214-CQ	
CBYY-I0413	IL-12R	Anticuerpo recombinante anti-IL12RB2 de ratón (CBYY-I0683)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-I1506-YY	
C-CAR066 Leu16 y 2.1.2	CD20			Liang et al., 2021, J. Clin. Oncol. 39(15) suppl:2508)
CD58 (LFA-3)	CD2	CD58/LFA-3 recombinante humano Proteína His-tag	R&D Systems, núm. 1689-CD	
CDLA68-1	CD68	Anticuerpo CD68 [clon CDLA68-1]	NSJ Bioreagents, núm. V7045	
CDX-0158	CD117	Anticuerpo de referencia Anti-SCFR / c-Kit / CD117 (CDX-0158)	BiOrbyt, núm. orb1817461	
cedelizumab	CD4	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Cedelizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99495	
		Cedelizumab (CD4)	ProSci, núm. 10-093	
cemiplimab	PD-1			Burova et al., 2017, Mol. Cancer Ther. 16 (5), 861-870.
cetrelimab	PD-1	Cetrelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99499	
cetuximab	EGFR	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo EGF R | C225	BioRad, núm. MCA6102	
		Cetuximab	MedChemExpress, núm. HY-P9905	

		Cetuximab (anti-EGFR)	SelleckChem, núm. A2000	
cevostamab	CD3	Cevostamab	MedChemExpress, núm. HY-P99601	
ch28/11	SSEA-4	Anticuerpo recombinante anti-SSEA-4 quimérico (ratón/humano) (clon ch28/11)	Creative Biolabs, núm. PABJ-0121	
cifurtilimab	CD40	Cifurtilimab; SEA-CD40	MedChemExpress, núm. HY-P99603	
ciltacabtagene autoleucel	BCMA			Berdeja et al., 2021, Lancet 398 (10297): 314-324.
CK6	CD117			Lebron et al., 2014, Cancer Biol. Ther. 15 (9): 1208–1218.
CL1659	CD117	Anticuerpo CD117/c-kit (CL1657)	Novus Biologicals, núm. NBP2-52975	
CLB-CD19	CD19			De Rie, 1989, Cell. Immunol. 118:368-381
clenoliximab	CD4	Clenoliximab	Novus Biologicals, núm. NBP2-52681H	
Cmab-43	CD133	Anticuerpo recombinante anti-CD133	Abcam, núm. AB264538	
CO.44B8	CD43	Anticuerpo monoclonal CD43 (CO.44B8)	ThermoFisher, núm. MA5-28371	
cobolimab	TIM-3	Cobolimab	MedChemExpress, núm. HY-P99827	
CPP32 4-1-18	Sca-1	Anticuerpo monoclonal de Caspasa 3 (CPP32 4-1-18)	ThermoFisher, MA1-16843	
crefmirlimab	CD8α	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		Farwell et al., J Nucl Med 63(5):720-726 (2021); US 10.414.820
		Crefmirlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99834	
		Biosimilar de crefmirlimab – mAb anti-CD8A - Grado de investigación	ProteGenix, núm. PX-TA1828-100	

CS1002	CTLA-4			Bishnoi et al., 2021, Ann. Oncol. 32, (Suppl. 5): S840.
CT041	CLDN18.2			Qi et al., 2022, Nat. Med. 28, 1189-1198.
CT103A (CAR0085)	BCMA			US 11.026.975
cudarolimab	OX40	Cudarolimab	MedChemExpress, núm. HY-P99836	Kuang, Z et al. Cancer Immunol Immunother. 2020 Jun;69(6):939-950.
cusatuzumab	CD70	Cusatuzumab	MedChemExpress, núm. HY-P99014	Riether, C et al. Nat Med. 2020 Sep;26(9):1459-1467.
CYT-91000	CD25	CD25/IL2RA antihumano de grado de investigación (CYT-91000)	AntibodySystem, núm. DHB95805	
dacetuzumab	CD40	Dacetuzumab	MedChemExpress, núm. HY-P99015	Hussein, M et al. Haematologica. 2010 May;95(5):845-8.
daclizumab	CD25	Daclizumab	MedChemExpress, núm. HY-108738	Cohan, S. L. et al. Biomedicines. 2019 Mar 11;7(1):18.
daratumumab	CD38	Daratumumab (anti-CD38)	SelleckChem, núm. A2027	
davoceticept	CD28	Davoceticept	MedChemExpress, núm. HY-P99844	Patnaik, A. et al. *JCO* 40, TPS2683-TPS2683(2022).
DF-T1	CD43	Antianticuerpo CD43 (DF-T1)	Santa Cruz Biotechnology, núm. sc-6256	
dinutuximab	GD2	Dinutuximab	ThermoFisher, núm. MA5-42000	Mohd, A.B. et al. J Res Med Sci. 2023 Sep 29;28:71.
dostarlimab	PD-1	Dostarlimab	SelleckChem, núm. A2835	Mirza, M.R. et al. N Engl J Med. 2023 Jun 8;388(23):2145-2158.
DS-7300A	B7H3			Yamato et al., 2022, Mol. Cancer Ther. 21(4): 635–646.
EasySep™		Kit de aislamiento de células T humanas EasySep™	Stemcell Technologies, núm. 100-0695	

efungumab	Stro-4	Efungumab	MedChemExpress, núm. HY-P9962	Karwa, R. et al. Ann Pharmacother. 2009 Nov;43(11):1818-23.
ektomab	GD2			Ruf, P. et al. J Transl Med. 2012 Nov 7;10:219.
Kit TNF-α humano Deluxe Set ELISA MAX™	TNF-α	Kit TNF-α humano Deluxe Set ELISA MAX™	BioLegend, núm. 430204	
elranatamab	CD3	Elranatamab de grado de investigación	AntibodySystem, núm. DHF92406	Lesokhin, A. M. et al. Nat Med. 2023 Sep;29(9):2259-2267.
EMB-02	LAG-3 PD-1			Day et al., 2023, Ann. Oncol. 34 (Suppl. 2): S625.
EMB-06	BCMA			US 2023/0002489
EMB-09	OX40 PD-L1			Li et al., 2023, Antib. Ther. 6 (Suppl 1): tbad014.008.
EMD 273063	GD2	Anti-GD2(EMD 273063)	SelleckChem, núm. A2916	
encelimab	LAG-3	Encelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99922	Perez-Santos, M. et al. Expert Opin Drug Discov. 2022 dic;17(12):1341-1355.
enoblituzumab	B7H3	Anticuerpo recombinante anti-CD276 humano	Creative Biolabs, núm. TAB-424CQ	
EOS-448	TIGIT			Cuende et al., 2022, Cancer Res. 82 (12_Supplement): LB189.
EP322Y	CD45	Anti-CD45 anticuerpo [EP322Y]	Abcam, núm. ab40763	
EPR8913(2)	SUSD2	Anticuerpo anti-SUSD2 [EPR8913(2)]	Abcam, núm. ab182147	
EPR20545	CD68	Anticuerpo anti-CD68 [EPR20545]	Abcam, núm. ab213363	
EPR26538-16	CD8β	Anticuerpo anti-CD8 beta recombinante [EPR26538-16]	Abcam, núm. ab300067	
EPR26948-19	FCRL5	Antianticuerpo anti-FCRL5 [EPR26948-19] - Libre de BSA y azida (Detector)	Abcam, núm. ab307569	

EPR26948-67	FCRL5	Antianticuerpo anti-FCRL5 [EPR26948-67] - Libre de BSA y azida (Captura)	Abcam, núm. ab307568	
EPR27365-87		Anticuerpo anti-FCRL5 [EPR27365-87]	Abcam, núm. ab307730	
epratuzumab	CD22	Anticuerpo recombinante anti-CD22 humano	Creative Biolabs, núm. TAB-176	
ET200-31	FCRL5			US 10.913.796
ET200-39				
ET200-69				
ET200-104				
ET200-105				
ET200-109				
ET200-117				
etigilimab	TIGIT			Mettu et al., 2022, Clin. Cancer. Res. 28(5): 882-892.
ezabenlimab	PD-1	Ezabenlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99610	Zettl, M. et al. Oncoimmunology. 2022 Jun 16;11(1):2080328.
F10-89-4	CD45	Anticuerpo anti-CD45 [F10-89-4] - Marcador de células madre hematopoyéticas	Abcam, núm. ab30470	
F119	FCRL5			Ise et al. (2005) Clin. Cáncer Res. 11(1): 87-96.
F25	FCRL5	Anticuerpo anti-FcRH5, clon F25	Millipore Sigma, núm. MABF2103	
F26	FCRL5			Franco et al. (2013) J. Immunol. 190(11): 5739-5746.
favezelimab	LAG-3	Favezelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99613	Gareth, P. et al. Cancer Res1 July 2019; 79 (13_Supplement): CT106.

felzartamab	CD38	Felzartamab	MedChemExpress, núm. HY-P99616	
FHVH33	BCMA			WO 2019/006072
fianlimab	LAG-3	Fianlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99617	Omid, H. et al. *JCO* 39, 9515-9515 (2021).
FMC63	CD19			Nicholson et al., 1997, Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165; WO 2018/213337, WO 2015/187528
forimtamig	GPRC5D			Harrison et al. (2023). Clin. Lymphoma Myeloma Leuk. 23 (Suppl. 2): S3-4.
FR4D11	CD10	Anticuerpo anti-CD10 humano, Clon FR4D11	Stemcell Technologies, núm. 60149	
FR104CD	CD28	Anticuerpo anti-CD28 recombinante [FR104]	Antibodies.com, núm. A323936	
FS118	LAG-3			Kraman et al., 2020, Clin. Cáncer Res. 26 (13): 3333–3344.
FS120	OX40 CD137			Gaspar et al., 2020, Cancer Immunol. Res. 8 (6): 781–793.
G.813.2	CD117	Anticuerpo monoclonal Phospho-C-Kit (Tyr703) (G.813.2)	ThermoFisher, núm. MA5-14830	
ganglidiximab	GD2			Eger et al., 2016, PLoS One 11 (3): e0150479.
GEN-3014	CD38			Hiemstra et al., 2023, EBioMedicine 93: 104663.
geptanolimab	PD-1	Geptanolimab	AntibodySystem, núm. DHH02224	Shi,Y. et al. Clin Cancer Res. 15 de diciembre de 2020;26(24):6445-6452. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2819. Epub 12 oct 2020. PMID: 33046518.
GIGA-564	CTLA-4			Stone, E. et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2022;10.

givastomig	CLDN18.2			Gao et al., 2023, J. Immunother. Cancer 11(6): e006704.
GN1412	CD28	Theralizumab	MedChemExpress, núm. HY-P9975	Hussain, K. et al. Blood. 2015 ene 1;125(1):102-10.
gresonitamab	CLDN18.2	Gresonitamab	MedChemExpress, núm. HY-P99350	
grisnilimab	CD7	Grisnilimab	MedChemExpress, núm. HY-P99650	Scharnhorst, V, et al. Gene. 2001 ago 8;273(2):141-61. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00593-5. PMID: 11595161.
GSK2831781	LAG-3			Clinical Trial ID: NCT03893565
GSK3174998	OX40			Infante, J. R. et al. *JCO* 34, TPS3107- TPS3107 (2016).
GWN323	GITR			Piha-Paul, S. A. et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2021;9:e002863.
h4C8	CD34	Fragmento Fab de anticuerpo recombinante CD34 antihumano (h4C8)	Creative Biolabs, núm. TAB -149LC-F (E)	
H22	CD64			Hristodorov, D. et al. MAbs. 2014;6(5):1283-9. doi: 10.4161/mabs.32182. PMID: 25517313; PMCID: PMC4622438.
H44	IL-18Rα	Anticuerpo CD218a APC antihumano (IL-18Rα)	Biolegend, núm. 313814	
H65	CD5	Anticuerpo CD5	Novus Biologicals, núm. NB100-2667	
hB-F5	CD4	Anticuerpo de lanzadera NeuroMab™ anti-CD4 BBB, Clon hB-F5	Creative Biolabs, núm. NRZP-1022-ZP3717	
HBM1007	CD73			Gan et al., 2020, 2020 AACR Poster núm. 6056.
HBM4003	CTLA-4			Shanzhi, G. et al. *JCO* 40, 2641-2641 (2022).

HC34LC14	CD117	Anticuerpos monoclonales recombinantes de conejo C-Kit (HC34LC14)	ThermoFisher, núm. 701494	
HCD27.15	CD27			US 9.527.916
HD37	CD19			Pezutto et al., 1987, J. Immunol. 138(9): 2793-2799
HE3	CD5			US 5.770.196
HFB301001	OX40			Fulton, R. et al. Cancer Res 1 July 2021; 81 (13_Supplement): 1882.
HI30	CD45	Anticuerpo CD45 antihumano purificado	BioLegend, núm. 304001	
HIT8a	CD8α	Anticuerpo CD8a antihumano purificado	BioLegend, núm. 300901	
HLX26	LAG-3			Rujiao, L. et al. *JCO* 41, e14671-e14671 (2023).
HLX51	OX40			Clinical Trial ID: NCT05788107
HM48-1	CD48	Anticuerpo monoclonal CD48 (HM48-1), APC, eBioScience™	ThermoFisher, núm. 17-0481-82	
HPAB-0260-YJ	CD200	Anticuerpo recombinante Anti-CD200 humano	Creative Biolabs, núm. HPAB-0260-YJ-F(E)	
HPAB-3334LY	PODXL	Anticuerpo recombinante anti-PODXL humano	Creative Biolabs, núm. HPAB-3334LY	
HPAB-MO612-YC	PODXL	Anticuerpo recombinante anti-LAM humano	Creative Biolabs, núm. HPAB-M0561-YC	
HPN217	BCMA			US 11.136.403
Hu001-MMAE	CD73			Jin et al., 2020, Mol. Cancer Ther. 19 (11): 2340-2352.
hu3G8-5.1-N297Q	CD16a			US 7.351.803
hu14.18k322A	GD2	Anticuerpo recombinante anti-GD2 humano (hu14.18K322A)	Creative Biolabs, núm. TAB-304CL	
Hu222	OX40			US 9.006.399
huAA98	CD146	Anticuerpo recombinante MCAM antihumano (huAA98)	Creative Biolabs, núm. TAB-444MZ	

Huly-m2	CD7	Anticuerpo monoclonal CD7 (marcador de leucemia de células T) (HuLy-m2)	ThermoFisher, núm. 924-MSM2-P1ABX	
HuMab 611	CD64			WO 2006/002438
Anticuerpo de control de poli-especificidad de IgG1 humana	IgG1	Anticuerpo de control de poli-especificidad de IgG1 humana	Medna Scientific, núm. H1308	
Anticuerpo de control de isotipo de IgG4 humana	IgG4	Anticuerpo de control de isotipo de IgG4 humana	Medna Scientific, núm. H1314	
AT-10 humanizado	CD32A	Anticuerpo CD32	Biorad, núm. MCA1075	
IV.3 humanizado	CD32A	Anticuerpo CD32 antihumano, Clon IV.3	StemCell Technologies, núm. 60012	
HuMax-TAC	CD25	Camidanlumab	MedChemExpress, núm. HY-P99233	
huRH105	CD105	Anti-CD105 [huRH105-1]	Absolute Antibody, núm. Ab04017	
IAB22M	CD8			US 11.254.744
IAb_CysDb3b_CD8	CD8			US 10.414.820
IAb_M1b_CD8	CD8			
IAb_M2b_CD8	CD8			
ibalizumab	CD4	Ibalizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99028	
IBI110	LAG-3			Xu et al., 2022, J. Clin. Oncol. 40 (16_suppl): 2650.
IBI310	CTLA-4			Zhou et al., 2022, J. Clin. Oncol. 40 (4_suppl): 421.
IBI318	PD-1	Reozalimab (LY3434172)	MedChemExpress, núm. HY-P9996	
IBI323	LAG-3			Ni et al., 2020, Cancer Res. 80 (16_Supplement): 3270.
IBI325	CD73			Zhou et al., 2023, Int. J. Biol. Macromol. 229:158-167.

IBI343	CLDN18.2			Yu et al., 2024, J. Clin. Oncol. 42 (16 Suppl.), 3037.
ibritumomab	CD20	Biosimilar de ibritumomab - mAb anti-MS4A1(CD20,MS4A-1) - Grado de investigación	ProteoGenix, núm. PX-TA1620	
idecabtagene vicleucel	BCMA			Munshi et al., 2021, *N. Engl. J. Med.* 384: 705-716.
ieramilimab	LAG-3	Imaprelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99027	Schöffski, P et al. J Immunother Cancer. 2022 Feb;10(2):e003776.
IL-A116	CD45RO	Anticuerpo monoclonal CD45RO (IL-A116)	ThermoFisher, núm. MA5-28403	
imaprelimab	CD146	Imaprelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99658	Pelletier, J. P. R. Et al. Immunologic Concepts in Transfusion Medicine, Elsevier, 2020, 251-348.
INBRX-106	OX40			Clinical Trial ID: NCT04198766
INCA00186	CD73			Stewart, S. et al. Cancer Res 1 July 2021; 81 (13_Supplement): LB174.
INCA32459	LAG-3			Clinical Trial ID: NCT05577182
INCAGN1949	OX40			Davis, E. J. et al. J Immunother Cancer. 2022 Oct;10(10):e004235. doi: 10.1136/jitc-2021-004235. PMID: 36316061; PMCID: PMC9628691.
INCAGN2385	LAG-3			Clinical Trial ID: NCT03538028
INCAGN02390	TIM-3			Clinical Trial ID: NCT03652077
inezetamab	CD4	Inezetamab	MedChemExpress, núm. HY-P99663	
inolimomab	CD25	Inolimomab de grado de investigación	Antibody System, núm. DHB95804	

inotuzumab	CD22	Anticuerpo recombinante anti-CD22 humanizado (clon Inotuzumab)	Creative Biolabs, núm. TAB-198	
IPH5301	CD73			Gonçalves et al., 2022, Immuno-Oncology and Technology 16 (S1): 199TiP.
ipilimumab	CTLA-4	Ipilimumab	MedChemExpress, núm. HY-P9901	
IPO-3	CD150	Anticuerpo anti-SLAM/CD150 [IPO-3]	Abcam, núm. ab2604	
isatuximab	CD38	Isatuximab (anti-CD38)	SelleckChem, núm. A2039	
iscalimab	CD40	Iscalimab	MedChemExpress, núm. HY-P99670	
ispectamab	BCMA			US 2021/0130483
IT1208	CD4			Shitara, K et al. J Immunother Cancer. 2019 Jul 24;7(1):195.
ivuxolimab	OX40	Ivuxolimab	MedChemExpress (MCE), núm. HY-P99159	Diab, A et al. Clin Cancer Res. 2022 ene 1;28(1):71-83.
JAB-BX102	CD73			Clinical Trial ID: NCT05174585
JK08	CTLA-4			Kotecki, et al., 2023, Ann. Oncol. 34(S2), pg. S635.
JM1-24-3	CD146			Feng et al., 2020, J. Exp. Clin. Cáncer Res. 39: 273.
JM7A4	IL-15Rα	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-IL-15RA [JM7A4]	Abcam, núm. ab91270	
		Anticuerpo IL-15R alfa (JM7A4) - libre de BSA	Novus Biologicals, núm. NBP1-43238	
JMW-3B3	CTLA-4	Anticuerpo recombinante Afuco™ Anti-CTLA4 humano ADCC (JMW-3B3), ADCC fortalecido	Creative Biolabs, núm. AFC-185CL	

JNJ-64164711	GITR	CD357/TNFRSF18/GITR antihumano de grado de investigación	AntibodySystem, núm. DHJ89808	Holland et al., 2018, Cancer Res. 78 (13_Supplement): 3813.
JS007	CTLA-4			Guan et al., 2023, MAbs 15(1): 2153409.
JTX-2011	ICOS	Vopratelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99382	
K45	CD117	Anticuerpo monoclonal c-Kit (K45)	ThermoFisher, núm. MA5-12944	
K117	CD90	Anticuerpo anti-CD90, Purificado	RayBiotech, núm. 136-00048	
KD6001	CTLA-4			Chen et al., 2024, Cancer Res. 84 (6_Suppl.): 1350.
keliximab	CD4	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Keliximab	MedChemExpress, núm. HY-P99680	
		Keliximab (CD4) - Biosimilar de grado de investigación	ProSci, núm. 10-178	
Ki-M7	CD68	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo CD68 | Ki-M7	Bio-Rad, núm. MCA2375F	
		Anticuerpo monoclonal CD68 (Ki-M7), FITC	ThermoFisher, núm. MA1-82715	
kit2c75	CD117	Anticuerpo monoclonal CD117 (c-Kit) (kit2c75), PE	ThermoFisher, núm. MA5-28805	
KM666	GD2			Nakamura et al., 2001, Cancer Immunol. Immunother. 50, 275-284.
KN044	CTLA-4			Clinical Trial ID: NCT04126590
L17F12	CD5	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo CD5 antihumano purificado	BioLegend, núm. 364001	

		Anticuerpo CD5 (L17F12)	Santa Cruz Biotechnology, núm. sc-18898	
LAMP4-824	CD68	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal de ratón CD68 (LAMP4/824)	Biotium, núm. 0824	
		Anticuerpo monoclonal CD68 (LAMP4, 824)	ThermoFisher, núm. 968-MSM4-P1	
LB1410	TIM-3			Liu, 2023, J. Clin. Oncol. 41 (16_suppl): TPS2663.
LCAR-B38M	BCMA			Zhao et al., 2018, J. Hematol. Oncol. 11(1):141; WO 2018/028647
LCAR-C18S (LB1908)	CLDN18.2			Zhen et al., 2023, J. Clin. Oncol. 41 (4 suppl.), TPS480.
Leu16	CD20			Wu et al., 2001, Protein Engineering. 14(12):1025-1033
linvoseltamab	BCMA			US 11.919.965
lisocabtagene maraleucel	CD19			Abramson et al., 2020, Lancet 396: 839-852.
LM-302	CLDN18.2			Huang et al., 2022, Eur. J. Cancer 174 (Suppl. 1): S41-S42.
LOP628	CD117	ADC anti-cKit-maitansina (LOP628)	Creative Biolabs, núm. ADC-L039	
lorigerlimab	PD-1			Luke et al., J. Clin. Oncol. 41 (6_suppl): 155.
lorvotuzumab	CD56	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Lorvotuzumab	MedChemExpress, núm. HY-P99372	
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de Lorvotuzumab	ThermoFisher, núm. MA5-41708	

LT-2	CD2	Anticuerpo monoclonal CD2 (LT2)	ThermoFisher, núm. MA1-10131	
LT-8	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal de ratón [LT8] a CD8 (PE)	Antibodies.com, núm. A242891	
		Anticuerpo monoclonal anti-CD8	Millipore Sigma, núm. SAB4701064	
lucatumumab	CD40	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Lucatumumab	MedChemExpress, núm. HY-P99167	
		Anticuerpo recombinante anti-CD40 (Lucatumumab)	Creative Biolabs, núm. TAB-759	
lulizumab	CD28	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de lulizumab	ThermoFisher, núm. MA5-42032	
		Anticuerpo recombinante anti-CD28 humanizado (clon Lulizumab)	Creative Biolabs, núm. TAB-H46	
LVGN6051	CD137			Qi et al., 2019, Nat. Commun. 10(1): 2141.
LY75_A1	CD205	Proteína LY75/DEC-205 (AA 28-1667) (Etiqueta His)	Antibodies Online, núm. ABIN7275222	
LY3321367	TIM-3			Harding et al., 2021, Clin. Cáncer Res. 27(8): 2168-2178.
LY3415244	TIM-3			Hellmann et al., 2021, Clin. Cáncer Res. 27(10): 2773-2781.
M108 (FG-M108)	CLDN18.2			Jin et al., 2024, J. Clin. Oncol. 42 (16 supl.), 4142.
M971	CD22	Anti-Siglec-2 / CD22 (NCI m971)	SelleckChem, núm. A3057	

mAb19	CD73			Wurm et al., 2021, Mol. Cancer Ther. 20(11): 2250-2261
MAB107	CD11b	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-CD11b/CD18, clon mAb107	Millipore Sigma, núm. MABF2085	
		mAb anti-IgE humano (107) no conjugado	Mabtech, núm. 3810-3	
MAB1472-100	IL-15Rα	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo alfa IL-15R humano	R&D Systems, núm. MAB1472	
		Anticuerpo alfa IL-15R (1020456) [no conjugado]	Novus Biologicals, núm. MAB1472	
MAB5511	IL-15Rα	Anticuerpo alfa IL-15R de ratón	R&D Systems, núm. MAB5511	
MAI1738	PODXL	PODXL antihumano de grado de investigación (MAI1738)	AntibodySystem, núm. DHA16801	
MAT304	CD5	CD5 antihumano de grado de investigación (MAT 304)	AntibodySystem, núm. DHC18804	
MAX.16H5	CD4			Guse et al., 1994, J. Chromatogr. A 661: 13-23.
MB-106	CD20	Fred Hutchinson Cancer Research Center		Shadman et al., 2019, Blood 134(Suppl.1):3235
MC631	SSEA-3	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-SSEA3 [MC631]	Abcam, núm. ab16286	
		Anticuerpo anti-SSEA-3 de ratón, Clon MC-631	StemCell Technologies, núm. 60061.1	
MC-813-70	SSEA-4	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal SSEA4 (MC-813-70)	ThermoFisher, núm. MA1-021	

		Anticuerpo anti-SSEA-4 humano, Clon MC-813-70	StemCell Technologies, núm. 60062	
MCARH109	GPRC5D			Mailankody et al., N Engl J Med. 387(13): 1196-1206 (2022)
MDE-8	CD32A	Anti-CD32 [MDE-8]	Absolute Antibodies, núm. Ab02072	
MDX-1203	CD70			Owonikoko et al., 2014, J. Clin. Oncol. 32:5s,(suppl; abstr 2558).
MDX-1411	CD70	Anticuerpo monoclonal anti-CD70 (MDX-1411)	Creative Biolabs, núm. Gly-008CL	
MEDI0680	PD-1			Naing et al., 2019, J. Immunother. Cancer 7: 225.
MEDI1873	GITR			Tigue et al., 2017, Oncoimmunology 6(3): e1280645.
MEDI2228	BCMA			US 10.988.546
MEDI5752	PD-1			Dovedi et al., 2021, Cancer Discov. 11(5): 1100-1117.
MEDI6383	OX40			Hammond et al., 2015, J. Clin. Oncol. 33 (15_suppl): 3056.
MEDI6469	OX40			Leidner et al., 2015, J. Clin. Oncol. 33 (15_suppl): TPS6083.
MEM-28	CD45	Anticuerpo anti-CD45 [MEM-28]	Abcam, núm. ab8216	
MEM-31	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD8 (MEM-31)	ThermoFisher, núm. MA1-19082	
		Anticuerpo monoclonal anti-CD8 producido en el ratón	SigmaAldrich, núm. SAB4700084	
MEM-55	CD45RB	Anticuerpo-CD45RB [MEM-55]	Abcam, núm. ab8218	

MEM-59	CD43	Anticuerpo monoclonal CD43 (MEM-59)	ThermoFisher, núm. MA1-19009	
MEM-65	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD2 (MEM-65)	ThermoFisher, núm. MA1-19070	
		Anticuerpo anti-CD2 [MEM-65]	Antibodies.com, #A86387	
MEM-87	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-CD8 (MEM-87)	Antibodies.com, núm. A85681	
		Anticuerpo monoclonal anti-CD8 producido en el ratón	SigmaAldrich, núm. SAB4700089	
MEM-102	CD48	Anticuerpo monoclonal CD48 (MEM-102)	ThermoFisher, núm. MA1-19119	
mezagitamab	CD38	Mezagitamab	MedChemExpress, núm. HY-P99730	
MGC018	B7H3			Scribner et al., 2020, Mol. Cancer Ther. 19(11): 2235-2244.
MGTA-117	CD117			Westervelt et al., 2022, Blood 140 (Supplement 1): 2117–2119.
MiK-Beta-1	CD122	Anticuerpo monoclonal CD122 (MIK-Beta 1)	ThermoFisher, núm. MA1-35896	
miptenalimab	LAG-3	Miptenalimab	MedChemExpress, núm. HY-P99736	
mitazalimab	CD40			Calvo et al., 2019, J. Clin. Oncol. 37 (15_suppl): 2527.
MK-1248	GITR			Geva et al., 2020, Cancer 126(22): 4926-4935.
MK-4166	GITR			Sukumar et al., 2017, Cancer Res. 77 (16): 4378–4388.

MORAb-028	GD2	Anticuerpo monoclonal humano recombinante MORAb-028	ThermoFisher, núm. MA5-41810	
moxetumomab	CD22	Anti-CD22 (Moxetumomab pasudotox)-SMCC-DM1 ADC	Creative Biolabs, núm. ADC-W-800	
mShad150	CD150	Anticuerpo monoclonal CD150 (mShad150), PE, eBioScience™	ThermoFisher, núm. 12-1502-82	
M-T413	CD4			Rieber et al., 1992, PNAS 89(22): 10792-6.
MT95-4	CD13			WO 2021/072312
MRTX1011A	CD4			Scheerens et al., 2011, Arthritis Res. Ther. 13 (5): R177.
MT807-R1	CD8α	Alfa anti-CD8 (MT807R1)	NIH Nonhuman Primate Reagent Resources, núm. AB_2716320	Nakamura-Hoshi et al., 2024, Mol. Ther. 32 (7): 1-12.
mupadolimab	CD73	Mupadolimab	MedChemExpress, núm. HY-P99181	
My10	CD34	Anticuerpo anti-CD34 [My10]	Abcam, núm. ab245689	
naxitamab	GD2	Naxitamab	MedChemExpress, núm. HY-P99206	
Nbl57	CD13			WO 2021/072312
ND-742	SSEA-3	Anticuerpo monoclonal anti-SSEA-3	Creative Diagnostics, núm. DMAB12907	
nivatrotamab	GD2	Nivatrotamab	MedChemExpress, núm. HY-P99757	
nivolumab	PD-1	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Nivolumab (anti-PD-1)	SelleckChem, núm. A2002	
		Nivolumab	Evidentic, núm. 8006657	
NN2101	CD117			Kim et al., 2020, Int. J. Biol. Macromol. 159: 66-78.
nofazinlimab	PD-1	Nofazinlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99758	

nurulimab	CTLA-4	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Nurulimab	MedChemExpress, núm. HY-P99760	
		Nurulimab (Anti-CTLA-4 / CD152	SelleckChem, núm. A2859	
NZV930	CD73			Fu et al., 2022, Cancer Res. 82(12_Suppl), CT503.
obinutuzumab	CD20	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Obinutuzumab	MedChemExpress, núm. HY-P9910	
		Obinutuzumab (anti-CD20)	SelleckChem, núm. A2023	
		Anticuerpo monoclonal de obinutuzumab (16B7)	ThermoFisher, núm. A01946-40	
ocrelizumab	CD20	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Ocrelizumab	MedChemExpress, núm. HY-P9960	
		Ocrelizumab (Anti-CD20)	SelleckChem, núm. A2561	
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de ocrelizumab	ThermoFisher, núm. MA5-41829	
odronextamab	CD20 CD3	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Odronextamab	MedChemExpress, núm. HY-P99038	
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de odronextamab	ThermoFisher, núm. MA5-42283	
ofatumumab	CD20	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		

		Ofatumumab	MedChemExpress, núm. HY-P9961	
		Biosimilar de ofatumumab - Anti-MS4A1, mAb CD20 - Grado de investigación	ProteoGenix, núm. PX-TA1146	
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de ofatumumab	ThermoFisher, núm. MA5-41813	
OKT1	CD5	CD5 OKT1 no conjugado IgG1k (RUO)	Biohippo, núm. BHA19900487	
OKT3 (muromonab-CD3)	CD3	Anticuerpo monoclonal CD3 (OKT3), eBioscience™	ThermoFisher, núm. 14-0037-82	
OKT4	CD4	Anticuerpo anti-CD4 humano Brilliant Violet 650™	BioLegend, núm. 317436	
OKT8	CD8α	Anticuerpo monoclonal CD8α (OKT8)	ThermoFisher, núm. 14-0086-80	
OKT11	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		US 4.364.937
		OKT11	ATCC, núm. CRL-8027	
			MilliporeSigma, núm. 86050802	
oleclumab	CD73	Oleclumab	MedChemExpress, núm. HY-P99039	
ONC-392	CTLA-4			Rolfo et al., 2020, J. Clin. Oncol. 38 (15_suppl): TPS3159.
OriCAR-017	GPRC5D			Rodriguez-Otero et al., Blood Cancer J. 14(1): 24 (2024)
OS2966	CD29			Nigim et al., 2019, Target. Oncol. 14: 479-489.
osemitamab	CLDN18.2			Qian et al., 2023, Ann. Oncol. 34 (Suppl. 2), S873, 1560P.

otelixizumab	CD3	Otelixizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99211	
OTI14B1	CD117	Ratón antihumano KIT, Clon: OTI14B1, liofilizado, TrueMab™	Fisher Scientific, núm. 50-166-9129	
OTI1B6		Anticuerpo monoclonal KIT (OTI1B6), TrueMab™	ThermoFisher, núm. CF808721	
OTI1E2		Anticuerpo monoclonal de ratón CD117 [ID del clon: OTI1E2]	OriGene, núm. TA801037	
OTI1F6		Anticuerpo monoclonal KIT (OTI1F6), TrueMab™	ThermoFisher, núm. CF801131	
OTI2B12		Anticuerpo monoclonal de ratón CD117 [ID del clon: OTI2B12]	OriGene, núm. CF808739	
OTI2B5		Anticuerpo monoclonal KIT (OTI2B5), TrueMab™	ThermoFisher, núm. TA801047	
OTI2C1D5		Anticuerpo monoclonal KIT (OTI2C1D5), TrueMab™	ThermoFisher, núm. CF801043	
OTI2C1H4		Anticuerpo monoclonal KIT (OTI2C1H4), TrueMab™	ThermoFisher, núm. CF805183	
OTI2E3		Ratón monoclonal anti-humano c-Kit/Anticuerpos CD117 (Sin portador, aa546-976, IHC, WB)	LSBio, núm. LS-C789071-100	
OTI3F9	CD117	Anticuerpo monoclonal KIT (OTI3F9), TrueMab™	ThermoFisher, núm. TA801045	
OTI4E4	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD2 (OTI4E4)	ThermoFisher, núm. TA500404	

		Anticuerpo monoclonal de ratón CD2 [ID del clon: OTI4E4]	Cambridge Bioscience, núm. TA500404	
OTI4G8	CD43	Anticuerpo monoclonal ASPDH (OTI4G8)	ThermoFisher, núm. MA5-27041	
OTI6A4	CD43	Anticuerpo monoclonal PRRX1 (OTI6A4)	ThermoFisher, núm. MA5-26579	
OTI6F8	CD117	Anticuerpo monoclonal KIT (OTI6F8), TrueMab™	ThermoFisher, núm. CF808746	
OTI9A11	CD117	Anticuerpo monoclonal de ratón CD117 [ID del clon: OTI9A11]	OriGene, núm. CF801205	
OX7	CD90	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD90 (OX-7)	ThermoFisher, núm. MA1-81491	
		Anticuerpo Thy-1/CD90 (OX7)	Santa Cruz Biotechnology, núm. sc-53116	
OX-45	CD48	Anticuerpo monoclonal CD48 (OX-45), PE	ThermoFisher, núm. MA5-17528	
OX-104	CD200	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD200 (OX104), eBioScience™	ThermoFisher, núm. 14-9200-82	
		Anticuerpo CD200 | OX-104	Bio-Rad, núm. MCA1960	
pavurutamab	CD3	Pavurutamab	MedChemExpress, núm. HY-P99814	
PD7/26	CD45RB	Anticuerpo monoclonal CD45RB (PD7/26), eBioScience™	ThermoFisher, núm. 14-9458-82	
pembrolizumab	PD-1	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Pembrolizumab	MedChemExpress, núm. HY-P9902	

			Evidentic, núm. 6302603D04	
penpulimab	PD-1	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Penpulimab	AbMole, núm. M25087	
		Penpulimab (Anti-PDCD1 / PD-1 / CD279	Selleckchem, núm. A3034	
peresolimab	PD-1	Peresolimab	MedChemExpress, núm. HY-P9993	
PF-03475952	CD44			Runnels et al., 2010, Adv. Ther. 27(3): 168-180.
PG-M1	CD68	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-CD68 [PG-M1]	Abcam, núm. ab783	
		Anticuerpo monoclonal CD68 (PG-M1)	ThermoFisher, núm. MA5-12407	
PI37012	TREM2			WO 2019/118513
pidilizumab	PD-1	Anticuerpo recombinante anti-PD-1/PDCD1/CD279 humano (pidilizumab)	Creative Biolabs, núm. TAB-900	
pimivalimab	PD-1	Pimivalimab	MedChemExpress, núm. HY-P99887	
pinatuzumab	CD22	Pinatuzumab	MedChemExpress, núm. HY-P99230	
praluzatamab	CD166			Boni et al., 2022, Clin. Cáncer Res. 28(10): 2020–2029.
prezalumab	CD28	Prezalumab	MedChemExpress, núm. HY-P99414	
priliximab	CD4	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Priliximab	MedChemExpress, núm. HY-P99790	

		Anticuerpo recombinante anti-CD4 humano (Priliximab)	Creative Biolabs, núm. TAB-164	
PRO1160	CD70			Jonasch et al., 2023, Oncologist 28(Suppl 1): S14–S15.
prolgolimab	PD-1	Prolgolimab	MedChemExpress, núm. HY-P99807	
promiximab	CD56	Anticuerpo recombinante anti-NCAM1 humano	Creative Biolabs, núm. HPAB-N0187-YC	
PRS-343	CD137			Hinner et al., 2016, Cancer Immunol. Res. 4 (11_Supplement): B016.
pucotenlimab	PD-1	Pucotenlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99938	
Q-1802	CLDN18.2			Yk et al., 2023, J. Clin. Oncol. 41 (4 suppl.), 382.
QBEND/10	CD34	Anticuerpo monoclonal CD34 (QBEND/10), PE	ThermoFisher, núm. MA1-10205	
QL1706	PD-1 CTLA-4			Zhang et al., 2021, Cancer Res. 81(13_Suppl): CT119.
quavonlimab	CTLA-4	Quavonlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99809	
r18D11	CD14	Anticuerpo recombinante anti-CD14 humano (18D11)	Creative Biolabs, núm. TAB-1583CL	
ragifilimab	GITR	Ragifilimab	MedChemExpress, núm. HY-P99812	
RAVB3	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD8 (RAVB3)	ThermoFisher, núm. MA5-17048	
		CD8 (RAVB3)	Santa Cruz Biotechnology, núm. sc-32812	
RC118	CLDN18.2			Liu et al., 2024, Ann. Oncol. 35 (Suppl. 2), S903, 1456P.

REA101	SSEA-4	Anticuerpo SSEA-4, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-122-914	
REA157	PODXL	Anticuerpo TRA-1-60, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-122-921	
REA246	PODXL	Anticuerpo TRA-1-81, antihumano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-123-293	
REA233	IL-21Rα	Anticuerpo CD360 (IL-21R), anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-126-094	
REA333	IL-12R	Anticuerpo IL-12R β2, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-120-068	
REA442	CD166	Anticuerpo CD166, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-118-349	
REA795	SUSD2	Anticuerpo SUSD2, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-111-641	
REA844	CD271	Anticuerpo anti-CD271 (LNGFR), anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-112-601	
REA877	CD10	Anticuerpo CD10, anti-humano, puro, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-124-312	
REA897	CD90	Anticuerpo CD90, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-114-860	
REA1060	CD29	Anticuerpo CD29, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-118-121	
REA1067	CD200	Anticuerpo CD200, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-118-129	
REA1164	CD34	Anticuerpo CD34, anti-humano, PE, REAfinity™	Miltenyi Biotec, núm. 130-120-515	
REAL219	MSCA-1	Anticuerpo MSCA-1, anti-humano, PE, REAlease®	Miltenyi Biotec, núm. 130-119-917	
REAL709	CD271	Anticuerpo,CD271 (LNGFR), anti-humano, PE, REAlease®	Miltenyi Biotec, núm. 130-125-053	
REGN5459	BCMA			US 11.384.153
REGN4659	CTLA-4			Burova et al., 2018, Cancer Res. 78 (13_Supplement): 3824.

REGN6569	GITR			Lakhani et al., 2022, IOTECH 16 (S1): 196TiP.
REGN7257	CD132			Le Floch-Ramondou et al., 2022, Blood 140 (Supplement 1): 473–474.
relatlimab	LAG-3	Relatlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99156	
retifanlimab	PD-1	Retifanlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99941	
RG7356	CD44	Anticuerpo recombinante anti-CD44 humano (RG7356)	Creative BIolabs, núm. TAB-128CL	
rituximab	CD20	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Biosimilar de Rituximab NA/LE CD20 anti-humano purificado BD Pharmingen™	BD Biosciences, núm. 569496	
		ANTI CD20 HUMANO (BIOSIMILAR DE RITUXIMAB)	BioRad, núm. MCA6091	
		Rituximab	MedChemExpress, núm. HY-P9913	
RIV-11	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-CD8 (RIV-11)	Antibodies.com, #A115691	
		Anticuerpo recombinante CD8 (RIV-11)	Aviva Systems Biology, núm. OAAV00971	
RM2051	CD45	Anticuerpo anti-CD45 [RM2051]	Abcam, núm. ab318154	
RO5429083	CD44			Perez et al., 2012, Cancer Res. 72 (8_Suppl.): 2521.
RO7121661	PD-1 TIM-3			Clinical Trial ID: NCT04785820
RO7247669	PD-1 LAG-3			Clinical Trial ID: NCT04785820
RO7296682	CD25	Anti-CD25/IL2RA humano, grado de investigación (RO7296682)	AntibodySystem, núm. DHB95808	

rocatinlimab	OX40	Rocatinlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99955	
RPA-2.10	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-CD2 humano purificado	BioLegend, núm. 300202	
		Anticuerpo monoclonal CD2 (RPA-2.10)	ThermoFisher, núm. 14-0029-82	
		Anticuerpo CD2 anti-humano, Clon RPA-2.10	Stemcell Technologies, núm. 60007	
RPA-T8 (CT8)	CD8α	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		ANTI CD8 HUMANO DE RATÓN	Bio-Rad, núm. MCA4609T	
		Anticuerpo monoclonal CD8a (RPA-T8), APC	ThermoFisher, núm. 17-0088-42	
RTX-003	CD25			“Nature-inspired, antibody discovery driven by AI.” Nature, dic. 2020, B44.
rulonilimab	PD-1	Rulonilimab	MedChemExpress, núm. HY-P99895	
RW03	CD133			Vora et al., 2020, Cell Stem Cell 26(6): 832-844.e6
sabatolimab	TIM-3	Sabatolimab	MedChemExpress, núm. HY-P99044	
samalizumab	CD200	Samalizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99400	
SAR445514	BCMA			US 2024/0034816
sasanlimab	PD-1	Sasanlimab (Anti-PDCD1 / PD-1 / CD279)	Selleckchem, núm. A3038	
sdA1	CD16a			WO 2018/039626
sdA2	CD16a			WO 2018/039626
SEA-BCMA	BCMA			US 11.078.291
selicrelumab	CD40	Selicrelumab	MedChemExpress, núm. HY-P99046	

semzuvolimab	CD4	Semzuvolimab	MedChemExpress, núm. HY-P9998	
serplulimab	PD-1	Serplulimab (Anti-PDCD1 / PD-1 / CD279)	Selleckchem, núm. A2381	
SG001	PD-1			Clinical Trial ID: NCT04886700
SGN-CD70A	CD70			Sandall et al., 2014, Cancer Res. 74 (19_Supplement): 2647.
SHR-1702	TIM-3			Clinical Trial ID: NCT03871855
SHR-1802	LAG-3			Deng et al., 2023, Ther. Adv. Med. Oncol. 15: 17588359231186025.
SIDI8BEE	CD8β	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD8b (SIDI8BEE)	ThermoFisher, núm. 14-5273-82	
		Anticuerpo recombinante anti-CD8B de ratón (SIDI8BEE)	CreativeBiolabs, núm. CBMAB-C10732-LY	
sindelizumab	PD-1			Li et al., 2022, Front. Pharmacol. 13: 918709.
sintilimab	PD-1	Sintilimab	MedChemExpress, núm. HY-P99048	
siplizumab	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Siplizumab	Medchem Express, núm. HY-P99904	
		Anticuerpo recombinante anti-CD2 humano	Creative Biolabs, núm. TAB-104	
SJ25C1	CD19			Bejcek et al., 1995, Cancer Res. 55:2346-2351
SK1	CD8α	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo anti-CD8 humano purificado *SK1*	AAT Bioquest, núm. 10081000	

		Anticuerpo monoclonal anti-CD8 de ratón [clon: SK1]	Avantor (VWR), núm. 344702-BL	
SKB315	CLDN18.2			Clinical Trial ID: NCT05367635
SLAM.4	CD150	Anticuerpo monoclonal CD150 (SLAM.4)	ThermoFisher, núm. MA5-46198	
SM03	CD22			Wong et al., 2022, J. Immunol. 208(12): 2726-2737.
SOT102	CLDN18.2			Spisek, 2023, ESMO Open 8(1), Suppl. 2, 101196, 2P.
sotigalimab	CD40	Sotigalimab	MedChemExpress, núm. HY-P99049	
SP-16	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal anti-CD8 (SP-16)	ThermoFisher, núm. MA5-14548	
			Novus Biologicals, núm. NBP2-26484	
SP34-2	CD3	APC-Cy™7 anti-CD3 humano de ratón BD Pharmingen™	BD Biosciences, núm. 557757	
SP55	CD43	Anticuerpo monoclonal CD43 (SP55)	ThermoFisher, núm. MA5-16339	
spartalizumab	PD-1	Spartalizumab	MedChemExpress, núm. HY-P9972	
SPM504	CD45RA	Anticuerpo anti-CD45RA [SPM504]	Abcam, núm. ab231426	
SPX-101	CLDN18.2			Zhu et al., 2020, Cancer Res. 80 (16_Supplement): 3361.
SR1	CD117	Kit de anticuerpo recombinante antihumano (SR1)	Creative Biolabs, núm. TAB-467LC	
ST04-99	CD117	CD117/c-kit conejo antihumano, clon: ST04-99, Novus Biologicals™	Fisher Scientific, núm. NBP267531	
STRO-1	Stro-1	Anticuerpo monoclonal STRO-1 (STRO-1)	ThermoFisher, núm. 39-8401	

STRO-4	Hsp90			Gronthos et al., 2009, Stem Cells Dev. 18(9): 1253-62.
surzebiclimab	TIM-3	Surzebiclimab	MedChemExpress, núm. HY-P99962	
Sym022	LAG-3	CD223/LAG3 antihumano de grado de investigación (Sym022)	AntibodySystem, núm. DHD30423	
Sym023	TIM-3			Lindsted et al., 2018, Cancer Res. 78 (13_Supplement): 5629.
Sym024	CD73			Jakobsen et al., 2021, Cancer Res. 81 (13_Supplement): 1797.
SYSA180	CLDN18.2			Wang et al., 2023, J. Clin. Oncol. 41 (16 suppl.), 3016.
T200/797	CD45RO	Anti-CD45RO anticuerpo [T200/797]	Abcam, núm. ab216024	
T3-3A1	CD7	Anticuerpo monoclonal CD7 (marcador de leucemia de células T) (T3-3A1)	ThermoFisher, núm. 924-MSM5-P0	
T6.3	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo recombinante anti-CD2 de ratón (clon T6.3)	Creative Biolabs, núm. ZG-0903F	
		Anticuerpo monoclonal anti-CD2 humano de ratón (clon T6.3)	LS Bio, núm. LS-C140259	
T595	CD117	Anticuerpo monoclonal de ratón CD117 [ID del clon: T595]	OriGene, núm. TA355261	
TAB-071CL	BMPR2	Anticuerpo recombinante anti-BMPR humano	Creative Biolabs, núm. TAB-071CL	
talquetamab	GPRC5D			Pillarisetti et al., Blood 135:1232-43 (2020)

tavolimab	OX40	Anticuerpo monoclonal humano recombinante de tavolimab	ThermoFisher, núm. MA5-42300	
TB19	CD73	Anticuerpo In Vivo MAb anti-CD73/NT5E humano (TB19)	AntibodySystem, núm. VHD46601	
TB38	CD73	Anticuerpo InVivoMAb anti-CD73/NT5E humano (TB38)	AntibodySystem, núm. VHD46602	
tebotelimab	LAG-3 PD-1	Tebotelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99573	
teclistamab	CD3	Teclistamab	MedChemExpress, núm. HY-P99392	
telazorlimab	OX40	Telazorlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99570	
teplizumab	CD3	Teplizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99222	
TG6050	CTLA-4			Marchand et al., 2023, Cancer Res. 83 (7_Supplement): 694.
TH-69	CD7	Anti-CD7 [TH69]	Absolute Antibody, núm. Ab03054	
teralizumab	CD28	Theralizumab	MedChemExpress, núm. HY-P9975	
tifcemalimab	BTLA			Song et al., 2023, Blood 142 (Supplement 1): 4458.
tiragolumab	TIGIT			Kim et al., 2023, JAMA Oncol. 9(11):1574-1582.
tisagenlecleucel	CD19			Mueller et al., 2018, Clin. Cáncer Res. 24 (24): 6175–6184.
tislelizumab	PD-1	Tislelizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99052	
TNB-383B	BCMA			US 11.505.606
tocilizumab	IL-6R	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo IL6R | rhPM-1	BioRad, núm. MCA6106	

		Tocilizumab	MedChemExpress, núm. HY-P9917	
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de Tocilizumab (rhPM-1 (Tocilizumab))	ThermoFisher, núm. MA5-48061	
toripalimab	PD-1	Toripalimab	MedChemExpress, #HY-P9978	
TORL-2-307-ADC	CLDN18.2			Clinical Trial ID: NCT05156866
tositumomab	CD20	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		CD20 humano (Biosimilar de tositumomab de Grado de investigación) Alexa Fluor® 647-anticuerpo conjugado	R&D Systems, núm. FAB10440R	
		Anticuerpo monoclonal de ratón recombinante de tositumomab	ThermoFisher, núm. MA5-41763	
TQB2618	TIM-3	Anti-CD366/HAVCR2/TIM-3 humano de grado de investigación (TQB2618)	AntibodySystem, núm. DHJ28406	
TQB2934	BCMA			US 2023/0193292
TRC205	CD105			US 9.926.375
tregalizumab	CD4	Tregalizumab	MedChemExpress, núm. HY-P99327	
tremelimumab	CTLA-4	Tremelimumab	MedChemExpress, núm. HY-P9918	
TRX1	CD4	Anticuerpo recombinante anti-CD4 humano (TRX1)	Creative Biolabs, núm. TAB-168LC	
TRX2	CD8	Oxford Therapeutic Antibody Centre, Oxford University, Oxford, United Kingdom		
TRX518	GITR	CD357/TNFRSF18/GITR anti-humano de grado de investigación (TRX518)	AntibodySystem, núm. DHJ89807	
TS1/8	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		

		Anticuerpo monoclonal CD2 (TS1/8)	ThermoFisher, núm. MA5-44080	
		Anticuerpo anti-CD2 humano purificado	BioLegend, núm. 309202	
TS2/18	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anticuerpo monoclonal CD2 (TS2/18)	ThermoFisher, núm. MA0200	
		Anticuerpo CD2 (TS2/18.1.1)	Santa Cruz Bio, núm. sc-19640	
TTI-CD200	CD200			Rastogi et al., 2021, Br. J. Haematol. 193, 155–159.
TUSP-2	Stro-1	Anticuerpo monoclonal anti-STRO-1 [Alexa Fluor® 647]	Creative Diagnostics, núm. DMAB18656	
UB-421	CD4	Semzuvolimab de grado de investigación	AntibodySystem, núm. DHB95908	
ublituximab	CD20	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Ublituximab	MedChemExpress, núm. HY-P99538	
		Ublituximab (Anti-CD20)	SelleckChem, núm. A2807	
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de ublituximab	ThermoFisher, núm. MA5-41938	
UCART20	CD20			Kang et al., 2024, J. Hem. Oncol. 17:29.
UCHL1	CD45RO	Anticuerpo anti-CD45RO [UCH-L1]	Abcam, núm. ab23	
UCHT2	CD5	Anticuerpo monoclonal CD5 (UCHT2), eBioScience™	ThermoFisher, núm. 14-0059-82	
UCHT4	CD8	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		

		Anticuerpo monoclonal CD8 (UCHT4)	ThermoFisher, núm. 65204-1-IG	
		Anti-CD8 [UCHT4]	Absolute Antibody, núm. Ab00694-2.0	
uliledlimab	CD73	Uliledlimab	MedChemExpress, núm. HY-P99169	
UMAB216	CD117	Anticuerpo monoclonal KIT (UMAB216), UltraMAB™	ThermoFisher, núm. UM800108CF	
UMCD2	CD2	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Anti-CD2 humano	Biohippo, núm. BHA14700014	
		Anticuerpo de ratón monoclonal CD2 (UMCD2)	Biotium, núm. 1235	
urelumab (BMS-663513)	CD137	Urelumab	MedChemExpress, núm. HY-P99055	
ustekinumab	IL-12 IL-23	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Biosimilar de ustekinumab - mAb anti-IL-12 IL-23 humano - Grado de investigación	Proteogenix, núm. PX-TA1011	
		Ustekinumab (anti-IL-12/IL-23)	SelleckChem, núm. A2024	
utomilumab (PF-05082566)	CD137	Utomilumab	MedChemExpress, núm. HY-P99056	
varlilumab	CD27	Anticuerpo monoclonal humano recombinante de varlilumab	ThermoFisher, núm. MA5-42030	
VB6-008	CD44			US 8.383.117
veltuzumab	CD20	*disponible desde múltiples fuentes, que incluye:*		
		Veltuzumab	MedChemExpress, núm. HY-P99224	

		Biosimilar de veltuzumab - receptores de mAb anti- CD20 - Grado de investigación	Proteogenix, núm. PX-TA1616	
		Anticuerpo monoclonal humano recombinante de Veltuzumab	ThermoFisher, núm. MA5-42301	
VIB9600	CD32A			Chen et al., 2019, Ann. Rheum. Dis. 78(2): 228–237.
vibecotamab	CD3	Anticuerpo monoclonal humano recombinante de vibecotamab,Invitrogen™	Fisher Scientific, núm. PIMA542248	
vibostolimab (MK-7684)	TIGIT			Niu et al., 2022, Ann. Oncol. 33(2): 169-180.
visilizumab	CD3	Anticuerpo recombinante anti-CD3E (Visilizumab)	Creative Biolabs, núm. TAB-714	
vonlerizumab	OX40	Vonlerizumab (Anti-TNFRSF4 / OX40 / CD134)	SelleckChem, núm. A2325	
vorsetuzumab	CD27 CD70	Vorsetuzumab	MedChemExpress, núm. HY-P99273	
vudalimab	PD-1	Vudalimab de grado de investigación	AntibodySystem, núm. DHH02222	
vunakizumab	CD27	Anticuerpo recombinante anti-IL17A humano (Vunakizumab)	Creative Biolabs, núm. TAB-458CQ	
W3/13HLK	CD43	Anticuerpo monoclonal CD43 (W3/13HLK), PE	ThermoFisher, núm. MA5-17386	
W5C5	SUSD2	Anticuerpo anti-SUSD2 humano purificado	BioLegend, núm. 327401	
W8B2	MSCA-1	Anticuerpo MSCA-1, anti-humano	Miltenyi Biotec, núm. 130-093-595	
WT1	CD7	Anticuerpo recombinante anti-CD7 de ratón (WT1)	Creative Biolabs, núm. CBMAB-C10581-LY	
WV078	BCMA			US 11.492.409
X9C3	MSCA-1	Anticuerpo monoclonal anti-MSCA-1 humano de ratón, PE	Creative Diagnostics, núm. CABT-B12374	

XTX101	CTLA-4			Jenkins et al., 2023, J. Immunother. Cancer 11(12): e007785.
Y1/82A	CD68	Anticuerpo CD68 | Y1/82A	Bio-Rad, núm. MCA6014GA	
YB5.B8	CD117	Anticuerpo monoclonal CD117 (C-Kit) (YB5.B8), eBioScience™	ThermoFisher, núm. 14-1179-82	
YH001	CTLA-4			Ganju et al., 2021, J. Clin. Oncol. 39 (15_suppl): 2577.
YTC182.20	CD8	Anticuerpo anti-CD8 alfa [YTC182.20]	Abcam, núm. ab60076	
YTH3.2.6	CD7	Anti-CD7 [YTH3.2.6]	Absolute Antibody, núm. Ab01019	
zalifrelimab	CTLA-4	Zalifrelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99514	
zanolimumab	CD4	Anticuerpo monoclonal humano recombinante de zanolimumab	ThermoFisher, núm. MA5-41819	
zimberelimab	PD-1	Zimberelimab	MedChemExpress, núm. HY-P99109	
zolbetuximab (IMAB362)	CLDN18.2			Sahin et al., 2018, Eur. J. Cancer 100, 17-26.