

Titolo: LIPIDI PER FORMULAZIONI DI RILASCIO DI AGENTE
TERAPEUTICO

DESCRIZIONE

RIFERIMENTO INCROCIATO A DOMANDE CORRELATE

[0001] La presente domanda rivendica il beneficio della
domanda di brevetto provvisoria statunitense n.:
61/657,480 depositata l'8 giugno 2012.

CAMPO TECNICO

[0002] La descrizione è rivolta a lipidi ionizzabili
per migliorare il rilascio di agenti terapeutici.

SFONDO

[0003] Sono disponibili varie tecniche per rilasciare
un agente terapeutico, per esempio, siRNA, acidi
nucleici, ecc., in una cella. Queste tecniche includono
sistemi di trasfezione virali e non virali. Sistemi di
trasfezione non virali possono includere, per esempio,
polimeri, lipidi, liposomi, micelle, dendrimeri e
nanomateriali. Polimeri che sono stati studiati per la
trasfezione di celle includono polimeri cationici come
per esempio, poli(L-lisina) ("PLL"), polietilenimina
("PEI"), chitosano e poli(2-dimetilammino)etil
metacrilato ("pDMAEMA").

[0004] Le tecniche di trasfezione virali e non virali
presentano tuttavia inconvenienti. Per esempio, sistemi
virali possono dare un'alta efficienza di trasfezione,

ma possono non essere del tutto sicuri. Inoltre, sistemi virali possono essere complessi e/o costosi da preparare.

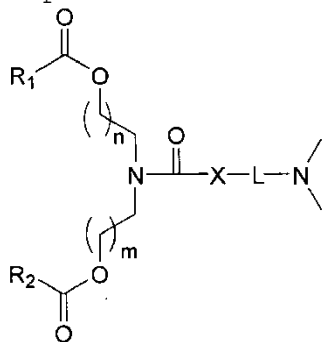
[0005] È stato riportato che sistemi di trasfezione non virali, per esempio, quelli che impiegano polimeri cationici, trasferiscono DNA plasmidico nelle cellule. Polimeri cationici, tuttavia, possono essere instabili e possono essere tossici per le cellule.

[0006] CA 2 800 818 A descrive un lipide cationico che si ritiene renda più facile introdurre un acido nucleico in una cellula. Sono anche descritti: una composizione che contiene il lipide cationico e un acido nucleico; e un metodo per introdurre un acido nucleico in una cellula, usando la composizione contenente il lipide cationico e un acido nucleico. WO 2012/170952 A descrive composti correlati nonché composizioni e formulazioni farmaceutiche includenti uno di o entrambi questi composti che sono utili per il rilascio di agenti terapeutici; e metodi per usare queste composizioni e formulazioni farmaceutiche.

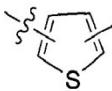
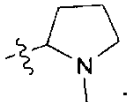
[0007] Come tale, vi è una necessità di nuovi composti, composizioni e metodi per usare una composizione cationica per migliorare il rilascio di agenti terapeutici a cellule, tessuti e organismi.

SOMMARIO

[0008] La presente descrizione è diretta a composti di lipide ionizzabile di formula I



in cui n e m sono indipendentemente 1, 2, 3 o 4; R₁ e R₂ sono indipendentemente C₁₀₋₁₈ alchile o C₁₂₋₁₈ alchenile; X è -CH₂-, S, O, N o assente; L è C₁₋₄ alchilene; -S-C₁₋₄ alchilene; -O-C₁₋₄ alchilene; -O-C(O)-

C₁₋₄ alchilene; -S(O)₂-C₁₋₄ alchilene;  C₁₋₄alchilene, o  ;

o una relativa forma di sale farmaceuticamente accettabile. Sono descritti anche composizioni, formulazioni farmaceutiche, veicoli farmaceutici e metodi per usare i composti di formula I.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

[0009]

La Fig. 1 raffigura l'efficacia sinergica *in vitro* di lipide ionizzabile: forme di realizzazione di lipide ionizzabile della presente descrizione

La Fig. 2 raffigura l'efficacia sinergica *in vitro* di lipide ionizzabile: forme di realizzazione di lipide

ionizzabile della presente descrizione

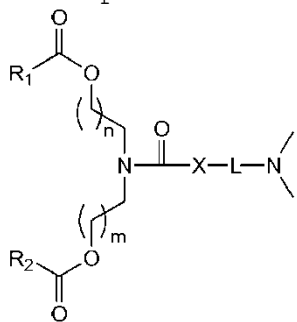
La Fig. 3 raffigura l'efficacia sinergica *in vitro* di lipide ionizzabile: forme di realizzazione di lipide cationico della presente descrizione

La Fig. 4 raffigura l'efficacia *in vivo* di lipide ionizzabile: forme di realizzazione di lipide cationico della presente descrizione

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DI FORME DI REALIZZAZIONE ILLUSTRATIVE

[0010] La presente descrizione è rivolta a composti di lipide ionizzabile, nonché ai loro usi nel rilascio di agenti terapeutici a cellule, tessuti e organismi.

[0011] Nell'ambito della descrizione rientrano composti di lipide ionizzabile di formula I:



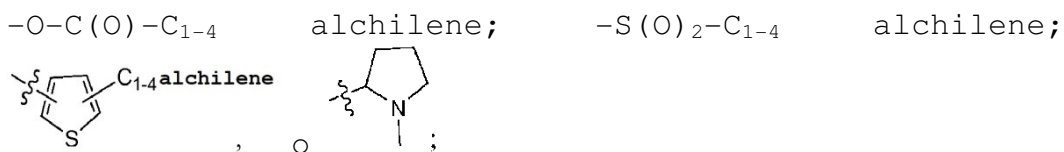
in cui

n e m sono indipendentemente 1, 2, 3 o 4;

R₁ e R₂ sono indipendentemente C₁₀₋₁₈ alchile o C₁₂₋₁₈ alchenile;

X è -CH₂-, S, O, N o assente;

L è C₁₋₄ alchilene; -S-C₁₋₄ alchilene; -O-C₁₋₄ alchilene;



o una relativa forma di sale farmaceuticamente accettabile.

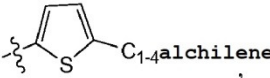
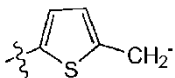
[0012] Nell'ambito della descrizione, n e m possono essere uguali o diversi. In forme di realizzazione preferite, n e m sono uguali. Particolarmente preferite sono quelle forme di realizzazione in cui n e m sono entrambi 1 o n e m sono entrambi 2.

[0013] In alcune forme di realizzazione della descrizione, X è un legame. In altre forme di realizzazione, X è $-CH_2-$. In altre ancora, X è S. Sono preferite anche forme di realizzazione in cui X è O. Nell'ambito della descrizione rientrano anche forme di realizzazione in cui X è N.

[0014] In alcune forme di realizzazione della descrizione, L è C_{1-4} alchilene. In altre forme di realizzazione, L è $-S-C_{1-4}$ alchilene. In ancora altre forme di realizzazione, L è $-O-C_{1-4}$ alchilene. In ancora altre forme di realizzazione, L è $-O-C(O)-C_{1-4}$ alchilene. In alternativa, L è $-S(O)_2-C_{1-4}$ alchilene. Nell'ambito della descrizione rientrano anche forme di realizzazione in cui L è



[0015] In queste forme di realizzazione in cui X è un legame, L è preferibilmente C₁₋₄alchilene. Tali esempi di L includono -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂ CH₂CH₂- e -CH₂ CH₂CH₂CH₂-.

In altre forme di realizzazione in cui X è un legame, L è , per esempio, .

[0016] In queste forme di realizzazione in cui X è -CH₂-, L è preferibilmente -S-C₁₋₄alchilene. Tali esempi di L includono -S-CH₂-, -S-CH₂-CH₂-, -S-CH₂CH₂CH₂- e -S-CH₂ CH₂CH₂CH₂-.

[0017] In altre forme di realizzazione in cui X è -CH₂-, L è preferibilmente -S(O)₂-C₁₋₄ alchilene. Tali esempi di L includono -S(O)₂-CH₂-, -S(O)₂-CH₂-CH₂-, -S(O)₂-CH₂-CH₂-CH₂- e S(O)₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-.

[0018] In ancora altre forme di realizzazione in cui X è un -CH₂-, L è -O-C₁₋₄alchilene. Tali esempi di L includono -O-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-, -O-CH₂CH₂CH₂- e -O-CH₂ CH₂CH₂CH₂-.

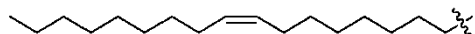
[0019] In queste forme di realizzazione della descrizione in cui X è S, L è preferibilmente C₁₋₄alchilene. Tali esempi di L includono -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂ CH₂CH₂- e -CH₂ CH₂CH₂CH₂-.

[0020] In queste forme di realizzazione in cui X è O, L è preferibilmente C₁₋₄alchilene. Tali esempi di L includono -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂ CH₂CH₂- e -CH₂ CH₂CH₂CH₂-.

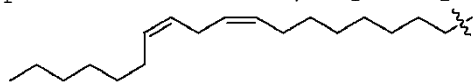
.

[0021] Nell'ambito della descrizione, R_1 e R_2 possono essere uguali o diversi. Preferibilmente, R_1 e R_2 sono uguali. Preferibilmente, R_1 e R_2 sono C_{10-18} alchile. Sono anche preferite forme di realizzazione in cui C_{10-18} alchile è C_{10-18} alchile di catena lineare. Maggiormente preferite sono forme di realizzazione in cui R_1 e R_2 sono C_{12-18} alchile. Preferite sono anche forme di realizzazione in cui R_1 e R_2 sono C_{12-15} alchile. Nella maggior parte delle forme di realizzazione preferite, R_1 e R_2 sono entrambi C_{13} alchile.

[0022] In altre forme di realizzazione della descrizione, R_1 e R_2 sono C_{12-18} alchenile. Preferibilmente, R_1 e R_2 sono C_{13-17} alchenile. Più preferibilmente, R_1 e R_2 sono ciascuno oleile:



[0023] In altre forme di realizzazione della descrizione, R_1 e R_2 sono C_{12-18} alchenile. Preferibilmente, R_1 e R_2 sono C_{13-17} alchenile. Più preferibilmente, R_1 e R_2 sono ciascuno linoleoile.



[0024] Nell'ambito della descrizione rientrano anche composizioni comprendenti un composto di formula I in un liposoma, in cui il liposoma comprende un doppio strato di molecole lipidiche. Mentre il composto di

formula I può comprendere una qualsiasi percentuale in moli delle molecole lipidiche in tali composizioni, è preferibile che il composto di formula I sia da circa il 5 a circa il 50% in moli delle molecole lipidiche delle composizioni della descrizione.

[0025] Composizioni di descrizione comprendenti un composto di formula I in un liposoma possono contenere più di un composto di formula I. In forme di realizzazione preferite, tali composizioni della descrizione includono due composti di formula I. In queste forme di realizzazione, è preferibile che il rapporto molare tra i due composti di formula I sia da circa 10:30 a circa 30:10.

[0026] Composizioni della descrizione comprendenti un composto di formula I in un liposoma possono comprendere anche un lipide cationico. In tali forme di realizzazione, il lipide cationico è da circa il 5 a circa il 40% in moli delle molecole lipidiche della composizione. Anche in queste forme di realizzazione comprendenti un composto di formula I in un liposoma con un lipide cationico, il rapporto molare tra il composto di formula I e il lipide cationico è da circa 5:35 a circa 35:5. Più preferibilmente, il rapporto è da circa 10:30 a circa 30:10.

[0027] Nell'ambito della descrizione, una qualsiasi

composizione della descrizione può inoltre comprendere un mezzo liquido. Preferibilmente, il mezzo liquido è idoneo per l'iniezione in un organismo vivente. In alcune forme di realizzazione, il mezzo liquido comprende un solvente organico. In alternativa, il mezzo liquido usato in certe forme di realizzazione della descrizione comprende acqua e un solvente organico. In altre forme di realizzazione della descrizione, il mezzo liquido può comprendere inoltre un mezzo non acquoso.

[0028] Anche nell'ambito della descrizione, una qualsiasi composizione della descrizione può inoltre comprendere almeno un fosfolipide.

[0029] In altre forme di realizzazione della descrizione, una qualsiasi composizione della descrizione può inoltre comprendere almeno un lipide coniugato a PEG.

[0030] Anche nell'ambito della descrizione rientrano veicoli farmaceutici specifici per cellule stellate. Queste forme di realizzazione della descrizione includono una qualsiasi delle composizioni summenzionate, nonché una quantità specifica per una cellula stellata di una molecola bersaglio costituita da (retinoide)_n-linker-(retinoide)_n, in cui n=0, 1, 2 o 3; e in cui il linker comprende un polietilenglicole

(PEG) o una molecola simile a PEG.

[0031] In forme di realizzazione preferite, i veicoli farmaceutici della descrizione comprendono anche una molecola di siRNA.

[0032] Anche nell'ambito della descrizione rientrano formulazioni farmaceutiche. Formulazioni farmaceutiche nell'ambito della descrizione includono uno qualsiasi dei veicoli farmaceutici summenzionati della descrizione e un veicolo o diluente farmaceuticamente accettabile. Si preferisce che in tali formulazioni, il siRNA sia incapsulato dal liposoma delle composizioni della descrizione.

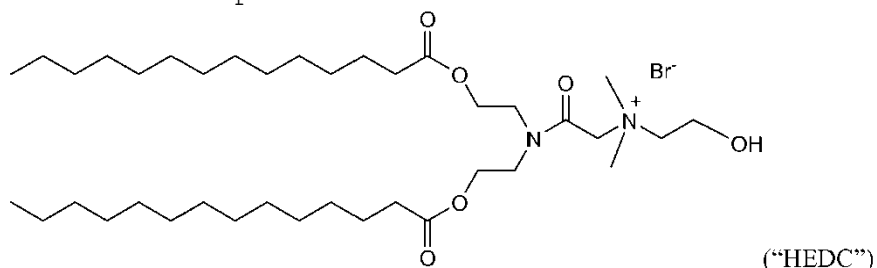
[0033] Anche nell'ambito della descrizione rientrano metodi per rilasciare un farmaco a un paziente bisognoso di trattamento. Questi metodi comprendono fornire una formulazione farmaceutica nell'ambito della descrizione e somministrare la formulazione farmaceutica per il paziente.

Definizioni

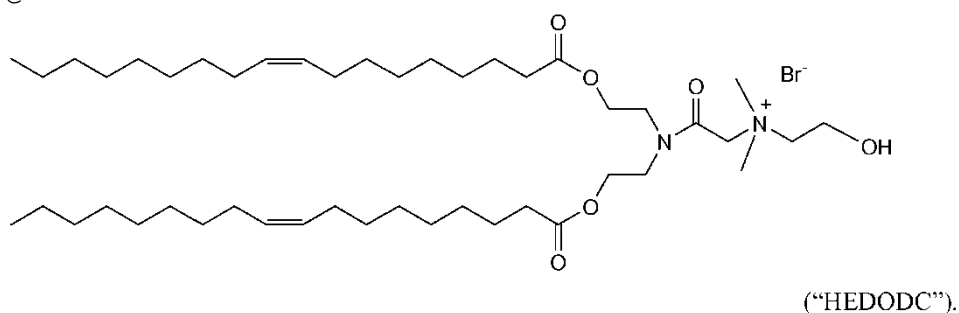
[0034] I seguenti termini sono usati in tutta questa descrizione.

[0035] Come usato nella presente, "lipide cationico" si riferisce a un composto che include almeno una frazione lipidica e un azoto quaternario carico positivamente associato a un controione. Nella tecnica è compreso che

i "lipidi" sono composti da una frazione alchilica o alchenilica idrofoba e una frazione di acido carbossilico o estere. Lipidi cationici preferiti per l'uso nella presente descrizione includono:



e



[0036] Come usato nella presente, "lipide ionizzabile" si riferisce a un composto di formula I nell'ambito della descrizione. Questi composti sono in grado di formare specie caricate quando a contatto con una specie di controione appropriata, per esempio, una specie che include un atomo di idrogeno ionizzabile.

[0037] Come usato nella presente, "alchile" si riferisce a un gruppo idrocarburico interamente lineare o ramificato saturo (assenza di doppi o tripli legami), per esempio, un gruppo avente la formula generale - C_nH_{2n+1} . Il gruppo alchile può avere da 1 a 50 atomi di carbonio (ogni volta che compare nella presente, un

intervallo numerico come "da 1 a 50" si riferisce a ciascun numero intero nell'intervallo dato; per esempio, "da 1 a 50 atomi di carbonio" significa che il gruppo alchile può essere costituito da 1 atomo di carbonio, 2 atomi di carbonio e 3 atomi di carbonio, ecc., fino a e includente 50 atomi di carbonio, sebbene la presente definizione comprenda anche la ricorrenza del termine "alchile" dove nessun intervallo numerico è indicato). Il gruppo alchile può essere un alchile di dimensione media avente da 1 a 30 atomi di carbonio. Il gruppo alchile può anche essere un alchile inferiore avente da 1 a 5 atomi di carbonio. Il gruppo alchile dei composti può essere denominato come "C₁₋₄ alchile" o denominazioni analoghe. A solo titolo esemplificativo, "C₁₋₄ alchile" indica che vi sono da uno a quattro atomi di carbonio nella catena alchilica, ossia la catena alchilica è selezionata dal gruppo costituito da metile, etile, propile, isopropile, n-butile, isobutile, sec-butile e t-butile. Tipici gruppi alchile includono, in via non limitativa, metile, etile, propile, isopropile, butile, isobutile, butile terziario, pentile, esile e simili.

[0038] Come usato nella presente, "alchilene" si riferisce a un gruppo funzionale alcandiile, per esempio, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, e

simili.

[0039] Come usato nella presente, "alchenile" si riferisce a un gruppo alchile che contiene nella catena idrocarburica lineare o ramificata uno o più doppi legami. Oleile è un esempio di un tale gruppo alchenile.

[0040] Come usato nella presente, il termine "veicolo farmaceutico" si riferisce a un composto chimico che facilita l'incorporazione di un composto nelle cellule o nei tessuti. Per esempio, dimetil solfossido (DMSO) è un veicolo comunemente usato in quanto facilita l'assorbimento di molti composti organici nelle cellule o nei tessuti di un organismo.

[0041] Come usato nella presente, il termine "diluente" si riferisce a composti chimici diluiti in acqua che dissolvono la formulazione di interesse (per esempio, la formulazione che può includere un composto, un retinoide, un secondo lipide, un agente stabilizzante e/o un agente terapeutico) nonché stabilizzano la forma biologicamente attiva della formulazione. Sali dissolti in soluzioni tampone sono usati come diluenti nella tecnica. Una soluzione tampone comunemente usata è il tampone fosfato salino poiché mima le condizioni saline del sangue umano. Poiché sali tampone possono controllare il pH di una soluzione a basse

concentrazioni, un diluente tampone raramente modifica l'attività biologica della formulazione. Come usato nella presente, un "eccipiente" si riferisce a una sostanza inerte che viene addizionata a una formulazione per fornire, in via non limitativa, volume, consistenza, stabilità, capacità legante, lubrificazione, capacità disintegrante, ecc., alla composizione. Un "diluente" è un tipo di eccipiente.

[0042] "Solventi organici" usati nell'ambito della descrizione sono noti nella tecnica, di per sé e includono, per esempio, C₁₋₄, alcoli alchilici, dimetil solfossido ("DMSO"), e simili.

[0043] Come usato nella presente, "agente terapeutico" si riferisce a un composto che, in seguito alla somministrazione a un mammifero in una quantità terapeuticamente efficace, fornisce un beneficio terapeutico per il mammifero. Un agente terapeutico può essere denominato nella presente come farmaco. I tecnici del ramo apprezzeranno che il termine "agente terapeutico" non è limitato a farmaci che hanno ricevuto l'approvazione delle autorità. Un "agente terapeutico" può essere operativamente associato a un composto come descritto nella presente, un retinoide e/o un secondo lipide. Per esempio, un secondo lipide, come descritto nella presente, può formare un liposoma,

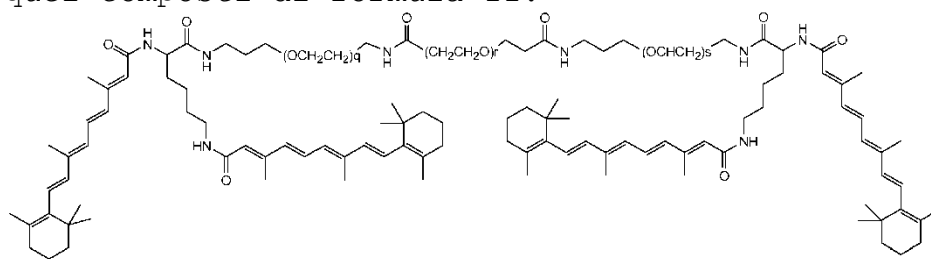
e l'agente terapeutico può essere operativamente associato al liposoma, per esempio, come descritto nella presente.

[0044] Come usato nella presente, un "retinoide" è un membro della classe di composti costituiti da quattro unità isoprenoidi unite in un modo testa-coda, si veda G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents," 2° Ed. Portland Press, pp. 247-251 (1992). "Vitamina A" è il descrittore generico per retinoidi che presentano qualitativamente l'attività biologica di retinolo. Come usato nella presente, retinoide si riferisce a retinoidi naturali e sintetici inclusi retinoidi di prima generazione, seconda generazione e terza generazione. Esempi di retinoidi presenti in natura includono, in via non limitativa, (1) 11-cis-retinale, (2) tutto-trans retinolo, (3), retinil palmitato, (4) acido tutto-trans retinoico, e (5) acidi 13-cis-retinoici. Inoltre, il termine "retinoide" comprende, retinoli, retinali, acidi retinoici, retinoidi, e loro derivati.

[0045] Come usato nella presente, "coniugato di retinoide" si riferisce a una molecola che include almeno una frazione di retinoide. In forme di realizzazione preferite della descrizione, il coniugato di retinoide è presente a una concentrazione da circa

lo 0,3 a circa il 30 per cento in peso, sulla base del peso totale della composizione o formulazione, che è equivalente a circa lo 0,1 a circa il 10% in moli, il che è equivalente a un rapporto molare da circa 0,1 a circa 10. Preferibilmente, il coniugato di retinoide è una molecola di retinoide-linker-lipide o una molecola di retinoide-linker-retinoide.

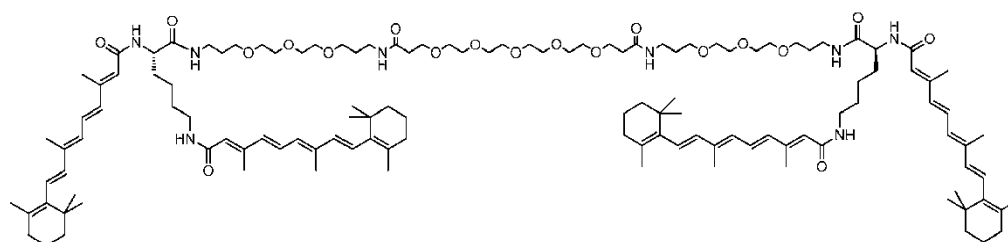
[0046] Un esempio di un coniugato di retinoide include quei composti di formula II:



II

in cui q , r e s sono ciascuno indipendentemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, e loro enantiomeri e diastereomeri.

[0047] Composti preferiti di formula II includono quelli in cui q , r e s sono ciascuno indipendentemente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. Più preferiti sono quei composti di formula II in cui q , r e s sono ciascuno indipendentemente 3, 4 o 5. Più preferiti sono quei composti di formula II in cui q è 3, r è 5 e s è 3. Un esempio di un composto di formula II è



DiVA-PEG-DiVA

[0048] DiVA-PEG-DiVA include stereocentri e tutti gli enantiomeri e diastereomeri sono considerati rientrare nell'ambito della descrizione.

[0049] Come usato nella presente, "la molecola di retinoide-linker-lipide" si riferisce a una molecola che include almeno una frazione di retinoide fissata ad almeno una frazione lipidica tramite almeno un linker come, per esempio, una frazione di PEG.

[0050] Come usato nella presente, "la molecola di retinoide-linker-retinoide" si riferisce a una molecola che include almeno una frazione di retinoide fissata ad almeno un'altra frazione di retinoide (che può essere uguale o diversa) tramite almeno un linker come, per esempio, una frazione di PEG.

[0051] Come usati nella presente, i termini "lipide" e "lipofilo" sono usati nei loro significati ordinari come inteso dai tecnici del ramo. Esempi non limitativi di lipidi e gruppi lipofili includono acidi grassi, steroli, C₂-C₅₀ alchile, C₂-C₅₀ eteroalchile, C₂-C₅₀ alchenile, C₂-C₅₀eteroalchenile, C₂-C₅₀ arile, C₂-C₅₀ eteroarile, C₂-C₅₀ alchinile, C₂-C₅₀heteroalchinile, C₂-

C₅₀ carbossilchenile e C₂-C₅₀ carbossieteroalchenile. Un acido grasso è un acido monocarbossilico saturo o insaturo a catena lunga che contiene, per esempio, da 12 a 24 atomi di carbonio. Un lipide è caratterizzato dal fatto di essere essenzialmente insolubile in acqua, avendo un'idrosolubilità inferiore a circa lo 0,01% (base in peso). Come usati nella presente, i termini "frazione lipidica" e "frazione lipofila" si riferiscono a un lipide o una sua porzione che è diventato attaccato a un altro gruppo. Per esempio, un gruppo lipidico può diventare attaccato a un altro composto (per esempio, un monomero) mediante una reazione chimica tra un gruppo funzionale (come un gruppo di acido carbossilico) del lipide e un gruppo funzionale appropriato di un monomero.

[0052] Come usato nella presente, "cellula stellata" si riferisce a neuroni con diversi dendriti che si irradiano dal corpo cellulare. Esempi di cellule stellate sono interneuroni inibitori.

[0053] Come usato nella presente, "siRNA" si riferisce a piccoli RNA interferenti, anche noto nella tecnica come RNA interferente breve o RNA silenziatore. siRNA è una classe di molecole di RNA a doppio filamento che hanno una varietà di effetti noti nella tecnica, i più notevoli sono l'interferenza con l'espressione di geni

specifici e l'espressione di proteine.

[0054] Il termine "liposoma" è usato nella presente nel suo significato ordinario come compreso dai tecnici del ramo, e si riferisce a una struttura a doppio strato lipidico che contiene lipidi attaccati a gruppi idrofili polari che formano una struttura sostanzialmente chiusa in mezzi acquosi. In alcune forme di realizzazione, il liposoma può essere operativamente associato a uno o più composti, come un agente terapeutico e un retinoide. Un liposoma può essere costituito da un doppio strato lipidico singolo (ossia, unilamellare) o può essere costituito da due o più doppi strati lipidici (ossia, multilamellare). Mentre la parte interna di un liposoma può essere costituita da una varietà di composti, l'esterno del liposoma è accessibile alla formulazione acquosa comprendente il liposoma. Un liposoma può essere approssimativamente sferico o di forma ellissoidale.

[0055] In alcune forme di realizzazione, il siRNA è incapsulato mediante il liposoma cosicché il siRNA sia inaccessibile al mezzo acquoso. Quando viene incapsulato siRNA, il liposoma ha un nucleo solido; tali liposomi incapsulanti siRNA e aventi un nucleo solido sono denominati nella presente "nanoparticelle lipidiche". In altre forme di realizzazione, il siRNA

non può essere incapsulato dal liposoma. In tali forme di realizzazione, il siRNA può essere complessato sulla superficie esterna del liposoma miscelando liposomi preformati con RNA in una soluzione acquosa. In queste forme di realizzazione, il siRNA è accessibile al mezzo acquoso. Liposomi aventi siRNA legato solo sulla loro superficie esterna sono denominati nella presente "lipoplessi".

[0056] Le formulazioni della descrizione possono anche includere lipidi coniugati a PEG. Lipidi coniugati a PEG nell'ambito della descrizione sono noti nella tecnica di per sé. PEG-lipidi idonei includono PEG-fosfolipidi e PEG-ceramidi come, per esempio, PEG2000-DSPE, PEG2000-DPPE, PEG2000-DMPE, PEG2000-DOPE, PEG1000-DSPE, PEG1000-DPPE, PEG1000-DMPE, PEG1000-DOPE, PEG550-DSPE, PEG550-DPPE, PEG-550DMPE, PEG-1000DOPE, PEG-BML, PEG-colesterolo. PEG2000-Ceramide, PEG1000-Ceramide, PEG750-Ceramide, PEG550-Ceramide.

[0057] Le composizioni precedenti della descrizione possono includere uno o più fosfolipidi come, per esempio, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina ("DSPC"), dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina ("DPPE"), e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina ("DOPE"). Preferibilmente, il lipide helper è DOPE.

[0058] Anche nell'ambito della descrizione rientrano formulazioni farmaceutiche che includono una qualsiasi delle suddette composizioni oltre a un veicolo o diluente farmaceuticamente accettabile. Formulazioni farmaceutiche della descrizione includono almeno un agente terapeutico. Preferibilmente, l'agente terapeutico è un siRNA. È previsto che una qualsiasi molecola di siRNA possa essere usata nell'ambito della descrizione. Per esempio, siRNA può includere:

Senso (5'→3') GGACAGGCCUCUACAACUATT (SEQ. ID. n. 1)

Antisenso (3'→5') TTCCUGUCCGGAGAUGUUGAU (SEQ. ID. n. 2) e

Senso (5'→3') GGACAGGCCUGUACAACUATT (SEQ. ID. n. 3)

Antisenso (3'→5') TTCCUGUCCGGACAUGUUGAU (SEQ. ID. n. 4)

[0059] In formulazioni preferite della descrizione includenti siRNA, il siRNA è incapsulato dal liposoma. In altre forme di realizzazione, il siRNA può essere all'esterno del liposoma. In queste forme di realizzazione, il siRNA può essere complessato all'esterno del liposoma.

[0060] Anche nell'ambito della descrizione rientrano metodi per rilasciare un agente terapeutico a un paziente. Questi metodi comprendono fornire una formulazione farmaceutica che include una qualsiasi

delle precedenti composizioni e un veicolo o diluente farmaceuticamente accettabile; e somministrare la formulazione farmaceutica al paziente.

[0061] In un altro aspetto, la presente descrizione si riferisce a una formulazione farmaceutica comprendente uno o più agenti tensioattivi fisiologicamente accettabili, veicoli farmaceutici, diluenti, eccipienti, e agenti di sospensione, o una loro combinazione; e una formulazione (per esempio, la formulazione che può includere un composto, un retinoide, un secondo lipide, un agente stabilizzante e/o un agente terapeutico) descritta nella presente. Altri veicoli o diluenti farmaceutici accettabili per uso terapeutico sono ben noti nella tecnica farmaceutica e sono descritti, per esempio, in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18° Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Conservanti, stabilizzanti, coloranti e simili possono essere forniti nella formulazione farmaceutica. Per esempio, sodio benzoato, acido ascorbico ed esteri di acido p-idrossibenzoico possono essere addizionati come conservanti. Inoltre, possono essere usati antiossidanti e agenti di sospensione. In varie forme di realizzazione, alcoli, esteri, alcoli alifatici solfati, e simili possono essere usati come agenti

tensioattivi; saccarosio, glucosio, lattosio, amido, cellulosa cristallizzata, mannitolo, silicato anidro leggero, alluminato di magnesio, alluminato di metasilicato di magnesio, silicato di alluminio sintetico, carbonato di calcio, carbonato di acido sodico, idrogenofosfato di calcio, calcio carbossimetil cellulosa, e simili possono essere usati come eccipienti; olio di cocco, olio di oliva, olio di sesamo, olio di arachidi, soia possono essere usati come agenti di sospensione o lubrificanti; ftalato di acetato di cellulosa come derivato di un carboidrato come cellulosa o zucchero, o copolimero di metilacetato-metilacrilato come derivato di polivinile possono essere usati come agenti di sospensione; e plastificanti come estere ftalati e simili possono essere usati come agenti di sospensione.

[0062] Le formulazioni farmaceutiche descritte nella presente possono essere somministrate a un paziente umano di per sé, o in formulazioni farmaceutiche dove sono miscelate con altri principi attivi, come in una terapia di combinazione, o veicoli o uno o più eccipienti farmaceuticamente idonei. Tecniche per la formulazione e la somministrazione dei composti della presente domanda possono essere riscontrate in "Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing

Co., Easton, PA, 18° edizione, 1990.

[0063] Vie idonee di somministrazione possono includere, per esempio, rilascio parenterale, incluse iniezioni intramuscolari, sottocutanee, endovenose, intramidollari, nonché iniezioni intratecali, intraventricolari dirette, intraperitoneali, intranasali o intraoculari. La formulazione (per esempio, la formulazione che può includere un composto, un retinoide, un secondo lipide, un agente stabilizzante e/o un agente terapeutico) può anche essere somministrata in forme di dosaggio a rilascio controllato o prolungato, incluse iniezioni di deposito, pompe osmotiche, e simili, per somministrazione pulsata, prolungata e/o temporizzata a una velocità predeterminata. Inoltre, la via di somministrazione può essere locale o sistemica.

[0064] Le formulazioni farmaceutiche possono essere prodotte in un modo che è di per sé noto, per esempio, per mezzo di processi convenzionali di miscelazione, dissoluzione, granulazione, confettatura, levigazione, emulsione, incapsulamento, intrappolamento o pastigliatura.

[0065] Formulazioni farmaceutiche possono essere formulate in una qualsiasi maniera convenzionale usando uno o più veicoli farmaceutici fisiologicamente

accettabili comprendenti eccipienti e prodotti ausiliari che facilitano la lavorazione dei composti attivi nelle preparazioni che possono essere usate farmaceuticamente. Una formulazione adeguata dipende dalla via di somministrazione scelta. Una/o qualsiasi delle tecniche ben note, dei veicoli farmaceutici e degli eccipienti può essere usata/o come appropriato e come inteso nella tecnica; per esempio, in Remington's Pharmaceutical Sciences, sopra.

[0066] Prodotti iniettabili possono essere preparati in forme convenzionali, come soluzioni o sospensioni liquide, forme solide idonee per soluzione o sospensione in un liquido prima dell'iniezione, o come emulsioni. Eccipienti idonei sono, per esempio, acqua, soluzione salina, destrosio, mannitolo, lattosio, lecitina, albumina, glutammato di sodio, cisteina cloridrato e simili. Inoltre, se desiderato, le formulazioni farmaceutiche iniettabili possono contenere quantità minori di sostanze ausiliarie non tossiche, come agenti umettanti, agenti di tamponamento del pH e simili. Tamponi fisiologicamente compatibili includono, in via non limitativa, soluzione di Hanks, soluzione di Ringer o tampone di soluzione fisiologica salina. Se desiderato, possono essere usate preparazioni di miglioramento dell'assorbimento.

[0067] Formulazioni farmaceutiche per la somministrazione parenterale, per esempio, per iniezione di bolo o infusione continua, includono soluzioni acquose della formulazione attiva (per esempio, la formulazione che può includere un composto, un retinoide, un secondo lipide, un agente stabilizzante e/o un agente terapeutico) in forma idrosolubile. Inoltre, sospensioni dei composti attivi possono essere preparate come sospensioni per iniezione oleose idonee. Sospensioni per iniezione acquose possono contenere sostanze che aumentano la viscosità della sospensione, quali carbossimetilcellulosa sodica, sorbitolo o destrano. Opzionalmente, la sospensione può inoltre contenere stabilizzanti o agenti idonei che aumentano la solubilità dei composti per consentire la preparazione di soluzioni altamente concentrate. Le formulazioni per iniezione si possono presentare sotto forma di dosaggio unitario, per esempio, in ampolle o in contenitori multidose, con un conservante aggiunto. Le formulazioni possono assumere tali forme come sospensioni, soluzioni o emulsioni in veicoli oleosi o acquosi, e possono contenere agenti di formulazione quali agenti di sospensione, stabilizzanti e/o di dispersione. In alternativa, il principio attivo può essere sotto forma di polvere per la ricostituzione con

un veicolo idoneo, per esempio, acqua sterile apirogena, prima dell'uso.

[0068] Oltre alle preparazioni precedentemente descritte, le formulazioni possono anche essere formulate come una preparazione di deposito. Tali formulazioni a lunga azione possono essere somministrate mediante iniezione intramuscolare. Pertanto, per esempio, le formulazioni (per esempio, la formulazione che può includere un composto, un retinoide, un secondo lipide, un agente stabilizzante e/o un agente terapeutico) possono essere formulate con materiali polimerici o idrofobi idonei (per esempio, come emulsione in un olio accettabile) o resine a scambio ionico, o come derivati moderatamente solubili, per esempio, come sale moderatamente solubile.

[0069] Le composizioni e le formulazioni della descrizione possono anche essere formulate per rilascio topico e possono essere applicate alla pelle del soggetto usando un qualsiasi processo idoneo per applicazione di veicolo di rilascio topico. Per esempio, la formulazione può essere applicata manualmente, usando un applicatore, o mediante un processo che coinvolge entrambi. In seguito all'applicazione, la formulazione può essere lavorata sulla pelle del soggetto, per esempio, mediante

sfregamento. L'applicazione può essere eseguita più volte al giorno o una volta al giorno. Per esempio, la formulazione può essere applicata sulla pelle di un soggetto una volta al giorno, due volte al giorno o più volte al giorno, oppure può essere applicata una volta ogni due giorni, una volta ogni tre giorni o circa una volta a settimana, una volta ogni due settimane o una volta ogni varie settimane.

[0070] Alcune forme di realizzazione nella presente sono dirette a un metodo per rilasciare un agente terapeutico in una cellula. Per esempio, alcune forme di realizzazione sono dirette a un metodo per rilasciare un agente terapeutico come siRNA in una cellula. Cellule idonee per l'uso secondo i metodi descritti nella presente includono procarioti, lievito o cellule eucariotiche superiori, incluse cellule vegetali e animali (per esempio, cellule di mammifero). In alcune forme di realizzazione, le cellule possono essere cellule di fibrosarcoma umano (per esempio, linea cellulare HT1080). In altre forme di realizzazione, le cellule possono essere cellule stellate epatiche (linea cellulare LX2). In altre forme di realizzazione, le cellule possono essere cellule cancerose. In ancora altre forme di realizzazione, le cellule possono essere cellule staminali (linea

cellulare pHSC). Possono essere usate linee cellulari che sono sistemi modello per il tumore, inclusi, in via non limitativa, tumore alla mammella (linee cellulari MCF-7, MDA-MB-438), linea cellulare del glioblastoma U87, cellule B16F0 (melanoma), cellule HeLa (tumore della cervice uterina), cellule A549 (tumore del polmone), e linee cellulari tumorali di ratto GH3 e 9L. In queste forme di realizzazione, le formulazioni descritte nella presente possono essere usate per trasfettare una cellula. Queste forme di realizzazione possono includere la messa in contatto della cellula con una formulazione descritta nella presente che include un agente terapeutico, per rilasciare in tal modo un agente terapeutico alla cellula.

[0071] Nella presente sono descritti metodi per trattare una condizione caratterizzata da fibrosi anomala, che possono includere somministrare una quantità terapeuticamente efficace di una formulazione descritta nella presente. Condizioni caratterizzate da fibrosi anomala possono includere tumore e/o una malattia fibrotica. Tipi di tumore che possono essere trattati o migliorati mediante una formulazione descritta nella presente includono, in via non limitativa, tumore del polmone, tumore del pancreas, tumore alla mammella, tumore del fegato, tumore dello

stomaco e tumore del colon. In una forma di realizzazione, il tumore che può essere trattato o migliorato è tumore del pancreas. In un'altra forma di realizzazione, il tumore che può essere trattato o migliorato è tumore del polmone. Tipi di malattia fibrotica che possono essere trattati o migliorati mediante una formulazione descritta nella presente includono, in via non limitativa, fibrosi epatica, cirrosi epatica, pancreatite, fibrosi pancreatica, fibrosi cistica, cicatrizzazione delle corde vocali, fibrosi mucosale delle corde vocali, fibrosi laringea, fibrosi polmonare, fibrosi polmonare idiopatica, fibrosi cistica, mielofibrosi, fibrosi retroperitoneale e fibrosi sistemica nefrogenica. In una forma di realizzazione, la condizione che può essere trattata o migliorata è fibrosi epatica.

[0072] Le formulazioni o composizioni farmaceutiche descritte nella presente possono essere somministrate al soggetto mediante un qualsiasi mezzo idoneo. Esempi non limitativi di metodi di somministrazione includono, tra gli altri, (a) somministrazione tramite iniezione per via sottocutanea, intraperitoneale, endovenosa, intramuscolare, intradermica, intraorbitale, intracapsulare, intraspinale, intrasternale, o simili, incluso rilascio tramite pompa di infusione; (b)

somministrazione locale come tramite iniezione direttamente nell'area renale o cardiaca, per esempio, tramite impianto di deposito; nonché come ritenuto appropriato dai tecnici del ramo per portare il composto attivo a contatto con un tessuto vivente.

[0073] Composizioni farmaceutiche adatte per la somministrazione includono formulazioni (per esempio, la formulazione che può includere un composto, un retinoide, un secondo lipide, un agente stabilizzante e/o un agente terapeutico), in cui gli ingredienti attivi sono contenuti in una quantità efficace per raggiungere lo scopo previsto. La quantità terapeuticamente efficace dei composti descritti nella presente necessaria come dose dipende dalla via di somministrazione, dal tipo di animale, incluso l'uomo, che viene trattato, e dalle caratteristiche fisiche del particolare animale considerato. La dose può essere adattata in modo da ottenere un effetto desiderato, ma dipende da tali fattori quali il peso, la dieta, il medicinale concomitante e altri fattori che i tecnici nelle tecniche mediche riconosceranno. Più specificamente, una quantità terapeuticamente efficace indica una quantità di un composto efficace per prevenire, alleviare o migliorare i sintomi della malattia o prolungare la sopravvivenza del soggetto in

trattamento. La determinazione di una quantità terapeuticamente efficace è ben alla portata di un tecnico del ramo, specialmente alla luce della descrizione dettagliata fornita nel presente documento. [0074] Come risulterà prontamente chiaro a un tecnico del ramo, il dosaggio utile in vivo da somministrare e la particolare modalità di somministrazione variano a seconda dell'età, del peso e della specie di mammifero trattato, dai particolari composti impiegati e dall'uso specifico per il quale questi composti sono impiegati. La determinazione dei livelli di dosaggio efficaci, che sono i livelli di dosaggio necessari per ottenere il risultato desiderato, può essere eseguita da un tecnico del ramo usando metodi farmacologici di routine. Tipicamente, applicazioni cliniche sugli esseri umani di prodotti hanno inizio a livelli di dosaggio inferiori, il livello di dosaggio essendo aumentato fino a che si ottiene l'effetto desiderato. In alternativa, studi in vitro accettabili possono essere usati per stabilire dosi utili e vie di somministrazione delle composizioni identificate mediante i metodi presenti usando metodi farmacologicamente consolidati.

[0075] In studi su animali non umani, applicazioni di potenziali prodotti hanno inizio a livelli di dosaggio

più elevati, il dosaggio essendo diminuito fino a che l'effetto desiderato non è più raggiunto o effetti collaterali avversi scompaiono. Il dosaggio può variare ampiamente a seconda degli effetti desiderati e dell'indicazione terapeutica. Tipicamente, i dosaggi possono essere da circa 10 microgrammi/kg a circa 100 mg/kg di peso corporeo, preferibilmente da circa 100 microgrammi/kg a circa 10 mg/kg di peso corporeo. In alternativa, i dosaggi possono essere basati e calcolati in base all'area superficiale del paziente, come compreso dai tecnici del ramo.

[0076] La formulazione esatta, la via di somministrazione e il dosaggio per le composizioni farmaceutiche possono essere scelti dal singolo medico in considerazione delle condizioni del paziente. (Si veda, per esempio, Finigl et al. 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", con particolare riferimento al Cap. 1, p. 1). Tipicamente, l'intervallo di dose della composizione somministrata al paziente può essere da circa 0,5 a circa 1000 mg/kg di peso corporeo del paziente. Il dosaggio può essere uno singolo o una serie di due o più dati nel corso di uno o più giorni, a seconda delle necessità del paziente. Nei casi in cui dosaggi per gli esseri umani per composti siano stati stabiliti per almeno qualche

condizione, i dosaggi saranno circa uguali o dosaggi che sono da circa lo 0,1% a circa il 500%, più preferibilmente da circa il 25% a circa il 250% del dosaggio stabilito per gli esseri umani. Dove non è stabilito alcun dosaggio per gli esseri umani, come sarà il caso di composizioni farmaceutiche scoperte di recente, un dosaggio idoneo per gli esseri umani può essere dedotto da valori ED50 o ID50, o altri valori appropriati derivati da studi in vitro o in vivo, come qualificato da studi di tossicità e studi di efficacia negli animali.

[0077] Occorre notare che il medico curante dovrebbe sapere come e quando terminare, interrompere o regolare la somministrazione per via di tossicità o disfunzioni di organo. Al contrario, il medico curante dovrebbe conoscere anche come regolare un trattamento a livelli più elevati se la risposta clinica non è stata adeguata (precludendo la tossicità). La grandezza di una dose somministrata nella gestione del disturbo di interesse varia con la gravità della condizione da trattare e la via di somministrazione. La gravità della condizione può, per esempio, essere valutata, in parte, mediante metodi di valutazione prognostica standard. Inoltre, la dose e forse la frequenza della dose, variano anche in base all'età, al peso corporeo e alla risposta del

singolo paziente. Un programma analogo a quello sopra discusso può essere usato in medicina veterinaria.

[0078] Sebbene il dosaggio esatto sia determinato in base ai farmaci, nella maggior parte dei casi, possono essere fatte alcune generalizzazioni riguardanti il dosaggio. Il regime di dosaggio giornaliero per un paziente umano adulto può, per esempio, essere una dose da circa 0,1 mg a 2000 mg di ciascun principio attivo, preferibilmente da circa 1 mg a circa 500 mg, per esempio, da 5 a 200 mg. In altre forme di realizzazione, viene usata una dose endovenosa, sottocutanea o intramuscolare di ciascun principio attivo da circa 0,01 mg a circa 100 mg, preferibilmente da circa 0,1 mg a circa 60 mg, per esempio, da circa 1 a circa 40 mg. In caso di somministrazione di un sale farmaceuticamente accettabile, i dosaggi possono essere calcolati come base libera. In alcune forme di realizzazione, la formulazione viene somministrata da 1 a 4 volte al giorno. In alternativa, le formulazioni possono essere somministrate tramite infusione endovenosa continua, preferibilmente a una dose di ciascun principio attivo fino a circa 1000 mg al giorno. Come verrà compreso dai tecnici del ramo, in alcune situazioni può essere necessario somministrare le formulazioni descritte nella presente in quantità

che superano, o addirittura superano di gran lunga quanto sopra indicato, l'intervallo di dosaggio preferito al fine di trattare in modo efficace e aggressivo malattie o infezioni particolarmente aggressive. In alcune forme di realizzazione, le formulazioni sono somministrate per un periodo di una terapia continua, per esempio, per una settimana o più, o per mesi o anni.

[0079] La quantità di dosaggio e l'intervallo possono essere regolati individualmente per fornire livelli plasmatici della frazione attiva che sono sufficienti per mantenere gli effetti modulatori, o concentrazione efficace minima (MEC). La MEC varia per ciascun composto ma può essere stimata a partire da dati in vitro. Dosaggi necessari per ottenere la MEC dipendono da caratteristiche individuali e dalla via di somministrazione. Tuttavia, saggi HPLC o biologici possono essere usati per determinare le concentrazioni plasmatiche.

[0080] Gli intervalli di dosaggio possono anche essere determinati usando il valore MEC. Composizioni devono essere somministrate usando un regime che mantiene i livelli plasmatici al di sopra della MEC per il 10-90% del tempo, preferibilmente tra il 30-90% e più preferibilmente tra il 50-90%.

[0081] In casi di somministrazione locale o assorbimento selettivo, la concentrazione locale efficace del farmaco può non essere correlata alla concentrazione plasmatica.

[0082] La quantità di formulazione somministrata può dipendere dal soggetto da trattare, dal peso del soggetto, dalla gravità della malattia, dalla modalità di somministrazione e dal giudizio del medico curante.

[0083] Formulazioni descritte nella presente (per esempio, la formulazione che può includere un composto, un retinoide, un secondo lipide, un agente stabilizzante e/o un agente terapeutico) possono essere valutate per efficacia e tossicità usando metodi noti. Per esempio, la tossicologia di un particolare composto o di un sottoinsieme dei composti, che condividono alcune frazioni chimiche, può essere stabilita determinando in vitro la tossicità verso una linea cellulare, come un mammifero, come una linea cellulare di mammifero e preferibilmente di essere umano. I risultati di tali studi sono spesso predittivi di tossicità in animali, quali mammiferi, o più specificamente, esseri umani. In alternativa, la tossicità di particolari composti in un modello animale, come topi, ratti, conigli o scimmie, può essere determinato usando metodi noti. L'efficacia di

un particolare composto può essere stabilita usando diversi metodi riconosciuti, come metodi in vitro, modelli animali, o studi clinici su esseri umani. Modelli in vitro riconosciuti esistono per quasi ogni classe di condizione inclusi, in via non limitativa, tumore, malattia cardiovascolare e varie disfunzioni immunitarie. Analogamente, modelli animali accettabili possono essere usati per stabilire l'efficacia di prodotti chimici per trattare tali condizioni. Quando si seleziona un modello per determinare l'efficacia, il tecnico può essere guidato dallo stato della tecnica per scegliere un modello appropriato, la dose e la via di somministrazione, e il regime. Naturalmente, studi clinici su esseri umani possono anche essere usati per determinare l'efficacia di un composto negli esseri umani.

[0084] Le formulazioni possono, se desiderato, essere presentate in una confezione o dispositivo erogatore che può contenere una o più forme di dosaggio unitario contenenti il principio attivo. La confezione può comprendere, per esempio, un foglio di metallo o plastica, come una confezione blister. La confezione o il dispositivo erogatore può essere accompagnato da istruzioni per la somministrazione. La confezione o l'erogatore può anche essere accompagnato da una nota

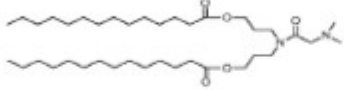
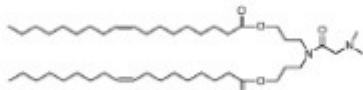
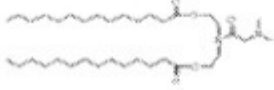
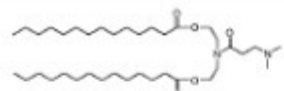
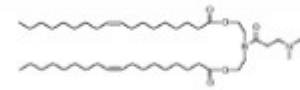
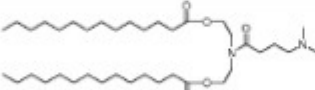
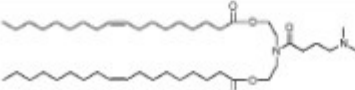
associata al contenitore nella forma prescritta da un'agenzia governativa che regola la produzione, l'uso o la vendita di prodotti farmaceutici, la quale nota riflette l'approvazione da parte dell'agenzia della forma del farmaco per somministrazione umana o veterinaria. Tale nota può, per esempio, essere l'etichettatura approvata dalla Food and Drug Administration statunitense per farmaci con prescrizione, o l'inserito di prodotto approvato. Composizioni comprendenti un composto formulato in un veicolo farmaceutico compatibile possono anche essere preparate, poste in un contenitore appropriato ed etichettate per il trattamento di una condizione indicata.

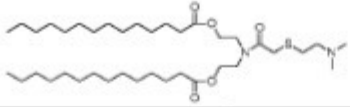
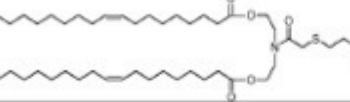
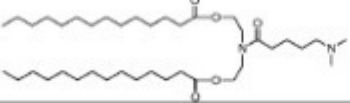
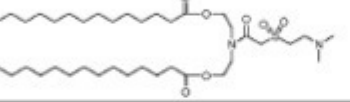
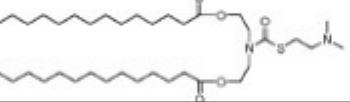
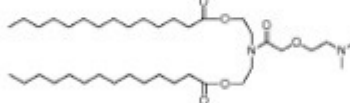
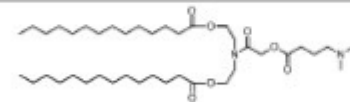

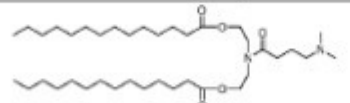

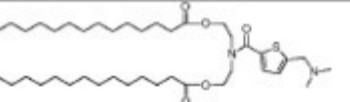
[0085] Resta inteso che, in un qualsiasi composto descritto nella presente avente uno o più stereocentri, se una stereochimica assoluta non è espressamente indicata, quindi ogni centro può indipendentemente essere di configurazione R o configurazione S o una loro miscela. Pertanto, i composti forniti nella presente possono essere enantiomericamente puri o essere miscele stereoisomeriche. Inoltre, resta inteso che, in un qualsiasi composto avente uno o più doppi legami generanti isomeri geometrici che possono essere definiti come E o Z, ciascun doppio legame può essere

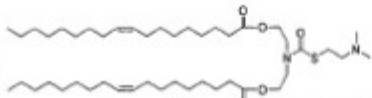
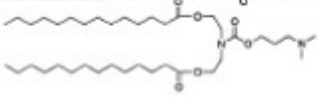
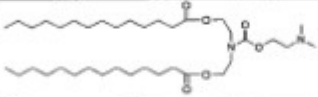
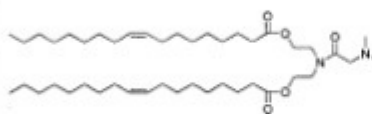
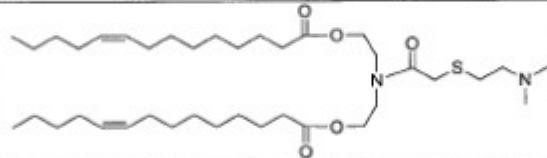
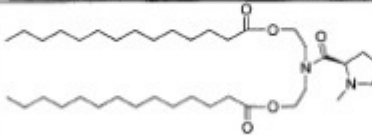
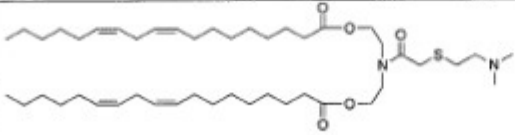
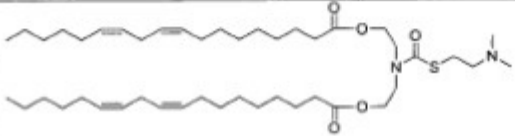
indipendentemente E o Z o una loro miscela. Analogamente, tutte le forme tautomere sono altresì intese essere incluse.

[0086] Composti preferiti di formula I nell'ambito della descrizione sono esposti nella Tabella 1. Dati *in vitro* e *in vivo* (si veda *infra*) sono anch'essi esposti nella Tabella 1.

Tabella 1

Lipide	Struttura	<i>in vitro</i> (pHSC) % KD @ 50 nM	<i>in vivo</i> (EMDQ di ratto) % KD
i-Pr-DC		53% @ 50 nM	
i-Pr-DODC		60% @ 50 nM	
i-DC		89% @ 200 nM	
i-Et-DC (Et104)		65% @ 50 nM	
i-Et-DODC		43% @ 50 nM	
i-Prop-DC		55% @ 50 nM	
i-Prop-DODC		55% @ 50 nM	

Lipide	Struttura	<i>in vitro</i> (pHSC) % KD	<i>in vivo</i> (DPOQ di ratto) % KD
S104		68% @ 50 nM	52% @ 0.5 mpk
S104-DO		78% @ 20 nM	65% @ 0.5 mpk
C104		53% @ 20 nM	75% @ 0.5 mpk
SO2-S104		75% @ 20 nM	18% @ 0.5 mpk
TU104		76% @ 20 nM	
O104		55% @ 20 nM	
HEDC-M1		53% @ 20 nM	
C104-DO		32% @ 20 nM	
Pr104		54% @ 20 nM	
Pr104-DO		27% @ 20 nM	
T104		58% @ 20 nM	

Lipide	Struttura	<i>in vitro</i> (pHSC) % KD	<i>in vivo</i> (DMOQ di ratto) % KD
TU104-DO		81% @ 20 nM	40% @ 0.25 mpk
CB104		42% @ 20 nM	
CA104			
INT-4		70% @ 50 nM	
S104-DMO		40% @ 10 nM	
Pro-DC			
S104-DLin			
TU104-DLin			

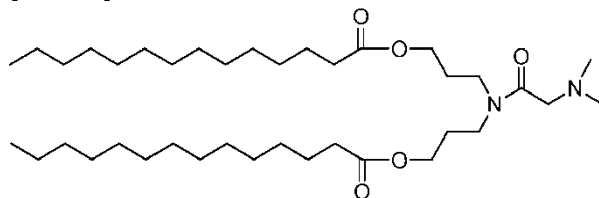
[0087] La descrizione può essere ulteriormente esemplificata facendo riferimento ai seguenti esempi. Questi esempi sono solamente illustrativi e non sono intesi limitare la descrizione.

SEZIONE SPERIMENTALE

Preparazione di ((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil)

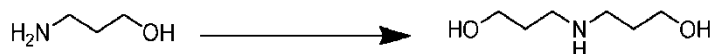
ditetradecanoato (i-Pr-DC)

[0088]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: 3,3'-azanodiilbis(propan-1-olo)

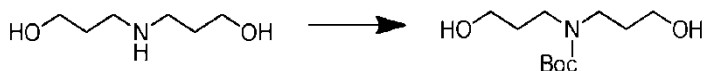
[0089]



[0090] Una miscela di 3-ammino-1-propanolo (14,5 mL, 19,0 mmol), 1-cloro-3-idrossi-propano (8,00 mL, 95,6 mmol) e H₂O (□50 mL) è stata fatta rifluire per 24 ore. In seguito, è stato addizionato idrossido di potassio (5,40 g). Dopo la dissoluzione, tutta l'acqua è stata fatta evaporare per lasciare un olio viscoso e grandi quantità di cloruro di potassio. Questi sono stati filtrati e lavati con acetone anidro e diclorometano. La fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄, filtrata e fatta evaporare per lasciare un olio. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato 3,3'-azanodiilbis(propan-1-olo) (12,5 g).

Fase 2: Preparazione di intermedio 2: terz-butil bis(3-idrossipropil) carbammato

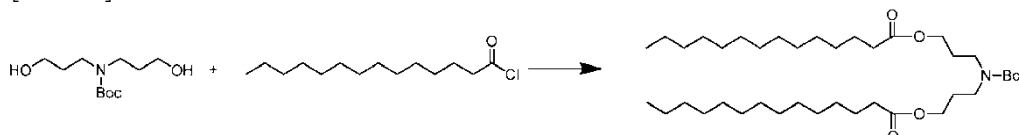
[0091]



[0092] 3,3'-azanodiilbis(propan-1-olo) (12,5 g, 95,4 mmol) è stata diluita in DCM (25 mL). Una soluzione di di-terz-butyl bicarbonato (26,0 g, 119 mmol) in DCM (25 mL) è stata addizionata lentamente in agitazione sotto una coperta di gas argo. La reazione è stata lasciata agitare per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato terz-butyl bis(3-idrossipropil)carbammato.

Fase 3: Preparazione di intermedio 3: ((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(propan-3,1-diil) ditetradecanoato

[0093]

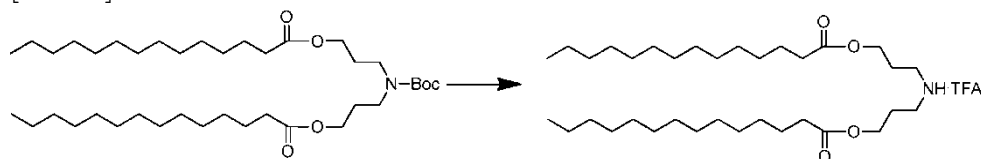


[0094] terz-butyl-bis(3-idrossipropil)carbammato (4,00 g, 17,3 mmol), Et₃N (4,8 mL, 34,6 mmol) e DMAP (529 mg, 4,33 mmol) sono stati dissolti in cloroformio (50 mL). Mentre in agitazione in un bagno di ghiaccio, una soluzione di cloruro di miristoile è stata addizionata per 15 min. L'addizione è stata effettuata in modo tale che la temperatura della reazione non superasse 30 °C. La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. Il giorno successivo, MeOH (50

mL) e una soluzione salina allo 0,9% (50 mL) sono stati addizionati per estinguere la reazione. La fase organica è stata separata e lavata con 1M NaHCO₃. Il solvente è stato essiccato con Na₂SO₄, filtrato e concentrato in vacuo per dare ((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil) ditetradecanoato come un olio che è stato fatto progredire senza ulteriore purificazione.

Fase 4: Preparazione di Intermedio 4: sale TFA di azanodiilbis (propan-3,1-diil) ditetradecanoato

[0095]

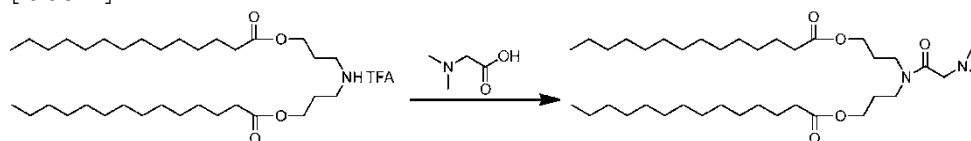


[0096] ((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil) ditetradecanoato (11,3 g, 17,3 mmol) è stato dissolto in TFA/CHCl₃ (1:1, 20 mL) e la miscela è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 15 minuti. Il materiale è stato in seguito concentrato in vacuo. Questo è stato ripetuto una seconda volta. Il materiale è stato in seguito dissolto in DCM e lavato con H₂O, essiccato con Na₂SO₄, concentrato in vacuo ed essiccato completamente per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato un sale TFA di

azanodiilbis(propano-3,1-diil) ditetradecanoato (7,5 g).

Fase 5: Preparazione di *i-Pr-DC*: ((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil) ditetradecanoato

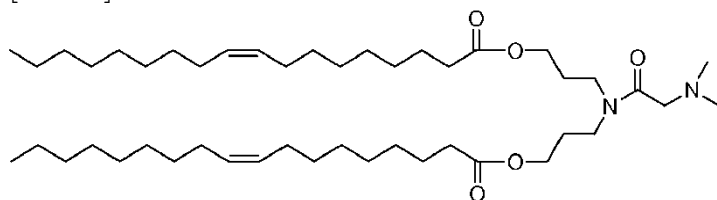
[0097]



[0098] Sale TFA di azanodiilbis(propano-3,1-diil) ditetradecanoato (750 mg, 1,35 mmol) è stato diluito con DCM (5 mL) e addizionato a una miscela pre-attivata di N,N-dimetilglicina (154 mg, 1,49 mmol), HATU (616 mg, 1,62 mmol) e DIEA (495 uL, 2,84 mmol) in DCM (5 mL). Un pallone è stato spurgato con argo e lasciato agitare a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato ((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil) ditetradecanoato (465 mg). QTOF MS ESI+: m/z 639,6 (M + H).

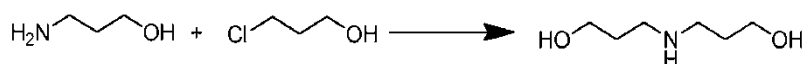
Preparazione di *(Z)*-((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil)dioloato
(i-Pr-DODC)

[0099]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: 3,3'-azanodiilbis(propan-1-olo)

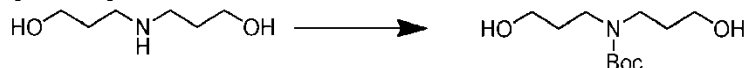
[0100]



[0101] Una miscela di 3-ammino-1-propanolo (14,5 mL, 19,0 mmol), 1-cloro-3-idrossi-propano (8,00 mL, 95,6 mmol) e acqua (50 mL) è stata fatta rifluire per 24 ore. In seguito, è stato addizionato idrossido di potassio (5,40 g). Dopo la dissoluzione, tutta l'acqua è stata fatta evaporare per lasciare un olio viscoso e grandi quantità di cloruro di potassio. Questi sono stati filtrati e lavati con acetone anidro e diclorometano. La fase organica è stata essiccata su Na₂SO₄, filtrata e fatta evaporare per lasciare un olio. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato 3,3'-azanodiilbis(propan-1-olo) (12,5 g).

Fase 2: Preparazione di intermedio 2: *terz-butil bis(3-idrossipropil) carbammato*

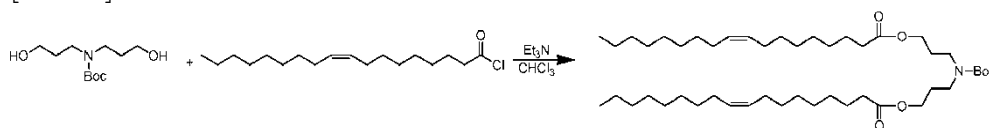
[0102]



[0103] 3,3'-azanodiilbis(propan-1-olo) (12,5 g, 95,4 mmol) è stata diluita in DCM (25 mL). Una soluzione di di-terz-butil bicarbonato (26,0 g, 119 mmol) in DCM (25 mL) è stata addizionata lentamente in agitazione sotto una coperta di gas Ar. La reazione è stata lasciata agitare per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato terz-butil bis(3-idrossipropil)carbammato.

Fase 3: Preparazione di intermedio 3: (Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(propan-3,1-diil) dioleato

[0104]

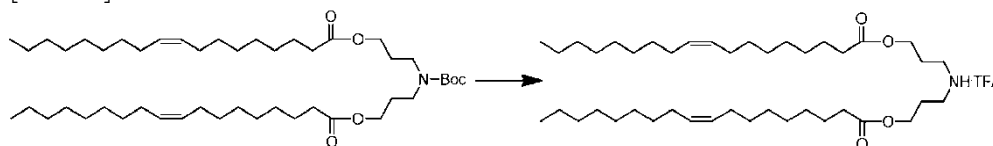


[0105] terz-butil bis(3-idrossipropil)carbammato, trietilammina e DMAP sono stati dissolti in cloroformio. Mentre viene agitata in un bagno di ghiaccio, una soluzione di cloruro di oleile è stata addizionata per 15 minuti. L'addizione è stata effettuata in modo tale che la temperatura della reazione non superasse 30 °C. La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. Il giorno successivo, MeOH (50 mL) e una soluzione salina allo 0,9% (50 mL) sono stati addizionati per estinguere la reazione. La fase organica è stata

separata e lavata con 1M NaHCO₃. Il solvente è stato essiccato con Na₂SO₄, filtrato e concentrato in vacuo per dare (Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil)dioloato come olio che è stato fatto progredire senza ulteriore purificazione.

Fase 4: Preparazione di intermedio 4: sale TFA di (Z)-azanodiilbis(propano-3,1-diil) dioloato

[0106]



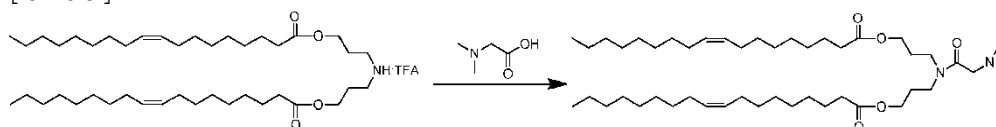
[0107]

(Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil)dioloato (13,2 g, 17,3 mmol) è stato dissolto in TFA/CHCl₃ (1:1, 20 mL) e la miscela è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 15 minuti. Il materiale è stato in seguito concentrato in vacuo. Questo è stato ripetuto una seconda volta. Il materiale è stato in seguito dissolto in DCM e lavato con H₂O, essiccato con Na₂SO₄ e concentrato in vacuo. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato un sale TFA di (Z)-azanodiilbis(propano-3,1-diil)dioloato.

Fase 5: Preparazione di i-Pr-DODC: (Z)-((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil)

diolateo

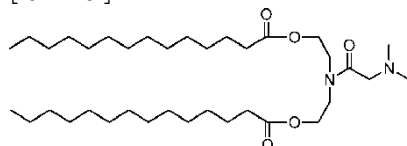
[0108]



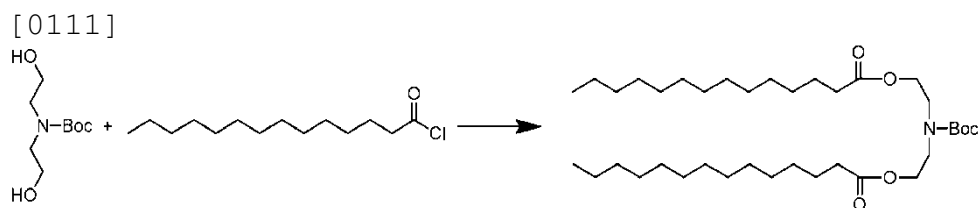
[0109] Sale TFA di (Z)-azanodiilbis(propano-3,1-diil) diolateo (750 mg, 1,13 mmol) è stato diluito con DCM (5 mL) e addizionato a una miscela pre-attivata di N,N-dimetilglicina (128 mg, 1,24 mmol), HATU (517 mg, 1,36 mmol) e DIEA (413 uL, 2,37 mmol) in DCM (5 mL). Un pallone è stato spurgato con argo e lasciato agitare a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato (Z)-((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(propano-3,1-diil) diolateo (450 mg). QTOF MS ESI+: m/z 747,7 (M + H).

Preparazione di ((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato, (i-DC)

[0110]



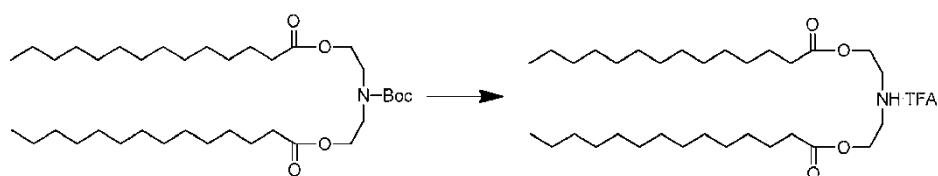
Fase 1: Preparazione di intermedio 1: ((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato



[0112] N-Boc dietanolamina (MW 205,25; 8,4 g, 0,041 mole), trietilamina (MW 101,19; 11,5 ml, 0,083 moli) e 4-(dimetilammino)piridina (MW 122,17; 1,3 g, 0,011 moli) sono state dissolte in cloroformio (170 mL). Mentre viene agitata in un bagno di ghiaccio/acqua, una soluzione di cloruro di miristoile (MW 246,82; 22 mL, 80,9 mmol) in 100 mL di cloroformio è stata addizionata goccia a goccia. La miscela di reazione è stata in seguito estratta dal bagno freddo, e l'agitazione è stata continuata a temperatura ambiente per 2 ore. Una miscela di 200 mL di metanolo e 200 ml di soluzione salina allo 0,9% è stata addizionata per estinguere la reazione. L'agitazione è stata interrotta e lo strato organico è stato isolato. Il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante per dare ((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato come un olio incolore (25,7 g) che è stato fatto progredire senza ulteriore purificazione.

Fase 2: Preparazione di intermedio 2: sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil)ditetradecanoato

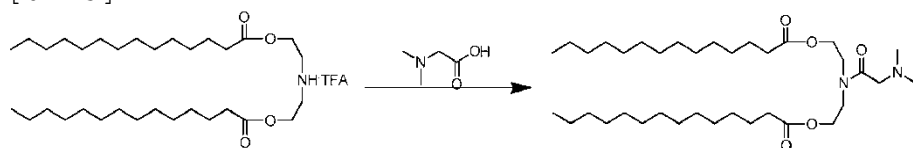
[0113]



[0114] A una soluzione di ((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (33,0 g, 0,053 moli) in 100 ml di cloroformio è stato addizionato acido trifluoroacetico (150 mL, 2,02 mol). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Dopo che il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante, il solido morbido risultante è stato ricristallizzato da 80 ml di metanolo per dare sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (16,6 g) come un solido bianco.

Fase 3: Preparazione di i-DC: ((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0115]

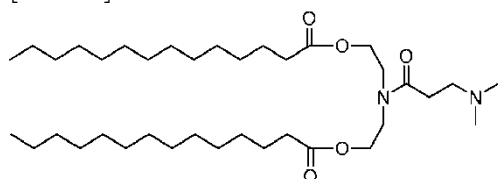


[0116] Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (10g, 16 mmol) è stato diluito con dimetilglicina (42,5g, 25 mmol), DCC (4,7 g, 23 mmol) e DIEA (6,33 mL, 40 mmol) in piridina (20 mL). Il pallone a fondo tondo è stato spurgato con gas argo e la

miscela di reazione è stata riscaldata a 55 °C per una notte. Il giorno successivo, la miscela di reazione è stata concentrata. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con DCM/MeOH, le frazioni raccolte sono state concentrate per dare ((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato.

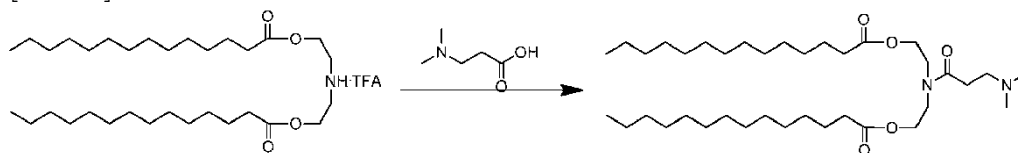
Preparazione di ((3-(dimetilammino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (i-Et-DC, anche denominato nella presente ET104)

[0117]



Preparazione di i-Et-DC: ((3-(dimetilammino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0118]

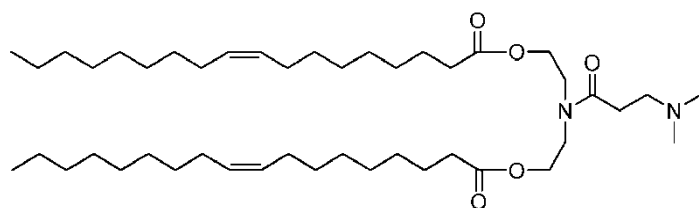


[0119] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1,50 g, 2,85 mmol) è stato diluito con DCM (10 mL) e

addizionato a una miscela pre-attivata di sale HCl di acido 3-(dimetilammino)propionico (482 mg, 3,14 mmol), HATU (1,30 g, 3,42 mmol) e DIEA (1,04 mL, 5,98 mmol) in DCM (10 mL). Il pallone a fondo tondo è stato spurgato con gas argo e la miscela di reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con DCM/MeOH, le frazioni raccolte sono state concentrate e agitate in DCM (20 mL) e 10% K₂CO₃ (20 mL) a 0-5 °C per 30 min. Lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con DCM (2 x 10 mL). I composti organici combinati sono stati agitati con MgSO₄ per 30 min a 0-5 °C, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare ((3-(dimetilammino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1,01 g). QTOF MS ESI+: m/z 625,6 (M + H).

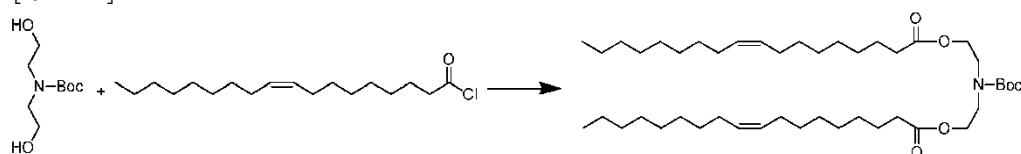
Preparazione **di** **(Z)-((3-
**(dimetilammino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-
diil)diolateo
i-Et-DODC****

[0120]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: (Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato

[0121]

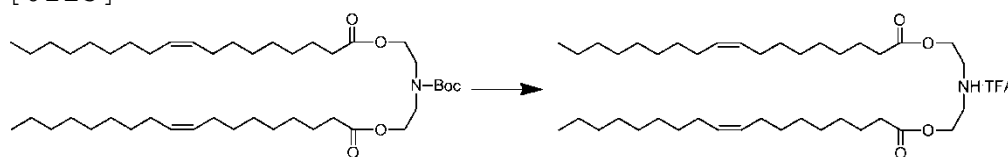


[0122] N-Boc dietanolamina (17,8 g, 0,087 moli), trietilamina (24,4 mL, 0,176 moli) e 4-(dimetilammino)piridina (2,76 g, 0,023 moli) sono stati dissolti in 350 ml di cloroformio. Mentre viene agitata, una soluzione di cloruro di oleile (61,6 g, 0,174 moli) in 100 ml di cloroformio è stata addizionata per 10 min (in alternativa, la soluzione di cloroformio di N-Boc dietanolamina è stata immersa in un bagno di ghiaccio/acqua mentre veniva addizionato cloruro di oleile). L'addizione è stata effettuata in modo tale che la temperatura della miscela di reazione non superi 50 °C. La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. Una miscela di 200 ml di metanolo e 200 ml di soluzione salina allo 0,9% è stata addizionata per estinguere la reazione. Lo strato organico è stato separato e lavato con 2 x 100 ml di bicarbonato di sodio acquoso diluito. Il solvente

è stato rimosso mediante evaporazione rotante per dare (Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato come un olio giallo chiaro (59,5 g). Questo materiale è stato usato per la fase successiva senza ulteriore purificazione. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 0,87 (t, 6H, CH_3), 1,20-1,40 (m, 40H, CH_2), 1,45 (s, 9H, tBu CH_3), 1,59 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$), 2,00 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 2,33 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$), 3,48 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4,18 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 5,33 (m, 4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Fase 2: Preparazione di intermedio 2: sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato

[0123]

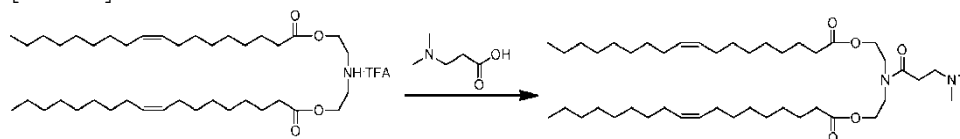


[0124] (Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato (59,5 g, 0,081 moli) è stato trattato per due volte con 100 ml di acido trifluoroacetico (100 mL, 1,35 moli) e 100 ml di cloroformio. Ciascuna consisteva nell'agitare a temperatura ambiente per 10 min, e il solvente è stato rimosso mediante evaporazione rotante al termine di ciascun trattamento. Il residuo è stato dissolto in 200 ml di cloruro di metilene e la miscela è stata lavata con 100 ml di acqua per due volte. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice

usando una miscela di metanolo e cloruro di metilene come eluente per dare sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato (44,0 g). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 0,87 (t, 6H, CH₃), 1,20-1,40 (m, 40H, CH₂), 1,59 (m, 4H, CH₂CH₂C(=O)), 2,00 (m, 8H, CH₂CH=CH), 2,33 (t, 4H, CH₂C(=O)), 3,31 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 4,38 (m, 4H, NCH₂CH₂O), 5,33 (m, 4H, CH=CH).

Fase 3: Preparazione di *i*-Et-DODC: (Z)-((3-(dimetilammino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)dioleato

[0125]

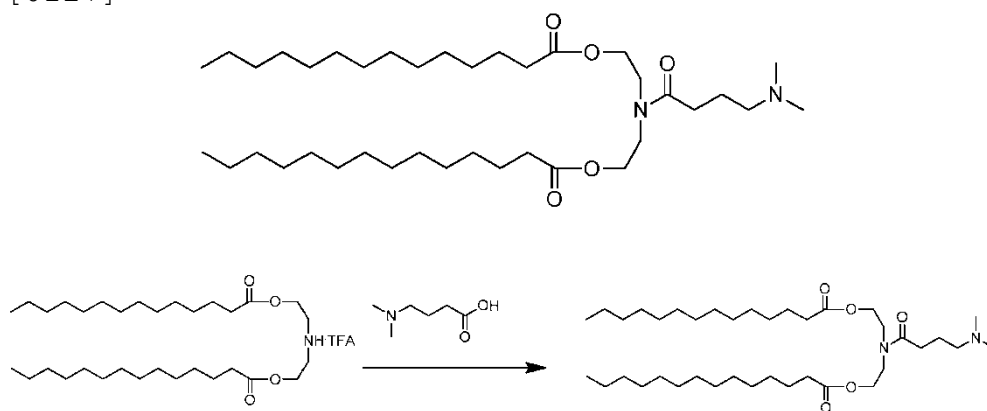


[0126] Sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato (1,50 g, 2,37 mmol) è stato diluito con DCM (10 mL) e addizionato a una miscela pre-attivata di sale HCl di acido 3-(dimetilammino)propionico (383 mg, 2,49 mmol), HATU (1,03 g, 2,72 mmol) e DIEA (831 μ L, 4,77 mmol) in DCM (10 mL). Il pallone a fondo tondo è stato spurgato con gas argo e la miscela di reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con DCM/MeOH, le frazioni raccolte sono state concentrate e agitate in DCM (20 mL) e 10% K₂CO₃

(20 mL) a 0-5 °C per 30 min. Lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con DCM (2 x 10 mL). I composti organici combinati sono stati agitati con MgSO₄ per 30 min a 0-5 °C, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare (Z)-((3-(dimetilammino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato. QTOF MS ESI+: m/z 733,6 (M + H).

Preparazione di ((4-(dimetilammino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato [i-Prop-DC (anche denominato nella presente Pr104)]

[0127]



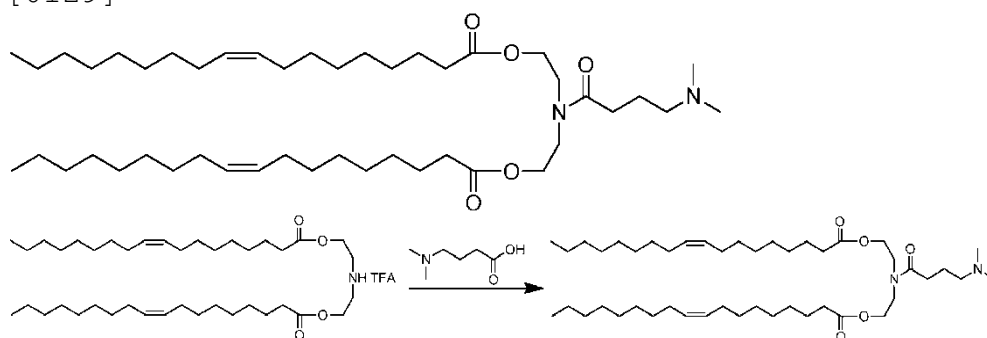
[0128] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1,00 g, 1,90 mmol) è stato diluito con DCM (5 mL) e addizionato a una miscela pre-attivata di sale HCl di acido 4-(dimetilammino)butirrico (382 mg, 2,28 mmol), HATU (867 mg, 2,28 mmol) e DIEA (728 uL, 4,18 mmol) in

DCM (5 mL). Il pallone a fondo tondo è stato spurgato con gas argo e la miscela di reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con DCM/MeOH, le frazioni raccolte sono state concentrate e agitate in DCM (20 mL) e 10% K₂CO₃ (20 mL) a 0-5 °C per 30 min. Lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con DCM (2 x 10 mL). I composti organici combinati sono stati agitati con MgSO₄ per 30 min a 0-5 °C, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare ((4-(dimetilammino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato. LCMS ESI+: m/z 639,6 (M + H).

Preparazione di (Z)-((4-(dimetilammino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)diolateo

[i-Prop-DODC (anche denominato nella presente Pr104-DO)]

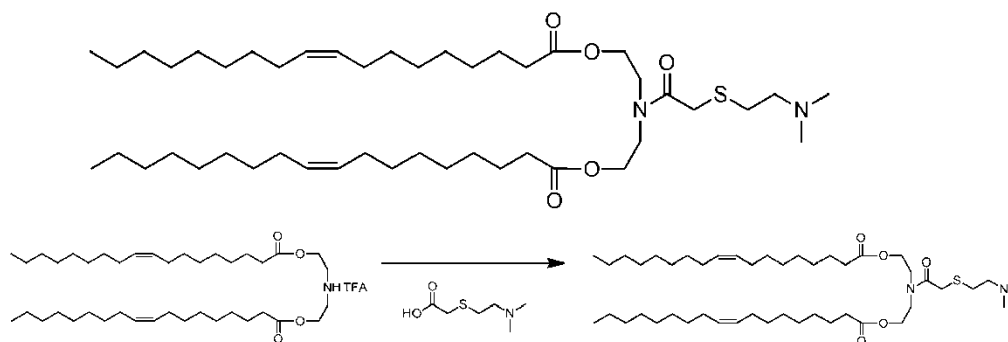
[0129]



[0130] Sintesi di sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato precedentemente descritto. Sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato (1,00 g, 1,58 mmol) è stato diluito con DCM (5 mL) e addizionato a una miscela pre-attivata di sale HCl di acido 4-(dimetilammino)butirrico (317 mg, 1,89 mmol), HATU (719 mg, 1,89 mmol) e DIEA (606 uL, 3,48 mmol) in DCM (5 mL). Il pallone a fondo tondo è stato spurgato con gas argo e la miscela di reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con DCM/MeOH, le frazioni raccolte sono state concentrate e agitate in DCM (20 mL) e 10% K₂CO₃ (20 mL) a 0-5 °C per 30 min. Lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con DCM (2 x 10 mL). I composti organici combinati sono stati agitati con MgSO₄ per 30 min a 0-5 °C, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare (Z)-((4-(dimetilammino)butanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato. LCMS ESI+: m/z 747,7 (M + H).

Preparazione di (Z)-((2-(2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato (S104-DO)

[0131]

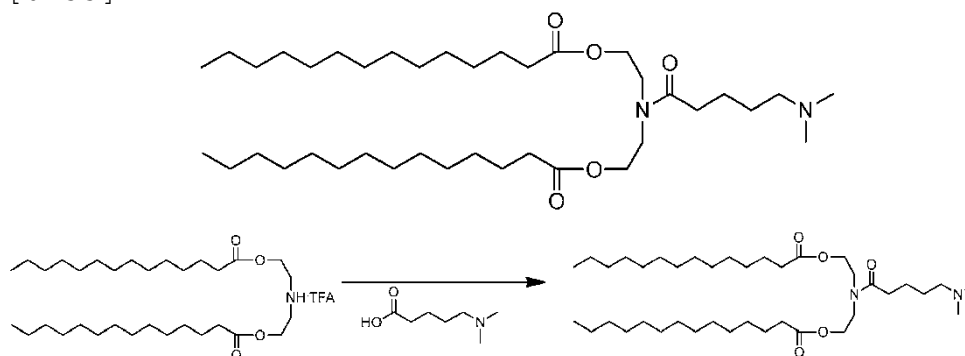


[0132] Sintesi di sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato precedentemente descritto. Sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato (4,06 g, 6,41 mmol) è stato agitato in DCM (60 mL) con 10% K_2CO_3 (30 mL) a 0-5 °C. Dopo 30 min, la fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con DCM (30 mL). Le fasi organiche combinate sono state agitate con $MgSO_4$ per un periodo di 30 min a 0-5 °C, filtrate e lavate con DCM (□30 mL). Ai filtrati combinati sono stati addizionati acido 2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetico (1,26 g, 7,70 mmol), sale di EDC HCl (1,84 g, 9,62 mmol), DMAP (78,3 mg, 0,64 mmol) e la sospensione poco densa è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. Il giorno successivo, sono stati addizionati H_2O (60 mL) e MeOH (30 mL) e dopo l'agitazione per 10 min, la fase organica trasparente è stata isolata. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM. Gli estratti organici combinati sono stati concentrati. Il materiale grezzo è stato filtrato attraverso un tappo di silice e ripreso

in DCM (40 mL) ed è stato addizionato PBS (pH=11, 50 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 10 min. Successivamente, la fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata estratta ancora con DCM (15 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄) per 30 min, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare (Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato (3,44 g). LCMS ESI+: *m/z* 780,2 (M + H).

Preparazione di ((5-(dimetilammino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (C104)

[0133]

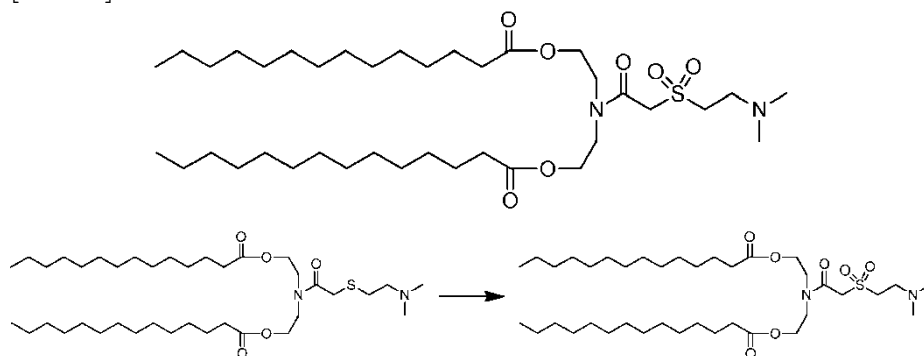


[0134] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (730 mg, 1,14 mmol) è stato agitato in DCM (20 mL) con 10% K₂CO₃ (10 mL) a 0-5 °C. Dopo 30 min, la fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con DCM (10 mL). Le fasi

organiche combinate sono state agitate con MgSO_4 per un periodo di 30 minuti a 0-5 °C, filtrate e lavate con DCM (10 mL). Ai filtrati combinati sono stati addizionati acido 5-(dimetilammino)pentanoico (248 mg, 1,37 mmol), sale di EDC HCl (328 mg, 1,71 mmol), DMAP (14 mg, 0,114 mmol) e la sospensione poco densa è stata agitata per una notte a temperatura ambiente, dopodiché la soluzione diventa trasparente. Il giorno successivo, sono stati addizionati H_2O (20 mL) e MeOH (10 mL) e dopo l'agitazione per 10 min, la fase organica trasparente è stata isolata. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM. Gli estratti organici combinati sono stati concentrati. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con acetato di etile al 100% seguito da MeOH/DCM al 10%, il residuo purificato è stato ripreso in DCM (25 mL) e PBS (pH=11, 25 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 15 min. Successivamente, la fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata estratta ancora con DCM (15 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO_4) per 30 min, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare ((5-(dimetilammino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)ditetradecanoato (405 mg). LCMS ESI+: m/z 654,1 (M + H).

Preparazione **di** **((2-((2-(dimetilammino)etil) solfonil) acetil) azanodiil) bis (etano-2,1-diil) ditetra-decanoato (S02-S104)**

[0135]

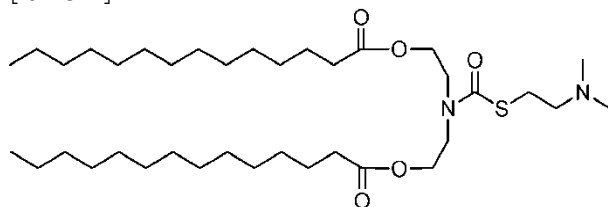


[0136] È stata descritta la sintesi di ((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato, ossia S104. A ((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoate in un pallone a fondo tondo, spurgato con argo è stato addizionato DCM (10 mL). La soluzione è stata raffreddata con un bagno di ghiaccio. A questa è stato addizionato mCPBA (una soluzione in DCM) lentamente per 5 min. Il bagno di ghiaccio è stato rimosso dopo l'addizione e la miscela di reazione è stata lasciata agitare per una notte a temperatura ambiente. Dopo 3,5 ore, 2M DMA/THF (4,55 mL) è stato addizionato lentamente e la miscela di reazione è stata lasciata agitare per una notte. La miscela di reazione è stata in seguito diluita con DCM a 75 mL. Lavata con H₂O (2 x 50 mL) e 10% K₂CO₃ (50 mL). Tutti i lavaggi

acquosi sono stati estratti ancora con DCM (40 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati ($MgSO_4$), filtrati e concentrati per dare un olio incolore. La miscela di reazione è stata concentrata. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di acetato di etile/MeOH ha dato ((2-((2-(dimetilammino)etil)solfonil)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (540 mg). LCMS ESI+: m/z 704,0 (M + H).

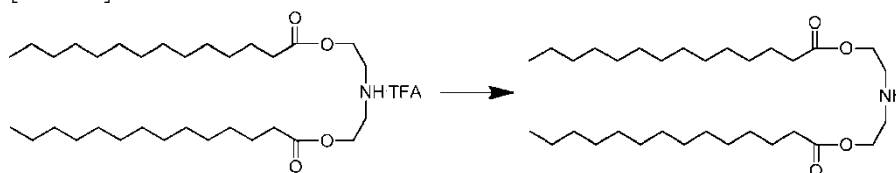
Preparazione di (((2-(dimetilammino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (TU104)

[0137]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0138]

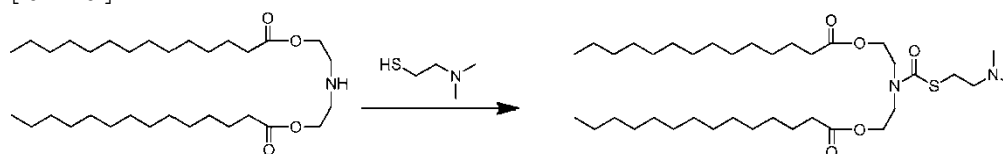


[0139] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato è

stato dissolto in DCM (50 mL) ed è stato addizionato PBS (pH=11, 50 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 15 min. Successivamente, la fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata estratta ancora con DCM (25 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄) per 30 min, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato come base libera.

Fase 2: Preparazione di TU-104: (((2-(dimetilammino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetra-decanoato

[0140]

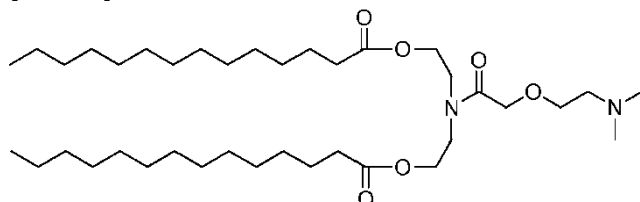


[0141] Triclorometil cloroformiato (ossia, difosgene) (257 uL, 2,13 mmol) è stato addizionato a una soluzione di sale HCl di 2-(dimetilammino)etantiolo (302 mg, 2,13 mmol) in DCM anidro (20 mL) e agitato sotto una coperta di argo a temperatura ambiente per 4 ore. Successivamente, DCM e difosgene in eccesso sono stati rimossi in vacuo. Sono stati in seguito addizionati una base libera di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1068 mg, 2,03 mmol), DCM (20 mL) e trietilammina (580 uL, 4,16 mmol). Dopo 16 ore a

temperatura ambiente la miscela di reazione è stata diluita con DCM e lavata con 1M HCl (75 mL), H₂O (75 mL) e PBS (pH=11, 75 mL), essiccata (MgSO₄), filtrata e concentrata. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con acetato di etile seguito da un gradiente di DCM/MeOH ha dato (((2-(dimetilammino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (120 mg). LCMS ESI+: m/z 657,5 (M + H).

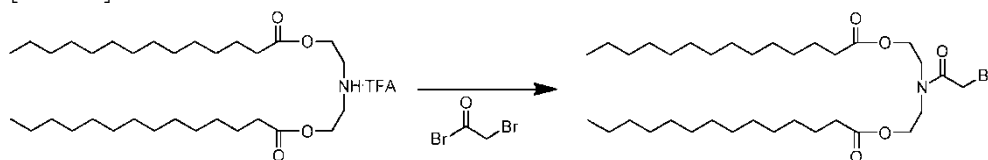
Preparazione di (((2-(2-(dimetilammino)etossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (O104)

[0142]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: ((2-bromoacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0143]

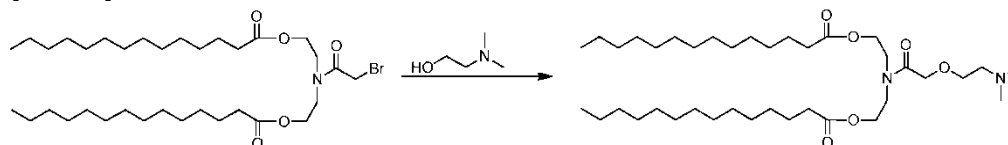


[0144] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato

(1500 mg, 2,34 mmol) è stato dissolto in DCM (20 mL) e posto in un bagno di ghiaccio. È stato addizionato bromoacetil bromuro (214 uL, 2,46 mmol), seguito da trietilammina (685 uL, 4,91 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la reazione è stata lasciata agitare per una notte a temperatura ambiente sotto una coperta di gas inerte. Il giorno successivo, diluita con DCM a 100 mL. Lavata con 1M HCl (75 mL), H₂O (75 mL), soluzione satura di NaHCO₃ (75 mL) e soluzione salina satura (75 mL). Tutti i lavaggi acquosi sono stati estratti ancora con DCM (25 mL). Essiccati i composti organici con with MgSO₄, filtrati e concentrati in vacuo. Purificati mediante cromatografia su gel di silice ed eluendo con acetato di etile al 100%. Frazioni raccolte e concentrate per dare ((2-bromoacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1220 mg).

Fase 2: Preparazione di O104: ((2-(2-(dimetilammino)etossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetra-decanoato

[0145]

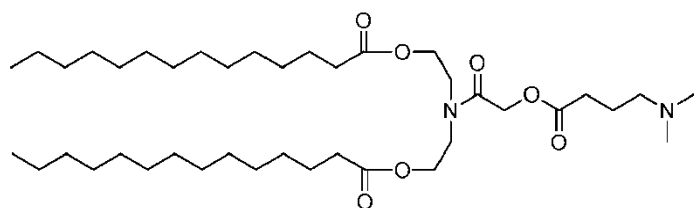


[0146] A un pallone a fondo tondo dotato di barra di agitazione, sono stati addizionati ((2-

bromoacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)
ditetradecanoato (1,22 g, 1,87 mmol), N,N-
dimetiletanolammina (197 uL, 1,96 mmol), ioduro di
potassio (6,2 mg, 0,0374 mmol) e THF anidro (25 mL). La
soluzione risultante è stata raffreddata a -40 °C. DBU
(588 uL, 3,93 mmol) è stato addizionato goccia a goccia
per 5 minuti e la reazione è stata riscaldata a 0 °C
per 2 ore. La miscela di reazione è stata concentrata.
Il residuo è stato ripreso in DCM, è stato addizionato
1M HCl (12 mL) e la miscela bifasica agitata per 15
min. In seguito, basificata usando PBS (pH=11). Lo
strato organico è stato isolato, essiccato (MgSO₄),
filtrato e concentrato. La purificazione mediante
cromatografia su gel di silice eluendo con acetato di
etile al 100% seguito da un gradiente di DCM/MeOH ha
dato ((2-(2-
(dimetilammino)etossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-
diil) ditetradecanoato (53 mg). LCMS ESI+: m/z 655,6 (M
+ H).

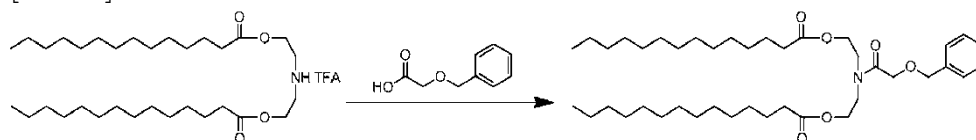
**Preparazione di ((2-((4-
(dimetilammino)butanoil)ossi)acetil)azanodiil)bis(etano
-2,1-diil) ditetra-decanoato (HEDC-M1)**

[0147]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: ((2-(benzilossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0148]

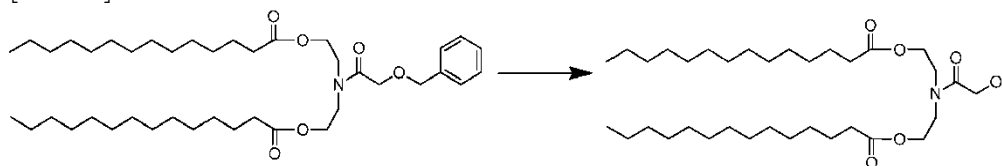


[0149] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato è stato agitato in DCM (25 mL) con 10% K₂CO₃ (12,5 mL) a 0-5 °C. Dopo 30 min, lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con DCM (12 mL). Le fasi organiche combinate sono state agitate con MgSO₄ per 30 min a 0-5 °C, filtrate e lavate con DCM (12 mL). Ai filtrati combinati sono stati addizionati acido benzilossi acetico (402 uL, 2,81 mmol), sale di EDC HCl (673 mg, 3,51 mmol) e DMAP (29 mg, 0,234 mmol). La sospensione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. Il giorno successivo, sono stati addizionati H₂O (25 mL) e MeOH (12 mL) e dopo l'agitazione per 10 min, la fase organica trasparente è stata isolata. La fase

acquosa torbida è stata estratta con DCM (25 ml). Gli estratti organici combinati sono stati essiccati con MgSO₄, filtrati e concentrati. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di esani/acetato di etile ha dato ((2-(benzilossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1,28 g).

Fase 2: Preparazione di intermedio 2: ((2-idrossiacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0150]

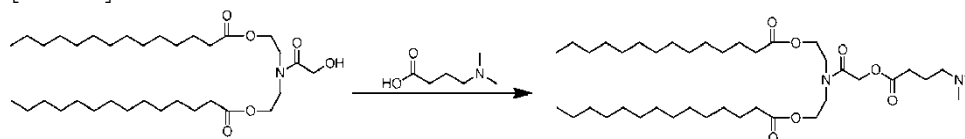


[0151] ((2-(benzilossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1,28 g, 1,80 mmol) è stato dissolto in un pallone a fondo tondo con MeOH (20 mL). Il pallone è stato tappato e spurgato con argo. È stato addizionato 10% Pd/C (135 mg) e il pallone è stato ancora una volta spurgato con argo. Tutta l'aria è stata rimossa tramite una pompa a vuoto e in seguito è stato aggiunto un palloncino 8" riempito con gas H₂. La reazione è stata lasciata agitare vigorosamente a temperatura ambiente. Dopo 30 min, la miscela di reazione è stata filtrata (celite), lavata con metanolo, concentrata a residuo, ripresa in DCM (25 mL)

e 10% K_2CO_3 (25 mL). La miscela è stata agitata per 15 min e in seguito lo strato organico è stato isolato. La fase acquosa è stata riestratta con DCM (15 ml). I composti organici combinati sono stati essiccati con $MgSO_4$, filtrati e concentrati per dare ((2-idrossiacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (990 mg).

Fase 3: Preparazione di HEDC-M1: ((2-((4-dimetilammino)butanoil)ossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) di-tetradecanoato

[0152]

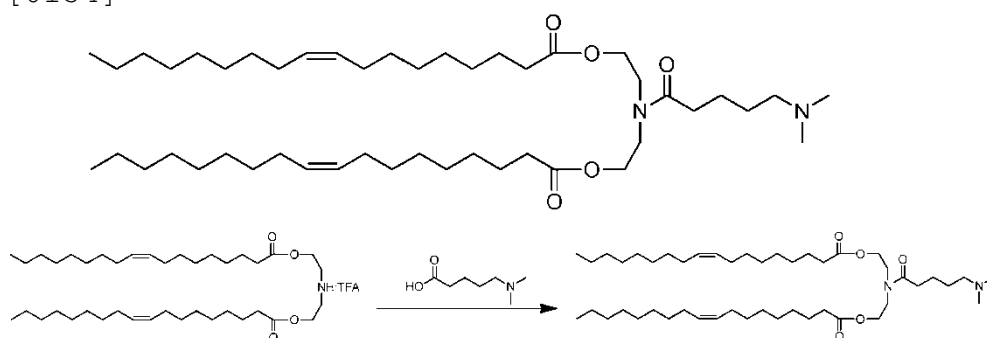


[0153] ((2-idrossiacetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (990 mg, 1,70 mmol) è stato agitato in DCM (20 mL) e sono stati addizionati acido 4-dimetilammino-butirrico (268 mg), sale di EDC HCl (487 mg) e DMAP (21 mg). La sospensione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. Il giorno successivo, sono stati addizionati H_2O (20 mL) e MeOH (10 mL) e dopo l'agitazione per 10 minuti la fase organica trasparente è stata isolata. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM (20 ml). Gli estratti organici combinati sono stati essiccati con $MgSO_4$, filtrati e concentrati. Il materiale grezzo è

stato purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH. Frazioni raccolte e concentrate sono state concentrate e riprese con DCM (25 mL) e PBS (pH = 11, 25 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 15 min. Successivamente, la fase organica è stata isolata e la fase acquosa è stata estratta ancora con DCM (25 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO_4), filtrati e concentrati per dare ((2-((4-(dimetilammino)butanoil)ossi)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (672 mg). LCMS ESI+: m/z 697,6 (M + H).

Preparazione di (Z)-((5-(dimetilammino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)dioloato (C104-DO)

[0154]



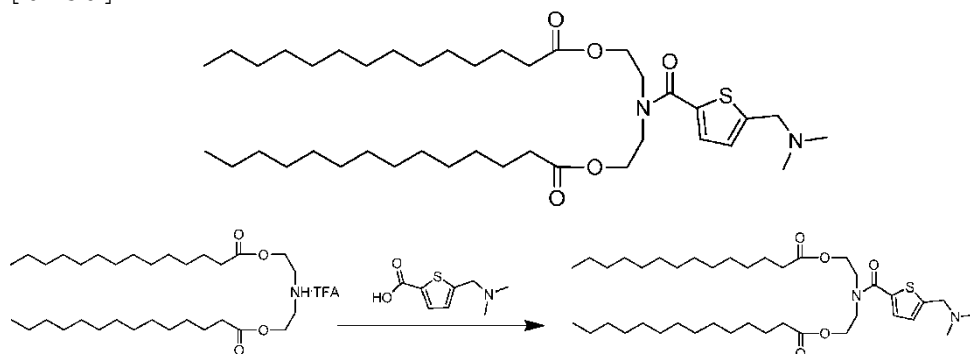
[0155] Sintesi di sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioloato precedentemente descritto. Sale TFA di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioloato (1,50 g, 2,37 mmol) è stato agitato in DCM (20 mL) con 10% K_2CO_3

(10 mL) a 0-5 °C. Dopo 30 min, la fase organica è stata isolata e la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con DCM (10 mL). Le fasi organiche combinate sono state agitate con MgSO₄ per un periodo di 30 min a 0-5 °C, filtrate e lavate con DCM (15 mL). Ai filtrati combinati sono stati addizionati acido 5-(dimetilammino)pentanoico (516 mg, 2,84 mmol), sale di EDC HCl (681 mg, 3,55 mmol), DMAP (29 mg, 0,237 mmol) e la sospensione è stata agitata per una notte a temperatura ambiente, dopo il quale periodo di tempo si è formata una soluzione trasparente. Il giorno successivo, sono stati addizionati H₂O (20 mL) e MeOH (10 mL) e dopo l'agitazione per 10 min, la fase organica trasparente è stata isolata. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM. I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄), filtrati e concentrati. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente DCM/MeOH, le frazioni raccolte e concentrate sono state riprese con DCM (25 mL) e PBS (pH=11, 25 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 10 min. Successivamente, la fase organica è stata isolata e la fase acquosa è stata estratta ancora con DCM (15 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄), filtrati e concentrati per dare (Z)-((5-

(dimetilammino)pentanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato (1,10 g). LCMS ESI+: m/z 761,7 (M + H).

Preparazione di ((5-((dimetilammino)metil)tiofene-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) di-tetradecanoato (T104)

[0156]

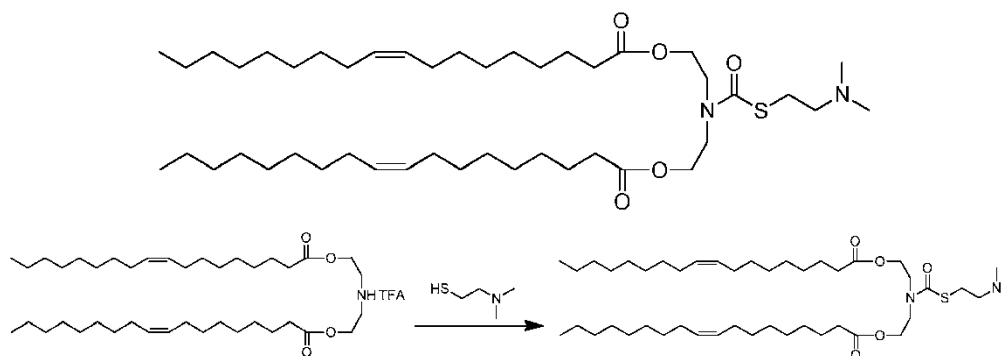


[0157] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1004 mg, 1,57 mmol) è stato agitato in DCM (20 mL) con 10% K₂CO₃ (20 mL) a 0-5 °C. Dopo 30 min, la fase organica è stata isolata e la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con DCM (10 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati con MgSO₄ per 30 min a 0-5 °C, filtrati e lavati con DCM (10 mL). Ai filtrati combinati sono stati addizionati acido ((dimetilammino)metil)tiofene-2-carbossilico (350 mg, 1,89 mmol), sale di EDC HCl (452 mg, 2,36 mmol) e DMAP (19,2 mg, 0,157 mmol). La sospensione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte.

Il giorno successivo, sono stati addizionati H₂O (20 mL) e MeOH (10 mL) e dopo l'agitazione per 10 min, la fase organica trasparente è stata isolata. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM (25 ml). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄), filtrati e concentrati. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di esani/acetato di etile, le frazioni raccolte e concentrate sono state riprese con DCM (20 mL) e PBS (pH=11, 20 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 10 min. Successivamente la fase organica è stata isolata e la fase acquosa è stata estratta ancora con DCM (15 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄) per un periodo di 30 min, filtrati, lavati con DCM e concentrati per dare ((5-((dimetilammino)metil)tiofene-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (482 mg). LCMS ESI+: m/z 693,6 (M + H).

Preparazione di (Z)-(((2-(dimetilammino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato (TU104-DO)

[0158]

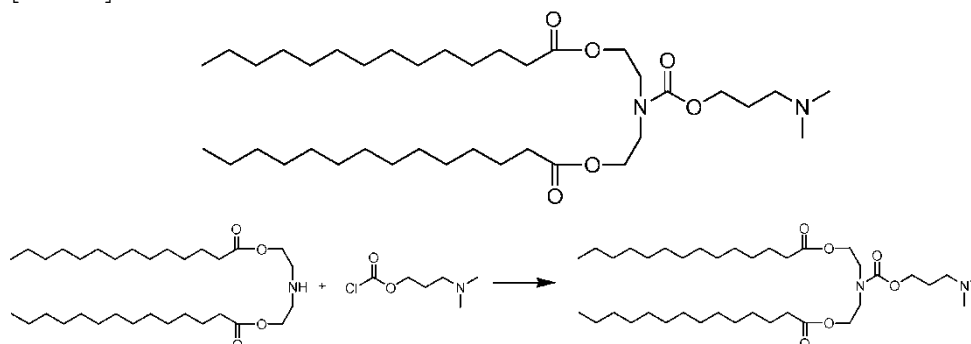


[0159] Sintesi di (Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato precedentemente descritto. (Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato (4,20 g, 5,72 mmol) è stato dissolto in DCM (20 mL) e raffreddato a 0 °C in un bagno di ghiaccio. È stato addizionato TFA (20 mL) e la miscela è stata lasciata agitare sotto una coperta di gas inerte per 20 min. Successivamente, la miscela di reazione è stata concentrata in vacuo. Il residuo è stato ripartito tra 10% K₂CO₃ (20 mL) e DCM (20 mL), e agitato in un bagno di ghiaccio per 20 minuti. Lo strato organico è stato isolato, essiccato (MgSO₄) e filtrato. Difosgene (1,38 mL, 11,4 mmol) è stato addizionato a un materiale di (Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) dioleato in DCM e agitato sotto una coperta di gas inerte a temperatura ambiente. Il giorno successivo, DCM e difosgene in eccesso sono stati rimossi in vacuo. Sale HCl di 2-(dimetilammino)etano tiolo (4,05 g, 28,6 mmol) è stato ripreso in DCM (50 mL) e trietilammina (5,2 mL, 37,2

mmol) e addizionato a un residuo di (Z)-((clorocarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato. Il materiale è stato lasciato agitare vigorosamente a temperatura ambiente. Il giorno successivo, diluito con DCM e lavato con 0,3M HCl (75 mL), H₂O (75 mL) e 10% K₂CO₃ (75 mL). Tutti i lavaggi acquosi sono stati estratti ancora con DCM (25 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati su MgSO₄, filtrati e concentrati. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato (Z)-(((2-(dimetilammino)etil)tio)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) dioleato (1,90 g). LCMS ESI+: m/z 765,7 (M + H).

Preparazione di (((3-(dimetilammino)propossi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetra-decanoato (CB104)

[0160]

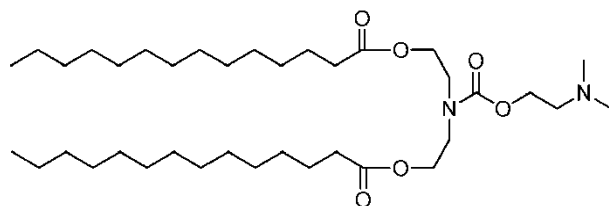


[0161] Sintesi di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Difosgene

(266 uL, 2,2 mmol) è stato addizionato a dimetilamminopropanolo (413 mg, 4,00 mmol) in DCM (10 mL) e agitato sotto una coperta di gas inerte a temperatura ambiente per 4 ore. Il DCM e il disfogene in eccesso sono stati rimossi in vacuo ed è stato addizionato azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato. Il pallone a fondo tondo è stato spurgato con argo e DCM (10 mL) ed è stata addizionata trietilammina (859 uL, 6,16 mmol). Il materiale è stato lasciato agitare vigorosamente a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata in seguito diluita con DCM e lavata con 0,3M HCl (75 mL), H₂O (75 mL) e 10% K₂CO₃ (75 mL). Tutti i lavaggi acquosi sono stati estratti ancora con DCM (25 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati su MgSO₄, filtrati e concentrati. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di DCM/MeOH ha dato ((3-(dimetilammino)propossi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (87 mg). LCMS ESI+: m/z 655,59 (M + H).

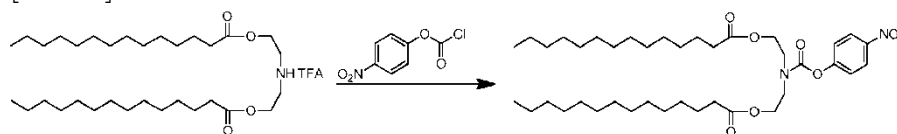
Preparazione di ((2-(dimetilammino)etossi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (CA104)

[0162]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: (((4-nitrofenossi) carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetra-decanoato

[0163]

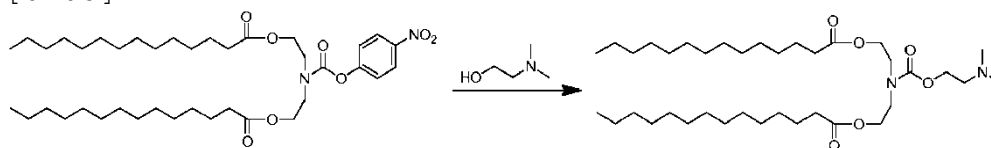


[0164] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato è stato dissolto in DCM anidro (10 mL) ed è stata addizionata trietilammina (654, 4,69 mmol). Il recipiente di reazione è stato spurgato con gas inerte ed è stato addizionato 4-nitrofenil cloroformiato. Il materiale è stato lasciato agitare a TA per una notte. La miscela di reazione è stata estinta con acqua (50 mL) e DCM (50 mL). Lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato riestratto con DCM (2 x 50 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati su MgSO₄, filtrati e concentrati. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di esani/acetato di etile ha dato (((4-nitrofenossi) carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)

ditetradecanoato.

Fase 2: Preparazione di CA104: ((2-(dimetilammino)etossi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetra-decanoato

[0165]



[0166]

A

((4-

nitrofenossi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)

ditetradecanoate è stato addizionato 2-

dimetilamminoetanolo (2 mL) e riscaldato a 140 °C con

una colonna di condensazione per 20 min.

Successivamente, il materiale grezzo è stato purificato

mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un

gradiente di DCM/MeOH per dare ((2-

(dimetilammino)etossi)carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-

diil) ditetradecanoato (38 mg). LCMS ESI+: m/z 641,7 (M

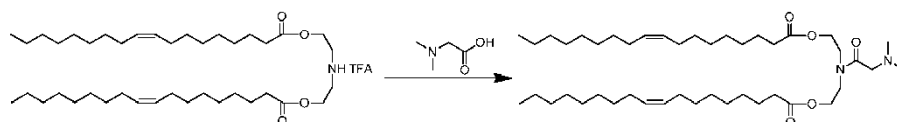
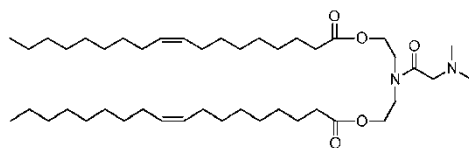
+ H).

Preparazione di ((2-

(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)

ditetradecanoato (INT-4)

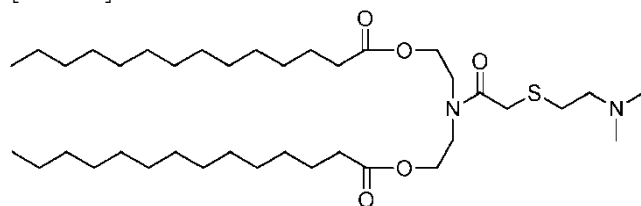
[0167]



[0168] Sintesi di ((Z)-((2-(dimetilammino)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)dioleato è stato preparato in maniera simile come i-Prop-DODC con la sostituzione di dimetilglicina con acido 3-(dimetilammino)propionico. QTOF MS ESI+: m/z 720,1 (M + H).

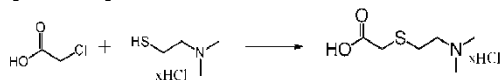
Preparazione di ((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetra-decanoato (S104)

[0169]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: cloridrato di acido 2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetico:

[0170]



[0171] Etanolo (500 mL) è stato degassato mediante evacuazione per tre volte a 60 mBar per 1-2 minuti e ripressurizzando con azoto. È stato addizionato acido

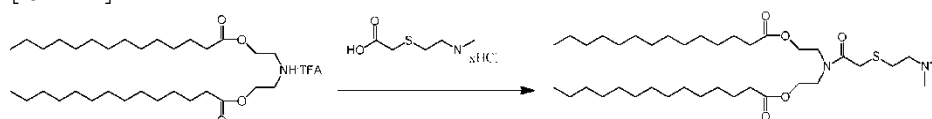
cloroacetico (36,9 g, 0,391 mol) e una soluzione trasparente è stata formata dopo aver agitato per 5 minuti a 17-20 °C. È stato addizionato 2-(dimetilammino)-etantiolo cloridrato (52,7 g, 0,372 mol) e una soluzione trasparente è stata formata dopo aver agitato per 20 minuti a 25 °C. Idrossido di sodio solido (47,7 g, 1,19 mol) è stato addizionato in porzioni per un periodo di 20 minuti con raffreddamento in modo da mantenere la temperatura al di sotto di 35 °C - è stato osservato un breve periodo a 44 °C. È stata osservata una precipitazione quasi immediata. La miscela di reazione è stata infine riscaldata e agitata a 40 °C per un periodo di due ore, al punto che TLC ha indicato il completamento della reazione. È stata addizionata celite 545 (74 g) e la miscela è stata filtrata attraverso una piastra sinterizzata di vetro G3 per 6 minuti, lavando con etanolo (2 x 105 mL). I filtrati nebulosi combinati sono stati fatti evaporare da un bagno a 50 °C per dare 110 g di solido bianco. Il solido è stato dissolto in acqua (250 mL), in seguito il pH è stato regolato da 13,1 (temp. 30 °C) a 10,5 (temp. 31 °C), usando HCl concentrato (5,5 mL) per dare una soluzione gialla molto chiara. La fase acquosa è stata lavata con DCM (3x 100 mL) per rimuovere l'impurità di disolfuro (necessari tutti e 3 i

lavaggi). HCl concentrato è stato addizionato alla fase acquosa (pH 10,7, temp. 22 °C) fino a che il pH era di 1,4 (57,5 mL addizionati, temp. 35 °C). La fase acquosa è stata lavata con DCM (100 mL) e in seguito concentrata a secchezza (temperatura del bagno 55 °C). È stato addizionato toluene (250 mL), la miscela è stata concentrata a secchezza (temperatura del bagno 55 °C) e questo è stato ripetuto una volta per dare un solido bianco umido (98 g). Acetonitrile (750 mL) è stato addizionato al solido, la miscela è stata agitata a 55 °C per un periodo di 45 minuti e in seguito filtrata attraverso una piastra sinterizzata di vetro G3. Acetonitrile (250 mL) è stato addizionato al residuo di filtrazione, la miscela è stata agitata a 55 °C per un periodo di 25 minuti e in seguito filtrata attraverso una piastra sinterizzata di vetro G3, lavando con acetonitrile (50 mL). I filtrati combinati sono stati concentrati a 300 mL, il che risulta in un precipitato bianco pesante. La miscela è stata raffreddata sotto azoto e agitata a 0 °C per un periodo di 30 minuti. Il precipitato è stato isolato mediante filtrazione attraverso una piastra sinterizzata di vetro G3 e il residuo di filtrazione è stato lavato con acetonitrile freddo (100 mL). L'essiccazione sotto pressione ridotta per 3 giorni ha dato 47,0 g (63%) di

cloridrato di acido 2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetico.

Fase 2: Preparazione di S104: ((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetyl)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0172]



[0173] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (152 g, 238 mmol) è stato agitato con DCM (2,3 mL) con 10% bicarbonato di potassio (1,15 L) a 0-5 °C. La fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata ulteriormente estratta con DCM (1,15 L). Le fasi organiche combinate sono state agitate con solfato di magnesio idrato (236 g) per un periodo di 30 minuti a 0-5 °C, filtrate e lavate con DCM (1,15 L). Ai filtrati combinati sono stati addizionati cloridrato di acido 2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetico (57,0 g, 285 mmol), cloridrato di EDC (68,4 g, 357 mmol) e DMAP (2,91 g, 23,8 mmol) e la sospensione poco densa è stata agitata per una notte a temperatura ambiente, dopo il quale periodo di tempo è stata formata una soluzione trasparente. Sono stati addizionati acqua (2,3 L) e

metanolo (460 mL) e dopo aver agitato per un periodo di 10 minuti la fase organica trasparente è stata separata. La fase acquosa torbida (pH 3,0) è stata estratta con DCM (575 mL). Gli estratti organici combinati sono stati concentrati ottenendo 143 g di materiale grezzo come sale cloridrato. Il materiale grezzo (142,6g) è stato trasferito in un pallone di distillazione con DCM (500 mL) ed è stato addizionato acetato di etile (1 L). La soluzione è stata riscaldata a distillazione a pressione atmosferica, e la distillazione è continuata per un periodo di 70 minuti al fine di ottenere una temperatura del residuo di 76 °C. Un volume totale di 1,4 L è stato ottenuto mediante l'addizione di acetato di etile (800 mL), ed è stato addizionato etanolo (70 mL). La soluzione trasparente a 50 °C è stata raffreddata a 37 °C e sono stati addizionati germi cristallini. Dopo aver osservato l'inizio di una significativa cristallizzazione per un periodo di 10 minuti a 37-35 °C, la sospensione è stata raffreddata e agitata a 0 °C per una notte e il precipitato è stato isolato mediante filtrazione e lavato con acetato di etile freddo (210 mL). L'essiccazione a peso costante a temperatura ambiente in pompa a vuoto ad olio per un periodo di 4,5 ore ha dato 134 g di materiale ricristallizzato come solido

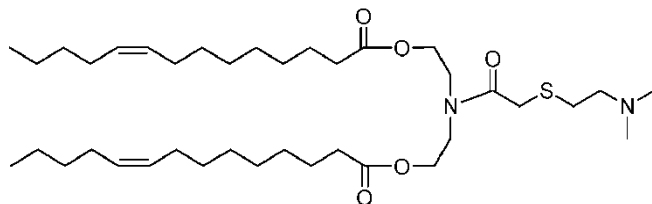
cristallino bianco di sale cloridrato.

[0174] Fosfato di tripotassio (85 g, 0,40 mol) e idrogenofosfato di dipotassio (226 g, 1,30 mol) sono stati addizionati ad acqua purificata (1,7 L), e la soluzione formata con pH 10,9 è stata raffreddata a 18-20 °C. Sono stati addizionati DCM (1,3 L) e cloridrato ricristallizzato S104 (133,0 g, 0,188 mol) e la miscela è stata agitata per un periodo di 10 minuti. Una fase organica trasparente è stata separata a velocità moderata (per un periodo di 35 minuti), e la fase acquosa torbida è stata ulteriormente estratta con DCM (650 mL). Le fasi organiche combinate sono state agitate con solfato di magnesio idrato (65 g) per un periodo di 40 minuti, e la miscela è stata filtrata, lavando con DCM (200 mL). I filtrati combinati sono stati fatti evaporare da 50 °C a bagnomaria sotto pressione ridotta (fino a 20 mBar, alla quale pressione la evaporazione è stata continuata per un'ora). Un'evaporazione aggiuntiva da un bagnomaria a 15-20 °C a pompa a vuoto ad olio ha dato 126 g di olio parzialmente solidificato. Il raffreddamento in un bagno di raffreddamento a -20 °C ha dato una completa solidificazione, e dopo l'essiccazione a -20 °C sotto vuoto per due giorni sono stati ottenuti 126 g di ((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-

2,1-diil) ditetradecanoato, noto anche come S104. HPLC indica il 98,1% di purezza. QTOF MS ESI+: m/z 671,6 (M + H).

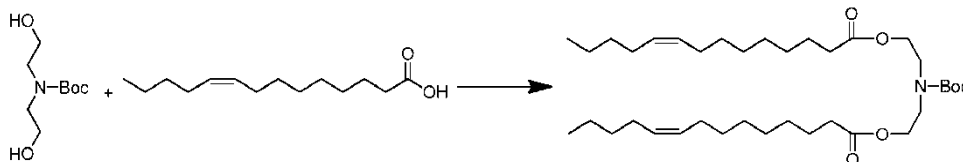
Preparazione di (9Z,9'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(tetradec-9-enoato) (S104-DMO)

[0175]



Fase 1: Preparazione di intermedio 1: (9Z,9'Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(tetradec-9-enoato)

[0176]

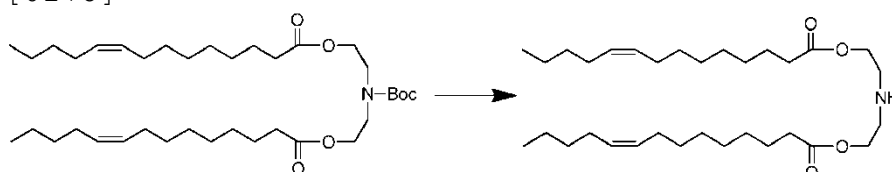


[0177] N-Boc-dietanolammina (454 mg, 2,21 mmol), acido miristoleico (1000 mg, 4,42 mmol) e DMAP (54 mg, 0,442 mmol) sono stati dissolti in DCM (25 mL) e posti in un bagnomaria a temperatura ambiente in un pallone a fondo tondo ed è stato spurgato con gas inerte. Sale di EDC HCl (932 mg, 4,86 mmol) è stato addizionato in 3 porzioni per 5 min. La reazione è stata lasciata agitare per una notte a temperatura ambiente sotto una coperta di gas inerte. Il giorno successivo, è stato

addizionato H₂O (25 mL) e agitato per 10 min. Lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con DCM (50 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄) per 10 min, filtrati e concentrati. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di esani/acetato di etile ha dato (9Z,9'Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)bis(tetradec-9-enoato) (1,10 g).

Fase 2: Preparazione di intermedio 2: (9Z,9'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) bis(tetradec-9-enoato)

[0178]



[0179]

A

(9Z,9'Z)-((terz-

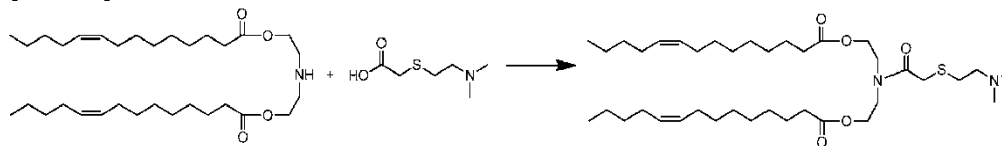
butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)

bis(tetradec-9-enoato) (1100 mg, 1,77 mmol) in un pallone a fondo tondo è stato addizionato DCM (10 mL) e posto in un bagno di ghiaccio. È stato addizionato TFA (10 mL) e la miscela è stata lasciata agitare sotto per 20 min. La miscela di reazione è stata in seguito concentrata. Toluene è stato addizionato al residuo per contribuire a eliminare azeotropicamente l'eccesso di TFA. Il residuo è stato nuovamente posto nel bagno di ghiaccio e sono stati addizionati PBS (pH=11, 25 mL) e

DCM (25 mL). La miscela è stata agitata per 15 min e lo strato organico è stato in seguito isolato. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM (10 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄) a 0 °C per 15 min, filtrati e concentrati per dare (9Z,9'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil)bis(tetradec-9-enoato) (923 mg).

Fase 3: Preparazione di S104-DMO: (9Z,9'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)bis(tetradec-9-enoato)

[0180]

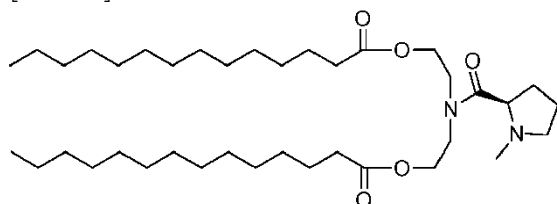


[0181] Una miscela di (9Z,9'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil)bis(tetradec-9-enoato) (923 mg, 1,77 mmol), acido 2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetico (346 mg, 2,12 mmol) e sale di EDC HCl (509 mg, 2,66 mmol) è stata sospesa in DCM (10 mL). DMAP (21,6 mg, 0,177 mmol) è stata addizionata e la miscela è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. Il giorno successivo, sono stati addizionati H₂O (10 mL) e MeOH (10 mL) e dopo l'agitazione per 10 min, la fase organica trasparente è stata isolata. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM (2 x 20 mL). Gli estratti organici combinati sono essiccati con MgSO₄,

filtrati e concentrati. Dopo la purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con DCM/MeOH, le frazioni raccolte e concentrate sono state riprese in DCM (25 mL) e PBS (pH=11, 25 mL). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per \square 10 min. Successivamente la fase organica è stata isolata e la fase acquosa è stata estratta ancora con DCM (2 x 15 mL). La fase di composti organici combinati è stata essiccata (MgSO₄), filtrata e concentrata per dare (9Z,9'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(tetradec-9-enoato) (589 mg). LCMS ESI+: m/z 667,6 (M + H).

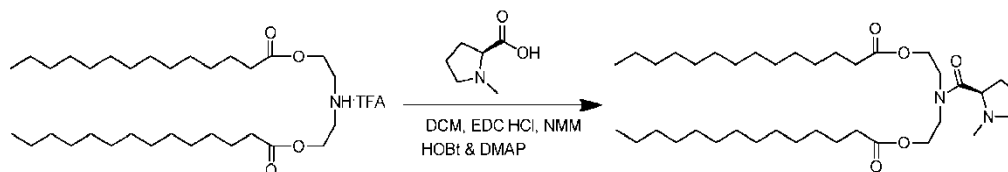
Preparazione di (R)-((1-metilpirrolidina-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (Pro-DC)

[0182]



Fase 1: Preparazione di Pro-DC: (R)-((1-metilpirrolidina-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato

[0183]

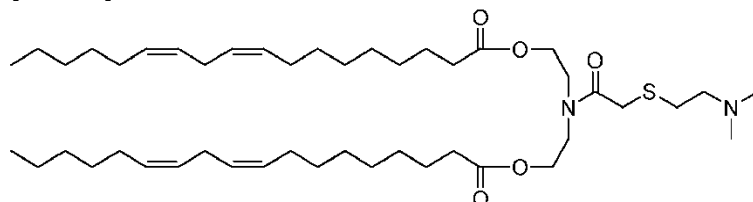


[0184] Sintesi di sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diile) ditetradecanoato precedentemente descritto. Sale TFA di azanodiilbis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato (1000 mg, 1,56 mmol) è stato agitato con DCM (10 mL) e N-metil-L-prolina (228 mg, 1,77 mmol), è stato addizionato HOBt·H₂O (239 mg, 1,77 mmol). NMM (365 uL, 3,32 mmol) è stato addizionato e la soluzione è diventata perlopiù trasparente. Una sospensione di cloridrato di EDC (518 mg, 2,70 mmol), NMM (257 uL, 2,34 mmol) e DMAP (19 mg, 0,156 mmol) in DCM (10 mL) è stata addizionata e la miscela è stata agitata per circa 12 ore a temperatura ambiente, dopo il quale periodo di tempo è stata formata una soluzione trasparente. Successivamente, la miscela è stata diluita con DCM (50 mL) e lavata con 10% K₂CO₃ acquoso (60 mL). I composti organici sono stati essiccati con MgSO₄, filtrati e concentrati. Il composto risultante era grezzo purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con un metanolo (0-10)% in gradiente di DCM per dare (R)-((1-metilpirrolidina-2-carbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) ditetradecanoato. LCMS ESI+: *m/z* 637,6 (M + H).

Preparazione di (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-(2-

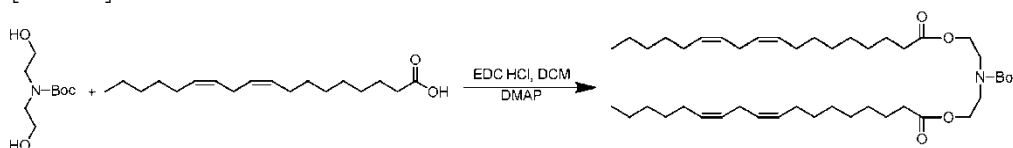
(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato) (S104-DLin)

[0185]



**Fase 1: Preparazione di intermedio 1:
(9Z, 9'Z, 12Z, 12'Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)bis(ottadeca-9,12-dienoato)**

[0186]

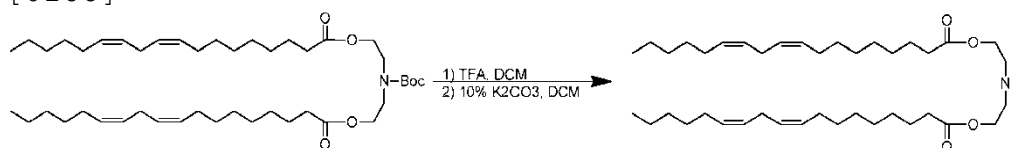


[0187] N-Boc-dietanolammina (5 g, 24,4 mmol) e acido linoleico (14,4 g, 51,2 mmol) sono stati dissolti in DCM (100 mL). È stato addizionato sale di EDC HCl (10,3 g, 53,7 mmol) seguito da DMAP (596 mg, 4,88 mmol). La reazione è stata lasciata agitare per circa 12 ore a temperatura ambiente sotto una coperta di gas inerte. Successivamente, sono stati addizionati 50 mL di acqua e 50 mL di metanolo, e la miscela è stata agitata per 10 min. Lo strato organico è stato isolato e lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con DCM (150 mL). I composti organici combinati sono stati essiccati ($MgSO_4$) per 10 min, filtrati e concentrati. La

purificazione mediante cromatografia su gel di silice eluendo con un gradiente di esano/acetato di etile ha dato
(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((terz-butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)bis(ottadeca-9,12-dienoato) (15,9 g).

**Fase 2: Preparazione di intermedio 2:
(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil)bis(ottadeca-9,12-dienoato)**

[0188]



[0189]

A

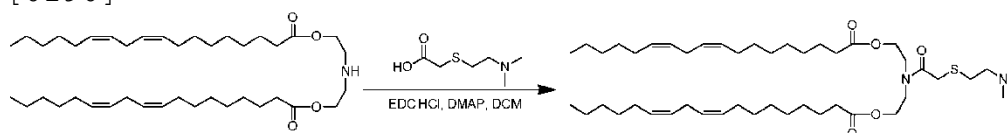
(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((terz-

butossicarbonil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)bis(ottadeca-9,12-dienoato) (5,33 g, 7,30 mmol) in un pallone a fondo tondo è stato addizionato DCM (50 mL) e posto in un bagno di ghiaccio. È stato addizionato TFA (50 mL) e la miscela è stata lasciata agitare per 30 min. La miscela di reazione è stata in seguito concentrata. Toluene è stato addizionato al residuo per contribuire a eliminare azeotropicamente l'eccesso di TFA. Il residuo è stato nuovamente posto nel bagno di ghiaccio e sono stati addizionati 10% K₂CO₃ (50 mL) e DCM (50 mL). La miscela è stata agitata per 15 min e lo strato organico è stato isolato. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM (20 mL). I composti

organici combinati sono stati essiccati (MgSO₄), filtrati e concentrati per dare (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato) (quantitativo).

Fase 3: Preparazione di S-104-DLin: (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato)

[0190]

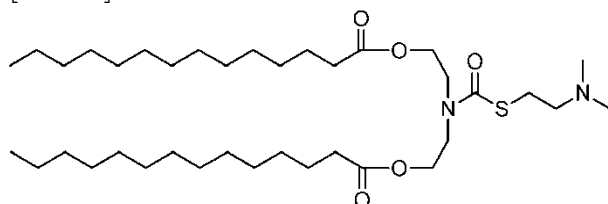


[0191] Una miscela di (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato) (4,68 g, 7,30 mmol), acido 2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetico (1,43 g, 8,76 mmol) e sale di EDC HCl (2,10 g, 10,95 mmol) è stata sospesa in DCM (100 mL). DMAP (89 mg, 0,73 mmol) è stata addizionata, agitata a temperatura ambiente per 12 ore. Sono stati addizionati 50 mL di ciascuno tra acqua e metanolo e dopo l'agitazione per 10 minuti, la fase organica trasparente è stata isolata. La fase acquosa torbida è stata estratta con DCM (2 x 20 mL) e gli estratti organici combinati lavati con PBS (pH=11, 100 mL). Il prodotto è stato essiccato con MgSO₄, filtrato e concentrato. La purificazione è avvenuta mediante

cromatografia su gel eluendo con MeOH in gradiente di DCM. Frazioni raccolte e concentrate hanno dato (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato) (4,3 g). LCMS ESI+: m/z 775,9 (M + H).

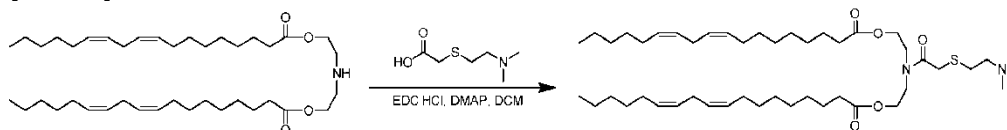
Preparazione di (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil)bis(ottadeca-9,12-dienoato) (TU104-DLin)

[0192]



Fase 1: Preparazione di TU104-DLin: (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato)

[0193]



[0194] Sintesi di (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato) precedentemente descritto. Triclorometil cloroformiato (ossia, difosgene) (740 uL) è stato addizionato a una soluzione di (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-azanodiilbis(etano-2,1-diil)

bis(ottadeca-9,12-dienoato) (2,6 g) in DCM anidro (40 mL) e agitato sotto una coperta di argo a temperatura ambiente per 12 ore. DCM e disfogene in eccesso sono stati rimossi in vacuo. In seguito, sono stati addizionati sale HCl di 2-(dimetilammino)etano tiolo (2,9 g), DCM (40 mL) e trietilammina (3,7 mL). Dopo 16 ore a temperatura ambiente la miscela di reazione è stata diluita con DCM e lavata con 10% K₂CO₃ (75 mL), essiccata (MgSO₄), filtrata e concentrata. La purificazione è stata purificata mediante cromatografia su gel di silice eluendo con acetato di etile seguito da un gradiente di DCM/MeOH per dare (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(dimetilammino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil) bis(ottadeca-9,12-dienoato) (850 mg). LCMS ESI+: m/z 761,9 (M + H).

[0195] *Formazione di liposomi contenenti non-diVA siRNA.* Lipide ionizzabile, DOPE, colesterolo e un lipide coniugato a PEG sono stati solubilizzati in EtOH assoluto (200 prove) a una concentrazione finale in peso di 4,4 mg/mL. Il siRNA è stato solubilizzato in tampone citrato a una concentrazione 0,26 mg/mL e la temperatura è stata regolata a 35-40 °C. La miscela di etanolo/lipide è stata in seguito addizionata al tampone contenente siRNA, mentre viene agitato per

formare spontaneamente liposomi caricati con siRNA. Lipidi sono stati combinati con siRNA per raggiungere un lipide totale finale a un rapporto di siRNA da 7:1 a 14:1 (p:p). I liposomi caricati con siRNA sono stati diafiltrati contro 10x volumi di PBS per rimuovere etanolo e scambiare il tampone. Il prodotto finale è stato filtrato attraverso un filtro da 0,22 µm, di grado sterilizzante per la riduzione della carica batterica. Questo processo ha prodotto liposomi con un diametro particellare medio di 40-100 nm, PDI <0,2 ed efficacia di incapsulamento di RNA (intrappolamento) dell'>85%.

[0196] *Formazione di liposomi contenenti siRNA co-solubilizzati con diVA.* Formulazioni di siRNA-diVA-liposomi sono stati preparati usando il metodo descritto sopra. diVA-PEG-diVA è stato co-solubilizzato in etanolo assoluto con gli altri lipidi (lipide ionizzabile, DOPE, colesterolo e lipidi coniugati a PEG) prima dell'addizione al tampone contenente siRNA. Il contenuto molare di diVA-PEG-diVA era compreso nell'intervallo dallo 0,1 al 5% in moli. Questo processo ha prodotto liposomi con un diametro particellare medio di 40-100 nm, PDI <0,2 ed efficacia di intrappolamento dell'>85%.

[0197] *Formazione di liposomi contenenti siRNA con*

lipidi ionizzabili e cationici. Formulazioni di siRNA-diVA-liposomi e formulazioni di siRNA-liposomi sono state preparate usando il metodo descritto sopra. Un lipide cationico è stato co-solubilizzato in etanolo assoluto con gli altri lipidi (lipide ionizzabile, DOPE, colesterolo, lipidi coniugati a PEG e diVA-PEG-diVA) prima dell'addizione al tampone contenente siRNA. Il contenuto molare di lipide cationico era compreso nell'intervallo dal 5 al 40% in moli. Questo processo ha prodotto liposomi con un diametro particellare medio di 40-100 nm, PDI <0,2 ed efficacia di intrappolamento dell'>85%.

Efficacia in vitro (pHSC, gp46 KD @ 20 nM)

[0198] PHSC in piastra a 96 pozzetti sono stati incubati con una formulazione che era costituita da una formulazione di lipidi ionizzabili C104, una formulazione di lipidi ionizzabili Tu104, o formulazioni di combinazione con un diverso rapporto di lipidi ionizzabili (C104:Tu104). Dopo 30 minuti, il terreno è stato sostituito con un terreno di crescita fresco. Quarantotto ore dopo, le cellule sono state lisate e i livelli di gp46 e GAPDH mRNA misurati mediante saggio quantitativo RT-PCR (TaqMan®), e i livelli di gp46 sono stati normalizzati ai livelli di GAPDH. I livelli di gp46 normalizzati sono stati

espressi come percentuale di cellule di controllo di simulazione. Barre di errore indicano deviazioni standard (n=3). I risultati sono illustrati nella figura 1. Come dimostrano i risultati, la combinazione di due lipidi ionizzabili della descrizione ha comportato una riduzione sinergica osservata dell'espressione genica.

[0199] Esperimenti simili sono stati effettuati con altre combinazioni di lipide ionizzabile: lipide ionizzabile e lipide ionizzabile:lipide cationico. I risultati per le combinazioni S104-DO:Tu104-DO sono illustrati nella figura 2. I risultati per le combinazioni HEDODC:Tu104 sono illustrati nella figura 3. Combinazioni di entrambi lipidi ionizzabili e lipidi ionizzabili:cationici hanno comportato nuovamente una riduzione sinergica dell'espressione genica.

Efficacia in vivo (DMNQ):

[0200] L'attività in vivo di una formulazione bersaglio è stata valutata nel modello di danno epatico a breve termine (denominato Quick Model o DMNQ). In questo modello, il danno epatico a breve termine indotto mediante trattamento con un agente epatotossico come dimetilnitrosammina (DMN) è accompagnato dall'aumento dei livelli di gp46 mRNA. Per indurre questi cambiamenti, ratti maschi Sprague-Dawley sono stati

iniettati per via intraperitoneale con DMN per sei giorni consecutivi. Al termine del periodo di trattamento con DMN, gli animali sono stati randomizzati in gruppi in base al peso corporeo dei singoli animali. Formulazioni sono state somministrate come singola dose IV, un'ora dopo l'ultima iniezione di DMN. Ventiquattro ore dopo, i lobi del fegato sono stati asportati ed entrambi i livelli di gp46 e MRPL19 mRNA sono stati determinati mediante saggio quantitativo RT-PCR (TaqMan). I livelli di mRNA per gp46 sono stati normalizzati ai livelli di MRPL19. I risultati sono illustrati nella figura 4. Diverse combinazioni di lipidi ionizzabili:cationici hanno raggiunto una riduzione del 50% dell'espressione genica espressione per una singola dose, 0,5 mg per kg di peso corporeo dell'animale, di siRNA incapsulato.

Dati di tossicologia *in vitro*, citotossicità *in vitro* (HepG2 @ 200 nM)

[0201] L'addizione del 20% in moli di S104 in formulazioni della descrizione ha migliorato la vitalità cellulare in un saggio di citotossicità di HepG2 migliorato dal 27% al 52%.

Formulazione	% vitalità
40:30:25:5:2 (HEDC:DOPE:Coleseterolo:Peg-lipide:DiVA)	27 ± 5.3 %
20:20:30:25:5:2 (HEDC:S104:DOPE:Coleseterolo:Peg-lipide:DiVA)	52 ± 10 %

Descrizione di saggio di citotossicità di HepG2:

[0202] Cellule HepG2, una linea cellulare aderente derivata da carcinoma epatocellulare umano, sono state coltivate in MEM/EBSS (Hyclone, Logan, Utah, Cat# SH30024.01) integrate con 10% FBS (Hyclone, Logan, Utah Cat# SH30910). Cellule HepG2 sono state seminate in piastre nere da 96 pozzetti Optilux (BD Falcon, Cat # BD353220) a 5000 cellule/pozzetto per una notte. Formulazioni sono state addizionate a ciascun pozzetto a una concentrazione finale indicata di siRNA (n=3). Dopo 48 ore dall'addizione della formulazione, la vitalità cellulare è stata determinata usando un kit per saggio di vitalità cellulare CellTiter-Glo Luminescent (Promega, Cat #G7572) seguendo le istruzioni del produttore. Un segnale chemioluminescente è stato misurato su un lettore di micropiastre a luminescenza Clarity (502-Biotek, Winooski, Vermont). La vitalità è stata calcolata in base alla % di segnale chemioluminescente in una formulazione trattata bene normalizzata rispetto a pozzetti trattati di simulazione.

Dati di tossicologia in vivo

[0203] La formulazione di HEDC:S104 (20:20) della presente descrizione è eccezionalmente ben tollerata come mostrato in studi di tossicità. Non è stata

osservata alcuna tossicità quando la formulazione è stata iniettata per via endovenosa in ratti e scimmie a dosi fino a 25 mg/kg e 12 mg/kg, rispettivamente, che i tecnici del ramo considerano essere superiore.

Trasfezione con formulazioni della descrizione:

[0204] Il metodo di trasfezione è lo stesso per LX-2 e pHSC. Le formulazioni di liposomi o formulazioni di lipoplessi della descrizione sono state miscelate con un terreno di crescita a concentrazioni desiderate. 100 µl della miscela sono stati addizionati in una piastra a 96 pozzetti e le cellule sono state incubate per 30 min a 37 °C nell'incubatore con 5% CO₂. Dopo 30 min, il terreno è stato sostituito con un terreno di crescita fresco. Dopo 48 ore di trasfezione, le cellule sono state trattate usando reagenti di lisi cellule-Ct (Applied Biosystems) secondo le istruzioni del produttore.

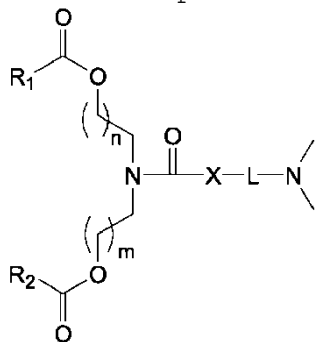
RT-PCR quantitativa (q) per misurare l'espressione di HSP47 mRNA

[0205] Saggi HSP47 e GAPDH TaqMan® e una miscela master One-Step RT-PCR sono stati acquistati da Applied Biosystems. Ciascuna reazione PCR conteneva la seguente composizione: 5 µl di miscela One-step RT-PCR, 0,25 µl di miscela di enzima RT TaqMan®, 0,25 µl di sonda di saggio di espressione genica TaqMan® (HSP47), 0,5 µl di

sonda di saggio di espressione genica TaqMan® (GAPDH), 3,25 µl di acqua libera RNasi, 0,75 µl di lisato cellulare, volume totale di 10 µl. GAPDH è stato usato come controllo endogeno per la quantificazione relativa dei livelli di HSP47 mRNA. RT-PCR quantitativa è stata eseguita in un sistema PCR realtime ViiA 7 (Applied Biosciences). Tutti i valori sono stati normalizzati all'espressione media di HSP47 delle cellule trasfettate di simulazione ed espressi come percentuale di espressione di HSP47 rispetto alla simulazione.

RIVENDICAZIONI

1. Un composto lipidico ionizzabile di formula I:



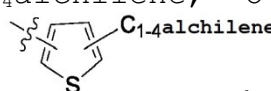
I

in cui

n e m sono indipendentemente 1, 2, 3 o 4;

R₁ e R₂ sono indipendentemente C₁₀₋₁₈alchile o C₁₂₋₁₈alchenile;

X è -CH₂-, S, O o assente;

L è C₁₋₄alchilene, -S-C₁₋₄alchilene, -O-C₁₋₄alchilene, -O-C(O)-C₁₋₄alchilene, -S(O)₂-C₁₋₄alchilene, ,

o  rappresenta  ;

o una relativa forma di sale farmaceuticamente accettabile, caratterizzato inoltre da

n e m essendo 2, o

X essendo assente e L essendo  o 

rappresenta , o

X essendo -CH₂- e L essendo -S-C₁₋₄alchilene, -S(O)₂-C₁₋₄alchilene, o -O-C(O)-C₁₋₄alchilene, o

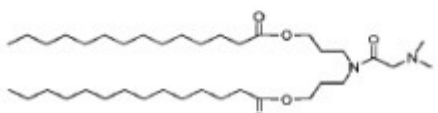
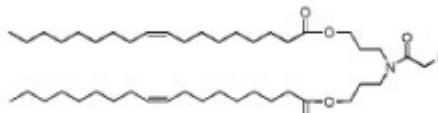
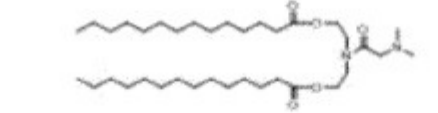
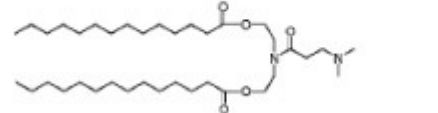
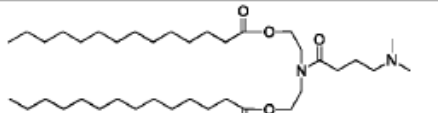
X essendo S, o

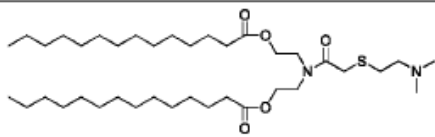
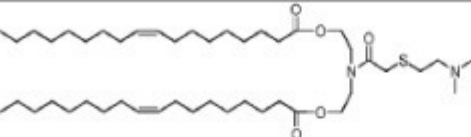
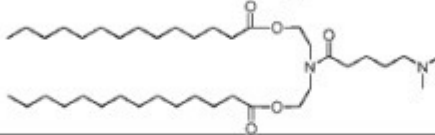
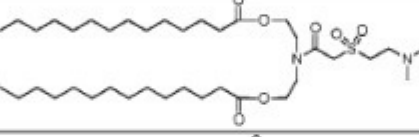
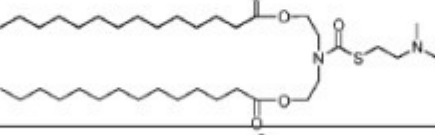
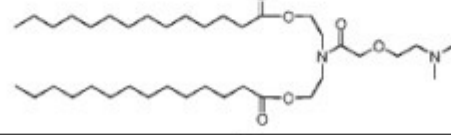
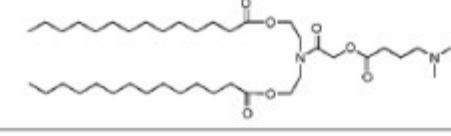
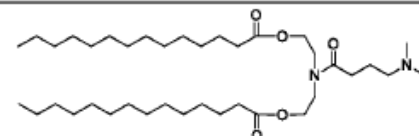
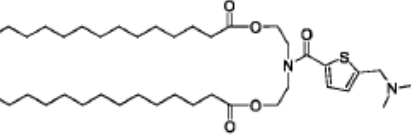
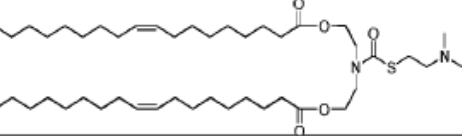
R₁ e R₂ essendo ciascuno C₁₀₋₁₈alchile,

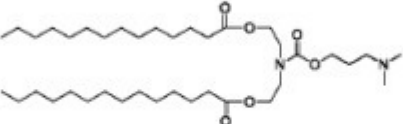
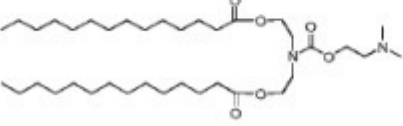
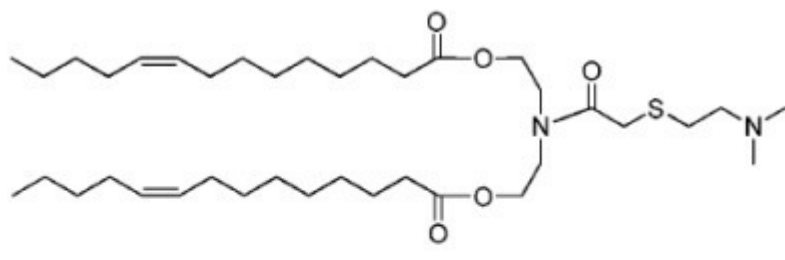
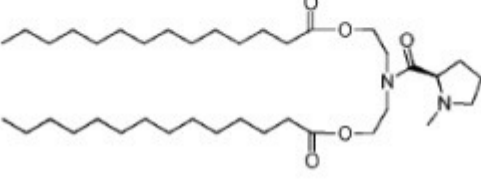
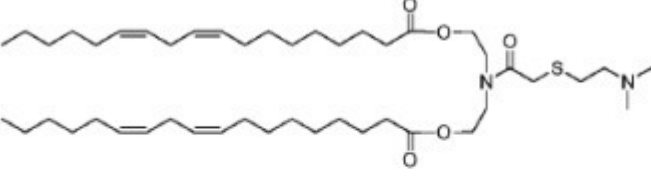
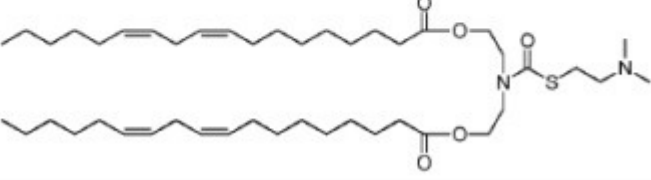
2. Il composto secondo la rivendicazione 1, in cui n e m sono 1.

3. Il composto secondo la rivendicazione 1, in cui X è -CH₂-.

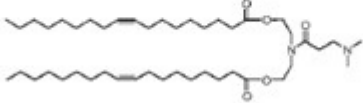
4. Il composto secondo la rivendicazione 1, selezionato dal seguente gruppo:

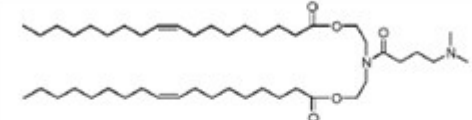
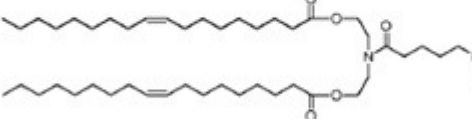
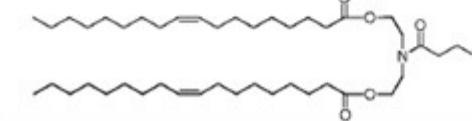
Lipide	Struttura
i-Pr-DC	
i-Pr-DODC	
i-DC	
i-Et-DC (Et104)	
i-Prop-DC	

S104	
Lipide	Struttura
S104-DO	
C104	
SO2-S104	
TU104	
O104	
HEDC-M1	
Pr104	
T104	
TU104-DO	

Lipide	Struttura
CB104	
CA104	
S104-DMO	
Pro-DC	
S104-DLin	
TU104-DLin	

5. Un composto selezionato dal seguente gruppo:

Lipide	Struttura
i-Et-DODC	

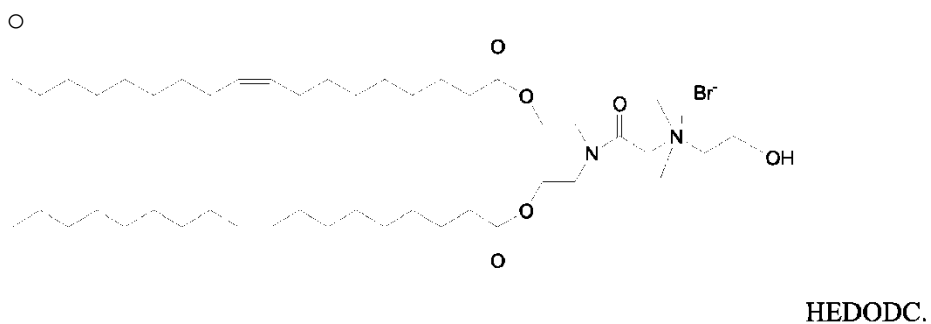
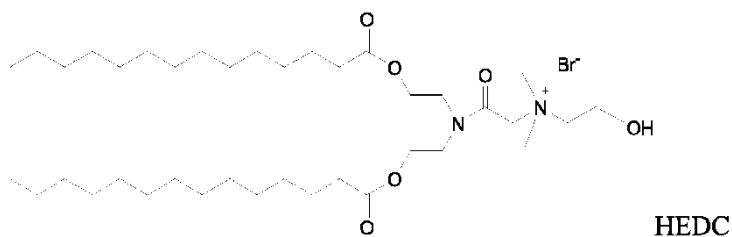
Lipide	Struttura
i-Prop-DODC	
C104-DO	
Pr104-DO	

6. Una composizione comprendente un composto secondo la rivendicazione 1 o 5 in un liposoma comprendente un doppio strato di molecole lipidiche.

7. La composizione secondo la rivendicazione 6, in cui il composto è dal 5 al 50% in moli delle molecole lipidiche.

8. La composizione secondo la rivendicazione 7, comprendente inoltre un lipide cationico.

9. La composizione secondo la rivendicazione 8, in cui il lipide cationico è



10. La composizione secondo la rivendicazione 8, in cui il lipide cationico è dal 5 al 40% in moli delle molecole lipidiche.

11. La composizione secondo la rivendicazione 6, comprendente inoltre un mezzo liquido.

12. La composizione secondo la rivendicazione 6, comprendente inoltre almeno un fosfolipide.

13. La composizione secondo la rivendicazione 6, comprendente inoltre almeno un lipide coniugato a PEG.

14. Un veicolo farmaceutico specifico di cellula stellata comprendente la composizione secondo la

rivendicazione 6, e una quantità specifica per una cellula stellata di una molecola bersaglio costituita dalla struttura (retinoide)_n-linker-(retinoide)_n, dove n=0, 1, 2 o 3; e in cui il linker comprende un polietilenglicole (PEG) o una molecole simile a PEG.

15. Il veicolo farmaceutico secondo la rivendicazione 14, comprendente inoltre una molecola di siRNA.

16. La formulazione farmaceutica secondo la rivendicazione 15, in cui il siRNA è incapsulato dal liposoma.

1/4

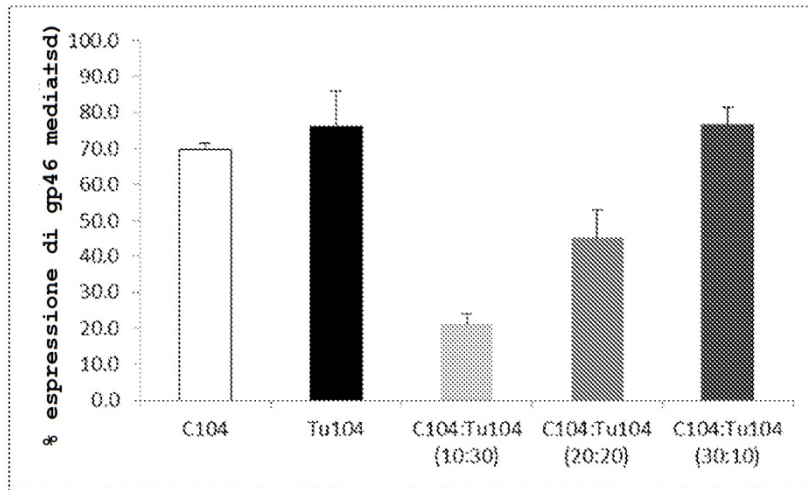


FIG. 1

2/4

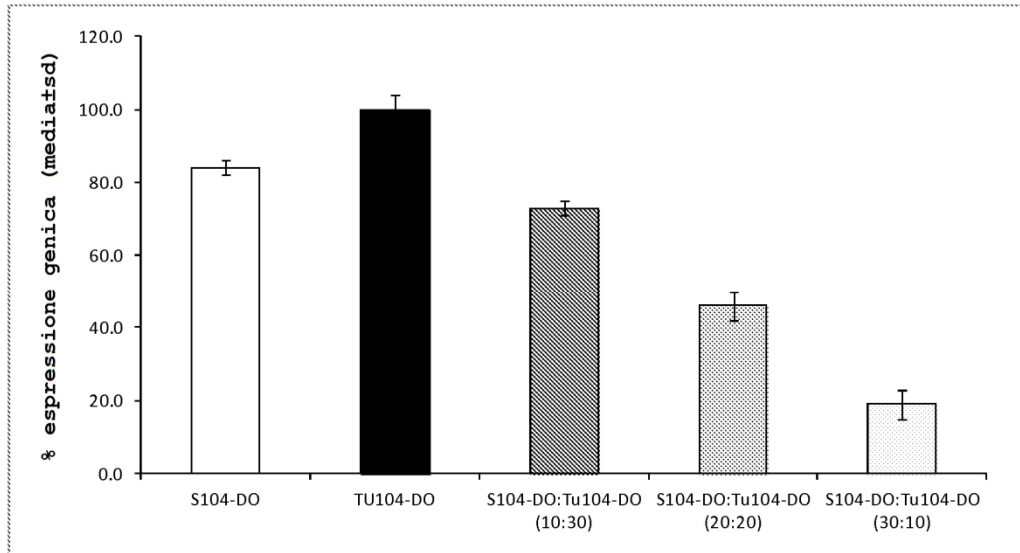


FIG. 2

3/4

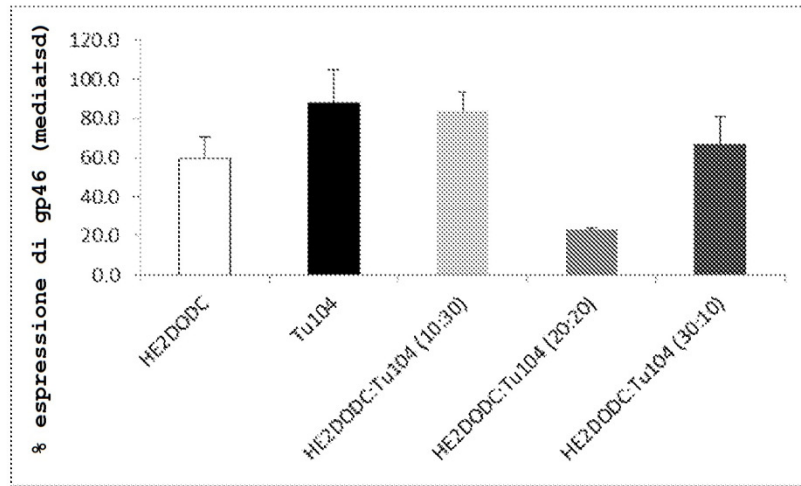


FIG. 3

4/4

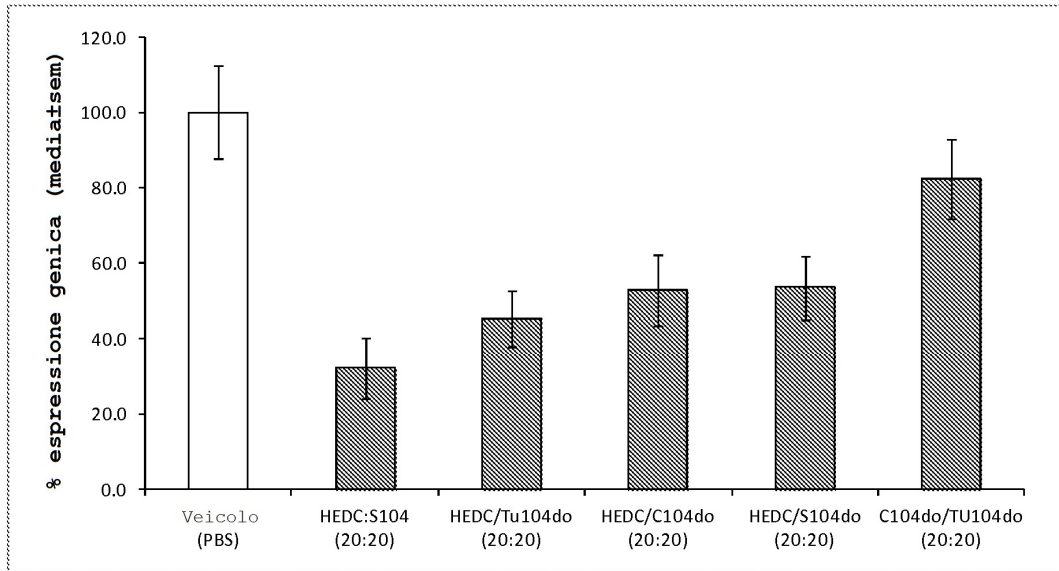


FIG. 4