

TRADUZIONE

Brevetto Europeo n° EP 3 394 030

Domanda di Brevetto Europeo n°16831870.7

Depositata in data 22 dicembre 2016

5 Titolo: **“COMPOSTI E COMPOSIZIONI PER IL RILASCIO INTRACELLULARE DI AGENTI”**

Titolare: **ModernaTX, Inc.**, con sede in 200 Technology Square, Cambridge, MA 02139/
STATI UNITI

10

DESCRIZIONE

DOMANDE CORRELATE

[0001] La presente domanda di brevetto rivendica la priorità e il beneficio delle domande provvisorie U.S. n. 62/271,160, depositata il 22 dicembre 2015, 62/271,179, depositata il 22 dicembre 2015, 62/271,137, depositata il 22 dicembre 2015, 62/271.200, depositata il 22 dicembre 2015, 62/271,146, depositata il 22 dicembre 2015; 62/338,474, depositata il 18 maggio 2016; 62/413,345, depositata il 26 ottobre 2016.

CAMPO TECNICO

[0002] La presente descrizione fornisce composti, composizioni che comprendono tali composti e metodi che prevedono composizioni di nanoparticelle lipidiche per rilasciare uno o più agenti terapeutici e/o profilattici e/o produrre polipeptidi in cellule o organi di mammiferi. Oltre a un amminolipide, le composizioni di nanoparticelle lipidiche della descrizione possono includere uno o più amminolipidi cationici e/o ionizzabili, fosfolipidi inclusi lipidi polinsaturi, lipidi PEG, lipidi strutturali e/o agenti terapeutici e/o profilattici in frazioni specifiche.

STATO DELLA TECNICA

25 [0003] L'efficace rilascio mirato di sostanze biologicamente attive come farmaci a piccole

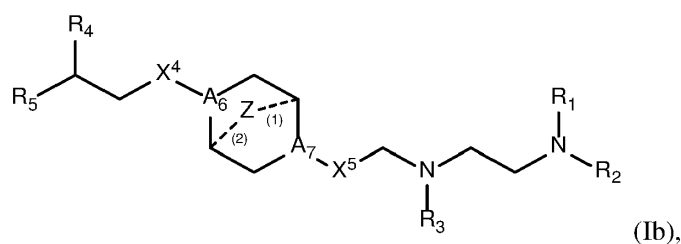
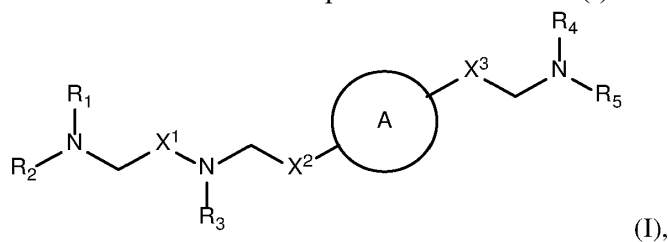
molecole, proteine e acidi nucleici rappresenta una sfida medica in corso. In particolare, il rilascio di acidi nucleici nelle cellule è reso difficile dalla relativa instabilità e dalla bassa permeabilità cellulare di tali specie. Pertanto, esiste la necessità di sviluppare metodi e composizioni per facilitare il rilascio di agenti terapeutici e/o profilattici, come acidi nucleici, nelle cellule.

[0004] Le composizioni di nanoparticelle contenenti lipidi, i liposomi e i lipoplessi si sono dimostrati efficaci come veicoli di trasporto nelle cellule e/o nei compartimenti intracellulari per sostanze biologicamente attive come farmaci a piccole molecole, proteine e acidi nucleici. Tali composizioni generalmente includono uno o più lipidi "cationici" e/o amminici (ionizzabili), fosfolipidi inclusi lipidi polinsaturi, lipidi strutturali (ad esempio steroli) e/o lipidi contenenti polietilenglicole (lipidi PEG). I lipidi cationici e/o ionizzabili includono, ad esempio, lipidi contenenti ammina che possono essere prontamente protonati. Sebbene sia stata dimostrata una varietà di tali composizioni di nanoparticelle contenenti lipidi, mancano ancora miglioramenti in termini di sicurezza, efficacia e specificità.

15 SOMMARIO

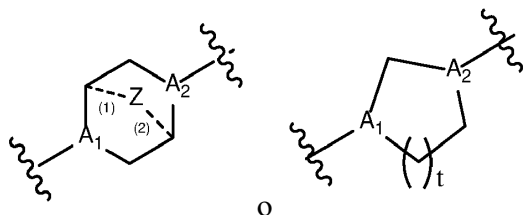
[0005] La presente descrizione fornisce composti e composizioni e metodi che li coinvolgono.

[0006] La presente invenzione fornisce un composto avente formula (I) o formula (Ib)



20

o un suo sale o isomero, in cui l'anello A è



t è 1 o 2;

A₁ e A₂ sono selezionati ciascuno indipendentemente tra CH o N;

- 5 A₆ e A₇ sono selezionati ciascuno indipendentemente da CH o N, in cui almeno uno tra A₆ e A₇ è N;

Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;

- 10 R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀, alchenile C₅₋₂₀, -R"MR', -R *YR", -YR", e -R* OR";

ciascun M è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂ -, un gruppo arilico e un gruppo eteroarilico; in cui quando il composto è di formula (Ib), allora M non è -OC(O)O-;

- 15 X¹, X² e X³ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da un legame, -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

X⁴ e X⁵ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -

- 20 CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

ciascun Y è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;

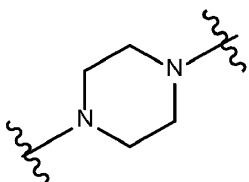
ciascun R* è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C₂₋

12;

ciascun R indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e carbociclo C₃₋₆;
ciascun R' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂
e H; e
ciascun R'' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋

5 12,

in cui quando il composto è di formula (I) e quando l'anello A è

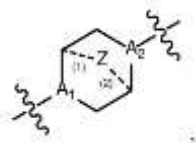


allora

i) almeno uno tra X¹, X² e X³ non è -CH₂-; e/o

10 ii) almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è -R''MR'; e

quando il composto è di Formula (I) e l'anello A è

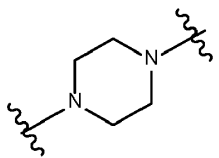


e X¹, X² e X³ sono ciascuno -CH₂, allora

almeno uno tra A¹ e A² è N,

15 R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₆₋₂₀ e alchenile C₆₋₂₀, e

quando l'anello A è



allora

20 i) R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali, in cui R₁ non è alchile C₁₂, alchile C₁₈ o alchenile C₁₈;

ii) solo uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è selezionato da alchenile C₆₋₂₀;

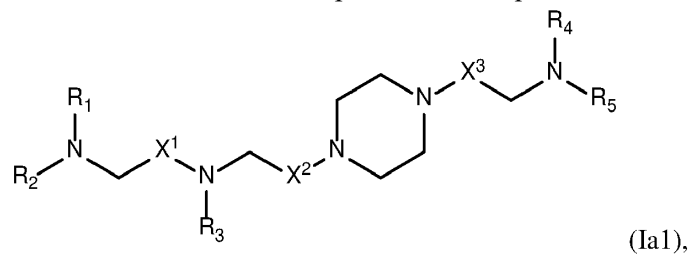
iii) almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ ha un numero di atomi di carbonio diverso da almeno un altro di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅;

iv) R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀, e R₄ e R₅ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀; o

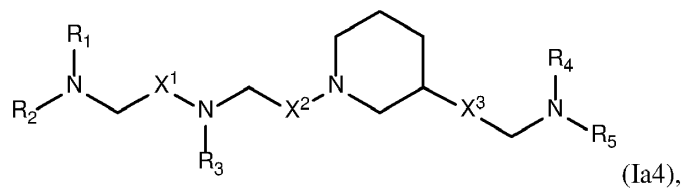
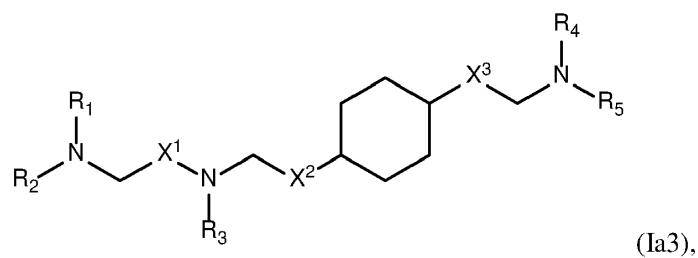
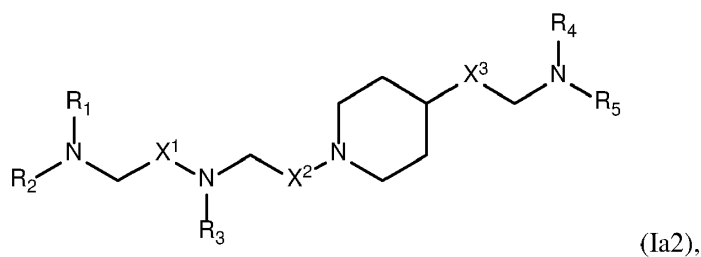
5 v) R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀ e R₄ e R₅ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀.

[0007] I composti di formula (I) possono includere una o più delle seguenti caratteristiche quando applicabili.

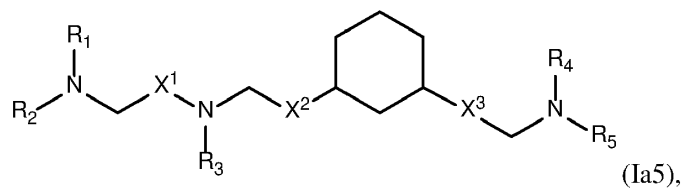
[0008] In alcune forme di realizzazione, il composto è di una qualsiasi delle formule (Ia1)-(Ia6):



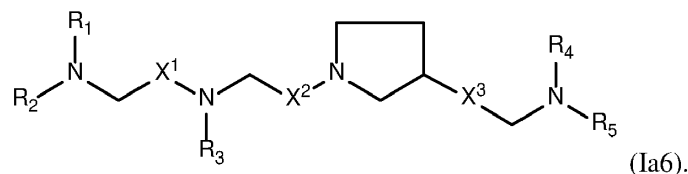
10



15



o



5

[0009] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra X^1 , X^2 e X^3 non è $-CH_2-$. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, X^1 non è $-CH_2-$. In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra X^1 , X^2 e X^3 è $-C(O)-$. In alcune forme di realizzazione, X^3 è un legame mentre ciascuno di X^1 e X^2 non è un legame. In alcune forme di realizzazione, nessuno di X^1 , X^2 e X^3 è un legame.

10 **[0010]** In alcune forme di realizzazione, R_1 e R_2 sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R_1 , R_2 e R_3 sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R_4 e R_5 sono uguali. In determinate forme di realizzazione, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 sono uguali.

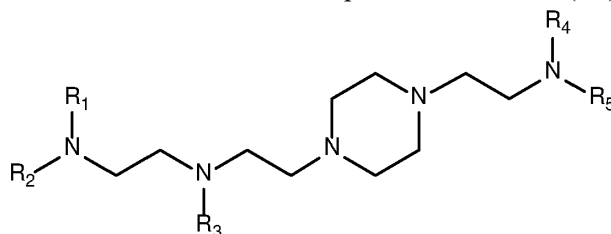
[0011] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è $-R''MR'$. In alcune forme di realizzazione, al massimo uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è $-R''MR'$. Ad esempio, almeno uno tra R_1 , R_2 e R_3 può essere $-R''MR'$, e/o almeno uno tra R_4 e R_5 è $-R''MR'$. In determinate forme di realizzazione, almeno un M è $-C(O)O-$. In alcune forme di realizzazione, ciascun M è $-C(O)O-$. In alcune forme di realizzazione, almeno un M è $-OC(O)-$. In alcune forme di realizzazione, ciascun M è $-OC(O)-$. In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile C_3 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R'' è alchile C_3 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile C_5 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R'' è alchile C_5 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile C_6 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R'' è alchile C_6 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile

20

C₇. In determinate forme di realizzazione, ciascuna R' è alchile C₇. In alcune forme di realizzazione, almeno un R' è alchile C₅. In determinate forme di realizzazione, ciascuna R' è alchile C₅. In altre forme di realizzazione, almeno un R' è alchile C₁. In determinate forme di realizzazione, ciascuna R' è alchile C₁. In alcune forme di realizzazione, almeno un R' è alchile C₂. In determinate forme di realizzazione, ciascuna R' è alchile C₂.

[0012] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è alchile C₁₂. In determinate forme di realizzazione, ciascuno di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono alchile C₁₂.

[0013] In alcune forme di realizzazione, il composto è di formula (IIa):



(IIa).

10

[0014] In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali e non sono alchile C₁₂, alchile C₁₈ o alchenile C₁₈. In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali e sono alchile C₉ o alchile C₁₄.

[0015] In alcune forme di realizzazione, solo uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è selezionato da alchenile C₆₋₂₀. In alcune di queste forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ hanno lo stesso numero di atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, R₄ è selezionato da alchenile C₅₋₂₀. Ad esempio, R₄ può essere alchenile C₁₂ o alchenile C₁₈.

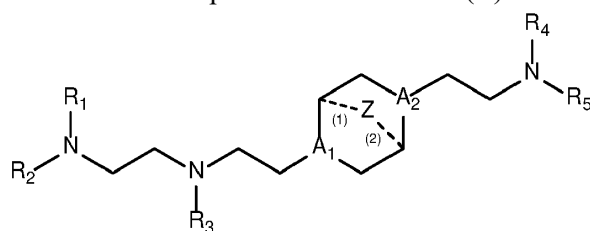
[0016] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ ha un numero di atomi di carbonio diverso da almeno un altro di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅.

[0017] In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀ e R₄ e R₅ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀. In altre forme di realizzazione, R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀ e R₄ e R₅ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀. In alcune forme di realizzazione, R₁,

R₂ e R₃ hanno lo stesso numero di atomi di carbonio e/o R₄ e R₅ hanno lo stesso numero di atomi di carbonio. Ad esempio, R₁, R₂ e R₃, o R₄ e R₅, possono avere 6, 8, 9, 12, 14 o 18 atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, e R₃, o R₄ e R₅, sono alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile). In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, e R₃, o R₄ e R₅, sono gruppi alchile che includono 6, 8, 9, 12 o 14 atomi di carbonio.

[0018] In alcune forme di realizzazione, R₁ ha un numero diverso di atomi di carbonio rispetto a R₂, R₃, R₄ e R₅. In altre forme di realizzazione, R₃ ha un numero di atomi di carbonio diverso da R₁, R₂, R₄ e R₅. In ulteriori forme di realizzazione, R₄ ha un numero di atomi di carbonio diverso da R₁, R₂, R₃ e R₅.

10 **[0019]** Viene anche descritto un composto avente formula (II):



(II),

o un suo sale o isomero, in cui

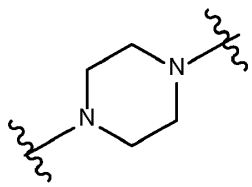
A₁ e A₂ sono selezionati ciascuno indipendentemente da CH o N, e almeno uno tra A₁ e A₂ è N;

Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna

15 un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;

R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₆₋₂₀ e alchenile C₆₋₂₀;

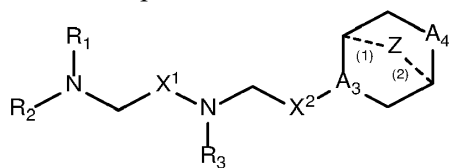
in cui quando l'anello A è



20 allora

- i) R_1, R_2, R_3, R_4 e R_5 sono uguali, in cui R_1 non è alchile C_{12} , alchile C_{18} o alchenile C_{18} ;
ii) solo uno tra R_1, R_2, R_3, R_4 e R_5 è selezionato da alchenile C_{6-20} ;
iii) almeno uno tra R_1, R_2, R_3, R_4 e R_5 ha un numero di atomi di carbonio diverso da almeno un altro di R_1, R_2, R_3, R_4 e R_5 ;
- 5 iv) R_1, R_2 e R_3 sono selezionati da alchenile C_{6-20} , e R_4 e R_5 sono selezionati da alchile C_{6-20} ; o
v) R_1, R_2 e R_3 sono selezionati da alchile C_{6-20} e R_4 e R_5 sono selezionati da alchenile C_{6-20} .

[0020] Viene anche descritto un composto secondo la formula (III):



(III),

o un suo sale o isomero, in cui

- 10 A_3 è CH o N;
 A_4 è CH_2 o NH; e almeno uno tra A_3 e A_4 è N o NH;
 Z è CH_2 o assente in cui quando Z è CH_2 , le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;
 R_1, R_2 e R_3 sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} , alchenile
- 15 C_{5-20} , $-R^*MR'$, $-R^*YR'$, $-YR'$, e $-R^*OR'$;
Ciascun M è indipendentemente selezionato da $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R')$, $-N(R')C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR')O-$, $-S(O)_2-$, un gruppo arile e un gruppo eteroarile;
 X^1 e X^2 sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da $-CH_2-$, $-(CH_2)_2-$, $-CHR-$, $-$
- 20 $CHY-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-C(O)-$, $-C(O)O-CH_2-$, $-OC(O)-CH_2-$, $-CH_2-C(O)O-$, $-CH_2-OC(O)-$, $-CH(OH)-$, $-C(S)-$ e $-CH(SH)-$;
ciascun Y è indipendentemente un carbociclo C_{3-6} ;
ciascun R^* è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} e alchenile C_2 .

12;

ciascun R indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e carbociclo C₃₋₆;

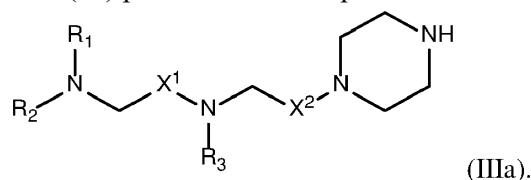
ciascun R' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂ e H; e

5 ciascun R'' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋

12.

[0021] I composto di formula (III) possono includere una o più delle seguenti caratteristiche quando applicabili.

[0022] Il composto di formula (III) può essere un composto di formula (IIIa):



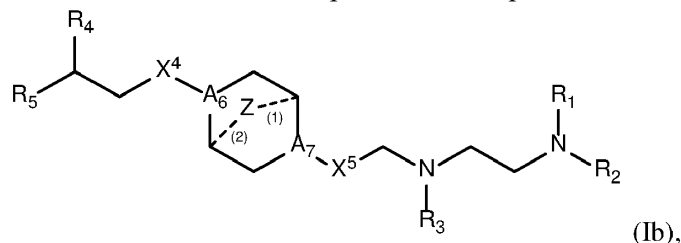
10

[0023] R₁, R₂ e R₃ possono essere selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀ e alchenile C₅₋₂₀. R₁, R₂ e R₃ possono essere uguali. R₁, R₂ e R₃ possono essere alchile C₆, C₉, C₁₂ o C₁₄. R₁, R₂ e R₃ possono essere alchenile C₁₈. Ad esempio, R₁, R₂ e R₃ possono essere

15

[0024] In alcuni esempi, almeno uno tra X¹ e X² non è -CH₂-. Ad esempio, in determinati casi, X¹ non è -CH₂-. In alcuni casi, almeno uno tra X¹ e X² è -C(O)-.

[0025] In alcune forme di realizzazione, il composto è un composto secondo la formula (Ib):



20

o un suo sale o isomero, in cui

A₆ e A₇ sono selezionati ciascuno indipendentemente da CH o N, in cui almeno uno tra A₆ e A₇

è N;

Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;

X⁴ e X⁵ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -
5 CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -
CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono ciascuno selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀ e alchenile C₅₋₂₀, -R"MR', -R *YR", -YR", e -R * OR";

Ciascun M è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da -C(O)O-, -OC(O)-, -
10 C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-,
un gruppo arile e un gruppo eteroarile;

ciascun Y è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;

ciascun R* è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C<sub>2-
12</sub>;

15 ciascun R indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e carbociclo C₃₋₆;
ciascun R' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂
e H; e

ciascun R'' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C<sub>3-
12</sub>.

20 **[0026]** 1B di formula (Ib) possono includere una o più delle seguenti caratteristiche quando applicabili.

[0027] In alcune forme di realizzazione, R₁ e R₂ sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂ e R₃ sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R₄ e R₅ sono uguali. In determinate forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali.

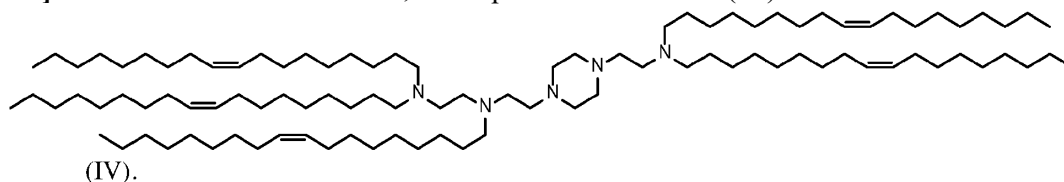
25 **[0028]** In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è alchile C₉₋₁₂. In

alcune forme di realizzazione, ciascuno di R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 indipendentemente è alchile C_9 , C_{12} o C_{14} . In determinate forme di realizzazione, ciascuno di R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è alchile C_9 .

[0029] In alcune forme di realizzazione, A_6 è N e A_7 è N. In alcune forme di realizzazione, A_6 è CH e A_7 è N.

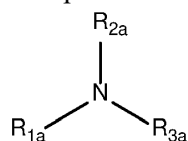
5 [0030] In alcune forme di realizzazione, X^4 è -CH₂- e X^5 è -C(O)-. In alcune forme di realizzazione, X^4 e X^5 sono -C(O)-.

[0031] In una forma di realizzazione, il composto ha la formula (IV)



10

[0032] Viene anche descritto un composto avente la formula (17-1):



(17-I),

o un suo sale o isomero, in cui R_{1a} è $-(CH_2)_{na}Q^a$, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, $-OR^a$, $-O(CH_2)_{na}N(R^a)_2$, $-C(O)OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-CX^a_3$, $-CX^a_2H$, $-CX^aH_2$, $-CN$, $-N(R^a)_2$, $-C(O)N(R^a)_2$,

15 $N(R^a)C(O)R^a$ e $-N(R^a)S(O)_2R^a$ e ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

R_{2a} e R_{3a} sono selezionati ciascuno indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{3-24} , alchenile C_{3-24} , $-R^a * Y^a R^{a''}$, $-Y^a R^{a''}$, e $-R^a * OR^{a''}$;

ciascun Y^a è indipendentemente un carbociclo C_{3-6} ;

ciascun R^{a*} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} e alchenile C_{1-12} ;

20

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

ciascun R^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e

H; e

ciascun R'' è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋₁₂;

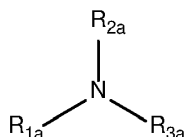
in cui R_{2a} include 7 o meno atomi di carbonio.

[0033] In alcuni esempi, Q^a è -OR^a. In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è -CH₃.

- 5 [0034] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altre forme di realizzazione, n^a è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

[0035] In alcuni esempi, R_{3a} include 7 o meno atomi di carbonio.

[0036] Nel presente contesto viene anche descritto un composto avente la formula (17-I)



(17-I),

- 10 o un suo sale o isomero, in cui

R_{1a} è -(CH₂)_{na}Q^a, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, -OR^a, -O(CH₂)_{na}N(R^a)₂, -C(O)OR^a, -OC(O)R^a, -CX^a₃, -CX^a₂H, -CX^aH₂, -CN, -N(R^a)₂, -C(O)N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)R^a e -N(R^a)S(O)₂R^a e ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

- 15 R_{2a} è selezionato dal gruppo costituito da alchenile C₈₋₂₄;

R_{3a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₈₋₂₄; e

ciascun R^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃, alchenile C₂₋₃ e H.

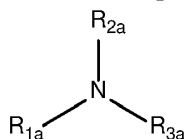
[0037] In alcuni esempi, Q^a è -OR^a. In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è -CH₃.

- 20 [0038] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altre forme di realizzazione, n^a è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

[0039] In alcuni esempi, R_{3a} è un alchile che include 9, 12, 14 o 18 atomi di carbonio.

[0040] In alcuni esempi, R_{2a} è alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile).

[0041] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (17-I)



(17-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1a} è $-(CH_2)_{na}Q^a$, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, $-OR^a$, $-O(CH_2)_{na}N(R^a)_2$, $-C(O)OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-CX^a_3$, $-CX^a_2H$, $-CX^aH_2$, $-CN$, $-N(R^a)_2$, $-C(O)N(R^a)_2$, $-N(R)C(O)R^a$ e $-N(R^a)S(O)_2R^a$ e ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

R_{2a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{13-20} ;

R_{3a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{8-20} ; e

10 ciascun R^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e H.

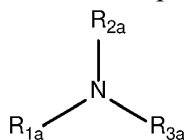
[0042] In alcuni esempi, Q^a è $-OR^a$. In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è $-CH_3$.

[0043] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altre forme di realizzazione, n^a è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

15 [0044] In alcuni esempi, R_{2a} e R_{3a} sono uguali.

[0045] In alcuni esempi, R_{2a} e/o R_{3a} è alchile C_{14} .

[0046] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (17-I)



(17-I),

20 o un suo sale o isomero, in cui

R_{1a} è $-(CH_2)_{na}Q^a$, dove Q^a è $-OR^a$, R^a è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e H, e n^a è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5; e

R2a e R3a sono selezionati ciascuno indipendentemente dal gruppo costituito da alchenile C₈₋₂₀,
in cui

- i) R^a è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e alchenile C₂₋₃; o
- ii) R_{1a} è -(CH₂)₂OH, e R_{2a} e R_{3a} includono ciascuno uno o meno doppi legami.

5 [0047] In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è -CH₃.

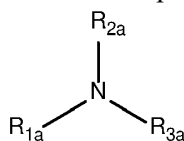
[0048] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altri esempi, n^a è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

[0049] In determinati esempi, R_{1a} è -(CH₂)₂OCH₃. In altri esempi, R_{1a} è -(CH₂)₂OH.

[0050] In alcuni esempi, R_{2a} è alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile). In alcuni esempi, R_{3a} è
10 alchenile C₁₈ (ad es. linoleile).

[0051] In alcuni esempi, R_{2a} e R_{3a} sono uguali.

[0052] La descrizione fornisce anche un composto di formula (17-1)



(17-I),

o un suo sale o isomero, in cui

15 R_{1a} è -(CH₂)_{na}Q^a, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, -OR^a, -O(CH₂)_{na}N(R^a)₂, -C(O)OR^a, -OC(O)R^a, -CX^a₃, -CX^a₂H, -CX^aH₂, -CN, -N(R^a)₂, -C(O)N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)R^a e -N(R^a)S(O)₂R^a e ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

R_{2a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₈₋₁₂;

20 R_{3a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₈₋₂₀; e

ciascun R^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃, alchenile C₂₋₃ e H.

[0053] In alcuni esempi, Q^a è -OR^a. In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è -CH₃.

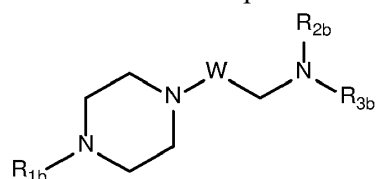
[0054] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altri esempi, n^a è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

[0055] In alcuni esempi, Q^a è $-OR^a$ e n^a è selezionato tra 2, 3 e 4.

[0056] In alcuni esempi, R_{2a} è alchile C_9 . In altri esempi, R_{2a} è alchile C_{12} .

5 [0057] In alcuni esempi, R_{2a} e R_{3a} sono uguali.

[0058] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (19-I),



(19-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1b} è selezionato dal gruppo costituito da H, alchile C_{1-5} , alchenile C_{2-5} , $-R^{b''}M^bR^{b'}$, un
10 carbociclo C_{3-6} , $-(CH_2)_nQ^b$ e $-(CH_2)_nCHQ^bR^b$, dove Q^b è selezionato da un eterociclo, $-OR^b$, $-$
 $O(CH_2)_nN(R^b)_2$, $-C(O)OR^b$, $-OC(O)R^b$, $-CX^b_3$, $-CX^b_2H$, $-CX^bH_2$, $-CN$, $-N(R^b)_2$, $-C(O)N(R^b)_2$, $-$
 $N(R^b)C(O)R^b$ e $-N(R^b)S(O)_2R^b$ e ogni n è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

R_{2b} e R_{3b} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-20} , alchenile
 C_{2-20} , $-R^{b''}MR^{b'}$, $-R^{b*}YR^{b''}$, $-YR^{b''}$ e $-R^{b*}OR^{b''}$;

15 Ciascun M^b è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-$
 $C(O)N(R^b)-$, $-N(R^b)C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR^b)O-$, $-S(O)_2-$,
un gruppo arile e un gruppo eteroarile;

W è selezionato dal gruppo costituito da $-CH_2-$, $-CHR^b-$, $-C(O)-$, $-CH(OH)-$, $-C(S)-$ e $-CH(SH)-$;
ciascun X^b è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

20 ciascun Y^b è indipendentemente un carbociclo C_{3-6} ;

ciascun R^{b*} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} e alchenile C_{1-}
12;

ciascun R^b è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , un carbociclo

C₃₋₆, alchenile C₂₋₃ e H;

ciascun R^{b'} è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂ e H; e

ciascun R^{b''} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋₁₂.

5

[0059] In alcuni esempi, W non è -CH₂-. In tali esempi specifici, W è -C(O)-.

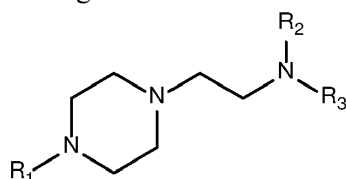
[0060] In alcuni esempi, almeno uno tra R_{2b} e R_{3b} è -R^{b'''}M^bR^{b'}. In determinati esempi, almeno un M^b è -C(O)O-. In alcuni esempi, almeno un R^{b'''} è alchile C₅. In determinati esempi, almeno un R^{b'} è alchile C₅.

10 [0061] In alcuni esempi, R_{2b} e/o R_{3b} sono selezionati dal gruppo costituito da alchile C₁₋₂₀. Ad esempio, R_{2b} e/o R_{3b} possono essere gruppi alchile includenti 9 o 12 atomi di carbonio. In altri esempi, R_{2b} e/o R_{3b} sono selezionati dal gruppo costituito da alchenile C₂₋₂₀. Ad esempio, R_{2b} e/o R_{3b} possono essere gruppi alchenile comprendenti 18 atomi di carbonio (ad esempio gruppi linoleile). In determinati esempi, R_{2b} e R_{3b} sono uguali.

15 [0062] In alcuni esempi, R_{1b} è H, mentre in altri esempi, R_{1b} è selezionato da alchile C₁₋₅. Ad esempio, R_{1b} può essere alchile C₁.

[0063] In alcuni esempi, R_{1b} è -(CH₂)_nQ^b. In tali esempi, Q^b è un eterociclo come un gruppo fenile. Ad esempio, Q^b può essere un gruppo fenile con uno o più sostituenti, come qui descritto.

[0064] Nel presente contesto vengono anche descritti i composti di formula (19-11):



(19-II),

20

o suoi sali o isomeri, in cui

R_{1b} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₆₋₂₀; e

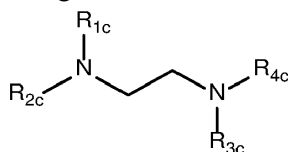
R_{2b} e R_{3b} sono selezionati ciascuno indipendentemente dal gruppo costituito da alchenile C₆₋₂₀.

[0065] In esempi specifici, R_{1b} è alchile C₁₂

[0066] In alcuni esempi, R_{2b} e/o R_{3b} sono alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile).

[0067] In determinati esempi, R_{2b} e R_{3b} sono entrambi linoleile.

[0068] Nel presente contesto vengono anche descritti i composti di formula (20-1):



5

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da un carbociclo

C₃₋₆, -(CH₂)_{nc}Q^c, -(CH₂)_{nc}CHQ^cR^c, -CHQ^cR^c e CQ^c (R^c)₂, dove Q^c è selezionato da un eterociclo, -OR^c, -O(CH₂)_{nc}N(R^c)₂, -C(O)OR^c, -OC(O)R^c, -CX^c₃, -CX^c₂H, -CX^cH₂, -CN, -N(R^c)₂, -C(O)N(R^c)₂, -N(R^c)C(O)R^c, e -N(R^c)S(O)₂R^c e ogni n^c è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

10

R_{2c}, R_{3c} e R_{4c} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da C₁₋₂₀ alchile, C₂₋₂₀ alchenile, -R^cM^cR^{ci}, -R^c*Y^cR^{ci}, -Y^cR^{ci}, e -R^c*OR^{ci};

Ciascun M^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R^c)-, -N(R^c)C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-, un gruppo arile e un gruppo eteroarile;

15

ciascun X^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

ciascun Y^c è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;

ciascun R^{c*} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C₁₋

20

12;

ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃, alchenile C₂₋₃ e H;

ciascun R^{ci} è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋

$_{12}$ e H; e

ciascun $R^{c'}$ indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{3-12} e alchenile C_{3-12} ,

$_{12}$,

in cui

5 i) R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da un carbociclo

C_{3-6} , $-(CH_2)_{nc}Q^c$, $-(CH_2)_{nc}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$ e $CQ^c(R^c)_2$, dove Q^c è selezionato da un eterociclo, $-O(CH_2)_{nc}N(R^c)_2$, $-C(O)OR^c$, $-OC(O)R^c$, $-CX^c_3$, $-CX^c_2H$, $-CX^cH_2$, $-C(O)N(R^c)_2$, $-N(R^c)C(O)R^c$, e $-N(R^c)S(O)_2R^c$ e ogni n^c è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5; e/o

ii) almeno uno tra R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} è $-R^{c''}M^cR^{c'}$.

10

[0069] In alcuni esempi, R_1 è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_{nc}Q^c$, $-(CH_2)_{nc}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$, e $-CQ^c(R^c)_2$, dove Q^c è selezionato da un eterociclo, $-O(CH_2)_{nc}N(R^c)_2$, $-C(O)OR^c$, $-OC(O)R^c$, $-CX^c_3$, $-CX^c_2H$, $-CX^cH_2$, $-CN$, $-C(O)N(R^c)_2$, $-N(R^c)C(O)R^c$, e $-N(R^c)S(O)_2R^c$ e ogni n è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5. In determinati esempi, R_{1c} è $-(CH_2)_nQ^c$. In

15 alcuni esempi, è 2. In alcuni esempi, Q^c è $-C(O)OR^c$, dove R^c è, ad esempio, H.

[0070] In alcuni esempi, almeno uno tra R_{2c} , R_{3c} , e R_{4c} è $-R^{c''}M^cR^{c'}$. Ad esempio, R_{2c} , R_{3c} e/o R_{4c} possono essere $-R^{c''}M^cR^{c'}$. In alcuni esempi, almeno un M^c è $-C(O)O-$. In determinati esempi, ogni M^c è $-C(O)O-$. In alcuni esempi, almeno un $R^{c''}$ è alchile C_5 o C_7 . In determinati esempi, ogni $R^{c''}$ è alchile C_5 . In altri esempi, ogni $R^{c''}$ è alchile C_7 . In alcuni esempi, almeno un $R^{c'}$ alchile C_5 , C_7 o C_9 . In determinati esempi, ogni $R^{c'}$ è alchile C_5 . In altri esempi, ogni $R^{c'}$ alchile C_7 . In altri esempi, ogni $R^{c'}$ alchile C_9 . In alcuni esempi, $R^{c'}$ è ramificato.

[0071] In alcuni esempi, R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} sono selezionati dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} . In determinati esempi, R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} sono alchile C_{12} .

[0072] In alcuni esempi, R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} e alchenile C_{5-20} .

25 Ad esempio, R_{2c} può essere alchile C_{12} .

[0073] In alcuni esempi, R_{3c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} e alchenile C_{5-20} .

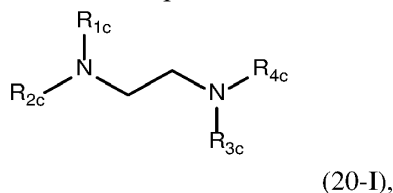
Ad esempio, R_{3c} può essere alchile C_6 , C_9 o C_{12} .

[0074] In alcuni esempi, R_{4c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} e alchenile C_{5-20} .

Ad esempio, R_{4c} può essere alchile C_6 , C_9 o C_{12} .

5 [0075] In alcuni esempi, R_{3c} e R_{4c} sono uguali.

[0076] La descrizione fornisce anche un composto secondo la formula (20-1):



o un suo sale o isomero, in cui

R_1 è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_n Q^c$, $-(CH_2)_n CHQ^c R^c$, $-CHQ^c R^c$, e $-CQ^c (R^c)_2$,

10 dove Q^c è selezionato da $-OR^c$, $-CN$ e $-N(R^c)_2$ e n^c è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5;

R_{2c} e R_{3c} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{6-20} e alchenile C_{6-20} ;

R_{4c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{13-20} e alchenile C_{5-20} ; e

ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e

15 H.

[0077] In alcuni esempi, R_{3c} è alchile C_{14} .

[0078] In alcuni esempi, R_{4c} è alchile C_{14} .

[0079] In alcuni esempi, R_{3c} è alchenile C_{18} . Ad esempio, R_{3c} può essere linoleile.

[0080] In alcuni esempi, R_{4c} è alchenile C_{18} . Ad esempio, R_{4c} può essere linoleile.

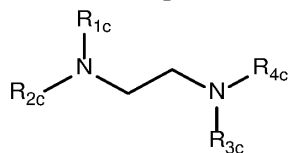
20 [0081] In alcuni esempi, R_{2c} è alchile C_{12} . In altri esempi, R_{2c} è alchile C_{14} . In alcuni esempi, R_{2c} è alchenile C_{18} . Ad esempio, R_{2c} può essere linoleile.

[0082] In alcuni esempi, R_{3c} e R_{4c} sono uguali.

[0083] In alcuni esempi, R_{1c} è $-(CH_2)_n Q^c$. In alcuni esempi, Q^c è $-OR^c$. Ad esempio, Q^c può

essere -OH. In alcuni esempi, n^c è 2 o 3.

[0084] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (20-1):



(20-I),

o un suo sale o isomero, in cui

- 5 R_1 è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_{nc}Q^c$, $-(CH_2)_{nc}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$, e $-CQ^c(R^c)_2$, dove Q^c è selezionato da $-OR^c$, $-CN$ e $-N(R^c)_2$ e n^c è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5;

R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{6-20} e alchenile C_{6-20} ;

ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e

- 10 H;

in cui

i) R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} , e/o

ii) R_{3c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} .

[0085] In alcuni esempi, R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} .

- 15 Ad esempio, R_{2c} può essere alchile C_6 o C_9 .

[0086] In alcuni esempi, R_{3c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} .

Ad esempio, R_{3c} può essere alchile C_6 o C_9 .

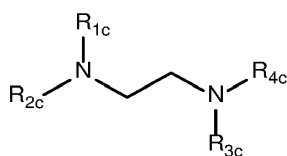
[0087] In alcuni esempi, R_{3c} è alchile C_{12} .

[0088] In alcuni esempi, R_{2c} è alchile C_{12} .

- 20 [0089] In alcuni esempi, R_{4c} è alchile C_6 , C_9 o C_{12} .

[0090] In alcuni esempi, R_{1c} è $-(CH_2)_{nc}Q^c$. In determinati esempi, Q^c è $-OR^c$. In alcuni esempi, R^c è H. In alcuni esempi, n^c è 2 o 3.

[0091] La descrizione fornisce anche un composto secondo la formula (20-1):



(20-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_{nc}Q^c$, $-(CH_2)_{nc}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$, e $-CQ^c(R^c)_2$,
dove Q^c è selezionato da $-OR^c$, $-CN$ e $-N(R^c)_2$ e n^c è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5;

5 R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da H, alchile C_{12-20} e alchenile C_{6-20} ;

R_{3c} e R_{4c} sono alchile C_{12} ; e

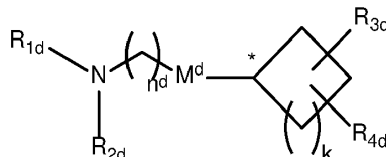
ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e H.

[0092] In alcuni esempi, R_{2c} è H. In altri esempi, R_{2c} è alchile o alchenile C_{12} . In alcuni esempi,

10 R_{2c} è alchile C_{14} . In altri esempi, R_{2c} è alchenile C_{18} . Ad esempio, R_{2c} può essere linoleile.

[0093] In alcuni esempi, R_{1c} è $-(CH_2)_{nc}Q^c$. In determinati esempi, Q^c è $-OR^c$. Ad esempio, Q^c può essere OH. In alcuni esempi, n^c è 2, 3 o 4.

[0094] La descrizione fornisce anche composti di formula (21-1):



(21-I),

15 o suoi sali o isomeri, in cui

R_{1d} e R_{2d} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-5} e alchenile C_2 ;

n^d è selezionato tra 1, 2, 3, 4 e 5;

k è selezionato tra 0, 1, 2 e 3;

20 R_{3d} e R_{4d} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-20} e alchenile C_{2-20} .

$-R^{d''}M^dR^{d'}$, $-R^{d*}Y^dR^{d''}$, $-Y^dR^{d''}$, e $-R^{d*}OR^{d''}$;

ogni M^d è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^{d'})-$, $-N(R^{d'})C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR^{d'})O-$, e $-S(O)_2-$, o è assente;

5 ogni R^d è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} e H; ogni Y^d è indipendentemente un carbociclo C_{3-6} ;

ciascun R^{d*} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} e alchenile C_{1-12} ;

10 ciascun $R^{d'}$ è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} e H; e

ciascun $R^{d''}$ è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{3-12} e alchenile C_{3-12} ,

in cui R_{3d} e R_{4d} sono legati o i) allo stesso atomo di carbonio o ii) atomi di carbonio adiacenti.

15 [0095] In alcuni esempi, R_{3d} e R_{4d} sono legati allo stesso atomo di carbonio. Ad esempio, R_{3d} e R_{4d} possono essere legati a un atomo di carbonio adiacente a C^* . In determinati esempi, R_{3d} e R_{4d} non sono legati a un atomo di carbonio adiacente a C^* .

[0096] In altri esempi, R_{3d} e R_{4d} sono legati ad atomi di carbonio adiacenti. In determinati esempi, uno o entrambi R_{3d} e R_{4d} sono legati ad atomi di carbonio adiacenti a C^* .

[0097] In alcuni esempi, k è 0. In altri esempi, k è 1, 2 o 3.

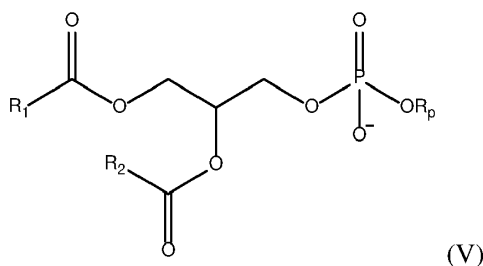
20 [0098] In alcuni esempi, M^d è assente. In altri esempi, M^d è selezionato dal gruppo costituito da $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^{d'})-$, $-N(R^{d'})C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR^{d'})O-$, e $-S(O)_2-$. In tali esempi specifici, M^d è $-C(O)O-$.

[0099] In alcuni esempi, n^d è 1, 2 o 3.

25 [0100] In alcuni esempi, R_{1d} e/o R_{2d} sono selezionati da alchile C_{1-5} . In determinati esempi, R_{1d} e/o R_{2d} sono alchile C_1 .

[0101] In alcuni esempi, R_{3d} e/o R_{4d} sono selezionati da alchenile C₂₋₂₀. In determinati esempi, R_{3d} e/o R_{4d} sono gruppi alchenile comprendenti 17, 18 o 19 atomi di carbonio. Ad esempio, R_{3d} e/o R_{4d} possono essere gruppi alchenile C₁₈ (ad esempio linoleile).

[0102] In un ulteriore aspetto, l'invenzione fornisce una composizione di nanoparticelle che include un componente lipidico comprendente un composto secondo una delle formule (I) o (Ib) come descritto sopra. Sono anche descritte composizioni di nanoparticelle che includono un componente lipidico comprendente un composto secondo una delle formule (Ia1)-(Ia6), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-II) e (20-1). In alcune forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di nanoparticelle include un fosfolipide. In alcune forme di realizzazione, un fosfolipide di una composizione di nanoparticelle include una porzione fosfolipidica e una o più porzioni di acidi grassi, una o più delle quali possono essere insature. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle può includere un lipide secondo la formula (V)



in cui R_p rappresenta una porzione fosfolipidica e R₁ e R₂ rappresentano frazioni di acidi grassi insaturi che possono essere uguali o differenti.

[0103] Una frazione fosfolipidica può essere selezionata dal gruppo non limitativo costituito da fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerolo, fosfatidilserina, acido fosfatidico, 2-lisofosfatidilcolina e una sfingomielinina. Una frazione di acido grasso può essere selezionata dal gruppo non limitativo costituito da acido laurico, acido miristico, acido miristoleico, acido palmitico, acido palmitoleico, acido stearico, acido oleico, acido linoleico, acido alfa-linolenico,

acido erucico, acido arachidico, acido arachidonico, acido fitanico, acido eicosapentaenoico, acido beenico, acido docosapentaenoico e acido docosaesaenoico. Ad esempio, in determinate forme di realizzazione, un fosfolipide è selezionato dal gruppo costituito da 1,2-dilinoileoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil -sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2- diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-O-ottadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18: 0 Dietere PC), 1-oleoil-2-colesterilhemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemsPC), 1-esadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Liso PC), 1,2-dilinoilenoil-sn-glicero -3-fosfocolina, 1,2-diarachidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosaesaossil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16.0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoilenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1, 2-dilinoilenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diarachidonoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosaesaenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicero -3-fosfo-rac- (1-glicerolo) sale sodico (DOPG) e sfingomielina. In determinate forme di realizzazione, il fosfolipide è DOPE. In altre forme di realizzazione, il fosfolipide è DSPC. Sono contemplate anche specie non naturali incluse le specie naturali con modifiche e sostituzioni inclusi ramificazione, ossidazione, ciclizzazione e alchini.

20 **[0104]** In alcune forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di nanoparticelle include un lipide strutturale. In determinate forme di realizzazione, un lipide strutturale viene selezionato dal gruppo costituito da colesterolo, fecosterolo, sitosterolo, ergosterolo, campesterolo, stigmasterolo, brassicasterolo, tomatidina, acido ursolico e alfa-tocoferolo. In determinate forme di realizzazione, il lipide strutturale è colesterolo.

25 **[0105]** In alcune forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di

nanoparticelle include un lipide PEG. In determinate forme di realizzazione, il lipide PEG è selezionato dal gruppo costituito da una fosfatidiletanolamina modificata con PEG, un acido fosfatidico modificato con PEG, una ceramide modificata con PEG, una dialchilamina modificata con PEG, un diacilglicerolo modificato con PEG e una modificata con PEG dialchilglicerolo.

[0106] In alcune forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle include un componente lipidico che comprende un composto secondo una delle formule (I) o (Ib), un fosfolipide (che può essere o meno insaturo), un lipide PEG e un lipide strutturale. Viene anche descritta la composizione di nanoparticelle che include un componente lipidico comprendente un composto secondo le formule (Ia1)-(Ia6), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), un fosfolipide (che può essere o meno insaturo), un lipide PEG e un lipide strutturale. In determinate forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di nanoparticelle include da circa il 30% in moli a circa il 60% in moli di composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-II), (20-1) e (21-1), da circa lo 0% in moli a circa il 30% in moli di fosfolipidi, da circa il 18,5% in moli a circa 48,5% in moli di lipidi strutturali e da circa lo 0% in moli a circa il 10% in moli di lipidi PEG. In alcune forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di nanoparticelle include da circa il 30% in moli a circa il 45% in moli di composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-II), (20-1) e (21-1), da circa il 5% in moli a circa il 25% in moli di fosfolipidi, da circa il 30% in moli a circa il 40% in moli di lipidi strutturali e da circa lo 0% in moli a circa il 10% in moli di lipidi PEG. In alcune forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di nanoparticelle include da circa il 35% in moli a circa il 55% in moli di composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I), da circa il 5% molare a circa il 25% in moli di fosfolipidi, da circa il 30% in moli a circa il 40% in moli di lipidi strutturali e da circa

lo 0% in moli a circa il 10% in moli di lipidi PEG. In determinate forme di realizzazione, il componente lipidico include circa il 50% in moli di detto composto, circa il 10% in moli di fosfolipide, circa il 38,5% in moli di lipidi strutturali e circa l'1,5% in moli di lipide PEG. In altre forme di realizzazione, il componente lipidico include circa il 40% in moli di detto
5 composto, circa il 20% in moli di fosfolipide, circa il 38,5% in moli di lipidi strutturali e circa l'1,5% in moli di lipide PEG. In alcune di queste forme di realizzazione, il fosfolipide è DOPE, mentre in altre forme di realizzazione il fosfolipide è DSPC. In determinate forme di realizzazione, il lipide strutturale è colesterolo. In determinate forme di realizzazione, il lipide PEG è PEG-DMG. In nessuno dei precedenti, il contenuto totale della componente lipidica non
10 può superare il 100%.

[0107] In alcune forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle include più di un fosfolipide, lipide PEG, lipide strutturale o altro lipide. In determinate forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle include inoltre un lipide cationico e/o ionizzabile come un amminolipide. In determinate forme di realizzazione, un lipide cationico e/o ionizzabile è
15 selezionato dal gruppo costituito da 3-(didodecilammino)-N1,N1,4-tridodecil-1-piperazinetanammina (KL10), N1-[2-(didodecilammino)etil]-N1,N4,N4-tridodecil-1,4-piperazindietanammina (KL22), 14,25-ditridecil-15,18,21,24-tetraaza-ottatriacontano (KL25), 1,2-dilinoleilossi-N,N-dimetilamminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilamminometil-[1,3]-diossolano (DLin-K-DMA), eptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-
20 (dimetilammino) butanoato (DLin-MC3-DMA o MC3), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilamminoetil)-[1,3]-diossolano (DLin-KC2-DMA), 1,2-dioleilossi-N,N-dimetilamminopropano (DODMA), 2-({8-[(3 β)-colest-5-en-3-ilossi]ottil}ossi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-ottadeca-9, 12-dien-1-ilossi]propan-1-ammina (ottil-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3 β)-colest-5-en-3-ilossi]ottil}ossi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-ottadeca-9,12-die n-1-ilossi]propan-1-ammina (Ottill-CLinDMA (2R)),
25 (2S)-2-({8-[(3 β)-colest-5-en-3-ilossi]ottil}ossi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-ottadeca-9,1 2-die n-

1-ilossi]propan-1-ammina (Ottil-CLinDMA (2S)), (12Z, 15Z)-N,N-dimetil-2-nonilenicosa-12,15-dien-1-ammina e N,N-dimetil-1-{{(1S,2R)-2-ottilciclopropil}eptadecan-8-ammina.

[0108] In alcune forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle include un agente terapeutico e/o profilattico. In determinate forme di realizzazione, l'agente terapeutico e/o
5 profilattico può essere selezionato dal gruppo costituito da una proteina, un farmaco a piccola molecola, un agente citotossico, uno ione radioattivo, un agente chemioterapico, un vaccino, un composto che provoca una risposta immunitaria, e/o un acido nucleico (come un acido desossiribonucleico o un acido ribonucleico). In determinate forme di realizzazione, l'agente terapeutico e/o profilattico è un acido ribonucleico (RNA). Un RNA può essere selezionato dal
10 gruppo costituito da un RNA interferente breve (small interfering RNA, siRNA), un RNA interferente asimmetrico (asymmetrical interfering RNA, aiRNA), un microRNA (miRNA), un RNA substrato di Dicer (dsRNA), un RNA a forcina breve (small hairpin RNA, shRNA), un RNA messaggero (mRNA) e loro miscele. In determinate forme di realizzazione, l'agente terapeutico e/o profilattico è un RNA messaggero (mRNA). Un RNA di una composizione di
15 nanoparticelle può essere presente in natura o in natura e può includere uno o più di una stem-loop, un nucleoside che termina la catena, una sequenza di poliA, un segnale di poliadenilazione e/o una struttura a 5' di cap.

[0109] In alcune forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle include più di un agente terapeutico e/o profilattico, come uno o più RNA. Gli agenti terapeutici e/o profilattici
20 possono essere dello stesso tipo o di tipi diversi (ad esempio, due mRNA, due siRNA, un mRNA e un siRNA, un mRNA e un farmaco a piccole molecole, ecc.).

[0110] In alcune forme di realizzazione, l'efficienza di incapsulamento di un agente terapeutico e/o profilattico di una composizione di nanoparticelle è almeno del 50%. In determinate forme di realizzazione, l'efficienza di incapsulamento è almeno dell'80%. In determinate forme di
25 realizzazione, l'efficienza di incapsulamento è maggiore del 90%.

[0111] In alcune forme di realizzazione, il rapporto peso/peso del componente lipidico rispetto a un agente terapeutico e/o profilattico nella composizione di nanoparticelle è compreso tra circa 10:1 e circa 60:1. In alcune forme di realizzazione, il rapporto peso/peso è di circa 20:1.

[0112] In alcune forme di realizzazione, il rapporto N:P della composizione di nanoparticelle va da circa 2:1 a circa 30:1. In determinate forme di realizzazione, il rapporto N:P va da circa 2:1 a circa 8:1. In determinate forme di realizzazione, il rapporto N:P va da circa 5:1 a circa 8:1. Ad esempio, il rapporto N:P può essere circa 5,0:1, circa 5,5:1, circa 5,67:1, circa 6,0:1, circa 6,5:1 o circa 7,0:1. In alcune forme di realizzazione, la dimensione media di una composizione di nanoparticelle varia da circa 40 nm a circa 150 nm. In determinate forme di realizzazione, la dimensione media va da circa 70 nm a circa 100 nm. In una forma di realizzazione, la dimensione media può essere compresa tra circa 80 e circa 100 nm. In determinate forme di realizzazione, la dimensione media può essere di circa 80 nm. In altre forme di realizzazione, la dimensione media può essere di circa 100 nm.

[0113] L'indice di polidispersione della composizione di nanoparticelle è compreso tra circa 0 e circa 0,25 in alcune forme di realizzazione. In determinate forme di realizzazione, l'indice di polidispersione è compreso tra circa 0,10 e circa 0,20.

[0114] In alcune forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle ha un potenziale zeta da circa -10 mV a circa +20 mV.

[0115] In alcune forme di realizzazione, al contatto con il composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa) e (IV) (ad esempio, uno qualsiasi dei Composti 1-109) o una sua composizione di nanoparticelle con una cellula di mammifero, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è indipendente da LDLR. In alcune forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è LDLR-dipendente. In alcune forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è indipendente da apoE. In alcune forme di

realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è apoE-dipendente. In alcune forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è indipendente dall'interazione LDLR-apoE. In alcune forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è dipendente dall'interazione LDLR-apoE.

[0116] In alcune forme di realizzazione, al contatto con il composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa) e (IV) (ad esempio, uno qualsiasi dei Composti 1-109) o la sua composizione nanoparticellare con una cellula di mammifero per produrre un polipeptide, la produzione del polipeptide è maggiore negli epatociti di mammifero rispetto alle cellule di un tessuto diverso (ad esempio, milza o rene).

[0117] In alcune forme di realizzazione, al contatto con il composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa) e (IV) (ad esempio, uno qualsiasi dei Composti 1-109) o la sua composizione nanoparticellare con una cellula di mammifero per produrre un polipeptide, la produzione del polipeptide avviene sostanzialmente negli epatociti di mammifero (ad esempio, poca o nessuna produzione del polipeptide in altre cellule, ad es. cellule della milza o cellule renali).

[0118] In alcune forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle include uno o più altri componenti inclusi, ma non limitati a, uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, piccole molecole idrofobe, agenti terapeutici e/o profilattici, carboidrati, polimeri, molecole che migliorano la permeabilità, tamponi e agenti di alterazione della superficie.

[0119] In ancora un altro aspetto, la descrizione presenta una composizione farmaceutica che comprende una composizione di nanoparticelle secondo gli aspetti precedenti e un veicolo farmaceuticamente accettabile. Ad esempio, la composizione farmaceutica viene refrigerata o congelata per la conservazione e/o la spedizione (ad esempio, essendo conservata a una temperatura di 4 °C o inferiore, come una temperatura compresa tra circa -150 °C e circa 0 °C o

tra circa -80 °C e circa -20 °C (ad esempio circa -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C). Ad esempio, la composizione farmaceutica è una soluzione refrigerata per la conservazione e/o la spedizione, ad esempio, a circa -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C o -80 °C.

5 **[0120]** Viene anche descritto, ma non fa parte dell'invenzione, un metodo per somministrare un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio un mRNA) a una cellula (ad esempio una cellula di mammifero). Questo metodo include la fase di somministrazione a un soggetto (ad es., un mammifero, come un essere umano) una composizione di nanoparticelle comprendente (i) un componente lipidico comprendente un fosfolipide (come un lipide polinsaturo), un lipide PEG,
10 un lipide strutturale, e un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1) e (ii) un agente terapeutico e/o profilattico, in cui la somministrazione comporta il contatto della cellula con la composizione di nanoparticelle, per cui il e/o l'agente profilattico viene somministrato alla cellula.

[0121] Viene anche descritto un metodo per produrre un polipeptide di interesse in una cellula
15 (ad esempio, una cellula di mammifero). Il metodo include la fase di mettere a contatto la cellula con una composizione di nanoparticelle che include (i) un componente lipidico che include un fosfolipide (come un lipide polinsaturo), un lipide PEG, un lipide strutturale e un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I) e (ii) un mRNA che codifica il polipeptide di interesse, per cui
20 l'mRNA è in grado di essere tradotto nella cellula per produrre il polipeptide.

[0122] In ancora un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione di nanoparticelle dell'invenzione da utilizzare in un metodo per trattare una malattia o un disturbo in un mammifero (ad esempio un essere umano) che ne ha bisogno. Il metodo include la fase di somministrazione al mammifero di una quantità terapeuticamente efficace della composizione
25 di nanoparticelle, ad esempio una composizione di nanoparticelle comprendente (i) un

componente lipidico comprendente un fosfolipide (come un lipide polinsaturo), un lipide PEG, un lipide strutturale e un composto secondo una delle formule (I) o (Ib), e (ii) un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, un mRNA). Sono anche descritti esempi di tale metodo in cui il composto è secondo una delle formule (Ia1)-(Ia6), (II), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1). In alcune forme di realizzazione, la malattia o il disturbo è caratterizzato da attività proteica o polipeptidica disfunzionale o aberrante. Ad esempio, la malattia o il disturbo è selezionato dal gruppo costituito da malattie rare, malattie infettive, cancro e malattie proliferative, malattie genetiche (ad esempio, fibrosi cistica), malattie autoimmuni, diabete, malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari e renovascolari e malattie metaboliche.

[0123] Viene anche descritto un metodo per somministrare (ad esempio, somministrare in modo specifico) un agente terapeutico e/o profilattico a un organo di mammifero (ad esempio, un fegato, una milza, un polmone o un femore). Questo metodo include la fase di somministrazione a un soggetto (ad esempio, un mammifero) di una composizione di nanoparticelle che include (i) un componente lipidico che include un fosfolipide, un lipide PEG, un lipide strutturale e un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I) e (ii) un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, un mRNA), in cui la somministrazione comporta il contatto della cellula con la composizione di nanoparticelle, per cui l'agente terapeutico e/o profilattico è consegnato all'organo come il fegato.

[0124] Viene anche descritto un metodo per la somministrazione potenziata di un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio un mRNA) a un tessuto bersaglio (ad esempio un fegato, una milza, un polmone o un femore). Questo metodo include la somministrazione a un soggetto (ad esempio un mammifero) di una composizione di nanoparticelle, la composizione includendo (i) un componente lipidico comprendente un composto secondo una delle formule

(I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), un fosfolipide, un lipide strutturale e un lipide PEG; e (ii) un agente terapeutico e/o profilattico, la somministrazione includendo il contatto del tessuto bersaglio con la composizione di nanoparticelle, per cui l'agente terapeutico e/o profilattico viene rilasciato al tessuto bersaglio. Il
5 rilascio può essere migliorato rispetto a una composizione di riferimento che comprende un lipide di riferimento invece di un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I).

[0125] Viene anche descritto, ma non fa parte dell'invenzione, un metodo per ridurre l'immunogenicità comprendente l'introduzione della composizione di nanoparticelle della
10 descrizione nelle cellule, in cui la composizione di nanoparticelle riduce l'induzione della risposta immunitaria cellulare delle cellule alla composizione di nanoparticelle, poiché rispetto all'induzione della risposta immunitaria cellulare nelle cellule indotta da una composizione di riferimento che comprende un lipide di riferimento anziché un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I). Ad
15 esempio, la risposta immunitaria cellulare è una risposta immunitaria innata, una risposta immunitaria adattativa o entrambe.

[0126] In determinate forme di realizzazione degli aspetti di cui sopra, una cellula messa a contatto in un metodo è in un mammifero.

[0127] In uno qualsiasi degli aspetti precedenti, un mammifero può essere, ad esempio, un
20 roditore, un primate non umano o un essere umano. In determinate forme di realizzazione, il mammifero è un essere umano. In determinate forme di realizzazione, il mammifero è carente di LDLR, o carente di apoE, o entrambi. In determinate forme di realizzazione, il mammifero non è carente di LDLR. In determinate forme di realizzazione, il mammifero non è carente di apoE. In determinate forme di realizzazione, il mammifero non è né carente di LDLR né carente di
25 apoE. In determinate forme di realizzazione, il mammifero ha un'interazione LDLR-apoE

anormale. In determinate forme di realizzazione, il mammifero ha una normale interazione LDLR-apoE.

[0128] In uno qualsiasi degli aspetti precedenti, un agente terapeutico e/o profilattico può essere un mRNA.

5 [0129] In alcune forme di realizzazione dei metodi di cui sopra, l'agente terapeutico e/o profilattico può essere somministrato in modo specifico a un tessuto bersaglio di interesse (ad esempio, un fegato, una milza, un polmone o un femore di mammifero).

[0130] In alcune forme di realizzazione dei metodi di cui sopra, un polipeptide di interesse può essere prodotto in modo specifico in una cellula bersaglio o in un tessuto di interesse (ad
10 esempio, un epatocita, un fegato, una milza, un polmone o un femore di mammifero), ad esempio, la produzione di il polipeptide è sostanzialmente più alto nella cellula o nel tessuto bersaglio rispetto a una cellula/tessuto non bersaglio.

[0131] In alcune forme di realizzazione, la composizione di nanoparticelle viene somministrata per via endovenosa, intramuscolare, intradermica, sottocutanea, intra-arteriosa, intra-tumorale o
15 per inalazione. Una dose da circa 0,001 mg/kg a circa 10 mg/kg di agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, mRNA) viene somministrata a un mammifero in alcune forme di realizzazione.

[0132] In uno qualsiasi degli aspetti precedenti, in alcune forme di realizzazione, la somministrazione (ad esempio, l'efficienza di somministrazione) dell'agente terapeutico e/o
20 profilattico alla cellula di mammifero è indipendente da LDLR. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'agente terapeutico e/o profilattico alla cellula di mammifero è LDLR-dipendente. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'agente terapeutico e/o profilattico alla cellula di mammifero è apoE-indipendente. In alcune
25 forme di realizzazione, la somministrazione dell'agente terapeutico e/o profilattico alla cellula di mammifero è apoE-dipendente. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione

dell'agente terapeutico e/o profilattico alla cellula di mammifero è indipendente dall'interazione LDLR-apoE. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'agente terapeutico e/o profilattico alla cellula di mammifero è dipendente dall'interazione LDLR-apoE.

[0133] In uno qualsiasi degli aspetti precedenti, in alcune forme di realizzazione, la produzione
5 (ad esempio, la resa) del polipeptide di interesse nella cellula di mammifero è LDLR-
indipendente. In alcune forme di realizzazione, la produzione del polipeptide di interesse nella
cellula di mammifero è LDLR-dipendente. In alcune forme di realizzazione, la produzione del
polipeptide di interesse nella cellula di mammifero è apoE-indipendente. In alcune forme di
realizzazione, la produzione del polipeptide di interesse nella cellula di mammifero è apoE-
10 dipendente. In alcune forme di realizzazione, la produzione del polipeptide di interesse nella
cellula di mammifero è indipendente dall'interazione LDLR-apoE. In alcune forme di
realizzazione, la produzione del polipeptide di interesse nella cellula di mammifero è dipendente
dall'interazione LDLR-apoE.

[0134] Negli aspetti precedenti, una o più composizioni di nanoparticelle, ciascuna
15 comprendente uno o più agenti terapeutici e/o profilattici, possono essere utilizzate in
combinazione. In alcune forme di realizzazione, una o più composizioni di nanoparticelle,
ciascuna delle quali include uno o più agenti terapeutici e/o profilattici, possono essere messe a
contatto contemporaneamente con una cellula o rilasciate in una cellula o in un organo di
mammifero. In altre forme di realizzazione, l'una o più composizioni di nanoparticelle vengono
20 messe a contatto con una cellula o rilasciate in una cellula o in un organo di mammifero in
momenti diversi.

[0135] Negli aspetti precedenti, uno o più agenti o composti terapeutici e/o profilattici
aggiuntivi possono essere utilizzati in combinazione con una composizione di nanoparticelle
che include un agente terapeutico e/o profilattico. In alcune forme di realizzazione, un agente o
25 un composto terapeutico e/o profilattico aggiuntivo può essere somministrato

contemporaneamente o quasi contemporaneamente a una composizione di nanoparticelle (ad esempio, entro un'ora). In altre forme di realizzazione, un agente o un composto terapeutico e/o profilattico aggiuntivo può essere somministrato prima o dopo (ad esempio, una o più ore prima o dopo) una composizione di nanoparticelle come terapia di pretrattamento o post-trattamento.

- 5 In alcune forme di realizzazione, un agente o un composto terapeutico e/o profilattico aggiuntivo viene selezionato dal gruppo costituito da un composto antinfiammatorio, uno steroide (ad esempio un corticosteroide), una statina, un estradiolo, un inibitore del BTK, un agonista S1P1, un modulatore del recettore dei glucocorticoidi (GRM) o un antistaminico. In determinate forme di realizzazione, un agente o un composto terapeutico e/o profilattico
- 10 aggiuntivo viene selezionato dal gruppo costituito da desametasone, metotrexato, paracetamolo, un bloccante del recettore H1 o un bloccante del recettore H2.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

- [0136] L'esperto della tecnica comprenderà che i disegni sono principalmente a scopo illustrativo e non intendono limitare l'ambito dell'argomento invenzione oggetto descritto nel
- 15 presente contesto. I disegni non sono necessariamente in scala; in alcuni casi, vari aspetti dell'argomento oggetto dell'invenzione descritto nel presente contesto possono essere mostrati ingigantiti o ingranditi nei disegni per facilitare la comprensione di caratteristiche differenti. Nei disegni, caratteri di riferimento simili si riferiscono generalmente a caratteristiche simili (ad es. elementi funzionalmente simili e/o strutturalmente simili).

- 20 [0137] Le precedenti e ulteriori caratteristiche risulteranno più chiaramente comprese dalla seguente descrizione dettagliata quando considerata congiuntamente ai disegni allegati.

La Figura 1 è una coppia di grafici che confrontano i livelli di espressione della luciferasi nei topi (corpo intero) dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle contenenti composti della descrizione nel tempo.

- 25 La Figura 2 è un grafico che riassume i livelli di espressione della luciferasi a 3 ore dopo la

somministrazione di composizioni di nanoparticelle contenenti composti della descrizione. I valori del flusso luminoso totale sono stati acquisiti tramite imaging luminescente del corpo (BLI) 3 ore dopo la somministrazione. In questa Figura, i numeri 1-12 si riferiscono alle composizioni contenenti rispettivamente i Composti 42-52 e MC3.

5 La Figura 3 è un grafico che riassume i livelli di espressione della luciferasi a 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle contenenti composti della descrizione. I valori del flusso luminoso totale sono stati acquisiti tramite BLI 6 ore dopo la somministrazione. In questa Figura, i numeri 1-12 si riferiscono alle composizioni contenenti rispettivamente i Composti 42-52 e MC3.

10 La Figura 4 è un grafico che riassume i livelli di espressione della luciferasi 24 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle contenenti composti della descrizione. I valori del flusso luminoso totale sono stati acquisiti tramite BLI 24 ore dopo la somministrazione. In questa Figura, i numeri 1-12 si riferiscono alle composizioni contenenti rispettivamente i Composti 42-52 e MC3.

15 La Figura 5 è un grafico che riassume i livelli di espressione della luciferasi nel fegato di topo 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle inclusi i composti della descrizione. In questa Figura, i numeri 1-12 si riferiscono alle composizioni contenenti rispettivamente i Composti 42-52 e MC3.

La Figura 6 è un grafico che riassume i livelli di espressione della luciferasi nei polmoni di topo
20 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle inclusi i composti della descrizione. In questa Figura, i numeri 1-12 si riferiscono alle composizioni contenenti rispettivamente i Composti 42-52 e MC3.

La Figura 7 è un grafico che riassume i livelli di espressione della luciferasi nella milza di topo
25 descrizione. In questa Figura, i numeri 1-12 si riferiscono alle composizioni contenenti

rispettivamente i Composti 42-52 e MC3.

La Figura 8 è una coppia di grafici che illustrano i livelli di espressione di hEPO nei ratti dosati con i composti della descrizione rispetto a KL22, mostrando che KL22 e i suoi derivati della lunghezza della catena (che in precedenza mostravano una migliore espressione proteica nei topi), non esprimono hEPO nei ratti. Come controllo viene utilizzata la PBS (soluzione salina tamponata con fosfato). Il grafico A confronta la concentrazione di hEPO dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle contenenti Composto 23, Composto 11, KL22 e MC3 a 2 mpk, somministrazione e.v. Il composto 11 LNP ha mostrato un'espressione di hEPO paragonabile a MC3 e una migliore tollerabilità rispetto a KL22. Il grafico B illustra i risultati di uno studio dose-risposta utilizzando il Composto 20, KL22 e MC3 alla dose di 0,2, 0,5 e 1 mpk. KL22 e Composto 23 si sono dimostrati tossici alla dose di 2 mg/kg. Nel grafico A i numeri 1-5 si riferiscono a composizioni contenenti: 1: Composto 23, 2: Composto 11, 3: KL22; 4: MC3; 5: PBS. Nel grafico B i numeri 1-9 si riferiscono a composizioni contenenti: 1: Composto 20, 0,2 mpk; 2: Composto 20, 0,5 mpk; 3: Composto 20, 1 mpk; 4: KL22, 0,2 mpk; 5: KL22, 0,5 mpk; 6: KL22, 1 mpk; 7: MC3, 0,2 mpk; 8: MC3, 0,5 mpk; 9: MC3, 1 mpk; 10: PBS.

La Figura 9 è una coppia di grafici che illustrano le prestazioni del Composto 11 come lipide indipendente da LDLr. Il grafico A è un grafico a barre che mostra l'espressione della luciferasi indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle tra cui il Composto 11 a dosaggi di 0,05 mpk, 0,25 mpk e 0,5 mpk a LDLR -/- topi knockout e di tipo selvatico. Il grafico B mostra i livelli di LDL-c nei topi knockout per LDLR dopo la somministrazione di un mRNA di controllo, ovvero il fattore IX non traduce ("NT-FIX") e varie composizioni comprendenti mRNA che codificano il recettore LDL nei topi, con KL22 a 0,5 mpk, o con il composto 11 a 0,5 e 1 mpk. È stato riscontrato che i livelli di LDL-c nei topi diminuiscono con la composizione di nanoparticelle contenente il Composto 11.

La Figura 10 è un grafico che mostra i livelli di hEPO in primati non umani fino a -50 ore dopo la somministrazione di una composizione di nanoparticelle contenente il Composto 4, rispetto a una composizione contenente MC3. Il Composto 4 LNP ha dimostrato un'espressione 3 volte di hEPO rispetto a MC3, stabilendo il Composto 4 come un lipide indipendente da LDLr che si traduce in specie superiori.

La Figura 11 è una coppia di immagini che confronta i risultati di un'immunoistochimica del fegato di topo (IHC) utilizzando mRNA che esprime la proteina fluorescente verde (GFP) dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle contenenti il Composto 4 e MC3. Il grafico A mostra le cellule epatiche di topo CD-1 dopo la somministrazione di mRNA di GFP in un LNP MC3, 6 ore dopo la somministrazione endovenosa a una dose di 0,5 mpk. L'espressione della proteina mRNA di GFP dalla composizione di MC3 LNP è stata osservata sia negli epatociti che nelle cellule di Kupffer. Il grafico B mostra le cellule epatiche di topo knockout LDLR dopo la somministrazione di mRNA di GFP in un composto 4 LNP, 8 ore dopo la somministrazione endovenosa a una dose di 0,5 mpk. In contrasto con MC3, l'LNP contenente il composto 4 sembra mostrare una minore espressione proteica nelle cellule di Kupffer.

La Figura 12 è una serie di grafici che illustrano i livelli di espressione di hEPO nei topi CD-1 dosati con i composti della divulgazione, rispetto a MC3. PBS è usato come controllo. Il grafico A mostra la concentrazione di hEPO 3 h dopo la somministrazione delle composizioni di nanoparticelle. Il grafico B mostra la concentrazione di hEPO 6 h dopo la somministrazione delle composizioni di nanoparticelle. Il grafico C mostra la concentrazione di hEPO 24 ore dopo la somministrazione delle composizioni di nanoparticelle. Nei grafici A-C i numeri 1-14 si riferiscono a composizioni contenenti: 1: Composto 73;2: Composto 80;3: Composto 70;4: Composto 81;5: Composto 69;6: Composto 82;7: Composto 83;8: Composto 62;9: Composto 84;10: Composto 85;11: Composto 86;12: Composto 87;13: MC3; 14: PBS.

La Figura 13 è un grafico che mostra i livelli di hEPO (pg/mL) nei topi CD-1 fino a -25 ore

dopo la somministrazione di una composizione di nanoparticelle contenente i composti della descrizione, rispetto a una composizione contenente MC3. I numeri 1-13 si riferiscono a composizioni contenenti quanto segue: 1: Composto 73,2: Composto 80,3: Composto 70;4: Composto 81;5: Composto 69;6: Composto 82;7: Composto 83;8: Composto 62;9: Composto
5 84;10: Composto 85;11: Composto 86;12: Composto 87;13: MC3.

La Figura 14 è una coppia di grafici che mostrano le percentuali di cellule B attivate nella milza di topi CD-1 dosati con i composti della divulgazione, rispetto a MC3, e confrontate con topi che non hanno ricevuto alcun trattamento (soggetto del test naive). PBS è usato come controllo. Il grafico A mostra la percentuale di cellule CD19+. Il grafico B mostra la percentuale di cellule
10 CD19+ CD69+ CD86+. I numeri 1-13 si riferiscono a composizioni contenenti quanto segue: 1: Composto 73,2: Composto 80,3: Composto 70;4: Composto 81;5: Composto 69;6: Composto 82;7: Composto 83;8: Composto 62;9: Composto 84;10: Composto 85;11: Composto 86;12: Composto 87;13: MC3; 14: PBS; 15: trattamento soggetto naive.

La Figura 15 è un grafico che riassume i livelli di espressione della luciferasi a 6 ore dopo la
15 somministrazione di composizioni di nanoparticelle contenenti composti della descrizione a topi CD-1 a una dose di 0,5 mpk. I valori del flusso luminoso totale sono stati acquisiti tramite imaging luminescente del corpo (BLI) 6 ore dopo la somministrazione. In questa Figura, i numeri 1-7 e 10 si riferiscono alle composizioni contenenti rispettivamente i Composti 4-10 e MC3.

20 La Figura 16 è un grafico che mostra i livelli di GFP nei fegati di topi knockout per LDLR da 30 minuti a 24 ore dopo la somministrazione endovenosa di un RNA eGFP in una composizione lipidica contenente il Composto 4. I livelli di GFP nel fegato sono stati determinati tramite IHC. I marcatori quadrati rappresentano il numero di cellule GFP positive dopo la somministrazione di una dose di 0,1 mpk della composizione. I marcatori circolari rappresentano il numero di
25 cellule GFP positive dopo la somministrazione di una dose di 0,5 mpk della composizione.

La Figura 17 è una coppia di grafici che mostrano la dipendenza da ApoE dell'espressione della luciferasi ("Luc") dopo la somministrazione di una composizione contenente l'mRNA di Luc e il Composto 4 a topi a una dose di 0,5 mpk. L'espressione dopo la somministrazione di una composizione contenente Luc mRNA e MC3 viene presentata per il confronto. Il grafico A

5 mostra il flusso totale nel fegato 6 ore dopo la somministrazione. La variazione di % nell'espressione di Luc nei fegati di ApoE knockout rispetto ai topi di tipo selvatico [vale a dire, (espressione media WT-espressione media KO)/espressione media WT] *100%) è stata del 91,9% per il Composto 4 e del 97,5% per MC3. Il grafico B mostra il flusso totale nella milza 6

10 ore dopo la somministrazione. La variazione di % nell'espressione nella milza dei topi knockout per ApoE rispetto ai topi di tipo selvatico era del 4,34% per il Composto 4 e del 72,2% per MC3. I numeri 1-4 si riferiscono a quanto segue: 1: Composizione contenente il Composto 4, somministrata a topi knockout per ApoE; 2: Composizione contenente il Composto 4, somministrata a topi di tipo selvatico; 3: Composizione contenente MC3, somministrata a topi knockout per ApoE; 4: Composizione contenente MC3, somministrata a topi di tipo selvatico.

15 La Figura 18 è una coppia di grafici che mostrano l'effetto di una composizione contenente il Composto 4 sugli enzimi epatici. La composizione è stata somministrata a ratti a 0,1 mpk e 1 mpk. Gli effetti di MC3 sono mostrati per confronto. PBS è usato come controllo. Il grafico A mostra l'effetto sull'aspartato amminotransferasi (AST). Il grafico B mostra l'effetto sull'alanina amminotransferasi (ALT).

20 La Figura 19 è una serie di grafici che mostrano l'attivazione delle cellule immunitarie da parte di una composizione contenente il Composto 4. Gli effetti di MC3 sono mostrati per confronto. Come controllo viene utilizzata la PBS (soluzione salina tamponata con fosfato). Le composizioni sono state somministrate ai ratti a 0,1 mpk o 1 mpk. Il grafico A mostra l'effetto sull'attivazione dei neutrofili. Il grafico B mostra l'effetto sull'attivazione dei linfociti. Il grafico

25 C mostra l'effetto sull'attivazione dei monociti. I numeri 1-5 nei Grafici AC si riferiscono a

quanto segue: 1: Composto 4, 0,1 mpk; 2: Composto 4; 1 mpk; 3: MC3, 0,1 mpk 4: MC3, 1 mpk; 5: PBS.

La Figura 20 è un grafico che mostra l'espressione della proteina Stefin A Quadruple Mutant-Tracy (SQT) nel fegato di topo determinata tramite FLAG IHC in diversi punti temporali dopo
5 la somministrazione endovenosa di varie composizioni di nanoparticelle comprendenti l'mRNA SQT e i lipidi qui descritti. I numeri 1-11 nella figura si riferiscono a quanto segue: 1: 0 h, PBS; 2: 0 h, Composto 4; 3: 0,5 h, Composto 4; 4: 4 h, Composto 4; 5: 8 h, Composto 4; 6: 24 h, Composto 4; 7: 0 h, MC3; 8: 0,5 h, MC3; 9: 4 h, MC3; 10: 8 h, MC3; 11: 24 h, MC3.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

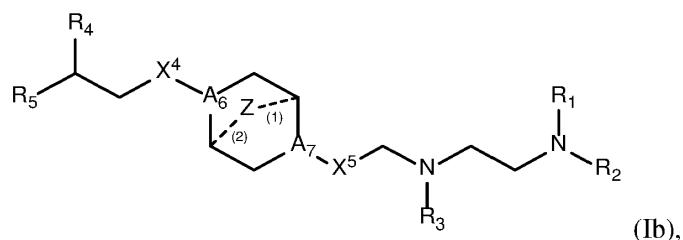
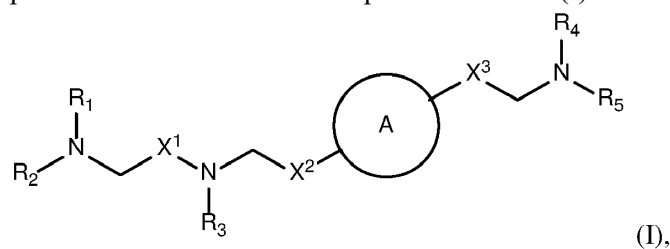
10 **[0138]** La descrizione si riferisce a nuovi lipidi e composizioni di nanoparticelle lipidiche che includono un nuovo lipide. La descrizione fornisce anche metodi per rilasciare un agente terapeutico e/o profilattico in una cellula di mammifero, rilasciare in modo specifico un agente terapeutico e/o profilattico in un organo di mammifero, produrre un polipeptide di interesse in una cellula di mammifero e trattare una malattia o un disturbo in un mammifero ne ha bisogno.
15 Ad esempio, un metodo per produrre un polipeptide di interesse in una cellula prevede la messa a contatto di una composizione di nanoparticelle comprendente un mRNA con una cellula di mammifero, per cui l'mRNA può essere tradotto per produrre il polipeptide di interesse. Un metodo per rilasciare un agente terapeutico e/o profilattico in una cellula o un organo di mammifero può prevedere la somministrazione di una composizione di nanoparticelle che
20 include l'agente terapeutico e/o profilattico a un soggetto, in cui la somministrazione prevede la messa a contatto della cellula o dell'organo con la composizione, per cui l'un agente terapeutico e/o profilattico viene rilasciato nella cellula o nell'organo.

Lipidi

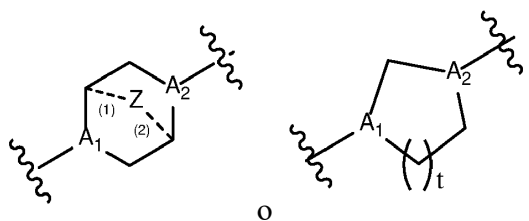
[0139] La presente descrizione fornisce lipidi che includono una parte centrale della piperazina.
25 I lipidi descritti nella presente possono essere vantaggiosamente utilizzati in composizioni di

nanoparticelle lipidiche per il rilascio di agenti terapeutici e/o profilattici in cellule oppure organi di mammiferi. Ad esempio, i lipidi descritti nella presente hanno poca o nessuna immunogenicità. Ad esempio, il composto lipidico di una qualsiasi delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1) hanno un'immunogenicità inferiore rispetto a un lipide di riferimento (ad esempio MC3, KC2 o DLinDMA). Ad esempio, una formulazione comprendente un lipide descritto nella presente e la sostanza terapeutica o profilattica ha un indice terapeutico aumentato rispetto a una formulazione corrispondente che comprende un lipide di riferimento (ad esempio, MC3, KC2 o DLinDMA) e la stessa sostanza terapeutica o profilattica.

10 [0140] I lipidi della presente invenzione sono composti di formula (I) o formula (Ib),



o loro sali o isomeri, in cui l'anello A è



15

t è 1 o 2;

A₁ e A₂ sono selezionati ciascuno indipendentemente tra CH o N;

A₆ e A₇ sono selezionati ciascuno indipendentemente da CH o N, in cui almeno uno tra A₆ e A₇ è N;

Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;

5 R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀, alchenile C₅₋₂₀, -R"MR', -R *YR", -YR", e -R * OR";

ciascun M è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂ -, un gruppo arilico e un gruppo eteroarilico; in cui quando il composto è

10 di formula (Ib), allora M non è -OC(O)O-;

X¹, X² e X³ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da un legame, -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

X⁴ e X⁵ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

ciascun Y è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;

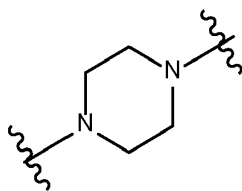
ciascun R* è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C₂₋₁₂;

20 ciascun R indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e carbociclo C₃₋₆;

ciascun R' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂ e H; e

ciascun R'' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋₁₂,

25 in cui quando l'anello A è

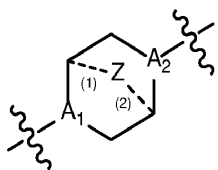


allora

i) almeno uno tra X^1 , X^2 e X^3 non è $-\text{CH}_2-$; e/o

ii) almeno uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è $-\text{R}''\text{MR}'$; o

5 quando il composto è di Formula (I) e l'anello A è



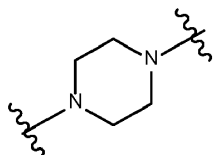
e X^1 , X^2 e X^3 sono ciascuno $-\text{CH}_2$, allora

almeno uno tra A^1 e A^2 è N,

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{6-20} e

10 alchenile C_{6-20} , e

quando l'anello A è



allora

i) R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 sono uguali, in cui R_1 non è alchile C_{12} , alchile C_{18} o alchenile C_{18} ;

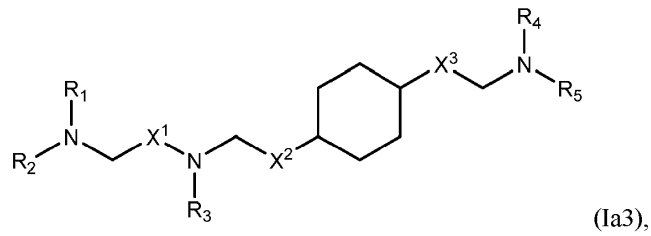
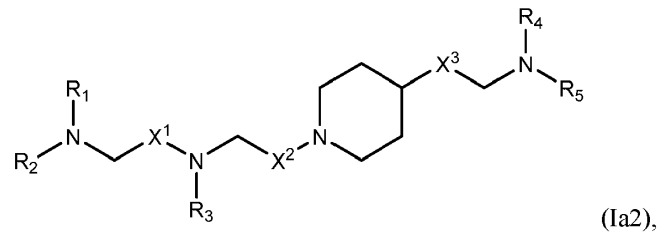
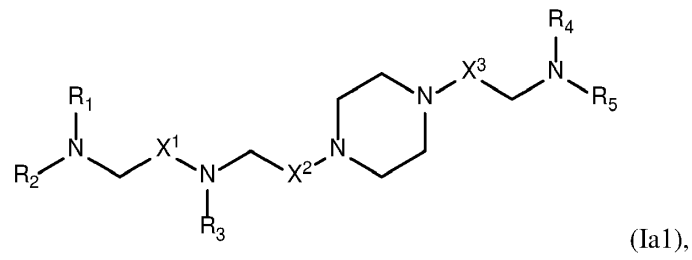
15 ii) solo uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è selezionato da alchenile C_{6-20} ;

iii) almeno uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 ha un numero di atomi di carbonio diverso da almeno un altro di R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 ;

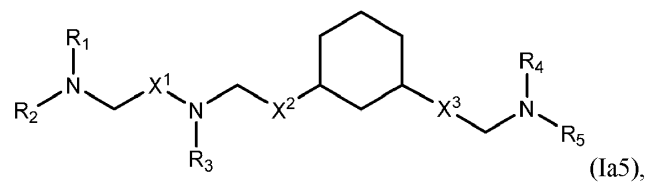
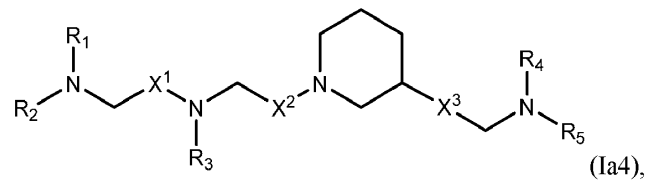
iv) R_1 , R_2 e R_3 sono selezionati da alchenile C_{6-20} , e R_4 e R_5 sono selezionati da alchile C_{6-20} ; o

v) R_1 , R_2 e R_3 sono selezionati da alchile C_{6-20} e R_4 e R_5 sono selezionati da alchenile C_{6-20} .

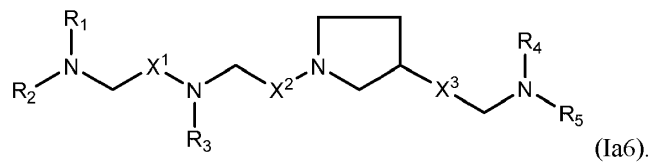
20 **[0141]** In alcune forme di realizzazione, il composto è diR qualsiasi delle formule (Ia1)-(Ia6):



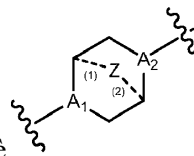
5



10 o

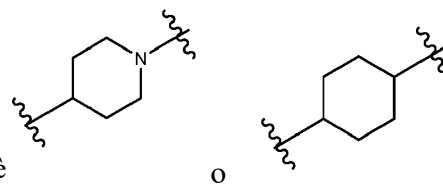


[0142] I composti di Formula (I) o uno qualsiasi di (Ia1)-(Ia6) includono una o più delle seguenti caratteristiche, quando applicabili.

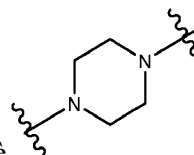


[0143] In alcune forme di realizzazione, l'anello A è

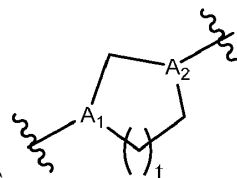
5



[0144] In alcune forme di realizzazione, l'anello A è



[0145] In alcune forme di realizzazione, l'anello A è



10 [0146] In alcune forme di realizzazione, l'anello A è

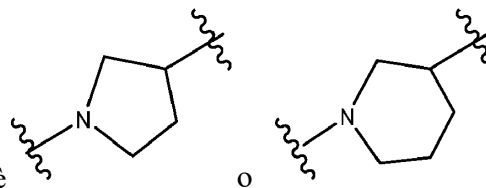
[0147] In alcune forme di realizzazione, l'anello A è



o



15



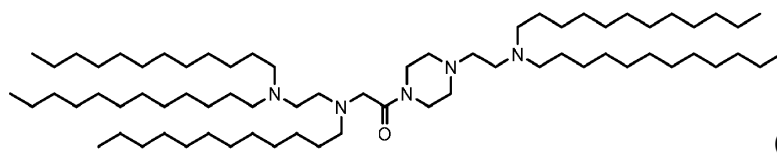
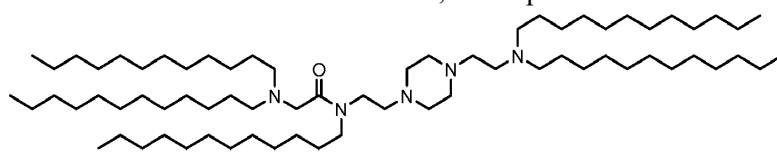
[0148] In alcune forme di realizzazione, l'anello A è in cui l'anello, in cui l'atomo N è collegato con X².

- 5 [0149] In alcune forme di realizzazione, Z è CH₂.
- [0150] In alcune forme di realizzazione, Z è assente.
- [0151] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra A₁ e A₂ è N.
- [0152] In alcune forme di realizzazione, ciascuno di A₁ e A₂ è N.
- [0153] In alcune forme di realizzazione, ciascuno di A₁ e A₂ è CH.
- 10 [0154] In alcune forme di realizzazione, A₁ è N e A₂ è CH.
- [0155] In alcune forme di realizzazione, A₁ è CH e A₂ è N.
- [0156] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra X¹, X² e X³ non è -CH₂-. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, X¹ non è -CH₂-. In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra X¹, X² e X³ è -C(O)-.
- 15 [0157] In alcune forme di realizzazione, X² è -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, o -CH₂-OC(O)-.
- [0158] In alcune forme di realizzazione, X³ è -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, o -CH₂-OC(O)-. In altre forme di realizzazione, X³ è -CH₂-.
- 20 [0159] In alcune forme di realizzazione, X³ è un legame o -(CH₂)₂-.
- [0160] In alcune forme di realizzazione, R₁ e R₂ sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂ e R₃ sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R₄ e R₅ sono uguali. In determinate forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali.

[0161] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è $-R''MR'$. In alcune forme di realizzazione, al massimo uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è $-R''MR'$. Ad esempio, almeno uno tra R_1 , R_2 e R_3 può essere $-R''MR'$, e/o almeno uno tra R_4 e R_5 è $-R''MR'$. In determinate forme di realizzazione, almeno un M è $-C(O)O-$. In alcune forme di realizzazione, ciascun M è $-C(O)O-$. In alcune forme di realizzazione, almeno un M è $-OC(O)-$. In alcune forme di realizzazione, ciascun M è $-OC(O)-$. In alcune forme di realizzazione, almeno un M è $-OC(O)O-$. In alcune forme di realizzazione, ciascun M è $-OC(O)O-$. In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile C_3 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R'' è alchile C_3 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile C_5 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R'' è alchile C_5 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile C_6 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R'' è alchile C_6 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R'' è alchile C_7 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R'' è alchile C_7 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R' è alchile C_5 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R' è alchile C_5 . In altre forme di realizzazione, almeno un R' è alchile C_1 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R' è alchile C_1 . In alcune forme di realizzazione, almeno un R' è alchile C_2 . In determinate forme di realizzazione, ciascuna R' è alchile C_2 .

[0162] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 è alchile C_{12} . In determinate forme di realizzazione, ciascuno di R_1 , R_2 , R_3 , R_4 e R_5 sono alchile C_{12} .

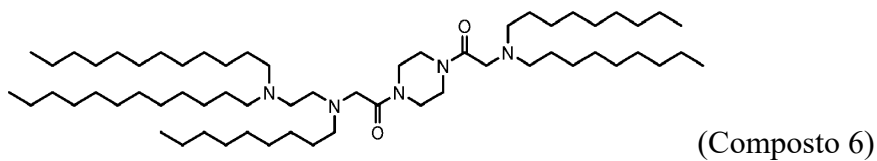
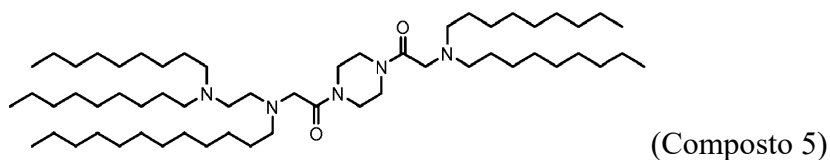
[0163] In determinate forme di realizzazione, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:



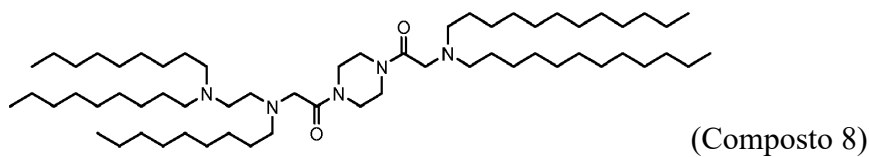
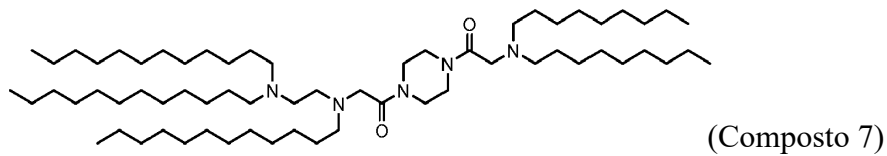
20



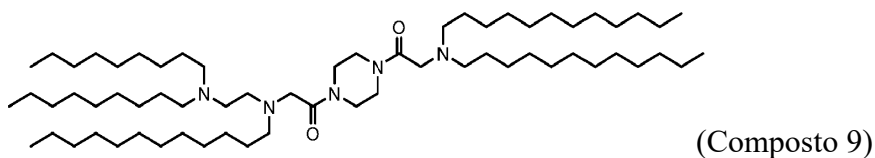
5

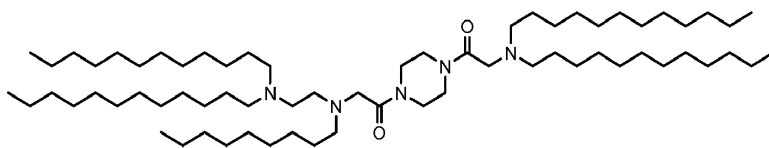


10

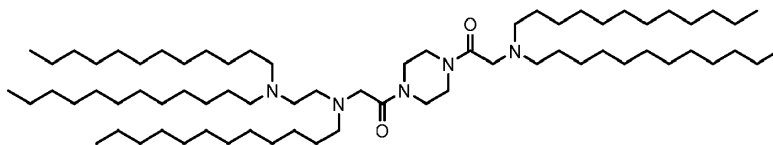


15

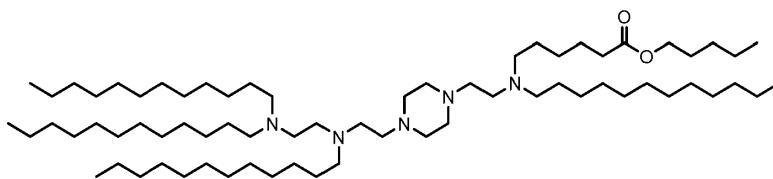




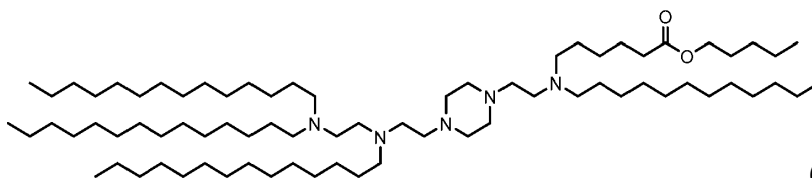
(Composto 10)



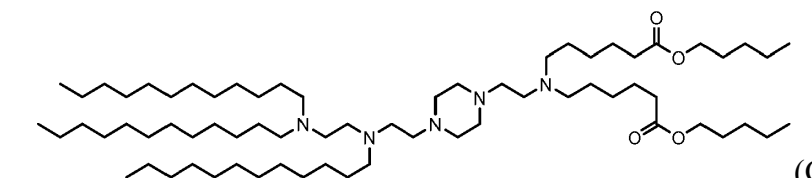
(Composto 11)



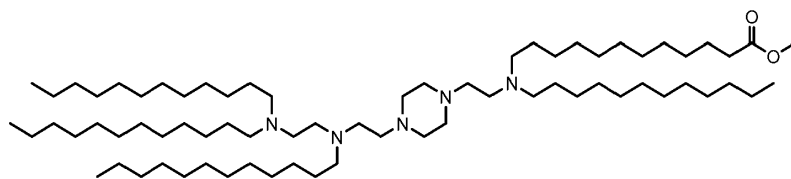
(Composto 12)



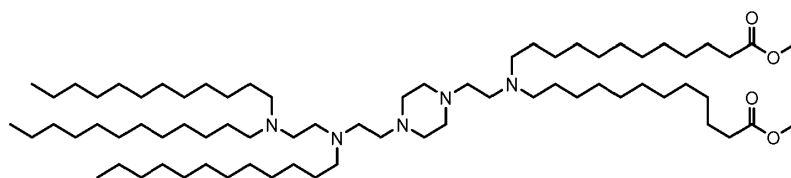
(Composto 13)



(Composto 14)



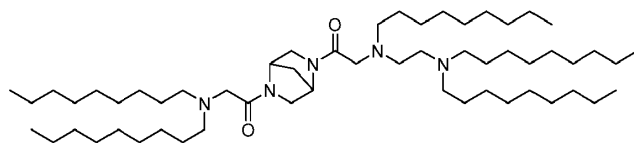
(Composto 15)



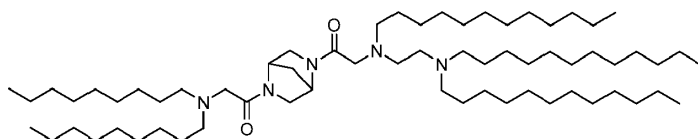
(Composto 16)

5

10

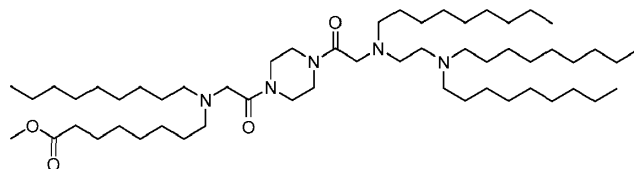


(Composto 42)

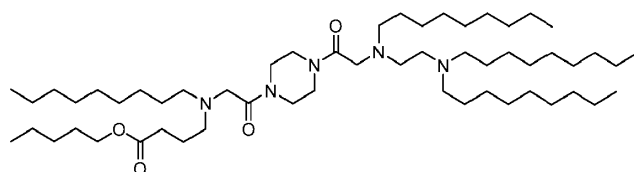


(Composto 43)

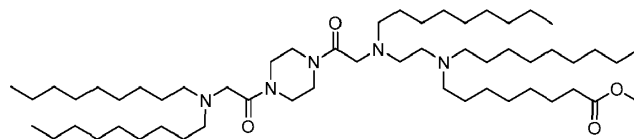
5



(Composto 44)

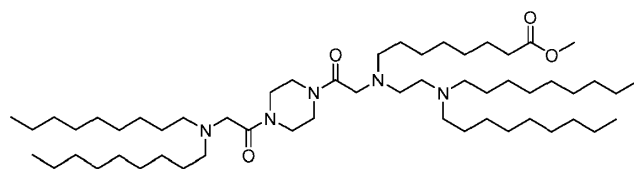


(Composto 45)

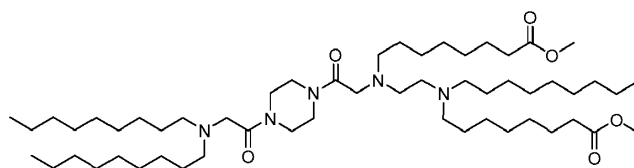


(Composto 46)

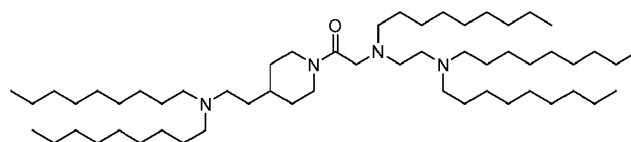
10



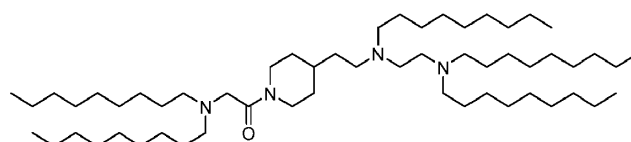
(Composto 47)



(Composto 48)

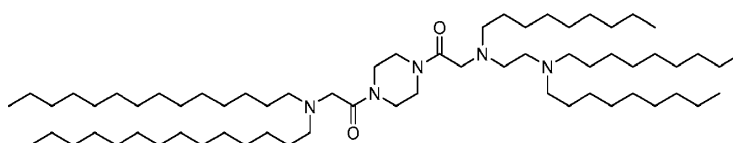


(Composto 49)

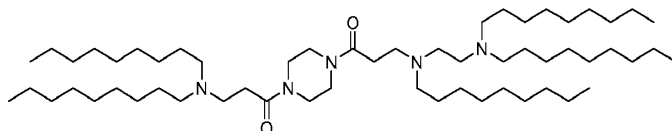


(Composto 50)

5

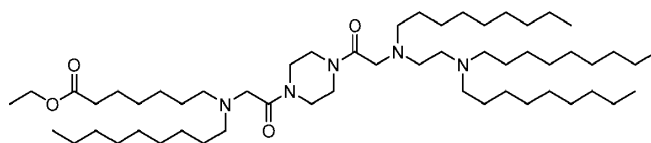


(Composto 51)

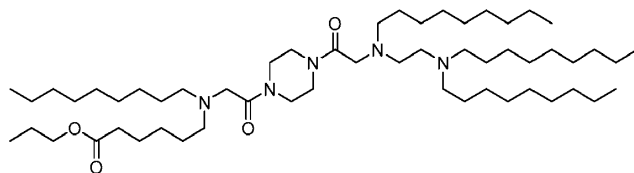


(Composto 52)

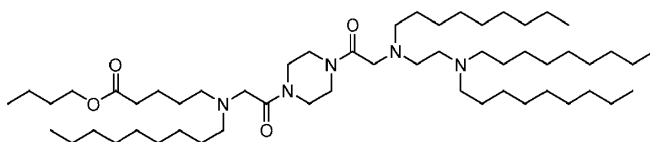
10



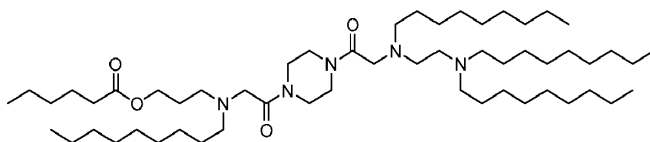
(Composto 53)



(Composto 54)

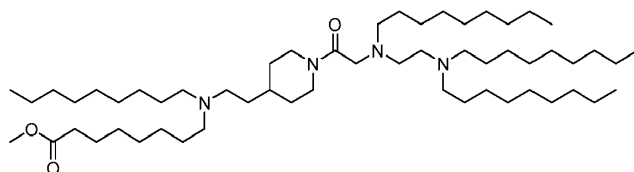


(Composto 55)

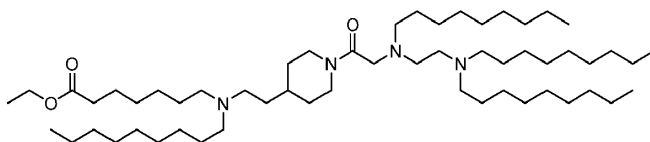


(Composto 56)

5

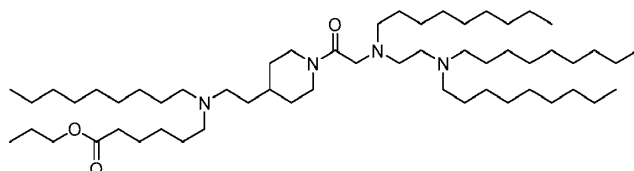


(Composto 57)

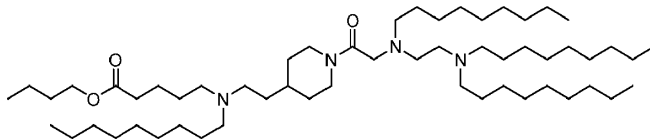


(Composto 58)

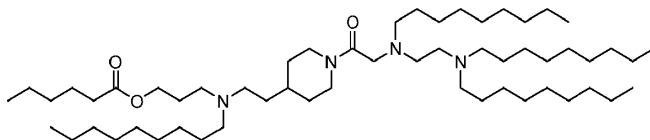
10



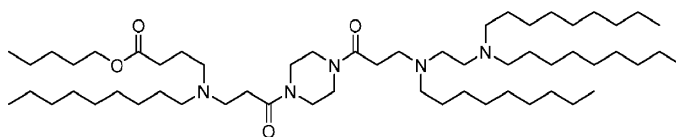
(Composto 59)



(Composto 60)

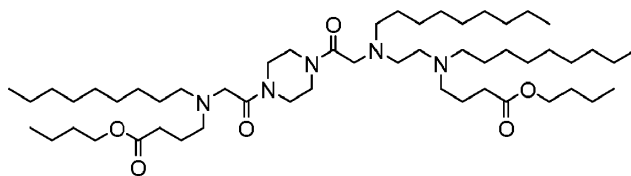


(Composto 61)

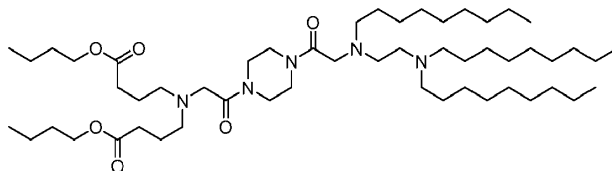


(Composto 62)

5

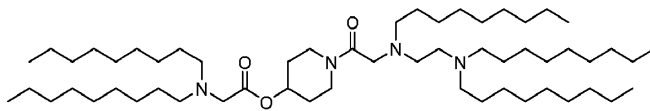


(Composto 63)

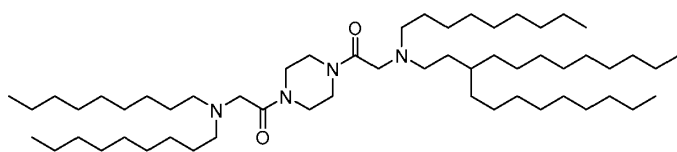


(Composto 64)

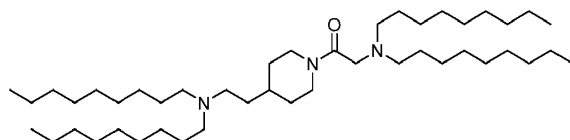
10



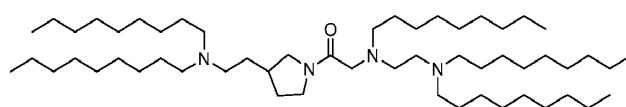
(Composto 65)



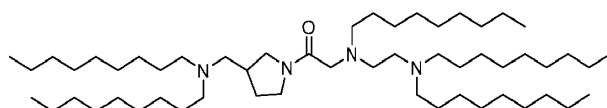
(Composto 66)



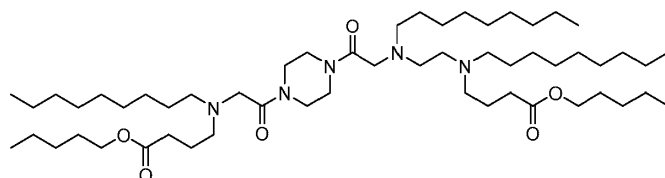
(Composto 68)



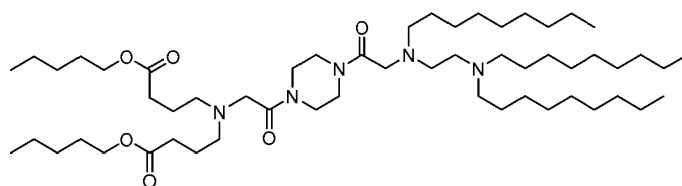
(Composto 69)



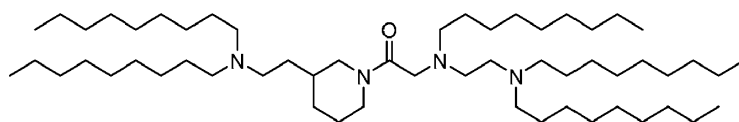
(Composto 70)



(Composto 71)



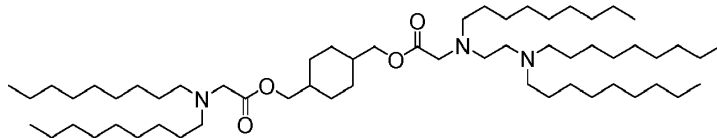
(Composto 72)



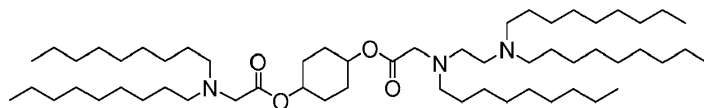
(Composto 73)

5

10

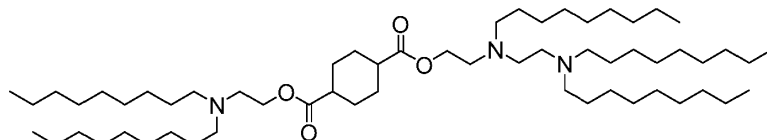


(Composto 74)

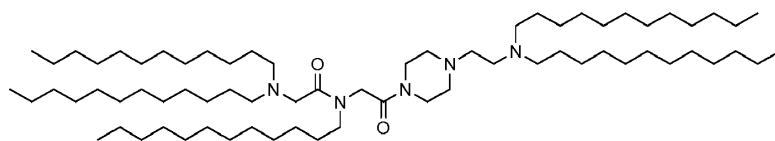


(Composto 75)

5

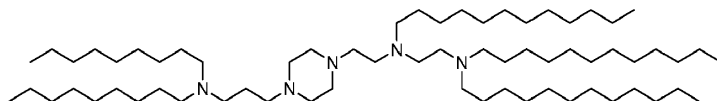


(Composto 76)

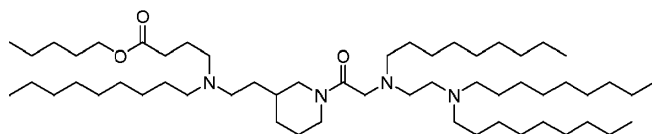


(Composto 78)

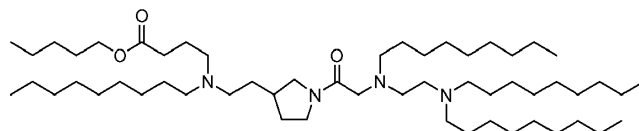
10



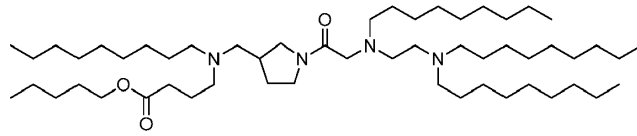
(Composto 79)



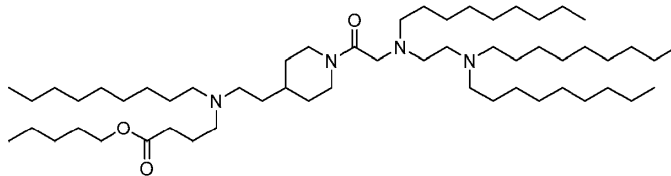
(Composto 80)



(Composto 81)

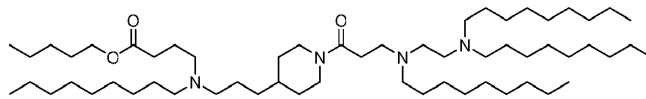


(Composto 82)

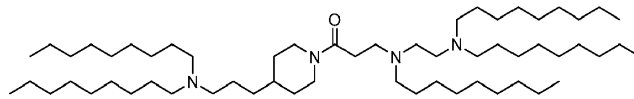


(Composto 83)

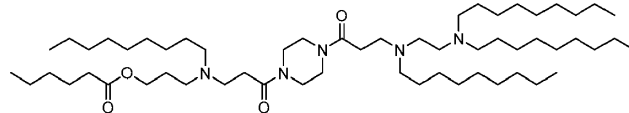
5



(Composto 84)

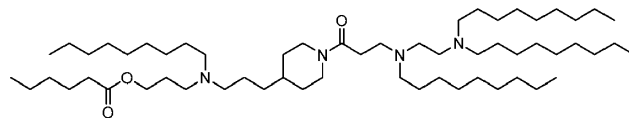


(Composto 85)

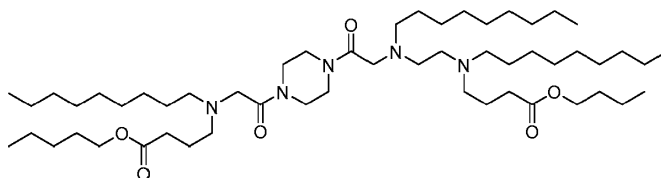


(Composto 86)

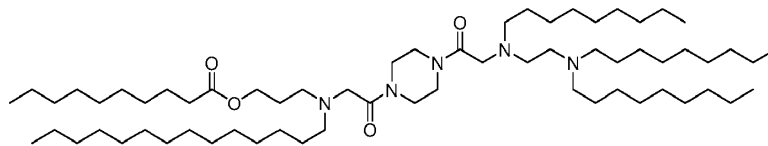
10



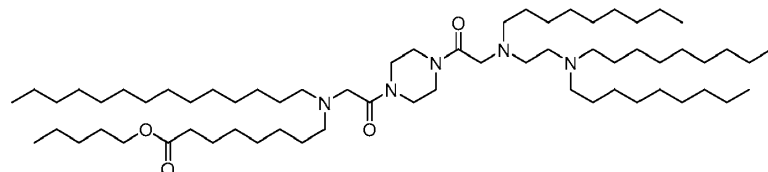
(Composto 87)



(Composto 88)

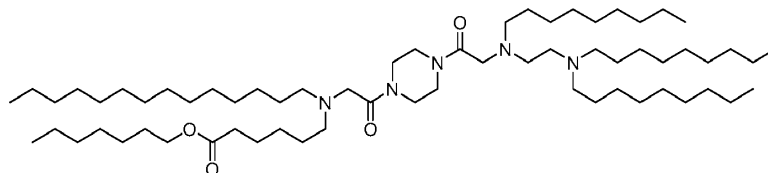


(Composto 89)

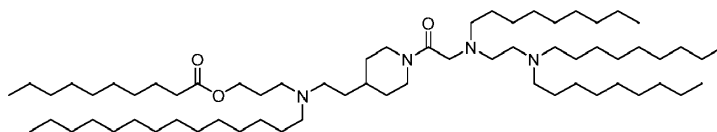


(Composto 90)

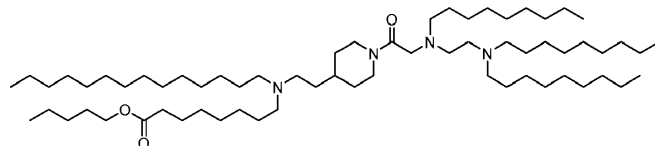
5



(Composto 91)

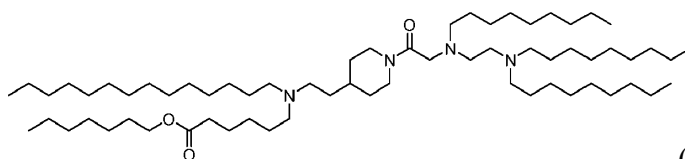


(Composto 92)

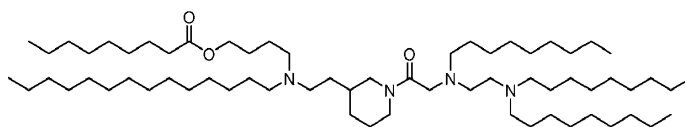


(Composto 93)

10

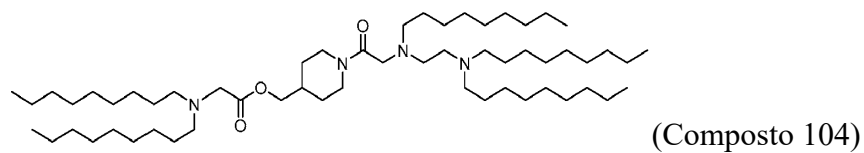
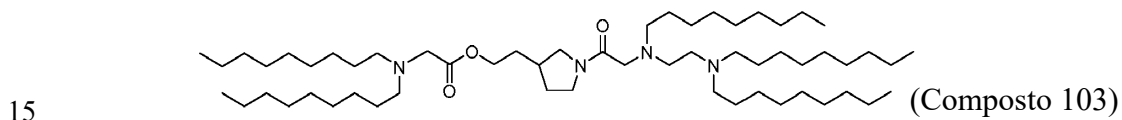
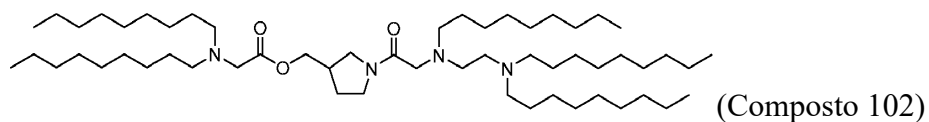
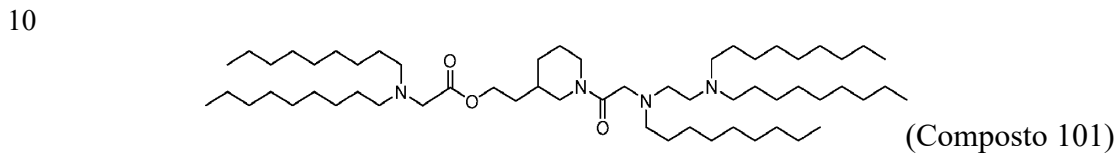
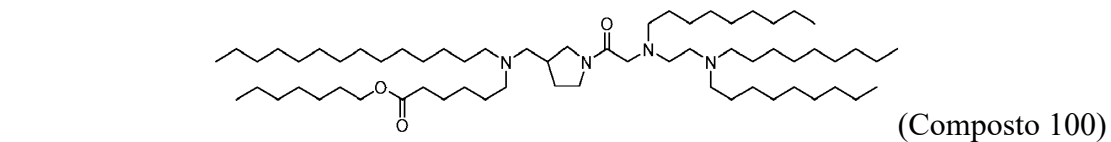
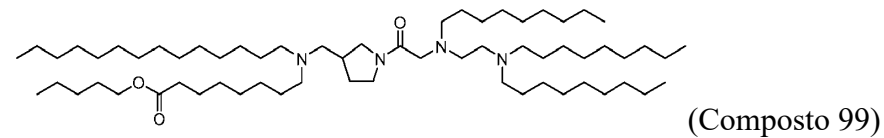
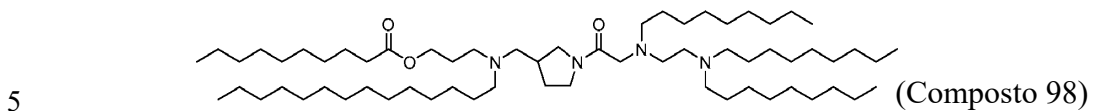
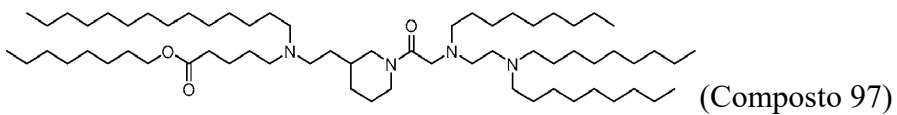
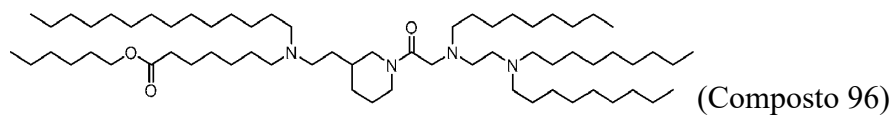


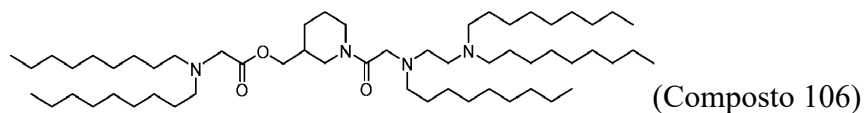
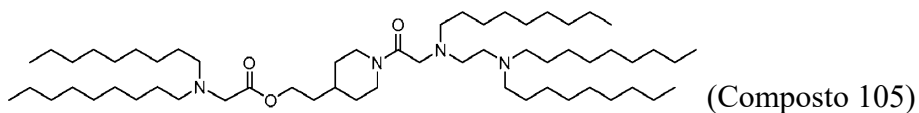
(Composto 94)



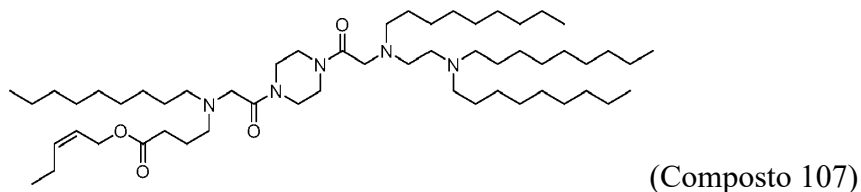
(Composto 95)

15

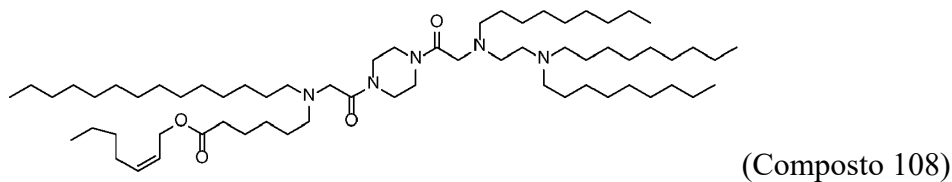




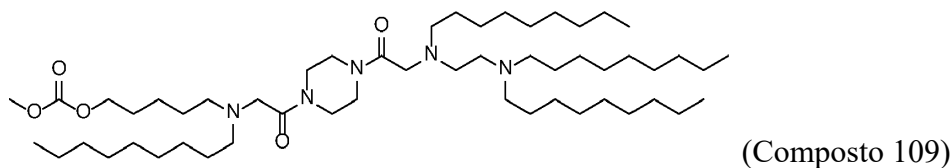
5



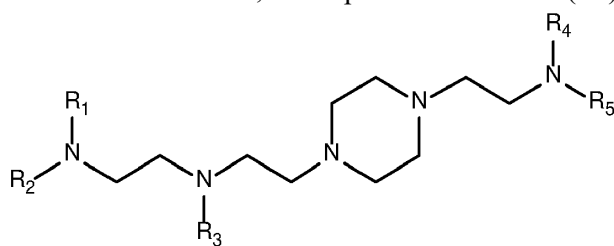
e



10



[0164] In alcune forme di realizzazione, il composto è di formula (IIa):



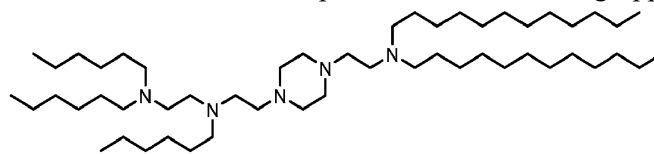
(IIa).

15 [0165] I composti di Formula (II) o (IIa) includono una o più delle seguenti caratteristiche quando applicabili

- [0166] In alcune forme di realizzazione, Z è CH₂.
- [0167] In alcune forme di realizzazione, Z è assente.
- [0168] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra A₁ e A₂ è N.
- [0169] In alcune forme di realizzazione, ciascuno di A₁ e A₂ è N.
- 5 [0170] In alcune forme di realizzazione, ciascuno di A₁ e A₂ è CH.
- [0171] In alcune forme di realizzazione, A₁ è N e A₂ è CH.
- [0172] In alcune forme di realizzazione, A₁ è CH e A₂ è N.
- [0173] In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali e non sono alchile C₁₂, alchile C₁₈ o alchenile C₁₈. In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali e
10 sono alchile C₉ o alchile C₁₄.
- [0174] In alcune forme di realizzazione, solo uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è selezionato da alchenile C₆₋₂₀. In alcune di queste forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ hanno lo stesso numero di atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, R₄ è selezionato da alchenile C₅₋₂₀. Ad esempio, R₄ può essere alchenile C₁₂ o alchenile C₁₈.
- 15 [0175] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ ha un numero di atomi di carbonio diverso da almeno un altro di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅.
- [0176] In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀ e R₄ e R₅ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀. In altre forme di realizzazione, R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀ e R₄ e R₅ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀. In alcune forme di realizzazione, R₁,
20 R₂ e R₃ hanno lo stesso numero di atomi di carbonio e/o R₄ e R₅ hanno lo stesso numero di atomi di carbonio. Ad esempio, R₁, R₂ e R₃, o R₄ e R₅, possono avere 6, 8, 9, 12, 14 o 18 atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, e R₃, o R₄ e R₅, sono alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile). In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, e R₃, o R₄ e R₅, sono gruppi alchile che includono 6, 8, 9, 12 o 14 atomi di carbonio.
- 25 [0177] In alcune forme di realizzazione, R₁ ha un numero diverso di atomi di carbonio rispetto a

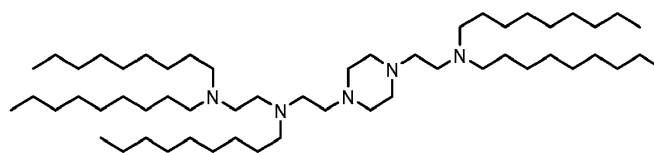
R₂, R₃, R₄ e R₅. In altre forme di realizzazione, R₃ ha un numero di atomi di carbonio diverso da R₁, R₂, R₄ e R₅. In ulteriori forme di realizzazione, R₄ ha un numero di atomi di carbonio diverso da R₁, R₂, R₃ e R₅.

[0178] In alcune forme di realizzazione, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:

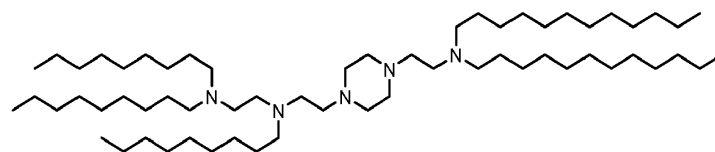


5

(Composto 17)

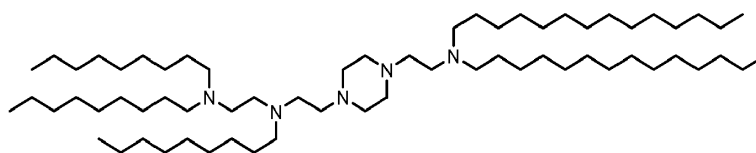


(Composto 18)

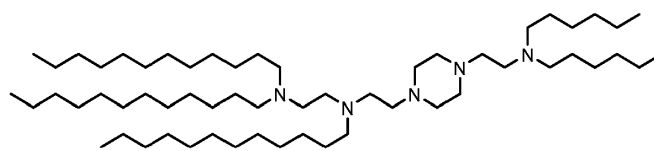


(Composto 19)

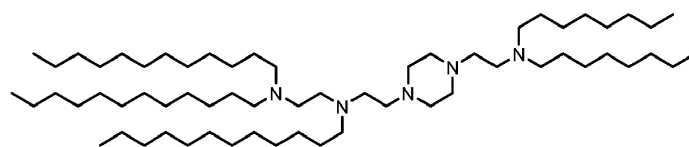
10



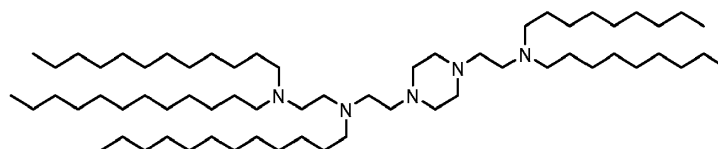
(Composto 20)



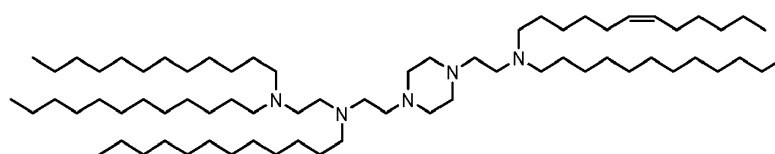
(Composto 21)



(Composto 22)

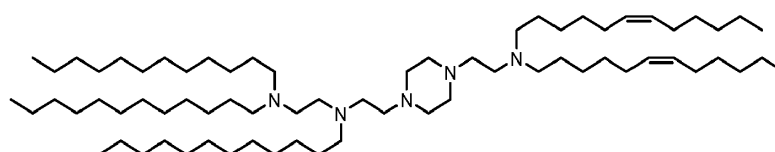


(Composto 23)

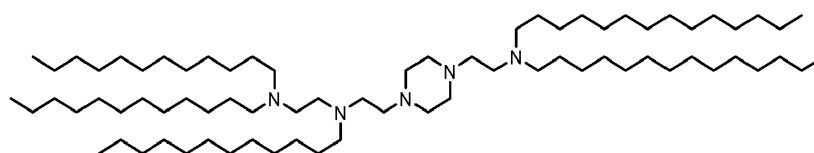


(Composto 24)

5



(Composto 25)

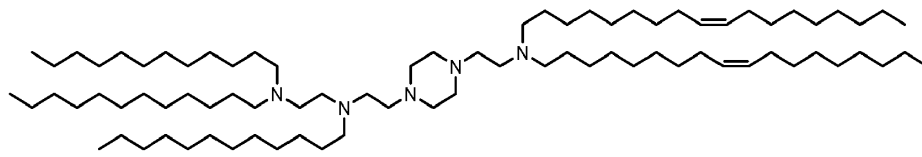


(Composto 26)

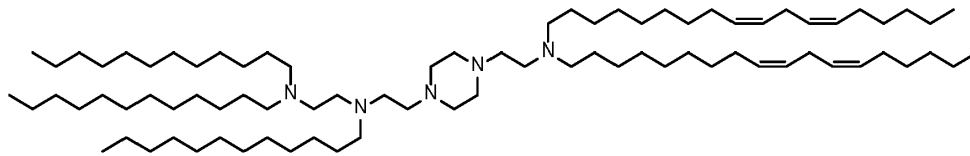
10



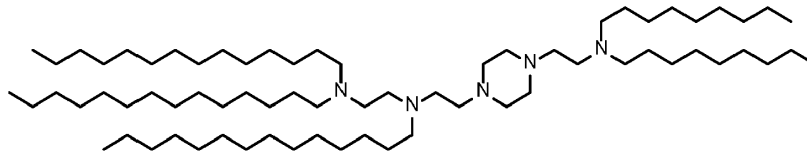
(Composto 27)



(Composto 28)

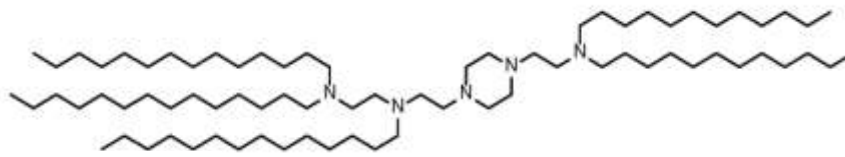


(Composto 29)

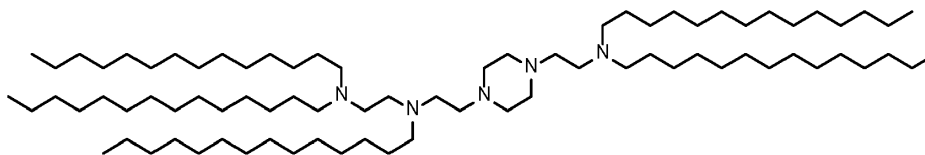


(Composto 30)

5

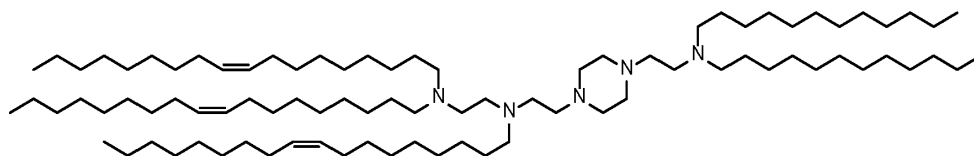


(Composto 31)



(Composto 32)

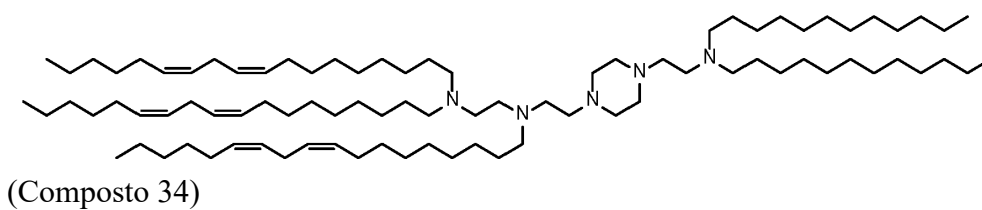
10



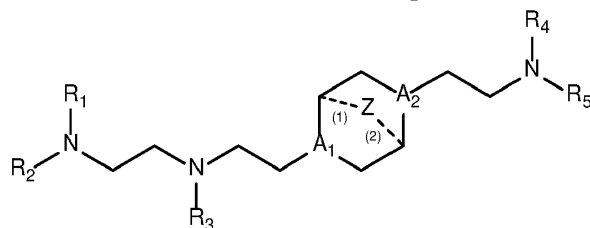
(Composto 33)

(Compound 33),

e



[0179] Nel presente documento è anche descritto un lipide di formula (II)



5 o un suo sale o isomero, in cui

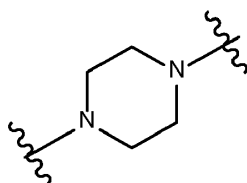
A₁ e A₂ sono selezionati ciascuno indipendentemente da CH o N, e almeno uno tra A₁ e A₂ è N;

Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;

R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₆₋₂₀ e

10 alchenile C₆₋₂₀;

in cui quando l'anello A è



allora

i) R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali, in cui R₁ non è alchile C₁₂, alchile C₁₈ o alchenile C₁₈;

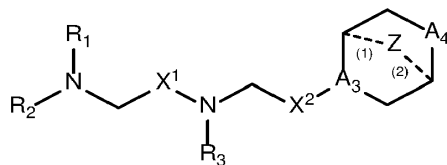
15 ii) solo uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è selezionato da alchenile C₆₋₂₀;

iii) almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ ha un numero di atomi di carbonio diverso da almeno un altro di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅;

iv) R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀, e R₄ e R₅ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀; o

v) R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀ e R₄ e R₅ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀.

[0180] Viene anche descritto un composto di formula (III)



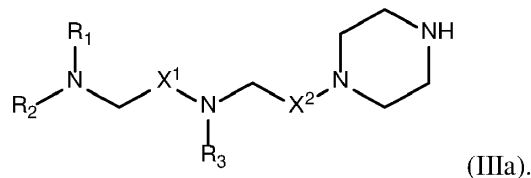
(III),

o un suo sale o isomero, in cui

- 5 A₃ è CH o N;
A₄ è CH₂ o NH; e almeno uno tra A₃ e A₄ è N o NH;
Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;
R₁, R₂ e R₃ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀, alchenile
- 10 C₅₋₂₀, -R"MR', -R*YR", -YR", e -R * OR";
Ciascun M è indipendentemente selezionato da -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)2-, un gruppo arile e un gruppo eteroarile;
X¹ e X² sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -
- 15 CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;
ciascun Y è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;
ciascun R* è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C₂₋₁₂;
12;
- 20 ciascun R indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e carbociclo C₃₋₆;
ciascun R' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂ e H; e
ciascun R'' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋

12.

[0181] In alcuni esempi, il composto è di formula (IIIa):



5 [0182] I composti di Formula (III) o (IIIa) includono una o più delle seguenti caratteristiche quando applicabili.

[0183] In alcuni esempi, Z è CH₂.

[0184] In alcuni esempi, Z è assente.

[0185] In alcuni esempi, almeno uno tra A₃ e A₄ è N o NH.

10 [0186] In alcuni esempi, A₃ è N e A₄ è NH.

[0187] In alcuni esempi, A₃ è N e A₄ è CH₂.

[0188] In alcuni esempi, A₃ è CH e A₄ è NH.

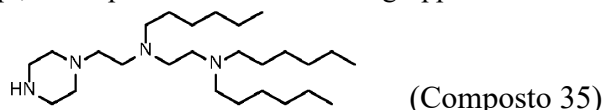
[0189] In alcuni esempi, almeno uno tra X¹ e X² non è -CH₂-. Ad esempio, in determinati esempi, X¹ non è -CH₂-. In alcuni esempi, almeno uno tra X¹ e X² è -C(O)-.

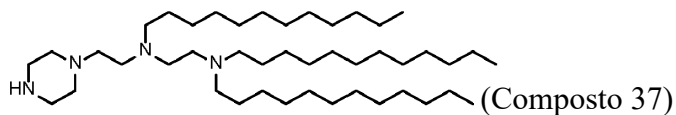
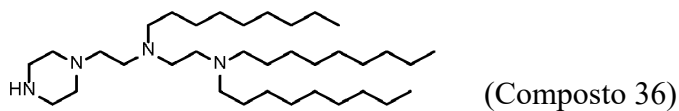
15 [0190] In alcuni esempi, X² è -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, o -CH₂-OC(O)-.

[0191] In alcuni esempi, R₁, R₂, e R₃ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀ e alchenile C₅₋₂₀. In alcuni esempi, R₁, R₂ e R₃ sono uguali. In determinati esempi, R₁, R₂, e R₃ sono alchile C₆, C₉, C₁₂, o C₁₄. In altri esempi, R₁, R₂ e R₃ sono alchenile C₁₈. Ad

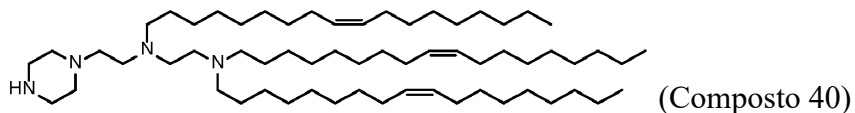
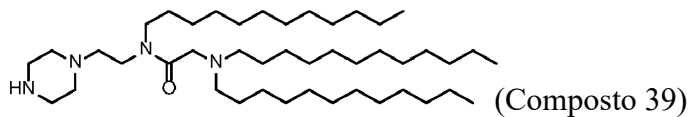
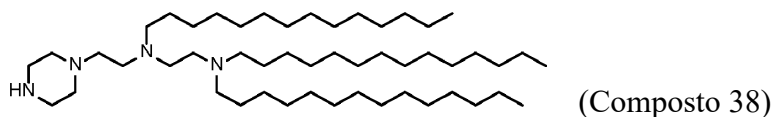
20 esempio, R₁, R₂ e R₃ possono essere linoleile.

[0192] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:

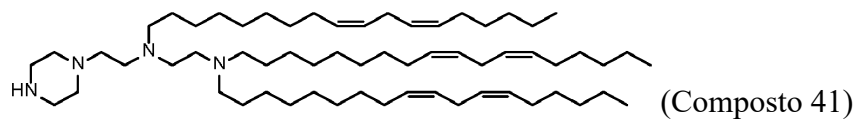




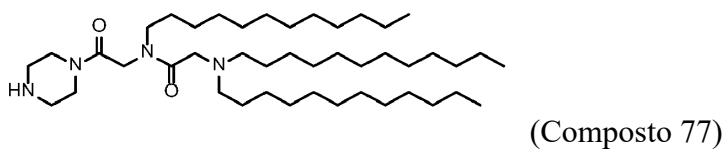
5



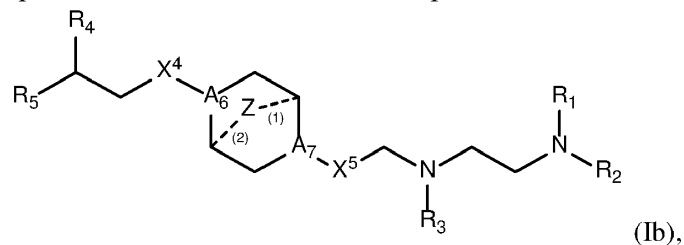
10



e



15 [0193] In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un composto secondo la formula (Ib):



o un suo sale o isomero, in cui

A₆ e A₇ sono selezionati ciascuno indipendentemente da CH o N, in cui almeno uno tra A₆ e A₇ è N;

Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;

5 X⁴ e X⁵ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono ciascuno selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀, alchenile C₅₋₂₀, -R"MR', -R*YR", -YR", e -R* OR";

10 Ciascun M è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-, un gruppo arile e un gruppo eteroarile;

ciascun Y è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;

ciascun R* è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C₂₋

15 12;

ciascun R indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e carbociclo C₃₋₆;

ciascun R' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂ e H; e

ciascun R'' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋

20 12.

[0194] In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄, e R₅ sono selezionati ciascuno indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₆₋₂₀ e alchenile C₆₋₂₀.

[0195] In alcune forme di realizzazione, R₁ e R₂ sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R₁, R₂ e R₃ sono uguali. In alcune forme di realizzazione, R₄ e R₅ sono uguali. In determinate

25 forme di realizzazione, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali.

[0196] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è alchile C₉₋₁₂. In alcune forme di realizzazione, ciascuno di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ indipendentemente è alchile C₉, C₁₂ o C₁₄. In determinate forme di realizzazione, ciascuno di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è alchile C₉.

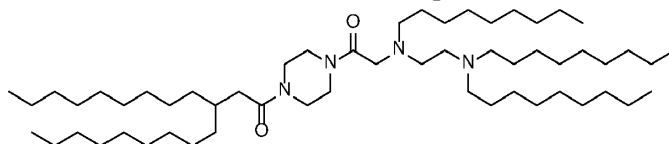
[0197] In alcune forme di realizzazione, A₆ è N e A₇ è N. In alcune forme di realizzazione, A₆ è CH e A₇ è N.

[0198] In alcune forme di realizzazione, X⁴ è -CH₂- e X⁵ è -C(O)-. In alcune forme di realizzazione, X⁴ e X⁵ sono -C(O)-.

[0199] In alcune forme di realizzazione, quando A₆ è N e A₇ è N, almeno uno di X⁴ e X⁵ non è -CH₂-, ad esempio, almeno uno di X⁴ e X⁵ è -C(O)-. In alcune forme di realizzazione, quando A₆ è N e A₇ è N, almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è -R"MR'.

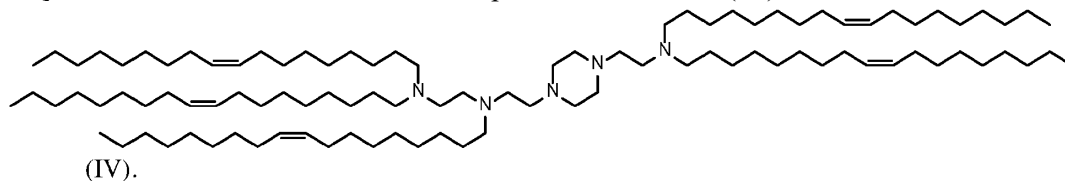
[0200] In alcune forme di realizzazione, almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ non è -R"MR'.

[0201] In alcune forme di realizzazione, il composto è

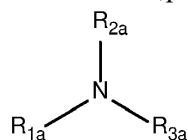


(Composto 67)

[0202] In una forma di realizzazione, il composto ha la formula (IV)



[0203] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (17-1)



(17-I),

o un suo sale o isomero, in cui R_{1a} è -(CH₂)_nQ^a, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, -OR^a, -

$O(CH_2)_n^{aN}(R^a)_2$, $-C(O)OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-CX^a_3$, $-CX^a_2H$, $-CX^aH_2$, $-CN$, $-N(R^a)_2$, $-C(O)N(R^a)_2$, $-N(R^a)C(O)R^a$ e $-N(R^a)S(O)_2R^a$ e ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

$R2a$ e $R3a$ sono selezionati ciascuno indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{3-24} , alchenile C_{3-24} , $-R^a * Y^aR^{a''}$, $-Y^aR^{a''}$, e $-R^a * OR^{a''}$;

5 ciascun Y^a è indipendentemente un carbociclo C_{3-6} ;

ciascun R^* indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} e alchenile C_{1-12} ;

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

ciascun R^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e H; e

10 ciascun $R^{a''}$ è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{3-12} e alchenile C_{3-12} ;

in cui $R2a$ include 7 o meno atomi di carbonio.

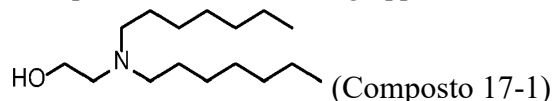
[0204] In alcuni esempi, Q^a è $-OR^a$. In determinati esempi, R^a è H. In altre forme di realizzazione, R^a è $-CH_3$.

[0205] In alcuni esempi, n^a è 1. In altre forme di realizzazione, n^a è 2. In altri esempi, n è 3. In

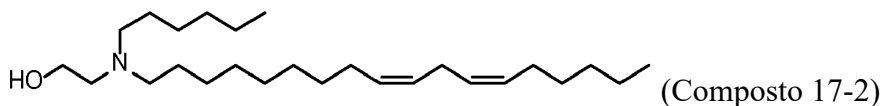
15 altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

[0206] In alcuni esempi, $R3a$ include 7 o meno atomi di carbonio.

[0207] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:

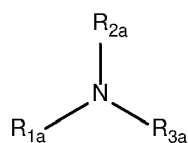


e



20

[0208] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (17-1)



(17-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1a} è $-(CH_2)_n Q^a$, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, $-OR^a$, $-O(CH_2)_{na}N(R^a)_2$, $-C(O)OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-CX^a_3$, $-CX^a_2H$, $-CX^aH_2$, $-CN$, $-N(R^a)_2$, $-C(O)N(R^a)_2$, $-N(R^a)C(O)R^a$ e $-N(R^a)S(O)_2R^a$ e

5 ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

R_{2a} è selezionato dal gruppo costituito da alchenile C_{8-24} ;

R_{3a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{8-24} ; e

ciascun R è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e

10 H.

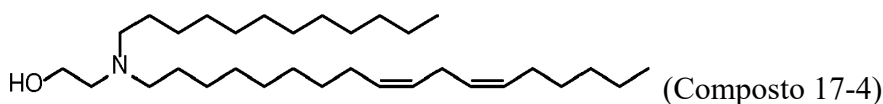
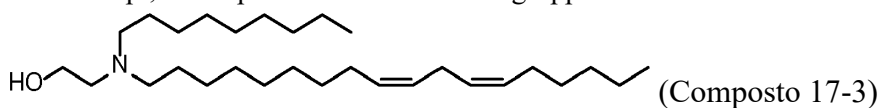
[0209] In alcuni esempi, Q^a è $-OR^a$. In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è $-CH_3$.

[0210] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altri esempi, n^a è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

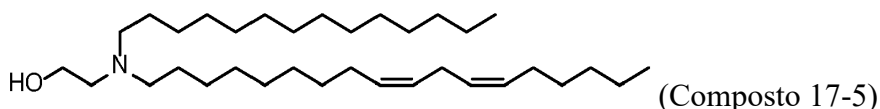
[0211] In alcuni esempi, R_{3a} è un alchile che include 9, 12, 14 o 18 atomi di carbonio.

15 [0212] In alcuni esempi, R_{2a} è alchenile C_{18} (ad esempio, linoleile).

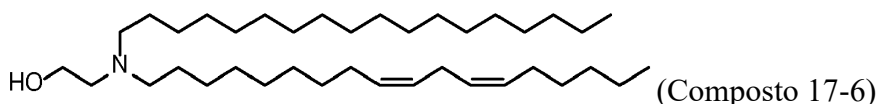
[0213] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:



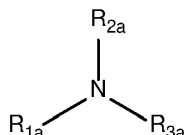
20



e



[0214] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (17-1)



5 o un suo sale o isomero, in cui

R_{1a} è $-(CH_2)_n Q^a$, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, $-OR^a$, $-O(CH_2)_{na}N(R^a)_2$, $-C(O)OR^a$, $-OC(O)R^a$, $-CX^a_3$, $-CX^a_2H$, $-CX^aH_2$, $-CN$, $-N(R^a)_2$, $-C(O)N(R^a)_2$, $-N(R^a)C(O)R^a$ e $-N(R^a)S(O)_2R^a$ e ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

10 R_{2a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{13-20} ;

R_{3a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{8-20} ; e

ciascun R^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e H.

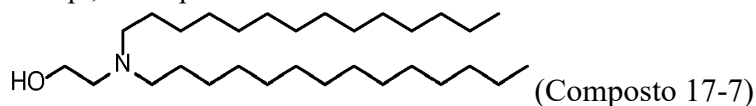
[0215] In alcuni esempi, Q^a è $-OR^a$. In determinati esempi, R^a è H. In altre forme di
15 realizzazione, R^a è $-CH_3$.

[0216] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altri esempi, n^a è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

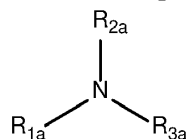
[0217] In alcuni esempi, R_{2a} e R_{3a} sono uguali.

[0218] In alcuni esempi, R_{2a} e/o R_{3a} è alchile C_{14} .

20 [0219] In alcuni esempi, il composto è



[0220] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (17-1)



(17-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1a} è -(CH₂)_n^aQ^a, dove Q^a è —OR^a, R^a è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃,

5 alchenile C₂₋₃ e H, e n^a è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5; e

R_{2a} e R_{3a} sono selezionati ciascuno indipendentemente dal gruppo costituito da alchenile C₈₋₂₀,

in cui

iii) R^a è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e alchenile C₂₋₃; o

iv) R_{1a} è -(CH₂)₂OH, e R_{2a} e R_{3a} includono ciascuno uno o meno doppi legami.

10 [0221] In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è -CH₃.

[0222] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altri esempi, n^a è 3. In altri esempi, n^a è

4. In alcuni esempi, n^a è 5.

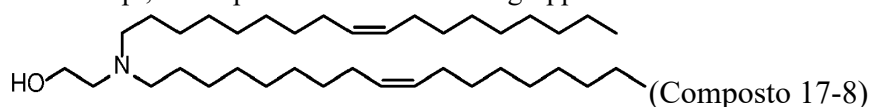
[0223] In determinati esempi, R_{1a} è -(CH₂)₂OCH₃. In altri esempi, R_{1a} è -(CH₂)₂OH.

[0224] In alcuni esempi, R_{2a} è alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile). In determinati esempi, R_{3a} è

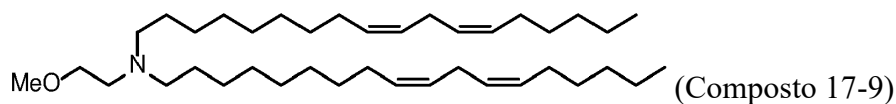
15 alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile).

[0225] In alcuni esempi, R_{2a} e R_{3a} sono uguali.

[0226] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:

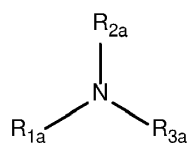


e



20

[0227] La descrizione fornisce anche un composto di formula (17-1)



(17-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R₁ è -(CH₂)_nQ^a, dove Q^a è selezionato da un eterociclo, -OR^a, -O(CH₂)_{na}N(R^a)₂, -C(O)OR^a, -OC(O)R^a, -CX^a₃, -CX^a₂H, -CX^aH₂, -CN, -N(R^a)₂, -C(O)N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)R^a e -N(R^a)S(O)₂R^a e

5 ogni n^a è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

ciascun X^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

R_{2a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₈₋₁₂;

R_{3a} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₈₋₂₀; e

ciascun R^a è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃, alchenile C₂₋₃ e

10 H.

[0228] In alcuni esempi, Q^a è -OR^a. In alcuni esempi, R^a è H. In altri esempi, R^a è -CH₃.

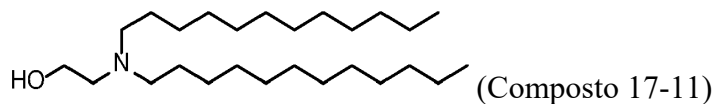
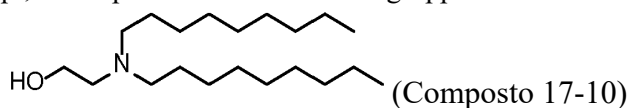
[0229] In alcuni esempi, n^a è 1. In altri esempi, n^a è 2. In altri esempi, n è 3. In altri esempi, n^a è 4. In alcuni esempi, n^a è 5.

[0230] In alcuni esempi, Q^a è -OR^a e n^a è selezionato tra 2, 3 e 4.

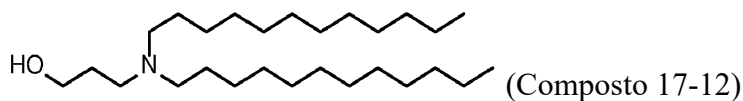
15 [0231] In alcuni esempi, R_{2a} è alchile C₉. In altri esempi, R_{2a} è alchile C₁₂.

[0232] In alcuni esempi, R_{2a} e R_{3a} sono uguali.

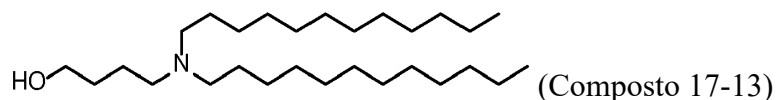
[0233] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:



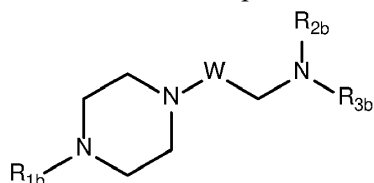
20



e



[0234] La descrizione fornisce anche un composto avente la formula (19-1)



(19-I),

5

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1b} è selezionato dal gruppo costituito da H, alchile C_{1-5} , alchenile C_{2-5} , $-R^{b''}M^bR^{b'}$, un carbociclo C_{3-6} , $-(CH_2)_nQ^b$ e $-(CH_2)_nCHQ^bR^{b'}$, dove Q^b è selezionato da un eterociclo, $-OR^b$, $-O(CH_2)_nN(R^b)_2$, $-C(O)OR^b$, $-OC(O)R^b$, $-CX^b_3$, $-CX^b_2H$, $-CX^bH_2$, $-CN$, $-N(R^b)_2$, $-C(O)N(R^b)_2$, $-N(R^b)C(O)R^b$ e $-N(R^b)S(O)_2R^b$ e ogni n è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

10

R_{2b} e R_{3b} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-20} , alchenile C_{2-20} , $-R^{b''}MR^{b'}$, $-R^{b*}YR^{b''}$, $-YR^{b''}$ e $-R^{b*}OR^{b''}$;

ciascun M^b è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^b)-$, $-N(R^b)C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR^b)O-$, $-S(O)_2-$,

15

un gruppo arile e un gruppo eteroarile;

W è selezionato dal gruppo costituito da $-CH_2-$, $-CHR^b-$, $-C(O)-$, $-CH(OH)-$, $-C(S)-$ e $-CH(SH)-$;

ciascun X^b è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

ciascun Y^b è indipendentemente un carbociclo C_{3-6} ;

ciascun R^{b*} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} e alchenile C_{1-12} ;

20

ciascun R^b è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , un carbociclo C_{3-6} , alchenile C_{2-3} e H;

ciascun $R^{b'}$ è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} e H; e

ciascun $R^{b''}$ indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{3-12} e alchenile C_{3-12} .

5 [0235] In alcuni esempi, W non è $-CH_2-$, ad esempio, W è $-C(O)-$.

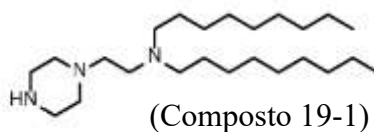
[0236] In alcuni esempi, almeno uno tra R_{2b} e R_{3b} è $-R^{b''}M^bR^{b'}$. In determinati esempi, almeno un M^b è $-C(O)O-$. In alcuni esempi, almeno un $R^{b''}$ è alchile C_5 . In determinati esempi, almeno un $R^{b'}$ è alchile C_5 .

10 [0237] In alcuni esempi, R_{2b} e/o R_{3b} sono selezionati dal gruppo costituito da alchile C_{1-20} . Ad esempio, R_{2b} e/o R_{3b} possono essere gruppi alchile includenti 9 o 12 atomi di carbonio. In altri esempi, R_{2b} e/o R_{3b} sono selezionati dal gruppo costituito da alchenile C_{2-20} . Ad esempio, R_{2b} e/o R_{3b} possono essere gruppi alchenile comprendenti 18 atomi di carbonio (ad esempio gruppi linoleile). In determinati esempi, R_{2b} e R_{3b} sono uguali.

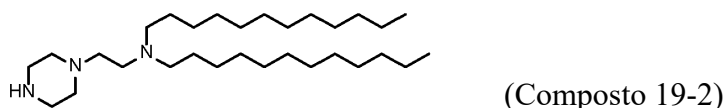
15 [0238] In alcuni esempi, R_{1b} è H, mentre in altri esempi, R_{1b} è selezionato da alchile C_{1-5} . Ad esempio, R_{1b} può essere alchile C_1 .

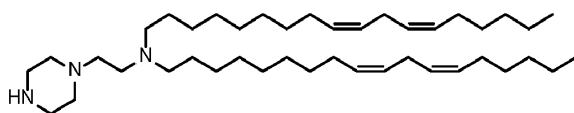
[0239] In alcuni esempi, R_{1b} è $-(CH_2)_nQ^b$. In tali esempi, Q^b è un eterociclo come un gruppo fenile. Ad esempio, Q^b può essere un gruppo fenile con uno o più sostituenti, come qui descritto.

[0240] In determinati esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:

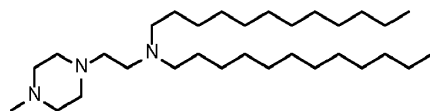


20



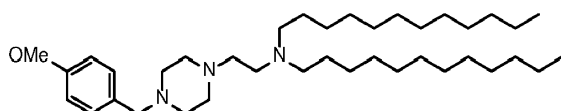


(Composto 19-3)



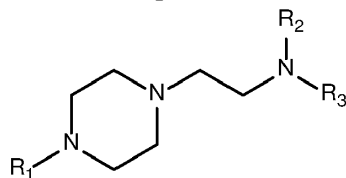
(Composto 19-4)

e



(Composto 19-5)

[0241] In altri esempi, i lipidi sono composti di formula (19-II)



(19-II),

o un suo sale o isomero, in cui

10 R_{1b} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C₆₋₂₀; e

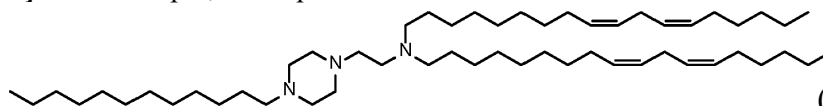
R_{2b} e R_{3b} sono selezionati ciascuno indipendentemente dal gruppo costituito da alchenile C₆₋₂₀.

[0242] In esempi specifici, R_{1b} è alchile C₁₂

[0243] In alcuni esempi, R_{2b} e/o R_{3b} sono alchenile C₁₈ (ad esempio, linoleile).

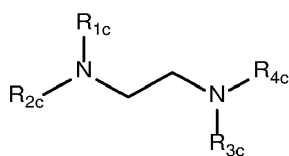
[0244] In determinati esempi, R_{2b} e R_{3b} sono entrambi linoleile.

15 [0245] In un esempio, il composto è



(Composto 19-6)

[0246] I lipidi possono essere composti di formula (20-1),



(20-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da un carbociclo

C₃₋₆, -(CH₂)_{nc}Q^c, -(CH₂)_{nc}CHQ^cR^c, -CHQ^cR^c e CQ^c (R^c)₂, dove Q^c è selezionato da un eterociclo,

- 5 -OR^c, -O(CH₂)_{nc}N(R^c)₂, -C(O)OR^c, -OC(O)R^c, -CX^c₃, -CX^c₂H, -CX^cH₂, -CN, -N(R^c)₂, -C(O)N(R^c)₂, -N(R^c)C(O)R^c, e --N(R^c)S(O)₂R^c e ogni n^c è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5;

R_{2c}, R_{3c} e R_{4c} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da C₁₋₂₀ alchile, C₂₋₂₀ alchenile, -R^cM^cR^c, -R^c * Y^cR^c, -Y^cR^c, R^c * OR^c;

- 10 Ciascun M^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R^c)-, -N(R^c)C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR^c)O-, -S(O)₂-, un gruppo arile e un gruppo eteroarile;

ciascun X^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da F, Cl, Br e I;

ciascun Y^c è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;

- 15 ciascun R^{c*} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C₁₋₁₂;

ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃, alchenile C₂₋₃ e H;

ciascun R^{c'} è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋

- 20 12 e H; e

ciascun R^{c''} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋

12,

in cui

i) R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da un carbociclo

C_{3-6} , $-(CH_2)_{nc}Q^c$, $-(CH_2)_{nc}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$ e $CQ^c(R^c)_2$, dove Q^c è selezionato da un eterociclo, $-O(CH_2)_{nc}N(R^c)_2$, $-C(O)OR^c$, $-OC(O)R^c$, $-CX^c_3$, $-CX^c_2H$, $-CX^c_2H_2$, $-C(O)N(R^c)_2$, $-N(R^c)C(O)R^c$, e $-N(R^c)S(O)_2R^c$ e ogni n^c è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5; e/o

5 ii) almeno uno tra R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} è $-R^{c''}M^cR^{c'}$.

[0247] In alcuni esempi, R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_n^cQ^c$, $-(CH_2)_{nc}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$, e $-CQ^c(R^c)_2$, dove Q^c è selezionato da un eterociclo, $-O(CH_2)_{nc}N(R^c)_2$, $-C(O)OR^c$, $-OC(O)R^c$, $-CX^c_3$, $-CX^c_2H$, $-CX^c_2H_2$, $-CN$, $-C(O)N(R^c)_2$, $-N(R^c)C(O)R^c$, e $-N(R^c)S(O)_2R^c$ e ogni n è selezionato indipendentemente da 1, 2, 3, 4 e 5. In determinati esempi, R_{1c} è $-(CH_2)_{nc}Q^c$. In

10 alcuni esempi, n^c è 2. In alcuni esempi, Q^c è $-C(O)OR^c$, dove R^c è, ad esempio, H.

[0248] In alcuni esempi, almeno uno tra R_{2c} , R_{3c} , e R_{4c} è $-R^{c''}M^cR^{c'}$. Ad esempio, R_{2c} , R_{3c} e/o R_{4c} possono essere $-R^{c''}M^cR^{c'}$. In alcuni esempi, almeno un M^c è $-C(O)O-$. In determinati esempi, ogni M^c è $-C(O)O-$. In alcuni esempi, almeno un $R^{c''}$ è alchile C_5 o C_7 . In determinati esempi, ogni $R^{c''}$ è alchile C_5 . In altri esempi, ogni $R^{c''}$ è alchile C_7 . In alcuni esempi, almeno un $R^{c'}$ alchile C_5 C_7 o C_9 . In determinati esempi, ogni $R^{c'}$ è alchile C_5 . In altri esempi, ogni $R^{c'}$ alchile C_7 . In altri esempi, ogni $R^{c'}$ alchile C_9 . In alcuni esempi, $R^{c'}$ è ramificato.

[0249] In alcuni esempi, R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} sono selezionati dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} . In determinati esempi, R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} sono alchile C_{12} .

[0250] In alcuni esempi, R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} e alchenile C_{5-20} .

20 Ad esempio, R_{2c} può essere alchile C_{12} .

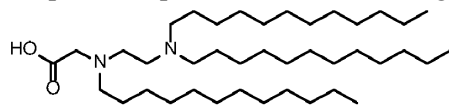
[0251] In alcuni esempi, R_{3c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} e alchenile C_{5-20} . Ad esempio, R_{3c} può essere alchile C_6 , C_9 o C_{12} .

[0252] In alcuni esempi, R_{4c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{5-20} e alchenile C_{5-20} .

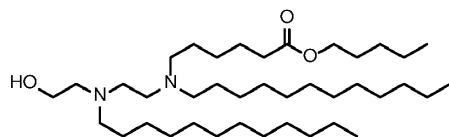
25 Ad esempio, R_{4c} può essere alchile C_6 , C_9 o C_{12}

[0253] In alcuni esempi, R_{3c} e R_{4c} sono uguali.

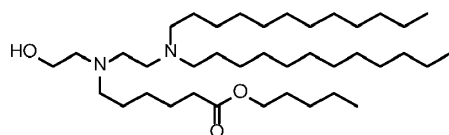
[0254] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:



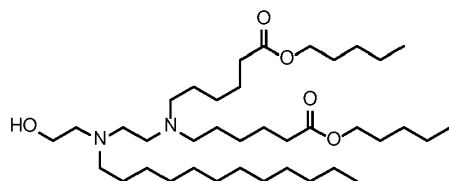
(Composto 20-1)



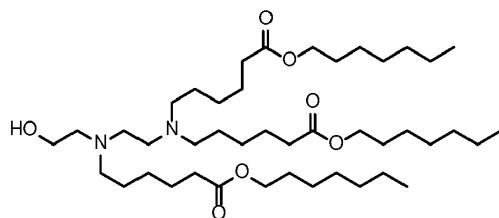
(Composto 20-2)



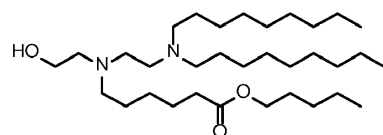
(Composto 20-3)



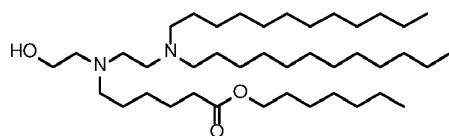
(Composto 20-4)



(Composto 20-5)



(Composto 20-6)

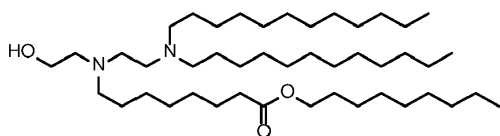


(Composto 20-7)

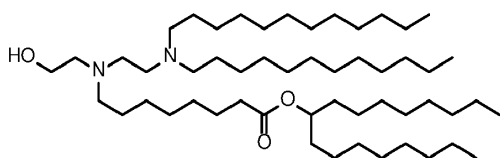
5

10

15

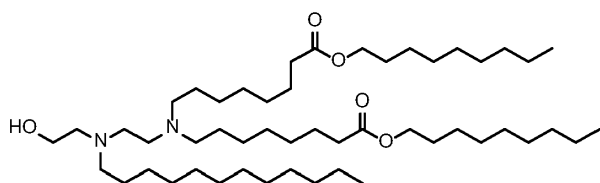


(Composto 20-8)



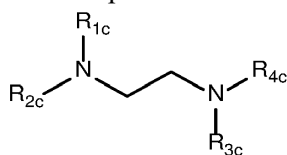
(Composto 20-9)

5 e



(Composto 20-10)

[0255] In altri esempi, il lipide è un composto secondo la formula (20-1)



(20-I),

10 o un suo sale o isomero, in cui

R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_nQ^c$, $-(CH_2)_nCHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$, e $-CQ^c(R^c)_2$, dove Q^c è selezionato da $-OR^c$, $-CN$ e $-N(R^c)_2$ e n^c è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5;

R_{2c} e R_{3c} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{6-20} e alchenile C_{6-20} ;

15 R_{4c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{13-20} e alchenile C_{5-20} ; e

ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e H.

[0256] In alcuni esempi, R_{3c} è alchile C_{14} .

[0257] In alcuni esempi, R_{4c} è alchile C₁₄.

[0258] In alcuni esempi, R_{3c} è alchenile C₁₈. Ad esempio, R_{3c} può essere linoleile.

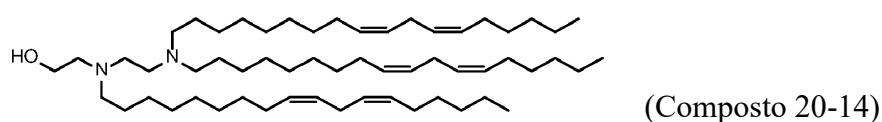
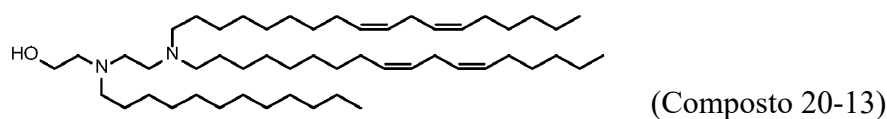
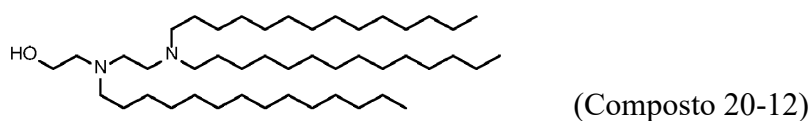
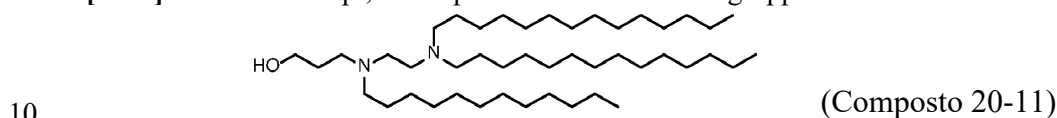
[0259] In alcuni esempi, R_{4c} è alchenile C₁₈. Ad esempio, R_{4c} può essere linoleile.

5 [0260] In alcuni esempi, R_{2c} è alchile C₁₂. In altri esempi, R_{2c} è alchile C₁₄. In alcuni esempi, R_{2c} è alchenile C₁₈. Ad esempio, R_{2c} può essere linoleile.

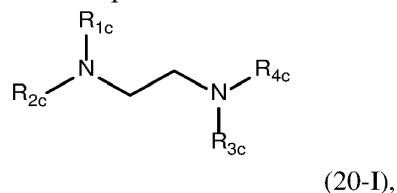
[0261] In alcuni esempi, R_{3c} e R_{4c} sono uguali.

[0262] In alcuni esempi, R_{1c} è -(CH₂)_{n^c}Q^c. In alcuni esempi, Q^c è -OR^c. Ad esempio, Q^c può essere -OH. In alcuni esempi, n^c è 2 o 3.

[0263] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:



[0264] In altri esempi, il lipide è un composto avente la formula (20-1)



20 o un suo sale o isomero, in cui

R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_{n^c}Q^c$, $-(CH_2)_{n^c}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$, e $-CQ^c(R^c)_2$,
dove Q^c è selezionato da $-OR^c$, $-CN$ e $-N(R^c)_2$ e n^c è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5;

R_{2c} , R_{3c} e R_{4c} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{6-20} e alchenile C_{6-20} ;

5 ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-3} , alchenile C_{2-3} e H;

in cui

i) R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} , e/o

ii) R_{3c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} .

10 **[0265]** In alcuni esempi, R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} .
Ad esempio, R_{2c} può essere alchile C_6 o C_9 .

[0266] In alcuni esempi, R_{3c} è selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-11} e alchenile C_{2-5} .
Ad esempio, R_{3c} può essere alchile C_6 o C_9 .

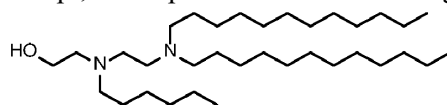
[0267] In alcuni esempi, R_{3c} è alchile C_{12} .

15 **[0268]** In alcuni esempi, R_{2c} è alchile C_{12} .

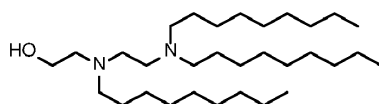
[0269] In alcuni esempi, R_{4c} è alchile C_6 , C_9 o C_{12} .

[0270] In alcuni esempi, R_{1c} è $-(CH_2)_{n^c}Q^c$. In determinati esempi, Q^c è $-OR^c$. In alcuni esempi, R^c è H. In alcuni esempi, n^c è 2 o 3.

[0271] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:

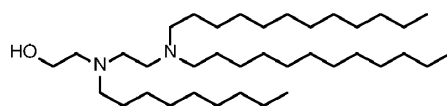


(Composto 20-15)



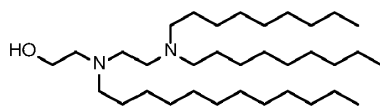
(Composto 20-16)

20



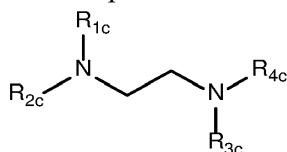
(Composto 20-17)

e



(Composto 20-18)

- 5 [0272] In altri esempi, il lipide è un composto secondo la formula (20-1)



(20-I),

o un suo sale o isomero, in cui

R_{1c} è selezionato dal gruppo costituito da $-(CH_2)_{nc}Q^c$, $-(CH_2)_{nc}CHQ^cR^c$, $-CHQ^cR^c$, e $-CQ^c(R^c)_2$,

dove Q^c è selezionato da $-OR^c$, $-CN$ e $-N(R^c)_2$ e n^c è selezionato da 1, 2, 3, 4 e 5;

- 10 R_{2c} è selezionato dal gruppo costituito da H, alchile C₁₂₋₂₀ e alchenile C₆₋₂₀;

R_{3c} e R_{4c} sono alchile C₁₂; e

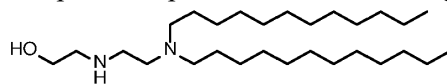
ciascun R^c è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃, alchenile C₂₋₃ e H.

[0273] In alcuni esempi, R_{2c} è H. In altri esempi, R_{2c} è alchile o alchenile C₁₂. In alcuni esempi,

- 15 R_{2c} è alchile C₁₄. In altri esempi, R_{2c} è alchenile C₁₈. Ad esempio, R_{2c} può essere linoleile.

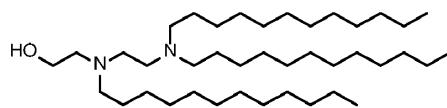
[0274] In alcune forme di realizzazione, R_{1c} è $-(CH_2)_{nc}Q^c$. In determinati esempi, Q^c è $-OR^c$. Ad esempio, Q^c può essere OH. In alcuni esempi, n^c è 2, 3 o 4.

[0275] In alcuni esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:

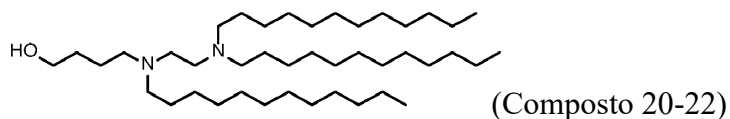
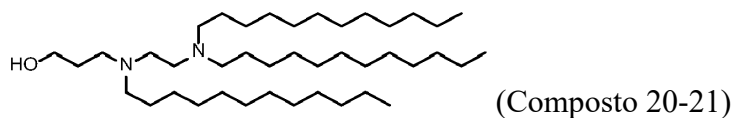


(Composto 20-19)

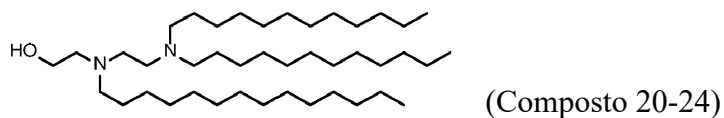
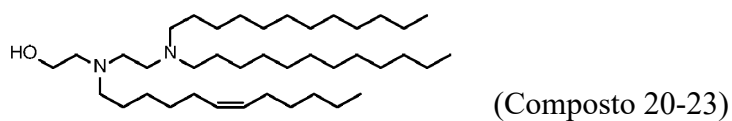
20



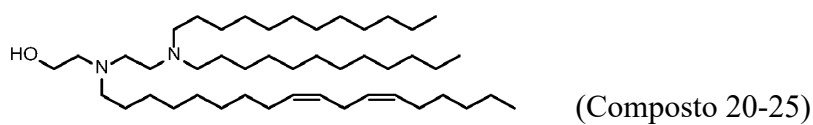
(Composto 20-20)



5

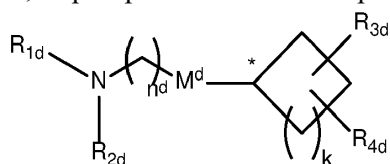


e



10

[0276] In un altro esempio, i lipidi possono essere composti di formula (21-1),



(21-I),

o un suo sale o isomero, in cui

15 R_{1d} e R_{2d} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-5} e alchenile C_{2-}

5;

n^d è selezionato tra 1, 2, 3, 4 e 5;

k è selezionato tra 0, 1, 2 e 3;

R_{3d} e R_{4d} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-20} , alchenile C_{2-}

20, $-R^d$, $-M^dR^d$, $-R^d * Y^d R^d$, $-Y^dR^d$, e $-R^d * OR^d$;

ogni M^d è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^d)-$, $-N(R^d)C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR^d)O-$, e $-S(O)_2-$, o è assente;

5 ogni R^d è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} e H; ogni Y^d è indipendentemente un carbociclo C_{3-6} ;

ciascun R^{d*} indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} e alchenile C_{1-12} ;

10 ciascun $R^{d'}$ è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{1-12} , alchenile C_{2-12} e H; e

ciascun $R^{d''}$ è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C_{3-12} e alchenile C_{3-12} ,

in cui R_{3d} e R_{4d} sono legati o i) allo stesso atomo di carbonio o ii) atomi di carbonio adiacenti.

15 [0277] In alcuni esempi, R_{3d} e R_{4d} sono legati allo stesso atomo di carbonio. Ad esempio, R_{3d} e R_{4d} possono essere legati a un atomo di carbonio adiacente a C^* . In determinati esempi, R_{3d} e R_{4d} non sono legati a un atomo di carbonio adiacente a C^* .

[0278] In altri esempi, R_{3d} e R_{4d} sono legati ad atomi di carbonio adiacenti. In determinati esempi, uno o entrambi R_{3d} e R_{4d} sono legati ad atomi di carbonio adiacenti a C^* .

[0279] In alcuni esempi, k è 0. In altri esempi, k è 1, 2 o 3.

20

[0280] In alcuni esempi, M^d è assente. In altri esempi, M^d è selezionato dal gruppo costituito da $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)N(R^d)-$, $-N(R^d)C(O)-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(S)S-$, $-SC(S)-$, $-CH(OH)-$, $-P(O)(OR^d)O-$, e $-S(O)_2-$. In tali esempi specifici, M^d è $-C(O)O-$.

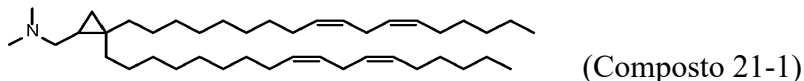
[0281] In alcuni esempi, n^d è 1, 2 o 3.

25 [0282] In alcuni esempi, R_{1d} e/o R_{2d} sono selezionati da alchile C_{1-5} . In determinati esempi, R_{1d}

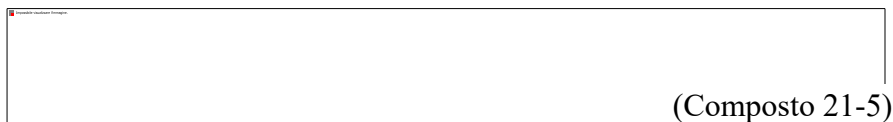
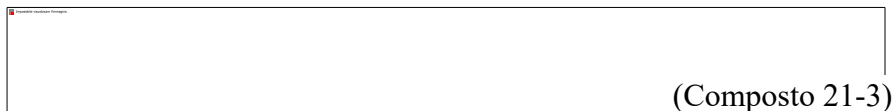
e/o R_{2d} sono alchile C₁.

[0283] In alcuni esempi, R_{3d} e/o R_{4d} sono selezionati da alchenile C₂₋₂₀. In determinati esempi, R_{3d} e/o R_{4d} sono gruppi alchenile comprendenti 17, 18 o 19 atomi di carbonio. Ad esempio, R_{3d} e/o R_{4d} possono essere gruppi alchenile C₁₈ (ad esempio linoleile).

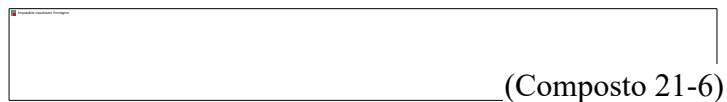
5 [0284] In determinati esempi, il composto è selezionato dal gruppo costituito da:



10



15 e



[0285] Come utilizzato nel presente documento, il termine "alchile" o "gruppo alchile" indica un idrocarburo saturo lineare o ramificato che include uno o più atomi di carbonio (ad esempio, uno, due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, quattordici, quindici, sedici, diciassette, diciotto, diciannove, venti o più atomi di carbonio), che è

opzionalmente sostituito. Ad esempio, la notazione "alchile C₁₋₂₄" indica un idrocarburo saturo, lineare o ramificato, facoltativamente sostituito, comprendente 1-24 atomi di carbonio. Un gruppo alchile qui descritto si riferisce sia al gruppo alchile non sostituito sia a quello sostituito se non diversamente specificato.

5 [0286] Come utilizzato nella presente, il termine "alchenile" o "gruppo alchenile" indica un idrocarburo lineare o ramificato che include due o più atomi di carbonio (ad esempio due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, quattordici, quindici, sedici, diciassette, diciotto, diciannove, venti o più atomi di carbonio) e almeno un doppio legame, che è opzionalmente sostituito. La notazione "alchenile C₂₋₂₄" indica un idrocarburo lineare o
10 ramificato opzionalmente sostituito che include 2-24 atomi di carbonio e almeno un doppio legame carbonio-carbonio. Un gruppo alchenile può includere uno, due, tre, quattro o più doppi legami carbonio-carbonio. Ad esempio, l'alchenile C₁₈ può includere uno o più doppi legami. Un gruppo alchenile C₁₈ che include due doppi legami può essere un gruppo linoleile. Un gruppo alchenile qui descritto si riferisce sia a non sostituito sia a sostituito se non diversamente
15 specificato.

[0287] Come utilizzato nella presente, il termine "carbociclo" o "gruppo carbociclico" indica un sistema mono o multiciclico opzionalmente sostituito che include uno o più anelli degli atomi di carbonio. Gli anelli possono essere tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici o dodici membri. La notazione "carbociclo C₃₋₆" indica un carbociclo che include un singolo
20 anello avente 3-6 atomi di carbonio. I carbocicli possono includere uno o più doppi o tripli legami carbonio-carbonio e possono essere non aromatici o aromatici (ad esempio, gruppi cicloalchile o arile). Esempi di carbocicli includono gruppi ciclopropile, ciclopentile, cicloesile, fenile, naftile e 1,2-diidronaftile. I carbocicli qui descritti si riferiscono sia ai carbocicli non sostituiti sia a quelli sostituiti, salvo diversamente specificato. Il termine "cicloalchile" come
25 utilizzato nella presente indica un carbociclo non aromatico e può includere o non includere

qualsiasi doppio o triplo legame. Salvo diversamente specificato, i carbocicli descritti nella presente si riferiscono a gruppi di carbocicli sia non sostituiti che sostituiti, cioè a carbocicli opzionalmente sostituiti.

[0288] Come utilizzato nel presente documento, il termine "eterociclo" o "gruppo eterociclico" indica un sistema mono o multicyclico opzionalmente sostituito che include uno o più anelli, dove almeno un anello include almeno un eteroatomo. Gli eteroatomi possono essere, ad esempio, atomi di azoto, ossigeno o zolfo. Gli anelli possono essere tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici o dodici membri. Gli eterocicli possono includere uno o più doppi o tripli legami e possono essere non aromatici o aromatici. Esempi di eterocicli includono gruppi imidazolile, imidazolidinile, ossazolile, ossazolidinile, tiazolile, tiazolidinile, pirazolidinile, pirazolile, isossazolidinile, isossazolile, isotiazolidinile, isotiazolile, morfolinile, pirrolile, pirrolidinile, furile, tetraidrofurile, tiofenile, piriridinile, piperidinile, chinolile e isochinolile. Gli eterocicli possono essere facoltativamente sostituiti.

[0289] Come utilizzato nella presente, un "gruppo biodegradabile" è un gruppo che può facilitare un metabolismo più rapido di un lipide in un'entità di mammifero. Un gruppo biodegradabile può essere selezionato dal gruppo costituito da, tuttavia senza limitazione, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂-, un gruppo arile e un gruppo eteroarile. Come utilizzato nella presente, un "gruppo arile" è un gruppo carbociclico che include uno o più anelli aromatici. Esempi di gruppi arile includono gruppi fenile e naftile. Come utilizzato nella presente, un "gruppo eteroarile" è un gruppo eterociclico che include uno o più anelli aromatici. Esempi di gruppi eteroarile includono pirrolile, furile, tiofenile, imidazolile, ossazolile e tiazolile. I gruppi arile ed eteroarile possono essere opzionalmente sostituiti. Ad esempio, ogni M, M^b, M^c o M^d possono essere selezionati indipendentemente dal gruppo non limitante costituito da fenile, ossazolo e tiazolo.

Nelle formule sopra, ogni M, M^b, M^c o M^d può essere selezionato indipendentemente dall'elenco

dei gruppi biodegradabili sopra.

[0290] I gruppi alchile, alchenile e ciclile (ad esempio, carbociclile ed eterociclile) possono essere opzionalmente sostituiti se non diversamente specificato. I sostituenti facoltativi possono essere selezionati dal gruppo costituito da, ma non sono limitati a, un atomo di alogeno (ad esempio un gruppo cloruro, bromuro, fluoruro o ioduro), un acido carbossilico [ad esempio -C(O)OH], un alcol (ad esempio, un idrossile, -OH), un estere [ad esempio, -C(O)OR o -OC(O)R], un'aldeide [ad esempio, -C(O)H], un carbonile [ad esempio, -C(O)R, in alternativa rappresentato da C=O], un alogenuro acilico [ad es. -C(O)X, in cui X è un alogenuro selezionato tra bromuro, fluoruro, cloruro e ioduro], un carbonato [ad es. -OC(O)OR], un alcossi (ad es. -OR), un acetale [ad es. -C(OR)₂R^{'''}, in cui ogni OR sono gruppi alcossile che possono essere uguali o diversi e R^{'''} è un gruppo alchilico o alchenile], un fosfato (ad es. P(O)₄³⁻), un tiolo (ad es. -SH), un solfossido (ad es. -S(O)R), un acido solfinico [ad es. -S(O)OH], un acido solfonico [ad es. -S(O)₂OH], un tiale [ad es. -C(S)H], un solfato (ad es. S(O)₄²⁻), un sulfonile (ad es. -S(O)₂-), un'ammidio (es. -C(O)NR₂, o -N(R)C(O)R), un azido (ad es. -N₃), un nitro (ad es. -NO₂), un ciano (ad es. -CN), un isociano (ad es. -NC), un acilossi (es., -OC(O)R), un ammino (ad es. -NR₂, -NRH o -NH₂), un carbamoile [ad es. -OC(O)NR₂, -OC(O)NRH o -OC(O)NH₂], una sulfonammide [ad esempio, -S(O)₂NR₂, -S(O)₂NRH, -S(O)₂NH₂, -N(R)S(O)₂R, -N(H)S(O)₂R, -N(R)S(O)₂H, o -N(H)S(O)₂H], un gruppo ciclile (ad es. carbociclile o eterociclile), un gruppo alchile, e un gruppo alchenile. In uno qualsiasi dei precedenti, R è un gruppo alchile o alchenile, come definito nella presente. In alcune forme di realizzazione, i gruppi sostituenti stessi possono essere ulteriormente sostituiti con, ad esempio, uno, due, tre, quattro, cinque o sei sostituenti come definito nella presente. Ad esempio, un gruppo alchile C₅₋₂₀ può essere ulteriormente sostituito con uno, due, tre, quattro, cinque o sei sostituenti come descritto nel presente contesto.

[0291] Una porzione amminica di un lipide secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1) possono essere protonati a pH

fisiologico. Pertanto, un lipide può avere una carica positiva o parziale positiva a pH fisiologico. Tali lipidi possono essere indicati come (ammino)lipidi cationici o ionizzabili. I lipidi possono essere anfionici, cioè molecole neutre aventi sia una carica positiva che una negativa.

Composizioni di nanoparticelle

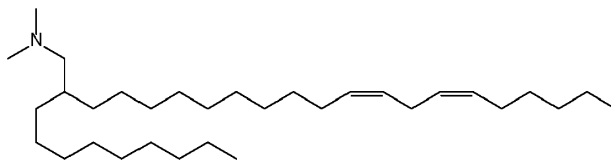
5 [0292] La descrizione presenta anche composizioni di nanoparticelle comprendenti un componente lipidico comprendente un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1) come descritto nel presente contesto. In alcune forme di realizzazione, la massima dimensione di una composizione di nanoparticelle è 1 µm o inferiore (ad esempio, 1 µm, 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500
10 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm o inferiore), ad esempio quando misurata mediante diffusione dinamica della luce (DLS), microscopia elettronica a trasmissione, microscopia elettronica a scansione o un altro metodo. Le composizioni di nanoparticelle includono, ad esempio, nanoparticelle lipidiche (LNP), liposomi, vescicole lipidiche e lipoplessi. In alcune forme di realizzazione, le composizioni di
15 nanoparticelle sono vescicole che includono uno o più doppi strati lipidici. In determinate forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle include due o più doppi strati concentrici separati da compartimenti acquosi. I doppi strati lipidici possono essere funzionalizzati e/o reticolati tra loro. I doppi strati lipidici possono includere uno o più ligandi, proteine o canali.

[0293] Le composizioni di nanoparticelle comprendono un componente lipidico che include
20 almeno un lipide, come un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), come descritto nel presente contesto. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle può includere un componente lipidico che include uno dei Composti da 1 a 88, Composti da 17-1 a 17-13, Composti da 19-1 a 19-6, Composti da 20-1 a 20-25 e Composti da 21-1 a 21-6. Le
25 composizioni di nanoparticelle possono anche includere una varietà di altri componenti. Ad

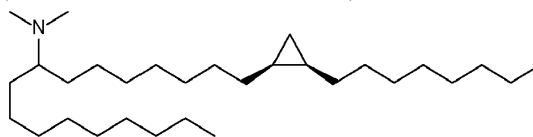
esempio, il componente lipidico di una composizione di nanoparticelle può includere uno o più altri lipidi oltre a un lipide secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1).

Lipidi cationici/ionizzabili

- 5 [0294] Una composizione di nanoparticelle può includere uno o più lipidi cationici e/o ionizzabili (ad es. lipidi che possono avere una carica positiva o parziale positiva a pH fisiologico) oltre a un lipide secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1). Lipidi cationici e/o ionizzabili possono essere selezionati dal gruppo costituito da 3-(didodecilammino)-N1,N1,4-tridodecil-1-
- 10 piperazinetanammina (KL10), N1-[2-(didodecilammino)etil]-N1,N4,N4-tridodecil-1,4-piperazindietanammina (KL22), 14,25-ditridecil-15,18,21,24-tetraaza-ottatriacontano (KL25), 1,2-dilinoleilossi-N,N-dimetilamminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilamminometil-[1,3]-diossolano (DLin-K-DMA), eptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilammino) butanoato (DLin-MC3-DMA), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilamminoetil)-[1,3]-
- 15 diossolano (DLin-KC2-DMA), 1,2-dioleilossi-N,N-dimetilamminopropano (DODMA), 2-({8-[(3β)-colest-5-en-3-ilossi]ottil}ossi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-ottadeca-9, 12-dien-1-ilossi]propan-1-ammina (ottil-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3β)-colest-5-en-3-ilossi]ottil}ossi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-ottadeca-9,12-die n-1-ilossi]propan-1-ammina (Ottill-CLinDMA (2R)),
- 20 1-ilossi]propan-1-ammina (Ottill-CLinDMA (2S)),



[vale a dire (12Z, 15Z)-N,N-dimetil-2-nonilenicoso-12,15-dien-1-ammina e



(vale a dire, N,N-dimetil-1-{(1S,2R)-2-ottilciclopropil}eptadecan-8-ammina.

[0295] Oltre a questi, un lipide cationico può anche essere un lipide che include un gruppo ammina ciclico. Ulteriori lipidi cationici e/o ionizzabili che sono adatti per le formulazioni e i metodi qui descritti includono quelli descritti in WO2015199952, WO2016176330 e
5 WO2015011633.

Lipidi PEG

[0296] Il componente lipidico di una composizione di nanoparticelle può includere uno o più lipidi PEG o modificati con PEG. Tali specie possono essere denominate in alternativa lipidi PEGilati. Un lipide PEG è un lipide modificato con polietilenglicole. Un lipide PEG può essere
10 selezionato dal gruppo non limitativo costituito da fosfatidiletanolammine modificate con PEG, acidi fosfatidici modificati con PEG, ceramidi modificate con PEG, dialchilammine modificate con PEG, diacilgliceroli modificati con PEG, dialchilgliceroli modificati con PEG e loro miscele. Ad esempio, un lipide PEG può essere PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o un lipide PEG-DSPE.

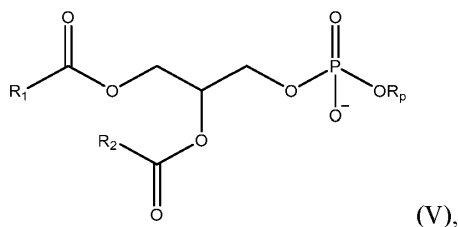
Lipidi strutturali

[0297] Il componente lipidico di una composizione di nanoparticelle può includere uno o più lipidi strutturali. I lipidi strutturali possono essere selezionati dal gruppo costituito da, tuttavia senza limitazione, colesterolo, fecosterolo, sitosterolo, ergosterolo, campesterolo, stigmasterolo, brassicasterolo, tomatidina, tomatina, acido ursolico, alfa-tocoferolo e loro miscele. In
20 determinate forme di realizzazione, il lipide strutturale è colesterolo. In alcune forme di realizzazione, il lipide strutturale include colesterolo e un corticosteroide (come prednisolone, desametasone, prednisone e idrocortisone) o una loro combinazione.

Fosfolipidi

[0298] Il componente lipidico di una composizione di nanoparticelle può includere uno o più
25 fosfolipidi, come uno o più lipidi (poli)insaturi. I fosfolipidi possono assemblarsi in uno o più

doppi strati lipidici. In generale, i fosfolipidi possono includere una frazione fosfolipidica e una o più frazioni di acidi grassi. Ad esempio, un fosfolipide può essere un lipide secondo la formula (V)



5 in cui R_p rappresenta una porzione fosfolipidica e R_1 e R_2 rappresentano porzioni di acidi grassi con o senza insaturazione che possono essere uguali o differenti. Una frazione fosfolipidica può essere selezionata dal gruppo non limitativo costituito da fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerolo, fosfatidilserina, acido fosfatidico, 2-lisofosfatidilcolina e una sfingomieline. Una frazione di acido grasso può essere selezionata dal

10 gruppo non limitativo costituito da acido laurico, acido miristico, acido miristoleico, acido palmitico, acido palmitoleico, acido stearico, acido oleico, acido linoleico, acido alfa-linolenico, acido erucico, acido arachidico, acido arachidonico, acido fitanico, acido eicosapentaenoico, acido beenico, acido docosapentaenoico e acido docosaesaenoico. Sono contemplate anche specie non naturali incluse le specie naturali con modifiche e sostituzioni inclusi ramificazione,

15 ossidazione, ciclizzazione e alchini. Ad esempio, un fosfolipide può essere funzionalizzato o reticolato a uno o più alchini (ad esempio, un gruppo alchenile in cui uno o più doppi legami sono sostituiti con un triplo legame). In condizioni di reazione appropriate, un gruppo alchino può subire una cicloadizione catalizzata da rame in seguito all'esposizione a un azoturo. Tali reazioni possono essere utili nella funzionalizzazione di un doppio strato lipidico di una

20 composizione di nanoparticelle per facilitare la permeazione della membrana o il riconoscimento cellulare o nel coniugare una composizione di nanoparticelle a un componente utile come una frazione di targeting o di imaging (ad esempio, un colorante).

[0299] I fosfolipidi utili nelle composizioni e nei metodi descritti nel presente contesto possono

essere selezionati dal gruppo non limitativo costituito da 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-dilinoleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diundecanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-di-Ottadecenil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diether PC), 1-oleoil-2-colesterolemisuccinoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (OChemPC), 1-esadecil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (C16 Lyso PC), 1,2-dilinolenoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-diarachidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-didocosaesaenoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16.0 PE), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinolenoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diarachidonoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosaesaenoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, sale di sodio 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerolo) (DOPG) e sfingomielina.

15 **[0300]** In determinate forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle include DSPC. In determinate forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle include DOPE. In alcune forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle include sia DSPC sia DOPE.

Adiuvanti

20 **[0301]** In alcune forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle che include uno o più lipidi descritti nella presente può includere inoltre uno o più adiuvanti, ad esempio, adiuvante lipidico glucopiranosile (Glucopyranosyl Lipid Adjuvant, GLA), oligodeossinucleotidi CpG (ad esempio, Classe A o B), poli(I:C), idrossido di alluminio e Pam3CSK4.

25 ***Agenti terapeutici***

[0302] Le composizioni di nanoparticelle possono includere una o più agenti terapeutici e/o profilattici. La descrizione presenta metodi per rilasciare un agente terapeutico e/o profilattico in una cellula o organo di mammifero, produrre un polipeptide di interesse in una cellula di mammifero e trattare una malattia o un disturbo in un mammifero che ne ha bisogno
5 comprendenti la somministrazione a un mammifero e/o la messa a contatto di una cellula di mammifero con una composizione di nanoparticelle che include un agente terapeutico e/o profilattico.

[0303] Gli agenti terapeutici e/o profilattici includono sostanze biologicamente attive e sono
10 alternativamente indicate come "agenti attivi". Un agente terapeutico e/o profilattico può essere una sostanza che, una volta rilasciata in una cellula o in un organo, determina un cambiamento desiderabile nella cellula, nell'organo o in un altro tessuto o apparato del corpo. Tali specie possono essere utili nel trattamento di una o più malattie, disturbi o condizioni. In alcune forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è un farmaco a piccole molecole utile nel
15 composizioni di nanoparticelle descritte nel presente contesto includono, ma non sono limitati a, agenti antineoplastici (ad esempio, vincristina, doxorubicina, mitoxantrone, camptotecina, cisplatino, bleomicina, ciclofosfamide, metotrexato e streptozotocina), agenti antitumorali (ad esempio actinomicina D, vincristina, vinblastina, citosina arabinoside, antracicline, agenti alchilanti, composti del platino, antimetaboliti e analoghi nucleosidici, come metotrexato e
20 analoghi di purina e pirimidina), agenti antinfettivi, anestetici locali (ad esempio dibucaina e clorpromazina), beta-bloccanti adrenergici (ad esempio propranololo, timololo e labetalolo), agenti antipertensivi (ad esempio clonidina e idralazina), antidepressivi (ad esempio imipramina, amitriptilina e doxepina), anti-convulsivanti (ad esempio fenitoina), antistaminici (ad esempio difenidramina, clorfeniramina, e prometazina), agenti antibiotici/antibatterici (ad
25 esempio gentamicina, ciprofloxacina e cefoxitina), agenti antimicotici (ad esempio miconazolo,

terconazolo, econazolo, isoconazolo, butaconazolo, clotrimazolo, itraconazolo, nistatina, naftifina e amfotericina B), agenti antiparassitari, ormoni, antagonisti ormonali, immunomodulatori, antagonisti dei neurotrasmettitori, agenti antiglaucoma, vitamine, narcotici e agenti di imaging.

- 5 [0304] In alcune forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è una citotossina, uno ione radioattivo, un chemioterapico, un vaccino, un composto che provoca una risposta immunitaria e/o un altro agente terapeutico e/o profilattico. Una citotossina o un agente citotossico include qualsiasi agente che è dannoso per le cellule. Esempi includono, ma tuttavia senza limitazioni, taxolo, citocalasina B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, mitomicina, 10 etoposide, teniposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidrossiantracinedione, mitoxantrone, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, puromicina, maytansinoidi, ad esempio maytansinolo, rachelmicina (CC-1065) e loro analoghi o omologhi. Gli ioni radioattivi 15 includono, ma non sono limitati a iodio (ad esempio, iodio 125 o iodio 131), stronzio 89, fosforo, palladio, cesio, iridio, fosfato, cobalto, ittrio 90, samario 153 e praseodimio. I vaccini includono composti e preparati in grado di fornire immunità contro una o più condizioni correlate a malattie infettive quali influenza, morbillo, papillomavirus umano (HPV), rabbia, meningite, pertosse, tetano, peste, epatite e tubercolosi e possono includere mRNA codificanti per antigeni e/o epitopi derivati da malattie infettive. I vaccini includono anche composti e 20 preparati che dirigono una risposta immunitaria contro le cellule cancerose e possono includere mRNA che codificano antigeni, epitopi e/o neoepitopi derivati da cellule tumorali. I composti che provocano risposte immunitarie possono includere vaccini, corticosteroidi (ad esempio desametasone) e altre specie. In alcune forme di realizzazione, un vaccino e/o un composto in grado di suscitare una risposta immunitaria viene somministrato per via intramuscolare 25 attraverso una composizione che include un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-

(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-II), (20-I) e (21-1). Altri agenti terapeutici e/o profilattici includono, tuttavia senza limitazioni, antimetaboliti (ad esempio metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agenti alchilanti [ad esempio mecloretammina, tiotepa clorambucile, rachelmicina (CC-1065),
5 melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamide, busulfan, dibromomannitolo, streptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiammina platino (II) (DDP), cisplatino], antracicline [ad esempio, daunorubicina (prima daunomicina) e doxorubicina], antibiotici [ad esempio, dactinomicina (prima actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)] e agenti anti-mitotici (ad esempio, vincristina, vinblastina, taxolo e
10 maytansinoidi).

[0305] In altre forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è una proteina. Le proteine terapeutiche utili nelle nanoparticelle nella descrizione includono, tuttavia senza limitazioni, gentamicina, ampicacina, insulina, eritropoietina (EPO), fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF),
15 Fattore VIR, analoghi dell'ormone di rilascio dell'ormone luteinizzante (LHRH), interferoni, eparina, antigene di superficie dell'epatite B, vaccino contro il tifo e vaccino contro il colera.

Polinucleotidi e acidi nucleici

[0306] In alcune forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è un polinucleotide o un acido nucleico (ad esempio, acido ribonucleico o acido
20 desossiribonucleico). Il termine "polinucleotide", nella sua accezione più, include qualsiasi composto e/o sostanza che è o può essere incorporato in una catena oligonucleotidica. Polinucleotidi esemplificativi per l'uso secondo la presente descrizione includono, ma non sono limitati a, uno o più acido desossiribonucleico (DNA), acido ribonucleico (RNA) incluso mRNA messaggero (mRNA), suoi ibridi, agenti che inducono RNAi, agenti RNAi, siRNA,
25 shRNA, miRNA, RNA antisenso, ribozimi, DNA catalitico, RNA che inducono la formazione

di tripla elica, aptameri, vettori, ecc. In determinate forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è un RNA. RNA utili nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente possono essere selezionati dal gruppo costituito da, tuttavia senza limitazioni, shortmer, antagomeri, antisenso, ribozimi, RNA interferente breve (siRNA), RNA interferente
5 asimmetrico (aiRNA), microRNA (miRNA), RNA substrato di Dicer (dsRNA), RNA a forcina breve (shRNA), RNA di trasferimento (tRNA), RNA messaggero (mRNA) e loro miscele. In determinate forme di realizzazione, l'RNA è un mRNA.

[0307] In determinate forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è un mRNA. Un mRNA può codificare qualsiasi polipeptide di interesse, incluso qualsiasi polipeptide
10 presente in natura o non naturale o altrimenti modificato. Un polipeptide codificato da un mRNA può essere di qualsiasi dimensione e può avere qualsiasi struttura o attività secondaria. In alcune forme di realizzazione, un polipeptide codificato da un mRNA può avere un effetto terapeutico quando espresso in una cellula.

[0308] In altre forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è un siRNA. Un
15 siRNA può essere in grado di eliminare o ridurre selettivamente l'espressione di regolazione di un gene di interesse. Ad esempio, un siRNA potrebbe essere selezionato per silenziare un gene associato a una particolare malattia, disturbo o condizione dopo la somministrazione di una composizione di nanoparticelle che include il siRNA a un soggetto che ne ha bisogno. Un siRNA può comprendere una sequenza complementare a una sequenza di mRNA che codifica
20 un gene o una proteina di interesse. In alcune forme di realizzazione, il siRNA può essere un siRNA immunomodulatore.

[0309] In alcune forme di realizzazione, un agente terapeutico e/o profilattico è un shRNA o un vettore o un plasmide che codifica per lo stesso. Un shRNA può essere prodotto all'interno di una cellula bersaglio a seguito del rilascio di un costrutto appropriato nel nucleo. Costrutti e
25 meccanismi correlati al shRNA sono ben noti nelle tecniche pertinenti.

[0310] Gli acidi nucleici e i polinucleotidi utili o adatti per i composti e i metodi della descrizione includono tipicamente una prima regione di nucleosidi collegati che codificano un polipeptide di interesse (ad esempio, una regione codificante), una prima regione fiancheggiante situata al terminale 5' della prima regione (ad esempio, una 5'-UTR), una seconda regione fiancheggiante situata al 3'-terminale della prima regione (ad esempio, una 3'-UTR), almeno una regione 5'-cap e una regione stabilizzante in 3'. In alcune forme di realizzazione, un acido nucleico o un polinucleotide include inoltre una regione poli-A o una sequenza di Kozak (ad esempio, in corrispondenza della 5'-UTR). In alcuni casi, i polinucleotidi possono contenere una o più sequenze nucleotidiche introniche che possono essere escisse dal polinucleotide. In alcune forme di realizzazione, un polinucleotide o un acido nucleico (ad esempio, un mRNA) può includere una struttura di cappuccio in 5', un nucleotide terminante la catena, uno stem-loop, una sequenza di poli-A e/o un segnale di poliadenilazione. Una qualsiasi delle regioni di un acido nucleico può includere uno o più componenti alternativi (ad esempio, un nucleoside alternativo). Ad esempio, la regione stabilizzante in 3' può contenere un nucleoside alternativo come un L-nucleoside, una timidina invertita o un nucleoside 2'-O-metile e/o la regione codificante, 5'-UTR, 3'-UTR, o la regione cap può includere un nucleoside alternativo come un'uridina 5-sostituita (ad esempio, 5-metossiuridina), una pseudouridina 1-sostituita (ad esempio, 1-metil-pseudouridina o 1-etil-pseudouridina) e/o una citidina 5-sostituita (ad esempio 5-metil-citidina).

[0311] In generale, la lunghezza più breve di un polinucleotide può essere la lunghezza della sequenza polinucleotidica sufficiente per codificare per un dipeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un tripeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un tetrapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un pentapeptide. In un'altra

forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un esapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un eptapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un
5 ottapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un nonapeptide. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della sequenza polinucleotidica è sufficiente per codificare per un decapeptide.

[0312] Esempi di dipeptidi per i quali le sequenze polinucleotidiche alternative possono codificare includono, ma non sono limitati a, carnosina e anserina.

10 **[0313]** In alcuni casi, un polinucleotide ha una lunghezza superiore a 30 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la molecola del polinucleotide ha una lunghezza superiore a 35 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 40 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 45 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 55 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la
15 lunghezza è di almeno 50 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 60 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 80 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 90 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 100 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 120 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di
20 almeno 140 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 160 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 180 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 200 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 250 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 300 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di
25 almeno 350 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 400

nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 450 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 600 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 700 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 800 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 900 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1100 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1200 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1300 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1400 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1600 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1800 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 2000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 2500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 3000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 4000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 5000 nucleotidi, o maggiore di 5000 nucleotidi.

[0314] Gli acidi nucleici e i polinucleotidi possono includere uno o più componenti presenti in natura, incluso uno qualsiasi dei nucleotidi canonici A (adenosina), G (guanosina), C (citosina), U (uridina) o T (timidina). In una forma di realizzazione, tutti o sostanzialmente tutti i nucleotidi comprendenti (a) la 5'-UTR, (b) la cornice di lettura aperta (ORF), (c) la 3'-UTR, (d) la coda di poli A e qualsiasi combinazione di (a, b, c o d sopra) comprendono nucleotidi canonici presenti in natura A (adenosina), G (guanosina), C (citosina), U (uridina) o T (timidina).

[0315] Gli acidi nucleici e i polinucleotidi possono includere uno o più componenti alternativi,

come descritto nella presente, che conferiscono proprietà utili tra cui una maggiore stabilità e/o la mancanza di una sostanziale induzione della risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto il polinucleotide. Ad esempio, un polinucleotide o un acido nucleico alternativo mostra una degradazione ridotta in una cellula in cui viene introdotto il polinucleotide o l'acido nucleico, rispetto a un corrispondente polinucleotide o acido nucleico inalterato. Queste specie alternative possono aumentare l'efficienza della produzione di proteine, la ritenzione intracellulare dei polinucleotidi e/o la vitalità delle cellule a contatto, oltre a possedere una ridotta immunogenicità.

[0316] I polinucleotidi e gli acidi nucleici possono essere presenti o non presenti in natura. I polinucleotidi e gli acidi nucleici possono includere una/uno o più basi azotate, nucleosidi, nucleotidi o loro combinazioni modificati (ad esempio alterati o alternativi). Gli acidi nucleici e i polinucleotidi utili nelle composizioni di nanoparticelle descritte nel presente contesto possono includere qualsiasi modificazione o alterazione utile, come alla base azotata, allo zucchero o al legame internucleosidico (ad esempio, a un legame fosfato/a un legame fosfodiesterico/alla catena principale di fosfodiesterico). In alcune forme di realizzazione, sono presenti alterazioni (ad esempio una o più alterazioni) in ciascuna tra la base azotata, lo zucchero e il legame internucleosidico. Le alterazioni secondo la presente descrizione possono essere alterazioni degli acidi ribonucleici (RNA) in acidi desossiribonucleici (DNA), ad esempio la sostituzione del 2'-OH dell'anello ribofuranosile con 2'-H, acidi nucleici di treosio (TNA), acidi nucleici di glicole (GNA), acidi nucleici peptidici (PNA), acidi nucleici bloccati (LNA) o loro ibridi. Ulteriori modifiche sono descritte qui.

[0317] I polinucleotidi e gli acidi nucleici possono essere o non essere alterati uniformemente lungo l'intera lunghezza della molecola. Ad esempio, uno o più o tutti i tipi di nucleotide (ad esempio, purina o pirimidina, o uno o più o tutti tra A, G, U, C) possono essere o non essere alterati uniformemente in un polinucleotide o acido nucleico, o in una sua data regione di

sequenza predeterminata. In alcuni casi, tutti i nucleotidi X in un polinucleotide (o in una sua data regione di sequenza) sono alterati, in cui X può essere uno qualsiasi dei nucleotidi A, G, U, C, o una qualsiasi delle combinazioni A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C o A+G+C.

5 **[0318]** In varie posizioni in un polinucleotide possono esistere diverse alterazioni dello zucchero e/o legami internucleosidici (ad esempio, strutture della catena principale). Un esperto della tecnica con competenza ordinaria comprenderà che gli analoghi nucleotidici o altra/e alterazione/i possono trovarsi in corrispondenza di qualsiasi posizione/i di un polinucleotide in modo tale che la funzione del polinucleotide non sia sostanzialmente ridotta. Un'alterazione può
10 anche essere un'alterazione del terminale 5' o 3'. In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide include un'alterazione in corrispondenza del terminale 3'. Il polinucleotide può contenere da circa l'1% a circa il 100% di nucleotidi alternativi (o in relazione al contenuto complessivo di nucleotidi, o in relazione a uno o più tipi di nucleotidi, vale a dire uno o più tra A, G, U o C) o qualsiasi percentuale intervenuta (ad es. dall'1% al 20%, dall'1% al 25%,
15 dall'1% al 50%, dall'1% al 60%, dall'1% al 70%, dall'1% al 80%, dall'1% al 90%, dall'1% al 95%, dal 10% al 20%, dal 10% al 25%, dal 10% al 50%, dal 10% al 60%, dal 10% al 70%, dal 10% al 80%, dal 10% al 90%, dal 10% al 95%, dal 10% al 100%, dal 20% al 25%, dal 20% al 50%, dal 20% al 60%, dal 20% al 70%, dal 20% al 80%, dal 20% al 90%, dal 20% al 95%, dal 20% al 100%, dal 50% al 60%, dal 50% al 70%, dal 50% all'80%, dal 50% al 90%, dal 50% al
20 95%, dal 50% al 100%, dal 70% al 80%, dal 70% al 90%, dal 70% al 95%, dal 70% al 100%, dall'80% al 90%, dall'80% al 95%, dall'80% al 100%, dal 90% al 95%, dal 90% al 100% e dal 95% al 100%. Si comprenderà che si tiene conto di qualsiasi percentuale rimanente con la presenza di un nucleotide canonico (ad esempio, A, G, U o C).

[0319] I polinucleotidi possono contenere un minimo dello zero e un massimo del 100% di
25 nucleotidi alternativi, o qualsiasi percentuale intermedia, come almeno il 5% di nucleotidi

- alternativi, almeno il 10% di nucleotidi alternativi, almeno il 25% di nucleotidi alternativi, almeno il 50% nucleotidi alternativi, almeno l'80% di nucleotidi alternativi o almeno il 90% di nucleotidi alternativi. Ad esempio, i polinucleotidi possono contenere una pirimidina alternativa come un uracile o una citosina alternativi. In alcune forme di realizzazione, almeno il 5%,
5 almeno il 10%, almeno il 25%, almeno il 50%, almeno l'80%, almeno il 90% o il 100% dell'uracile in un polinucleotide viene sostituito con un uracile alternativo (ad esempio, un uracile 5-sostituito). L'uracile alternativo può essere sostituito da un composto avente un'unica struttura unica, oppure può essere sostituito da una pluralità di composti aventi strutture diverse (ad esempio, 2, 3, 4 o più strutture uniche). In alcuni casi, almeno il 5%, almeno il 10%, almeno
10 il 25%, almeno il 50%, almeno l'80%, almeno il 90% o il 100% della citosina nel polinucleotide viene sostituito con una citosina alternativa (ad esempio, una citosina 5-sostituita). La citosina alternativa può essere sostituita da un composto avente un'unica struttura unica, oppure può essere sostituita da una pluralità di composti aventi strutture diverse (ad esempio, 2, 3, 4 o più strutture uniche).
- 15 **[0320]** In alcuni casi, gli acidi nucleici non inducono sostanzialmente una risposta immunitaria innata di una cellula in cui viene introdotto il polinucleotide (ad esempio, mRNA). Le caratteristiche di una risposta immunitaria innata indotta includono 1) aumento dell'espressione di citochine proinfiammatorie, 2) attivazione di PRR intracellulari (RIG-I, MDA5, ecc. e/o 3) terminazione o riduzione della traduzione proteica.
- 20 **[0321]** Gli acidi nucleici possono includere facoltativamente altri agenti (ad esempio, agenti che inducono RNAi, agenti RNAi, siRNA, shRNA, miRNA, RNA antisenso, ribozimi, DNA catalitico, tRNA, RNA che inducono la formazione della tripla elica, aptameri e vettori). In alcune forme di realizzazione, gli acidi nucleici possono includere uno o più RNA messengeri (mRNA) aventi uno o più nucleosidi o nucleotidi alternativi (cioè molecole di mRNA
25 alternative).

[0322] In alcune forme di realizzazione, una molecola di acido nucleico (ad es. mRNA), formula, composizione o metodo a esso associata/o comprende uno o più polinucleotidi comprendenti caratteristiche come descritto in WO2002/098443, WO2003/051401, WO2008/052770, WO2009127230, WO2006122828, WO2008/083949, WO2010088927, 5 WO2010/037539, WO2004/004743, WO2005/016376, WO2006/024518, WO2007/095976, WO2008/014979, WO2008/077592, WO2009/030481, WO2009/095226, WO2011069586, WO2011026641, WO2011/144358, WO2012019780, WO2012013326, WO2012089338, WO2012113513, WO2012116811, WO2012116810, WO2013113502, WO2013113501, WO2013113736, WO2013143698, WO2013143699, WO2013143700, WO2013/120626, 10 WO2013120627, WO2013120628, WO2013120629, WO2013174409, WO2014127917, WO2015/024669, WO2015/024668, WO2015/024667, WO2015/024665, WO2015/024666, WO2015/024664, WO2015101415, WO2015101414, WO2015024667, WO2015062738, WO2015101416.

Alternative nucleobasiche

15 [0323] I nucleosidi e i nucleotidi alternativi possono includere una base azotata alternativa. Una base azotata di un acido nucleico è una base organica come una purina o pirimidina o un suo derivato. Una base azotata può essere una base canonica (ad esempio adenina, guanina, uracile, timina e citosina). Queste basi azotate possono essere alterate o completamente sostituite per fornire molecole polinucleotidiche aventi proprietà potenziate, ad esempio una maggiore 20 stabilità come la resistenza alle nucleasi. Basi non canoniche o modificate possono includere, ad esempio, una o più sostituzioni o modificazioni incluse, tuttavia senza limitazione, sostituzioni di alchile, arile, alogeno, osso, ossidrilico, alchilossi e/o tio; uno o più anelli fusi o aperti; ossidazione e/o riduzione.

[0324] L'accoppiamento di basi nucleotidiche alternative comprende non solo le coppie di basi 25 standard di adenina-timina, adenina-uracile o guanina-citosina, ma anche coppie di basi formate

tra nucleotidi e/o nucleotidi alternativi, comprese basi non standard o alternative, in cui la disposizione di donatori di legami idrogeno e accettori di legami idrogeno consente il legame idrogeno tra una base non standard e una base standard o tra due strutture di base non standard complementari. Un esempio di tale accoppiamento di basi non standard è l'accoppiamento di basi tra il nucleotide alternativo inosina e l'adenina, la citosina o l'uracile.

[0325] In alcune forme di realizzazione, la base azotata è un uracile alternativo. Esempi di nucleobasi e nucleosidi aventi un uracile alternativo includono pseudouridina (ψ), piridin-4-one ribonucleoside, 5-aza-uracile, 6-aza-uracile, 2-tio-5-aza-uracile, 2-tio-uracile (s^2U), 4-tio-uracile (s^4U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-idrossi-uracile (ho^5U), 5-aminoallil-uracile, 5-alo-uracile (ad es., 5-iodo-uracile o 5-bromo-uracile), 3-metil-uracile (m^3U), 5-metossi-uracile (mo^5U), uracile acido 5-ossiacetico (cmo^5U), uracile 5-estere metilico dell'acido ossiacetico ($mcmo^5U$), 5-carbossimetil-uracile (cm^5U), 1-carbossimetil-pseudouridina, 5-carbossiidrossimetil-uracile (chm^5U), 5-carbossiidrossimetil-uracile metil estere ($mchm^5U$), 5-metossicarbonilmetil-uracile (mcm^5U), 5-metossicarbonilmetil-2-tio-uracile (mcm^5s^2U), 5-amminometil-2-tio-uracile (nm^5s^2U), 5-metilamminometil-uracile (mnm^5U), 5-metilamminometil-2-tio-uracile (mnm^5s^2U), 5-metilamminometil-2-seleno-uracile (mnm^5se^2U), 5-carbamoilmetil-uracile (ncm^5U), 5-carbossimetilamminometil-uracile ($cmnm^5U$), 5-carbossimetilamminometil-2-tio-uracile ($cmnm^5s^2U$), 5-propinil-uracile, 1-propinil-pseudouracile, 5-taurinometil-uracile (τm^5U), 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uracile (τm^5s^2U), 1-taurinometil-4-tio-pseudouridina, 5-metil-uracile (m^5U , vale a dire avente la nucleobase deossitimina), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 1-etil-pseudouridina ($Et^1\psi$), 5-metil-2-tio-uracile (m^5s^2U), 1-metil-4-tio-pseudouridina ($m^1s^4\psi$), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina ($m^3\psi$), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, diidrouacile (D), diidropseudouridina, 5,6-diidrouacile, 5-metil-diidrouacile (m^5D), 2-tio-diidrouacile, 2-tio-diidropseudouridina, 2-metossi-uracile, 2-

metossi-4-tio-uracile, 4-metossi-pseudouridina, 4-metossi-2-tio-pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 3-(3-ammino-3-carbossipropil)uracile (acp^3U), 1-metil-3-(3-ammino-3-carbossipropil)pseudouridina ($acp^3\Psi$), 5-(isopentenilamminometil)uracile (inm^5U), 5-(isopentenilamminometil)-2-tio-uracile (inm^5s^2U), 5,2'-O-dimetil-uridina (m^5Um), 2-tio-2'-O-metil-uridina (s^2Um), 5-metossicarbonilmetil-2'-O-metil-uridina (mcm^5Um), 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-uridina (ncm^5Um), 5-carbossimetilamminometil-2'-O-metil-uridina ($cmnm^5Um$), 3,2'-O-dimetil-uridina (m^3Um) e 5-(isopentenilamminometil)-2'-O-metil-uridina (inm^5Um), 1-tio-uracile, deossitimidina, 5-(2-carbometossivinil)-uracile, 5-(carbamoilidrossimetil)-uracile, 5-carbamoilmetil-2-tio-uracile, 5-carbossimetil-2-tio-uracile, 5-cianometil-uracile, 5-metossi-2-tio-uracile e 5-[3-(1-E-propenilammino)]uracile.

[0326] In alcune forme di realizzazione, la base azotata è una citosina alternativa. Esempi di nucleobasi e nucleosidi aventi una citosina alternativa includono 5-aza-citosina, 6-aza-citosina, pseudoisocitidina, 3-metil-citosina ($m3C$), N4-acetil-citosina ($ac4C$), 5-formil-citosina ($f5C$), N4-metil-citosina ($m4C$), 5-metil-citosina ($m5C$), 5-alo-citosina (ad es., 5-iodo-citosina), 5-idrossimetil-citosina ($hm5C$), 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citosina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citosina ($s2C$), 2-tio-5-metil-citosina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metossi-citosina, 2-metossi-5-metil-citosina, 4-metossi-pseudoisocitidina, 4-metossi-1-metil-pseudoisocitidina, lisidina ($k2C$), 5,2'-O-dimetil-citidina ($m5Cm$), N4-acetil-2'-O-metil-citidina ($ac4Cm$), N4,2'-O-dimetil-citidina ($m4Cm$), 5-formil-2'-O-metil-citidina ($f5Cm$), N4,N4,2'-O-trimetilcitidina ($m42Cm$), 1-tio-citosina, 5-idrossi-citosina, 5-(3-azidopropil)-citosina e 5-(2-azidoetil)-citosina.

[0327] In alcune forme di realizzazione, la base azotata è un'adenina alternativa. Esempi di nucleobasi e nucleosidi aventi un'adenina alternativa includono 2-ammino-purina, 2,6-

diamminopurina, 2-ammino-6-alo-purina (ad es., 2-ammino-6-cloro-purina), 6-alo-purina (ad esempio, 6-cloro-purina), 2-ammino-6-metil-purina, 8-azido-adenina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-ammino-purina, 7-deaza-8-aza-2-ammino-purina, 7-deaza-2,6-diamminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diamminopurina, 1-metil-adenina (m1A), 2-metil-adenina (m2A), N6-metil-adenina (m6A), 2-metiltio-N6-metil-adenina (ms2m6A), N6-isopentenil-adenina (i6A), 2-metiltio-N6-isopentenil-adenina (ms2i6A), N6-(cis-idrossiisopentenil)adenina (io6A), 2-metiltio-N6-(cis-idrossiisopentenil)adenina (ms2io6A), N6-glicinilcarbamoil-adenina (g6A), N6-treonilcarbamoil-adenina (t6A), N6-metile -N6-treonilcarbamoil-adenina (m6t6A), 2-metiltio-N6-treonilcarbamoil-adenina (ms2g6A), N6,N6-dimetil-adenina (m62A), N6-idrossinorvalilcarbamoil-adenina (hn6A), 2-metiltio-N6-idrossinorvalilcarbamoil-adenina (ms2hn6A), N6-acetil-adenina (ac6A), 7-metil-adenina, 2-metiltio-adenina, 2-metossi-adenina, N6,2'-O-dimetil-adenosina (m6Am), N6,N6,2'-O-trimetil-adenosina (m62Am), 1,2'-O-dimetil-adenosina (m1Am), 2-ammino-N6-metil-purina, 1-tio-adenina, 8-azido-adenina, N6-(19-ammino-pentaossanonadecile)-adenina, 2,8-dimetil-adenina, N6-formil-adenina e N6-idrossimetil-adenina.

[0328] In alcune forme di realizzazione, la base azotata è una guanina alternativa. Esempi di nucleobasi e nucleosidi aventi una guanina alternativa includono inosina (I), 1-metil-inosina (m1I), viosina (imG), metilviosina (mimG), 4-demetil-viosina (imG-14), isoviosina (imG2), vibutosina (yW), perossivibutosina (o2yW), idrossivibutosina (OHyW), idrossivibutosina sottomodificata (OHyW*), 7-deaza-guanina, queuosina (Q), epossicheuosina (oQ), galattosil-cheuosina (galQ), mannosil-cheuosina (manQ), 7-ciano-7-deaza-guanina (preQ0), 7-amminometil-7-deaza-guanina (preQ1), archeosina (G+), 7-deaza-8-aza-guanina, 6-tio-guanina, 6-tio-7-deaza-guanina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanina, 7-metil-guanina (m7G), 6-tio-7-metil-guanina, 7-metil-inosina, 6-metossi -guanina, 1-metil-guanina (m1G), N2-metil-guanina (m2G), N2,N2-dimetil-guanina (m22G), N2,7-dimetil-guanina (m2,7G), N2, N2,7 -dimetil-guanina

(m2,2,7G), 8-osso-guanina, 7-metil-8-osso-guanina, 1-metil-6-tio-guanina, N2-metil-6-tio-guanina, N2, N2-dimetil-6-tio-guanina, N2-metil-2'-O-metil-guanosina (m2Gm), N2,N2-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m22Gm), 1-metil-2'-O-metil-guanosina (m1Gm), N2,7-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m2,7Gm), 2'-O-metil-inosina (Im), 1,2'-O-dimetil-inosina (m1Im), 1-tio-guanina e O-6-metil-guanina.

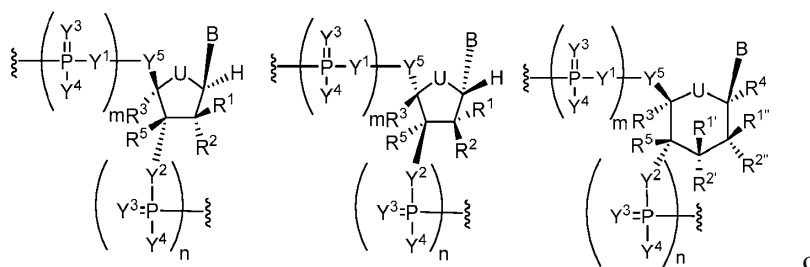
[0329] La nucleobase alternativa di un nucleotide può essere indipendentemente una purina, una pirimidina, o un analogo della purina o della pirimidina. Ad esempio, la base azotata può essere un'alternativa all'adenina, alla citosina, alla guanina, all'uracile o all'ipoxantina. In un'altra forma di realizzazione, la base azotata può anche includere, ad esempio, derivati naturali e sintetici di una base, tra cui pirazolo[3,4-d]pirimidine, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-idrossimetil citosina, xantina, ipoxantina, 2-amminoadenina, 6-metil e altri derivati alchilici di adenina e guanina, 2-propile e altri derivati alchilici di adenina e guanina, 2-tiouracile, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-propinil uracile e citosina, 6-azo uracile, citosina e timina, 5-uracile (pseudouracile), 4-tiouracile, 8-alogeno (ad esempio 8-bromo), 8-ammino, 8-tiolo, 8-tioalchile, 8-idrossile e altre adenine e guanine 8-sostituite, 5-alogeno in particolare 5-bromo, 5-trifluorometile e altri uracili e citosine 5-sostituiti, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, deazaguanina, 7-deazaguanina, 3-deazaguanina, deazaadenina, 7-deazaadenina, 3-deazaadenina, pirazolo[3,4-d]pirimidina, imidazo[1,5-a]1,3,5 triazinoni, 9-deazapurine, imidazo[4,5-d]pirazine, tiazolo[4,5-d]pirimidine, pirazin-2-oni, 1,2,4-triazina, piridazina o 1,3,5 triazina.

Quando i nucleotidi sono rappresentati usando l'abbreviazione A, G, C, T o U, ogni lettera si riferisce alla base rappresentativa e/o ai suoi derivati, ad esempio A include adenina o analoghi dell'adenina, ad esempio 7-deaza adenina).

Alterazioni sullo zucchero

[0330] I nucleosidi includono una molecola di zucchero (ad esempio, uno zucchero a 5 o 6 atomi di carbonio, come pentosio, ribosio, arabinosio, xilosio, glucosio, galattosio o un loro

deossiderivato) in combinazione con una base azotata, mentre i nucleotidi sono nucleosidi
 contenenti un nucleoside e un gruppo fosfato o un gruppo alternativo (ad esempio,
 boranofosfato, tiofosfato, selenofosfato, fosfonato, gruppo alchile, ammidato e glicerolo). Un
 nucleoside o nucleotide può essere una specie canonica, ad esempio, un nucleoside o nucleotide
 5 comprendente una base azotata canonica, zucchero e, nel caso dei nucleotidi, un gruppo fosfato,
 oppure può essere un nucleoside o nucleotide alternativo includente uno o più componenti
 alternativi. Ad esempio, nucleosidi e nucleotidi alternativi possono essere alterati sullo zucchero
 del nucleoside o del nucleotide. In alcune forme di realizzazione, i nucleosidi o nucleotidi
 alternativi includono la struttura:

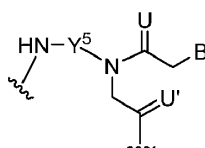


Formula VI

Formula VII

Formula VIII

10



Formula IX

[0331] In ciascuna delle formule VI, VII, VIII e IX,

15 ciascuno di m e n è indipendentemente un numero intero da 0 a 5;

ciascuno di U e U' indipendentemente è O, S, N(R^U)_{nu}, o C(R^U)_{nu}, in cui nu è un numero intero
 compreso da 0 a 2 e ciascun R^U è, indipendentemente, H, alogeno o alchile opzionalmente
 sostituito;

ciascuno di R¹, R², R^{1'}, R^{2'}, R^{1''}, R^{2''}, R³, R⁴ e R⁵ è, indipendentemente, se presente, H, alogeno,

idrossi, tiolo, alchile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchililossi opzionalmente sostituito, amminoalcossi opzionalmente sostituito, alcossialcossi opzionalmente sostituito, idrossialcossi opzionalmente sostituito, ammino opzionalmente sostituito, azido, arile opzionalmente sostituito, amminoalchile opzionalmente sostituito, amminoalchenile opzionalmente sostituito, amminoalchinile opzionalmente sostituito, o assente; in cui la combinazione di R^3 con uno o più di $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, o R^5 (ad esempio, la combinazione di $R^{1'}$ e R^3 , la combinazione di $R^{1''}$ e R^3 , la combinazione di $R^{2'}$ e R^3 , la combinazione di $R^{2''}$ e R^3 , o la combinazione di R^5 e R^3) può unirli a formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchenile opzionalmente sostituito e, presi insieme agli atomi di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio un eterociclile biciclicico, triciclico o tetraciclico); in cui la combinazione di R^5 con uno o più di $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$ o $R^{2''}$ (ad esempio, la combinazione di $R^{1'}$ e R^5 , la combinazione di $R^{1''}$ e R^5 , la combinazione di $R^{2'}$ e R^5 , o la combinazione di $R^{2''}$ e R^5) può unirli a formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, e, presi insieme con gli atomi di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio un eterociclile biciclicico, triciclico o tetraciclico); e in cui la combinazione di R^4 e uno o più di $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, R^3 o R^5 possono unirsi a formare alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito e, presi insieme all'atomo di carbonio a cui sono attaccati, forniscono un eterociclile opzionalmente sostituito (ad esempio un eterociclile biciclicico, triciclico o tetraciclico); ciascuno di m' e m'' è indipendentemente un numero intero da 0 a 3 (ad es. da 0 a 2, da 0 a 1, da 1 a 3, o da 1 a 2); ciascuno di Y^1 , Y^2 e Y^3 , è, indipendentemente, O, S, Se, $—NR^{N1}—$, alchilene opzionalmente sostituito o eteroalchilene opzionalmente sostituito, in cui R^{N1} è H, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, arile opzionalmente sostituito o assente;

ciascun Y^4 è, indipendentemente, H, idrossi, tiolo, boranile, alchile opzionalmente sostituito, alchenile opzionalmente sostituito, alchinile opzionalmente sostituito, alcossi opzionalmente sostituito, alchenilossi opzionalmente sostituito, alchinilossi opzionalmente sostituito, tioalcoosi opzionalmente sostituito, alcossialcoosi opzionalmente sostituito o ammino opzionalmente

5 sostituito;

ogni Y^5 è, indipendentemente, O, S, Se, alchilene opzionalmente sostituito (ad esempio metilene), o eteroalchilene opzionalmente sostituito; e

B è una base azotata, modificata o non modificata. In alcune forme di realizzazione, il gruppo 2'-idrossile (OH) può essere modificato o sostituito con un certo numero di sostituenti differenti.

10 Sostituzioni esemplificative nella posizione 2' includono, tuttavia senza limitazioni, H, azido, alogeno (ad esempio fluoro), alchile C_{1-6} facoltativamente sostituito (ad esempio metile); alcossi C_{1-6} facoltativamente sostituito (ad esempio metossi o etossi); arilossi C_{6-10} facoltativamente sostituito; cicloalchile C_{3-8} facoltativamente sostituito; arile C_{6-10} -alcossi C_{1-6} facoltativamente sostituito, (eterocicli)ossi C_{1-12} facoltativamente sostituito; uno zucchero (ad es. ribosio, 15 pentoso o qualsiasi altro descritto nel presente contesto); un polietilenglicole (PEG), - $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, dove R è H o alchile facoltativamente sostituito, e n è un numero intero da 0 a 20 (ad es. da 0 a 4, da 0 a 8, da 0 a 10, da 0 a 16, da 1 a 4, da 1 a 8, da 1 a 10, da 1 a 16, da 1 a 20, da 2 a 4, da 2 a 8, da 2 a 10, da 2 a 16, da 2 a 20, da 4 a 8, da 4 a 10, da 4 a 16, e da 4 a 20); acidi nucleici "bloccati" (LNA) in cui il 2'-idrossi è collegato da un ponte alchilene 20 C_{1-6} o eteroalchilene C_{1-6} al 4'-carbonio dello stesso zucchero ribosio, dove ponti esemplificativi includevano metilene, propilene, etere o ponti amminici; amminoalchile, come qui definito; amminoalcossi, come qui definito; ammino come qui definito; e amminoacido, come qui definito.

[0332] In generale, l'RNA include il gruppo zucchero ribosio, che è un anello a 5 elementi 25 avente un atomo di ossigeno. I nucleotidi modificati esemplificativi e non limitativi alternativi

includono la sostituzione dell'ossigeno nel ribosio (ad esempio, con S, Se o alchilene, come metilene o etilene); aggiunta di un doppio legame (ad esempio, per sostituire il ribosio con ciclopentenile o cicloesenile); contrazione dell'anello di ribosio (ad esempio, per formare un anello a 4 membri di ciclobutano o ossoetano); espansione dell'anello di ribosio (ad esempio, per formare un anello a 6 o 7 membri avente un carbonio o eteroatomo aggiuntivo, come per anidroestolo, altritolo, mannitolo, cicloesanile, cicloesenile e morfolino che hanno anche una catena principale di fosforamidato); forme multicicliche (ad esempio, triciclo; e forme "sbloccate", come l'acido glicole nucleico (GNA) (ad esempio, R-GNA o S-GNA, dove il ribosio è sostituito da unità di glicole attaccate a legami fosfodiesteri), acido treosio nucleico [TNA, dove il ribosio viene sostituito con α -L-treofuranosil-(3 \rightarrow 2')] e acido nucleico peptidico (PNA, dove i legami 2-ammino-etil-glicina sostituiscono la catena principale di ribosio e fosfodiesteri).

[0333] In alcune forme di realizzazione, il gruppo dello zucchero contiene uno o più atomi di carbonio che possiedono la configurazione stereochimica opposta del corrispondente atomo di carbonio nel ribosio. Pertanto, una molecola polinucleotidica può includere nucleotidi contenenti, ad esempio, arabinosio o L-ribosio, come zucchero.

[0334] In alcune forme di realizzazione, il polinucleotide include almeno un nucleoside in cui lo zucchero è L-ribosio, 2'-O-metil-ribosio, 2'-fluoro-ribosio, arabinosio, esitolo, un LNA o un PNA.

20 *Alterazioni sul legame internucleosidico*

[0335] I nucleotidi alternativi possono essere alterati sul legame internucleosidico (ad esempio, la catena principale di fosfato). In questa sede, nel contesto della catena principale polinucleotidica, le espressioni "fosfato" e "fosfodiesteri" sono usate in modo intercambiabile. I gruppi fosfato della catena principale possono essere alterati sostituendo uno o più atomi di ossigeno con un sostituto diverso.

[0336] I nucleotidi alternativi possono includere la sostituzione completa di una frazione fosfato inalterata con un altro legame internucleosidico come descritto nel presente contesto. Esempi di gruppi fosfato alternativi includono, tuttavia senza limitazioni, fosforotioato, fosforoselenati, boranofosfati, esteri boranofosfato, idrogenofosfonati, fosforammidati, fosforodiammidati, 5 alchil- o arilfosfonati e fosfotriesteri. I fosforoditioati hanno entrambi gli atomi di ossigeno non leganti sostituiti dallo zolfo. Il linker fosfato può anche essere alterato sostituendo un ossigeno di collegamento con azoto (fosforammidati a ponte), zolfo (fosforotioati a ponte) e carbonio (fosfonati di metilene a ponte).

[0337] I nucleosidi e i nucleotidi alternativi possono includere la sostituzione di uno o più degli 10 atomi di ossigeno non a ponte con una frazione borano (BH_3), zolfo (tio), metile, etile e/o metossi. A titolo di esempio non limitativo, due atomi di ossigeno non leganti a ponte nella stessa posizione [ad esempio la posizione alfa (α), beta (β) o gamma (γ)] possono essere sostituiti con uno zolfo (tio) e un metossi.

[0338] Viene fornita la sostituzione di uno o più atomi di ossigeno nella posizione α della 15 frazione fosfato (ad esempio, α -tiofosfato) per conferire stabilità (come contro esonucleasi ed endonucleasi) all'RNA e al DNA attraverso i legami del fosforotioato innaturale con la catena principale. Il DNA e l'RNA del fosforotioato hanno una maggiore resistenza alla nucleasi e, di conseguenza, un'emivita più lunga in un ambiente cellulare.

20 [0339] Nel presente contesto vengono descritti altri legami internucleosidici che possono essere impiegati secondo la presente descrizione, inclusi i legami internucleosidici che non contengono un atomo di fosforo.

Siti interni di ingresso ribosomiale

[0340] I polinucleotidi possono contenere un sito interno di ingresso del ribosoma (IRES). Un 25 IRES può agire come unico sito di legame del ribosoma, o può servire come uno dei molteplici

siti di legame del ribosoma di un mRNA. Un polinucleotide contenente più di un sito di legame del ribosoma funzionale può codificare diversi peptidi o polipeptidi che sono tradotti indipendentemente dai ribosomi (ad es., mRNA multicistronico). Quando i polinucleotidi sono provvisti di un IRES, è inoltre prevista facoltativamente una seconda regione traslabile. Esempi

5 di sequenze IRES che possono essere utilizzate secondo la presente descrizione includono, senza limitazione, quelle da picornavirus (ad esempio, FMDV), virus dei parassiti (CFFV), virus della poliomielite (PV), virus dell'encefalomiocardite (ECMV), afta epizootica virus (FMDV), virus dell'epatite C (HCV), virus della peste suina classica (CSFV), virus della leucemia murina (MLV), virus dell'immunodeficienza scimmiesca (SIV) o virus della paralisi del grillo (CrPV).

10 **Struttura cap in 5'**

[0341] Un polinucleotide (ad esempio, un mRNA) può includere una struttura cap in 5'. La struttura cap in 5' di un polinucleotide è coinvolta nell'esportazione nucleare e nell'aumento della stabilità del polinucleotide e lega la proteina di legame del cap (cap binding protein, CBP) dell'mRNA, che è responsabile della stabilità del polinucleotide nella cellula e della competenza

15 di traduzione attraverso l'associazione della CBP con la proteina di legame di poli-A per formare le specie di mRNA ciclico mature. Il cap aiuta ulteriormente la rimozione degli introni prossimali 5' durante lo splicing dell'mRNA.

[0342] Le molecole polinucleotidiche endogene possono essere incappucciate all'estremità 5' generando un legame 5'-ppp-5'-trifosfato tra un residuo del cappuccio terminale della guanosina

20 e il nucleotide senso trascritto 5'-terminale del polinucleotide. Questo cap 5'-guanilato può quindi essere metilato per generare un residuo di N7-metil-guanilato. Gli zuccheri ribosio dei nucleotidi trascritti terminali e/o anteterminali dell'estremità 5' del polinucleotide possono facoltativamente essere anche 2'-O-metilati. Il 5'-decapping attraverso l'idrolisi e la scissione della struttura del cap guanilato può colpire una molecola di polinucleotide, come una molecola

25 di mRNA, per la degradazione.

[0343] Le alterazioni dei polinucleotidi possono generare una struttura del cap non idrolizzabile che impedisce il decapping e quindi aumenta l'emivita del polinucleotide. Poiché l'idrolisi della struttura cap richiede la scissione dei legami di fosforodiesteri 5'-ppp-5', durante la reazione di capping possono essere utilizzati nucleotidi alternativi. Ad esempio, un enzima di capping di
5 vaccino della New England Biolabs (Ipswich, MA) può essere utilizzato con nucleotidi di α -tio-
guanosina secondo le istruzioni del produttore per creare un legame fosforotioato nel cap 5'-
ppp-5'. Ulteriori nucleotidi di guanosina alternativi possono essere usati come nucleotidi di α -
metil-fosfonato e seleno-fosfato.

[0344] Ulteriori alterazioni includono, ma non sono limitate a, 2'-O-metilazione degli zuccheri
10 ribosio dei nucleotidi 5'-terminali e/o 5'-anteterminali del polinucleotide (come menzionato
sopra) sul gruppo 2'-idrossi dello zucchero. Più strutture cap in 5' distinte possono essere
utilizzate per generare il 5'-cap di un polinucleotide, come una molecola di mRNA.

[0345] Le strutture cap in 5' includono quelle descritte nelle pubblicazioni di brevetto
internazionale n. WO2008127688, WO 2008016473 e WO 2011015347.

15 [0346] Gli analoghi di cap, che nel presente contesto sono indicati anche come analoghi di cap
sintetici, cap chimici, analoghi di cap chimici, o analoghi di cap strutturali o funzionali,
differiscono dai cap in 5' naturali (vale a dire endogeni, tipo selvatico o fisiologici) nella loro
struttura chimica, pur mantenendo la funzione di cap. Gli analoghi del cap possono essere
sintetizzati chimicamente (vale a dire non enzimaticamente) o enzimaticamente e/legati a un
20 polinucleotide.

[0347] Ad esempio, l'analogo di cap anti-inversione (ARCA) contiene due guanosine legate da
un gruppo 5'-5'-trifosfato, in cui una guanosina contiene un gruppo N7-metile e un gruppo 3'-O-
metile (cioè, N7,3'-O-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina, $m^7 G-3'mppp-G$, che può
essere equivalentemente designato 3' O-Me- $m^7G(5')ppp(5')G$). L'atomo 3'-O dell'altra
25 guanosina, inalterata, si lega al nucleotide 5'-terminale del polinucleotide ricoperto (ad es., un

mRNA). La guanosina N7- e 3'-O-metilata fornisce la frazione terminale del polinucleotide ricoperto (ad esempio, l'mRNA).

5 [0348] Un altro cap esemplificativo è mCAP, che è simile ad ARCA ma ha un gruppo 2'-O-metile sulla guanosina (vale a dire, N7,2'-O-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina, m7Gm-ppp-G).

[0349] Un cap può essere un analogo del cap dinucleotidico. Come esempio non limitativo, l'analogo del cap del dinucleotide può essere modificato in diverse posizioni del fosfato con un gruppo boranofosfato o un gruppo fosforoselenoato come gli analoghi del cap del dinucleotide descritti nel brevetto U.S. n. 8.519.110.

10 [0350] In alternativa, un analogo del cap può essere un analogo del cap dinucleotidico N7-(4-clorofenossietil) sostituito noto nella tecnica e/o descritto nella presente. Esempi non limitativi di analoghi del cap dinucleotidico N7-(4-clorofenossietil) sostituiti includono un N7-(4-clorofenossietil)-G(5')ppp(5')G e un analogo di cap N7-(4-clorofenossietil)-m3'-OG(5')ppp(5')G (si veda, ad esempio, i vari analoghi del cap e i metodi di sintesi degli analoghi
15 del cap descritti in Kore et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574). In altri casi, un analogo del cap utile nei polinucleotidi della presente descrizione è un analogo di 4-cloro/bromofenossietile.

[0351] Sebbene gli analoghi del cap consentano il concomitante capping di un polinucleotide in una reazione di trascrizione in vitro, fino al 20% dei trascritti rimane senza cap. Questo, così
20 come le differenze strutturali di un analogo del cap dalle strutture endogene cap in 5' dei polinucleotidi prodotti dal meccanismo di trascrizione cellulare endogena, può portare a una ridotta competenza traduzionale tra e a una ridotta stabilità cellulare.

[0352] Polinucleotidi alternativi possono anche essere dotati di cap post-trascrizionalmente, utilizzando enzimi, al fine di generare strutture di cap in 5' più autentiche. Come usato qui, la
25 frase "più autentico" si riferisce a una caratteristica che rispecchia o imita da vicino,

strutturalmente o funzionalmente, una caratteristica endogena o di tipo selvatico. Vale a dire, una caratteristica "più autentica" è meglio rappresentativa di una funzione cellulare e/o di una struttura endogena, di tipo selvatico, naturale o fisiologica rispetto alle caratteristiche sintetiche o agli analoghi della tecnica precedente, o che supera le corrispondenti caratteristiche endogene, di tipo selvatico, naturali o fisiologiche in uno o più aspetti. Esempi non limitativi di strutture cap in 5' più autentici utili nei polinucleotidi della presente descrizione sono quelle che, tra le altre cose, hanno un legame potenziato delle proteine che legano il cap, un'emivita aumentata, una suscettibilità ridotta alle 5'-endonucleasi e /o 5'-decapping ridotto, rispetto alle strutture sintetiche 5'-cap note nella tecnica (o a una struttura 5'-cap di tipo selvatico, naturale o fisiologica). Ad esempio, l'enzima di capping del virus vaccino ricombinante e l'enzima ricombinante 2'-O-metiltransferasi possono creare un legame canonico 5'-5'-trifosfato tra il nucleotide 5'-terminale di un polinucleotide e un nucleotide del cap della guanosina in cui la guanosina del cap contiene un N7-metilazione e il nucleotide 5'-terminale del polinucleotide contiene un 2'-O-metile. Tale struttura è denominata struttura Cap1. Questo cap dà come risultato una maggiore competenza traslazionale, stabilità cellulare e una ridotta attivazione di citochine pro-infiammatorie cellulari, rispetto, ad esempio, ad altre strutture analoghe di cap in 5' note nella tecnica. Altre strutture di cap esemplificative includono 7mG(5')ppp(5')N,pN2p (Cap 0), 7mG(5')ppp(5')NlmpNp (Cap 1), 7mG(5')-ppp(5')NlmpN2mp (Cap 2), e m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up (Cap 4).

[0353] Poiché i polinucleotidi alternativi possono essere bloccati dopo la trascrizione e poiché questo processo è più efficiente, quasi il 100% dei polinucleotidi alternativi può essere bloccato. Ciò è in contrasto con circa l'80% quando un analogo del cap è collegato a un polinucleotide nel corso di una reazione di trascrizione *in vitro*.

[0354] I cap terminali in 5' possono includere cap endogeni o analoghi dei cap. Un cap terminale in 5' può includere un analogo della guanosina. Analoghi utili della guanosina

includono inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-osso-guanosina, 2-ammino-guanosina, LNA-guanosina e 2-azido-guanosina.

[0355] In alcuni casi, un polinucleotide contiene un cap in 5' modificato. Una modifica sul cap in 5' può aumentare la stabilità del polinucleotide, aumentare l'emivita del polinucleotide e può aumentare l'efficienza traduzionale del polinucleotide. Il cap in 5'- modificato può includere, a titolo esemplificativo, una o più delle seguenti modifiche: modifica nella posizione 2'- e/o 3'- di un guanosina trifosfato (GTP) con tappo), una sostituzione dello zucchero ossigeno dell'anello (che ha prodotto l'anello carbociclico) con una frazione metilenica (CH₂), una modifica alla frazione del ponte trifosfato della struttura del cap, o una modifica alla frazione (G) della nucleobase.

5'-UTR

[0356] Una 5'-UTR può essere fornita come regione fiancheggiante ai polinucleotidi (ad esempio, mRNA). Una 5'-UTR può essere omologa o eterologa alla regione codificante trovata in un polinucleotide. Molteplici 5'-UTR possono essere incluse nella regione fiancheggiante e possono essere uguali o di sequenze diverse. Qualsiasi porzione delle regioni fiancheggianti, inclusa nessuna, può essere ottimizzata per codone e qualsiasi può contenere indipendentemente una o più diverse alterazioni strutturali o chimiche, prima e/o dopo l'ottimizzazione per codone.

[0357] Nella Tabella 21 della domanda provvisoria statunitense n. 61/775.509, e nella Tabella 21 e nella Tabella 22 della domanda provvisoria U.S. n. 61/829.372, di cui sono qui incorporate per riferimento, è riportato un elenco di inizio e fine sito di polinucleotidi alternativi (ad es., mRNA). Nella Tabella 21 ogni 5'-UTR (da 5'-UTR-005 a -5'-UTR 68511) è identificato dal suo sito di inizio e fine relativo al suo trascritto nativo o di tipo selvatico (omologa) (ENST; l'identificatore utilizzato nell'ENSEMBL database).

[0358] Per alterare una o più proprietà di un polinucleotide (ad esempio, mRNA), è possibile ingegnerizzare 5'-UTR che sono eterologhe alla regione codificante di un polinucleotide

alternativo (ad esempio, mRNA). I polinucleotidi (ad esempio mRNA) possono quindi essere somministrati a cellule, tessuti o organismi e si possono misurare i risultati come il livello proteico, la localizzazione e/o l'emivita per valutare gli effetti benefici che la 5'-UTR eterologa può avere sui polinucleotidi alternativi (mRNA). Possono essere utilizzate varianti delle 5'-UTR in cui uno o più nucleotidi vengono aggiunti o rimossi ai terminali, inclusi A, T, C o G. Le 5'-UTR possono anche essere ottimizzate per i codoni o alterate in qualsiasi modo descritto nella presente.

5'-UTR, 3'-UTR e gli elementi di potenziamento della traduzione (Translation Enhancer Elements, TEE)

10 [0359] La 5'-UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può includere almeno un elemento potenziatore della traduzione. Il termine "elemento di potenziamento della traduzione" si riferisce a sequenze che aumentano la quantità di polipeptide o proteina prodotta da un polinucleotide. A titolo di esempio non limitativo, il TEE può trovarsi tra il promotore di trascrizione e il codone di inizio. I polinucleotidi (ad esempio, mRNA) con almeno un TEE in 15 5'-UTR possono includere un cap in 5'-UTR. Inoltre, almeno un TEE può essere localizzato nella 5'-UTR di polinucleotidi (ad esempio, mRNA) sottoposti a traduzione cap-dipendente o cap-indipendente.

[0360] In un aspetto, i TEE sono elementi conservati nell'UTR che possono promuovere l'attività traduzionale di un polinucleotide come, ma non solo, la traduzione cap-dipendente o 20 cap-indipendente. La conservazione di queste sequenze è stata precedentemente mostrata da Panek et al. (Nucleic Acids Research, 2013, 1-10) attraverso 14 specie inclusi gli esseri umani.

[0361] In un esempio non limitativo, i TEE noti possono essere nel 5'-leader della proteina omeodominiale Gtx (Chappell et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:9590-9594, 2004).

[0362] In un altro esempio non limitativo, i TEE sono descritti nelle pubblicazioni di brevetto 25 U.S. nn. 2009/0226470 e 2013/0177581, le pubblicazioni di brevetto internazionale

nn. WO2009/075886, WO2012/009644, e WO1999/024595, e i brevetti U.S. nn. 6,310,197 e 6,849,405.

[0363] In ancora un altro esempio non limitativo, il TEE può essere un sito di ingresso del ribosoma interno (IRES), HCV-IRES o un elemento IRES come, ma non limitato a, quelli descritti nel brevetto U.S. n. 7.468.275, pubblicazione di brevetto U.S. n. 2007/0048776 e 5 2011/0124100 e pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2007/025008 e WO2001/055369. Gli elementi IRES possono includere, ma non sono limitati a, le sequenze Gtx (ad es. Gtx9-nt, Gtx8-nt, Gtx7-nt) descritte da Chappell et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9590-9594, 2004] e Zhou et al. (PNAS 102:6273-6278, 2005) e nella pubblicazione di 10 brevetto U.S. n. 2007/0048776 e 2011/0124100 e nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2007/025008.

[0364] "I "polinucleotidi di potenziamento della traduzione" sono polinucleotidi che includono uno o più dei TEE specifici qui esemplificati e/o descrizioni nella tecnica (si vedano ad esempio brevetti U.S. nn. 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, 7,183,395, le pubblicazioni di brevetto U.S. 15 nn. 20090/226470, 2007/0048776, 2011/0124100, 2009/0093049, 2013/0177581, le pubblicazioni di brevetto internazionale nn. WO2009/075886, WO2007/025008, WO2012/009644, WO2001/055371, WO1999/024595, e i brevetti europei nn. 2610341 e 2610340) o loro varianti, omologhi o derivati funzionali. Una o più copie di uno specifico TEE possono essere presenti in un polinucleotide (ad esempio mRNA). I TEE nei polinucleotidi 20 potenziatori della traduzione possono essere organizzati in uno o più segmenti di sequenza. Un segmento di sequenza può ospitare uno o più dei TEE specifici esemplificati nella presente, ciascun TEE essendo presente in una o più copie. Quando in un polinucleotide potenziatore della traduzione sono presenti molteplici segmenti di sequenza, essi possono essere omogenei o eterogenei. Pertanto, i molteplici segmenti di sequenza in un polinucleotide potenziatore della 25 traduzione possono ospitare tipi identici o diversi di TEE specifici esemplificati nella presente,

numero di copie identico o diverso di ciascuno dei TEE specifici e/o organizzazione identica o diversa dei TEE all'interno di ciascun segmento di sequenza.

[0365] Un polinucleotide (ad es., mRNA) può includere almeno un TEE che viene descritto nelle pubblicazioni di brevetto internazionale nn. WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886, WO2007/025008, WO1999/024595, pubblicazioni di brevetto europeo nn. 2610341 e 2610340, brevetti U.S. nn. 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, 7,183,395, e pubblicazione di brevetto U.S. nn. 2009/0226470, 2011/0124100, 2007/0048776, 2009/0093049, e 2013/0177581. Il TEE può essere localizzato nella 5'-UTR dei polinucleotidi (ad esempio, mRNA).

10 **[0366]** Un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può includere almeno un TEE che ha almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno 75 %, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95% o almeno il 99% di identità con i TEE descritti nelle pubblicazioni di brevetto U.S. Nn 2009/0226470, 2007/0048776, 2013/0177581 e 2011/0124100, nelle pubblicazioni di brevetto internazionale nn. WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886 e WO2007/025008, le pubblicazioni di brevetto europeo nn. 2610341 e 2610340, i brevetti U.S. nn. 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, 7,183,395.

15 **[0367]** La 5'-UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può includere almeno 1, almeno 2, almeno 3, almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 7, almeno 8, almeno 9, almeno 10, almeno 11, almeno 12, almeno 13, almeno 14, almeno 15, almeno 16, almeno 17, almeno 18 almeno 19, almeno 20, almeno 21, almeno 22, almeno 23, almeno 24, almeno 25, almeno 30, almeno 35, almeno 40, almeno 45, almeno 50, almeno 55 o più di 60 sequenze TEE. Le sequenze di TEE nel 5'-UTR di un polinucleotide (ad esempio mRNA) possono essere sequenze di TEE uguali o diverse. Le sequenze di TEE possono essere in uno schema come ABABAB, AABBAABBAABB o ABCABCABC, o loro varianti, ripetute una, due o più di tre volte. In questi motivi, ogni lettera, A, B o C rappresenta una diversa sequenza TEE a livello di

nucleotide.

[0368] In alcuni casi, la 5'-UTR può includere un distanziatore per separare due sequenze di TEE. Come esempio non limitativo, il distanziatore può essere un distanziatore a 15 nucleotidi e/o altri distanziatori noti nella tecnica. Come altro esempio non limitativo, la 5'-UTR può
5 includere un modulo distanziatore di sequenza di TEE ripetuto almeno una volta, almeno due, almeno 3 volte, almeno 4 volte, almeno 5 volte, almeno 6 volte, almeno 7 volte, almeno 8 volte, almeno 9 volte, o più di 9 volte nella 5'-UTR.

[0369] In altri casi, il distanziatore che separa due sequenze di TEE può includere altre sequenze note nella tecnica che possono regolare la traduzione dei polinucleotidi (ad esempio, mRNA)
10 della presente descrizione come, tuttavia senza limitazione, sequenze di miR (ad esempio, siti di legame di miR e seed di miR). A titolo di esempio non limitativo, ciascun distanziatore utilizzato per separare due sequenze TEE può includere una diversa sequenza miR o un componente di una sequenza miR (ad esempio, sequenza seme miR).

[0370] In alcuni casi, il TEE nella 5'-UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può
15 includere almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, a almeno il 25%, almeno il 30%, almeno il 35%, almeno il 40%, almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 99% o più del 99% delle sequenze TEE descritte nelle pubblicazioni di brevetto U.S. nn. 2009/0226470, 2007/0048776, 2013/0177581 e
20 2011/0124100, le pubblicazioni di brevetto internazionali nn. WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886 e WO2007/025008, le pubblicazioni di brevetto europee nn. 2610341 e 2610340, e i brevetti U.S. nn. 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, e 7,183,395. In un altro aspetto, il TEE nella 5'-UTR dei polinucleotidi (ad es. mRNA) della presente descrizione può includere un frammento di 5-30 nucleotidi, un frammento di 5-25 nucleotidi, un frammento
25 di 5-20 nucleotidi, un frammento di 5-15 nucleotidi, un frammento di 5-10 nucleotidi delle

sequenze TEE descritte nelle pubblicazioni di brevetto U.S. nn. 2009/0226470, 2007/0048776, 2013/0177581 e 2011/0124100, nelle pubblicazioni di brevetto internazionale nn. WO1999/024595, WO2012/009644, WO2009/075886 e WO2007/025008, nelle pubblicazioni di brevetto europeo nn. 2610341 e 2610340, e nei brevetti U.S. nn. 6,310,197, 6,849,405, 7,456,273, e 7,183,395.

[0371] In determinati casi, il TEE nella 5'-UTR dei polinucleotidi (ad esempio, mRNA) della presente descrizione può includere almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, a almeno il 25%, almeno il 30%, almeno il 35%, almeno il 40%, almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 99% o più del 99% delle sequenze TEE descritte in Chappell et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9590-9594, 2004] e Zhou et al. (PNAS 102:6273-6278, 2005), nella Tabella supplementare 1 e nella Tabella supplementare 2 descritte da Wellensiek et al (Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements, Nature Methods, 2013; DOI:10.1038/NMETH.2522). In un'altra forma di realizzazione, il TEE nella 5'-UTR dei polinucleotidi (ad es. mRNA) della presente descrizione può includere un frammento di 5-30 nucleotidi, un frammento di 5-25 nucleotidi, un frammento di 5-20 nucleotidi, un frammento di 5-15 nucleotidi, un frammento di 5-10 nucleotidi delle sequenze TEE descritte in Chappell et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9590-9594, 2004] e Zhou et al. (PNAS 102:6273-6278, 2005), nella Tabella supplementare 1 e nella Tabella supplementare 2 descritte da Wellensiek et al (Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements, Nature Methods, 2013; DOI:10.1038/NMETH.2522).

[0372] In alcuni casi, il TEE utilizzato nella --UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) è una sequenza IRES come, tuttavia senza limitazione, quelle descritte nel brevetto U.S. n. 7.468.275 e nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2001/055369.

[0373] In alcuni casi, i TEE utilizzati nella 5'-UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) possono essere identificati mediante i metodi descritti nella pubblicazione di brevetto U.S. n. 2007/0048776 e 2011/0124100 e nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2007/025008 e WO2012/009644.

5 [0374] In alcuni casi, i TEE utilizzati nella 5'-UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) della presente descrizione possono essere un elemento di regolazione della trascrizione descritto nei brevetti U.S. nn. 7.456.273 e 7.183.395, pubblicazione di brevetto U.S. n. 2009 /0093049 e pubblicazione internazionale n. WO2001/055371. Gli elementi di regolamentazione della trascrizione possono essere identificati mediante metodi noti nella tecnica, come, ma non
10 limitati a, i metodi descritti nei brevetti U.S. nn. 7.456.273 e 7.183.395, nella pubblicazione del brevetto U.S. n. 2009/0093049 e nella pubblicazione internazionale n. WO2001/ 055371.

[0375] In ancora altri casi, il TEE utilizzato nella 5'-UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) è un polinucleotide o una sua porzione come descritto nei brevetti U.S. n. 7.456.273 e 7.183.395, nella pubblicazione di brevetto statunitense n. 2009/0093049, e pubblicazione
15 internazionale n. WO2001/055371.

[0376] La 5'-UTR che include almeno un TEE descritto nel presente contesto può essere incorporata in una sequenza monocistronica come, ma non solo, un sistema vettoriale o un vettore polinucleotidico. A titolo di esempio non limitativo, i sistemi vettoriali e i vettori polinucleotidici possono includere quelli descritti nei brevetti U.S. nn. 7,456,273 e 7,183,395, le
20 pubblicazioni di brevetto U.S. nn. 2007/0048776, 2009/0093049 e 2011/0124100, e le pubblicazioni di brevetto internazionale nn. WO2007/025008 e WO2001/055371.

[0377] I TEE qui descritti possono essere localizzati nella 5'-UTR e/o nella 3'-UTR dei polinucleotidi (ad esempio, mRNA). I TEE situati nella 3'-UTR possono essere gli stessi e/o diversi dai TEE situati e/o descritti per l'incorporazione nella 5'-UTR.

25 [0378] In alcuni casi, la 3'-UTR di un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può includere

almeno 1, almeno 2, almeno 3, almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 7, almeno 8, almeno 9, almeno 10, almeno 11, almeno 12, almeno 13, almeno 14, almeno 15, almeno 16, almeno 17, almeno 18 almeno 19, almeno 20, almeno 21, almeno 22, almeno 23, almeno 24, almeno 25, almeno 30, almeno 35, almeno 40, almeno 45, almeno 50, almeno 55 o più di 60 sequenze TEE.

5 Le sequenze TEE nella 3'-UTR dei polinucleotidi (ad esempio mRNA) della presente descrizione possono essere sequenze TEE uguali o differenti. Le sequenze TEE possono essere in un motivo come ABABAB, AABBAABBAABB o ABCABCABC, o loro varianti, ripetute una, due o più di tre volte. In questi motivi, ogni lettera, A, B o C rappresenta una diversa sequenza TEE a livello di nucleotide.

10 **[0379]** In un caso, la 3'-UTR può includere un distanziatore per separare due sequenze di TEE. Come esempio non limitativo, il distanziatore può essere un distanziatore a 15 nucleotidi e/o altri distanziatori noti nella tecnica. Come altro esempio non limitativo, la 3'-UTR può includere un modulo distanziatore di sequenza TEE ripetuto almeno una volta, almeno due, almeno 3 volte, almeno 4 volte, almeno 5 volte, almeno 6 volte, a almeno 7 volte, almeno 8 volte, almeno
15 9 volte, o più di 9 volte nella 3'-UTR.

[0380] In altri casi, il distanziatore che separa due sequenze di TEE può includere altre sequenze note nella tecnica che possono regolare la traduzione dei polinucleotidi (ad esempio, mRNA) della presente descrizione come, tuttavia senza limitazione, sequenze di miR descritte nel presente contesto (ad esempio, siti di legame di miR e seed di miR). A titolo di esempio non
20 limitativo, ciascun distanziatore utilizzato per separare due sequenze TEE può includere una diversa sequenza miR o un componente di una sequenza miR (ad esempio, sequenza seme miR).

[0381] In ancora altri casi, l'incorporazione di una sequenza di miR e/o di una sequenza di TEE cambia la forma della regione a stem-loop che può aumentare e/o diminuire la traduzione. (Si veda ad es., Kedde et al. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-
25 221 and miR-22 accessibility. Nature Cell Biology. 2010).

Stem-loop

[0382] I polinucleotidi (ad esempio, mRNA) possono includere uno stem-loop come, ma non solo, uno stem-loop dell'istone. Lo stem-loop può essere una sequenza nucleotidica che è lunga circa 25 o circa 26 nucleotidi come, ma non solo, quelli descritti nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2013/103659. Lo stem-loop dell'istone può essere localizzato in 3' rispetto alla regione codificante (ad es., in corrispondenza del terminale 3' della regione codificante). A titolo di esempio non limitativo, lo stem-loop può essere situato all'estremità 3' di un polinucleotide qui descritto. In alcuni casi, un polinucleotide (ad esempio, un mRNA) include più di uno stem-loop (ad esempio due stem-loop). Esempi di sequenze di stem-loop sono descritti nelle pubblicazioni di brevetti internazionali n. WO2012/019780 e WO201502667. In alcuni casi, un polinucleotide include la sequenza di stem-loop CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA (SEQ ID NO: 1). In altri, un polinucleotide include la sequenza di stem-loop CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA (SEQ ID NO: 2).

[0383] Uno stem-loop può essere situato in una seconda regione terminale di un polinucleotide. A titolo di esempio non limitativo, lo stem-loop può essere situato all'interno di una regione non tradotta (ad esempio, 3'-UTR) in una seconda regione terminale.

[0384] In alcuni casi, un polinucleotide come, tuttavia senza limitazione, mRNA, che include lo stem-loop dell'istone può essere stabilizzato mediante l'aggiunta di una regione stabilizzante in 3' (ad esempio, una regione stabilizzante in 3' che include almeno un nucleoside terminante la catena). Senza voler essere legati alla teoria, l'aggiunta di almeno un nucleoside di terminazione della catena può rallentare la degradazione di un polinucleotide e quindi può aumentare l'emivita del polinucleotide.

[0385] In altri casi, un polinucleotide come, tuttavia senza limitazione, mRNA che include lo stem-loop dell'istone può essere stabilizzato mediante un'alterazione della regione 3' del polinucleotide che può prevenire e/o inibire l'aggiunta di oligo(U) (si veda ad esempio la

pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2013/103659).

[0386] In ancora altri casi, un polinucleotide come, tuttavia senza limitazione, mRNA, che include lo stem-loop dell'istone può essere stabilizzato mediante l'aggiunta di un oligonucleotide che termina in un 3'-deossinucleoside, 2',3'-dideossinucleoside 3'-O-metilnucleosidi, 3'-O-
5 etilnucleosidi, 3'-arabinosidi e altri nucleosidi alternativi noti nella tecnica e/o descritti nella presente.

[0387] In alcuni casi, i polinucleotidi della presente descrizione possono includere uno stem-loop dell'istone, una regione poli-A e/o una struttura del cap in 5'. Lo stem-loop dell'istone può essere prima e/o dopo la regione poli-A. I polinucleotidi che includono lo stem-loop dell'istone e
10 una sequenza di regione poli-A possono includere un nucleoside di terminazione di catena descritto nella presente.

[0388] In altri casi, i polinucleotidi della presente descrizione possono includere uno stem-loop dell'istone e/o una struttura del cap 5'. La struttura 5'-cap può includere, tuttavia senza limitazioni, quelle qui descritte e/o note nella tecnica.

[0389] In alcuni casi, la regione di stem-loop conservata può includere una sequenza di miR
15 descritta nella presente. Come esempio non limitativo, la regione di stem-loop può includere la sequenza seed di una sequenza di miR descritta nella presente. In un altro esempio non limitativo, la regione di stem-loop può includere una sequenza seed di miR-122.

[0390] In determinati casi, la regione di stem-loop conservata può includere una sequenza di
20 miR descritta nella presente e può anche includere una sequenza di TEE.

[0391] In alcuni casi, l'incorporazione di una sequenza di miR e/o di una sequenza di TEE cambia la forma della regione a stem-loop che può aumentare e/o diminuire la traduzione. (Si veda ad es., Kedde et al. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 and miR-22 accessibility. Nature Cell Biology. 2010).

[0392] I polinucleotidi possono includere almeno uno stem-loop dell'istone e una regione poli-A
25

o un segnale di poliadenilazione. Esempi non limitativi di sequenze polinucleotidiche codificanti almeno uno stelo-ansa dell'istone e una regione poli-A o un segnale di poliadenilazione sono descritti nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2013/120497, WO2013/120629, WO2013/120500, WO2013/120627, WO2013/120498, 5 WO2013/120626, WO2013/120499 e WO2013/120628. In determinati casi, il polinucleotide che codifica per uno stem-loop dell'istone e una regione poli-A o un segnale di poliadenilazione può codificare per un antigene patogeno o un suo frammento come le sequenze polinucleotidiche descritte nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2013/120499 e WO2013/120628. In altri casi, il polinucleotide che codifica uno stem-loop dell'istone e una 10 regione poli-A o un segnale di poliadenilazione può codificare per una proteina terapeutica come le sequenze polinucleotidiche descritte nelle pubblicazioni di brevetti internazionali n. WO2013/120497 e WO2013/120629. In alcuni casi, il polinucleotide che codifica per uno stem-loop dell'istone e una regione poli-A o un segnale di poliadenilazione può codificare per un antigene tumorale o un suo frammento come le sequenze polinucleotidiche descritte nelle 15 pubblicazioni di brevetti internazionali n. WO2013/120500 e WO2013/120627. In altri casi, il polinucleotide che codifica per uno stem-loop dell'istone e una regione poli-A o un segnale di poliadenilazione può codificare per un antigene allergenico o un autoantigene autoimmune come le sequenze polinucleotidiche descritte nella pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2013/120498 e WO2013/120626.

20 ***Regioni poli-A***

[0393] Un polinucleotide o un acido nucleico (ad esempio, un mRNA) può includere una sequenza di poliA e/o un segnale di poliadenilazione. Una sequenza di poliA può essere composta interamente o principalmente da nucleotidi di adenina o loro analoghi o derivati. Una sequenza di poliA può essere una coda situata adiacente a una regione 3' non tradotta di un 25 acido nucleico.

[0394] Durante l'elaborazione dell'RNA, una lunga catena di nucleotidi di adenosina (regione poli-A) viene normalmente aggiunta alle molecole di RNA messaggero (mRNA) per aumentare la stabilità della molecola. Immediatamente dopo la trascrizione, l'estremità 3' del trascritto può essere scissa per liberare un idrossi in 3'. Quindi la poli-A polimerasi aggiunge una catena di
5 nucleotidi di adenosina all'RNA. Il processo, chiamato poliadenilazione, aggiunge una regione poli-A che ha una lunghezza compresa tra 100 e 250 residui.

[0395] Lunghezze uniche della regione poli-A possono fornire alcuni vantaggi ai polinucleotidi alternativi della presente descrizione.

[0396] In generale, la lunghezza di una regione poli-A di polinucleotidi della presente
10 descrizione è di almeno 30 nucleotidi di lunghezza. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza della regione poli-A è di almeno 35 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 40 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 45 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 55 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 60 nucleotidi. In un'altra forma di
15 realizzazione, la lunghezza è di almeno 70 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 80 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 90 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 100 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 120 nucleotidi. In un'altra forma di
20 realizzazione, la lunghezza è di almeno 140 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 160 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 180 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 200 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 250 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 300 nucleotidi. In un'altra forma di
25 realizzazione, la lunghezza è di almeno 350 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 400 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di

almeno 450 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 600 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 700 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 800 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 900 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1100 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1200 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1300 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1400 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1600 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1700 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1800 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 1900 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 2000 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 2500 nucleotidi. In un'altra forma di realizzazione, la lunghezza è di almeno 3000 nucleotidi.

[0397] In alcuni casi, la regione poli-A può avere una lunghezza di 80 nucleotidi, 120 nucleotidi, 160 nucleotidi su una molecola polinucleotidica alternativa descritta nella presente.

[0398] In altri casi, la regione poli-A può avere una lunghezza di 20, 40, 80, 100, 120, 140 o 160 nucleotidi su una molecola polinucleotidica alternativa descritta nella presente.

[0399] In alcuni casi, la regione poli-A è progettata in relazione alla lunghezza del polinucleotide alternativo complessivo. Questo disegno può essere basato sulla lunghezza della regione codificante del polinucleotide alternativo, la lunghezza di una particolare caratteristica o regione del polinucleotide alternativo (come mRNA), o basato sulla lunghezza del prodotto finale espresso dal polinucleotide alternativo. Quando relativa a qualsiasi caratteristica del

polinucleotide alternativo (ad esempio, diversa dalla porzione di mRNA che include la regione poli-A), la regione poli-A può essere del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% in più di lunghezza rispetto alla caratteristica aggiuntiva. La regione poli-A può anche essere progettata come una frazione del polinucleotide alternativo a cui appartiene. Nel presente contesto, la regione poli-A può essere del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% o più della lunghezza totale del costruito o della lunghezza totale del costruito meno la regione poli-A.

[0400] In alcuni casi, per migliorare l'espressione possono essere utilizzati siti di legame ingegnerizzati e/o la coniugazione di polinucleotidi (ad esempio, mRNA) per la proteina di legame di poli-A. I siti di legame ingegnerizzati possono essere sequenze di sensori che possono operare come siti di legame per ligandi del microambiente locale dei polinucleotidi (ad esempio, mRNA). Come esempio non limitativo, i polinucleotidi (ad esempio, mRNA) possono includere almeno un sito di legame ingegnerizzato per alterare l'affinità di legame della proteina di legame della poli-A (PABP) e dei suoi analoghi. L'incorporazione di almeno un sito di legame ingegnerizzato può aumentare l'affinità di legame della PABP e dei suoi analoghi.

[0401] Inoltre, più polinucleotidi distinti (ad esempio, mRNA) possono essere collegati insieme alla PABP (proteina di legame della poli-A) attraverso l'estremità 3' utilizzando nucleotidi alternativi al terminale 3' della regione poli-A. Gli esperimenti di trasfezione possono essere condotti in linee cellulari pertinenti e la produzione di proteine può essere analizzata mediante ELISA a 12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore e il giorno 7 dopo la trasfezione. Come esempio non limitativo, gli esperimenti di trasfezione possono essere utilizzati per valutare l'effetto sull'affinità di legame di PABP o analoghi come risultato dell'aggiunta di almeno un sito di legame ingegnerizzato.

[0402] In alcuni casi, una regione poli-A può essere utilizzata per modulare l'avvio della traduzione. Pur non desiderando essere vincolati dalla teoria, la regione poli-A recluta la PABP che a sua volta può interagire con il complesso di avvio della traduzione e quindi può essere

essenziale per la sintesi proteica.

[0403] In alcuni casi, nella presente descrizione può essere utilizzata anche una regione poli-A per proteggere dalla digestione della 3'-5'-esonucleasi.

[0404] In alcuni casi, un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può includere un poliA-G-
5 quadruplex. Il G-quadruplex è una matrice ciclica legata all'idrogeno di quattro nucleotidi di
guanina che possono essere formati da sequenze ricche di G sia nel DNA sia nell'RNA. In
questa forma di realizzazione, il G-quadruplex è incorporato all'estremità della regione poli-A. I
polinucleotidi risultanti (ad esempio mRNA) vengono analizzati per valutare la stabilità, la
produzione di proteine e altri parametri inclusa l'emivita in vari punti temporali. È stato scoperto
10 che il poliA-G-quadruplex determina una produzione proteica equivalente ad almeno il 75% di
quella osservata utilizzando una regione poli-A di 120 nucleotidi da sola.

[0405] In alcuni casi, un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può includere una regione poli-A
e può essere stabilizzato mediante l'aggiunta di una regione stabilizzante in 3'. I polinucleotidi
(ad es., mRNA) con una regione poli-A possono inoltre includere una struttura 5'-cap.

15 **[0406]** In altri casi, un polinucleotide (ad esempio, mRNA) può includere un poli-A-G-
quadruplex. I polinucleotidi (ad esempio mRNA) con un poli-A-G-quadruplex possono inoltre
includere una struttura cap in 5'.

[0407] In alcuni casi, la regione stabilizzante in 3' che può essere utilizzata per stabilizzare un
polinucleotide (ad esempio, mRNA) comprendente una regione poli-A o un poli-A-G-
20 quadruplex può essere, tuttavia senza limitazione, quelle descritte nella pubblicazione di
brevetto internazionale n. WO2013/103659. In altri casi, la regione 3'-stabilizzante che può
essere utilizzata con i polinucleotidi della presente descrizione include un nucleoside di
terminazione di catena come 3'-deossadenosina (cordicepina), 3'-deossiuridina, 3'-
deossicitosina, 3'-deossiguanosina, 3'-deossitimina, 2',3'-dideossinucleosidi, come 2',3'-
25 dideossadenosina, 2',3'-dideossiuridina, 2',3'-dideossicitosina, 2',3'-dideossiguanosina, 2',3'-

dideossitimina, 2'-deossinucleoside o un O-metilnucleoside.

[0408] In altri casi, un polinucleotide come, tuttavia senza limitazione, mRNA che include una regione poliA o un poli-A-G-quadruplex può essere stabilizzato mediante un'alterazione della regione in 3' del polinucleotide che può prevenire e/o inibire l'aggiunta di oligo(U) (si veda ad
5 esempio la pubblicazione di brevetto internazionale n. WO2013/103659).

[0409] In ancora un altro caso, un polinucleotide come, tuttavia senza limitazione, mRNA, che include una regione poliA o un poli-A-G-quadruplex può essere stabilizzato mediante l'aggiunta di un oligonucleotide che termina in un 3'-deossinucleoside, 2',3'-dideossinucleoside 3-O-metilnucleosidi, 3'-O-etilnucleosidi, 3'-arabinosidi e altri nucleosidi alternativi noti nella
10 tecnica e/o descritti nella presente.

Nucleosidi di terminazione della catena

[0410] Un acido nucleico può includere un nucleoside di terminazione della catena. Ad esempio, un nucleoside che termina la catena può includere quei nucleosidi deossigenati nelle posizioni 2' e/o 3' del loro gruppo dello zucchero. Tali specie possono includere 3'-
15 deossiadenosina (cordicepina), 3'-deossiuridina, 3'-deossicitosina, 3'-deossiguanosina, 3'-deossitimina e 2',3'-dideossinucleosidi, come 2',3'-dideossiadenosina, 2',3'-dideossiuridina, 2',3'-dideossicitosina, 2',3'-dideossiguanosina e 2',3'-dideossitimina.

Altri componenti

[0411] Una composizione di nanoparticelle può includere uno o più componenti oltre a quelli
20 descritti nelle sezioni precedenti. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle può includere una o più piccole molecole idrofobe come una vitamina (ad esempio, vitamina A o vitamina E) o uno sterolo.

[0412] Le composizioni di nanoparticelle possono anche includere una o più molecole potenziatrice della permeabilità, carboidrati, polimeri, agenti di alterazione della superficie o
25 altri componenti. Una molecola di potenziamento della permeabilità può essere una molecola

descritta dalla pubblicazione della domanda di brevetto U.S. n. 2005/0222064, ad esempio. I carboidrati possono includere zuccheri semplici (ad es. glucosio) e polisaccaridi (ad es. glicogeno e suoi derivati e analoghi).

[0413] Un polimero può essere incluso e/o utilizzato per incapsulare o parzialmente incapsulare una composizione di nanoparticelle. Un polimero può essere biodegradabile e/o biocompatibile. Un polimero può essere selezionato, tuttavia senza limitazioni, poliammine, polieteri, poliammidi, poliesteri, policarbonammati, poliuree, policarbonati, polistireni, poliimmidi, polisolfoni, poliuretani, poliacetileni, polietileni, polietilenimine, poliisocianati, poliacrilati, polimetacrilati, poliacrilonitrili e poliarilati. Ad esempio, un polimero può includere poli(caprolattone) (PCL), polimero di etilenvinilacetato (EVA), poli(acido lattico) (PLA), poli(acido L-lattico) (PLLA), poli(acido glicolico) (PGA), poli(acido lattico-co-acido glicolico) (PLGA), poli(acido L-lattico-co-acido glicolico) (PLLGA), poli(D,L-lattide) (PDLA), poli(L-lattide) (PLLA), poli(D,L-lattide-co-caprolattone), poli(D,L-lattide-co-caprolattone-co-glicolide), poli(D,L-lattide-co-PEO-co-D,L-lattide), poli(D,L-lattide-co-PPO-co-D,L-lattide), polialchilcianoacrilato, poliuretano, poli-L-lisina (PLL), idrossipropilmetacrilato (HPMA), polietilenglicole, poli-L-acido glutammico, poli(idrossiacidi), polianidridi, poliortoesteri, poli(estereammidi), poliammidi, poli(estereteri), policarbonati, polialchileni come polietilene e polipropilene, polialchilenglicoli come poli(etilenglicole) (PEG), polialchilenossidi (PEO), polialchilentereftalati come poli(etilene tereftalato), alcoli polivinilici (PVA), eteri di polivinile, esteri di polivinile come poli(vinilacetato), polivinil alogenuri come poli(vinilcloruro) (PVC), polivinilpirrolidone (PVP), polisilossani, polistirene (PS), poliuretani, cellulose derivatizzate come alchilcellulose, idrossialchilcellulose, eteri di cellulosa, esteri di cellulosa, nitrocellulose, idrossipropilcellulosa, carbossimetilcellulosa, polimeri di acidi acrilici, come poli(metil(met)acrilato) (PMMA), poli(etil(met)acrilato), poli(butil(met)acrilato), poli(isobutil(met)acrilato), poli(esil(met)acrilato), poli(isodecil(met)acrilato),

poli(lauril(met)acrilato), poli(fenil(met)acrilato), poli(metilacrilato), poli(isopropilacrilato), poli(isobutilacrilato), poli(ottadecilacrilato) e loro copolimeri e miscele, polidiossannoni e suoi copolimeri, poliidrossialcanoati, polipropilene fumarato, poliossimetilene, polossameri, poliossammine, poli(orto)esteri, poli(acido butirrico), poli(acido valerico), poli(lattide-co-
5 caprolattone), carbonato di trimetilene, poli(*N*-acriloilmorfolina) (PACM), poli(2-metil-2-ossazolina) (PMOX), poli(2-etil-2-ossazolina) (PEOZ) e poliglicerolo.

[0414] Gli agenti che alterano la superficie possono includere, tuttavia senza limitazioni, proteine anioniche (ad esempio, sieralbumina bovina), tensioattivi (ad esempio tensioattivi cationici come il dimetildiottadecil-ammonio bromuro), zuccheri o derivati dello zucchero (ad
10 esempio, ciclodestrina), nucleici acidi, polimeri (ad esempio, eparina, polietilenglicole e poloxamer), agenti mucolitici (ad esempio, acetilcisteina, artemisia, bromelina, papaina, clerodendrum, bromexina, carbocisteina, eprazinone, mesna, ambroxolo, sobrerol, domiodol, letosteine, stepronin, tiopronin, gelsolina, timosina β 4, dornasi alfa, neltexina ed erdoesteina) e DNasi (ad esempio, rhDNasi). Un agente di alterazione della superficie può essere disposto
15 all'interno di una nanoparticella e/o sulla superficie di una composizione di nanoparticelle (ad esempio, mediante rivestimento, adsorbimento, legame covalente o altro processo).

[0415] Una composizione di nanoparticelle può anche comprendere uno o più lipidi funzionalizzati. Ad esempio, un lipide può essere funzionalizzato con un gruppo alchilico che, quando esposto ad un azoturo in condizioni di reazione appropriate, può subire una reazione di
20 cicloaddizione. In particolare, un doppio strato lipidico può essere funzionalizzato in questo modo con uno o più gruppi utili nel facilitare la permeazione della membrana, il riconoscimento cellulare o l'imaging. La superficie di una composizione di nanoparticelle può anche essere coniugata con uno o più anticorpi utili. Gruppi funzionali e coniugati utili nel rilascio cellulare mirato, nell'imaging e nella permeazione della membrana sono ben noti nella tecnica.

25 **[0416]** Oltre a questi componenti, le composizioni di nanoparticelle possono includere qualsiasi

sostanza utile nelle composizioni farmaceutiche. Ad esempio, la composizione di nanoparticelle può includere uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili o ingredienti accessori come, tuttavia senza limitazione, uno o più solventi, mezzi di dispersione, diluenti, coadiuvanti di dispersione, coadiuvanti di sospensione, coadiuvanti di granulazione, disgreganti, riempitivi, antiagglomeranti, veicoli liquidi, leganti, agenti tensioattivi, agenti isotonici, agenti addensanti o emulsionanti, agenti tamponanti, agenti lubrificanti, oli, conservanti e altre specie. Possono anche essere inclusi eccipienti come cere, burri, agenti coloranti, agenti di rivestimento, aromi e agenti profumanti. Gli eccipienti farmaceuticamente accettabili sono ben noti nella tecnica (si veda ad esempio The Science and Practice of Pharmacy di Remington, 21a edizione, AR Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006).

[0417] Esempi di diluenti possono includere, tuttavia senza limitazioni, carbonato di calcio, carbonato di sodio, fosfato di calcio, fosfato bicalcico, solfato di calcio, fosfato acido di calcio, fosfato di sodio lattosio, saccarosio, cellulosa, cellulosa microcristallina, caolino, mannitolo, sorbitolo, inositolo, cloruro di sodio, amido secco, amido di mais, zucchero a velo e/o loro combinazioni. Gli agenti granulanti e disperdenti possono essere selezionati dall'elenco non limitativo costituito da fecola di patate, amido di mais, amido di tapioca, glicolato di amido di sodio, argille, acido alginico, gomma di guar, polpa di agrumi, agar, bentonite, cellulosa e prodotti del legno, spugna naturale, resine a scambio cationico, carbonato di calcio, silicati, carbonato di sodio, poli(vinil-pirrolidone) reticolato (crospovidone), carbossimetil-amido sodico (sodio amido glicolato), carbossimetilcellulosa, carbossimetilcellulosa sodica reticolata (croscarmellosa), metilcellulosa, amido pregelatinizzato (amido 1500), amido microcristallino, amido insolubile in acqua, carbossimetilcellulosa di calcio, silicato di magnesio e alluminio (VEEGUM®), sodio lauril solfato, composti di ammonio quaternario e/o loro combinazioni.

[0418] Esempi di agenti tensioattivi e/o emulsionanti possono includere, ma non sono limitati a, emulsionanti naturali (ad esempio acacia, agar, acido alginico, alginato di sodio, gomma

adragante, condru, colesterolo, xantano, pectina, gelatina, tuorlo d'uovo, caseina, grasso di
lana, colesterolo, cera e lecitina), argille colloidali (ad esempio bentonite [silicato di alluminio]
e VEEGUM® [silicato di magnesio e alluminio]), derivati di amminoacidi a catena lunga, alcoli
ad alto peso molecolare (ad esempio alcol stearilico, alcol cetilico, alcol oleilico, triacetina
5 monostearato, etilenglicole distearato, gliceril monostearato e propilenglicole monostearato,
alcol polivinilico), carbomeri (ad esempio carbossipolimetilene, acido poliacrilico, polimero di
acido acrilico e polimero carbossivinilico), carragenina, derivati della cellulosa (ad esempio
idrossimetilcellulosa, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, metilcellulosa), esteri
di acidi grassi del sorbitano (ad esempio monolaurato di poliossietilene sorbitano [TWEEN®20],
10 poliossietilene sorbitano [TWEEN®60], poliossietilene sorbitano monooleato [TWEEN®80],
sorbitano monopalmitato [SPAN®40], sorbitano monostearato [SPAN®60], sorbitano tristearato
[SPAN®65], gliceril monooleato [SPAN®80]), esteri di poliossietilene (ad esempio
monostearato di poliossietilene [MYRJ®45], olio di ricino idrogenato poliossietilene, olio di
ricino polietossilato, stearato di poliossimetilene e SOLUTOL®), esteri di acidi grassi di
15 saccarosio, esteri di acidi grassi di glicole polietilenico (ad esempio CREMOPHOR®), eteri di
poliossietilene, (ad esempio poliossietilene lauril etere [BRIJ®30]), poli(vinil-pirrolidone),
dietilenglicole monolaurato, trietanolammina oleato, sodio oleato, potassio oleato, etil oleato,
acido oleico, etil laurato, sodio laurilsolfato, PLUORINC® F 68, POLOXAMER® 188, bromuro
di cetrimonio, cloruro di cetilpiridinio, cloruro di benzalconio, sodio docusato, eccetera e/o loro
20 combinazioni.

[0419] Un agente di legame può essere l'amido (ad es. amido di mais e pasta di amido); gelatina;
zuccheri (ad es. saccarosio, glucosio, destrosio, destrina, melassa, lattosio, lattitolo, mannitolo);
gomme naturali e sintetiche [ad es. acacia, alginato di sodio, estratto di muschio irlandese,
gomma di panwar, gomma ghatti, mucillagine di bucce di isapol, carbossimetilcellulosa,
25 metilcellulosa, etilcellulosa, idrossietilcellulosa, idrossipropilcellulosa,

idrossipropilmetilcellulosa, cellulosa microcristallina, acetato di cellulosa, polivinil-pirrolidone), magnesio alluminio silicato (VEEGUM®), e larice arabogalattano]; alginati; ossido di polietilene; glicole polietilenico; sali di calcio inorganici; acido silicico; polimetacrilati; cere; acqua; alcol; e loro combinazioni, o qualsiasi altro agente di legame adatto.

- 5 [0420] Esempi di conservanti possono includere, tuttavia senza limitazioni, antiossidanti, agenti chelanti, conservanti antimicrobici, conservanti antimicotici, conservanti alcolici, conservanti acidi e/o altri conservanti. Esempi di antiossidanti includono, tuttavia senza limitazioni, alfa tocoferolo, acido ascorbico, acorbil palmitato, idrossianisolo butilato, idrossitoluene butilato, monotioglicerolo, metabisolfito di potassio, acido propionico, propil gallato, ascorbato di sodio,
- 10 bisolfito di sodio, metabisolfito di sodio e/o solfito di sodio. Esempi di agenti chelanti includono acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), acido citrico monoidrato, disodio edetato, dipotassio edetato, acido edetico, acido fumarico, acido malico, acido fosforico, sodio edetato, acido tartarico e trisodio edetato. Esempi di conservanti antimicrobici includono, tuttavia senza limitazioni, benzalconio cloruro, benzetonio cloruro, alcool benzilico, bronopolo, cetrimide,
- 15 cetilpiridinio cloruro, clorexidina, clorobutanolo, clorocresolo, cloroxilenolo, cresolo, alcool etilico, glicerina, etanolo, esetidina, imidurea, fenolo, fenossietanolo, alcool fenilettilico, nitrato fenilmercurico, propilenglicole e/o thimerosal. Esempi di conservanti antimicotici includono, tuttavia senza limitazioni, butilparabene, metilparabene, etilparabene, propilparabene, acido benzoico, acido idrossibenzoico, benzoato di potassio, sorbato di potassio, benzoato di sodio,
- 20 propionato di sodio e/o acido sorbico. Esempi di conservanti alcolici esemplificativi includono, tuttavia senza limitazioni, etanolo, polietilenglicole, alcol benzilico, fenolo, composti fenolici, bisfenolo, clorobutanolo, idrossibenzoato e/o alcol fenilettilico. Esempi di conservanti acidi includono, tuttavia senza limitazioni, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-carotene, acido citrico, acido acetico, acido deidroascorbico, acido ascorbico, acido sorbico e/o acido fitico.
- 25 Altri conservanti includono, ma non sono limitati a, tocoferolo, tocoferolo acetato, deterossima

mesilato, cetrimide, idrossianisolo butilato (BHA), idrossianisolo butilato (BHT),
etilendiammina, sodio lauril solfato (SLS), sodio lauril etere solfato (SLES), sodio bisolfito,
metabisolfito di sodio, solfito di potassio, metabisolfito di potassio, GLYDANT PLUS[®],
PHENONIP[®], metilparaben, GERMALL[®]115, GERMABEN[®]II, NEOLONE[™], KATHON[™] e/o
5 EUXYL[®].

[0421] Esempi di agenti tamponanti includono, tuttavia senza limitazioni, soluzioni tampone di
citrato, soluzioni tampone di acetato, soluzioni tampone di fosfato, cloruro di ammonio,
carbonato di calcio, cloruro di calcio, citrato di calcio, glubionato di calcio, gluceptato di calcio,
gluconato di calcio, acido d-gluconico, glicerofosfato di calcio, lattato di calcio, lattobionato di
10 calcio, acido propanoico, levulinato di calcio, acido pentanoico, fosfato di calcio bibasico, acido
fosforico, fosfato di calcio tribasico, idrossido di calcio fosfato, acetato di potassio, cloruro di
potassio, gluconato di potassio, miscele di potassio, potassio dibasico fosfato, fosfato di potassio
monobasico, miscele di fosfato di potassio, acetato di sodio, bicarbonato di sodio, cloruro di
sodio, citrato di sodio, lattato di sodio, fosfato di sodio bibasico, fosfato di sodio monobasico,
15 miscele di fosfato di sodio, trometamina, tamponi aminosolfonati (ad es. HEPES), idrossido di
magnesio, idrossido di alluminio, acido alginico, acqua apirogena, soluzione salina isotonica,
soluzione fi Ringer, alcol etilico e/o loro combinazioni. Gli agenti lubrificanti possono essere
selezionati dal gruppo non limitativo costituito da stearato di magnesio, stearato di calcio, acido
stearico, silice, talco, malto, gliceril behenato, oli vegetali idrogenati, polietilenglicole, sodio
20 benzoato, sodio acetato, sodio cloruro, leucina, magnesio lauril solfato, sodio lauril solfato e
loro combinazioni.

[0422] Esempi di oli includono, tuttavia senza limitazioni, mandorla, nocciolo di albicocca,
avocado, babassu, bergamotto, semi di ribes nero, borragine, cade, camomilla, canola, cumino,
carnauba, ricino, cannella, burro di cacao, cocco, fegato di merluzzo, caffè, mais, semi di
25 cotone, emu, eucalipto, enotera, pesce, semi di lino, geraniolo, zucca, semi d'uva, nocciola,

issopo, miristato isopropilico, jojoba, noce kukui, lavandin, lavanda, limone, litsea cubeba, noce di macamia, malva, semi di mango, semi di schiuma di prato, visone, noce moscata, oliva, arancia, pesce specchio atlantico, palma, palmisti, nocciolo di pesca, arachidi, semi di papavero, semi di zucca, colza, crusca di riso, rosmarino, cartamo, legno di sandalo, sasquana, santoreggia, olivello spinoso, sesamo, burro di karitè, silicone, semi di soia, girasole, tea tree, cardo, tsubaki, vetiver, noce e oli di germe di grano nonché butil stearato, trigliceride caprilico, trigliceride caprico, ciclometicone, dietil sebacato, dimeticone 360, simeticone, isopropil miristato, olio minerale, ottildodecanolo, alcol oleilico, olio di silicone e/o loro combinazioni.

Formulazioni

10 **[0423]** Le composizioni di nanoparticelle possono includere un componente lipidico e uno o più componenti aggiuntivi, come un agente terapeutico e/o profilattico. Una composizione di nanoparticelle può essere progettata per una o più applicazioni o obiettivi specifici. Gli elementi di una composizione di nanoparticelle possono essere selezionati in base a una applicazione o un obiettivo specifico e/o in base all'efficacia, alla tossicità, alla spesa, alla facilità d'uso, alla
15 disponibilità o ad altre caratteristiche di uno o più elementi. Allo stesso modo, la specifica formulazione di una composizione di nanoparticelle può essere selezionata per una applicazione o un obiettivo specifico in base, ad esempio, all'efficacia e alla tossicità di specifiche combinazioni di elementi.

[0424] Il componente lipidico di una composizione di nanoparticelle può includere, ad esempio,
20 un lipide secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), un fosfolipide (come un lipide insaturo, ad es. DOPE o DSPC), un lipide PEG e un lipide strutturale. Gli elementi del componente lipidico possono essere forniti in frazioni specifiche.

[0425] In alcune forme di realizzazione, il componente lipidico di una composizione di
25 nanoparticelle include un lipide secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III),

(IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), un fosfolipide, un lipide PEG e un lipide strutturale. In determinate forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di nanoparticelle include da circa il 30% in moli a circa il 60% in moli di composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), da circa lo 0% in moli a circa il 30% in moli di fosfolipide, da circa il 18,5% in moli a circa il 48,5% in moli di lipide strutturale e da circa lo 0% in moli a circa il 10% in moli di lipide PEG, a condizione che la % molare totale non superi il 100%. In alcune forme di realizzazione, il componente lipidico della composizione di nanoparticelle include da circa il 35% in moli a circa il 55% in moli di composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), da circa il 5% in moli a circa il 25% in moli di fosfolipidi, da circa il 30% in moli a circa il 40% in moli di lipidi strutturali e da circa lo 0% in moli a circa il 10% in moli di lipidi PEG. In determinate forme di realizzazione, il componente lipidico include circa il 50% in moli di detto composto, circa il 10% in moli di fosfolipide, circa il 38,5% in moli di lipidi strutturali e circa l'1,5% in moli di lipide PEG. In altre forme di realizzazione, il componente lipidico include circa il 40% in moli di detto composto, circa il 20% in moli di fosfolipide, circa il 38,5% in moli di lipidi strutturali e circa l'1,5% in moli di lipide PEG. In alcune forme di realizzazione, il fosfolipide può essere DOPE o DSPC. In altre forme di realizzazione, il lipide PEG può essere PEG-DMG e/o il lipide strutturale può essere colesterolo.

20 **[0426]** Le composizioni di nanoparticelle possono essere progettate per una o più applicazioni o obiettivi specifici. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle può essere progettata per rilasciare un agente terapeutico e/o profilattico come un RNA in una particolare cellula, tessuto, organo o apparato o gruppo di essi nel corpo di un mammifero. Le proprietà fisicochimiche delle composizioni di nanoparticelle possono essere alterate al fine di aumentare la selettività per i bersagli corporei specifici. Ad esempio, le dimensioni delle particelle possono essere regolate in

base alle dimensioni della finestratura di diversi organi. L'agente terapeutico e/o profilattico incluso in una composizione di nanoparticelle può anche essere selezionato in base all'uno o più obiettivi di rilascio desiderati. Ad esempio, un agente terapeutico e/o profilattico può essere selezionato per una particolare indicazione, condizione, malattia o disturbo e/o per il rilascio in una particolare cellula, tessuto, organo o apparato o gruppo di essi (ad esempio, rilascio localizzato o specifico). In determinate forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle può includere un mRNA che codifica per un polipeptide di interesse in grado di essere tradotto all'interno di una cellula per produrre il polipeptide di interesse. Una tale composizione può essere progettata per essere specificamente rilasciata in un particolare organo.

5

10 In determinate forme di realizzazione, una composizione può essere progettata per essere rilasciata in modo specifico in un fegato di mammifero.

[0427] La quantità di un agente terapeutico e/o profilattico in una composizione di nanoparticelle può dipendere dalle dimensioni, dalla composizione, dal bersaglio e/o dall'applicazione desiderati o da altre proprietà della composizione di nanoparticelle, nonché dalle proprietà dell'agente terapeutico e/o profilattico. Ad esempio, la quantità di un RNA utile in una composizione di nanoparticelle può dipendere dalle dimensioni, dalla sequenza e da altre caratteristiche dell'RNA. Anche le quantità relative di un agente terapeutico e/o profilattico e di altri elementi (ad esempio, lipidi) in una composizione di nanoparticelle possono variare. In alcune forme di realizzazione, il rapporto peso/peso della componente lipidica rispetto a un agente terapeutico e/o profilattico in una composizione di nanoparticelle può variare da circa 5:1 a circa 60:1, come 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20: 1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1 e 60:1. Ad esempio, il rapporto peso/peso del componente lipidico rispetto a un agente terapeutico e/o profilattico può variare da circa 10:1 a circa 40:1. In alcune forme di realizzazione, il rapporto peso/peso è di circa 20:1. La quantità di un agente terapeutico e/o profilattico in una composizione di nanoparticelle può, ad esempio,

15

20

25

essere misurata usando la spettroscopia di assorbimento (ad esempio, spettroscopia ultravioletta-visibile).

[0428] In alcune forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle include uno o più RNA e l'uno o più RNA, lipidi e quantità di essi possono essere selezionati per fornire uno
5 specifico rapporto N:P. Il rapporto N:P della composizione si riferisce al rapporto molare degli atomi di azoto in uno o più lipidi rispetto al numero di gruppi fosfato in un RNA. In generale, si preferisce un rapporto N:P inferiore. L'uno o più RNA, lipidi e loro quantità possono essere selezionati per fornire un rapporto N:P da circa 2:1 a circa 30:1, come 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26:1, 28:1 o 30:1. In determinate forme di
10 realizzazione, il rapporto N:P può variare da circa 2:1 a circa 8:1. In altre forme di realizzazione, il rapporto N:P va da circa 5:1 a circa 8:1. Ad esempio, il rapporto N:P può essere di circa 5,0:1, circa 5,5:1, circa 5,67:1, circa 6,0:1, circa 6,5:1 o circa 7,0:1. Ad esempio, il rapporto N:P può essere di circa 5,67:1.

Proprietà fisiche

15 [0429] Le caratteristiche di una composizione di nanoparticelle possono dipendere dai suoi componenti. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle che include il colesterolo come lipide strutturale può avere caratteristiche diverse rispetto a una composizione di nanoparticelle che include un diverso lipide strutturale. Allo stesso modo, le caratteristiche di una
20 composizione di nanoparticelle possono dipendere dalle quantità assolute o relative dei suoi componenti. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle che include una frazione molare superiore di un fosfolipide può avere caratteristiche diverse rispetto a una composizione di nanoparticelle che include una frazione molare inferiore di un fosfolipide. Le caratteristiche possono variare anche a seconda del metodo e delle condizioni di preparazione della composizione di nanoparticelle.

25 [0430] Le composizioni di nanoparticelle possono essere caratterizzate da una varietà di metodi.

Ad esempio, la microscopia (ad esempio la microscopia elettronica a trasmissione o la microscopia elettronica a scansione) può essere utilizzata per esaminare la morfologia e la distribuzione dimensionale di una composizione di nanoparticelle. La diffusione dinamica della luce o la potenziometria (ad esempio, titolazioni potenziometriche) possono essere utilizzate per misurare i potenziali zeta. La diffusione dinamica della luce può anche essere utilizzata per determinare le granulometrie. Strumenti come lo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Regno Unito) possono essere utilizzati anche per misurare molteplici caratteristiche di una composizione di nanoparticelle, come la granulometria, l'indice di polidispersità e il potenziale zeta.

5 [0431] La dimensione media di una composizione di nanoparticelle può essere compresa tra decine di nm e centinaia di nm. Ad esempio, la dimensione media può variare da circa 40 nm a circa 150 nm, come circa 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm o 150 nm. In alcune forme di realizzazione, la dimensione media di una
15 composizione di nanoparticelle può essere da circa 50 nm a circa 100 nm, da circa 50 nm a circa 90 nm, da circa 50 nm a circa 80 nm, da circa 50 nm a circa 70 nm, da da circa 50 nm a circa 60 nm, da circa 60 nm a circa 100 nm, da circa 60 nm a circa 90 nm, da circa 60 nm a circa 80 nm, da circa 60 nm a circa 70 nm, da circa 70 nm a circa 100 nm, da circa 70 nm a circa 90 nm, da circa 70 nm a circa 80 nm, da circa 80 nm a circa 100 nm, da circa 80 nm a circa 90 nm, o da
20 circa 90 nm a circa 100 nm. In alcune forme di realizzazione, la dimensione media di una composizione di nanoparticelle può variare da circa 70 nm a circa 100 nm. In alcune forme di realizzazione, la dimensione media può essere di circa 80 nm. In altre forme di realizzazione, la dimensione media può essere di circa 100 nm.

[0432] Una composizione di nanoparticelle può essere relativamente omogenea. Un indice di polidispersione può essere utilizzato per indicare l'omogeneità di una composizione di
25

nanoparticelle, ad esempio la distribuzione delle dimensioni delle particelle delle composizioni di nanoparticelle. Un indice di polidispersione piccolo (ad es., inferiore a 0,3) indica generalmente una distribuzione granulometrica stretta. Una composizione di nanoparticelle può avere un indice di polidispersità da circa 0 a circa 0,25, come di 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 5 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 o 0,25. In determinate forme di realizzazione, l'indice di polidispersità di una composizione di nanoparticelle può variare da circa 0,10 a circa 0,20.

[0433] Il potenziale zeta di una composizione di nanoparticelle può essere utilizzato per indicare il potenziale elettrocinetico della composizione. Ad esempio, il potenziale zeta può descrivere la 10 carica superficiale di una composizione di nanoparticelle. Sono generalmente desiderabili composizioni di nanoparticelle con cariche relativamente basse, positive o negative, poiché specie più cariche possono interagire in modo indesiderato con cellule, tessuti e altri elementi del corpo. In alcune forme di realizzazione, il potenziale zeta di una composizione di nanoparticelle può variare da circa -10 mV a circa +20 mV, da circa -10 mV a circa +15 mV, da 15 circa -10 mV a circa +10 mV, da da circa -10 mV a circa +5 mV, da circa -10 mV a circa 0 mV, da circa -10 mV a circa -5 mV, da circa -5 mV a circa +20 mV, da circa -5 mV a circa +15 mV, da circa -5 mV a circa +10 mV, da circa -5 mV a circa +5 mV, da circa -5 mV a circa 0 mV, da circa 0 mV a circa +20 mV, da circa 0 mV a circa +15 mV, da circa 0 mV a circa +10 mV, da circa 0 mV a circa +5 mV, da circa +5 mV a circa +20 mV, da circa +5 mV a circa +15 mV, 20 oppure da circa da +5 mV a circa +10 mV.

[0434] L'efficienza dell'incapsulamento di un agente terapeutico e/o profilattico descrive la quantità di agente terapeutico e/o profilattico che è incapsulata o altrimenti associata a una composizione di nanoparticelle dopo la preparazione, rispetto alla quantità iniziale fornita. L'efficienza di incapsulamento è desiderabilmente elevata (ad esempio, vicina al 100%). 25 L'efficienza di incapsulamento può essere misurata, ad esempio, confrontando la quantità di

agente terapeutico e/o profilattico in una soluzione contenente la composizione di nanoparticelle prima e dopo la rottura della composizione di nanoparticelle con uno o più solventi organici o detergenti. La fluorescenza può essere utilizzata per misurare la quantità di agente terapeutico e/o profilattico libero (ad esempio, RNA) in una soluzione. Per le composizioni di nanoparticelle descritte nella presente, l'efficienza di incapsulamento di un agente terapeutico e/o profilattico può essere almeno del 50%, ad esempio del 50%, del 55%, del 60%, del 65%, del 70%, del 75%, dell'80%, dell'85%, del 90%, del 91%, del 92%, del 93%, del 94%, del 95%, del 96%, del 97%, del 98%, del 99% o del 100%. In alcune forme di realizzazione, l'efficienza di incapsulamento può essere almeno dell'80%. In determinate forme di realizzazione, l'efficienza di incapsulamento può essere almeno del 90%.

[0435] Una composizione di nanoparticelle può opzionalmente comprendere uno o più rivestimenti. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle può essere formulata in una capsula, pellicola o compressa avente un rivestimento. Una capsula, una pellicola o una compressa comprendente una composizione descritto nel presente contesto può avere qualsiasi dimensione, resistenza alla trazione, durezza o densità utile.

Composizioni farmaceutiche

[0436] Le composizioni di nanoparticelle possono essere formulate nel complesso o in parte come composizioni farmaceutiche. Le composizioni farmaceutiche possono includere una o più composizioni di nanoparticelle. Ad esempio, una composizione farmaceutica può includere una o più composizioni di nanoparticelle che includono una o più diverse agenti terapeutici e/o profilattici. Le composizioni farmaceutiche possono inoltre includere uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili o ingredienti accessori come quelli descritti nella presente. Linee guida generali per la formulazione e la produzione di composizioni e agenti farmaceutici sono disponibili, ad esempio, in Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21a Edizione, A. R. Gennaro; Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006. Eccipienti e ingredienti

accessori convenzionali possono essere utilizzati in qualsiasi composizione farmaceutica, eccetto nella misura in cui qualsiasi eccipiente o ingrediente accessorio convenzionale possa essere incompatibile con uno o più componenti di una composizione di nanoparticelle. Un eccipiente o un ingrediente accessorio può essere incompatibile con un componente di una
5 composizione di nanoparticelle se la sua combinazione con il componente può provocare un effetto biologico indesiderabile o un effetto altrimenti dannoso.

[0437] In alcune forme di realizzazione, uno o più eccipienti o ingredienti accessori possono costituire più del 50% della massa o del volume totale di una composizione farmaceutica che include una composizione di nanoparticelle. Ad esempio, l'uno o più eccipienti o ingredienti
10 accessori possono costituire il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90% o più di una convenzione farmaceutica. In alcune forme di realizzazione, un eccipiente farmaceuticamente accettabile è puro almeno al 95%, almeno al 96%, almeno al 97%, almeno al 98%, almeno al 99% o al 100%. In alcune forme di realizzazione, un eccipiente è approvato per l'uso negli esseri umani e per l'uso veterinario. In alcune forme di realizzazione, un eccipiente è approvato dalla Food and
15 Drug Administration degli Stati Uniti. In alcune forme di realizzazione, un eccipiente è di grado farmaceutico. In alcune forme di realizzazione, un eccipiente soddisfa gli standard della Farmacopea statunitense (USP), della Farmacopea europea (EP), della Farmacopea britannica e/o della Farmacopea internazionale.

[0438] Le quantità relative dell'una o più composizioni di nanoparticelle, dell'uno o più
20 eccipienti farmaceuticamente accettabili e/o di eventuali ingredienti aggiuntivi in una composizione farmaceutica in conformità con la presente descrizione varieranno, a seconda dell'identità, delle dimensioni e/o delle condizioni del soggetto trattato e ulteriormente a seconda della via attraverso la quale deve essere somministrata la composizione. A titolo di esempio, una composizione farmaceutica può comprendere tra lo 0,1% e il 100% (peso/peso) di una o più
25 composizioni di nanoparticelle.

[0439] In determinate forme di realizzazione, le composizioni di nanoparticelle e/o le composizioni farmaceutiche della descrizione vengono refrigerate o congelate per la conservazione e/o la spedizione (ad esempio, essendo conservate a una temperatura di 4 °C o inferiore, come una temperatura compresa tra circa -150 °C e circa 0 °C o tra circa -80 °C e circa -20 °C (ad esempio circa -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C). Ad esempio, la composizione farmaceutica comprendente un composto di una qualsiasi delle formule (I)-(IV) è una soluzione refrigerata per la conservazione e/o la spedizione, ad esempio, a circa -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C o -80 °C. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione riguarda anche un metodo per aumentare la stabilità delle composizioni di nanoparticelle e/o delle composizioni farmaceutiche comprendenti un composto di una qualsiasi delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I) immagazzinando le composizioni di nanoparticelle e/o composizioni farmaceutiche a una temperatura di 4 °C o inferiore, come una temperatura compresa tra circa -150 °C e circa 0 °C o tra circa -80 °C e circa -20 °C, ad esempio circa -5 °C, -10 °C, -15 °C, -20 °C, -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -130 °C o -150 °C). Ad esempio, le composizioni di nanoparticelle e/o le composizioni farmaceutiche descritte nella presente sono stabili per circa almeno 1 settimana, almeno 2 settimane, almeno 3 settimane, almeno 4 settimane, almeno 5 settimane, almeno 6 settimane, almeno 1 mese, almeno 2 mesi, almeno 4 mesi, almeno 6 mesi, almeno 8 mesi, almeno 10 mesi, almeno 12 mesi, almeno 14 mesi, almeno 16 mesi, almeno 18 mesi, almeno 20 mesi, almeno 22 mesi, o almeno 24 mesi, ad esempio, a una temperatura di 4 °C o inferiore (ad esempio, tra circa 4 °C e -20 °C). In una forma di realizzazione, la formulazione è stabilizzata per almeno 4 settimane a circa 4 °C. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della divulgazione comprende una composizione di nanoparticelle qui divulgata e un veicolo farmaceuticamente accettabile selezionato da uno o più tra Tris, un acetato (ad

esempio acetato di sodio), un citrato (ad esempio citrato di sodio), soluzione salina, PBS, e saccarosio. In determinate forme di realizzazione, la composizione farmaceutica della descrizione ha un valore di pH compreso tra circa 7 e 8 (ad esempio, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 o 8,0, o tra 7,5 e 8 o tra 7 e 7,8). Ad esempio, una composizione farmaceutica della descrizione comprende una composizione di nanoparticelle descritta nella presente, Tris, soluzione salina e saccarosio, e ha un pH di circa 7,5-8, che è adatto per la conservazione e/o la spedizione, ad esempio, a circa -20 °C. Ad esempio, una composizione farmaceutica della descrizione comprende una composizione di nanoparticelle descritta nella presente e PBS e ha un pH di circa 7-7,8, adatto per la conservazione e/o la spedizione, ad esempio, a circa 4 °C o meno. "Stabilità", "stabilizzato" e "stabile" nel contesto della presente descrizione si riferisce alla resistenza delle composizioni di nanoparticelle e/o delle composizioni farmaceutiche descritte nella presente ai cambiamenti chimici o fisici (ad esempio degradazione, cambiamento della granulometria, aggregazione, cambiamento di incapsulamento, ecc.) in determinate condizioni di produzione, preparazione, trasporto, conservazione e/o utilizzo, ad esempio quando viene applicata una sollecitazione come forza di taglio, sollecitazione da congelamento-scongelo, ecc.

[0440] Le composizioni di nanoparticelle e/o le composizioni farmaceutiche che includono una o più composizioni di nanoparticelle possono essere somministrate a qualsiasi paziente o soggetto, inclusi quei pazienti o soggetti che possono beneficiare di un effetto terapeutico fornito dal rilascio di un agente terapeutico e/o profilattico in una/o o più cellule, tessuti, organi o apparatispecifici o gruppi di essi, come l'apparato renale. Sebbene le descrizioni qui fornite di composizioni di nanoparticelle e composizioni farmaceutiche che includono le composizioni di nanoparticelle siano principalmente dirette a composizioni che sono adatte per la somministrazione all'uomo, l'esperto comprenderà che tali composizioni sono generalmente adatte per la somministrazione a qualsiasi altro mammifero. La modifica di composizioni adatte

per la somministrazione agli esseri umani al fine di rendere le composizioni adatte per la somministrazione a vari animali è ben compresa e il farmacologo veterinario esperto con competenza ordinaria può progettare e/o eseguire tale modifica con la semplice sperimentazione ordinaria, se necessaria. I soggetti per i quali è contemplata la somministrazione delle
5 composizioni includono, tuttavia senza limitazioni, esseri umani, altri primati e altri mammiferi, inclusi mammiferi commercialmente rilevanti come bovini, maiali, cavalli, pecore, gatti, cani, topi e/o ratti.

[0441] Una composizione farmaceutica che include una o più composizioni di nanoparticelle può essere preparata con qualsiasi metodo noto o sviluppato in seguito nella tecnica della
10 farmacologia. In generale, tali metodi preparatori comprendono l'associazione del principio attivo con un eccipiente e/o uno o più altri ingredienti accessori, e poi, se desiderabile o necessario, la divisione, la modellatura e/o il confezionamento del prodotto in un'unità singola o multi-dose desiderata.

[0442] Una composizione farmaceutica secondo la presente descrizione può essere preparata,
15 confezionata e/o venduta sfusa, come una singola dose unitaria e/o come una pluralità di singole dosi unitarie. Come utilizzato nella presente, una "dose unitaria" è una quantità discreta della composizione farmaceutica comprendente una quantità predeterminata del principio attivo (ad esempio la composizione di nanoparticelle). La quantità del principio attivo è generalmente uguale al dosaggio del principio attivo che verrebbe somministrato a un soggetto e/o una
20 frazione opportuna di tale dosaggio come, ad esempio, metà o un terzo di tale dosaggio.

[0443] Le composizioni farmaceutiche possono essere preparate in una varietà di forme adatte a una varietà di vie e metodi di somministrazione. Ad esempio, le composizioni farmaceutiche possono essere preparate in forme di dosaggio liquide (ad esempio emulsioni, microemulsioni, nanoemulsioni, soluzioni, sospensioni, sciroppi ed elisir), forme iniettabili, forme di dosaggio
25 solide (ad esempio capsule, compresse, pillole, polveri e granuli), forme di dosaggio per

somministrazione topica e/o transdermica (ad esempio, unguenti, paste, creme, lozioni, gel, polveri, soluzioni, spray, inalanti e cerotti), sospensioni, polveri e altre forme.

[0444] Le forme di dosaggio liquide per la somministrazione orale e parenterale includono, tuttavia senza limitazione, emulsioni, microemulsioni, nanoemulsioni, soluzioni, sospensioni, 5 sciroppi e/o elisir farmaceuticamente accettabili. In aggiunta ai principi attivi, le forme di dosaggio liquide possono comprendere diluenti inerti comunemente utilizzati nella tecnica come, ad esempio, acqua o altri solventi, agenti solubilizzanti ed emulsionanti quali alcol etilico, alcol isopropilico, etilcarbonato, etilacetato, alcol benzilico, benzilbenzoato, propilenglicole, 1,3-butilenglicole, oli (in particolare oli di semi di cotone, di arachidi, di mais, 10 di germe, di oliva, di ricino e di sesamo), glicerolo, alcol di tetraidrofurfurilico, polietilenglicoli ed esteri di acido grasso di sorbitano e loro miscele. Oltre ai diluenti inerti, le composizioni orali possono includere agenti terapeutici e/o profilattici aggiuntivi, agenti aggiuntivi come agenti umettanti, agenti emulsionanti e sospensivanti, agenti edulcoranti, aromatizzanti e/o profumanti. In determinate forme di realizzazione per la somministrazione parenterale, le composizioni 15 vengono miscelate con agenti solubilizzanti come Cremophor[®], alcoli, oli, oli modificati, glicoli, polisorbati, ciclodestrine, polimeri e/o loro combinazioni.

[0445] Preparazioni iniettabili, ad esempio, sospensioni acquose o oleose iniettabili sterili possono essere formulate secondo la tecnica nota usando agenti disperdenti o umettanti e agenti sospensivanti adatti. I preparati iniettabili sterili possono essere soluzioni iniettabili sterili, 20 sospensioni e/o emulsioni in diluenti e/o solventi parenteralmente accettabili non tossici, ad esempio, come soluzione in 1,3-butandiololo. Tra i veicoli e solventi accettabili che possono essere impiegati vi sono acqua, soluzione di Ringer, USP e soluzione isotonica di cloruro di sodio. Oli fissi sterili sono tradizionalmente impiegati come solvente o terreno di sospensione. A questo scopo può essere impiegato qualsiasi olio fisso blando inclusi mono- o digliceridi 25 sintetici. Acidi grassi come l'acido oleico possono essere utilizzati nella preparazione di

iniettabili.

[0446] Le formulazioni iniettabili possono essere sterilizzate ad esempio mediante filtrazione attraverso un filtro di trattenimento dei batteri e/o incorporando agenti sterilizzanti sotto forma di composizioni solide sterili che possono essere disciolte o disperse in acqua sterile o altro terreno iniettabile sterile prima dell'uso.

[0447] Al fine di prolungare l'effetto di un principio attivo, è spesso desiderabile rallentare l'assorbimento del principio attivo dall'iniezione sottocutanea o intramuscolare. Questo può essere compiuto mediante l'uso di una sospensione liquida di materiale cristallino o amorfo con scarsa idrosolubilità. La velocità di assorbimento del farmaco quindi dipende dalla sua velocità di dissoluzione che, a sua volta, può dipendere dalla dimensione dei cristalli e dalla forma cristallina. In alternativa, l'assorbimento ritardato di una forma di farmaco somministrata per via parenterale viene ottenuto dissolvendo o sospendendo il farmaco in un veicolo oleoso. Le forme di depot iniettabili sono realizzate formando matrici microincapsulate del farmaco in polimeri biodegradabili come polilattide-poliglicolide. A seconda del rapporto tra farmaco e polimero e della natura dello specifico polimero impiegato, è possibile controllare la velocità di rilascio del farmaco. Esempi di altri polimeri biodegradabili includono poli(ortoesteri) e poli(anidridi). Formulazioni iniettabili di deposito vengono preparate intrappolando il farmaco in liposomi o microemulsioni che sono compatibili con i tessuti corporei.

[0448] Le composizioni per la somministrazione rettale o vaginale sono tipicamente supposte che possono essere preparate mescolando le composizioni con eccipienti non irritanti adatti come burro di cacao, polietilenglicole o una cera per supposte che sono solidi a temperatura ambiente ma liquidi a temperatura corporea e quindi si sciolgono nel retto o nella cavità vaginale e rilasciano il principio attivo.

[0449] Forme di dosaggio solide per la somministrazione orale includono capsule, compresse, pillole, pellicole, polveri e granuli. In tali forme di dosaggio solide, un principio attivo viene

miscelato con almeno un eccipiente inerte farmaceuticamente accettabile come citrato di sodio o fosfato dicalcico e/o riempitivi o estensori (ad esempio, amidi, lattosio, saccarosio, glucosio, mannitolo e acido silicico), leganti (ad esempio, carbossimetilcellulosa, alginati, gelatina, polivinilpirrolidinone, saccarosio e acacia), umettanti (ad esempio, glicerolo), agenti disgreganti
5 (ad esempio, agar, carbonato di calcio, fecola di patate o tapioca, acido alginico, alcuni silicati e carbonato di sodio), agenti ritardanti di soluzione (ad esempio, paraffina), acceleratori di assorbimento (ad esempio, composti di ammonio quaternario), agenti umettanti (ad esempio, alcool cetilico e glicerolo monostearato), assorbenti (ad esempio, caolino e argilla bentonitica) e
10 lubrificanti (ad esempio, talco, calcio stearato, magnesio stearato, polietilenglicoli solidi, sodio laurilsolfato) e loro miscele. Nel caso di capsule, compresse e pillole, le forme di dosaggio possono comprendere agenti tamponanti.

[0450] Composizioni solide di tipo simile possono essere impiegate come riempitivi in capsule di gelatina con riempimento molli e dure utilizzando tali eccipienti come lattosio o zuccheri del latte nonché polietilenglicoli dall'elevato peso molecolare e simili. Forme di dosaggio solide di
15 compresse, confetti, capsule, pillole e granuli possono essere preparate con rivestimenti e gusci come rivestimenti enterici e altri rivestimenti ben noti nella tecnica della formulazione farmaceutica. Possono opzionalmente comprendere agenti opacizzanti e possono essere di una composizione tale da rilasciare solo l'uno o più principi attivi, o preferenzialmente, in una determinata parte del tratto intestinale, opzionalmente, in un modo ritardato. Esempi di
20 composizioni incorporanti che possono essere utilizzate includono sostanze polimeriche e cere. Composizioni solide di tipo simile possono essere impiegate come riempitivi in capsule di gelatina con riempimento molle e duro utilizzando tali eccipienti come lattosio o zuccheri del latte nonché polietilenglicoli dall'elevato peso molecolare e simili.

[0451] Le forme di dosaggio per la somministrazione topica e/o transdermica di una
25 composizione possono includere unguenti, paste, creme, lozioni, gel, polveri, soluzioni, spray,

inalanti e/o cerotti. Generalmente, un principio attivo è miscelato in condizioni sterili con un eccipiente farmaceuticamente accettabile e/o possono essere richiesti eventuali conservanti e/o tamponi necessari. Inoltre, la presente descrizione contempla l'uso di cerotti transdermici, che spesso hanno l'ulteriore vantaggio di fornire il rilascio controllato di un composto al corpo. Tali
5 forme di dosaggio possono essere preparate, ad esempio, dissolvendo e/o erogando il composto nel mezzo adatto. In alternativa o in aggiunta, la velocità può essere controllata fornendo una membrana di controllo della velocità e/o disperdendo il composto in una matrice e/o gel polimerica/o.

[0452] Dispositivi adatti per l'uso nella somministrazione di composizioni farmaceutiche
10 intradermiche qui descritti includono dispositivi ad aghi corti come quelli descritti nei brevetti U.S. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; e 5.417.662. Le composizioni intradermiche possono essere somministrate da dispositivi che limitano la lunghezza di penetrazione effettiva di un ago nella pelle, come quelli descritti nella pubblicazione PCT WO 99/34850e loro equivalenti funzionali. Dispositivi di iniezione a getto
15 che rilasciano composizioni liquide nel derma tramite un iniettore a getto di liquido e/o tramite un ago che perfora lo strato corneo e produce un getto che raggiunge il derma. I dispositivi di iniezione a getto sono descritti, ad esempio, nei brevetti U.S. 5,480,381; 5,599,302; 5,334,144; 5,993,412; 5,649,912; 5,569,189; 5,704,911; 5,383,851; 5,893,397; 5,466,220; 5,339,163; 5,312,335; 5,503,627; 5,064,413; 5,520,639; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 4,940,460; e
20 nelle pubblicazioni PCT WO 97/37705 d WO 97/13537. Sono adatti dispositivi balistici di rilascio di polvere/particelle che utilizzano gas compresso per accelerare il vaccino in polvere attraverso gli strati esterni della pelle fino al derma. In alternativa o in aggiunta, si possono utilizzare siringhe tradizionali nel metodo classico di somministrazione intradermica mantoux.

[0453] Le formulazioni adatte per la somministrazione topica includono, tuttavia senza
25 limitazioni, preparazioni liquide e/o semiliquide come linimenti, lozioni, emulsioni olio in acqua

e/o acqua in olio come creme, unguenti e/o paste, e /o soluzioni e/o sospensioni. Le formulazioni somministrabili per via topica possono, ad esempio, comprendere da circa l'1% a circa il 10% (p/p) di principio attivo, sebbene la concentrazione del principio attivo possa essere elevata quanto il limite di solubilità del principio attivo nel solvente. Le formulazioni per la somministrazione topica possono inoltre comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente.

[0454] Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata e/o venduta in una formulazione adatta per la somministrazione polmonare attraverso la cavità buccale. Una tale formulazione può comprendere particelle secche che comprendono il principio attivo. Tali composizioni sono opportunamente sotto forma di polveri secche per la somministrazione utilizzando un dispositivo comprendente un serbatoio di polvere secca a cui può essere diretto un flusso di propellente per disperdere la polvere e/o utilizzando un contenitore di erogazione di solvente/polvere autopropellente come un dispositivo comprendente il principio attivo disciolto e/o sospeso in un propellente a basso punto di ebollizione in un contenitore sigillato. Le composizioni in polvere secca possono includere un diluente solido in polvere fine come lo zucchero e sono opportunamente fornite in una forma di dose unitaria.

[0455] I propellenti a basso punto di ebollizione generalmente includono propellenti liquidi aventi un punto di ebollizione inferiore a 18,3 °C (65 °F) a pressione atmosferica. Generalmente il propellente può costituire dal 50% al 99,9% (p/p) della composizione e il principio attivo può costituire dallo 0,1% al 20% (p/p) della composizione. Un propellente può inoltre comprendere ingredienti aggiuntivi come un tensioattivo non ionico liquido e/o anionico solido e/o un diluente solido (che può avere una granulometria dello stesso ordine delle particelle che comprendono il principio attivo).

[0456] Le composizioni farmaceutiche formulate per il rilascio polmonare possono fornire un principio attivo sotto forma di goccioline di una soluzione e/o sospensione. Tali formulazioni

possono essere preparate, confezionate, e/o vendute come soluzioni acquose e/o alcoliche diluite e/o sospensioni, opzionalmente sterili, comprendenti il principio attivo, e possono essere opportunamente somministrate utilizzando qualsiasi dispositivo di nebulizzazione e/o atomizzazione. Tali formulazioni possono inoltre comprendere uno o più ingredienti aggiuntivi
5 inclusi, tuttavia senza limitazioni, un agente aromatizzante come saccarina sodica, un olio volatile, un agente tamponante, un agente tensioattivo, e/o un conservante come il metilidrossibenzoato. Le goccioline fornite con questa via di somministrazione possono avere un diametro medio nell'intervallo da circa 1 a circa 200 nm.

[0457] Le formulazioni descritte nel presente contesto essendo utili per la somministrazione
10 polmonare sono utili per la somministrazione intranasale di una composizione farmaceutica. Un'altra formulazione adatta per la somministrazione intranasale è una polvere grossolana comprendente il principio attivo e avente una particella media da circa 0,2 a 500 µm. Tale formulazione viene somministrata nel modo in cui si assume il tabacco da fiuto, vale a dire mediante inalazione rapida attraverso il passaggio nasale da un contenitore della polvere tenuto
15 vicino al naso.

[0458] Le formulazioni adatte per la somministrazione nasale possono, ad esempio, comprendere da circa lo 0,1% (p/p) e fino al 100% (p/p) del principio attivo e può comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente. Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata, e/o venduta in una formulazione adatta alla
20 somministrazione buccale. Tali formulazioni possono, ad esempio, essere sotto forma di compresse e/o pastiglie realizzate con metodi tradizionali e possono [comprendere], ad esempio, dallo 0,1% al 20% (p/p) del principio attivo, il resto comprendendo una composizione oralmente solubile e/o degradabile e, opzionalmente, uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nella presente. In alternativa, le formulazioni adatte per la somministrazione buccale
25 possono comprendere una polvere e/o una soluzione aerosolizzata e/o atomizzata e/o sospensione

comprendente il principio attivo. Tali formulazioni in polvere, aerosolizzate e/o aerosolizzate, quando disperse, possono avere una granulometria e/o dimensione delle goccioline media nell'intervallo da circa 0,1 a circa 200 nm, e possono inoltre comprendere uno o più degli ingredienti aggiuntivi descritti nel presente contesto.

- 5 [0459] Una composizione farmaceutica può essere preparata, confezionata, e/o venduta in una formulazione adatta alla somministrazione oftalmica. Tali formulazioni possono, per esempio, essere sotto forma di gocce oculari comprendenti, ad esempio, una soluzione e/o sospensione del principio attivo allo 0,1/1,0% (p/p) in un eccipiente liquido acquoso o oleoso. Tali gocce possono inoltre comprendere agenti tamponanti, sali, e/o uno o più eventuali ingredienti
- 10 aggiuntivi descritti nel presente contesto. Altre formulazioni somministrabili oftalmicamente che sono utili includono quelle che comprendono il principio attivo in forma microcristallina e/o in una preparazione liposomiale. Gocce auricolari e/o gocce oculari sono contemplate come rientranti nell'ambito della presente descrizione.

Metodi di produzione dei polipeptidi nelle cellule

- 15 [0460] La presente descrizione fornisce metodi per produrre un polipeptide di interesse in una cellula di mammifero. I metodi per produrre polipeptidi prevedono la messa a contatto di una cellula con una composizione di nanoparticelle che include un mRNA che codifica per il polipeptide di interesse. Dopo aver messo a contatto la cellula con la composizione di nanoparticelle, l'mRNA può essere raccolto e tradotto nella cellula per produrre il polipeptide di
- 20 interesse.

- [0461] In generale, la fase di messa a contatto di una cellula di mammifero con una composizione di nanoparticelle che include un mRNA che codifica per un polipeptide di interesse può essere eseguita *in vivo*, *ex vivo*, in coltura o *in vitro*. La quantità di composizione di nanoparticelle a contatto con una cellula, e/o la quantità di mRNA in essa contenuta, può
- 25 dipendere dal tipo di cellula o tessuto con cui viene messa a contatto, dal mezzo di

somministrazione, dalle caratteristiche fiso-chimiche della composizione di nanoparticelle e dall'mRNA (ad esempio, dimensione, carica e composizione chimica) ivi contenuto e altri fattori. In generale, una quantità efficace della composizione di nanoparticelle consentirà un'efficiente produzione di polipeptidi nella cellula. Le metriche per l'efficienza possono includere la traduzione del polipeptide (indicata dall'espressione del polipeptide), il livello di degradazione dell'mRNA e gli indicatori della risposta immunitaria.

[0462] La fase di messa a contatto di una composizione di nanoparticelle che include un mRNA con una cellula può comportare o causare trasfezione. Un fosfolipide incluso nel componente lipidico di una composizione di nanoparticelle può facilitare la trasfezione e/o aumentare l'efficienza di trasfezione, ad esempio, interagendo e/o fondendosi con una membrana cellulare o intracellulare. La trasfezione può consentire la traduzione dell'mRNA all'interno della cellula.

[0463] In alcune forme di realizzazione, le composizioni di nanoparticelle qui descritte possono essere utilizzate terapeuticamente. Ad esempio, un mRNA incluso in una composizione di nanoparticelle può codificare un polipeptide terapeutico (ad esempio, in una regione traducibile) e produrre il polipeptide terapeutico in seguito al contatto e/o all'ingresso (ad esempio, trasfezione) in una cellula. In altre forme di realizzazione, un mRNA incluso in una composizione di nanoparticelle può codificare un polipeptide che può migliorare o aumentare l'immunità di un soggetto. Ad esempio, un mRNA può codificare per un fattore stimolante le colonie di granulociti o trastuzumab.

[0464] In determinate forme di realizzazione, un mRNA incluso in una composizione di nanoparticelle può codificare per un polipeptide ricombinante che può sostituire uno o più polipeptidi che possono essere sostanzialmente assenti in una cellula messa a contatto con la composizione di nanoparticelle. L'uno o più polipeptidi sostanzialmente assenti possono mancare a causa di una mutazione genetica del gene codificante o di una sua via regolatoria. In alternativa, un polipeptide ricombinante prodotto dalla traduzione dell'mRNA può

antagonizzare l'attività di una proteina endogena presente nella, sulla superficie della o secreta dalla cellula. Un polipeptide ricombinante antagonista può essere desiderabile per combattere gli effetti deleteri causati dalle attività della proteina endogena, come attività alterate o localizzazione causata dalla mutazione. In un'altra alternativa, un polipeptide ricombinante
5 prodotto dalla traduzione dell'mRNA può antagonizzare indirettamente o direttamente l'attività di una frazione biologica presente nella, sulla superficie della o secreta dalla cellula. Frazioni biologiche antagonizzate possono includere, ma non sono limitate a, lipidi (ad esempio, colesterolo), lipoproteine (ad esempio, lipoproteine a bassa densità), acidi nucleici, carboidrati e tossine di piccole molecole. I polipeptidi ricombinanti prodotti dalla traduzione dell'mRNA
10 possono essere ingegnerizzati per la localizzazione all'interno della cellula, come all'interno di un compartimento specifico come il nucleo, oppure possono essere ingegnerizzati per la secrezione dalla cellula o per la traslocazione alla membrana plasmatica della cellula.

[0465] In alcune forme di realizzazione, la messa a contatto di una cellula con una composizione di nanoparticelle che include un mRNA può ridurre la risposta immunitaria innata
15 di una cellula a un acido nucleico esogeno. Una cellula può essere messa a contatto con una prima composizione di nanoparticelle che include una prima quantità di un primo mRNA esogeno includente una regione traducibile e il livello della risposta immunitaria innata della cellula al primo mRNA esogeno può essere determinato. Successivamente, la cellula può essere messa a contatto con una seconda composizione che include una seconda quantità del primo
20 mRNA esogeno, la seconda quantità essendo una quantità minore del primo mRNA esogeno rispetto alla prima quantità. In alternativa, la seconda composizione può includere una prima quantità di un secondo mRNA esogeno che è diverso dal primo mRNA esogeno. Le fasi di messa a contatto della cellula con la prima e la seconda composizione possono essere ripetute una o più volte. Inoltre, l'efficienza della produzione di polipeptidi (ad esempio, la traduzione)
25 nella cellula può essere opzionalmente determinata e la cellula può essere rimessa a contatto

ripetutamente con la prima e/o la seconda composizione fino a raggiungere un'efficienza di produzione di proteine bersaglio.

[0466] In alcune forme di realizzazione, un metodo per produrre un polipeptide di interesse in una cellula di mammifero prevede il contatto della cellula con una composizione di nanoparticelle che include (i) un componente lipidico che include un fosfolipide, un lipide strutturale, un lipide PEG e un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I), come qui descritto; e (ii) un mRNA codificante il polipeptide di interesse, per cui l'mRNA è in grado di essere tradotto nella cellula per produrre il polipeptide di interesse.

10 ***Metodi di rilascio di agenti terapeutici a cellule e organi***

[0467] La presente descrizione fornisce metodi per rilasciare un agente terapeutico e/o profilattico in una cellula o un organo di mammifero. Il rilascio di un agente terapeutico e/o profilattico in una cellula prevede la somministrazione di una composizione di nanoparticelle che include l'agente terapeutico e/o profilattico a un soggetto, in cui la somministrazione della composizione prevede la messa a contatto della cellula con la composizione. Ad esempio, una proteina, un agente citotossico, uno ione radioattivo, un agente chemioterapico o un acido nucleico (come un RNA, ad esempio un mRNA) possono essere rilasciati in una cellula o un organo. Nel caso in cui un agente terapeutico e/o profilattico sia un mRNA, al contatto di una cellula con la composizione di nanoparticelle, un mRNA traducibile può essere tradotto nella cellula per produrre un polipeptide di interesse. Tuttavia, anche gli mRNA che sono sostanzialmente non traducibili possono essere rilasciati nelle cellule. Gli mRNA sostanzialmente non traducibili possono essere utili come vaccini e/o possono sequestrare componenti traduzionali di una cellula per ridurre l'espressione di altre specie nella cellula.

[0468] In alcune forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle può mirare a un particolare tipo o classe di cellule (ad esempio, cellule di un particolare organo o suo apparato).

Ad esempio, una composizione di nanoparticelle che include un un agente terapeutico e/o profilattico d'interesse può essere specificatamente rilasciata in un fegato, un rene, una milza, un femore o un polmone di mammifero. Il rilascio specifico in una particolare classe di cellule, un organo o un apparato o un gruppo di questi implica che una percentuale maggiore di composizioni di nanoparticelle che include un un agente terapeutico e/o profilattico viene rilasciata nella destinazione di interesse (ad esempio, tessuto) rispetto ad altre destinazioni, ad esempio, dopo la somministrazione di una composizione di nanoparticelle a un mammifero. In alcune forme di realizzazione, il rilascio specifico può dare come risultato un aumento maggiore di 2 volte, 5 volte, 10 volte, 15 volte o 20 volte della quantità di un agente terapeutico e/o profilattico per 1 g di tessuto della destinazione mirata (ad esempio tessuto di interesse, come un fegato) rispetto ad un'altra destinazione (ad esempio, la milza). In determinate forme di realizzazione, il tessuto di interesse è selezionato dal gruppo costituito da fegato, rene, polmone, milza, femore, endotelio vascolare nei vasi (ad esempio, intracoronarico o intra-femorale) o rene e tessuto tumorale (ad es., tramite iniezione intratumorale).

15 **[0469]** Come altro esempio di rilascio mirato o specifico, un mRNA che codifica per un partner di legame proteico (ad esempio, un anticorpo o un suo frammento funzionale, una proteina scaffold o un peptide) o un recettore su una superficie cellulare può essere incluso in una composizione di nanoparticelle. Un mRNA può essere utilizzato in aggiunta o invece per dirigere la sintesi e la localizzazione extracellulare di lipidi, carboidrati o altre frazioni biologiche. In alternativa, altri agenti terapeutici e/o profilattici o elementi (ad esempio, lipidi o ligandi) di una composizione di nanoparticelle possono essere selezionati in base alla loro affinità per particolari recettori (ad esempio, recettori per le lipoproteine a bassa densità) in modo tale che una composizione di nanoparticelle possa interagire più prontamente con una popolazione cellulare bersaglio che include i recettori. Ad esempio, i ligandi possono includere, 25 tuttavia senza limitazioni, membri di una specifica coppia di legame, anticorpi, anticorpi

monoclonali, frammenti Fv, frammenti Fv a catena singola (scFv), frammenti Fab', frammenti F(ab')₂, anticorpi a singolo dominio, anticorpi camelizzati e loro frammenti, anticorpi umanizzati e loro frammenti e loro versioni multivalenti; reagenti di legame multivalenti inclusi anticorpi mono- o bi-specifici come frammenti Fv stabilizzati con disolfuro, tandem di scFv, diabody, tribody o tetrabody; e aptameri, recettori e proteine di fusione.

[0470] In alcune forme di realizzazione, un ligando può essere un anticorpo legato alla superficie, che può consentire la regolazione della specificità del targeting cellulare. Ciò è particolarmente utile poiché è possibile attivare anticorpi altamente specifici contro un epitopo di interesse per il sito di targeting desiderato. In una forma di realizzazione, più anticorpi sono espressi sulla superficie di una cellula e ciascun anticorpo può avere una specificità diversa per un bersaglio desiderato. Tali approcci possono aumentare l'avidità e la specificità delle interazioni bersagliamento.

[0471] Un ligando può essere selezionato, ad esempio, da un esperto nelle tecniche biologiche, in base alla localizzazione o funzione desiderata della cellula. Ad esempio, un ligando del recettore per gli estrogeni, come il tamoxifene, può indirizzare le cellule verso le cellule di cancro della mammella estrogeno-dipendente che hanno un numero aumentato di recettori per gli estrogeni sulla superficie cellulare. Altri esempi non limitativi di interazioni ligando/recettore includono CCR1 (ad esempio, per il trattamento di tessuti articolari o cerebrali infiammati nell'artrite reumatoide e/o nella sclerosi multipla), CCR7, CCR8 (ad esempio, per il targeting del tessuto linfonodale), CCR6, CCR9, CCR10 (ad esempio, per il targeting del tessuto intestinale), CCR4, CCR10 (ad esempio, per il targeting della pelle), CXCR4 (ad esempio, per una tras migrazione potenziata generale), HCELL (ad esempio, per il trattamento di infiammazione e disturbi infiammatori, midollo osseo), Alpha4beta7 (ad esempio, per il targeting della mucosa intestinale) e VLA-4/NCAM-1 (ad esempio, per il targeting dell'endotelio). In generale, qualsiasi recettore coinvolto nel targeting (ad esempio, metastasi del

cancro) può essere sfruttato per l'uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente.

[0472] Le cellule mirate possono includere, tuttavia senza limitazioni, epatociti, cellule epiteliali, cellule emopoietiche, cellule epiteliali, cellule endoteliali, cellule polmonari, cellule ossee, cellule staminali, cellule mesenchimali, cellule neurali, cellule cardiache, adipociti, cellule vascolari del muscolo liscio, cardiomiociti, cellule del muscolo scheletrico, cellule beta, cellule pituitarie, cellule del rivestimento sinoviale, cellule ovariche, cellule testicolari, fibroblasti, cellule B, cellule T, reticolociti, leucociti, granulociti e cellule tumorali.

[0473] In determinate forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle può bersagliare gli epatociti. È stato dimostrato che le apolipoproteine come l'apolipoproteina E (apoE) si associano a composizioni di nanoparticelle contenenti lipidi neutre o quasi neutre nel corpo e sono note per associarsi a recettori come i recettori delle lipoproteine a bassa densità (LDLR) trovati sulla superficie degli epatociti. Si veda, ad esempio, Akinc, A. et al., *Mol. Ther.* 2010, 18, 1357—1364 e Dong, Y. et al., *PNAS* 2014, 111, 3955-3960. Pertanto, una composizione di nanoparticelle che include un componente lipidico con una carica neutra o quasi neutra che viene somministrata a un soggetto può acquisire apoE nel corpo di un soggetto e può successivamente rilasciare un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, un RNA) agli epatociti, inclusi LDLR in modo mirato.

[0474] In determinate forme di realizzazione, assorbimento cellulare di un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa) e (IV) come descritto nel presente contesto o una composizione di nanoparticelle che comprende il composto può dipendere dai livelli e/o dalle attività di LDLR, oppure l'assorbimento cellulare della composizione di nanoparticelle è LDLR-dipendente. Ad esempio, se la cellula è carente di LDLR (ad esempio, avendo un'attività LDLR aberrante e/o un livello anormalmente basso di LDLR), l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle può diminuire rispetto all'assorbimento da parte di una cellula normale.

[0475] In determinate forme di realizzazione, assorbimento cellulare di un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa) e (IV) come descritto nel presente contesto o una composizione di nanoparticelle che comprende il composto può non dipendere dai livelli e/o dalle attività di LDLR, oppure l'assorbimento cellulare della composizione di nanoparticelle è LDLR-indipendente. Ad esempio, se la cellula è carente di LDLR (ad esempio, avendo un'attività LDLR aberrante e/o un livello anormalmente basso di LDLR), l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è sostanzialmente lo stesso dell'assorbimento da parte di una cellula normale.

[0476] In determinate forme di realizzazione, assorbimento cellulare di un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa) e (IV) come descritto nel presente contesto o una composizione di nanoparticelle che comprende il composto può dipendere dai livelli e/o dalle attività di apoE, oppure l'assorbimento cellulare della composizione di nanoparticelle è apoE-dipendente. Ad esempio, se la cellula è carente di apoE (ad esempio, avendo un'attività apoE aberrante e/o un livello anormalmente basso di apoE), l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle può diminuire rispetto all'assorbimento da parte di una cellula normale.

[0477] In determinate forme di realizzazione, assorbimento cellulare di un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa) e (IV) come descritto nel presente contesto o una composizione di nanoparticelle che comprende il composto può non dipendere dai livelli e/o dalle attività di apoE, oppure l'assorbimento cellulare della composizione di nanoparticelle è apoE-indipendente. Ad esempio, se la cellula è carente di apoE (ad esempio, avendo un'attività apoE aberrante e/o un livello anormalmente basso di apoE), l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle è sostanzialmente lo stesso dell'assorbimento da parte di una cellula normale.

[0478] In determinate forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della

composizione di nanoparticelle qui descritta può essere sia LDLR-dipendente che apoE-dipendente.

[0479] In determinate forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle qui descritta può dipendere dall'interazione di LDLR e apoE. Ad esempio, se l'interazione di LDLR e apoE è anormale (ad es., portando a un livello anormalmente basso di segnalazione a valle), l'assorbimento cellulare della composizione del composto o delle nanoparticelle può diminuire rispetto all'assorbimento da parte di una cellula normale.

[0480] In determinate forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle qui descritta può essere sia LDLR-dipendente che apoE-dipendente.

[0481] In determinate forme di realizzazione, l'assorbimento cellulare del composto o della composizione di nanoparticelle qui descritta può non dipendere dall'interazione di LDLR e apoE. Ad esempio, se l'interazione di LDLR e apoE è anormale (ad es., portando a un livello anormalmente basso di segnalazione a valle), l'assorbimento cellulare della composizione del composto o delle nanoparticelle è sostanzialmente uguale rispetto all'assorbimento da parte di una cellula normale.

[0482] In determinate forme di realizzazione, la apoE è apoE3.

[0483] In alcune forme di realizzazione, un metodo per somministrare un agente terapeutico e/o profilattico a una cellula di mammifero prevede la somministrazione a un soggetto di una composizione di nanoparticelle che include (i) un componente lipidico che include un fosfolipide, un lipide strutturale, un lipide PEG e un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19 -I), (19-II), (20-I) e (21-I), come qui descritto; e (ii) un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, un mRNA), in cui la somministrazione implica il contatto della cellula con la composizione di nanoparticelle, per cui l'agente

terapeutico e/o profilattico viene somministrato alla cellula.

- [0484]** In ulteriori forme di realizzazione, un metodo per rilasciare specificatamente un agente terapeutico e/o profilattico a un organo di mammifero prevede la somministrazione a un mammifero di una composizione di nanoparticelle che include (i) un componente lipidico che include un fosfolipide, un lipide strutturale, un lipide PEG e un composto di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19 -I), (19-II), (20-I) e (21-I), come qui descritto; e (ii) un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, un mRNA), in cui la somministrazione implica il contatto dell'organo di mammifero con la composizione di nanoparticelle, per cui l'agente terapeutico e/o profilattico viene somministrato all'organo.
- 5
- [0485]** In determinate forme di realizzazione, l'efficienza di somministrazione dell'agente terapeutico e/o profilattico è LDLR-indipendente o apoE-indipendente, o entrambi. In determinate forme di realizzazione, l'efficienza di rilascio dell'agente terapeutico e/o profilattico è LDLR-dipendente o apoE-dipendente, o entrambi. In determinate forme di realizzazione, l'efficienza di rilascio dell'agente terapeutico e/o profilattico è indipendente dall'interazione LDLR-apoE. In determinate forme di realizzazione, l'efficienza di erogazione dell'agente terapeutico e/o profilattico dipende dall'interazione LDLR-apoE.
- 10
- 15

Metodi di trattamento di malattie e disturbi

- [0486]** Le composizioni di nanoparticelle possono essere utili per il trattamento di una malattia, un disturbo o una condizione. In particolare, tali composizioni possono essere utili nel trattamento di una malattia, un disturbo o una condizione caratterizzata/o da attività proteica o polipeptidica assente o aberrante. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle comprendente un mRNA che codifica per un polipeptide mancante o aberrante può essere somministrata o rilasciata in una cellula. La successiva traduzione dell'mRNA può produrre il polipeptide, riducendo o eliminando così un problema causato dall'assenza del o dall'attività aberrante causata dal polipeptide. Poiché la traduzione può avvenire rapidamente, i metodi e le
- 20
- 25

composizioni possono essere utili nel trattamento di malattie acute, disturbi o condizioni come sepsi, ictus e infarto del miocardio. Un agente terapeutico e/o profilattico inclusa in una composizione di nanoparticelle può anche essere in grado di alterare la velocità di trascrizione di una data specie, influenzando così l'espressione genica.

5 [0487] Malattie, disturbi e/o condizioni caratterizzati da attività proteica o polipeptidica disfunzionale o aberrante per cui può essere somministrata una composizione includono, tuttavia senza limitazioni, malattie rare, malattie infettive (sia come vaccini che sostanze terapeutiche), cancro e malattie proliferative, malattie genetiche (ad esempio fibrosi cistica), malattie autoimmuni, diabete, malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari e
10 renovascolari e malattie metaboliche. Molteplici malattie, disturbi e/o condizioni possono essere caratterizzati dalla mancanza dell'attività proteica (o da un'attività sostanzialmente ridotta tale che non si verifica una corretta funzione proteica). Tali proteine potrebbero non essere presenti o potrebbero essere essenzialmente non funzionali. Un esempio specifico di una proteina disfunzionale sono le varianti di mutazione missenso del gene del regolatore della conduttanza
15 transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che producono una variante proteica disfunzionale della proteina CFTR, che causa la fibrosi cistica. La presente descrizione fornisce un metodo per il trattamento di tali malattie, disturbi e/o condizioni in un soggetto somministrando una composizione di nanoparticelle comprendente un RNA e un componente lipidico comprendente un lipide secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-
20 I), (19-II), (20-I) e (21-I), un fosfolipide (opzionalmente insaturo), un lipide PEG e un lipide strutturale, in cui l'RNA può essere un mRNA codificante un polipeptide che antagonizza o altrimenti supera un'attività proteica aberrante presente nella cellula del soggetto.

[0488] In alcune forme di realizzazione, un metodo per trattare una malattia o un disturbo in un mammifero che ne ha bisogno prevede la somministrazione al mammifero di una quantità
25 terapeuticamente efficace di una composizione di nanoparticelle che include (i) un componente

lipidico che include un fosfolipide, un lipide strutturale, un PEG lipide e un composto di formula (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II) o (20-I), come qui descritto; e (ii) un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, un mRNA).

[0489] La descrizione fornisce metodi che prevedono la somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono uno o più agenti terapeutici e/o profilattici e composizioni farmaceutiche che includono gli stessi. I termini terapeutico e profilattico nella presente possono essere usati in modo intercambiabile rispetto a caratteristiche e forme di realizzazione della presente descrizione. Le composizioni terapeutiche, o le loro composizioni di imaging, diagnostiche o profilattiche, possono essere somministrate a un soggetto utilizzando qualsiasi quantità ragionevole e qualsiasi via di somministrazione efficace per prevenire, trattare, diagnosticare o visualizzare per immagini una malattia, un disturbo e/o una condizione e/o qualsiasi altro scopo. La quantità specifica somministrata a un determinato soggetto può variare a seconda della specie, dell'età e delle condizioni generali del soggetto; lo scopo della somministrazione; la composizione specifica; le modalità di somministrazione; e simili. Le composizioni secondo la presente descrizione possono essere formulate in forma di unità di dosaggio per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. Risulterà chiaro, tuttavia, che l'uso quotidiano totale di una composizione della presente descrizione verrà deciso da un medico curante nell'ambito di un affidabile giudizio medico. Il livello di dose specifico terapeuticamente efficace, profilatticamente efficace o altrimenti appropriato (ad esempio per l'imaging) per qualsiasi paziente specifico dipenderà da una varietà di fattori, tra cui la gravità e l'identificazione di un disturbo trattato, se presente; l'una o più agenti terapeutici impiegate; la composizione specifica impiegata; l'età, il peso corporeo, lo stato di salute generale, il sesso e il regime alimentare del paziente; il tempo di somministrazione, la via di somministrazione e la velocità di escrezione della specifica composizione farmaceutica utilizzata; la durata del trattamento; i farmaci usati in combinazione o in coincidenza con la composizione farmaceutica

specifica impiegata e fattori simili ben noti nelle tecniche mediche.

[0490] Una composizione di nanoparticelle che include una o più agenti terapeutici e/o profilattici può essere somministrata mediante qualsiasi via. In alcune forme di realizzazione, le composizioni, tra cui le composizioni profilattiche, diagnostiche o di imaging che includono una o più composizioni di nanoparticelle descritte nella presente, sono somministrate attraverso una o più di una varietà di vie, tra cui orale, endovenosa, intramuscolare, intra-arteriosa, intramidollare, intratecale, sottocutanea, intraventricolare, trans- o intradermica, interdermica, rettale, intravaginale, intraperitoneale, intraoculare, sottoretinica, intravitreale, topica (ad esempio mediante polveri, unguenti, creme, gel, lozioni e/o gocce), mucosale, nasale, buccale, enterale, vitreale, intratumorale, sublinguale, intranasale; per instillazione intratracheale, instillazione bronchiale e/o inalazione; come spray orale e/o polvere, spray nasale e/o aerosol e/o attraverso un catetere della vena porta. In alcune forme di realizzazione, una composizione può essere somministrata per via endovenosa, intramuscolare, intradermica, intra-arteriosa, intratumorale, sottocutanea, intraoculare, sottoretinica, intravitreale o per inalazione. Tuttavia, la presente descrizione comprende il rilascio o la somministrazione di composizioni attraverso qualsiasi via appropriata, tenendo in considerazione i probabili progressi delle scienze relative al rilascio dei farmaci. In generale, la via di somministrazione più appropriata dipenderà da una varietà di fattori, inclusa la natura della composizione di nanoparticelle, tra cui una o più agenti terapeutici e/o profilattici (ad esempio, la sua stabilità in vari ambienti corporei come il flusso sanguigno e il tratto gastrointestinale), le condizioni del paziente (ad esempio, se il paziente è in grado di tollerare particolari vie di somministrazione), ecc.

[0491] In determinate forme di realizzazione, le composizioni secondo la presente descrizione possono essere somministrate a livelli di dosaggio sufficienti per rilasciare da circa 0,0001 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0,001 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0,005 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0,05 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0,1

mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 1 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 2 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 5 mg/kg a circa 10 mg/kg, da circa 0,0001 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 0,001 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 0,005 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 0,05 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 0,1 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 1 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 2 mg/kg a circa 5 mg/kg, da circa 0,0001 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 0,001 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 0,005 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 0,05 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 0,1 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 1 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 2 mg/kg a circa 2,5 mg/kg, da circa 0,0001 mg/kg a circa 1 mg/kg, da circa 0,001 mg/kg a circa 1 mg/kg, da circa 0,005 mg/kg a circa 1 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 1 mg/kg, da circa 0,05 mg/kg a circa 1 mg/kg, da circa 0,1 mg/kg a circa 1 mg/kg, da circa 1 mg/kg a circa 0,25 mg/kg, da circa 0,001 mg/kg a circa 0,25 mg/kg, da circa 0,005 mg/kg a circa 0,25 mg/kg, da circa 0,01 mg/kg a circa 0,25 mg/kg, da circa 0,05 mg/kg a circa 0,25 mg/kg, o da circa 0,1 mg/kg a circa 0,25 mg/kg di un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio un mRNA) in una data dose, dove una dose di 1 mg/kg (mpk) fornisce 1 mg di un agente terapeutico e/o profilattico per 1 kg di peso corporeo del soggetto. In determinate forme di realizzazione, può essere somministrata una dose da circa 0,001 mg/kg a circa 10 mg/kg di un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio mRNA) di una composizione di nanoparticelle. In altre forme di realizzazione, può essere somministrata una dose da circa 0,005 mg/kg a circa 2,5 mg/kg di un agente terapeutico e/o profilattico. In determinate forme di realizzazione, può essere somministrata una dose da circa 0,1 mg/kg a circa 1 mg/kg. In altre forme di realizzazione, può essere somministrata una dose da circa 0,05 mg/kg a circa 0,25 mg/kg. Una dose può essere somministrata una o più volte al giorno, nella stessa quantità o in una quantità diversa, per ottenere un desiderato livello di espressione di mRNA e/o effetto terapeutico, diagnostico, profilattico o di imaging. Il dosaggio desiderato può essere rilasciato, ad esempio, tre volte al giorno, due volte al giorno, una volta al giorno, a giorni

alterni, ogni tre giorni, ogni settimana, ogni due settimane, ogni tre settimane o ogni quattro settimane. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio desiderato può essere erogato usando più somministrazioni (ad esempio due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, tredici, quattordici o più amministrazioni). In alcune forme di realizzazione, una singola dose può essere somministrata, ad esempio, prima o dopo una procedura chirurgica o nel caso di una malattia, un disturbo o una condizione acuta.

[0492] Le composizioni di nanoparticelle che includono una o più agenti terapeutici e/o profilattici possono essere utilizzati in combinazione con uno o più altri agenti terapeutici, profilattici, diagnostici o di imaging. Con "in combinazione con", non si intende implicare che gli agenti debbano essere somministrati contemporaneamente e / o formulati per la consegna insieme, sebbene questi metodi di consegna rientrino nell'ambito della presente informativa. Ad esempio, una o più composizioni di nanoparticelle che includono uno o più diversi agenti terapeutici e/o profilattici possono essere somministrati in combinazione. Le composizioni possono essere somministrate contemporaneamente con, prima di o successive a uno o più altre sostanze terapeutiche o procedure mediche desiderate. In generale, ciascun agente sarà somministrato a una dose e/o una programmazione determinata per quell'agente. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione comprende il rilascio di composizioni, o relative composizioni di imaging, diagnostiche o profilattiche in combinazione con agenti che migliorano la loro biodisponibilità, riducono e/o modificano il loro metabolismo, inibiscono la loro escrezione e/o modificano la loro distribuzione all'interno del corpo.

[0493] Si comprenderà inoltre che gli agenti attivi terapeutici, profilattici, diagnostici o di imaging utilizzati in combinazione possono essere somministrati insieme in un'unica composizione o somministrati separatamente in composizioni diverse. In generale, si prevede che gli agenti utilizzati in combinazione saranno utilizzati a livelli che non superano i livelli ai quali vengono utilizzati singolarmente. In alcune forme di realizzazione, i livelli utilizzati in

combinazione possono essere inferiori rispetto a quelli utilizzati singolarmente.

[0494] La specifica combinazione di terapie (sostanze terapeutiche o procedure) da impiegare in un regime di combinazione terrà conto della compatibilità delle terapie e/o procedure desiderate e dell'effetto terapeutico desiderato da raggiungere. Si apprezzerà anche che le terapie impiegate
5 possono ottenere un effetto desiderato per lo stesso disturbo (ad esempio, una composizione utile per il trattamento del cancro può essere somministrata in concomitanza con un agente chemioterapico), oppure possono ottenere effetti diversi (ad esempio, il controllo di eventuali effetti avversi, come reazioni correlate all'infusione).

[0495] Una composizione di nanoparticelle può essere utilizzata in combinazione con un agente
10 per aumentare l'efficacia e/o la finestra terapeutica della composizione. Tale agente può essere, ad esempio, un composto antinfiammatorio, uno steroide (ad esempio, un corticosteroide), una statina, un estradiolo, un inibitore del BTK, un agonista di S1P1, un modulatore del recettore dei glucocorticoidi (GRM) o un antistaminico. In alcune forme di realizzazione, una composizione di nanoparticelle può essere utilizzata in combinazione con desametasone, metotrexato,
15 acetaminofene, un bloccante del recettore H1 o un bloccante del recettore H2. In determinate forme di realizzazione, un metodo per trattare un soggetto che ne ha bisogno o per rilasciare un agente terapeutico e/o profilattico in un soggetto (ad esempio un mammifero) può prevedere il pretrattamento del soggetto con uno o più agenti prima di somministrare una composizione di nanoparticelle. Ad esempio, un soggetto può essere pretrattato con una quantità utile (ad
20 esempio, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg o qualsiasi altra quantità utile) di desametasone, metotrexato, acetaminofene, un bloccante del recettore H1 o un bloccante del recettore H2. Il pretrattamento può durare 24 ore o meno (ad esempio 24 ore, 20 ore, 16 ore, 12 ore, 8 ore, 4 ore, 2 ore, 1 ora, 50 minuti, 40 minuti, 30 minuti, 20 minuti o 10 minuti) prima della somministrazione della composizione di nanoparticelle e può verificarsi
25 una, due o più volte, ad esempio, aumentando le quantità di dosaggio.

[0496] In qualsiasi metodo o uso qui descritto, in alcune forme di realizzazione, il soggetto che ne ha bisogno è carente di LDLR o carente di apoE o entrambi. In determinate forme di realizzazione, il soggetto che ne ha bisogno non è carente di LDLR o ha livelli e/o attività di LDLR normali. In determinate forme di realizzazione, il soggetto che ne ha bisogno non è

5 carente di apoE o ha livelli e/o attività di apoE normali. In determinate forme di realizzazione, il soggetto che ne ha bisogno ha un'interazione anormale di LDLR e apoE. In determinate forme di realizzazione, il soggetto che ne ha bisogno ha una normale interazione di LDLR e apoE.

[0497] Circa, Approssimativamente: come utilizzati nella presente, i termini "approssimativamente" e "circa", applicati a uno o più valori di interesse, si riferiscono a un

10 valore simile a un valore di riferimento dichiarato. In alcune forme di realizzazione, il termine "approssimativamente" o "circa" si riferisce a un intervallo di valori che rientrano tra il 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o meno in entrambe le direzioni (maggiore o minore di) del valore di riferimento indicato se non diversamente indicato o altrimenti evidente dal contesto (a meno che tale

15 numero non superi il 100% di un valore possibile). Ad esempio, quando utilizzato nel contesto di una quantità di un dato composto in un componente lipidico di una composizione di nanoparticelle, "circa" può significare +/- il 10% del valore recitato. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle che include un componente lipidico avente circa il 40% di un dato composto può includere il 30-50% del composto.

[0498] Composto: Come utilizzato nella presente, il termine "composto" intende includere tutti gli isomeri e gli isotopi della struttura illustrata. "Isotopi" si riferisce ad atomi aventi lo stesso numero atomico ma diversi numeri di massa risultanti da un diverso numero di neutroni nei nuclei. Ad esempio, gli isotopi di idrogeno includono trizio e deuterio. Inoltre, un composto, un sale o un complesso della presente descrizione può essere preparato in combinazione con

25 molecole di solvente o acqua per formare solvati e idrati mediante metodi ordinari.

[0499] Mettere a contatto: Come utilizzato nella presente, il termine "mettere a contatto" significa stabilire una connessione fisica tra due o più entità. Ad esempio, mettere a contatto una cellula di mammifero con una composizione di nanoparticelle significa che la cellula di mammifero e una nanoparticella sono fatte per condividere una connessione fisica. Metodi per mettere a contatto le cellule con entità esterne sia *in vivo* che *ex vivo* sono ben noti nelle arti biologiche. Ad esempio, la messa a contatto di una composizione di nanoparticelle e una cellula di mammifero disposta all'interno di un mammifero può essere effettuata mediante varie vie di somministrazione (ad esempio, endovenosa, intramuscolare, intradermica e sottocutanea) e può prevedere quantità variabili di composizioni di nanoparticelle. Inoltre, più di una cellula di mammifero può entrare a contatto con una composizione di nanoparticelle.

[0500] Rilascio: Come utilizzato nella presente, il termine "rilascio" significa fornire un'entità a una destinazione. Ad esempio, rilasciare una sostanza terapeutica e/o profilattica in un soggetto può prevedere la somministrazione di una composizione di nanoparticelle che include l'agente terapeutico e/o profilattico al soggetto (ad esempio, per via endovenosa, intramuscolare, intradermica o sottocutanea). La somministrazione di una composizione di nanoparticelle a una cellula di mammifero o di mammifero può prevedere la messa a contatto di una o più cellule con la composizione di nanoparticelle.

[0501] Rilascio potenziato: Come utilizzato nella presente, il termine "rilascio potenziato" indica il rilascio di un livello maggiore (ad esempio, almeno 1,5 volte di più, almeno 2 volte di più, almeno 3 volte di più, almeno 4 volte di più, almeno 5 volte di più, almeno 6 volte di più, almeno 7 volte di più, almeno 8 volte di più, almeno 9 volte di più, almeno 10 volte di più) di un agente terapeutico e/o profilattico da parte di una nanoparticella in un tessuto bersaglio di interesse (ad esempio, fegato di mammifero) rispetto al livello di rilascio di un agente terapeutico e/o profilattico da parte di una nanoparticella di controllo in un tessuto bersaglio di interesse (ad esempio MC3, KC2 o DLinDMA). Il livello di rilascio di una nanoparticella in un

particolare tessuto può essere misurato confrontando la quantità di proteine prodotte in un tessuto rispetto al peso di detto tessuto, confrontando la quantità di un agente terapeutico e/o profilattico in un tessuto rispetto al peso di detto tessuto, confrontando la quantità di proteine prodotte in un tessuto con la quantità di proteine totali in detto tessuto, o confrontando la

5 quantità di un agente terapeutico e/o profilattico in un tessuto con la quantità di sostanza terapeutica e/o profilattica totale in detto tessuto. Si comprenderà che il rilascio potenziato di una nanoparticella in un tessuto bersaglio non deve necessariamente essere determinato in un soggetto da trattare, può essere determinato in un surrogato come un modello animale (ad esempio, un modello di ratto).

10 **[0502]** Rilascio specifico: Come utilizzato nella presente, il termine "rilascio specifico", "rilasciare in modo specifico" o "rilasciare specificamente" significa rilasciare un livello superiore (ad esempio, almeno 1,5 volte di più, almeno 2 volte di più, almeno 3 volte di più, almeno 4 volte di più, almeno 5 volte di più, almeno 6 volte di più, almeno 7 volte di più, almeno 8 volte di più, almeno 9 volte di più, almeno 10 volte di più) di un agente terapeutico e/o

15 profilattico mediante una nanoparticella in un tessuto bersaglio di interesse (ad esempio, fegato di mammifero) rispetto a un tessuto fuori bersaglio (ad esempio) milza di mammifero). Il livello di rilascio di una nanoparticella in un particolare tessuto può essere misurato confrontando la quantità di proteine prodotte in un tessuto rispetto al peso di detto tessuto, confrontando la quantità di un agente terapeutico e/o profilattico in un tessuto rispetto al peso di detto tessuto,

20 confrontando la quantità di proteine prodotte in un tessuto con la quantità di proteine totali in detto tessuto, o confrontando la quantità di un agente terapeutico e/o profilattico in un tessuto con la quantità di sostanza terapeutica e/o profilattica totale in detto tessuto. Ad esempio, per il targeting renovascolare, un agente terapeutico e/o profilattico viene specificamente fornito in un rene di mammifero rispetto al fegato e alla milza se 1,5, 2 volte, 3 volte, 5 volte, 10 volte, 15

25 volte o 20 volte più un agente terapeutico e/o profilattico per 1 g di tessuto viene rilasciata in un

rene rispetto a quella rilasciata nel fegato o nella milza dopo la somministrazione sistemica dell'agente terapeutico e/o profilattico. Si comprenderà che la capacità di una nanoparticella di rilasciare specificamente in un tessuto bersaglio non deve necessariamente essere determinato in un soggetto da trattare, può essere determinato in un surrogato come un modello animale (ad esempio un modello di ratto).

[0503] Efficienza di incapsulamento: Come utilizzato nella presente, "efficienza di incapsulamento" si riferisce alla quantità di un agente terapeutico e/o profilattico che diventa parte di una composizione di nanoparticelle, rispetto alla quantità totale iniziale di un agente terapeutico e/o profilattico utilizzata nella preparazione di una composizione di nanoparticelle.

10 Ad esempio, se 97 mg di agente terapeutico e/o profilattico sono incapsulati in una composizione di nanoparticelle su un totale di 100 mg di agente terapeutico e/o profilattico inizialmente forniti alla composizione, l'efficienza di incapsulamento può essere del 97%. Come qui utilizzato, "incapsulamento" può riferirsi a contenere, confinare, circondare o racchiudere in modo completo, sostanziale o parziale.

15 **[0504]** Espressione: Come utilizzato nella presente, "espressione" di una sequenza di acidi nucleici si riferisce alla traduzione di un mRNA in un polipeptide o una proteina e/o alla modifica post-traduzionale di un polipeptide o una proteina.

[0505] In vitro: Come qui utilizzato, il termine "in vitro" si riferisce a eventi che si verificano in un ambiente artificiale, ad esempio in una provetta o in un recipiente di reazione, in una coltura cellulare, in una piastra di Petri, ecc., piuttosto che all'interno di un organismo (ad esempio, animali, piante o microbi).

[0506] In vivo: Come usato qui, il termine "in vivo" si riferisce a eventi che si verificano all'interno di un organismo (ad esempio, animale, pianta o microbi o loro cellule o tessuti).

25 **[0507]** Ex vivo: Come utilizzato nella presente, il termine "*ex vivo*" si riferisce a eventi che si verificano all'esterno di un organismo (ad esempio, animale, pianta o microbo o relativa/o

cellula o tessuto). Gli eventi ex vivo possono aver luogo in un ambiente minimamente alterato da un ambiente naturale (ad esempio *in vivo*).

[0508] Isomero: Come qui utilizzato, il termine "isomero" indica qualsiasi isomero geometrico, tautomero, zwitterione, stereoisomero, enantiomero o diastereomero di un composto. I composti
5 possono includere uno o più centri chirali e/o doppi legami e possono quindi esistere come stereoisomeri, come isomeri a doppio legame (cioè isomeri geometrici E/Z) o diastereomeri {ad esempio, enantiomeri [cioè, (+) o (-)] o isomeri *cis/trans*}. La presente descrizione comprende qualsiasi e tutti gli isomeri dei composti qui descritti, comprese le forme stereomericamente pure (ad esempio, geometricamente pure, enantiomericamente pure o diastereomericamente
10 pure) e miscele enantiomeriche e stereoisomeriche, ad esempio racemati. Sono ben note miscele enantiomeriche e stereomeriche di composti e mezzi per risolverle nei loro enantiomeri o stereoisomeri componenti.

[0509] Componente lipidico: Come utilizzato nella presente, un "componente lipidico" è quel componente di una composizione di nanoparticelle che include uno o più lipidi. Ad esempio, il
15 componente lipidico può includere uno o più lipidi cationici/ionizzabili, PEGilati, strutturali o di altro tipo, come i fosfolipidi.

[0510] Linker: Come utilizzato nella presente, un "linker" è una frazione che collega due frazioni, ad esempio, il collegamento tra due nucleosidi di una specie cap. Un linker può includere uno o più gruppi inclusi, ma non limitati a, gruppi fosfato (ad esempio, fosfati, boranofosfati, tiofosfati, selenofosfati e fosfonati), gruppi alchile, ammidati o gliceroli. Ad
20 esempio, due nucleosidi di un analogo di cap possono essere collegati in corrispondenza delle loro posizioni 5' da un gruppo trifosfato o da una catena includente due frazioni fosfato e una frazione boranofosfato.

[0511] Metodi di somministrazione: Come utilizzato nella presente, i "metodi di
25 somministrazione" possono includere metodi per via endovenosa, intramuscolare, intradermica,

sottocutanea o di altro tipo per rilasciare una composizione in un soggetto. Un metodo di somministrazione può essere selezionato per indirizzare la consegna (ad esempio, per consegnare in modo specifico) a una specifica regione o sistema di un organismo.

5 [0512] Modificato: Come qui usato, "modificato" significa non naturale. Ad esempio, un RNA può essere un RNA modificato. Cioè, un RNA può includere una o più basi azotate, nucleosidi, nucleotidi o linker che non sono presenti in natura. Nella presente, una specie "modificata" può anche essere indicata come una specie "alterata". Le specie possono essere modificate o alterate chimicamente, strutturalmente o funzionalmente. Ad esempio, una specie a basi azotate modificate può includere una o più sostituzioni che non sono presenti in natura.

10 [0513] Rapporto N:P: Come utilizzato nella presente, il "rapporto N:P" è il rapporto molare tra atomi di azoto ionizzabili (nell'intervallo di pH fisiologico) in un lipide e gruppi fosfato in un RNA, ad esempio, in una composizione di nanoparticelle che include un componente lipidico e un RNA.

15 [0514] Composizione di nanoparticelle: Come utilizzato nella presente, una "composizione di nanoparticelle" è una composizione che comprende uno o più lipidi. Le composizioni di nanoparticelle hanno tipicamente dimensioni nell'ordine di micrometri o inferiori e possono includere un doppio strato lipidico. Le composizioni di nanoparticelle comprendono nanoparticelle lipidiche (LNP), liposomi (ad esempio vescicole lipidiche) e lipoplessi. Ad esempio, una composizione di nanoparticelle può essere un liposoma avente un doppio strato
20 lipidico con un diametro di 500 nm o meno.

[0515] *Presente in natura*: come usato qui, "presente in natura" significa esistente in natura senza aiuti artificiali.

[0516] Paziente: come utilizzato nel presente contesto, "paziente" si riferisce a un soggetto che può cercare o avere bisogno di cure, richiede un trattamento, sta ricevendo un trattamento,
25 riceverà un trattamento o un soggetto che è curato da un professionista qualificato per una

particolare malattia o condizione.

[0517] lipide PEG: come utilizzato nella presente, un "lipide PEG" o "lipide PEGilato" si riferisce a un lipide comprendente un componente di polietilenglicole.

[0518] Farmaceuticamente accettabile: L'espressione "farmaceuticamente accettabile" viene
5 utilizzata nel presente contesto per fare riferimento a quei composti, materiali, composizioni e/o
forme di dosaggio che sono, nell'ambito di un valido giudizio medico, adatti all'uso a contatto
con i tessuti di esseri umani e animali senza tossicità, irritazione, risposta allergica eccessiva o
altro problema o complicanza, proporzionali a un ragionevole rapporto benefici/rischi.

[0519] Eccipiente farmaceuticamente accettabile: L'espressione "eccipiente farmaceuticamente
10 accettabile", come usata nel presente contesto, si riferisce a qualsiasi ingrediente diverso dai
composti qui descritti (ad esempio, un veicolo in grado di sospendere, mettere in complesso o
dissolvere il composto attivo) e avere le proprietà di essere sostanzialmente non tossico e non
infiammatorio in un paziente. Gli eccipienti possono includere, ad esempio: antiaderenti,
antiossidanti, leganti, rivestimenti, ausili di compressione, disintegranti, coloranti (colori),
15 emollienti, emulsionanti, riempitivi (diluenti), formatori o rivestimenti di film, aromi, fragranze,
antiagglomeranti (potenziatori di flusso), lubrificanti, conservanti, stampa inchiostri, assorbenti,
agenti sospensivi o disperdenti, dolcificanti e acque di idratazione. Eccipienti esemplificativi
includono, ma non sono limitati a: idrossitoluene butilato (BHT), carbonato di calcio, fosfato di
calcio (dibasico), stearato di calcio, croscarmellosa, polivinil pirrolidone reticolato, acido
20 citrico, crospovidone, cisteina, etilcellulosa, gelatina, idrossipropilcellulosa, lattosio, magnesio
stearato, maltitolo, mannitolo, metionina, metilcellulosa, metil parabene, cellulosa
microcristallina, polietilenglicole, polivinil pirrolidone, povidone, amido pregelatinizzato, propil
parabene, retinil palmitato, sodio carbonato, amido glicolato, sorbitolo, amido (mais), acido
stearico, saccarosio, talco, biossido di titanio, vitamina A, vitamina E (alfa tocoferolo), vitamina
25 C e xilitolo e altre specie qui descritte.

[0520] Nella presente descrizione, la formula strutturale del composto rappresenta un certo isomero per comodità in alcuni casi, ma la presente descrizione include tutti gli isomeri, come isomeri geometrici, isomeri ottici basati su un carbonio asimmetrico, stereoisomeri, tautomeri e simili, fermo restando che non tutti gli isomeri possono avere lo stesso livello di attività. Inoltre, per i composti rappresentati dalla formula può essere presente un polimorfismo cristallino. Si noti che qualsiasi forma cristallina, miscela di forma cristallina, o sua anidride o idrato è inclusa nell'ambito della presente descrizione.

[0521] Il termine "polimorfi cristallini", "polimorfi" o "forme cristalline" indica strutture cristalline in cui un composto (o un suo sale o solvato) può cristallizzare in diverse disposizioni di impaccamento cristallino, tutte aventi la stessa composizione elementare. Forme cristalline differenti di solito hanno diversi spettri di diffrazione dei raggi X, spettri a infrarossi, punti di fusione, densità, durezza, forma cristallina, proprietà ottiche ed elettriche, stabilità e solubilità. Il solvente di ricristallizzazione, la velocità di cristallizzazione, la temperatura di conservazione e altri fattori possono far dominare una forma cristallina. I polimorfi cristallini dei composti possono essere preparati mediante cristallizzazione in condizioni diverse.

[0522] Sali farmaceuticamente accettabili: Le composizioni possono anche includere sali di uno o più composti. I sali possono essere sali farmaceuticamente accettabili. Come utilizzato nella presente, "sali farmaceuticamente accettabili" si riferisce a derivati dei composti descritti in cui il composto progenitore viene alterato convertendo una frazione di acido o di base esistente nella sua forma salina (ad esempio, facendo reagire un gruppo di base libera con un acido organico adatto). Esempi di sali farmaceuticamente accettabili includono, tuttavia senza limitazioni, sali di acidi minerali oppure organici di residui basici quali ammine; sali alcalini oppure organici di residui acidi quali acidi carbossilici; e simili. Sali di addizione con acidi rappresentativi includono acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzensolfonato, benzoato, bisolfato, borato, butirrato, canforato, canfosolfonato, citrato, ciclopentanepropionato,

digluconato, dodecilsolfato, etansolfonato, fumarato, glucoeptonato, glicerofosfato, emisolfato, eptonato, esanoato, idrobromuro, cloridrato, idroduro, 2-idrossi-etansolfonato, lattobionato, lattato, laurato, lauril solfato, malato, maleato, malonato, metanesolfonato, 2-naftalensolfonato, nicotinato, nitrato, oleato, ossalato, palmitato, pamoato, pectinato, persolfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, stearato, succinato, solfato, tartrato, tiocianato, toluensolfonato, undecanoato, sali di valerato e simili. Sali rappresentativi di metalli alcalini o alcalino terrosi comprendono sodio, litio, potassio, calcio, magnesio e simili, nonché ammonio non tossico, ammonio quaternario e cationi amminici, inclusi, ma non limitati a, ammonio, tetrametilammonio, tetraetilammonio, metilammina, dimetilammina, trimetilammina, trietilammina, etilammina e simili. I sali farmaceuticamente accettabili della presente descrizione includono i sali non tossici convenzionali del composto genitore formato, ad esempio, da acidi inorganici o organici non tossici. I sali farmaceuticamente accettabili della presente descrizione possono essere sintetizzati dal composto genitore che contiene una porzione basica o acida mediante metodi chimici convenzionali. Generalmente, tali sali possono essere preparati facendo reagire le forme libere di acido o di base di questi composti con una quantità stechiometrica della base o dell'acido appropriato in acqua o in un solvente organico o in una miscela dei due; generalmente, terreni non acquosi come etere, etilacetato, etanolo, isopropanolo o acetonitrile sono preferiti. Elenchi di sali adatti si trovano in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Sali farmaceutici: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (a cura di), Wiley-VCH, 2008, e Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977).

[0523] Fosfolipide: Come utilizzato nella presente, un "fosfolipide" è un lipide che include una frazione fosfato e una o più catene di carbonio, come catene di acidi grassi insaturi. Un fosfolipide può includere uno o più legami multipli (ad esempio doppi o tripli) (ad esempio una o più insaturazioni). Particolari fosfolipidi possono facilitare la fusione a una membrana. Ad

esempio, un fosfolipide cationico può interagire con uno o più fosfolipidi caricati negativamente di una membrana (ad esempio, una membrana cellulare o intracellulare). La fusione di un fosfolipide a una membrana può consentire a uno o più elementi di una composizione contenente lipidi di passare attraverso la membrana consentendo, ad esempio, il rilascio dell'uno o più elementi in una cellula.

[0524] Indice di polidispersione: Come utilizzato nella presente, l'"indice di polidispersità" è un rapporto che descrive l'omogeneità della distribuzione granulometrica di un sistema. Un valore piccolo, ad esempio inferiore a 0,3, indica una distribuzione granulometrica stretta.

[0525] Polipeptide: Come utilizzato nella presente, il termine "polipeptide" o "polipeptide di interesse" si riferisce a un polimero di residui di amminoacidi tipicamente uniti da legami peptidici che possono essere prodotti naturalmente (ad esempio, isolati o purificati) o sinteticamente.

[0526] RNA: Come utilizzato nella presente, un "RNA" si riferisce a un acido ribonucleico che può essere o non essere presente in natura. Ad esempio, un RNA può includere componenti modificati e/o non presenti in natura come una/o o più basi azotate, nucleosidi, nucleotidi o linker. Un RNA può includere una struttura cap, un nucleoside che termina la catena, uno stem-loop, una sequenza di poliA e/o un segnale di poliadenilazione. Un RNA può avere una sequenza nucleotidica che codifica per un polipeptide di interesse. Ad esempio, un RNA può essere un RNA messaggero (mRNA). La traduzione di un mRNA codificante per un particolare polipeptide, ad esempio la traduzione *in vivo* di un mRNA all'interno di una cellula di mammifero, può produrre il polipeptide codificato. Gli RNA possono essere selezionati dal gruppo non limitativo costituito da RNA interferente breve (small interfering RNA, siRNA), RNA interferente asimmetrico (asymmetrical interfering RNA, aiRNA), microRNA (miRNA), RNA substrato di Dicer (dsRNA), RNA a forcina breve (small hairpin RNA, shRNA), mRNA e loro miscele.

[0527] Dose unitaria singola: Come usato qui, una "dose unitaria singola" è una dose di qualsiasi terapia somministrata in una dose/in una volta/via singola/punto di contatto singolo, cioè, singolo evento di somministrazione.

[0528] Dose divisa: Come usato qui, una "dose divisa" è la divisione della singola dose unitaria o della dose giornaliera totale in due o più dosi.

[0529] Dose giornaliera totale: Come qui utilizzato, una "dose giornaliera totale" è una quantità somministrata o prescritta in un periodo di 24 ore. Può essere somministrata come singola dose unitaria.

[0530] Dimensioni: Come utilizzato nella presente, "dimensione" o "dimensione media" nel contesto delle composizioni di nanoparticelle si riferisce al diametro medio di una composizione di nanoparticelle.

[0531] Soggetto: Come qui utilizzato, il termine "soggetto" o "paziente" si riferisce a qualsiasi organismo a cui può essere somministrata una composizione secondo la descrizione, ad esempio per scopi sperimentali, diagnostici, profilattici e/o terapeutici. Soggetti tipici includono animali (ad esempio mammiferi come topi, ratti, conigli, primati non umani ed esseri umani) e/o piante.

[0532] Cellule bersagliate: Come qui utilizzato, "cellule bersagliate" si riferisce a una o più cellule di interesse. Le cellule possono essere trovate *in vitro*, *in vivo*, *in situ* o nel tessuto o organo di un organismo. L'organismo può essere un animale, preferibilmente un mammifero, più preferibilmente un essere umano e più preferibilmente un paziente.

[0533] Tessuto bersaglio: Come utilizzato nella presente, "tessuto bersaglio" si riferisce a uno o più tipi di tessuto di interesse in cui il rilascio di una sostanza terapeutica e/o profilattica risulterà in un effetto biologico e/o farmacologico desiderato. Esempi di tessuti bersaglio di interesse includono tessuti, organi e apparati specifici o loro gruppi. In applicazioni particolari, un tessuto bersaglio può essere un rene, un polmone, una milza, un endotelio vascolare nei vasi (ad esempio, intracoronarico o intra-femorale), o tessuto tumorale (ad esempio, tramite

iniezione intratumorale). Un "tessuto fuori bersaglio" si riferisce a uno o più tipi di tessuto in cui l'espressione della proteina codificata non si traduce in un effetto biologico e/o farmacologico desiderato. In applicazioni particolari, i tessuti fuori bersaglio possono includere il fegato e la milza.

5 **[0534]** Agente terapeutico e/o profilattico: Il termine "agente terapeutico" si riferisce a qualsiasi agente che, quando somministrato a un soggetto, ha un effetto terapeutico e/o diagnostico e/o suscita un desiderato effetto biologico e/o farmacologico. Il termine "agente profilattico" si riferisce a qualsiasi agente che, quando somministrato a un soggetto, ha un effetto profilattico. Gli agenti terapeutici e/o profilattici sono anche indicati come "attivi" o "agenti attivi". Tali
10 agenti includono, ma non sono limitati a, citotossine, ioni radioattivi, agenti chemioterapici, farmaci a piccole molecole, proteine e acidi nucleici.

[0535] Quantità terapeuticamente efficace: Come usato qui, il termine "quantità terapeuticamente efficace" indica una quantità di un agente da somministrare (ad esempio, acido nucleico, farmaco, composizione, agente terapeutico, agente diagnostico, agente profilattico,
15 ecc.) che è sufficiente, quando somministrato a un soggetto che è affetto da o è suscettibile a un'infezione, malattia, disturbo e/o condizione, per trattare, migliorare i sintomi di, diagnosticare, prevenire e/o ritardare l'insorgenza dell'infezione, della malattia, del disturbo e/o della condizione.

[0536] Trasfezione: Come utilizzato nel presente contesto, "trasfezione" si riferisce
20 all'introduzione di una specie (ad esempio, un RNA) in una cellula. La trasfezione può avvenire, ad esempio, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

[0537] Trattamento: Come qui usato, il termine "trattamento" si riferisce ad alleviare parzialmente, completamente, migliorare, potenziare, migliorare, ritardare l'insorgenza, inibire la progressione, ridurre la gravità e/o ridurre l'incidenza di uno o più sintomi o caratteristiche di
25 una infezione, una malattia, un disturbo e/o una condizione specifici. Ad esempio, "trattare" il

cancro può riferirsi all'inibizione della sopravvivenza, della crescita e/o della diffusione di un tumore. Il trattamento può essere somministrato a un soggetto che non presenta segni di una malattia, un disturbo e/o una condizione e/o a un soggetto che presenta solo segni precoci di una malattia, un disturbo e/o una condizione allo scopo di ridurre il rischio di sviluppare patologie associate a malattia, disturbo e/o condizione.

[0538] Potenziale zeta: Come utilizzato nella presente, il "potenziale zeta" è il potenziale elettrocinetico di un lipide, ad esempio, in una composizione di particelle.

[0539] Gli esperti nella tecnica riconosceranno, o saranno in grado di accertare utilizzando non più della sperimentazione di routine, molti equivalenti delle forme di realizzazione specifiche in conformità con la presente descrizione. L'ambito della presente descrizione non è inteso essere limitato alla Descrizione di cui sopra, ma è piuttosto come indicato nelle rivendicazioni allegate.

[0540] Nelle rivendicazioni gli articoli come "un," "una," e "il" possono indicare uno o più di uno, salvo diversamente indicato, al contrario o altrimenti evidente dal contesto. Le rivendicazioni o le descrizioni che includono "o" tra uno o più elementi di un gruppo sono considerati soddisfatti se uno, più di uno, o tutti gli elementi del gruppo sono presenti, impiegati in o altrimenti rilevanti in un dato prodotto o processo salvo diversamente indicato al contrario o altrimenti evidente dal contesto. La descrizione include forme di realizzazione in cui è esattamente presente un membro del gruppo, impiegato in o altrimenti rilevante per un determinato prodotto o processo. La descrizione include forme di realizzazione in cui più di uno o tutti gli elementi del gruppo sono presenti in, impiegati in o altrimenti pertinenti a un determinato prodotto o processo. Come qui utilizzato, le espressioni "uno o più di A, B o C", "uno o più A, B o C", "uno o più di A, B e C", "uno o più A, B e C", "selezionato da A, B e C", "selezionato dal gruppo composto da A, B e C" e simili sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono tutti a una selezione da un gruppo composto da A, B e/o C, ovvero una o più As, una o più B, una o più C, o qualsiasi combinazione di esse, salvo diversa indicazione.

[0541] Si noti inoltre che il termine "comprendente" è inteso come aperto e consente ma non richiede l'inclusione di elementi o passaggi aggiuntivi. Quando il termine "comprendente" è usato nella presente, anche i termini "costituito essenzialmente da" e "costituito da" vengono così compresi e descritti. In tutta la descrizione, quando le composizioni sono descritte come
5 aventi, includenti o comprendenti componenti specifici, è contemplato che anche le composizioni siano essenzialmente costituite, o siano costituite dai componenti citati. Allo stesso modo, laddove i metodi o processi siano descritti come aventi, includenti o comprendenti fasi di processo specifiche, anche i processi sono essenzialmente costituiti o sono costituiti dalle fasi di lavorazione citate. Inoltre, resta inteso che l'ordine delle fasi o l'ordine per l'esecuzione di
10 determinate azioni è irrilevante fintanto che l'invenzione rimane operativa. Inoltre, due o più fasi o azioni possono essere eseguite contemporaneamente.

[0542] Laddove siano indicati intervalli, sono inclusi i punti finali. Inoltre, è chiaro che, se non diversamente indicato o altrimenti evidente dal contesto e dalla comprensione di un esperto con competenza ordinaria nella tecnica, i valori che sono espressi come intervalli possono assumere
15 qualsiasi valore specifico o sottointervallo all'interno degli intervalli dichiarati in diverse forme di realizzazione della descrizione, al decimo dell'unità del limite inferiore dell'intervallo, a meno che il contesto non indichi chiaramente diversamente.

[0543] I processi sintetici della descrizione possono tollerare un'ampia varietà di gruppi funzionali, pertanto possono essere utilizzati vari materiali di partenza sostituiti. I processi
20 generalmente forniscono il composto finale desiderato in corrispondenza o in prossimità della fine del processo complessivo, sebbene possa essere desiderabile in certi casi convertire ulteriormente il composto in un suo sale farmaceuticamente accettabile.

[0544] I composti della presente descrizione possono essere preparati in una varietà di modi utilizzando materiali di partenza disponibili in commercio, composti noti in letteratura o a
25 partire da intermedi prontamente preparati, impiegando metodi e procedimenti sintetici standard

noti agli esperti del settore, o che risulteranno evidenti all'esperto alla luce degli insegnamenti contenuti nella presente. Metodi e procedimenti sintetici standard per la preparazione di molecole organiche e trasformazioni e manipolazioni di gruppi funzionali possono essere ottenuti dalla letteratura scientifica pertinente o da libri di testo standard nel settore. Sebbene non siano limitati a una o più fonti, testi classici come Smith, MB, March, J., March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5a edizione John Wiley & Sons: New York, 2001; Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3a edizione, John Wiley & Sons: New York, 1999; R. Larock, Trasformazioni organiche complete, editori VCH (1989); L. Fieser e M. Fieser, Fieser e Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); e L. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995) sono libri di testo di riferimento utili e riconosciuti di sintesi organica noti agli esperti della tecnica. Le seguenti descrizioni di metodi sintetici hanno lo scopo di illustrare, ma non di limitare, procedure generali per la preparazione dei composti della presente descrizione.

15 **[0545]** I composti di questa descrizione aventi una qualsiasi delle formule descritte nella presente possono essere preparati secondo le procedure illustrate negli Schemi 1-3 di seguito, da materiali di partenza disponibili in commercio o materiali di partenza che possono essere preparati utilizzando procedure di letteratura. Le variabili negli Schemi (ad es. R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅) sono come qui definite, ad esempio R₁, R₂, R₃, R₄, e R₅ sono ciascuna indipendentemente alchile. Un esperto della tecnica noterà che, durante le sequenze di reazione e gli schemi sintetici descritti nella presente, l'ordine di alcune fasi può essere modificato, come l'introduzione e la rimozione di gruppi protettivi.

[0546] Un esperto con competenza ordinaria nella tecnica riconoscerà che alcuni gruppi possono richiedere protezione dalle condizioni di reazione tramite l'uso di gruppi protettivi. I gruppi protettivi possono anche essere usati per differenziare gruppi funzionali simili nelle

molecole. Un elenco di gruppi protettivi e come introdurre e rimuovere questi gruppi può essere trovato in Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3a edizione, John Wiley & Sons: New York, 1999. Gruppi protettivi preferiti includono, ma non sono limitati a:

5 Per una frazione ossidrilica: TBS, benzile, THP, Ac;

Per gli acidi carbossilici: estere benzilico, estere metilico, estere etilico, estere allilico;

Per le ammine: Fmoc, Cbz, BOC, DMB, Ac, Bn, Tr, Ts, trifluoroacetile, ftalimmide, benzilidenammina;

Per i dioli: Ac (x2) TBS (x2) o, se presi insieme, acetoni;

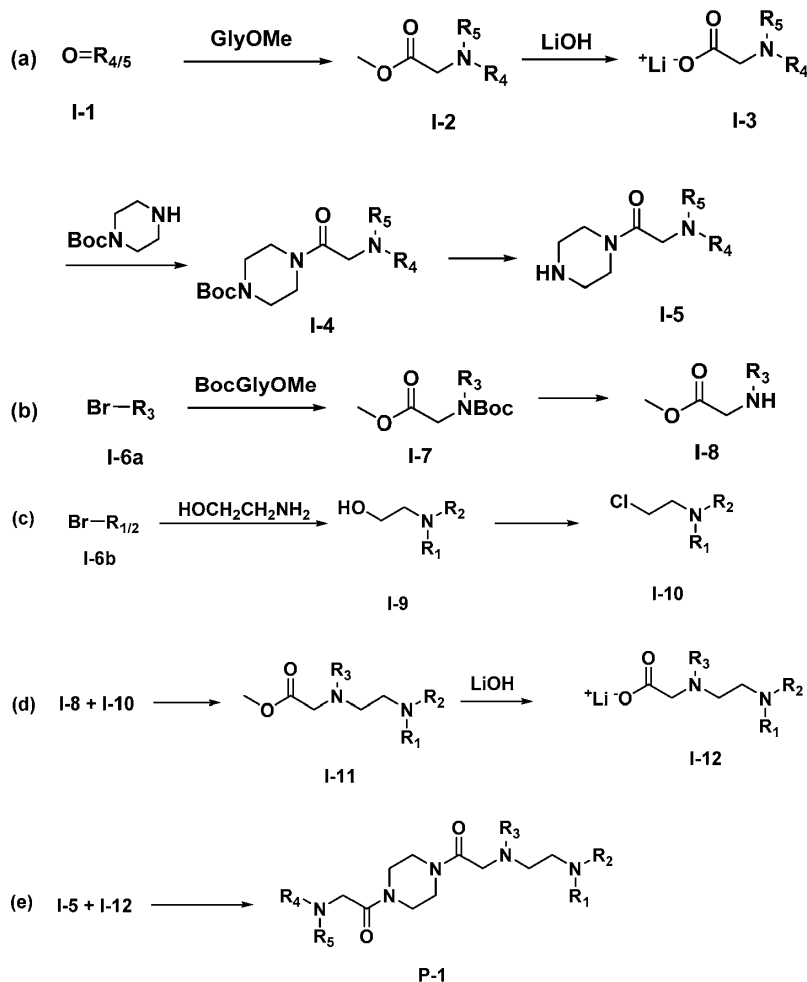
10 Per i tioli: Ac;

Per i benzimidazoli: SEM, benzile, PMB, DMB;

Per le aldeidi: di-alchil acetali come dimetossi acetale o dietil acetile.

[0547] Negli schemi di reazione descritti nella presente, possono essere prodotti molteplici stereoisomeri. Quando non viene indicato alcuno stereoisomero specifico, si intendono tutti i
15 possibili stereoisomeri che potrebbero essere prodotti dalla reazione. Un esperto con competenza ordinaria nella tecnica riconoscerà che le reazioni possono essere ottimizzate per fornire preferenzialmente un isomero, oppure possono essere escogitati nuovi schemi per produrre un singolo isomero. Se vengono prodotte miscele, tecniche come la cromatografia preparativa su strato sottile, la HPLC preparativa, la HPLC chirale preparativa o la SFC
20 preparativa possono essere utilizzate per separare gli isomeri.

Schema 1



[0548] Lo Schema 1 di cui sopra illustra una procedura in 11 fasi per la sintesi dei lipidi della
 5 descrizione. (a) L'aldeide (**I-1**) viene fatta reagire con glicina metil estere cloridrato in presenza
 di un agente riducente, ad esempio NaBH(OAc)₃, e una base, ad esempio NEt₃, in un solvente
 appropriato, ad esempio AcOH, per ottenere metil dialchilglicinato (**I-2**). Questa reazione può
 avvenire in un solvente organico, ad esempio dicloroetano. Il metil dialchilglicinato (**I-2**) viene
 idrolizzato usando idrossido di litio, ad esempio in THF, per produrre il rispettivo alchilglicinato
 10 di litio (**I-3**). Una soluzione di (**I-3**), ad esempio in THF, viene fatta reagire con 1-*terz*-butil-
 piperazina in presenza di una base, ad esempio diisopropiletilammina (DIPEA), e un agente di

accoppiamento, ad esempio anidride dell'acido propilfosfonico, per formare *terz*-butil 4-(alchil)piperazin-1-carbossilato (**I-4**), che viene quindi deprotetto, utilizzando ad esempio acido trifluoroacetico (TFA), per produrre 2-(alchil)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (**I-5**). Questa reazione può avvenire in un solvente organico 150, ad esempio diclorometano (DCM). (b) Il

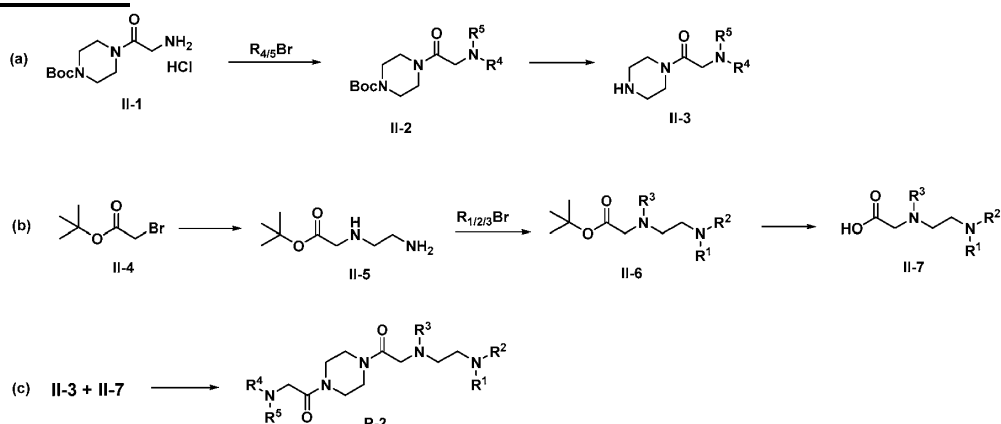
5 bromoalcano (**I-6**) viene fatto reagire con *terz*-butil-metil alchilglicinato in presenza di una base forte, ad esempio NaH, e in un solvente appropriato, ad esempio dimetilformammide (DMF), per formare metil N-(*terz*-butil)-N-alchilglicinato (**I-7**), che viene quindi deprotetto, usando ad esempio TFA, per produrre metil alchilglicinato (**I-8**). La reazione di deprotezione può avvenire in un solvente organico, ad es. diclorometano. (c) Il bromoalcano (**I-6**) viene fatto reagire con

10 etanolo-1-ammina in condizioni alcaline (ad es. K₂CO₃) e in presenza di un catalizzatore, ad esempio KI in un solvente appropriato (ad es. acetonitrile), per formare 2-(dialchilamino)etanolo (**I-9**), che viene convertito in *N*-(2-cloroetil)-*N*-alchilalcan-1-ammina (**I-10**) utilizzando un reagente adatto, ad es. mesilcloruro in presenza di una base, ad es. trietilammina, e un solvente appropriato, ad esempio DCM. (d) alchilglicinato di metile (**I-8**),

15 ottenuto secondo (b) e *N*-(2-cloroetil)-*N*-alchilalcan-1-ammina (**I-10**) ottenuto secondo (c) sono accoppiati in presenza di una base, ad es. K₂CO₃ e un catalizzatore nucleofilo, ad es. KI in un solvente appropriato (ad es. acetonitrile), per formare l'intermedio di metilglicinato (**I-11**), che viene poi idrolizzato utilizzando idrossido di litio in un solvente appropriato, ad es. tetraidrofurano (THF), per produrre il composto di glicinato di litio (**I-12**). (e) 2-(alchil)-1-

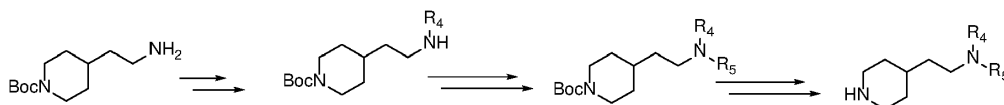
20 (piperazina-1-il)etan-1-one (**I-5**) ottenuto secondo (a) e il composto (**I-12**) ottenuto secondo (d) si fanno reagire in presenza di una base, ad esempio diisopropilettilammina (DIPEA), e di un agente di accoppiamento, ad esempio anidride dell'acido propilfosfonico, per dare il prodotto (**P-1**). Questa reazione può avvenire in un solvente organico, ad esempio THF.

Schema 2

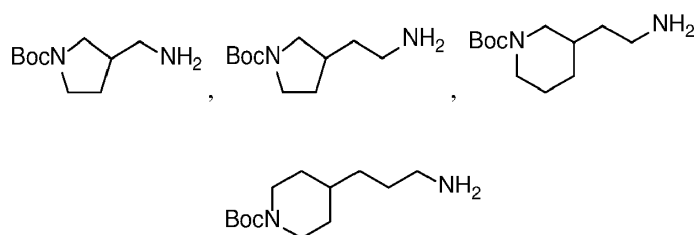


[0549] Lo Schema 2 di cui sopra illustra una procedura in 6 fasi per la sintesi dei lipidi della descrizione. (a) Il *terz*-butil 4-glicilpiperazina-1-carbossilato cloridrato (**II-1**) disponibile in commercio viene fatto reagire con bromoalcano in presenza di una base, ad esempio K_2CO_3 e un catalizzatore nucleofilo, ad esempio KI in un solvente appropriato, ad esempio ciclopentile etere metilico/acetonitrile e deproteetto usando, ad esempio, trifluoroacetico (TFA) per produrre 2-(dialchilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one. La fase di deprotezione può avvenire in un solvente organico, ad es. diclorometano (DCM) (b) il *terz*-butil 2-bromoacetato (**II-4**) viene fatto reagire con 1,2-diammino etano, in un solvente appropriato, ad es. DCM per produrre *terz*-butil(2-amminoetil)glicinato (**II-5**) che si accoppia con bromoalcano in presenza di una base, ad esempio K_2CO_3 e un catalizzatore nucleofilo, ad esempio KI in un solvente appropriato, ad esempio acetonitrile, per dare *terz*-butile N-(2-(dialchilammino)etil)-N-alchilglicinato (**II-6**). La deprotezione di **II-6**, usando ad esempio TFA, produce il corrispondente composto di glicina (**II-7**). (c) La reazione di (**II-3**), ottenuta secondo (a), e (**II-7**), ottenuta secondo (b), in presenza di una base, ad esempio diisopropiletilammina (DIPEA), e un agente di accoppiamento, ad esempio anidride dell'acido propilfosfonico, fornisce il prodotto (**P-2**). Questa reazione può avvenire in un solvente organico, ad esempio 2-metiltetraidrofurano.

Schema 3



[0550] Come illustrato nello Schema 3 sopra, gli intermedi per la sintesi di alcuni composti della divulgazione possono essere ottenuti alchilando il gruppo amminico del terz-butil 4-(2-amminoetil) piperidina-1-carbossilato. Reazioni simili possono essere eseguite con un materiale di partenza diverso come



10 [0551] Inoltre, è chiaro che qualsiasi forma di realizzazione specifica della presente descrizione che rientri nella tecnica anteriore può essere esplicitamente esclusa da una o più delle rivendicazioni. Poiché tali forme di realizzazione sono ritenute note a un esperto del ramo con competenza ordinaria, esse possono essere escluse anche se l'esclusione non è espressamente prevista nella presente.

15 [0552] In caso di dichiarazioni contrastanti tra una fonte citata e la presente domanda di brevetto, prevale l'affermazione nella presente domanda di brevetto. La citazione di pubblicazioni e di documenti brevettuali non è intesa come ammissione di pertinenza della tecnica anteriore, né costituisce ammissione circa il contenuto o la data delle stesse. Essendo stata ora descritta l'invenzione a titolo di descrizione scritta, gli esperti della tecnica
20 riconosceranno che l'invenzione può essere messa in pratica in una varietà di forme di realizzazione e che la descrizione e gli esempi precedenti di seguito sono a scopo illustrativo e non limitativo delle rivendicazioni che segue.

Esempi

[0553] Esempio 1: sintesi di composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I).

A. Considerazioni generali

[0554] Tutti i solventi e i reagenti utilizzati sono stati ottenuti in commercio e utilizzati tal quali se non diversamente specificato. Spettri ¹H NMR sono stati registrati in CDCl₃, a 300 K utilizzando uno strumento Bruker Ultrashield 300 MHz o uno strumento Varian Unity Inova 400 MHz. Gli spostamenti chimici sono riportati come parti per milione (ppm) rispetto a TMS (0,00) per ¹H. Le cromatografie su gel di silice sono state eseguite su strumenti ISCO CombiFlash Rf+ Lumen utilizzando cartucce ISCO RediSep Rf Gold Flash (granulometria: 20-40 micrometri). Le cromatografie in fase inversa sono state eseguite su strumenti ISCO CombiFlash Rf+ Lumen utilizzando colonne RediSep Rf Gold C18 High Performance. Tutti i composti finali sono stati determinati essere puri a più dell'85% tramite analisi mediante UPLC-MS a fase inversa (tempi di ritenzione, RT, in minuti) utilizzando lo strumento Waters Acquity UPLC con DAD ed ELSD e una colonna LC SB-C18 ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD), 2,1 mm, 50 mm, 1,8 µm e un gradiente dal 65 al 100% di acetonitrile in acqua con TFA allo 0,1% in 5 minuti a 1,2 mL/min. Il volume di iniezione era di 5 µL e la temperatura della colonna era di 80 °C. Il rilevamento si basava sulla ionizzazione elettrospray (ESI) in modalità positiva utilizzando lo spettrometro di massa Waters SQD (Milford, MA, USA) e un rivelatore di dispersione della luce evaporativa.

[0555] Le procedure descritte per la sintesi dei Composti 12 e 19 sono applicabili alla sintesi di composti secondo le formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I) in generale.

[0556] Nella presente sono impiegate le seguenti abbreviazioni:

t.a: Temperatura ambiente

MeOH: Metanolo

DCM: Diclorometano

DCE: Dicloroetano

DMAP: 4-Dimetilamminopiridina

DMF: *N,N*-dimetilformammide

5 EtOAc: Etilacetato

MeCN: Acetonitrile

THF: Tetraidrofurano

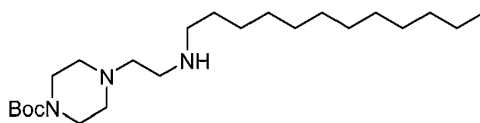
EDC·HCl: *N*-(3-Dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimmide cloridrato

B. Composto 1: 2-(Didodecilammino)-*N*-(2-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-

10 ***N*-dodecilammetammide**

Fase 1: *terz*-Butil 4-(2-(dodecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0557]



Formula chimica: $C_{23}H_{47}N_3O_2$

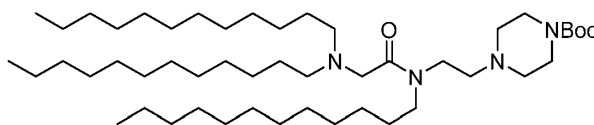
Peso molecolare: 397.65

15 [0558] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 18, il *terz*-butil 4-(2-(dodecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato da 1-bromododecano (3,3 g, 13.1 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (3,0 g, 13,1 mmol), K_2CO_3 (3,62 g, 26,2 mmol) e KI (217 mg, 1,31 mmol) in MeCN (60 mL). Resa (1,42 g, 27%). UPLC/ELSD: RT = 1,18 min. MS (ES): m/z (MH^+) 398,56 per $C_{23}H_{47}N_3O_2$

20 [0559] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,45 (br. m, 4H); 2,75 (br. m, 2H); 2,65 (br. m, 2H); 2,55 (br. m, 2H); 2,42 (br. m, 4H); 1,60-1,22 (br. m, 29H); 0,91 (br. m, 3H).

Fase 2: *terz*-Butil 4-(2-(2-(didodecilammino)-*N*-dodecilacetammido)etil)piperazin-1-carbossilato

[0560]



Formula chimica: $C_{49}H_{98}N_4O_3$

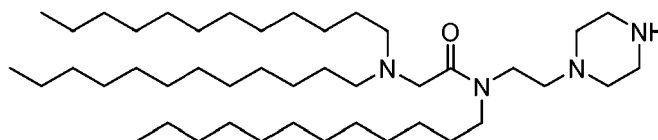
Peso molecolare: 791.35

[0561] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 11, il *tert*-butil 4-(2-(2-(didodecilammino)-*N*-dodecilacetammido)etil)piperazina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *tert*-butil 4-(2-(dodecilammino)etil)piperazina-1-carbossilato (100 mg, 0,25 mmol), didodecilglicina di litio (0,10 g, 0,25 mmol), anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione al 50% di EtOAc, 0,45 mL, 0,75 mmol) e *i* Pr₂EtN (0,044 mL, 0,25 mmol) in THF (2 mL). Resa (0,12 g, 63%).

[0562] UPLC/ELSD: RT = 3,36 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 792,082 per $C_{49}H_{98}N_4O_3$

10 **Fase 3: 2-(Didodecilammino)-*N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)acetammide**

[0563]



Formula chimica: $C_{44}H_{90}N_4O$

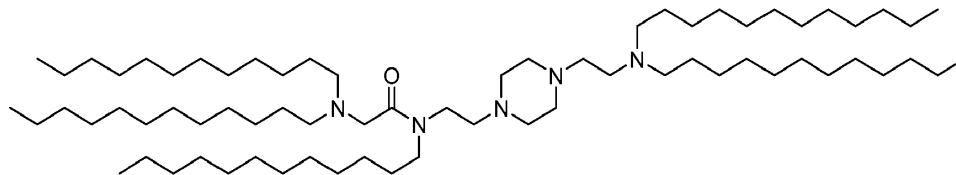
Peso molecolare: 691.23

[0564] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, la 2-(didodecilammino)-*N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)acetammide è stata sintetizzata dal *tert*-butil 4-(2-(2-(didodecilammino)-*N*-dodecilacetamido)etil)piperazin-1-carbossilato (0,12 g, 0,16 mmol) e TFA (0,25 mL, 3,2 mmol) in 0,25 mL di DCM.

[0565] UPLC/ELSD: RT = 3,06 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 692,984 per $C_{44}H_{90}N_4O$

Fase 4: Composto 1: 2-(Didodecilammino)-*N*-(2-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-*N*-dodecilacetammide

[0566]



Formula chimica: $C_{70}H_{143}N_5O$

Peso molecolare: 1070.95

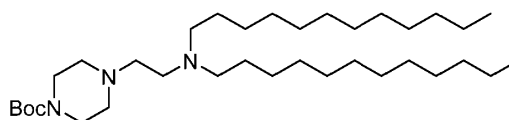
[0567] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, è stata sintetizzata la 2-(didodecilammino)-N-(2-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N-dodecilacetammide da 2-(didodecilammino)-N-dodecil-N-(2-(piperazin-1-il)etil)acetammide (65 mg, 0,094 mmol), N-(2-cloroetil)-N-dodecildodecan-1-ammina (42 mg, 0,10 mmol), K_2CO_3 (13 mg, 0,094 mmol) e KI (2 mg, 0,0094 mmol) in 0,5 mL di MeCN per ottenere 58,5 mg per una resa del 58%. UPLC/ELSD: RT = 3,75 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1072,585 per $C_{70}H_{143}N_5O$

[0568] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,82-3,23 (br. m. 8H); 3,04-2,90 (br. m., 2H); 2,47 (m, 18H); 1,24 (m, 100H); 0,96 (m, 15H).

C. Composto 2: 2-((2-(Didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)-1-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etan-1-one

Fase 1: *terz*-Butil 4-(2-(dodecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0569]



Formula chimica: $C_{35}H_{71}N_3O_2$

Peso molecolare: 565.97

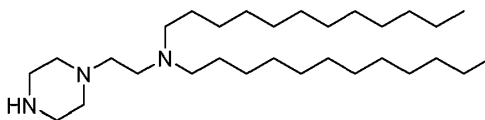
[0570] Una miscela di 1-bromododecano (1,1 mL, 4,6 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (1,0 g, 4,4 mmol), K_2CO_3 (0,61 g, 4,4 mmol), in 10 mL di MeCN è stato lasciato agitare a t.a. per 12 ore. Trascorso questo tempo la reazione è stata filtrata e concentrata. Il

materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-20% di MeOH in DCM con 1% di NH₄OH per fornire *terz*-butil 4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (450 mg, 0,80 mmol, 18%). UPLC/ELSD: RT = 2,87 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 566,655 per C₃₅H₇₁N₃O₂

- 5 [0571] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,40 (m, 4H); 2,56 (m, 2H); 2,40 (m, 10H); 1,44 (s, 9H); 1,40-1,24 (m, 40H); 0,86 (t, 6H).

Fase 2: *N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina

[0572]



Formula chimica: C₃₀H₆₃N₃

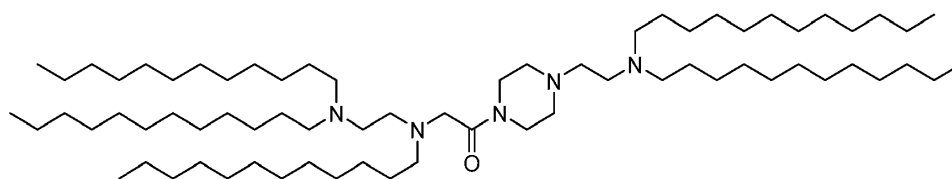
Peso molecolare: 465.86

- 10 [0573] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 18, la *N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina è stata sintetizzata dal *terz*-butil 4-(2-(didodecilammino))etil)piperazina-1-carbossilato (0,92 g, 1,63 mmol), TFA (6,2 mL, 82 mmol) in 6 mL di DCM per ottenere 490 mg per una resa del 65%. UPLC/ELSD: RT = 2,10 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 466,379 per C₃₀H₆₃N₃

- 15 [0574] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 2,88 (t, 4H); 2,61 (m, 2H); 2,45 (m, 10H); 1,43-1,24 (m, 40H); 0,86 (t, 6H).

Fase 3: Composto 2: 2-((2-(Didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)-1-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etan-1-one

[0575]



Formula chimica: $C_{70}H_{143}N_5O$

Peso molecolare: 1070.95

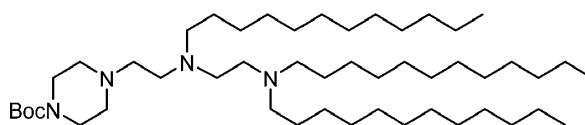
[0576] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)-1-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il) l'etan-1-one è stato sintetizzato da *N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina (32 mg, 0,069 mmol), *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina (43 mg, 0,069 mmol), anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione al 50% di EtOAc, 0,12 mL, 0,21 mmol) e *i*-Pr₂EtN (0,024 mL, 0,14 mmol) in 0,5 mL di THF per fornire 17,7 mg (17%).

[0577] UPLC: RT = 3,90 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 1071,475 per $C_{70}H_{143}N_5O$

[0578] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,65 (m, 2H); 3,57 (m, 2H); 3,26 (s, 2H); 2,33 2,57 (m, 22H); 1,24-1,39 (m, 100H); 0,88 (t, 15H).

D. Composto 3: 2-(Didodecilammino)-1-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etan-1-one Fase 1: *terz*-Butil 4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0579]



Formula chimica: $C_{49}H_{100}N_4O_2$

Peso molecolare: 777.37

15

[0580] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 18, il *terz*-butil 4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(dodecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (700 mg, 1,76 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (806 mg, 1,93 mmol), K₂CO₃ (486 mg, 3,52 mmol) e KI

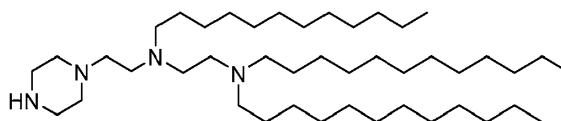
(29 mg, 0,176 mmol) in THF (15 mL). Resa (683 mg, 50%).

[0581] UPLC/ELSD: RT = 3,35 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 778,16 per C₄₉H₁₀₀N₄O₂

[0582] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,44 (t, 4H); 3,11-2,86 (br. m, 4H); 2,78-2,32 (br. m, 14H); 1,80-1,05 (br. m, 69H); 0,91 (t, 9H).

5 **Fase 2: N¹,N¹,N²-Tridodecil-N²-(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina**

[0583]



Formula chimica: C₄₄H₉₂N₄

Peso molecolare: 677.25

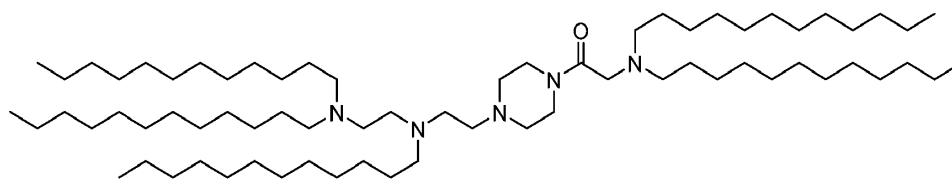
[0584] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 18, N¹,N¹,N²-tridodecil-N²-(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina è stato sintetizzato da *terz*-butil 4-(2-((2-
10 (didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (683 mg, 0,879 mmol) e TFA (3,4 mL, 43,9 mmol) in DCM (3,4 mL). Resa (595 mg, 99%).

[0585] UPLC/ELSD: RT = 2,94 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 678,16 per C₄₄H₉₂N₄

Fase 3: Composto 3:

15 **2-(Didodecilammino)-1-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etan-1-one**

[0586]



Formula chimica: C₇₀H₁₄₃N₅O

Peso molecolare: 1070.95

[0587] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-(didodecilammino)-1-(4-(2-((2-

(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il) l'etan-1-one era da N^1 , N^1 , N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (50 mg, 0,074 mmol), litio didodecilglicina (33 mg, 0,078 mmol), anidride dell'acido propilfosfonico (50% in EtOAc, 0,13 mL, 0,22 mmol) e *i*-Pr₂EtN (0,026 mL) in 0,5 mL THF per ottenere 33,9 mg (43%).

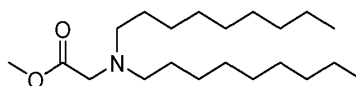
5 [0588] UPLC: RT = 3,90 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1071,475 per C₇₀H₁₄₃N₅O

[0589] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,65 (m, 2H); 3,57 (m, 2H); 3,26 (s, 2H); 2,33 2,57 (m, 22H); 1,24-1,39 (m, 100H); 0,88 (t, 15H).

E. Composto 4: 2-(Dinonilammino)-1-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

10 **Fase 1: Metil dinonilglicinato**

[0590]



Formula chimica: C₂₁H₄₃NO₂

Peso molecolare: 341.58

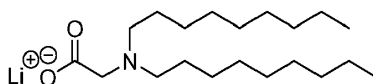
[0591] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 11, il metil dinonilglicinato è stato sintetizzato da glicina metil estere cloridrato (5,0 g, 39,8 mmol), trietilammina (8,3 mL, 59,7

15 mmol), 95% nonanale (15,0 g, 99,6 mmol), triacetossiboroidruo di sodio (21,1 g, 99,6 mmol) e acido acetico (5,7 mL, 99,6 mmol) in DCE (50 mL). Resa (3,5 g, 26%). UPLC/ELSD: RT = 1,82 min. MS (ES): m/z (MH^+) 343,62 per C₂₁H₄₃NO₂

[0592] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,72 (s, 3H); 3,35 (s, 2H); 2,57 (t, 4H); 1.46 (br. m, 4H); 1.29 (br. m, 24H); 0,90 (t, 6H).

20 **Fase 2: Litio dinonilglicinato**

[0593]



Formula chimica: $C_{20}H_{40}LiNO_2$

Peso molecolare: 333.49

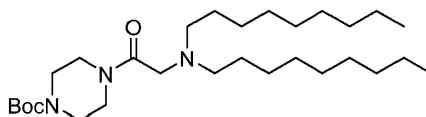
[0594] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 11, il dinonilglicinato di litio è stato sintetizzato da metil dinonilglicinato (3,5 g, 10,2 mmol) e LiOH 1M (50 mL, 50 mmol) in THF (50 mL). Resa (3,0 g, 88%).

5 UPLC/ELSD: RT = 1,71 min. MS (ES): m/z (MH^+) 328,37 per $C_{20}H_{41}NO_2$

[0595] 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : ppm 3,13 (s, 2H); 2,59 (t, 4H); 1,51 (br. m, 4H); 1,32 (br. m, 24H); 0,92 (t, 6H).

Fase 3: *terz*-Butil 4-(dinonilglicil) piperazin-1-carbossilato

[0596]



Formula chimica: $C_{29}H_{57}N_3O_3$

Peso molecolare: 495.79

10

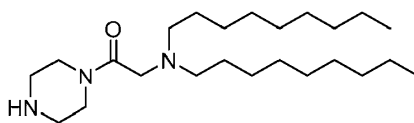
[0597] Allo stesso modo della Fase 3 per il composto 11, il *terz*-butil 4-(dinonilglicil)piperazina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal litio dinonilglicinato (2,0 g, 6,00 mmol), 1-boc-piperazina (1,23 g, 6,58 mmol), *i*-Pr₂EtN (2,3 mL, 13,2 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione EtOAc al 50%, 10,7 mL, 17,9 mmol). Resa (824 mg,

15 28%).

[0598] UPLC/ELSD: RT = 2,19 min. MS (ES): m/z (MH^+) 496,72 per $C_{29}H_{57}N_3O_3$

Fase 4: 2-(Dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one

[0599]



Formula chimica: $C_{24}H_{49}N_3O$

Peso molecolare: 395.68

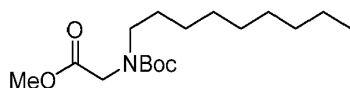
[0600] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il 2-(diononilammino)-1-(piperazin-1-iletan-1-one è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(dionilglicil) piperazin-1-carbossilato (824 mg, 1,66 mmol) e TFA (6,4 mL, 83,1 mmol) in DCM (6,4 mL). Resa (246 mg, 37%). UPLC/ELSD:

5 RT = 1,25 min. MS (ES): m/z (MH^+) 396,68 per $C_{24}H_{49}N_3O$

[0601] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,63 (br. m, 4H); 3,28 (s, 2H); 2,89 (br. m, 4H); 2,48 (t, 4H); 1,45 (br. m, 4H); 1,28 (br. m, 24H); 0,90 (t, 6H).

Fase 5: Metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-nonilglicinato

[0602]



Formula chimica: $C_{17}H_{33}NO_4$

Peso molecolare: 315.45

10

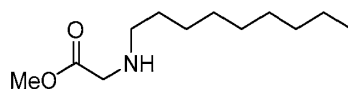
[0603] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 11, il metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-nonilglicinato è stato sintetizzato dall'*N*-(*terz*-butossicarbonil)glicina metil estere (7,7 g, 40,7 mmol) e NaH (60 %, 1,71 g, 42,7 mmol) in DMF (100 mL). Resa (3,32 g, 26%).

[0604] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,02-3,84 (br. m, 2H); 3,75 (s, 3H); 3,26 (br. m, 2H); 1,65-1,39 (br. m, 11H); 1,28 (br. m, 12H); 0,90 (t, 3H).

15

Fase 6: Metil nonilglicinato

[0605]



Formula chimica: $C_{12}H_{25}NO_2$

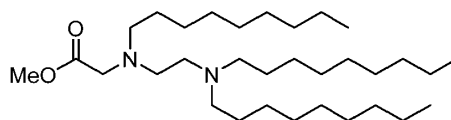
Peso molecolare: 215.34

[0606] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 11, il metil nonilglicinato è stato sintetizzato dal metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-nonilglicinato (3,32 g, 10,5 mmol) e TFA (16 mL, 210 mmol) in DCM (16 mL). Resa (2,23 g, 98%).

- 5 [0607] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,75 (s, 3H); 3,44 (s, 2H); 2,61 (t, 2H); 1,69 (br. m, 1H); 1,51 (br. m, 2H); 1,28 (br. m, 12H); 0,90 (t, 3H).

Fase 7: Metil *N*-(2-(dinonilammino)etil) -*N*-nonilglicinato

[0608]



Formula chimica: C₃₂H₆₆N₂O₂

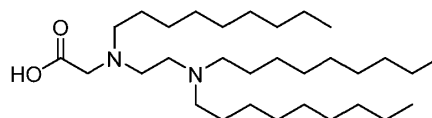
Peso molecolare: 510.89

- 10 [0609] Allo stesso modo della Fase 9 per il composto 11, il metil *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicinato è stato sintetizzato dal metil nonilglicinato (449 mg, 2,08 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (830 mg, 2,50 mmol), K₂CO₃ (576 mg, 4,16 mmol) e KI (35 mg, 0,208 mmol) in MeCN (13 mL). Resa (958 mg, 90%). UPLC/ELSD: RT = 3,11 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 511,97 per C₃₂H₆₆N₂O₂

- 15 [0610] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,72 (s, 3H); 3,42 (s, 2H); 2,95-2,15 (br. m, 10H); 1,85-1,00 (br. m, 42H); 0,90 (t, 9H).

Fase 8: *N*-(2-(Dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina

[0611]



Formula chimica: C₃₁H₆₄N₂O₂

Peso molecolare: 496.87

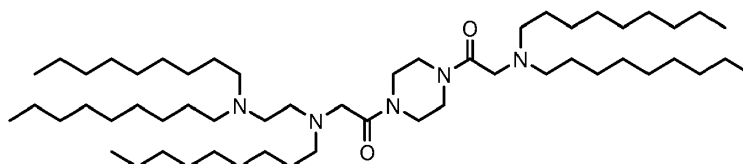
- 20 [0612] Allo stesso modo della Fase 10 per il Composto 11, la *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-

nonilglicina è stata sintetizzata dal metil *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicinato (958 mg, 1,88 mmol) e LiOH 1M (10 mL, 10 mmol) in THF (10 mL). Resa (514 mg, 55%). UPLC/ELSD: RT = 2,75 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 497,95 per C₃₁H₆₄N₂O₂

[0613] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,92 (br. m, 6H); 3,14 (br. m, 6H); 1,77 (br. m, 6H); 1,45-1,13 (br. m, 36H); 0,90 (t, 9H).

Fase 9: Composto 4: 2-(Dinonilammino)-1-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

[0614]



Formula chimica: C₅₅H₁₁₁N₅O₂

Peso molecolare: 874.53

10 [0615] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-(dinonilammino)-1-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)etan-1 -uno è stato sintetizzato da 2-(dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (61,5 mg, 0,155 mmol), *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (85 mg, 0,171 mmol), *i*-Pr₂EtN (60 μl, 0,342 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione al 50% di EtOAc, 0,278 mL, 0,466 mmol). Resa
15 (38 mg, 28%).

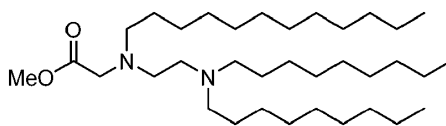
[0616] UPLC/ELSD: RT = 3,13 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 875,76 per C₅₅H₁₁₁N₅O₂

[0617] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,82-3,49 (br. m, 8H); 3,33 (s, 2H); 3,27 (s, 2H); 2,68-2,18 (br. m, 14H); 1,82-1,02 (br. m, 70H); 0,90 (t, 15H).

F. Composto 5: 2-(Dinonilammino)-1-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

Fase 1: Metil *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato

[0618]



Formula chimica: $C_{35}H_{72}N_2O_2$

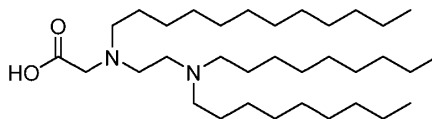
Peso molecolare: 552.97

[0619] Allo stesso modo della Fase 9 per il composto 11, il metil *N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato è stato sintetizzato dal metil dodecilglicinato (535 mg, 2,08 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (830 mg, 2,50 mmol), K_2CO_3 (576 mg, 4,16 mmol) e KI (35 mg, 0,208 mmol) in MeCN (13 mL). Resa (385 mg, 34%). UPLC/ELSD: RT = 3,34 min. MS (ES): m/z (MH^+) 553,96 per $C_{35}H_{72}N_2O_2$

[0620] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,72 (s, 3H); 3,41 (s, 2H); 2,90-2,20 (br. m, 10H); 1,85-1,05 (br. m, 48H); 0,90 (t, 9H).

Fase 2: *N*-(2-(Dionilammino)etil)-*N*-dodecilglicina

10 [0621]



Formula chimica: $C_{34}H_{70}N_2O_2$

Peso molecolare: 538.95

[0622] Allo stesso modo della Fase 10 per il Composto 11, la *N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-dodecilglicina è stata sintetizzata dal metil *N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato (385 mg, 0,696 mmol) e LiOH da 1M (3,5 mL, 3,5 mmol) in THF (3,5 mL). Resa (225 mg, 60%).

15 [0623] UPLC/ELSD: RT = 3,13 min. MS (ES): m/z (MH^+) 539,93 per $C_{34}H_{70}N_2O_2$

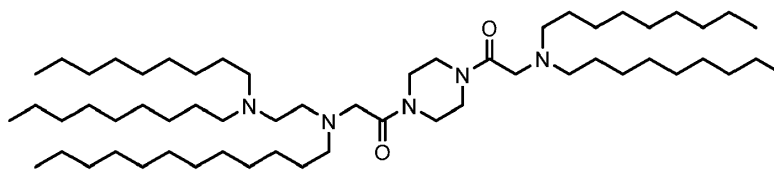
[0624] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,73 (s, 2H); 3,62-3,39 (br. m, 4H); 3,09 (br. m, 6H); 1,76 (br. m, 6H); 1,28 (br, 42H); 0,90 (t, 9H).

Fase 3: Composto 5:

2-(Dionilammino)-1-(4-(*N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-

20 one

[0625]



Formula chimica: $C_{58}H_{117}N_5O_2$

Peso molecolare: 916.61

[0626] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-(disonilammino)-1-(4-(N-(2-(disonilammino)etil)-N-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one è stato sintetizzato da 2-(disonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (62 mg, 0,155 mmol), N-(2-(disonilammino)etil)-N-dodecilglicina (92 mg, 0,171 mmol), *i*-Pr₂EtN (60 µl, 0,342 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione al 50% di EtOAc, 0,278 mL, 0,466 mmol). Resa (38 mg, 26%).

[0627] UPLC/ELSD: RT = 3,32 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 917,67 per $C_{58}H_{117}N_5O_2$

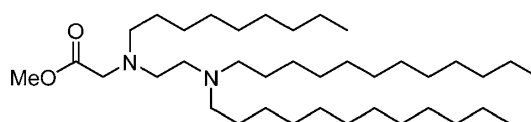
[0628] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,86-3,45 (br. m, 8H); 3,33 (s, 2H); 3,28 (s, 2H); 2,73-2,27 (br. m, 14H); 1,86-1,00 (76H); 0,91 (t, 15H).

G. Composto 6:

2-((2-(Didodecilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(disonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

Fase 1: Metil N-(2-(didodecilammino)etil)-N-nonilglicinato

[0629]



Formula chimica: $C_{38}H_{78}N_2O_2$

Peso molecolare: 595.05

15

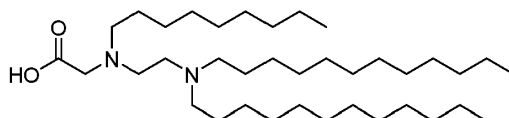
[0630] Allo stesso modo della Fase 9 per il Composto 11, il metil N-(2-(didodecilammino)etil)-N-nonilglicinato è stato sintetizzato dal metil nonilglicinato (355 mg, 1,65 mmol), N-(2-cloroetil)-N-dodecilnonan-1-ammina (825 mg, 1,98 mmol), K₂CO₃ (457 mg, 3,30 mmol) e KI (27 mg, 0,165 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (460 mg, 47%). UPLC/ELSD: RT = 3,62 min.

MS (ES): m/z (MH^+) 596,03 per $C_{38}H_{78}N_2O_2$

[0631] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,72 (s, 3H); 3,42 (s, 2H); 2,80-2,24 (br. m, 10H); 1,56-1,00 (br. m, 54H); 0,90 (t, 9H).

Fase 2: *N*-(2-(Didodecilammino)etil)-*N*-nonilglicina

5 [0632]



Formula chimica: $C_{37}H_{76}N_2O_2$

Peso molecolare: 581.03

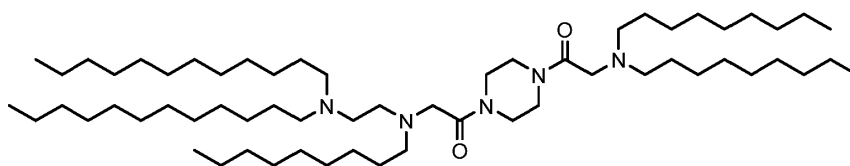
[0633] Allo stesso modo della Fase 10 per il Composto 11, la *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-nonilglicina è stata sintetizzata dal metil *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-nonilglicinato (460 mg, 0,773 mmol) e LiOH 1M (3,9 mL, 3,9 mmol) in THF (3,9 mL). Resa (323 mg, 72%).

10 [0634] UPLC/ELSD: RT = 3,37 min. MS (ES): m/z (MH^+) 582,00 per $C_{37}H_{76}N_2O_2$

[0635] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,17 (s, 2H); 4,00 (br. m, 2H); 3,84 (br. m, 2H); 3,34 (br. m, 2H); 3,18 (br. m, 4H); 1,82 (br. m, 6H); 1,27 (br. m, 48H); 0,91 (t, 9H).

Fase 3: Composto 6:

15 one [0636] 2-((2-(Didodecilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-



Formula chimica: $C_{61}H_{123}N_5O_2$

Peso molecolare: 958.69

[0637] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(didodecilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one è stato
20 sintetizzato da 2-(dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (62 mg, 0,155 mmol), *N*-(2-

(didodecilammino)etil)-*N*-nonilglicina (99 mg, 0,171 mmol), *i*-Pr₂EtN (60 μL, 0,342 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione EtOAc al 50%, 0,278 mL, 0,466 mmol). Resa (45 mg, 30%).

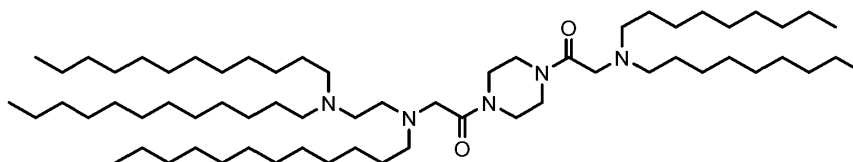
[0638] UPLC/ELSD: RT = 3,46 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 959,98 per C₆₁H₁₂₃N₅O₂

5 [0639] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,81-3,49 (br. m, 8H); 3,33 (s, 2H); 3,27 (s, 2H); 2,70-2,25 (br. m, 14H); 1,90-1,00 (br. m, 82H); 0,90 (t, 15H).

H. Composto 7:

2-((2-(Didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)-1-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

[0640]



Formula chimica: C₆₄H₁₂₉N₅O₂

Peso molecolare: 1000.77

10

[0641] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)-1-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one è stato sintetizzato da 2-(dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (62 mg, 0,155 mmol), *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina (107 mg, 0,171 mmol), *i*-Pr₂EtN (60 μL, 0,342 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione EtOAc al 50%, 0,278 mL, 0,466 mmol). Resa (34 mg, 20%).

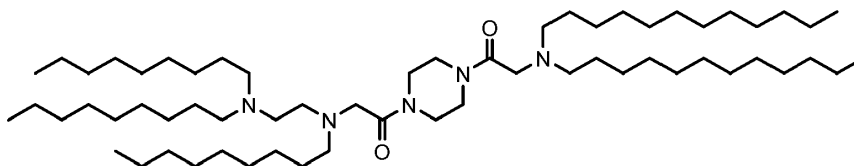
[0642] UPLC/ELSD: RT = 3,60 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 1001,97 per C₆₄H₁₂₉N₅O₂

[0643] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,85-2,18 (br. m, 26H); 1,91-1,00 (br. m, 88H); 0,90 (t, 15H).

20 **I. Composto 8:**

2-(Didodecilammino)-1-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

[0644]



Formula chimica: $C_{61}H_{123}N_5O_2$

Peso molecolare: 958.69

[0645] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-(didodecilammino)-1-(4-(N-(2-(dionilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)etan-1 -uno è stato sintetizzato da 2-(didodecilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (202 mg, 0,421 mmol), N-(2-(dionilammino)etil)-N-nonilglicina (230 mg, 0,463 mmol), *i*-Pr₂EtN (0,162 mL, 0,926 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione al 50% di EtOAc, 0,752 mL, 1,26 mmol). Resa (148 mg, 37%).

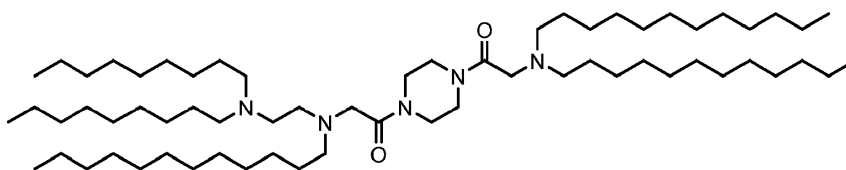
[0646] UPLC/ELSD: RT = 3,41 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 959,74 per $C_{61}H_{123}N_5O_2$

[0647] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,82-3,49 (br. m, 8H); 3,33 (s, 2H); 3,27 (s, 2H); 2,66-2,30 (br. m, 14H); 1,85-1,02 (br. m, 82H); 0,90 (t, 15H).

J. Composto 9:

2-(Didodecilammino)-1-(4-(N-(2-(dionilammino)etil)-N-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

[0648]



Formula chimica: $C_{64}H_{129}N_5O_2$

Peso molecolare: 1000.77

[0649] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-(didodecilammino)-1-(4-(N-(2-(dionilammino)etil)-N-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1 -uno è stato sintetizzato da (76 mg,

0,157 mmol), (93 mg, 0,173 mmol), *i*-Pr₂EtN (60 μL, 0,342 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione al 50% di EtOAc, 0,278 mL, 0,466 mmol). Resa (59 mg, 37%).

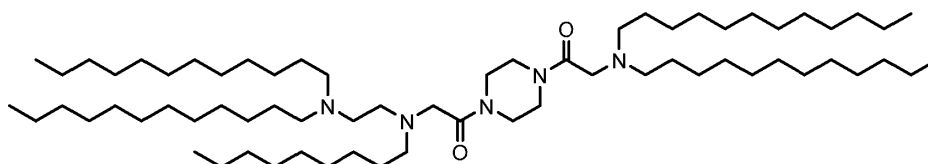
UPLC/ELSD: RT = 3,57 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 1001,65 per C₆₄H₁₂₉N₅O₂

[0650] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,95-2,23 (br. m, 26H); 2,05-1,00 (br. m, 88H);
5 0,90 (t, 15H).

K. Composto 10:

2-(Didodecilammino)-1-(4-(*N*- (2-(didodecilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

[0651]



Formula chimica: C₆₇H₁₃₅N₅O₂

Peso molecolare: 1042.85

10

[0652] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-(didodecilammino)-1-(4-(*N*-2-(didodecilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)etan-1 -uno è stato sintetizzato da 2-(didodecilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (76 mg, 0,157 mmol), *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-nonilglicina (101 mg, 0,173 mmol), *i*-Pr₂EtN (60 μL, 0,342 mmol) e
15 anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione al 50% di EtOAc, 0,278 mL, 0,466 mmol). Resa (56 mg, 34%).

[0653] UPLC/ELSD: RT = 3,72 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 1043,88 per C₆₇H₁₃₅N₅O₂

[0654] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,95-2,15 (br. m, 26H); 1,90-1,05 (br. m, 94H);
0,90 (t, 15H).

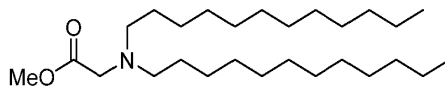
20

L. Composto 11:

2-(Didodecilammino)-1-(4-(*N*- (2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

Fase 1: Metil didodecilglicinato

[0655]



Formula chimica: $C_{27}H_{55}NO_2$

Peso molecolare: 425.74

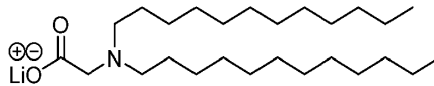
[0656] Una soluzione di glicina metil estere cloridrato (5,0 g, 39,8 mmol) e trietilammina (8,3
5 mL, 59,7 mmol) in DCE (50 mL) è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 15 minuti.
È stata aggiunta una soluzione di dodecanolo al 92% (20,0 g, 99,6 mmol) in DCE (50 mL) e la
miscela è stata raffreddata a 0 °C. Sono stati aggiunti sodio triacetossiboroidruro (21,1 g, 99,6
mmol) e acido acetico (5,7 mL, 99,6 mmol) e la reazione è stata lasciata tornare a temperatura
10 ambiente e agitata per 16 ore. La reazione è stata spenta mediante aggiunta lenta di bicarbonato
di sodio saturo ed estratta con DCM. Gli estratti combinati sono stati lavati con soluzione salina,
essiccati su Na_2SO_4 anidro, filtrati e concentrati nel vuoto. La purificazione mediante
cromatografia flash su silice ISCO (0-30% EtOAc/esani) ha fornito metil didodecilglicinato (7,7
g, 45%).

[0657] UPLC/ELSD: RT = 2,82 min. MS (ES): m/z (MH^+) 426,69 per $C_{27}H_{55}NO_2$

15 [0658] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,72 (s, 3H); 3,35 (s, 2H); 2,57 (t, 4H); 1,46 (m,
4H); 1,28 (br. m, 36H); 0,91 (t, 6H).

Fase 2: Litio didodecilglicinato

[0659]



Formula chimica: $C_{26}H_{52}LiNO_2$

Peso molecolare: 417.65

20

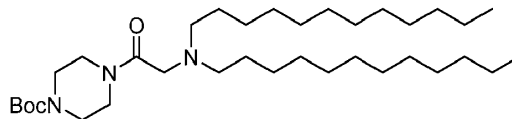
[0660] Una soluzione di didodecilglicinato di metile (7,7 g, 18,1 mmol) in THF (100 mL) e

LiOH da 1M (90,4 mL, 90,4 mmol) è stata lasciata in agitazione a 65 °C per 16 ore. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e concentrata fino a ottenere una polvere bianca. La polvere è stata sospesa in acqua, filtrata, lavata con acqua ed etere dietilico ed essiccata sotto vuoto per fornire litio didodecilglicinato (7,0 g, 93%).

- 5 [0661] UPLC/ELSD: RT = 2,74 min. MS (ES): m/z (MH^+) 412,83 per $C_{26}H_{53}NO_2$
[0662] 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : ppm 3,14 (s, 2H); 2,60 (t, 4H); 1,51 (m, 4H); 1,31 (m, 36H); 0,92 (t, 6H).

Fase 3: *terz*-Butil 4-(didodecilglicil) piperazin-1-carbossilato

[0663]



Formula chimica: $C_{35}H_{69}N_3O_3$

Peso molecolare: 579.96

10

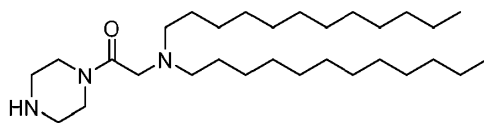
[0664] Una soluzione di didodecilglicinato di litio (2,0 g, 4,79 mmol), 1-boc-piperazina (978 mg, 5,25 mmol), *i*-Pr₂EtN (1,84 mL, 10,5 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (50% EtOAc soluzione, 8,53 mL, 14,3 mmol) in THF (24 mL) è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 48 ore. La reazione è stata diluita con acqua ed estratta con EtOAc. Gli estratti organici sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su Na₂SO₄ anidro, filtrati e concentrati nel vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) ha fornito *terz*-butil 4-(didodecilglicil) piperazin-1-carbossilato (983 mg, 35%).

15

[0665] UPLC/ELSD: RT = 3,06 min. MS (ES): m/z (MH^+) 581,02 per $C_{35}H_{69}N_3O_3$

Fase 4: 2-(Didodecilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one

20 [0666]



Formula chimica: $C_{30}H_{61}N_3O$

Peso molecolare: 479.84

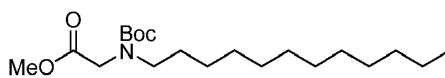
[0667] A una soluzione a 0 °C di *terz*-butil 4-(didodecilglicil)piperazin-1-carbossilato (983 mg, 1,69 mmol) in DCM (6,5 mL) è stato aggiunto goccia a goccia TFA (6,5 mL, 84,7 mmol). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata per 16 ore. La miscela di
5 reazione è stata concentrata sotto vuoto e il materiale grezzo è stato sciolto in $CHCl_3$. La soluzione è stata lavata con Na_2CO_3 al 5%, soluzione salina, essiccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e concentrata *sotto vuoto* per fornire 2-(didodecilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (163 mg, 20%).

[0668] UPLC/ELSD: RT = 2,07 min. MS (ES): m/z (MH^+) 480,89 per $C_{30}H_{61}N_3O$

10 [0669] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,67 (br. m, 4H); 3,32 (s, 2H); 2,92 (br. m, 4H); 2,53 (br. m, 4H); 1,48 (br. m, 4H); 1,28 (br. m, 36H); 0,91 (t, 6H).

Fase 5: Metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-dodecilglicinato

[0670]



Formula chimica: $C_{20}H_{39}NO_4$

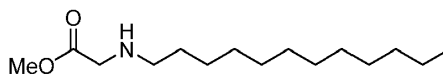
Peso molecolare: 357.54

15 [0671] Una soluzione a 0 °C di *N*-(*terz*-butossicarbonil)glicina metil estere (7,7 g, 40,7 mmol) in DMF (100 mL) è stata trattata con NaH (60%, 1,71 g, 42,7 mmol) e la miscela è stata lasciato mescolare per 30 minuti. La soluzione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente prima che fosse aggiunto 1-bromododecano (15,2 g, 61,0 mmol). La reazione è stata spenta con acqua ed estratta con EtOAc. Gli estratti organici sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su
20 Na_2SO_4 anidro, filtrati e concentrati nel vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% EtOAc/esani) ha fornito metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-dodecilglicinato

(4,03 g, 28%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 4,01-3,84 (br. m, 2H); 3,75 (s, 3H); 3,27 (br. m, 2H); 1,67-1,39 (br. m, 11H); 1,28 (br. m, 18H); 0,90 (t, 3H).

Fase 6: Metil dodecilglicinato

[0672]



Formula chimica: $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{NO}_2$

Peso molecolare: 257.42

5

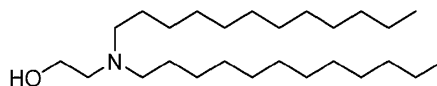
[0673] A una soluzione a 0 °C di metil N-(terz-butossicarbonil)-N-dodecilglicinato (4,03 g, 11,3 mmol) in DCM (17 mL) è stato aggiunto goccia a goccia TFA (17 mL, 226 mmol). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata per 6 ore. La miscela di reazione è stata concentrata sotto vuoto e il materiale grezzo è stato sciolto in DCM. La soluzione è stata lavata con NaOH al 10%, soluzione salina, essiccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e concentrata sotto vuoto per fornire metil dodecilglicinato (2,84 g, 98%).

10

[0674] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 3,75 (s, 3H); 3,44 (s, 2H); 2,62 (t, 2H); 1,70 (br. 1H); 1,51 (m, 2H); 1,29 (br. m, 18H); 0,90 (t, 3H).

Fase 7: 2-(Didodecilammino)etan-1-olo

15 [0675]



Formula chimica: $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{NO}$

Peso molecolare: 397.73

[0676] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il 2-(didodecilammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 1-bromododecano (10 g, 40,1 mmol), etanolammina (1,10 mL, 18,2 mmol), K_2CO_3 (11,1 g, 80,1 mmol) e KI (302 mg, 1,82 mmol) in MeCN (84 mL). Resa (3,87 g, 53%).

20

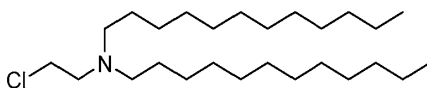
[0677] UPLC/ELSD: RT = 2,69 min. MS (ES): m/z (MH^+) 398,56 per $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{NO}$

[0678] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 3,57 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,49 (br. m, 4H); 1,48 (br.

m, 4H); 1,29 (br. m, 36H); 0,91 (t, 6H).

Fase 8: *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina

[0679]



Formula chimica: $C_{26}H_{54}ClN$

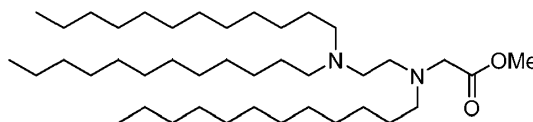
Peso molecolare: 416.18

5 [0680] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, la *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina è stata sintetizzata dal 2-(didodecilammino)etan-1-olo (3,87 g, 9,73 mmol), trietilammina (1,76 mL, 12,6 mmol) e metansolfonil cloruro (0,941 mL, 12,2 mmol) in DCM (50 mL). Resa (1,92 g, 47%).

[0681] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,51 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,47 (br. m, 4H); 1,44 (br. m, 4H); 1,28 (br. m, 36H); 0,90 (t, 6H).

Fase 9: Metil *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato

[0682]



Formula chimica: $C_{41}H_{84}N_2O_2$

Peso molecolare: 637.14

15 [0683] A una soluzione di metil dodecilglicinato (425 mg, 1,65 mmol) in MeCN (10 mL) è stata aggiunta *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (825 mg, 1,98 mmol), K_2CO_3 (457 mg, 3,30 mmol) e KI (27 mg, 0,165 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 72 ore. La miscela di reazione è stata filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato concentrato sotto vuoto a dare il prodotto grezzo. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito metil *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato (652 mg, 62%).

20 [0684] UPLC/ELSD: RT = 3,77 min. MS (ES): m/z (MH^+) 638,18 per $C_{41}H_{84}N_2O_2$

[0685] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 3,72 (s, 3H); 3,41 (s, 2H); 2,90-2,20 (br. m, 10H); 1,60-1,00 (br. m, 60H); 0,90 (t, 9H).

Fase 10: *N*-(2-(Didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina

[0686]

5
Formula chimica:
Peso molecolare:

[0687] Una soluzione di metil *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato (652 mg, 1,02 mmol) in THF (6 mL) e LiOH da 1M (5 mL, 5 mmol) è stata lasciata agitare a 65 °C per 16 ore. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e acidificata con HCl al 10%. La miscela è stata estratta con cloroformio e le sostanze organiche sono state lavate con soluzione salina, essiccate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e concentrate *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina (153 mg, 24%). UPLC/ELSD: RT = 3,60 min. MS (ES): m/z (MH^+) 624,07 per $\text{C}_{40}\text{H}_{82}\text{N}_2\text{O}_2$

10
15
[0688] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 4,02-3,40 (br. m, 6H); 3,16 (br. m, 6H); 1,78 (br. m, 6H); 1,46-1,01 (br. m, 54H); 0,90 (t, 9H).

Fase 11: Composto 11: 2-(Didodecilammino)-1-(4-(*N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

[0689]

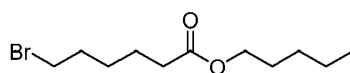
Formula chimica:
Peso molecolare:

- [0690] A una soluzione di *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina (212 mg, 0,340 mmol) e 2-(didodecilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (163 mg, 0,340 mmol) in THF (4 mL) sono stati aggiunti *i*-Pr₂EtN (0,119 mL, 0,680 mmol) e anidride dell'acido propilfosfonico (soluzione EtOAc al 50%, 0,606 mL, 1,02 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata diluita con acqua ed estratta con EtOAc. Gli estratti organici sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su Na₂SO₄ anidro e concentrati nel vuoto. Purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% [DCM, 20% MeOH, 1% NH₄OH]/MeOH) fornito 2-(didodecilammino)-1-(4-(*N*-(2-(didodecilammino)etile)-*N*-dodecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one (148 mg, 37%).
- 10 [0691] UPLC/ELSD: RT = 3,81 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 1086,94 per C₇₀H₁₄₁N₅O₂
- [0692] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,00-2,20 (br. m, 26H); 1,77 (br. m, 6H); 1,54-1,02 (br. m, 94H); 0,90 (t, 15H).

M. Composto 12: Pentil 6-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecilammino)esanoato

15 **Fase 1: Pentil 6-bromoesanoato**

[0693]



Formula chimica: C₁₁H₂₁BrO₂

Peso molecolare: 265.19

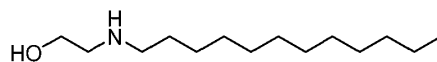
- [0694] A una soluzione di acido 6-bromoesanoico (2 g, 10,3 mmol) e pentan-1-olo (2,2 mL, 20,5 mmol) in 26 mL di DCM, EDC·HCl (1,97 g, 10,3 mmol) e DMAP (0,26 g, 2,1 mmol) sono stati aggiunti. La soluzione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. Dopo questo tempo la reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di acqua. La miscela è stata estratta tre volte con DCM. Le sostanze organiche sono state messe in pool e lavate con NaHCO₃

saturo, acido citrico al 10% e soluzione salina. Le sostanze organiche sono state quindi essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate sotto vuoto. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-30% di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato (2,3 g, 8,67 mmol).

- 5 [0695] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,06 (t, 2H); 3,39 (t, 2H); 2,30 (t, 2H); 1,84 (m, 2H); 1,62(m, 4H);1,46 (m, 2H); 1,31 (m, 4H); 0,88 (t, 3H).

Fase 2: 2-(Dodecilammino)etan-1-olo

[0696]



Formula chimica: C₁₄H₃₁NO

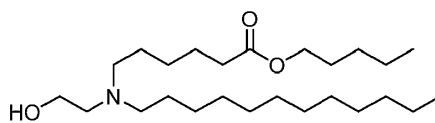
Peso molecolare: 229.41

- 10 [0697] Il metil dodecilglicinato (3,4 g, 13,2 mmol) è stato sciolto in 2 mL di THF in atmosfera di N₂ e la beuta di reazione è stato lasciata raffreddare in un bagno di ghiaccio. Alla soluzione è stato aggiunto lentamente LiAlH₄ (0,55 g, 14,5 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione alla stessa temperatura per 1 ora. Dopo questo tempo la reazione è stata spenta mediante la successiva aggiunta di 0,55 mL di H₂O, 0,55 mL di NaOH al 10% e quindi 1,65 mL
- 15 di H₂O. La reazione è stata quindi filtrata e il filtrato è stato concentrato *sotto vuoto*. Il materiale grezzo è stato purificato *mediante* cromatografia su gel di silice (0-20% di MeOH in DCM, con 1% di NaOH) per fornire l'alcol desiderato (1,9 g, 8,28 mmol, 63% di resa).

[0698] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,63 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 1,48 (m, 2H); 2,14 (m, 18H); 0,88 (t, 3H).

- 20 **Fase 3: Pentil 6-(dodecil(2-idrossietil)ammino)esanoato**

[0699]



Formula chimica: $C_{25}H_{51}NO_3$

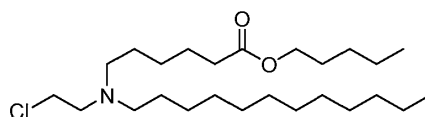
Peso molecolare: 413.69

[0700] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il pentil 6-(dodecil(2-idrossietil)ammino)esanoato è stato sintetizzato dal pentile 6-bromoesanoato (0,87 g, 3,27 mmol), 2-(dodecilammino)etan-1 -ol (0,50 g, 2,18 mmol), K_2CO_3 (0,60 g, 4,36 mmol) e KI (36 mg, 0,22 mmol) in 10 mL di THF per ottenere 0,30 g del prodotto desiderato (33%).

[0701] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,04 (t, 2H); 3,51 (m, 2H); 2,56 (m, 2H); 2,42 (m, 4H); 2,28 (t, 2H); 1,60(m,4H);1,42 (m, 4H); 1,30-1,24 (m, 24); 0,87 (m, 6H).

Fase 4: Pentil 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato

[0702]



Peso molecolare: $C_{25}H_{50}ClNO_2$

Formula chimica: 432.13

10

[0703] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, il pentil 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato è stato sintetizzato dal pentile 6-(dodecil(2-idrossietil)ammino)esanoato (300 mg, 0,73 mmol), metansolfonil cloruro (0,062 mL, 0,80 mmol) e trietilammina (0,13 mL, 1,3 mmol) in 2 mL di DCM per ottenere 285 mg del prodotto desiderato (66%).

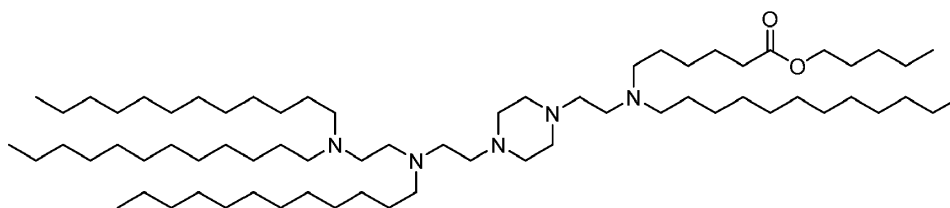
15

[0704] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,04 (t, 2H); 3,45 (t, 2H); 2,74 (t, 2H); 2,43 (m, 4H); 2,28 (t, 2H); 1,65-1,59 (m, 4H); 1,31-1,24 (m, 32H); 0,88 (m, 6H).

Fase 5: Composto 12: Pentil 6-((2-(4-(2-((2-(didodecil)ammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecil)ammino)esanoato

20

[0705]



[0706] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, il pentil 6-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecil)ammino)esanoato è stato sintetizzato da pentile 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato (75 mg, 0,17 mmol), N^1 , N^1 , N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (107 mg, 0,16 mmol), K_2CO_3 (23 mg, 0,17 mmol) e KI (2,7 mg, 0,1 mmol) in 1 mL di MeCN da permettersi 99 mg del prodotto desiderato (58%).

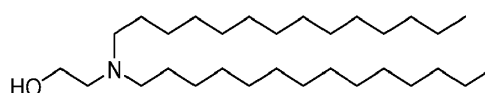
[0707] UPLC: RT = 3,53 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1073,325 per $C_{69}H_{141}N_5O_2$

[0708] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,03 (t, 2H); 2,56-2,37 (br. m., 30H); 2,27 (t, 2H); 1,61 (m, 4H); 1,40-1,23 (br. m.; 90H); 0,87 (m, 15H).

N. Composto 13: Pentil 6-((2-(4-(2-((2-(ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecil)ammino)esanoato

Fase 1: 2-(Ditetradecilammino)etan-1-olo

15 [0709]



Formula chimica: $C_{30}H_{63}NO$

Peso molecolare: 453.84

[0710] Allo stesso modo delal Fase 1 per il Composto 18, il 2-(ditetradecilamino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 1-bromotetradecano (21,6 mL, 72,8 mmol), etanolammina (2 mL, 33,1 mmol), K_2CO_3 (20 g, 145,5 mmol) e KI (549 mg, 3,31 mmol) in MeCN (165 mL). Resa (12 g, 81%).

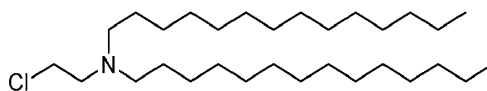
[0711] UPLC/ELSD: RT = 3,30 min. MS (ES): m/z (MH^+) 454,46 per $C_{30}H_{63}NO$

[0712] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,54 (br. m, 2H); 2,59 (br. m, 2H); 2,46 (br. m, 4H); 1,56-1,17(br. m, 48H); 0,90 (br. m, 6H).

Fase 2: *N*-(2-cloroetil)-*N*-tetradeciltetraacn-1-ammina

[0713]

5



[0714] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, la *N*-(2-cloroetil)-*N*-tetradeciltetradeca*N*-1-ammina è stata sintetizzata dal 2-(ditetradecilammino)etan-1-olo (10 g, 22,0 mmol), trietilammina (4,0 mL, 28,6 mmol) e metansolfonil cloruro (2,75 mL, 27,5 mmol) in DCM (110 mL). Il materiale grezzo è stato portato alla fase successiva senza purificazione.

10 Resa (10,2 g, 98%).

[0715] UPLC/ELSD: RT = 3,37 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 472,45 per C₃₀H₆₂CIN

[0716] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,27 -2,20 (br. m, 8H); 1,96-1,17 (br. m, 48H); 0,90 (br. m, 6H).

Fase 3: *terz*-Butil 4-(2-(tetradecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato

15 [0717]

| |
|--------------------------------------|
| Formula chimica: Peso molecolare: |
|--------------------------------------|

[0718] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 18, il *terz*-butil 4-(2-(tetradecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato da 1-bromotetradecano (3,63 g, 13,1 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (3,0 g, 13,1 mmol), K₂CO₃ (3,62 g, 26,2 mmol) e KI (217 mg, 1,31 mmol) in MeCN (60 mL). Resa (1,42 g, 27%).

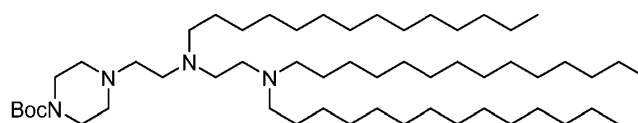
[0719] UPLC/ELSD: RT = 1,58 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 426,61 per C₂₅H₅₁N₃O₂

[0720] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,45 (t, 4H); 2,75 (t, 2H) 2,65 (t, 2H); 2,54 (t, 2H); 2,42 (t, 4H); 1,61-1,41 (br. m, 11H); 1,40-1,20 (br. m, 22H); 0,90 (t, 3H).

Fase 4: *terz-butil* 4-(2-((2-(ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato

5

[0721]



Formula chimica: C₅₅H₁₁₂N₄O₂

Peso molecolare: 861.53

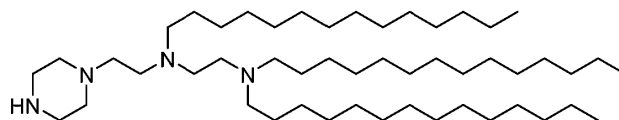
[0722] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 18, il *terz-butil* 4-(2-((2-(ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal
10 *terz-butil* 4-(2-(tetradecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (700 mg, 1,64 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-tetradeciltetradecan-1-ammina (1,01 g, 2,14 mmol), K₂CO₃ (455 mg, 3,29 mmol) e KI (27 mg, 0,164 mmol) in THF (15 mL). Resa (740 mg, 52%).

[0723] UPLC/ELSD: RT = 3,81 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 862,47 per C₅₅H₁₁₂N₄O₂

[0724] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,45 (br. m, 4H); 3,10-2,83 (br. m, 4H); 2,74-2,34
15 (br. m, 14H); 1,75-1,20 (br. m, 81H); 0,91 (t, 9H).

Fase 5: *N*¹-(2-(Piperazin-1-il)etil)-*N*¹, *N*², *N*²-tritetradeciletan-1,2-diammina

[0725]



Formula chimica: C₅₀H₁₀₄N₄

Peso molecolare: 761.41

[0726] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 18, *N*¹-(2-(piperazin-1-il)etil)-*N*¹, *N*², *N*²-tritetradeciletano-1,2-diammina è stato sintetizzato da *terz-butil* 4-(2-((2-

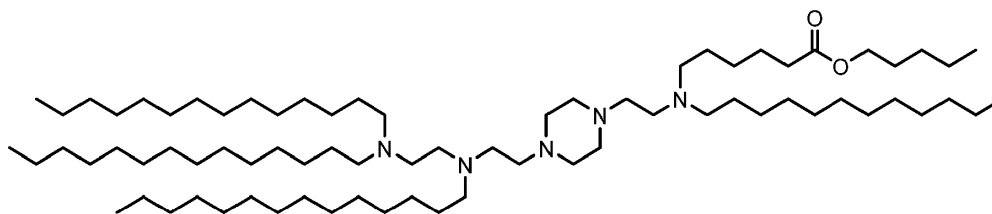
20

(ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (740 mg, 0,859 mmol) e TFA (3,3 mL, 42,9 mmol) in DCM (3,3 mL). Resa (661 mg, 99%). UPLC/ELSD: RT = 3,38 min. MS (ES): m/z (MH^+) 762,42 per $C_{50}H_{104}N_4$

[0727] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 2,92 (t, 4H); 2,70-2,30 (br. m, 18H); 1,46 (br. m, 6H); 1,37-1,20 (br. m, 66H); 0,90 (t, 9H).

Fase 6: Composto 13: Pentil 6-((2-(4-(2-((2-(ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecil)ammino)esanoato

[0728]



Formula chimica: $C_{75}H_{153}N_5O_2$

Peso molecolare: 1157,08

10

[0729] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, il pentile 6-((2-(4-(2-((2-(ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecil)ammino)esanoato è stato sintetizzato da N^1 -(2-(piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tritetradeciletan-1,2-diammina (66 mg, 0,087 mmol), pentil 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato (42 mg, 0,095 mmol) K_2CO_3 (24 mg, 0,17 mmol) e KI (2 mg, 0,012 mmol) in THF (2 mL). Resa (38 mg, 38%).

15

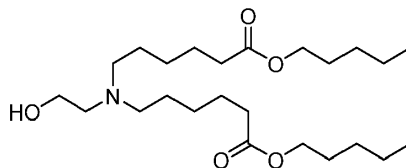
[0730] UPLC/ELSD: RT = 3,81 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1157,70 per $C_{75}H_{153}N_5O_2$

[0731] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (m, 2H); 3,16-2,15 (br. m, 32H); 1,65 (br. m, 4H); 1,54-1,00 (br. m, 100H); 0,91 (br. m, 15H).

O. Composto 14: Dipentil 6,6'-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)azandiil)diesanoato Fase 1: Dipentil 6,6'-((2-idrossietil)azandiil)diesanoato

20

[0732]



Formula chimica: $C_{24}H_{47}NO_5$

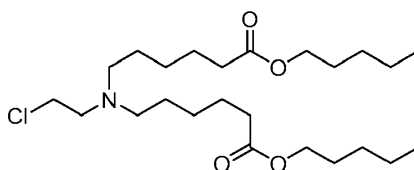
Peso molecolare: 429.64

[0733] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il dipentil 6,6'-((2-idrossietil)azandiil)diesanoato è stato sintetizzato dal pentil 6-bromoesanoato (0,50 g, 1,89 mmol), etanolamina (0,052 mL, 0,86 mmol), K_2CO_3 (0,52 g, 3,77 mmol) e KI (14 mg, 0,098 mmol) in 4 mL di MeCN per fornire 234 mg (55%).

[0734] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08(t, 4H); 3,62 (m, 2H); 2,68-2,56 (br. m., 6H); 2,33 (t, 4H); 1,64-1,54 (m, 13H); 1,35 (m, 12H); 0,93 (t, 6H).

Fase 2: Dipentil 6,6'-((2-cloroetil)azandiil)diesanoato

10 [0735]



Formula chimica: $C_{24}H_{46}ClNO_4$

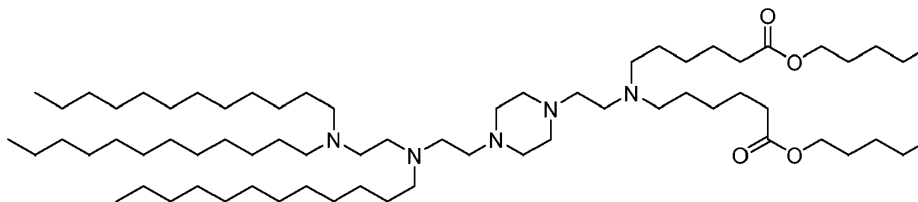
Peso molecolare: 448.09

[0736] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, il dipentil 6,6'-((2-cloroetil)azandiil)diesanoato è stato sintetizzato dal dipentil 6,6'-((2-idrossietil)azandiil)diesanoato (124 mg, 0,29 mmol), metansolfonil cloruro (0,025 mL, 0,32 mmol) e trietilamina (0,060 mL, 0,44 mmol) in 1,5 mL di DCM per fornire 84 mg (65%).

[0737] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,04 (t, 4H); 3,46 (t, 2H); 2,73 (t, 2H); 2,43 (t, 4H); 2,28 (t, 4H); 1,60 (m, 8H); 1,40 (m, 4H); 1,29 (m, 12H); 0,89 (t, 6H).

Fase 3: Composto 14: Dipentil 6,6'-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)azandiil)diesanoato

[0738]



Formula chimica: $C_{68}H_{137}N_5O_4$

Peso molecolare: 1088.88

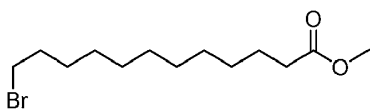
[0739] Allo stesso modo del Passaggio 6 per il Composto 18, dipentil 6,6'-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)azanediil)diesanoato è stato sintetizzato da N^1,N^1,N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (105 mg, 0,16 mmol), dipentil 6,6'-((2-cloroetil)azandiil)diesanoato (84 mg, 0,19 mmol) e K_2CO_3 (22 mg, 0,16 mmol) in 1 mL di MeCN. Resa (53 mg, 0,049 mmol, 30%).

[0740] UPLC: RT = 3,47 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1089,53 per $C_{68}H_{137}N_5O_4$

[0741] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,04 (t, 4H); 2,89-2,98 (m, 4H); 2,39-2,68 (m, 26H); 2,27 (t, 4H); 1,57-1,71 (m, 10H); 1,35 (m, 4H); 1,28-1,35 (m, 74H); 0,90 (m, 15H).

P. Composto 15: Metil 12-((2-(4-(2-((2-(didodecil)ammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecil)ammino)dodecanoato Fase 1: Metil 12-bromododecanoato

[0742]



Formula chimica: $C_{13}H_{25}BrO_2$

Peso molecolare: 293.25

15

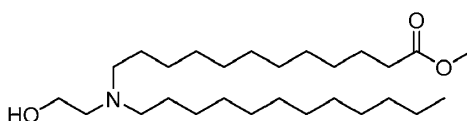
[0743] Ad una soluzione di acido 12-bromododecanoico (2,5 g, 8,95 mmol) in THF (7 mL) è stato aggiunto metanolo (7,2 mL, 179 mmol). È stato aggiunto goccia a goccia acido solforico (0,50 mL, 8,95 mmol) e la reazione è stata lasciata sotto agitazione a 65 °C per due ore. La miscela di reazione è stata lavata con $NaHCO_3$ al 5% e soluzione salina. Lo strato organico è

stato essiccato su Na₂SO₄ anidro, filtrato e concentrato nel vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% EtOAc/esani) ha fornito metil 12-bromododecanoato (2,40 g, 92%).

[0744] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,44 (t, 2H); 2,33 (t, 2H); 1,88 (br. m, 2H); 1,64 (br. m, 2H); 1,45 (br. m, 2H); 1,31 (br. m, 12H).

Fase 2: Metil 12-(dodecil(2-idrossietil)ammino)dodecanoato

[0745]



Formula chimica: C₂₇H₅₅NO₃

Peso molecolare: 441.74

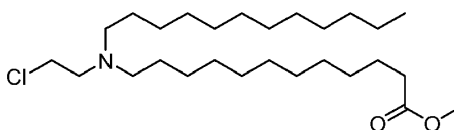
[0746] A una soluzione di metil 12-((2-idrossietil)ammino)dodecanoato (413 mg, 1,51 mmol) in MeCN (5 mL) è stato aggiunto 1-bromododecano (452 mg, 1,81 mmol), K₂CO₃ (418 mg, 3,02 mmol) e KI (25 mg, 0,151 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 16 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, diluita H₂O ed estratta con EtOAc. Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su Na₂SO₄ anidro, filtrati e concentrati nel vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% [DCM, 20% MeOH, 1% NH₄OH]/MeOH) ha fornito metil 12-(dodecil(2-idrossietil)ammino)dodecanoato (409 mg, 61%).

[0747] UPLC/ELSD: RT = 2,39 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 442,60 per C₂₇H₅₅NO₃

[0748] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,61 (t, 2H); 2,68 (t, 2H); 2,54 (t, 4H); 2,32 (t, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,50 (br. m, 4H); 1,28 (br. m, 32H); 0,90 (t, 3H).

Fase 3: Metil 12-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)dodecanoato

[0749]



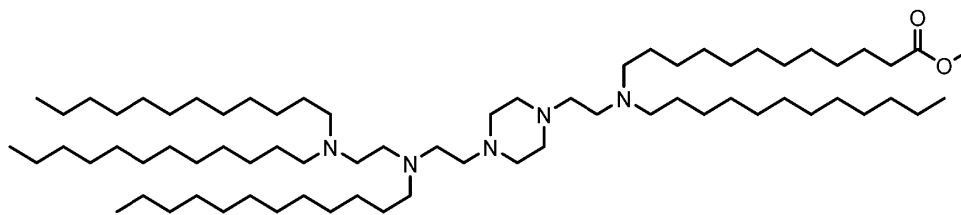
[0750] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, il metil 12-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)dodecanoato è stato sintetizzato dal metil 12-((2-idrossietil)ammino)dodecanoato (409 mg, 0,926 mmol), trietilammina (0,168 mL, 1,20 mmol) e metansolfonil cloruro (0,090 mL, 1,16 mmol) in DCM (5 mL). Resa (307 mg, 72%).

5 UPLC/ELSD: RT = 4,30 min. MS (ES): m/z (MH^+) 460,80 per $C_{27}H_{54}ClNO_2$

[0751] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,59 (s, 3H); 3,42 (br. m, 2H); 2,70 (br. m, 2H); 2,38 (br. m, 4H); 2,30 (t, 2H); 1,55 (m, 2H); 1,36 (br. m, 4H); 1,27-0,96 (br. m, 32H); 0,81 (t, 3H).

Fase 4: Composto 15: Metil 12-((2-(4-(2-((2-
10 (didodecil)ammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-
il)etil)(dodecil)ammino)dodecanoato

[0752]



Formula chimica: $C_{71}H_{145}N_5O_2$

Peso molecolare: 1100,97

[0753] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, il metil 12-((2-(4-(2-((2-
15 (didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etile)(dodecil)ammino)dodecanoato
è stato sintetizzato da N^1, N^1, N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (150
mg, 0,221 mmol), metil 12-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)dodecanoato (134 mg, 0,266 mmol)
 K_2CO_3 (61 mg, 0,443 mmol) e KI (4 mg, 0,024 mmol) in THF (5 mL). Resa (32 mg, 15%).

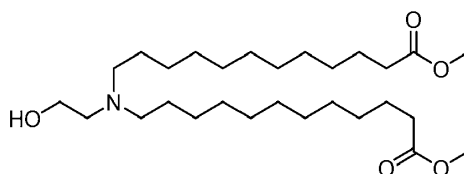
[0754] UPLC/ELSD: RT = 4,83 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1102,11 per $C_{71}H_{145}N_5O_2$

20 [0755] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69 (s, 3H); 2,75-2,24 (br. m, 32H); 1,64 (m, 2H);
1,52-1,00 (br. m, 96H); 0,90 (t, 12H).

Q. Composto 16: Dimetil 12,12'-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)azandiil)didodecanoato

Fase 1: Dimetil 12,12'-((2-idrossietil)azandiil)didodecanoato

[0756]



5

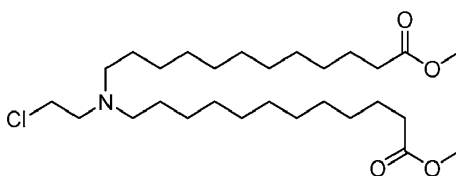
[0757] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il dimetil 12,12'-((2-idrossietil)azandiil)didodecanoato è stato sintetizzato dal metil 12-bromododecanoato (1,5 g, 5,12 mmol), etanolamina (0,310 mL, 5,12 mmol), K_2CO_3 (1,42 g, 10,2 mmol) e KI (85 mg, 0,512 mmol) in MeCN (11 mL). Resa (563 mg, 45%).

10 [0758] UPLC/ELSD: RT = 1,81 min. MS (ES): m/z (MH^+) 486,63 per $C_{28}H_{55}NO_5$

[0759] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69 (s, 6H); 3,59 (br. m, 2H); 2,75-2,40 (br. m, 6H); 2,32 (t, 4H); 1,64 (m, 4H); 1,48 (br. m, 4H); 1,29 (br. m, 28H).

Fase 2: Dimetil 12,12'-((2-cloroetil)azandiil)didodecanoato

[0760]



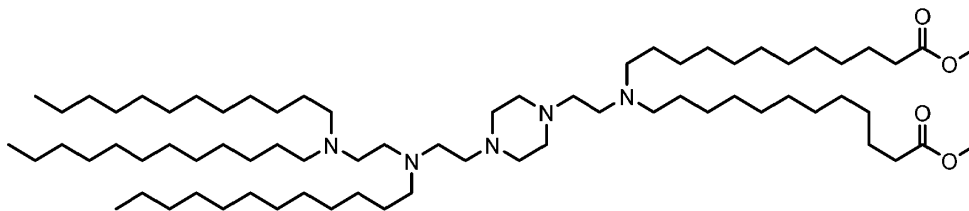
15

[0761] Allo stesso modo della Fase 2 per il composto 18, il dimetil 12,12'-((2-cloroetil)azandiil)didodecanoato è stato sintetizzato dal dimetil 12,12'-((2-idrossietil)azandiil)didodecanoato (518 mg, 1,07 mmol), trietilammina (0,193 mL, 1,39 mmol) e metansolfonil cloruro (0,103 mL, 1,33 mmol) in DCM (5,5 mL). Resa (376 mg, 70%).

20 [0762] UPLC/ELSD: RT = 2,17 min. MS (ES): m/z (MH^+) 504,75 per $C_{28}H_{54}ClNO_4$

Fase 3: Composto 16: Dimetil 12,12'-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)azandiil)didodecanoato

[0763]



Formula chimica: $C_{72}H_{145}N_5O_4$

Peso molecolare: 1144.98

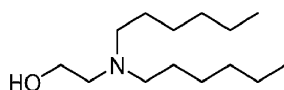
[0764] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, il dimetil 12,12-((2-(4-(2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)(dodecil)ammino)dodecanoato è stato sintetizzato da N^1, N^1, N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (150 mg, 0,221 mmol), dimetil 12,12-((2-cloroetil)(azanedil)dodecanoato (134 mg, 0,266 mmol) K_2CO_3 (61 mg, 0,443 mmol) e KI (4 mg, 0,024 mmol) in THF (5 mL). Resa (32 mg, 15%). UPLC/ELSD: RT = 3,46 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1146,07 per $C_{72}H_{145}N_5O_4$

[0765] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69 (s, 6H); 2,75-2,24 (br. m, 34H); 1,64 (m, 4H); 1,52-1,00 (br. m, 92H); 0,90 (t, 9H).

R. Composto 17: N^1 -(2-(4-(2-(Didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -trihexiletan-1,2-diammina

Fase 1: 2-(Diesilammino)etan-1-olo

[0766]

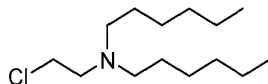


[0767] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il 2-(diesilammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 1-bromoesano (5 g, 82 mmol), etanolammina (11,5 mL, 82 mmol), K_2CO_3 (22,7 g, 164 mmol) e KI (1,36 g, 8,2 mmol) in MeCN (380 mL). Resa (2,58g, 14%). UPLC/ELSD: RT = 0,41 min. MS (ES): m/z (MH^+) 229,95 per $C_{14}H_{31}NO$

[0768] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,62 (t, 2H); 2,70 (t, 2H); 2,57 (t, 4H); 1,50 (br. m, 4H); 1,30 (br. 12H); 0,91 (t, 6H).

Fase 2: *N*-(2-cloroetil)-*N*-esilesan-1-ammina

[0769]



Formula chimica: C₁₄H₃₀ClN

Peso molecolare: 247.85

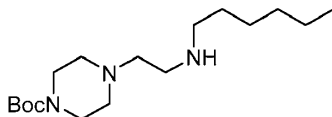
[0770] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, la *N*-(2-cloroetil)-*N*-esilesan-1-
5 ammina è stata sintetizzata dal 2-(diesilammino)etan-1-olo (2,50 g, 10,9 mmol), trietilammina
(2,0 mL, 14,2 mmol) e metansolfonil cloruro (1,0 mL, 13,6 mmol) in DCM (56 mL). Resa (1,93
g, 71%).

[0771] UPLC/ELSD: RT = 0,42 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 247,86 per C₁₄H₃₀ClN

[0772] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,50 (t, 2H); 2,77 (t, 2H); 2,51 (t, 4H); 1,42 (br. m,
10 4H); 1,27 (br. 12H); 0,89 (t, 6H).

Fase 3: *terz*-Butil 4-(2-(esilammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0773]



Formula chimica: C₁₇H₃₅N₃O₂

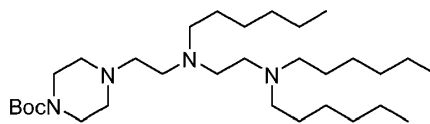
Peso molecolare: 313.49

15 [0774] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 18, il *terz*-butil 4-(2-
(esilammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato da 1-bromoesano (1,44 g, 8,72
mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (2,0 g, 8,72 mmol), K₂CO₃ (2,4 g, 17,4 mmol) e KI
(145 mg, 0,872 mmol). Resa (446 mg, 16%).

[0775] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,44 (br. m, 4H); 2,75 (br. m, 2H); 2,65 (br. m, 2H);
20 2,54 (br. m, 2H); 2,42 (br. m, 4H); 1,60-1,43 (br. m, 11H); 1,40-1,05 (br. m, 6H); 0,91 (br. m,
3H).

Fase 4: *terz*-butil 4-(2-((2-(diesilammino)etil)(esil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0776]



Formula chimica: $C_{31}H_{64}N_4O_2$

Peso molecolare: 524.88

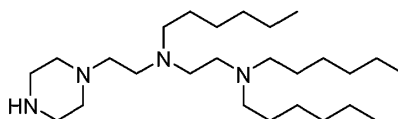
[0777] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 18, il *terz*-butil 4-(2-((2-(diesilammino)etil)(esil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(esilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (250 mg, 0,797 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-esilesan-1-ammina (217 mg, 0,877 mmol), K_2CO_3 (220 mg, 1,59 mmol) e KI (13 mg, 0,0797 mmol) in THF (5 mL). Resa 308 mg, 74%).

[0778] UPLC/ELSD: RT = 1,40 min. MS (ES): m/z (MH^+) 525,83 per $C_{31}H_{64}N_4O_2$

10 [0779] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,45 (br. m, 4H); 3,15-2,15 (br. m, 18H); 1,85-1,00 (br. m, 33H); 0,91 (9H).

Fase 5: N^1, N^1, N^2 -Triesil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

[0780]



Formula chimica: $C_{26}H_{56}N_4$

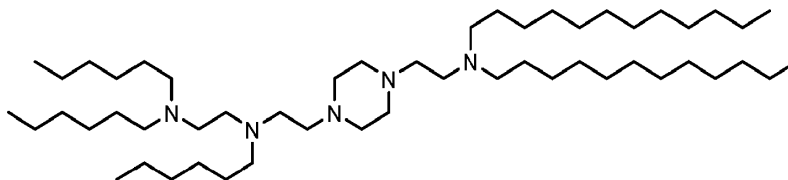
Peso molecolare: 424.76

15 [0781] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 18, N^1, N^1, N^2 -triesil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina è stato sintetizzato da *terz*-butil 4-(2-((2-(diesilammino)etil)(esil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (308 mg, 0,587 mmol) e TFA (2,25 mL, 29,3 mmol) in DCM (2.5 mL). Resa (220 mg, 88%).

20 [0782] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 2,92 (br. m, 4H); 2,70-2,20 (br. m, 18H); 1,54-1,22 (br. m, 24H); 0,91 (br. m, 9H).

Fase 6: Composto 17: N^1 -(2-(4-(2-(Didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -trihesiletan-1,2-diammina

[0783]



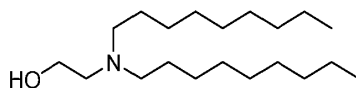
5 [0784] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -trihesiletano-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1 , N^1 , N^2 -trihesil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (110 mg, 0,259 mmol), N -(2-cloroetil)- N -dodecildodecan-1-ammina (162 mg, 0,388 mmol), K_2CO_3 (72 mg, 0,518 mmol) e KI (5 mg, 0,0259 mmol) in THF (6 mL). Resa (81 mg, 39%). UPLC/ELSD: RT
10 = 2,79 min. MS (ES): m/z (MH^+) 806,30 per $C_{52}H_{109}N_5$

[0785] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,05-2,10 (br. m, 30H); 1,80-1,05 (br. m, 64H); 0,91 (br. m, 15H).

S: Composto 18: N^1 -(2-(4-(2-(Dinonilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -trinoniletan-1,2-diammina

15 **Fase 1: 2-(Dinonilammino)etan-1-olo**

[0786]



Formula chimica: $C_{20}H_{43}NO$

Peso molecolare: 313.57

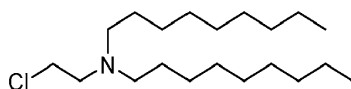
[0787] A una soluzione 1-bromononano (8,31 g, 40,1 mmol) in MeCN (84 mL) è stata aggiunta etanolammina (1,10 mL, 18,2 mmol), K_2CO_3 (11,1 g, 80,1 mmol) e KI (302 mg, 1,82 mmol). La
20 reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 48 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato estratto con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante

cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito 2-(dinonilammino)etan-1-olo (4,06 g, 71%).

[0788] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,57 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,49 (br. m, 4H); 1,48 (br. m, 4H); 1,29 (br. m, 24H); 0,91 (t, 6H).

5 Fase 2: *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina

[0789]



Formula chimica: C₂₀H₄₂ClN

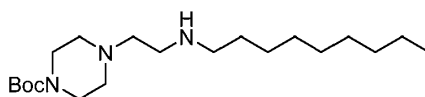
Peso molecolare: 332.01

[0790] A una soluzione a 0 °C di 2-(dinonilammino)etan-1-olo (4,06 g, 12,9 mmol) e trietilammina (2,35 mL, 16,8 mmol) in DCM (65 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una
10 soluzione di metansolfonil cloruro (1,25 mL, 16,18 mmol) in DCM (5 mL). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata per 16 ore. La miscela è stata spenta per aggiunta di acqua ed estratta con DCM. Lo strato organico è stato lavato con NaHCO₃ saturato, soluzione salina, essiccato su Na₂SO₄ anidro, filtrato e concentrato *sotto vuoto*. La purificazione
15 mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-10% EtOAc/esani) ha fornito *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (2,58 g, 60%).

[0791] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,51 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,47 (br. m, 4H); 1,44 (br. m, 4H); 1,28 (br. m, 24H); 0,90 (t, 6H).

Fase 3: *terz*-Butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0792]



Formula chimica: C₂₀H₄₁N₃O₂

Peso molecolare: 355.57

20

[0793] A una soluzione di 1-bromononano (1,81 g, 8,72 mmol) in MeCN (44 mL) è stata

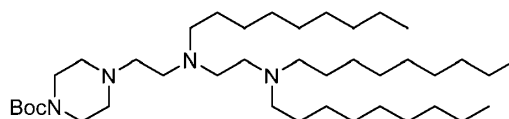
aggiunta 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (2,0 g, 8,72 mmol), K_2CO_3 (2,4 g, 17,4 mmol) e KI (145 mg, 0,872 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 65 °C per 16 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato estratto con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) ha fornito *terz-butyl* 4-(2-(nonilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (775 mg, 25%).

[0794] UPLC/ELSD: RT = 0,47 min. MS (ES): m/z (MH^+) 356,41 per $C_{20}H_{41}N_3O_2$

[0795] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,44 (br. m, 4H); 2,74 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,53 (t, 2H); 2,41 (br. m, 4H); -1,48 (br. m, 9H); -1,30 (br. m, 14H); 0,90 (t, 3H).

10 **Fase 4: *terz-butyl* 4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato**

[0796]



Formula chimica: $C_{40}H_{82}N_4O_2$

Peso molecolare: 651.12

[0797] A una soluzione di *terz-butyl* 4-(2-(nonilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (500 mg, 1,41 mmol) in THF (9 mL) è stato aggiunto *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (514 mg, 1,55 mmol), K_2CO_3 (390 mg, 2,82 mmol) e KI (23 mg, 0,141 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 65 °C per 72 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, diluita con acqua ed estratta con EtOAc. Gli estratti combinati sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su Na_2SO_4 anidro, filtrati e concentrati nel vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-15% MeOH/DCM) ha fornito *terz-butyl* 4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (763 mg, 83 %).

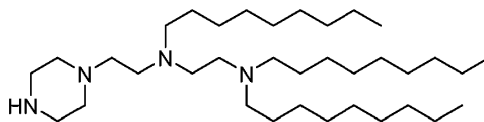
UPLC/ELSD: RT = 2,61 min. MS (ES): m/z (MH^+) 651,91 per $C_{40}H_{82}N_4O_2$

[0798] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,45 (br. m, 4H); 2,75-2,30 (br. m, 18H); 1,55-

1,20(br. m, 51H); 0,91 (br. m, 9H).

Fase 5: N^1, N^1, N^2 -Trinonil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

[0799]



Formula chimica: $C_{35}H_{74}N_4$

Peso molecolare: 551.01

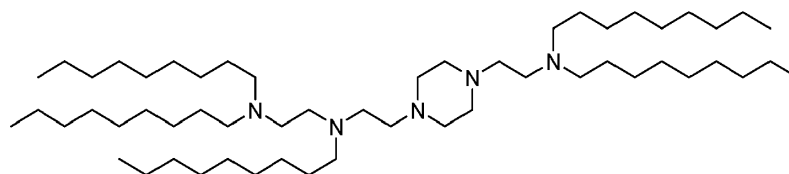
5 [0800] A una soluzione a 0 °C di *terz*-butil 4-(2-((2-(dionilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (763 mg, 1,17 mmol) in DCM (4,5 mL) è stato aggiunto goccia a goccia TFA (4,5 mL, 58,5 mmol). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata per 16 ore. La miscela di reazione è stata concentrata sotto vuoto e il materiale grezzo è stato sciolto in $CHCl_3$. La soluzione è stata lavata con

10 Na_2CO_3 al 5%, soluzione salina, essiccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e concentrata *sotto vuoto*. Purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% [DCM, 20% MeOH, 1% di NH_4OH]/MeOH) fornito N^1, N^1, N^2 -trinonil- N^2 -(2-(piperazin-1- il)etil)etano-1,2-diammina (218 mg, 34%). UPLC/ELSD: RT = 1,81 min. MS (ES): m/z (MH^+) 551,78 per $C_{35}H_{74}N_4$

[0801] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 2,91 (br. m, 4H); 2,70-2,35 (br. m, 18H); 1,46 (br. m, 6H); 1,29 (br. m, 36H); 0,91 (br. m, 9H).

Fase 6: Composto 18: N^1 -(2-(4-(2-(Dionilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -trinoniletan-1,2-diammina

[0802]



Formula chimica: $C_{55}H_{115}N_5$

Peso molecolare: 846.56

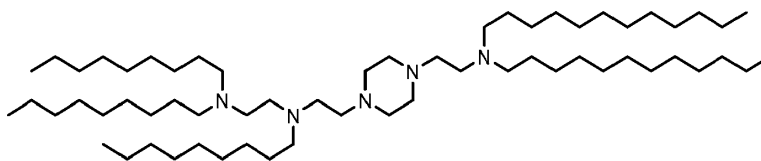
[0803] A una soluzione di N^1, N^1, N^2 -trionil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (74 mg, 0,134 mmol) e N -(2-cloroetil)- N -nonilnonan-1-ammina (58 mg, 0,175 mmol) in THF (4 mL) è stata aggiunta K_2CO_3 (37 mg, 0,269 mmol) e KI (3 mg, 0,0134 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 65 °C per 48 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, diluita con acqua ed estratta con EtOAc. Gli estratti combinati sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su Na_2SO_4 anidro, filtrati e concentrati nel vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash ISCO C18 (50-100% [MeCN 0,1% TFA]/[H₂O 0,1% di TFA]) ha fornito il prodotto desiderato come sale di TFA. Il sale è stato sciolto in $CHCl_3$ e la soluzione è stata lavata con Na_2CO_3 al 5%, soluzione salina, essiccata su Na_2SO_4 anidro, filtrata e concentrata *sotto vuoto* per fornire N^1 -(2-(4-(2-(dinonilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -trinoniletan-1,2-diammina (66 mg, 58%).

[0804] UPLC/ELSD: RT = 2,91 min. MS (ES): m/z (MH^+) 847,30 per $C_{55}H_{115}N_5$

[0805] ¹H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3.10-2,25 (br. m, 30H); 1,90-1,35 (br. m, 10H); 1,29 (br. m, 60H); 0,91 (br. m, 15H).

15 **T: Composto 19: N^1 -(2-(4-(2-(Didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -trinoniletan-1,2-diammina**

[0806]



Formula chimica: $C_{61}H_{127}N_5$

Peso molecolare: 930.72

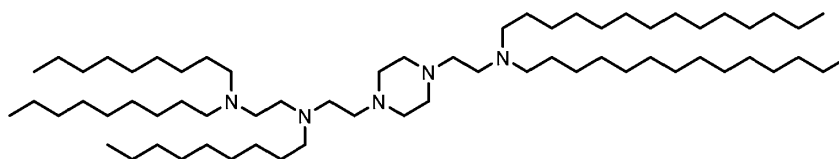
[0807] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -triesiletano-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1, N^1, N^2 -trionil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (70 mg, 0,127 mmol), N -(2-cloroetil)- N -dodecildodecan-1-ammina (79 mg, 0,191 mmol), K_2CO_3 (35 mg,

0,254 mmol) e KI (2 mg, 0,0127 mmol) in THF (3 mL). Resa (52 mg, 44%). UPLC/ELSD: RT = 3,35 min. MS (ES): m/z (MH^+) 931,61 per $C_{61}H_{127}N_5$

[0808] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 2,70 (br. m, 30H); 1,56-1,02 (br. m, 82H); 0,90 (t, 15H).

5 **U: Composto 20:** N^1 -(2-(4-(2-(Ditetradecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1,N^2,N^2 -trioniletan-1,2-diammina

[0809]



Formula chimica: $C_{65}H_{135}N_5$

Peso molecolare: 986.83

Formula chimica: $C_{65}H_{135}N_5$

10 **Peso molecolare:** 986,83

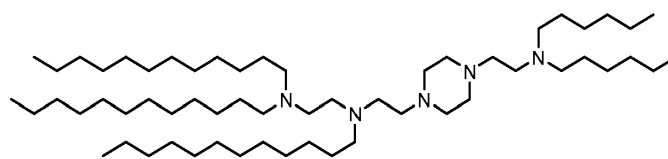
[0810] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(ditetradecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -triesiletano-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1, N^1, N^2 -trionil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (74 mg, 0,134 mmol), N -(2-cloroetil)- N -dodecildodecan-1-ammina (95 mg, 0,201 mmol), K_2CO_3 (37 mg,

15 0,269 mmol) e KI (3 mg, 0,0134 mmol) in THF (2 mL). Resa (50 mg, 38%) UPLC/ELSD: RT = 3,55 min. MS (ES): m/z (MH^+) 987,87 per $C_{65}H_{135}N_5$

[0811] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,20-2,25 (br. m, 30H); 1,85-1,00 (br. m, 90H); 0,91 (t, 15H).

20 **V: Composto 21:** N^1 -(2-(4-(2-(Diesilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1,N^2,N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina

[0812]



Formula chimica: $C_{58}H_{121}N_5$

Peso molecolare: 888.64

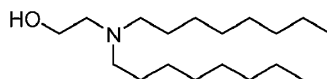
[0813] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(dodecylamino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1 , N^1 , N^2 -tridonil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (67 mg, 0,099 mmol), N -(2-cloroetil)- N -esilesan-1-ammina (32 mg, 0,129 mmol), K_2CO_3 (28 mg, 0,198 mmol) e KI (2 mg, 0,0099 mmol) in THF (2 mL). Resa (30 mg, 34%). UPLC/ELSD: RT = 3,24 min. MS (ES): m/z (MH^+) 890,58 per $C_{58}H_{121}N_5$

[0814] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,15-2,20 (br. m, 30H); 1,85-1,00 (br. m, 76H); 0,91 (br. m, 15H).

10 **W: Composto 22: N^1 -(2-(4-(2-(Diottilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina**

Fase 1: 2-(Diottilammino)etan-1-olo

[0815]



Formula chimica: $C_{18}H_{39}NO$

Peso molecolare: 285.52

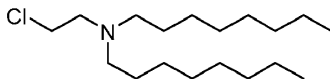
15 [0816] Allo stesso modo della Fase1 per il Composto 18, il composto è stato sintetizzato da etanolammina (5 g, 82 mmol), 1-bromoottano (14 mL, 82 mmol) e K_2CO_3 (11 g, 82 mmol) in 200 mL di MeCN. Resa (3,13 g, 11 mmol, 13%).

[0817] UPLC/ELSD: RT = 1,78 min. MS (ES): m/z (MH^+) 286,22 per $C_{18}H_{39}NO$

[0818] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,54 (m, 2H); 2.60-2,47 (m, 6H); 1,44 (m, 4H); 1,26 (m, 21H); 0,86 (t, 6H).

Fase 2: *N*-(2-cloroetil)-*N*-ottilnonan-1-ammina

[0819]



Formula chimica: $C_{18}H_{38}ClN$

Peso molecolare: 303.96

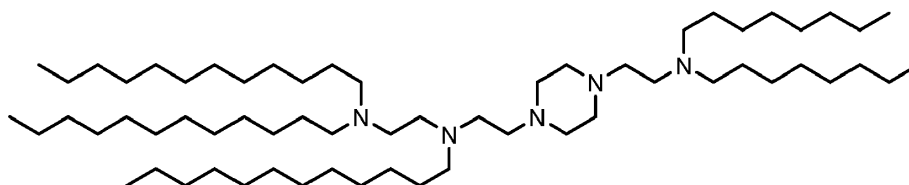
[0820] Allo stesso modo della Fase 2 per il composto 18, la *N*-(2-cloroetil)-*N*-ottilottan-1-
5 ammina è stata sintetizzata dal 2-(diottilammino)etan-1-olo (3,13 g, 11 mmol), cloruro di
metansolfonile (0,85 mL, 11 mmol) ed Et_3N (1,5 mL, 11 mmol) in 30 mL di DCM. Resa (1,55
g, 5,1 mmol, 46%).

[0821] UPLC/ELSD: RT = 3,86 min. MS (ES): m/z (MH^+) 304,43 per $C_{18}H_{38}ClN$

[0822] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,48 (2, 2H); 2,75 (t, 2H); 2,43 (t, 4H); 1,40-1,25
10 (m, 24H); 0,86 (t, 6H).

**Fase 3: Composto 22: *N*¹-(2-(4-(2-(Diottilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-*N*¹, *N*², *N*²-
tridodeciletan-1,2-diammina**

[0823]



Formula chimica: $C_{62}H_{129}N_5$

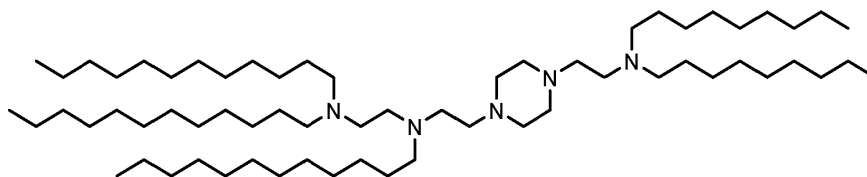
Peso molecolare: 944.75

15 [0824] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, *N*¹-(2-(4-(2-
(diottilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-*N*¹, *N*², *N*²-tridodeciletan-1,2-diammina è stata
sintetizzata da *N*¹, *N*¹, *N*²-trinonil-*N*²-(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (150 mg, 0,221
mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-ottilottan-1-ammina⁵⁴ (81 mg, 0,266 mmol), K_2CO_3 (61 mg, 0,443
mmol) e KI (4 mg, 0,024 mmol) in THF (5mL). Resa (200 mg, 96%). UPLC/ELSD: RT = 3,41
20 min. MS (ES): m/z (MH^+) 945,96 per $C_{62}H_{129}N_5$

[0825] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 2,76-2,10 (br. m, 30H); 1,56-1,00 (br. m, 84H); 0,90 (t, 15H).

X: **Composto 23:** *N*¹-(2-(4-(2-(Dinonilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-*N*¹,*N*²,*N*²-tridodeciletan-1,2-diammina

5 [0826]



Formula chimica: C₆₄H₁₃₃N₅

Peso molecolare: 972.80

[0827] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, *N*¹-(2-(4-(2-(dinonilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-*N*¹, *N*², *N*²-triesiletano-1,2-diammina è stata sintetizzata da *N*¹, *N*¹, *N*²-trinonil-*N*²-(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (595 mg, 0,879 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (350 mg, 1,05 mmol), K₂CO₃ (243 mg, 1,76 mmol) e KI (15 mg, 0,0879 mmol) in THF (13 mL). Resa (534 mg, 62%). UPLC/ELSD: RT = 3,50 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 973,60 per C₆₄H₁₃₃N₅

10

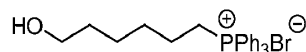
[0828] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 2,70-2,30 (br. m, 30H); 1,56-1,37 (br. m, 10H); 1,28 (br. m, 78H); 0,90 (t, 15H).

15

Y: **Composto 24:** (*Z*)-*N*¹-(2-(4-(2-(Dodec-6-en-1-il(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)-*N*¹,*N*²,*N*²-tridodeciletan-1,2-diammina

Fase 1: (6-idrossiesil)trifenilfosfonio bromuro

[0829]



Formula chimica: C₂₄H₂₈BrOP

Peso molecolare: 443.36

20

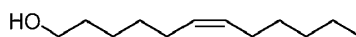
[0830] Il 6-bromo-1-esanolo (4,89 g, 27 mmol) e la trifetilfosfina (7,87 g, 30 mmol) e 50 mL di

MeCN sono stati combinati in una beuta a fondo tondo. La beuta è stata dotata di un condensatore e posta in una mensola riscaldante e la reazione è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 48 ore. Dopo questo tempo la reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e la soluzione è stata cannulata in 200 mL di Et₂O, producendo un precipitato bianco. I
5 solidi sono stati lasciati decantare e il solvente è stato decantato. Sono stati aggiunti 20 mL di DCM per sciogliere i solidi e quindi sono stati aggiunti lentamente 100 mL di Et₂O per ottenere un precipitato bianco. Il solvente è stato quindi rimosso *sotto vuoto* per fornire bromuro di (6-idrossiesil)trifenilfosfonio pulito (9,4 g, 21,2 mmol, per una resa del 78%).

[0831] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 7,80 (m, 15H); 3,80 (m, 2H); 3,65 (m, 2H); 2,23 (m,
10 2H); 1,68 (m, 4H); 1,52 (m, 4H).

Fase 2: (Z)-Dodec-6-en-1-olo

[0832]



Formula chimica: C₁₂H₂₄O

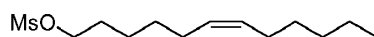
Peso molecolare: 184.32

[0833] Una soluzione di (6-idrossiesil)trifenilfosfonio bromuro (3,0 g, 6,77 mmol) in 25 mL di
15 THF è stata lasciata raffreddare in un bagno di ghiaccio secco/acetone a -78 °C. Una volta raffreddato *n*-BuLi (2,5 M in esani) (5,7 mL, 14,2 mmol) è stato aggiunto goccia a goccia. Dopo 1 ora, sono stati aggiunti altri 10 mL di THF e *n*-BuLi (1,35 mL) e l'agitazione è stata continuata alla stessa temperatura per 1 ora. Dopo questo tempo è stato aggiunto 1-esanale (1,6 mL, 13,5 mmol) e la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente e agitata per 3 ore. Dopo
20 questo tempo la reazione è stata spenta mediante aggiunta di NH₄Cl saturo in eccesso. La soluzione è stata estratta tre volte con EtOAc. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate *sotto vuoto*. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-50% di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato come un olio limpido (0,76 g, 4,1 mmol, 61%).

[0834] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,34 (m, 2H); 3,62 (t, 2H); 2,01 (m, 4H); 1,56 (m, 2H); 1,35-1,27 (m, 11H); 0,87 (t, 3H).

Fase 3: (Z)-Dodec-6-en-1-il metansolfonato

[0835]



Formola chimica: C₁₃H₂₆O₃S

Peso molecolare: 262.41

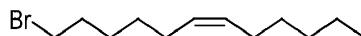
5

[0836] A una soluzione a 0 °C di (Z)-dodec-6-en-1-olo (1,81 g, 9,3 mmol) in 20 mL di DCM, è stato aggiunto Et₃N (1,7 mL, 12,1 mmol) e metansolfonil cloruro (0,80 mL, 10,2 mmol). La reazione è stata lasciata riscaldare lentamente a temperatura ambiente e agitata per una notte. La reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di acqua e la miscela è stata estratta due volte con
10 DCM. Le sostanze organiche sono state messe in pool, lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-30% di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato pulito (2,2 g, 8,4 mmol, 90%).

[0837] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,34 (m, 2H); 4,20 (t, 2H); 2,98 (s, 3H); 2,01 (m,
15 4H); 1,74 (m, 2H); 1,38-1,27 (m, 10H); 0,87 (t, 3H).

Fase 4: (Z)-1-Bromododec-6-ene

[0838]



Formola chimica: C₁₂H₂₃Br

Peso molecolare: 247.22

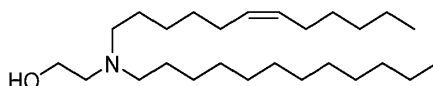
[0839] In una beuta a fondo tondo, sotto N₂, (Z)-dodec-6-en-1-il metansolfonato (2,2 g, 8,3
20 mmol) è stato sciolto in 40 mL di Et₂O. È stato aggiunto MgBr₂Et₂O (6,5 g, 25 mmol) e la reazione è stata lasciata sotto agitazione per 48 h. Dopo questo tempo la reazione è stata estinta dall'aggiunta di ghiaccio. La miscela è stata quindi estratta con Et₂O tre volte. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO₄, filtrate e

concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-30% di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato (1,8 g, 7,28 mmol, 88%).

[0840] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 5,34 (m, 2H); 3,39 (t, 2H); 2,01-1,84 (m, 6H); 1,28 (m, 10H); 0,87 (t, 3H).

5 **Fase 5: (Z)-2-(Dodec-6-en-1-il(dodecil)ammino)etan-1-olo**

[0841]



Formula chimica: $\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{NO}$

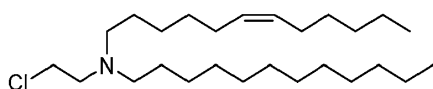
Peso molecolare: 395.72

[0842] Allo stesso modo della Fase 1 per il composto 18, (Z)-2-(Dodec-6-en-1-il(dodecil)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da (Z)-1-bromododec-6-ene (0,25 g, 1,0 mmol), 2-(dodecilammino)etan-1-olo (0,23 g, 1,0 mmol), K_2CO_3 (0,14 g, 1,0 mmol) e KI (2 mg, 0,01 mmol) in 5 mL di MeCN.

[0843] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 5,34 (m, 2H); 3,65 (br, m, 2H); 2,64 (br, m, 6H); 2,00 (m, 4H); 1,55 (m, 6H); 1,24 (m, 26H); 0,86 (t, 6H).

Fase 6: (Z)-N-(2-cloroetil)-N-dodecildodec-6-en-1-ammina

15 [0844]



Formula chimica: $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{ClN}$

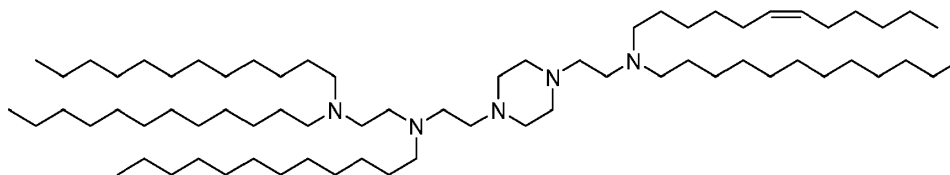
Peso molecolare: 414.16

[0845] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, (Z)-N-(2-cloroetil)-N-dodecildodec-6-en-1-ammina è stata sintetizzata da (Z)-2-(dodec-6-en-1-il(dodecil)ammino)etan-1-olo (35 mg, 0,088 mmol), metansolfonil cloruro (0,008 mL, 0,097 mmol) e trietilammina (0,018 mL, 0,13 mmol) in 0,5 mL di DCM. Resa (17,3 mg, 47%).

[0846] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,34 (m, 2H); 3,47 (t, 2H); 2,74 (t, 2H); 2,43 (t, 4H); 2,0 (m, 4H); 1,24 (m, 32H); 0,86 (t, 6H).

Fase 7: Composto 24: (Z)-N¹-(2-(4-(2-(Dodec-6-en-1-il(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tridodeciletan-1,2-diammina

5 [0847]



[0848] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, (Z)-N¹-(2-(4-(2-(dodec-6-en-1-il(dodecil)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tridodeciletan-1,2-diammina è stato sintetizzato da N¹, N¹, N²-tridodecil-N²-(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (27 mg, 0,040 mmol) e (Z)-N-(2-cloroetil)-N-dodecildodec-6-en-1-ammina (17,3 mg, 0,042 mmol), K₂CO₃ (6 mg, 0,040 mmol) in 0,5 mL di DCM. Resa (24 mg, 0,023 mmol, 57%).

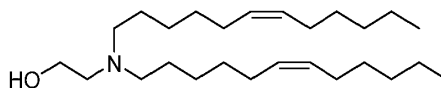
[0849] UPLC: RT = 3,78 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 1056,376 per C₇₀H₁₄₃N₅

[0850] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,36 (m, 2H); 2,53-2,35 (m, 30H); 2,00 (m, 4H); 1,39-1,24 (m, 92H); 0,86 (m, 15H).

15 **Z: Composto 25: N¹-(2-(4-(2-(Di(Z)-dodec-6-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tridodeciletan-1,2-diammina**

Fase 1: 2-(Di((Z)-dodec-6-en-1-il)ammino)etan-1-olo

[0851]



Formula chimica: C₂₆H₅₁NO

Peso molecolare: 393.70

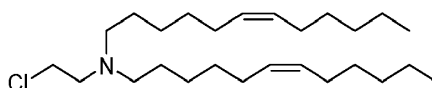
20 [0852] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il 2-(di((Z)-dodec-6-en-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato dall'etanolammina (60 mg, 1,0 mmol), (Z)-1-

bromododec-6-ene (0,51 g, 2,1 mmol) e K_2CO_3 (0,14 g, 1,0 mmol) in 5 mL di DCM. Resa (0,22 g, 0,56 mmol, 56%).

[0853] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,34 (m, 4H); 3,59 (m, 2H); 2,65-2,53 (m, 6H); 2,00 (m, 9H); 1,49 (m, 4H); 1,23 (m, 20H); 0,86 (t, 6H).

5 **Fase 2: (Z)-N-(2-cloroetil)-N-((Z)-dodec-6-en-1-il)dodec-6-en-1-ammina**

[0854]



Formula chimica: $C_{26}H_{50}ClN$

Peso molecolare: 412.14

[0855] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, (Z)-N-(2-cloroetil)-N-((Z)-dodec-6-en-1-il)dodec-6-en-1-ammina è stata sintetizzata da 2-(di((Z)-dodec-6-en-1-il)ammino)etan-1-olo (0,22 g, 0,56 mmol), metansolfonil cloruro (0,047 mL, 0,61 mmol) e trietilammina (0,12 mL, 0,84 mmol) in 3 mL di DCM. (Resa (150 mg, 0,36 mmol, 65%).

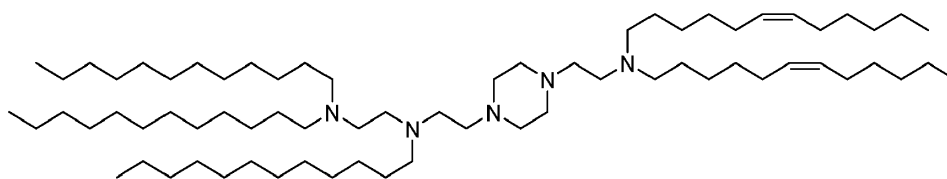
10

[0856] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,34 (m, 4H); 3,47 (t, 2H); 2,74 (t, 2H); 2,43 (t, 4H); 2,00 (m, 8H); 1,41-1,27 (m, 24H); 0,87 (m, 6H).

Fase 3: Composto 25: N^1 -(2-(4-(2-(Di(Z)-dodec-6-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)-

15 **N^1, N^2, N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina**

[0857]



Formula chimica: $C_{70}H_{141}N_5$

Peso molecolare: 1052.93

[0858] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(di((Z)-dodec-6-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-yl)etil)- N^1, N^2, N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina è stata sintetizzata da (Z)-N-(2-cloroetil)-N-((Z)-dodec-6-en-1-il)dodec-6-en-1-ammina (56 mg, 0,14 mmol), $N^1, N^1,$

20

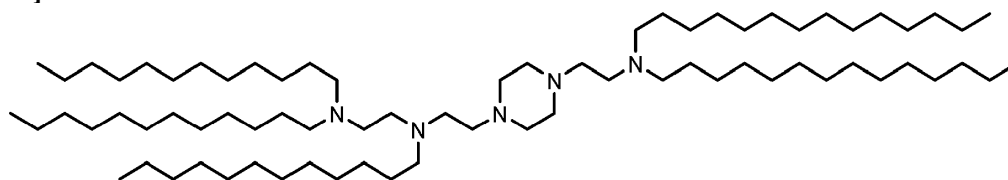
N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (84 mg, 0,12 mmol) e K_2CO_3 (17 mg, 0,12 mmol) in 1 mL di MeCN. Resa (41,9 mg, 0,040 mmol, 33%).

[0859] UPLC: RT = 3,74 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1053,564 per $C_{70}H_{141}N_5$

[0860] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,33 (m, 4H); 2,55-2,35 (br, m, 30H); 1,98 (m, 8H);
5 1,32-1,24 (m, 84H); 0,86 (m, 15H).

AA: Composto 26: N^1 -(2-(4-(2-(Ditradecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1,N^2,N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina

[0861]



Formula chimica: $C_{74}H_{153}N_5$

Peso molecolare: 1113,07

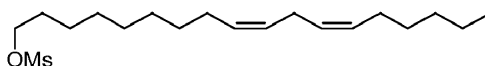
10 [0862] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(ditradecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1, N^1, N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (75 mg, 0,111 mmol), N -(2-cloroetil)- N -dodecildodecan-1-ammina (58 mg, 0,122 mmol), K_2CO_3 (31 mg, 0,221 mmol) e KI (3 mg, 0,0181 mmol) in THF (4 mL). Resa (17 mg, 7%). UPLC/ELSD: RT =
15 3,88 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1113,59 per $C_{74}H_{153}N_5$

[0863] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,15-2,00 (br. m, 30H); 1,75-0,90 (br. m, 108H); 0,81 (t, 15H).

AB: Composto 27: N^1, N^1, N^2 -Tridodecil- N^2 -(2-(4-(2-(dodecil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

20 **Fase 1: (6Z,9Z)-18-(metilsulfonyl)ottadeca-6,9-diene**

[0864]



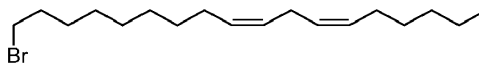
Formula chimica: $C_{19}H_{36}O_3S$

Peso molecolare: 344.55

- [0865] A una soluzione a 0 °C di alcol linoleilico (10 mL, 31,2 mmol) e trietilammina (5,68 mL, 40,5 mmol) in DCM (50 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di metansolfonil cloruro (2,66 mL, 34,3 mmol) in DCM (20 mL). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e lasciata agitare per 4 ore. La miscela è stata spenta per aggiunta di acqua ed estratta con DCM. Lo strato organico è stato lavato con $NaHCO_3$ saturato, soluzione salina, essiccato su Na_2SO_4 anidro, filtrato e concentrato *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-40% EtOAc/esani) ha fornito (6Z,9Z)-18-(metilsulfonil)ottadeca-6,9-diene (10,0 g, 93%).
- 10 [0866] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,35 (m, 4H); 4,22 (t, 2H); 2,99 (s, 3H); 2,77 (t, 2H); 2,04 (q, 4H); 1,74 (m, 2H); 1,30 (br. m, 16H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: (6Z,9Z)-18-Bromoottadeca-6,9-diene

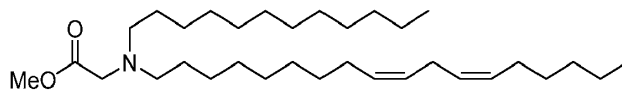
[0867]



- 15 [0868] A una soluzione di (6Z,9Z)-18-(metilsulfonil)ottadeca-6,9-diene (10,0 g, 29,0 mmol) in dietilere (372 mL) è stato aggiunto bromuro di magnesio etil etere (22,5 g, 87,1 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. La miscela è stata spenta per aggiunta di acqua ed estratta con dietilere. Gli strati organici combinati sono stati lavati con K_2CO_3 all'1%, soluzione salina, essiccati su Na_2SO_4 anidro, filtrati e concentrati *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO fornita (6Z,9Z)-18-bromoottadeca-6,9-diene (8,9 g, 93%).
- 20 [0869] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,36 (m, 4H); 3,41 (t, 2H); 2,77 (t, 2H); 2,05 (q, 4H); 1,86 (m, 2H); 1,48-1,22 (br, m, 16H); 0,89 (t, 3H).

Fase 3: Metil N-dodecil-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)glicinato

[0870]



Formula chimica: $C_{33}H_{63}NO_2$

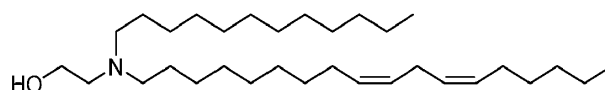
Peso molecolare: 505.87

[0871] A una soluzione di metil dodeciliglicinato·HCl (1 g, 3,4 mmol) in 8,5 mL di DMF, (Z)-1-bromoottadec-9-ene (1,68 g, 5,1 mmol) e K_2CO_3 (1,4 g, 10,2 mmol) sono stati aggiunti. La
5 reazione è stata quindi lasciata in agitazione a 85 °C per 12 ore. Dopo questo tempo la reazione è stata lasciata raffreddare a t.a. ed è stata spenta mediante l'aggiunta di H_2O in eccesso. La miscela è stata estratta 3 volte con EtOAc. Le sostanze organiche sono state messe in pool e lavate con soluzione salina, essiccate su $MgSO_4$, filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-10% di EtOAc in esani) per ottenere il
10 prodotto desiderato (0,87 g, 1,72 mmol, 50%).

[0872] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,33 (m, 4H); 3,68 (s, 3H); 3,30 (s, 2H); 2,74 (t, 2H); 2,52 (m, 4H); 2,02 (m, 4H); 1,23 (m, 38H); 0,86 (m, 6H).

Fase 4: 2-(Dodecil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo

[0873]



Formula chimica: $C_{32}H_{63}NO$

Peso molecolare: 477.86

15

[0874] A una soluzione a 0 °C di metil *N*-dodecil-*N*-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)glicinato (980 mg, 1,94 mmol) in THF (10 mL) è stato aggiunto goccia a goccia idruro di litio e alluminio (184 mg, 4,85 mmol). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e lasciata agitare per 3 ore. La miscela è stata spenta lentamente mediante l'aggiunta graduale di acqua
20 (0,184 mL), NaOH al 10% (0,552 mL) e acqua (0,184 mL). La miscela di reazione è stata filtrata, lavata con THF e concentrata *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash

su silice ISCO (0-100% [DCM, 20% di MeOH, 1% di NH₄OH]/MeOH) fornito 2-(dodecil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo (660 mg, 71%).

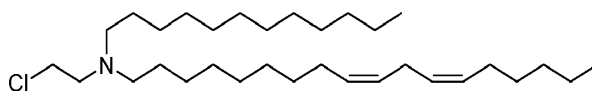
[0875] UPLC/ELSD: RT = 3,13 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 478,52 per C₃₂H₆₃NO

[0876] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,39 (br. m, 4H); 3,56 (br. m, 2H); 2,80 (br. m, 2H);

5 2,61 (br. m, 2H); 2,48 (br. m, 4H); 2,09 (br. m, 4H); 1,57-1,17 (br. m, 38H); 0,91 (br. m, 6H).

Fase 5: (9Z,12Z)-N-(2-cloroetil)-N-dodeciloctadeca-9,12-dien-1-ammina

[0877]



Formula chimica: C₃₂H₆₂ClN

Peso molecolare: 496.31

[0878] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, (9Z,12Z)-N-(2-cloroetil)-N-dodeciloctadeca-9,12-dien-1-ammina è stata sintetizzata dalla 2-(dodecil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo (660 mg, 1,38 mmol), trietilammina (0,249 mL, 1,80 mmol) e metansolfonil cloruro (0,172 mL, 1,73 mmol) in DCM (7 mL). Resa (123 mg, 18%).

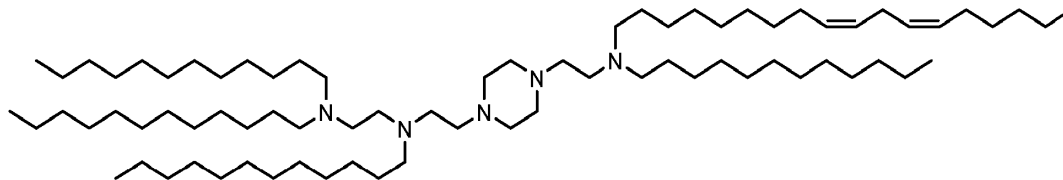
UPLC/ELSD: RT = 3,23 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 496,72 per C₃₂H₆₂ClN

[0879] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,29 (br. m, 4H); 3,43 (br. m, 2H); 2,71 (br. m, 4H);

15 2,38 (br. m, 4H); 1,98 (br. m, 4H); 1,45-1,07 (br. m, 38H); 0,82 (br. m, 6H).

Fase 6: Composto 27: N¹, N¹, N²-Tridodecil-N²-(2-(4-(2-(dodecil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

[0880]



20 [0881] Allo stesso modo della Fase 6 per il composto 18, N¹, N¹, N²-tridodecil-N²-(2-(4-(2-(dodecil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina è

stata sintetizzata da N^1, N^1, N^2 -tridodecil- N^2 -(2-piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (67 mg, 0,099 mmol), (9Z,12Z)- N -(2-cloroetil)- N -dodecilottadeca-9,12-dien-1-ammina (64 mg, 0,129 mmol) K_2CO_3 (28 mg, 0,198 mmol) e KI (2 mg, 0,012 mmol) in THF (2 mL). Resa (48 mg, 43%).

5 [0882] UPLC/ELSD: RT = 3,90 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1137,95 per $C_{76}H_{153}N_5$

[0883] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,48-5,29 (m, 4H); 3,15-2,15 (br, m, 32H); 2,07 (br, m, 4H); 1,83-1,00 (br. m, 98H); 0,91 (br. m, 15H).

AC: **Composto 28:** N^1 -(2-(4-(2-(Di((Z))-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina

10 **Fase 1: (Z)-1-(metilsolfonil)ottadec-9-ene**

[0884]

| |
|--|
| Formula chimica: Peso molecolare: _____ |
|--|

[0885] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 27, (Z)-1-(metilsolfonil)ottadec-9-ene è stato sintetizzato da alcol oleilico (10 mL, 31,7 mmol), trietilammina (5,74 mL, 41,2 mmol), e metansolfonil cloruro (2,70 mL, 34,9 mmol) in DCM (50 mL). Resa (8,55 g, 78%).

15

[0886] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,33 (m, 2H); 4,20 (t, 2H); 2,98 (s, 3H); 2,00 (m, 4H); 1,73 (m, 2H); 1,44-1,16 (br. M, 22H); 0,87 (t, 3H).

Fase 2: (Z)-1-Bromoottadec-9-ene

[0887]

| |
|--|
| |
|--|

20

[0888] Allo stesso modo della Fase 2 per il composto 27, (Z)-1-bromoottadec-9-ene è stato sintetizzato da (Z)-1-(metilsulfonil)ottadec-9-ene (8,55 g, 24,7 mmol), e etileterato di bromuro di magnesio (19,1 g, 74,1 mmol) in dietilere (317 mL). Resa (7,42 g, 91%). 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,35 (m, 2H); 3,41 (t, 2H); 2,01 (m, 4H); 1,85 (m, 2H); 1,48-1,14 (br. m,

22H); 0,88 (t, 3H).

Fase 3: 2-(Di((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etan-1-olo

[0889]

Formula chimica:
Peso molecolare:

- 5 [0890] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il 2-(di((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da (Z)-1-bromooctadec -9-ene (5 g, 15,1 mmol), etanolammina, (0,414 mL, 6,86 mmol), K₂CO₃ (4,17 g, 30,2 mmol) e KI (114 mg, 0,686 mmol) in MeCN (32 mL). Resa (3,2 g, 83%).

[0891] UPLC/ELSD: RT = 7,325 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 562,60 per C₃₈H₇₅NO

- 10 [0892] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,34 (m, 4H); 3,53 (t, 2H); 2,58 (t, 2H); 2,45 (t, 4H); 2,01 (m, 8H); 1,44 (m, 4H); 1,38-1,18 (br. m, 44H); 0,88 (t, 6H).

Fase 4: (Z)-N-(2-cloroetil)-N-((Z)-ottadec-9-en-1-il)ottadec-9-en-1-ammina

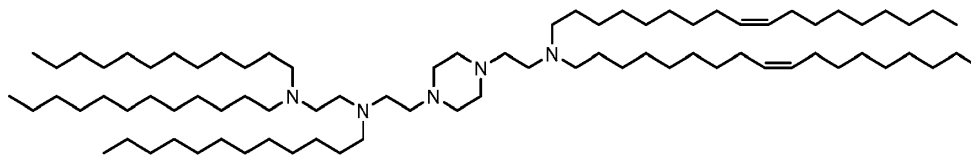
[0893]

Formula chimica:
Peso molecolare:

- 15 [0894] Allo stesso modo della Fase 2 per il composto 18, (Z)-N-(2-cloroetil)-N-((Z)-ottadec-9-en-1-il)ottadec-9-en-1-ammina è stata sintetizzata da 2-(di((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etan-1-olo (1,64 g, 2,92 mmol) trietilammina (0,529 mL, 3,79 mmol) e metansolfonil cloruro (0,282 mL, 3,65 mmol) in DCM (15 mL). Resa (1,47 g, 87%). UPLC/ELSD: RT = 3,75 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 580,64 per C₃₈H₇₄CIN
- 20 [0895] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,35 (m, 4H); 3,48 (br. m, 2H); 2,77 (br. m, 2H); 2,45 (br. m, 4H); 2,02 (br. m, 8H); 1,62-1,05 (br. m, 48H); 0,89 (t, 6H).

Fase 5: Composto 28: N^1 -(2-(4-(2-(Di(Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina

[0896]



5 [0897] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(di((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina è stato sintetizzato da N^1, N^1, N^2 -tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etile)etano-1,2-diammina (75 mg, 0,111 mmol), (Z)- N -(2-cloroetil)- N -(1-il)ottadec-9-en-1-ammina (71 mg, 0,122 mmol) K_2CO_3 (31 mg, 0,222 mmol) e KI (3 mg, 0,018 mmol) in THF (1,5 mL). Resa (20 mg, 15%).

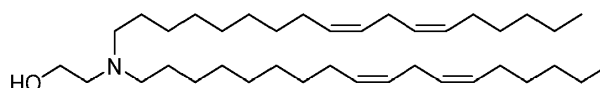
10 [0898] UPLC/ELSD: RT = 4,05 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1221,72 per $C_{82}H_{165}N_5$

[0899] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,29-5,14 (br. m, 4H); 2,95-2,00 (br. m, 30H); 1,96-1,77 (br. m, 8H); 1,60-0,85 (br. m, 108H); 0,76 (br. m, 15H).

AD: Composto 29: N^1 -(2-(4-(2-(Di(9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina

15 **Fase 1: 2-(Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo**

[0900]



Formula chimica: $C_{38}H_{71}NO$

Peso molecolare: 557,99

[0901] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il 2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da (6Z,9Z)-18-bromoottadeca-6,9-diene (4 g, 12,1 mmol), etanolamina, (0,334 mL, 5,52 mmol), K_2CO_3 (3,36 g, 24,3 mmol) e KI (92 mg, 0,552 mmol) in MeCN (26 mL). Resa (1,9 g, 62%).

[0902] UPLC/ELSD: RT = 6,80 min. MS (ES): m/z (MH^+) 557,94 per $C_{38}H_{71}NO$

[0903] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,35 (m, 8H); 3,52 (t, 2H); 2,77 (t, 4H); 2,57 (t, 2H); 2,43 (t, 4H); 2,04 (q, 8H); 1,48-1,18 (br. m, 36H); 0,89 (t, 6H).

Fase 2: (9Z,12Z)-N-(2-cloroetil)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina

5 [0904]

Formula chimica:

Peso molecolare:

[0905] Allo stesso modo della Fase 2 per il composto 18, (9Z,12Z)-N-(2-cloroetil)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina è stata sintetizzata da 2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo (250 mg, 0,45 mmol), trietilammina (81 μl, 0,58 mmol) e metansolfonil cloruro (38 μl, 0,49 mmol) in DCM (2 mL). Resa (134 mg, 52%).

10

[0906] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,36 (m, 8H); 3,49 (t, 2H); 2,78 (m, 6H); 2,45 (t, 4H); 2,05 (q, 8H); 1,48-1,18 (br. m, 36H); 0,89 (t, 6H).

Fase 3: Composto 29: N¹-(2-(4-(2-(Di(9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tridodeciletan-1,2-diammina

15 [0907]

Formula chimica:

Peso molecolare:

[0908] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N¹-(2-(4-(2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil) piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tridodeciletan-1,2-diammina è stata sintetizzata da N¹, N¹, N²-tridodecil-N²-(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (75 mg, 0,111 mmol), (9Z,12Z)-N-(2-cloroetil)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-

20

ammia (71 mg, 0,122) K₂CO₃ (31 mg, 0,222 mmol) e KI (3 mg, 0,018 mmol) in THF (3 mL). Resa (20 mg, 15%)

[0909] UPLC/ELSD: RT = 3,97 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 1217,95 per C₈₂H₁₆₁N₅

[0910] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,48-5,28 (m, 12H); 3,30-2,20 (br. m, 36H); 2,17-1,92 (br. m, 12H); 1,90-1,00 (br. m, 94H); 0,87 (br. m, 15H).

AE: Composto 30: N¹-(2-(4-(2-(Dinonilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹, N²,N²-tritetradeciletan-1,2-diammina

[0911]

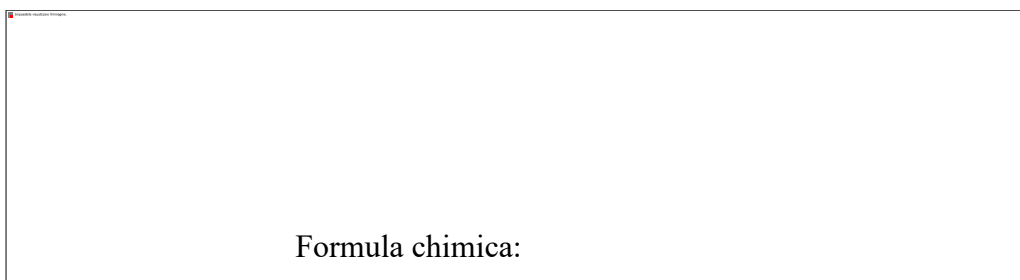


[0912] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N¹-(2-(4-(2-(dinonilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tritetradeciletan-1,2-diammina è stata sintetizzata da N¹-(2-(piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tritetradeciletan-1,2-diammina (150 mg, 0,197 mmol), N-(2-cloroetil)-N-nonilnonan-1-ammina (79 mg, 0,236 mmol), K₂CO₃ (54 mg, 0,394 mmol) e KI (3 mg, 0,0134 mmol) in THF (4 mL). Resa (50 mg, 24%). UPLC/ELSD: RT = 3,79 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 1057,74 per C₇₀H₁₄₅N₅

[0913] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,15-2,20 (br. m, 30H); 1,90-1,00 (br. m, 100H); 0,90 (t, 15H).

AF: Composto 31: N¹-(2-(4-(2-(Didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹,N²,N²-tritetradeciletan-1,2-diammina

[0914]



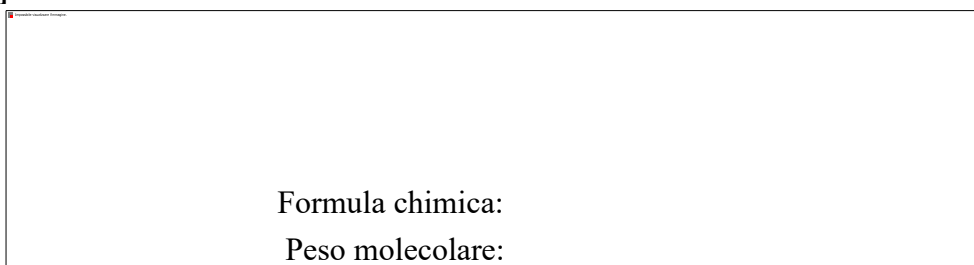
Peso molecolare:

[0915] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(didonilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tridodeciletan-1,2-diammina è stata
5 sintetizzata da N^1 , N^2 , N^2 -tridodecil- N^1 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (150 mg, 0,197 mmol), N -(2-cloroetil)- N -nonilnonan-1-ammina (98 mg, 0,236 mmol), K_2CO_3 (54 mg, 0,394 mmol) e KI (3 mg, 0,0134 mmol) in THF (4 mL). Resa (42 mg, 19%). UPLC/ELSD: RT = 3,98 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1142,14 per $C_{76}H_{157}N_5$

[0916] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,20-2,20 (br. m, 30H); 1,90-1,00 (br. m, 112H);
10 0,90 (t, 15H).

AG: Composto 32: N^1 -(2-(4-(2-(Ditetradecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tritetradeciletan-1,2-diammina

[0917]



15 [0918] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(ditetradecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tritetradeciletan-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1 -(2-(piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tritetradeciletan-1,2-diammina (150 mg, 0,197 mmol), N -(2-cloroetil)- N -nonilnonan-1-ammina (130 mg, 0,276 mmol), K_2CO_3 (54 mg, 0,394 mmol) e KI (3 mg, 0,0134 mmol) in THF (4 mL). Resa (17 mg, 7%). UPLC/ELSD: RT =

4,11 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1198,32 per $C_{80}H_{165}N_5$

[0919] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,20-2,15 (br. m, 30H); 1,90-1,00 (br. m, 120H); 0,90 (t, 15H).

AH: Composto 33: N^1 -(2-(4-(2-(Didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)etano-1,2-diammina

Fase 1: *terz*-butile (Z)-4-(2-(ottadec-9-en-1-ilammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0920]



Formula chimica:

Peso molecolare:

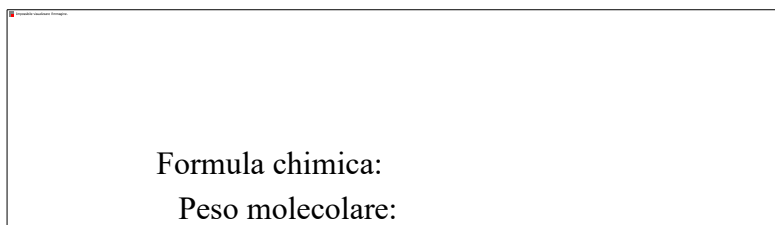
10

[0921] Allo stesso modo della Fase 3 per il composto 18, da (Z) è stato sintetizzato il *terz*-butil(Z)-4-(2-(ottadec-9-en-1-ilammino)etil)piperazin-1-carbossilato(Z) -1-bromottadec-9-ene (1,95 g, 11,8 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (1,35 g, 5,89 mmol), K_2CO_3 (1,60 g, 11,8 mmol) e KI (98 mg, 0,689 mmol) in MeCN (30 mL). Resa (790 mg, 28%).

15 [0922] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,32 (m, 2H); 3,45 (br, 4H); 2,75 (t, 2H); 2,65 (t, 2H); 2,57 (t, 2H); 2,40 (br, 4H); 2,09 (br, 4H); 1,48 (br. m, 11H); 1,41-1,10 (br, 22H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: *terz*-butil 4-(2-((2-(di((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato

20 [0923]



Formula chimica:

Peso molecolare:

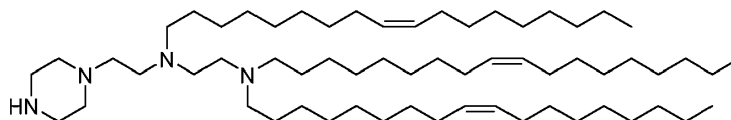
[0924] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 18, *terz*-butile 4-(2-((2-(di((Z))-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato da *terz*-butil (Z)-4-(2-(ottadec-9-en-1-ilammino)etil) piperazina -1-carbossilato (573

5 mg, 1,19 mmol), (Z)-N-(2-cloroetil)-N-((Z)-ottadec-9-en-1-il)ottadec-9-en-1-ammina (693 mg, 1,19 mmol), K₂CO₃ (329 mg, 2,38 mmol) e KI (20 mg, 0,119 mmol) in THF (6 mL). Resa (918 mg, 75%).

[0925] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,37 (m, 6H); 3,45 (br. m, 4H); 2,72-2,18 (br. m, 18H); 2,04 (br. m, 12H); 1,65-1,05 (br. m, 81H) 0,91 (br. m, 9H).

10 **Fase 3: N¹, N¹, N²-Tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)-N²-(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina**

[0926]



Formula chimica: C₆₂H₁₂₂N₄

Peso molecolare: 923,69

[0927] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 18, N¹, N¹, N²-tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)-N²-(2-(piperazin-1 -il)etil)etan-1,2-diammina è stata sintetizzata da, *terz*-butil 4-(2-((2-(di((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (740

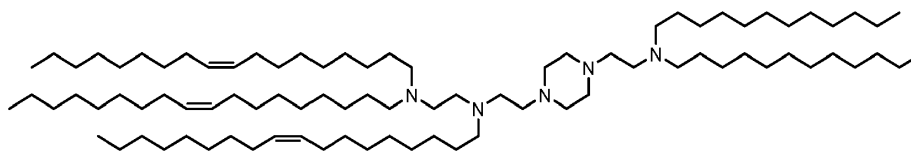
15 mg, 0,859 mmol) e TFA (3,3 mL, 42,9 mmol) in DCM (3,3 mL). Resa (115 mg, 14%).

[0928] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,36 (m, 6H); 2,91 (br, 4H); 2,74-2,34 (br. m, 18H); 2,03 (br. m, 12H); 1,54-1,04 (br. m, 72H); 0,90 (br. m, 9H).

Fase 4: Composto 33: N¹-(2-(4-(2-(Didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)-N¹, N², N²-tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)etano-1,2-diammina

20

[0929]



[0930] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(didodecylammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tri((*Z*)-ottadec-9-en-1-il)etano-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1 , N^1 , N^2 -tri((*Z*)-ottadec-9-en-1-il)- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (58 mg, 0,063 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (31 mg, 0,075 mmol), K_2CO_3 (17 mg, 0,13 mmol) e KI (1 mg, 0,006 mmol) in THF (1,5 mL). Resa (30 mg, 37%).

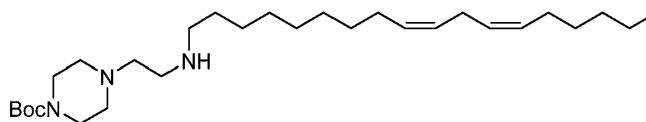
[0931] UPLC/ELSD: RT = 4,16 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1304,03 per $C_{88}H_{175}N_5$

[0932] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,36-5,24 (br. m, 6H); 2,66-2,08 (br. m, 30H); 2,04-1,82 (br. m, 12H); 1,57-0,87 (br. m, 112H); 0,81 (br. m, 15H).

AI: Composto 34: N^1 -(2-(4-(2-(Didodecylammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tri((*9Z,12Z*)-ottadeca-9,12-dien-1-il)etano-1,2-diammina

Fase 1: *terz*-butil 4-(2-(((*9 Z,12 Z*)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato

15 [0933]

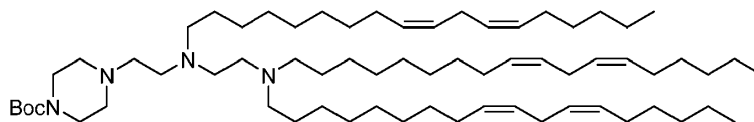


[0934] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 18, *terz*-butil 4-(2-(((*9Z,12Z*)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazina-1-carbossilato è stato sintetizzato da (*6Z,9Z*)-18-bromoottadeca-6,9-diene (3,0 g, 9,11 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (2,09 g, 9,11 mmol), K_2CO_3 (2,52 g, 18,22 mmol) e KI (151 mg, 0,911 mmol) in MeCN (44 mL). Resa (1,20 g, 27%).

[0935] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,35 (m, 4H); 3,42 (t, 4H); 2,77 (t, 2H); 2,73 (t, 2H); 2,62 (t, 2H); 2,51 (t, 2H); 2,38 (t, 4H); 2,04 (q, 4H); 1,60-1,20 (br. m, 27H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: *terz*-Butil 4-(2-((2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)((9Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[0936]



Formula chimica: $C_{67}H_{124}N_4O_2$

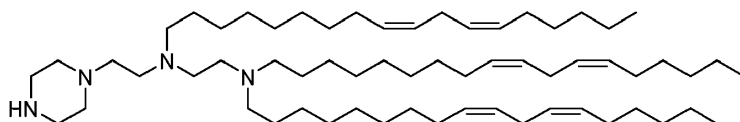
Peso molecolare: 1017.76

- 5 [0937] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 18, *terz*-butil 4-(2-((2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(((9Z, 12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (600 mg, 1,26 mmol), (9Z,12Z)-*N*-(2-cloroetil)-*N*-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina (796 mg, 1,38 mmol), K_2CO_3
- 10 (347 mg, 2,51 mmol) e KI (21 mg, 0,126 mmol) in THF (8 mL). Resa (793 mg, 62%).

[0938] UPLC/ELSD: RT = 3,95 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1018,19 per $C_{67}H_{124}N_4O_2$

Fase 3: N^1, N^1, N^2 -Tri((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

[0939]



Formula chimica: $C_{62}H_{116}N_4$

Peso molecolare: 917.64

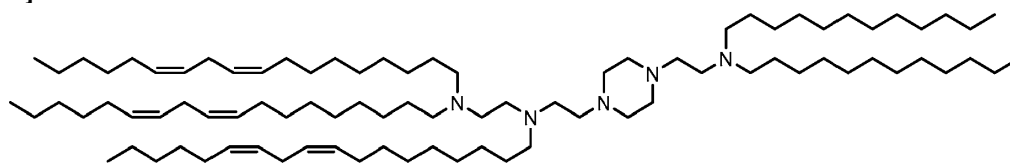
- 15 [0940] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 18, N^1, N^1, N^2 -tri((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina è stata sintetizzata da, *terz*-butil 4-(2-((2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (793 mg, 0,779 mmol) e TFA (3,0 mL, 39,0 mmol) in
- 20 DCM (3,0 mL). Resa (374 mg, 52%).

[0941] UPLC/ELSD: RT = 3,68 min. MS (ES): m/z (MH^+) 918,84 per $C_{62}H_{116}N_4$

[0942] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,36 (m, 12H); 4,12 (m, 6H); 3,30-2,55 (22H); 2,04 (q, 12H); 1,80-1,00 (br. m, 54H); 0,89 (t, 9H).

Fase 4: N^1 -(2-(4-(2-(Didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tri((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)etan-1,2-diammina

[0943]



Formula chimica: $C_{88}H_{169}N_5$

Peso molecolare: 1297,36

[0944] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1 , N^2 , N^2 -tri((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)etan-1,2-diammina è stata sintetizzata da N^1 , N^1 , N^2 -tri((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina (75 mg, 0,082 mmol), N -(2-cloroetil)- N -dodecildodecan-1-ammina (37 mg, 0,090), K_2CO_3 (23 mg, 0,163 mmol) e KI (2 mg, 0,012 mmol) in THF (3 mL). Resa (20 mg, 15%).

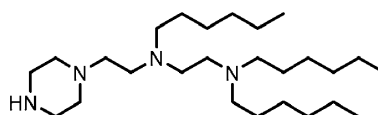
[0945] UPLC/ELSD: RT = 4,00 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1297,88 per $C_{88}H_{169}N_5$

[0946] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,48-5,28 (Br, 12H); 3,30-2,20 (br. m, 36H); 2,17-1,92 (br. m, 12H); 1,90-1,00 (br. m, 94H); 0,87 (br. m., 15H).

AJ: Composto 35: N^1 , N^1 , N^2 -Triesil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

Il Composto 35 è stato sintetizzato secondo le Fasi 1-5 per il Composto 17.

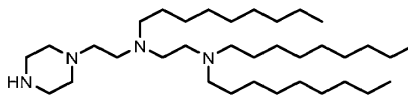
[0947]



AK: Composto 36: N^1 , N^1 , N^2 -Trinonil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etano-1,2-diammina

Il Composto 36 è stato sintetizzato secondo le Fasi 1-5 delineate per il Composto 18.

[0948]



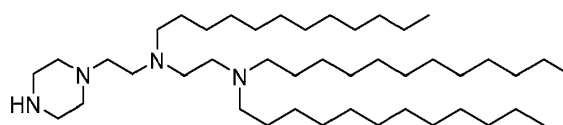
Formula chimica: $C_{35}H_{74}N_4$

Peso molecolare: 551.01

AL: Composto 37: N^1, N^1, N^2 -Tridodecil- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina II

Composto 37 è stato sintetizzato secondo le Fasi 12 per il Composto 3.

5 [0949]

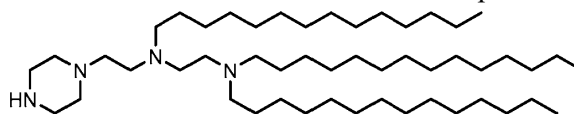


Formula chimica: $C_{44}H_{92}N_4$

Peso molecolare: 677.25

AM: Composto 38: N^1 -(2-(Piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tritetradeciletan-1,2-diammina

[0950] Il Composto 38 è stato sintetizzato secondo le Fasi 1-5 per il Composto 13.

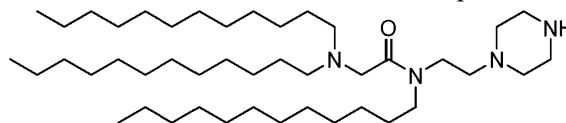


Formula chimica: $C_{50}H_{104}N_4$

Peso molecolare: 761.41

10 **AN: Composto 39: 2-(Didodecilammino)- N -dodecil- N -(2-(piperazin-1-il)etil)acetammide**

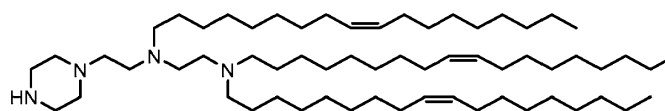
[0951] Il Composto 39 è stato sintetizzato secondo le Fasi 1-3 per il Composto 1.



AO: Composto 40: N^1, N^1, N^2 -Tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

15

[0952] Il Composto 40 è stato sintetizzato secondo le Fasi 1-3 per il Composto 33.

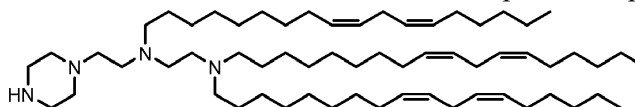


Formula chimica: $C_{62}H_{122}N_4$

Peso molecolare: 923.69

AP: Composto 41: N^1,N^1,N^2 -Tri((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina

[0953] Il Composto 41 è stato sintetizzato secondo le Fasi 1-3 per il Composto 34.



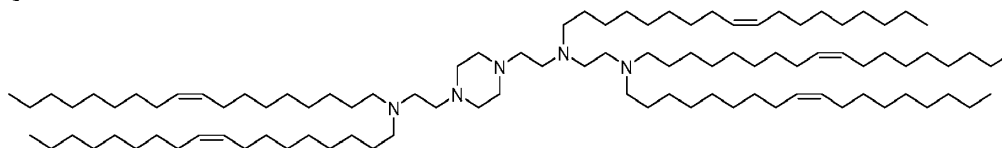
Formula chimica:

Peso molecolare:

5

AQ: Il Composto secondo la formula (IV): N^1 -(2-(4-(2-(Di((Z))-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)etan-1,2-diammina

[0954]



10 [0955] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 18, N^1 -(2-(4-(2-(di((Z))-ottadec-9-en-1-il)ammino)etil)piperazin-1-il)etil)- N^1, N^2, N^2 -tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)etano-1,2-diammina è stato sintetizzato da N^1, N^1, N^2 -tri((Z)-ottadec-9-en-1-il)- N^2 -(2-(piperazin-1-il)etil)etan-1,2-diammina (75 mg, 0,0812 mmol), (Z)- N -(2-cloroetil)- N -((Z)-ottadec-9-en-1-il)ottadec-9-en-1-ammina (57 mg, 0,0974 mmol) K_2CO_3 (22 mg, 0,162 mmol) e KI (2 mg, 0,012 mmol) in THF (1,5 mL).

15 Resa (30 mg, 25%)

[0956] UPLC/ELSD: RT = 4,41 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1469,08 per $C_{100}H_{195}N_5$

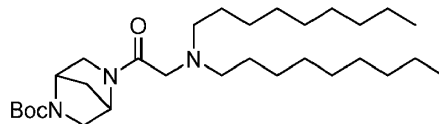
[0957] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,40-5,27 (br. m, 10H); 3,18-2,22 (br. m, 30H); 2,06-1,89 (m, 20H); 1,80-0,97 (br. m, 120H); 0,88 (t, 15H).

AR:Composto 42: 2-(Dinonilammino)-1-(5-(N -(2-(dinonilammino)etil)- N -nonilglicil)-2,5-

diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)etan-1-one

Fase 1: *terz*-butil 5-(dinonilglicil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-carbossilato

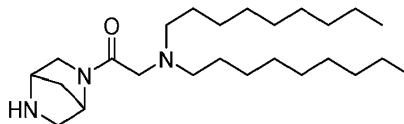
[0958]



- 5 [0959] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 11, il *terz*-butil 5-(dinonilglicil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-carbossilato è stato sintetizzato dal litio dinonilglicinato (500 mg, 1,50 mmol), *terz*-butil 2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptano-2-carbossilato (357 mg, 1,80 mmol), iPr_2EtN (628 μ L, 3,60 mmol) e T3P (soluzione al 50% di EtOAc, 2,68 mL, 4,50 mmol) in THF (15 mL). Resa (710 mg, 78%).
- 10 [0960] UPLC/ELSD: RT = 0,87 min. MS (ES): m/z (MH^+) 508,44 per $C_{30}H_{57}N_3O_3$
- [0961] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,98-4,46 (br. m, 2H); 4,30-3,15 (br. m, 10H); 2,14-1,60 (br. m, 6H); 1,49 (s, 9H); 1,40-1,00 (br. m, 24H); 0,89 (t, 6H).

Fase 2: 1-(2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)-2-(dinonilammino)etan-1-one

[0962]



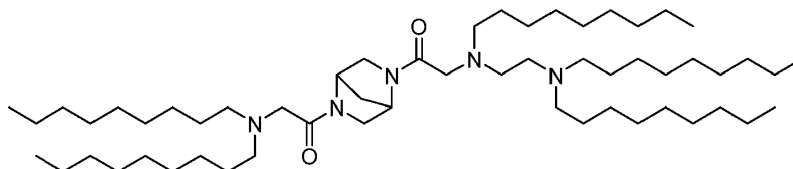
15

Formula chimica: $C_{25}H_{49}N_3O$
Peso molecolare: 407.69

- [0963] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, dal *terz*-butile è stato sintetizzato 1-(2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)-2-(dinonilammino)etan-1-one 5-(dinonilglicil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-carbossilato (710 mg, 1,40 mmol) e TFA (5,4 mL, 70 mmol) in DCM (5 mL). Resa (446 mg, 78%)
- 20 [0964] UPLC/ELSD: RT = 0,67 min. MS (ES): m/z (MH^+) 408,64 per $C_{25}H_{49}N_3O$
- [0965] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,90-3,00 (br. m, 8H); 2,49 (br. m, 4H); 1,79 (br. m, 2H); 1,58-1,08 (br. m, 28H); 0,90 (t, 6H).

Fase 3: 2-(Dinonilammino)-1-(5-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)etan-1-one

[0966]



Formula chimica: $C_{56}H_{111}N_5O_2$

Peso molecolare: 886.54

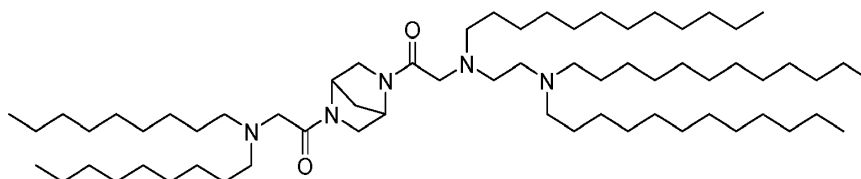
5 [0967] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, il 2-(dinonilammino)-1-(5-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)etan-1-one è stato sintetizzato da 1-(2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)-2-(dinonilammino)etan-1-one (100 mg, 0,25 mmol), N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicina (134 mg, 0,27 mmol), iPr_2EtN (94 μ L, 0,54 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 438 μ L, 0,74 mmol) in THF (20 mL). Resa (50 mg,
10 23%).

[0968] UPLC/ELSD: RT = 3,60 min. MS (ES): m/z (MH^+) 887,12 per $C_{56}H_{111}N_5O_2$

[0969] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,15-2,28 (br. m, 26H); 2,16-1,00 (br. m, 70H); 0,90 (t, 15H).

AS: **Composto 43: 2-((2-(Didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)-1-(5-(dinonilglicil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)etan-1-one 3**

[0970]



[0971] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)-1-(5-(dinonilglicil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)etan-1-one è stato sintetizzato da 1-(2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)-2-(dinonilammino)etan-
20 il)etan-1-one è stato sintetizzato da 1-(2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptan-2-il)-2-(dinonilammino)etan-

1-one (100 mg, 0,25 mmol) N-(2-(didodecilammino)etil)-N-dodecilglicina (168 mg, 0,27 mmol), iPr_2EtN (94 μL , 0,54 mmol), e T3P (50% di soluzione di EtOAc, 438 μL , 0,74 mmol) in THF (20 mL). Resa (150 mg, 60%).

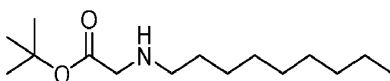
[0972] UPLC/ELSD: RT = 3,60 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1013,24 per $C_{65}H_{129}N_5O_2$

5 [0973] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,15-2,26 (br. m, 24H); 2,13-1,09 (br. m, 90H); 0,90 (t, 15H).

AT: Composto 44: Metil 8-((2-(4-(N-(2-(dionilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)ottanoato

Fase 1: *terz*-Butil nonilglicinato

10 [0974]

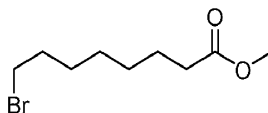


[0975] A una miscela di *terz*-butilglicina (3,0 g, 23 mmol) e 1-bromononano (2,4 g, 11,5 mmol) in MeCN (100 mL) è stato aggiunto K_2CO_3 (3,2 g, 23 mmol) e KI (190 mg, 1,1 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 24 ore. La sospensione è stata raffreddata a
15 temperatura ambiente e filtrata attraverso un tampone di celite, risciacquando con esani. Il MeCN è stato estratto 3x con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-15% di MeOH/DCM) ha fornito *terz*-butil nonilglicinato come un olio trasparente incolore (848 mg, 29%).

[0976] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,31 (s, 2H); 2,60 (t, 2H); 1,82-1,63 (br, 1H); 1,56-
20 1,20 (br. m, 23H); 0,90 (t, 3H).

Fase 2: Metil 8-bromoottanoato

[0977]



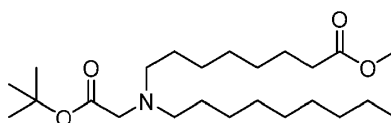
[0978] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 15, il metil 8-bromoottanoato è stato

sintetizzato da acido 8-bromoottanoico (5,0 g, 22 mmol), metanolo (20 mL, 450 mmol) e H₂SO₄ (1,2 mL), 22 mmol) in THF (20 mL). Resa (5,0 g, 95%).

[0979] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,42 (t, 2H); 2,33 (t, 2H); 1,88 (quint, 2H); 1,65 (quint, 2H); 1,54-1,27 (br. m, 6H).

5 Fase 3: Metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)ottanoato

[0980]



Formula chimica: C₂₄H₄₇NO₄

Peso molecolare: 413.64

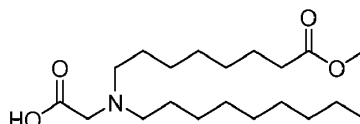
[0981] A una miscela di *terz*-butil nonilglicinato (300 mg, 1,17 mmol) e metil 8-bromoottanoato (290 mg, 1,22 mmol) in MeCN (12mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (341 mg, 2,45 mmol) e KI (19 mg, 0,12 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 12 ore. La sospensione è stata raffreddata a temperatura ambiente e filtrata attraverso un tampone di celite, risciacquando con esani. Il MeCN è stato estratto 3x con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-10% EtOAc/esani) ha fornito metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)ottanoato (353 mg, 73%).

[0982] UPLC/ELSD: RT = 1,60 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 414,51 per C₂₄H₄₇NO₄

[0983] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,23 (s, 2H); 2,57 (t, 4H); 2,32 (t, 2H); 1,70-1,18 (br. m, 33H); 0,90 (t, 3H).

Fase 4: *N*-(8-metossi-8-ossoetil)-*N*-nonilglicina

20 [0984]



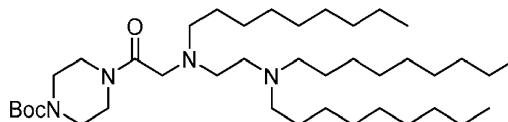
[0985] A una soluzione di metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)ottanoato (353

mg, 0,85 mmol) in DCM (4mL) è stato aggiunto TFA (3,3 mL, 43 mmol) e la soluzione è stata lasciata agitare a TA per 4 ore. La soluzione è stata concentrata *sotto vuoto*, ripresa in DCM e lavata con Na₂CO₃ al 5% e soluzione salina, essiccata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata *sotto vuoto* per fornire *N*-(8-metossi-8-ossoottile)-*N*-nonilglicina (305 mg, 99%).

- 5 [0986] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,49 (s, 2H); 3,06 (t, 4H); 2,32 (t, 2H); 1,79-1,14 (br. m, 24H); 0,90 (t, 3H).

Fase 5: *terz*-Butil 4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-carbossilato

[0987]



Formula chimica: C₄₀H₈₀N₄O₃

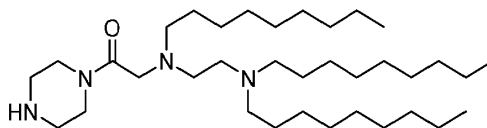
Peso molecolare: 665.11

- 10 [0988] Ad una soluzione di *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (1,0 g, 2,0 mmol) e 1-boc-piperazina (412 mg, 2,2 mmol) in THF (20 mL) è stato aggiunto iPr₂EtN (773 μL, 4,4 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 3,6 mL, 6,0 mmol) e la soluzione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 12 ore. La reazione è stata spenta con acqua ed estratta 3x con EtOAc. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su Na₂SO₄,
15 filtrate e concentrate *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) ha fornito *terz*-butil 4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-carbossilato (961 mg, 72%). UPLC/ELSD: RT = 3,27 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 665,79 per C₄₀H₈₀N₄O₃

- [0989] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,43-2,90 (br. m, 20H); 2,04-0,99 (br. m, 51H);
20 0,90 (t, 9H).

Fase 6: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one

[0990]

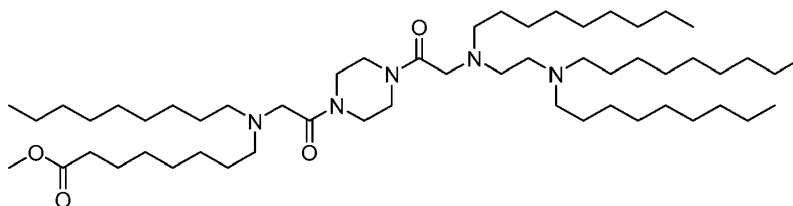


[0991] A una soluzione di *terz*-butil 4-(*N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-carbossilato (961 mg, 1,44 mmol) in DCM (6 mL) è stato aggiunto TFA (5,5 mL, 72 mmol) e la soluzione è stata lasciata agitare per 4 ore. La soluzione è stata concentrata *sotto vuoto*, ripresa in DCM e lavata con Na₂CO₃ al 5%, soluzione salina, essiccata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata *sotto vuoto* per fornire 2-((2-(dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (743 mg, 91%). UPLC/ELSD: RT = 2,14 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 565,82 per C₃₅H₇₂N₄O

[0992] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,59 (br, 4H); 3,36 (br, 2H); 2,99-2,03 (br. m, 14H); 1,74-1,01 (br. m, 42H); 0,90 (t, 9H).

10 **Fase 7: Metil 8-((2-(4-(*N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)ottanoato**

[0993]



Formula chimica: C₅₅H₁₀₉N₅O₄

Peso molecolare: 904.51

[0994] A una soluzione di *N*-(8-metossi-8-ossoottil)-*N*-nonilglicina (100 mg, 0,28 mmol) e 2-((2-(dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (174 mg, 0,31 mmol) in THF (25 mL) è stato aggiunto, iPr₂EtN (107 μL, 0,62 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 0,50 mL, 0,84 mmol) e la reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata diluita con acqua ed estratta con EtOAc. Le sostanze organiche sono state essiccate su Na₂SO₄ anidro, filtrate e concentrate *sotto vuoto*.

20 Purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% DCM/[DCM 20% MeOH

1% NH₄OH]) fornito metil 8-((2-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)ottanoato (121 mg, 48%).

[0995] UPLC/ELSD: RT = 2,88 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 905 per C₅₅H₁₀₉N₅O₄

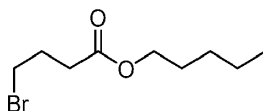
[0996] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,64-3,36 (br. m, 11H); 3,18 (s, 2H); 3,13 (s, 2H);

5 2,54-2,09 (br. m, 16H); 1,55-0,88 (br. m, 66H); 0,76 (t, 12H).

AU: Composto 45: Pentil 4-((2-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)butanoato

Fase 1: Pentil 4-bromobutanoato

[0997]



Formola chimica: C₉H₁₇BrO₂

Peso molecolare: 237.14

10

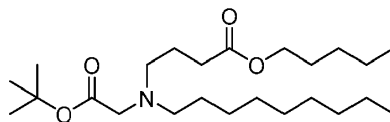
[0998] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 15, il pentil 4-bromobutanoato è stato sintetizzato da acido 4-bromobutanoico (2,0 g, 12 mmol), pentanolo (1,7 mL, 15,6 mmol) e H₂SO₄ (0,65 mL, 12 mmol) in THF (20 mL). Resa (1,26 g, 44%).

[0999] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,10 (t, 2H); 3,49 (t, 2H); 2,52 (t, 2H); 2,20 (quint,

15 2H); 1,65 (quint, 2H); 1,35 (m, 4H); 0,93 (t, 3H).

Fase 2: Pentil 4-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)butanoato

[1000]



Formola chimica: C₂₄H₄₇NO₄

Peso molecolare: 413.64

[1001] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 44, il pentil 4-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil nonilglicinato (300 mg, 1,17

20

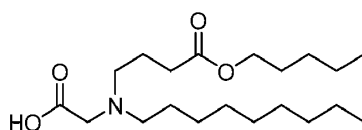
mmol) e pentil 4-bromobutanoato (290 mg, 1,22 mmol) in MeCN (12 mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (341 mg, 2,45 mmol) e KI (19 mg, 0,12 mmol). Resa (343 mg, 71%).

[1002] UPLC/ELSD: RT = 1,81 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 415 per C₂₄H₄₇NO₄

[1003] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,23 (s, 2H); 2,60 (br. m, 4H); 2,37 (t, 2H); 1,78 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,52-1,20 (br. m, 27H); 0,90 (m, 6H).

Fase 3: *N*-nonil-*N*-(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicina

[1004]



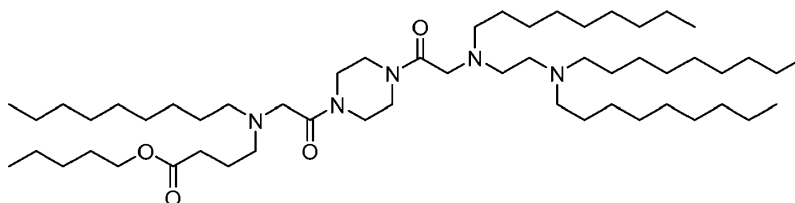
[1005] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, la *N*-nonil-*N*-(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicina è stata sintetizzata dal pentil 4-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)butanoato (343 mg, 0,83 mmol) e TFA (3,17 mL, 41,5 mmol) in DCM (4 mL). Resa (296 mg, 99%).

[1006] UPLC/ELSD: RT = 1,29 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 358 per C₂₀H₃₉NO₄

[1007] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,43 (br, 2H); 2,94 (br, 4H); 2,41 (t, 2H); 1,98 (br. m, 2H); 1,74-1,54 (br. m, 4H); 1,40-1,16 (br. m, 16H); 0,91 (m, 6H).

Fase 4: Pentil 4-((2-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)butanoato

[1008]



Formula chimica: C₅₅H₁₀₉N₅O₄

Peso molecolare: 904.51

[1009] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, pentil 4-((2-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)butanoato è stato

sintetizzato da *N*-nonil-*N*-(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicina (100 mg, 0,28 mmol), 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil) ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (174 mg, 0,31 mmol), *i*Pr₂EtN (107 μL, 0,62 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 0,50 mL, 0,84 mmol) in THF (25 mL). Resa (121 mg, 48%).

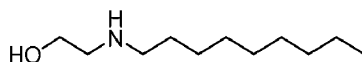
5 [1010] UPLC/ELSD: RT = 3,01 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 905 per C₅₅H₁₀₉N₅O₄

[1011] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,93 (t, 2H); 3,61-3,31 (br. m, 8H); 3,17 (m, 4H); 2,55-2,08 (br. m, 16H); 1,71-0,90 (br. m, 64H); 0,75 (m, 15H).

AV: Composto 46: Metil 8-((2-((2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)ottanoato

10 Fase 1: 2-(Nonilammino)etan-1-olo

[1012]



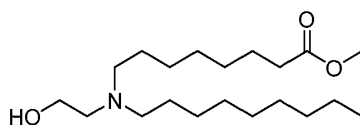
[1013] A una miscela di etanolammina (4,4 mL, 72 mmol) e 1-bromononano (3,0 g, 14,5 mmol) in MeCN (150 mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (4,0 g, 29 mmol) e KI (240 mg, 1,5 mmol) e la

15 miscela è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 12 ore. La sospensione è stata raffreddata a temperatura ambiente e filtrata su un tampone di celite, risciacquando con esani. Il MeCN è stato estratto con esani 3x e gli esani combinati sono stati concentrati. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% DCM/[DCM 20% MeOH 1% NH₄OH]) ha fornito 2-(nonilammino)etan-1-olo (1,0 g, 38%)

20 [1014] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,66 (t, 2H); 2,80 (t, 2H); 2,62 (t, 2H); 1,96 (br. m, 2H); 1,50 (br. m, 2H); 1,28 (br. m, 12H); 0,90 (t, 3H).

Fase 2: Metil 8-((2-idrossietil)(nonil)ammino)ottanoato

[1015]



Formula chimica: $C_{20}H_{41}NO_3$

Peso molecolare: 343.55

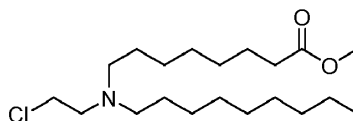
[1016] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il metil 8-((2-idrossietil)(nonil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato da 2-(nonilammino)etan-1-olo (500 mg, 2,67 mmol), metil 8-bromoottanoato (665 mg, 2,8 mmol), K_2CO_3 (780 mg, 5,6 mmol) e KI (44 mg, 0,27 mmol) in MeCN (30 mL). Resa (578 mg, 63%).

[1017] UPLC/ELSD: RT = 1,01 min. MS (ES): m/z (MH^+) 344,31 per $C_{20}H_{41}NO_3$

[1018] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69 (s, 3H); 3,59 (t, 2H), 2,65 (br, 2H); 2,51 (t, 4H); 2,32 (t, 2H); 1,65 (br. m, 2H); 1,49 (br. m, 4H); 1,30 (br. m, 18H); 0,90 (t, 3H).

Fase 3: Metil 8-((2-cloroetil)(nonil)ammino)ottanoato

10 [1019]



[1020] Allo stesso modo del passaggio 2 per il composto 18, il metil 8-((2-cloroetil)(nonil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato dal metil 8-((2-idrossietil)(nonil)ammino)ottanoato (578 mg, 1,68 mmol), metansolfonil cloruro (163 μ L, 2,10 mmol) e trimetilammina (305 μ L, 2,20 mmol) in DCM (10 mL). Resa (418 mg, 69%).

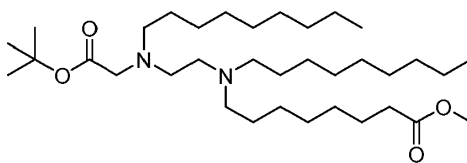
UPLC/ELSD: RT = 1,21 min. MS (ES): m/z (MH^+) 363 per $C_{20}H_{40}ClNO_2$

[1021] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69 (br, 3H); 3,51 (br, 2H), 2,78 (br. m, 2H); 2,47 (br. m, 4H); 2,33 (t, 2H); 1,72-1,20 (br. m, 24H); 0,91 (t, 3H).

Fase 4: Metil 8-((2-((2-(*terz*-butossi)-2-ossietil)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)ottanoato

20

[1022]



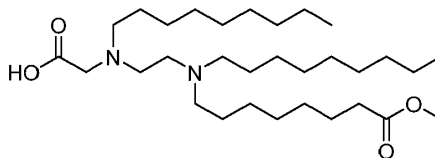
[1023] A una miscela di *terz*-butil nonilglicinato (218 mg, 0,85 mmol) e metil 8-((2-cloroetil)(nonil)ammino)ottanoato (337 mg, 0,93 mmol) in MeCN (10 mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (236 mg, 1,69 mmol) e KI (14 mg, 0,08 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto
5 agitazione a 82 °C per 12 ore. La sospensione è stata raffreddata a temperatura ambiente e filtrata attraverso un tampone di celite, risciacquando con esani. La miscela è stato estratta con esani 3x e gli esani combinati sono stati concentrati. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-10% MeOH/DCM) ha fornito metil 8-((2-((2-*terz*-butossi)-2-
ossoetil)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)ottanoato (283 mg, 57%).

10 [1024] UPLC/ELSD: RT = 2,92 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 584 per C₃₅H₇₀N₂O₄

[1025] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,28 (s, 2H); 2,80-2,20 (br. m, 12H); 1,85-1,10 (br. m, 47H); 0,91 (t, 6H).

Fase 5: *N*-(2-((8-metossi-8-ossoottil)(nonil)ammino)etil)-*N*-nonilglicina

[1026]



15

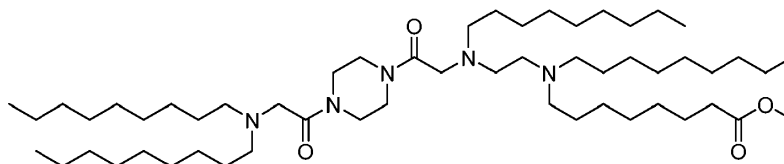
[1027] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, la *N*-(2-((8-metossi-8-
ossoottil)(nonil)ammino)etil)-*N*-nonilglicina è stata sintetizzata dalla metil 8-((2-((2-*terz*-
butossi)-2-*ossoetil*)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)ottanoato (283 mg, 0,49 mmol) e TFA
(1,86 mL, 24,3 mmol) in DCM (2 mL). Resa (255 mg, 99%).

20 [1028] UPLC/ELSD: RT = 2,18 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 528 per C₃₁H₆₂N₂O₄

[1029] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H), 3,26 (s, 2H), 2,79 (br. m, 8H), 2,59 (t,
2H), 2,33 (t, 2H), 1,76-1,08 (br. m, 38H); 0,90 (t, 6H).

Fase 6: Metil 8-((2-((2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)ottanoato

[1030]



Formula chimica: $C_{55}H_{109}N_5O_4$

Peso molecolare: 904.51

5 [1031] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, metil 8-((2-((2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)etil)(il nonil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato da 2-(dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (75 mg, 0,20 mmol), *N*-(2-((8-metossi-8-ossoottile))(nonil)ammino)etil)-*N*-nonilglicina (150 mg, 0,28 mmol), *i*Pr₂EtN (88 μ L, 0,50 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 409 μ L, 0,69 mmol). Resa (57 mg, 32%).

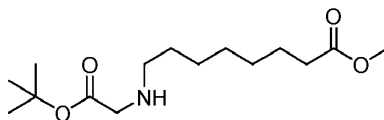
10 UPLC/ELSD: RT = 2,88 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 905 per $C_{55}H_{109}N_5O_4$

[1032] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 3,82-2,87 (br. m, 27H); 2,64 (m, 2H); 2,33 (t, 2H); 1,80-1,15 (br. m, 66H); 0,90 (t, 12H).

AW: Composto 47: Metil 8-((2-(dinonilammino)etil)(2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)ammino)ottanoato

15 **Fase 1: Metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)ammino)ottanoato**

[1033]

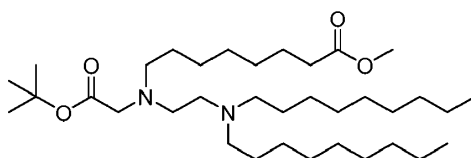


[1034] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 44, il metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato dalla *terz*-butilglicina (2,0 g, 12 mmol), metile 8-bromoottanoato (2,8 g, 12 mmol), K₂CO₃ (3,3 g, 24 mmol) e KI (198 mg, 1,2 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (1,16 g, 34%).

[1035] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,33 (s, 2H); 2,62 (t, 2H); 2,32 (s, 2H); 2,16-1,80 (br, 1H); 1,72-1,42 (br. m, 13H); 1,34 (br. m, 6H).

Fase 2: Metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(2-(dinilammino)etil)ammino)ottanoato

[1036]



Formula chimica: C₃₅H₇₀N₂O₄

Peso molecolare: 582.96

5

[1037] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 46, *metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)ammino)ottanoato* è stato sintetizzato da *metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)ammino)ottanoato* (300 mg, 1,0 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (381 mg, 1,15 mmol), K₂CO₃ (320 mg, 2,3 mmol) e KI (17 mg, 0,10 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (285 mg, 47%).

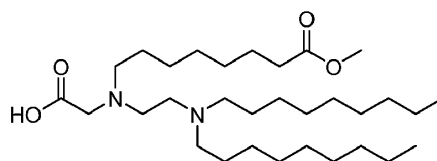
10

[1038] UPLC/ELSD: RT = 2,89 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 584 per C₃₅H₇₀N₂O₄

[1039] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,29 (s, 2H); 3,10 (br, m, 8H); 2,59 (t, 2H); 2,32 (t, 2H); 1,82 (br. m, 4H); 1,74-1,16 (br. m, 43H); 0,91 (t, 6H).

Fase 3: *N*-(2-(dinilammino)etil)-*N*-(8-metossi-8-ossoottil)glicina

15 [1040]



[1041] Allo stesso modo della Fase 5 per il composto 46, la *N*-(2-(dinilammino)etil)-*N*-(8-metossi-8-ossoottil)glicina è stata sintetizzata dalla *metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(2-(dinilammino)etil)ammino)ottanoato* (285 mg, 0,50 mmol) e TFA (1,87 mL, 24,4 mmol) in DCM (2 mL). Resa (254 mg, 98%).

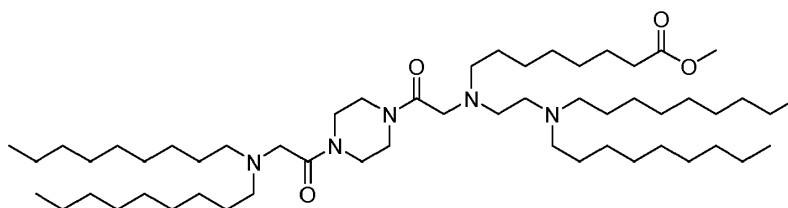
20

[1042] UPLC/ELSD: RT = 2,16 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 528 per C₃₁H₆₂N₂O₄

[1043] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 3,25 (s, 2H); 2,90-2,72 (br. m, 8H); 2,59 (t, 2H); 2,32 (t, 2H); 1,66 (br. m, 6H); 1,48 (br. m, 2H); 1,40-1,20 (br. m, 30H); 0,91 (t, 6H).

Fase 4: Metil 8-((2-(dinonilammino)etil)(2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)ammino)ottanoato

[1044]



Formula chimica: C₅₅H₁₀₉N₅O₄

Peso molecolare: 904.51

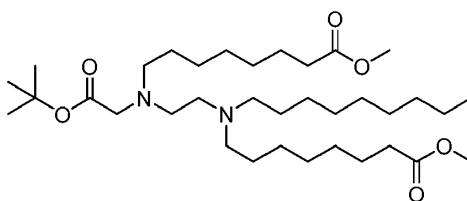
[1045] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, il metil 8-((2-(dinonilammino)etil)(2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)ammino)ottanoato era sintetizzato da 2-(dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (75 mg, 0,20 mmol), N-(2-(dinonilammino)etil)-N-(8-metossi-8-ossoottil)glicina (150 mg, 0,28 mmol), iPr₂EtN (88 μL, 0,50 mmol) e T3P (soluzione EtOAc al 50%, 409 μL, 0,69 mmol). Resa (80 mg, 39%). UPLC/ELSD: RT = 2,87 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 905 per C₅₅H₁₀₉N₅O₄

[1046] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,81-2,21 (br. m, 31H); 1,89-1,05 (br. m, 66H); 0,90 (t, 12H).

AX: Composto 48: Metil 8-((2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(2-((8-metossi-8-ossoottil)(nonil)ammino)etil)ammino)ottanoato

Fase 1: Metil 8-((2-(terz-butossi)-2-ossoetil)(2-((8-metossi-8-ossoottil)(nonil)ammino)etil)ammino)ottanoato

[1047]



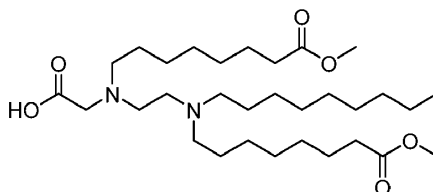
[1048] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 46, metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(2-((8-metossi-8-ossoottil)(nonil)ammino)etil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato da metil 8-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)ammino)ottanoato (65 mg, 0,23 mmol), metil 8-((2-
5 cloroetil)(nonil)ammino)ottanoato (86 mg, 0,24 mmol), K₂CO₃ (69 mg, 0,50 mmol) e KI (4 mg, 0,02 mmol) in MeCN (4 mL). Resa (60 mg, 43%).

[1049] UPLC/ELSD: RT = 2,42 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 614 per C₃₅H₆₈N₂O₆

[1050] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,66 (s, 6H); 3,25 (s, 2H); 2,66 (m, 2H); 2,54 (m, 4H); 2,38 (m, 4H); 2,28 (t, 4H); 1,61 (m, 4H); 1,54-1,10 (br. m, 39H); 0,87 (t, 3H).

10 **Fase 2: *N*-(8-metossi-8-ossoottil)-*N*-(2-((8-metossi-8-ossoottil)(nonil)ammino)etil)glicina**

[1051]



Formula chimica: C₃₁H₆₀N₂O₆

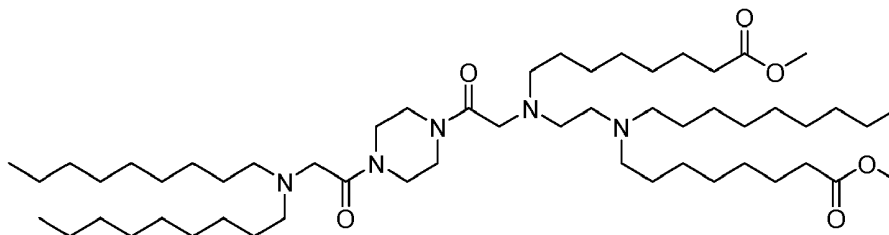
Peso molecolare: 556.83

[1052] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 46, *N*-(8-metossi-8-ossoottil)-*N*-(2-((8-metossi-8-ossoottil)(nonil)ammino)etil)glicina è stata sintetizzato da metil 8-((2-(*terz*-butossi)-
15 2-ossoetil)(2-((8-metossi-8-ossoottil)(nonil)ammino)etil)ammino)ottanoato (60 mg, 0,10 mmol), e TFA (0,37 mL, 4,9 mmol) in DCM (1 mL). Resa (54 mg, 99%).

[1053] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,60 (s, 6H); 3,15 (s, 2H); 2,72 (br. m, 8H); 2,50 (t, 2H); 2,22 (t, 4H); 1,70-1,05 (br. m, 34H); 0,81 (t, 3H).

**Fase 3: Metil 8-((2-(4-(dinonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(2-((8-metossi-8-
20 ossoottil)(nonil)ammino)etil)ammino)ottanoato**

[1054]



[1055] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, metil 8-((2-(4-

5 (dionilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(2-((8-metossi-8-
(nonil)ammino)etil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato da 2-(dionilammino)-1-
(piperazin-1-il)etan-1-one (26 mg, 0,07 mmol), *N*-(8-metossi-8 -ossoottil)-*N*-(2-((8-metossi-8-
ossoottil)(nonil)ammino)etil)glicina (54 mg, 0,10 mmol), *i*Pr₂EtN (30 μ L, 0,17 mmol) e T3P
(50% di soluzione di EtOAc, 140 μ L, 0,24 mmol). Resa (20 mg, 27%).

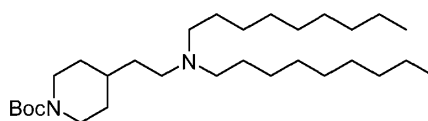
[1056] UPLC/ELSD: RT = 2,56 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 935 per C₅₅H₁₀₇N₅O₆

10 [1057] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 3,70-3,00 (br. m, 18H); 2,55-2,05 (br. m, 18H);
1,70-0,95 (br. m, 62H); 0,76 (t, 9H).

AY: **Composto 49: 2-((2-(Dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(2-**
(dionilammino)etil)piperidin-1-il)etan-1-one

Fase 1: *terz*-butil 4-(2-(dionilammino)etil)piperidina-1-carbossilato

15 [1058]



Formula chimica: C₃₀H₆₀N₂O₂

Peso molecolare: 480.82

[1059] A una miscela di *terz*-butil 4-(2-amminoetil) piperidina-1-carbossilato (1,50 g, 6,6
mmol) e 1-bromononano (1,36 g, 6,57 mmol) in MeCN (100 mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (1,83
g, 13,1 mmol) e KI (109 mg, 0,66 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C
20 per 12 ore. La sospensione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata su un tampone di

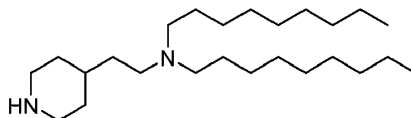
celite risciacquando con esani e concentrata *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% DCM/[DCM 20% MeOH 1% NH₄OH]) ha fornito *terz*-butil 4-(2-(dinonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (602 mg, 19%).

[1060] UPLC/ELSD: RT = 2,41 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 482 per C₃₀H₆₀N₂O₂

5 [1061] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,20-2,26 (br. m, 10H); 1,77-1,10 (br. m, 44H); 0,91 (t, 6H).

Fase 2: *N*-nonil-*N*-(2-(piperidin-4-il)etil)nonan-1-ammina

[1062]



10

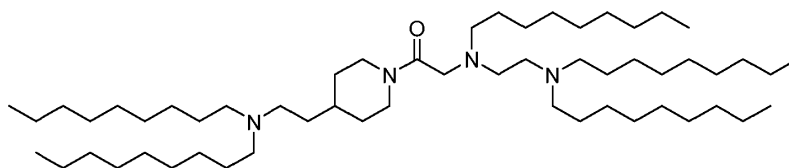
[1063] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, la *N*-nonil-*N*-(2-(piperidin-4-il)etil)nonan-1-ammina è stata sintetizzata dal *terz*-butil 4-(2-(dinonilammino))etil piperidina-1-carbossilato (602 mg, 1,25 mmol) e TFA (4,8 mL, 63 mmol) in DCM (5 mL). Resa (406 mg, 85%).

15 [1064] UPLC/ELSD: RT = 1,27 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 382 per C₂₅H₅₂N₂

[1065] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,15 (br. m, 2H); 2,65 (br. m, 2H); 2,42 (br. m, 6H); 1,83-1,04 (br. m, 35H); 0,90 (t, 6H).

Fase 3: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(2-(dinonilammino)etil)piperidin-1-il)etan-1-one

20 [1066]



Formula chimica: $C_{56}H_{114}N_4O$

Peso molecolare: 859.56

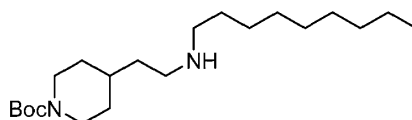
[1067] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(2-(dinonilammino)etil)piperidin-1-il) l'etan-1-one è stato sintetizzato da *N*-nonil-*N*-(2-(piperidin-4-il)etil)nonan-1-ammina (200 mg, 0,53 mmol), *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (287 mg, 0,58 mmol), *i*Pr₂EtN (201 μ L, 1,2 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 938 μ L, 1,6 mmol) in THF (10 mL). Resa (90 mg, 20%). UPLC/ELSD: RT = 3,26 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 860 per $C_{56}H_{114}N_4O$

[1068] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 4,62-4,09 (br. m, 2H); 3,55-2,21 (br. m, 20H); 1,94-1,00 (br. m, 77H); 0,91 (t, 15H).

10 **AZ: Composto 50: 2-(Dinonilammino)-1-(4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperidin-1-il)etan-1-one**

Fase 1: *terz*-butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1069]



15

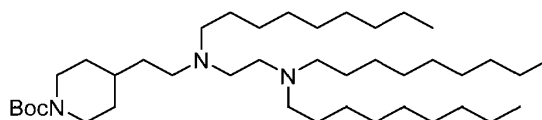
[1070] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-amminoetil)piperidina-1-carbossilato (1,50 g, 6,6 mmol), 1-bromononano (1,36 g, 6,57 mmol), K₂CO₃ (1,83 g, 13,1 mmol) e KI (109 mg, 0,66 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (288 mg, 13%).

20 [1071] UPLC/ELSD: RT = 1,23 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 356 per $C_{21}H_{42}N_2O_2$

[1072] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (br. m, 2H); 2,67 (br. m, 6H); 1,80-0,98 (br. m, 30H); 0,90 (t, 3H).

Fase 2: *terz*-butil 4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1073]



Formula chimica: C₄₁H₈₃N₃O₂

Peso molecolare: 650.13

5

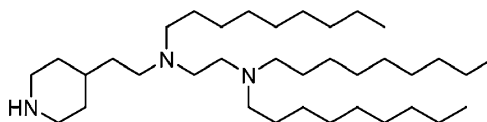
[1074] A una miscela di *terz*-butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (288 mg, 0,81 mmol) e *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (297 mg, 0,89 mmol) in MeCN (20 mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (249 mg, 1,79 mmol) e KI (13 mg, 0,08 mmol) e la miscela è stata lasciata agitare a 82 °C per 12 ore. La sospensione è stata raffreddata a temperatura ambiente e
10 filtrata su un tampone di celite risciacquando con esani e concentrata. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% DCM/[DCM 20% MeOH 1% NH₄OH]) ha fornito *terz*-butil 4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil) piperidina-1-carbossilato (216 mg, 41%) UPLC/ELSD: RT = 2,72 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 651 per C₄₁H₈₃N₃O₂

[1075] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (br, 2H); 2,83-2,29 (br. m, 14H); 1,75-1,00 (br. m, 58H); 0,90 (t, 9H).

15

Fase 3: *N*¹,*N*¹,*N*²-Trinonil-*N*²-(2-(piperidin-4-il)etil)etan-1,2-diammina

[1076]



[1077] Allo stesso modo della Fase 6 per il Composto 44, *N*¹, *N*¹, *N*²-trinonil-*N*²-(2-(piperidin-4-il)etil)etano-1,2-diammina è stato sintetizzato da *terz*-butil 4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (216 mg, 0,33 mmol) e TFA (1,27 mL, 16,6 mmol) in DCM (2 mL). Resa (178 mg, 97%).

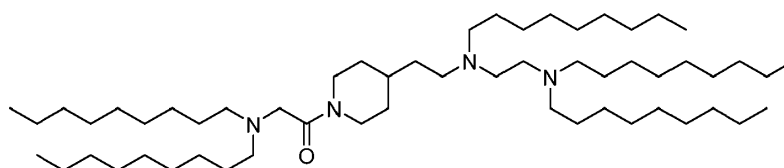
20

[1078] UPLC/ELSD: RT = 1,84 min. MS (ES): m/z (MH^+) 551 per $C_{36}H_{75}N_3$

[1079] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,08 (br. m, 2H); 2,70-2,25 (br. m, 14H); 2,0 (br, 1H); 1,80-1,02 (br. m, 49H); 0,90 (t, 9H).

Fase 4: 2-((Dinonilammino)-1-(4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperidin-1-il)etan-1-one

[1080]



Formula chimica: $C_{56}H_{114}N_4O$

Peso molecolare: 859.56

[1081] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, 2-(dinonilammino)-1-(4-(2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etil)piperidin-1-il) etan-1-one è stato sintetizzato da
10 dinonilglicina (96 mg, 0,29 mmol), N^1 , N^1 , N^2 -trionil- N^2 -(2-(piperidin-4-il)etil)etano-1,2-diammina (178 mg, 0,32 mmol), iPr_2EtN (112 μ L, 0,65 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 525 μ L, 0,88 mmol) in THF (6 mL). Resa (121 mg, 48%).

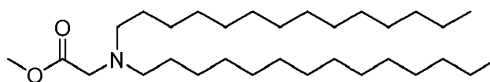
[1082] UPLC/ELSD: RT = 2,96 min. MS (ES): m/z (MH^+) 860 per $C_{56}H_{114}N_4O$

[1083] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,63-4,08 (br. m, 4H); 3,34-2,25 (br. m, 18H); 1,90-
15 1,01 (br. m, 77H); 0,91 (t, 15H).

BA: Composto 51: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(ditetradecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

Fase 1: Metil ditetradecilglicinato

[1084]



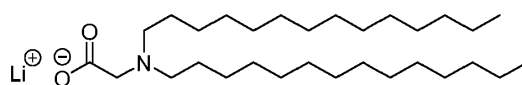
[1085] Allo stesso modo della Fase 1 del Composto 11, il metil 3-(ditetradecilammino)propanoato è stato sintetizzato da glicina metil estere cloridrato (564 mg,

4,49 mmol), tetradecanale (2,1 g, 9,89 mmol), sodio triacetossiboroidruro (2,1 g, 9,89 mmol), acido acetico (0,6 mL, 9,89 mmol), trimetilammina (0,93 mL, 6,74 mmol), in DCE (22 mL). Resa (1,93 g, 89%).

[1086] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,72 (s, 3H); 3,34 (s, 2H); 1,56 (t, 4H); 1,60-1,03 (br. m, 48H); 0,91 (t, 6H).

Fase 2: Ditetradecilglicinato di litio

[1087]



Formula chimica: C₃₀H₆₀LiNO₂

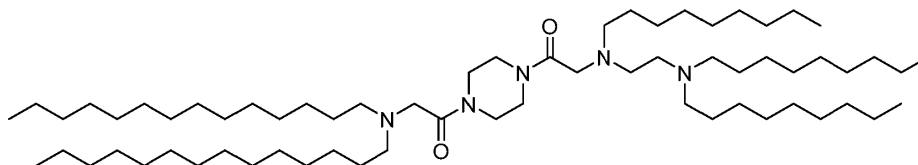
Peso molecolare: 473.76

[1088] Allo stesso modo della Fase 2 del Composto 11, il ditetradecilglicinato di litio è stato sintetizzato da metil ditetradecilglicinato (1,93 g, 4,0 mmol) e 1M di LiOH (20 mL, 20 mmol) in THF (20 mL). Resa (1,81 g, 97%).

[1089] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,17 (s, 2H); 2,64 (t, 4H); 1,52 (br. m, 4H); 1,31 (br. m, 44H); 0,93 (t, 6H).

Fase 3: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(ditetradecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one

[1090]



[1091] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(ditetradecilglicil)piperazin-1-il)etan-1-one è stato sintetizzato da ditetradecilglicinato di litio (126 mg, 0,26 mmol), 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (134 mg, 0,24 mmol), iPr₂EtN (91 μL, 0,52 mmol) e T3P (soluzione EtOAc al 50%, 424 μL, 0,71 mmol) in THF (4 mL)

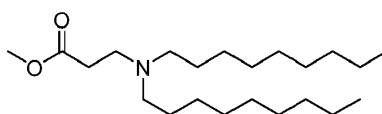
[1092] UPLC/ELSD: RT = 3,64 min. MS (ES): m/z (MH^+) 1016 per $C_{65}H_{131}N_5O_2$

[1093] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,84-2,34 (br. m, 26H); 1,88-0,99 (br. m, 90H); 0,90 (t, 15H).

BB: **Composto** **52:** **3-(Dinonilammino)-1-(4-(3-((2-**
5 **(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)propan-1-one**

Fase 1: Metil 3-(dinonilammino)propanoato

[1094]



Formula chimica: $C_{22}H_{45}NO_2$

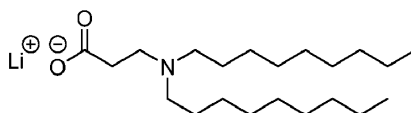
Peso molecolare: 355.61

[1095] A una miscela di metil 3-amminopropanoato cloridrato (2,0 g, 14 mmol) e 1-
10 bromononano (2,7 mL, 14 mmol) in MeCN (100 mL) è stato aggiunto K_2CO_3 (4,0 g, 29 mmol)
e KI (238 mg, 1,4 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 12 ore. La
sospensione è stata raffreddata a TA e filtrata su un tampone di lavaggio con celite con esani e
concentrata *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-10%
MeOH/DCM) ha fornito metil 3-(dinonilammino)propanoato (663 mg, 13%).

15 [1096] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69 (s, 3H); 2,80 (t, 2H); 2,41 (br. m, 6H); 1,70 -
1,10 (br. m, 28H); 0,90 (t, 6H).

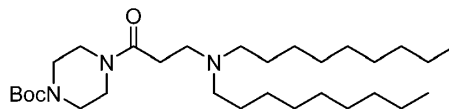
Fase 2: 3-(Dinilammino)propanoato di litio

[1097]



20 [1098] Allo stesso modo della Fase 2 del Composto 11, il 3-(dinonilammino)propanoato di litio
è stato sintetizzato dal metil 3-(dinonilammino)propanoato (663 mg, 1,86 mmol) e 1M di LiOH
(9,32 mL, 9,32 mmol) in THF (10 mL). Resa (636 mg, 99%).

[1099] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 2,94-1,65 (br. m, 8H); 1,65-1,04 (br. m, 28H); 0,90 (t, 6H). *terz*-Butil 4-(3-(dinonilammino)propanoil)piperazin-1-carbossilato



Formula chimica: C₃₀H₅₉N₃O₃

Peso molecolare: 509.82

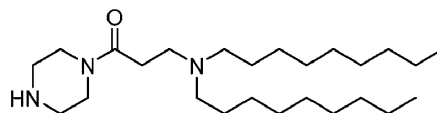
[1100] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 11, il *terz*-butil 4-(3-(dinonilammino)propanoil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal 3-(dinonilammino)propanoato di litio (636 mg, 1,83 mmol), 1-boc-piperazina (388 mg, 2,08 mmol), iPr₂EtN (726 μL, 4,17 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 3,4 mL, 5,68 mmol) in THF (20 mL). Resa (839 mg, 87%).

[1101] UPLC/ELSD: RT = 2,26 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 511 per C₃₀H₅₉N₃O₃

10 [1102] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,71-2,21 (br. m, 16H); 1,92-0,98 (br. m, 37H); 0,90 (t, 6H).

Fase 3: 3-(Dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)propan-1-one

[1103]



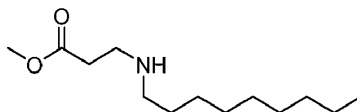
15 [1104] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il 3-(dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)propan-1-one è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-(dinonilammino)propanoil) piperazina-1-carbossilato (839 mg, 1,65 mmol) e TFA (6,3 mL, 83 mmol) in DCM (7 mL). Resa (501 mg, 74%).

[1105] UPLC/ELSD: RT = 1,19 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 411 per C₂₅H₅₁N₃O

20 [1106] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,61 (t, 2H); 3,47 (t, 2H); 2,86 (br. m, 6H); 2,46 (br. m, 6H); 1,80 (br, 1H); 1,56-1,08 (br. m, 28H); 0,90 (t, 6H).

Fase 4: Metil 3-(nonilammino)propanoato

[1107]

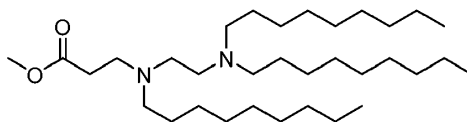


[1108] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 52, il metil 3-(nonilammino)propanoato è stato sintetizzato da metil 3-amminopropanoato cloridrato (2,0 g, 14 mmol), 1-bromononano (2,7 mL, 14 mmol), K₂CO₃ (4,0 g, 29 mmol) e KI (238 mg, 1,4 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (300 mg, 9%)

[1109] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,70 (s, 3H); 2,91 (t, 2H); 2,60 (br. m, 4H); 1,90 (br, 1H); 1,58-1,02 (br. m, 14H); 0,90 (t, 3H).

Fase 5: Metil 3-((2-(dionilammino)etil)(nonil)ammino)propanoato

10 [1110]



[1111] Allo stesso modo della Fase 9 del Composto 10, il metil 3-((2-(dionilammino)etil)(nonil)ammino)propanoato è stato sintetizzato dal metil 3-(nonilammino)propanoato (300 mg, 1,31 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (478 mg, 1,44 mmol), K₂CO₃ (400 mg, 2,88 mmol) e KI (22 mg, 0,13 mmol) in MeCN (20 mL). Resa (348 mg, 51%).

[1112] UPLC/ELSD: RT = 2,66 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 526 per C₃₃H₆₈N₂O₂

[1113] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,69 (s, 3H); 2,82 (t, 2H); 2,44 (br. m, 12H); 1,85-1,05 (br. m, 42H); 0,90 (t, 9H).

20 **Fase 6: Acido 3-((2-(Dionilammino)etil)(nonil)ammino)propanoico**

[1114]



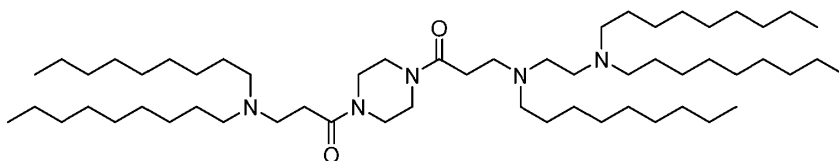
[1115] Allo stesso modo della Fase 10 del Composto 10, l'acido 3-((2-

(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoico è stato sintetizzato dal metil 3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoato (348 mg, 0,66 mmol) e 1M di LiOH (3,3 mL, 3,3 mmol) in THF (3,3 mL). Resa (338 mg, 99%).

[1116] UPLC/ELSD: RT = 2,29 min. MS (ES): m/z (MH^+) 512 per $C_{32}H_{66}N_2O_2$

5 Fase 7: **3-(Dinonilammino)-1-(4-(3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)propan-1-one**

[1117]



Formula chimica: $C_{57}H_{115}N_5O_2$

Peso molecolare: 902.58

10 [1118] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 3-(dinilammino)-1-(4-(3-((2-(dinilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)propan-1-one è stato sintetizzato da 3-(dinonilammino)-1-(piperazin-1-il)propan-1-one (298 mg, 0,73 mmol), acido 3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoico (338 mg, 0,68 mmol), iPr_2EtN (254 μ L, 1,46 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 1,18 mL, 1,98 mmol) in THF (10 mL). Resa (218 mg, 37%).

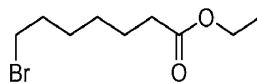
15 [1119] UPLC/ELSD: RT = 2,89 min. MS (ES): m/z (MH^+) 903 per $C_{57}H_{115}N_5O_2$

[1120] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,65 (br, m, 4H); 3,50 (br, m, 4H); 2,82 (br, m, 4H); 2,66-2,30 (br, m, 18H); 1,61-1,02 (br, m, 70H); 0,90 (t, 15H).

BC: Composto 53: Etil 7-((2-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)eptanoato

20 Fase 1: Etil 7-bromoeptanoato

[1121]

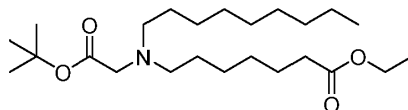


[1122] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 15, l'etil 7-bromoeptanoato è stato sintetizzato da acido 7-bromoeptanoico (1,0 g, 4,8 mmol), etanolo (5,6 mL, 96 mmol) e H₂SO₄ (0,25 mL, 4,8 mmol) in THF (6 mL). Resa (911 mg, 80%).

[1123] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,15 (q, 2H); 3,42 (t, 2H); 2,33 (t, 2H); 1,87 (m, 2H); 1,66 (m, 2H); 1,57-1,14 (br. m, 7H).

Fase 2: Etil 7-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)eptanoato

[1124]



Formula chimica: C₂₄H₄₇NO₄

Peso molecolare: 413.64

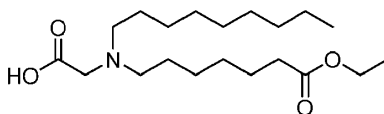
[1125] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 44, l'etil 7-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)eptanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil nonilglicinato (250 mg, 0,97 mmol), etil 7-bromoeptanoato (253 mg, 1,07 mmol), K₂CO₃ (270 mg, 1,94 mmol) e KI (16 mg, 0,10 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (298 mg, 74%).

[1126] UPLC/ELSD: RT = 1,60 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 414,68 per C₂₄H₄₇NO₄

[1127] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,14 (q, 2H); 3,23 (s, 2H); 2,57 (t, 4H); 2,31 (t, 2H); 1,74-1,12 (br. m, 34H); 0,90 (t, 3H).

Fase 3: *N*-(7-etossi-7-ossoeptil)-*N*-nonilglicina

[1128]



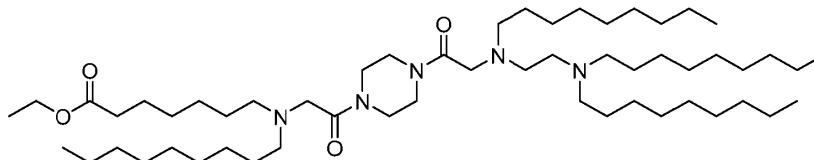
[1129] Allo stesso modo della Fase 4 per il composto 44, la *N*-(7-etossi-7-ossoeptil)-*N*-nonilglicina è stata sintetizzata dall'etil 7-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)eptanoato (298 mg, 0,72 mmol) e TFA (2,8 mL, 36 mmol) in DCM (3 mL). Resa (244 mg, 95%).

[1130] UPLC/ELSD: RT = 1,07 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 358,50 per C₂₀H₃₉NO₄

[1131] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,15 (q, 2H); 3,46 (br, 2H); 3,01 (br, 4H); 2,31 (t, 2H); 1,86-1,10 (br. m, 25H); 0,91 (t, 3H).

Fase 4: Etil 7-((2-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)eptanoato

5 [1132]



Formula chimica: C₅₅H₁₀₉N₅O₄

Peso molecolare: 904.51

[1133] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, etil 7-((2-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetile)(nonil)ammino)eptanoato è stato sintetizzato da *N*-(7-etossi-7-ossoeptile)-*N*-nonilglicina (111 mg, 0,31 mmol), 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (160 mg, 0,28 mmol), iPr₂EtN (109 μL, 0,62 mmol) e T3P (soluzione al 50% di EtOAc, 0,51 mL, 0,81 mmol) in THF (10 mL). Resa (70 mg, 27%).

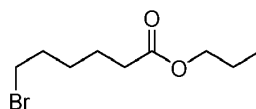
[1134] UPLC/ELSD: RT = 2,88 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 905,33 per C₅₅H₁₀₉N₅O₄

15 [1135] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,00 (q, 2H); 3,65-3,34 (br. m, 8H); 3,19 (s, 2H); 3,13 (s, 2H); 2,50-2,10 (br. m, 16H); 1,65-0,90 (br. m, 67H); 0,75 (t, 12H).

BD: Composto 54: Propil 6-((2-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)esanoato

Fase 1: Propil 6-bromoesanoato

[1136]



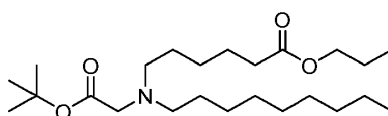
20

[1137] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 15, il propil 6-bromoesanoato è stato sintetizzato da acido 6-bromoesanoico (1,0 g, 5,1 mmol), 1-propanolo (1,5 g, 26 mmol) e H₂SO₄ (0,27 mL, 5,1 mmol) in THF (5 mL). Resa (1,14 g, 94%).

[1138] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,05 (t, 2H); 3,43 (t, 2H); 2,34 (t, 2H); 1,90 (m, 2H); 1,68 (m, 4H); 1,50 (m, 2H); 0,96 (t, 3H).

Fase 2: Propil 6-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)esanoato

[1139]



Formula chimica: C₂₄H₄₇NO₄

Peso molecolare: 413.64

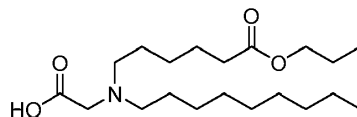
[1140] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 44, il propil 6-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)esanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil nonilglicinato (250 mg, 0,97 mmol), propil 6-bromoesanoato (253 mg, 1,07 mmol), K₂CO₃ (270 mg, 1,94 mmol) e KI (16 mg, 0,10 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (258 mg, 64%).

[1141] UPLC/ELSD: RT = 1,62 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 414,59 per C₂₄H₄₇NO₄

[1142] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,05 (t, 2H); 3,23 (s, 2H); 2,58 (br. m, 4H); 2,33 (t, 2H); 1,75-1,15 (br. m, 31H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: *N*-nonil-*N*-(6-osso-6-propossiesil)glicina

[1143]



Formula chimica: C₂₀H₃₉NO₄

Peso molecolare: 357.54

[1144] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, la *N*-nonil-*N*-(6-osso-6-propossiesil)glicina è stata sintetizzata dalla propil 6-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetile)

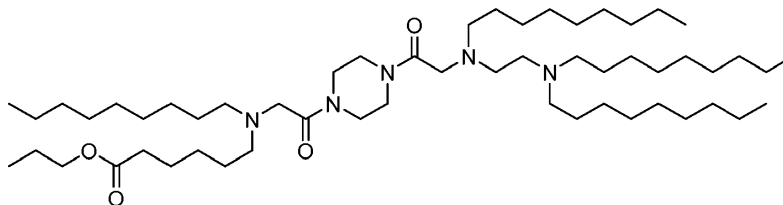
(nonil)ammino)esanoato (258 mg, 0,62 mmol) e TFA (2,4 mL, 31 mmol) in DCM (3 mL). Resa (223 mg, 99%).

[1145] UPLC/ELSD: RT = 1,13 min. MS (ES): m/z (MH^+) 358,50 per $C_{20}H_{39}NO_4$

[1146] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,09 (t, 2H); 3,34 (s, 2H); 2,87 (br. m, 4H); 2,36 (t, 2H); 1,77-1,10 (br. m, 22H); 0,92 (m, 6H).

Fase 4: Propil 6-((2-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)esanoato

[1147]



Formula chimica: $C_{55}H_{109}N_5O_4$

Peso molecolare: 904.51

[1148] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, propil 6-((2-(4-(N(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)esanoato è stato sintetizzato da N-nonil-N-(6-osso-6-(propossiesil)glicina (111 mg, 0,31 mmol), 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil) ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (160 mg, 0,28 mmol), iPr_2EtN (109 μ L, 0,62 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 0,51 mL, 0,81 mmol) in THF (10 mL). Resa (72 mg, 28%).

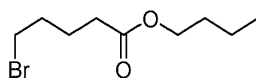
[1149] UPLC/ELSD: RT = 2,91 min. MS (ES): m/z (MH^+) 905,33 per $C_{55}H_{109}N_5O_4$

[1150] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,09 (t, 2H); 3,78-3,46 (br. m, 8H); 3,34 (s, 2H); 3,28 (s, 2H); 2,68-2,24 (br. m, 16H); 1,85-1,10 (br. m, 64H); 0,92 (m, 15H).

BE: Composto 55: Butil 5-((2-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)pentanoato

Fase 1: Butil 5-bromopentanoato

[1151]



Formula chimica: $C_9H_{17}BrO_2$

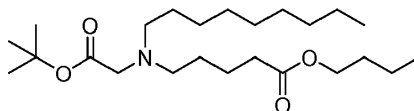
Peso molecolare: 237.14

[1152] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 15, il butil 5-bromopentanoato è stato sintetizzato da acido 5-bromopentanoico (1,47 g, 8,1 mmol), 1-butanolo (0,50 g, 6,8 mmol) e
5 H_2SO_4 (0,36 mL, 6,8 mmol) in THF (7 mL). Resa (1,42 g, 0,89%).

[1153] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,10 (t, 2H); 4,34 (t, 2H); 2,36 (t, 2H); 1,93 (m, 2H); 1,80 (m, 2H); 1,62 (m, 2H); 1,40 (m, 2H); 0,96 (t, 3H).

Fase 2: Butil 5-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)pentanoato

[1154]



Formula chimica: $C_{24}H_{47}NO_4$

Peso molecolare: 413.64

10

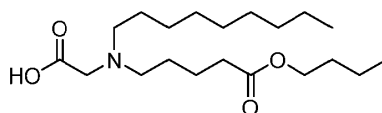
[1155] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 44, il butil 5-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)pentanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil nonilglicinato (250 mg, 0,97 mmol), butil 5-bromopentanoato (253 mg, 1,07 mmol), K_2CO_3 (270 mg, 1,94 mmol) e KI (16 mg, 0,10 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (284 mg, 71%).

15 [1156] UPLC/ELSD: RT = 1,67 min. MS (ES): m/z (MH^+) 414,59 per $C_{24}H_{47}NO_4$

[1157] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,09 (t, 2H); 3,23 (s, 2H); 2,58 (br. m, 4H); 2,34 (t, 2H); 1,74-1,20 (br. m, 31H); 0,93 (m, 6H).

Fase 3: *N*-(5-butossi-5-ossopentil)-*N*-nonilglicina

[1158]



Formula chimica: $C_{20}H_{39}NO_4$

Peso molecolare: 357.54

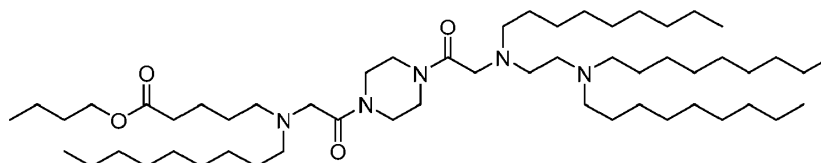
[1159] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, la *N*-(5-butossi-5-ossopentil)-*N*-nonilglicina è stata sintetizzata dal butil 5-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetile)(nonilammino)pentanoato (284 mg, 0,69 mmol) e TFA (2,6 mL, 34 mmol) in DCM (3 mL). Resa (245 mg, 99%).

[1160] UPLC/ELSD: RT = 1,09 min. MS (ES): m/z (MH^+) 358,50 per $C_{20}H_{39}NO_4$

[1161] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,05 (t, 2H); 3,48 (s, 2H); 3,03 (br. m, 4H); 2,34 (t, 2H); 1,85-1,15 (br. m, 22H); 0,93 (m, 6H).

Fase 4: Butil 5-((2-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonilammino)pentanoato

[1162]



[1163] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, butil 5-((2-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetile)(nonilammino)pentanoato è stato sintetizzato da *N*-(5-butossi-5-ossopentil)-*N*-Nonilglicina (111 mg, 0,31 mmol), 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonilammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (160 mg, 0,28 mmol), iPr_2EtN (109 μ L, 0,62 mmol) e T3P (soluzione al 50% di EtOAc, 0,51 mL, 0,81 mmol) in THF (10 mL). Resa (92 mg, 36%).

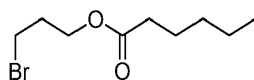
[1164] UPLC/ELSD: RT = 2,88 min. MS (ES): m/z (MH^+) 905,33 per $C_{55}H_{109}N_5O_4$

[1165] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,90 (t, 2H); 3,65-3,35 (br. m, 8H); 3,19 (t, 2H); 3,13 (s, 2H); 2,52-2,06 (br. m, 16H); 1,65-0,95 (br. m, 64H); 0,77 (m, 15H).

**BF: Composto 56: 3-((2-(4-(N-(2-(Dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-
ossoetil)(nonil)ammino)propil esanoato**

Fase 1: 3-Bromopropil esanoato

[1166]



Formula chimica: C₉H₁₇BrO₂

Peso molecolare: 237.14

5

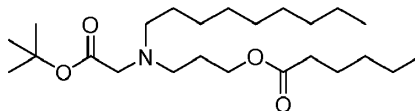
[1167] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 15, il 3-bromopropil esanoato è stato sintetizzato da 3-bromopropan-1-olo (0,87 mL, 9,6 mmol), acido esanoico (1,0 mL, 8,0 mmol) e H₂SO₄ (1,0 mL, 8,0 mmol) in THF (10 mL). Resa (823 mg, 44%).

[1168] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,23 (t, 2H); 3,49 (t, 2H); 2,33 (t, 2H); 2,20 (m, 2H); 1,65 (m, 2H); 1,34 (m, 4H); 0,91 (t, 3H).

10

Fase 2: 3-((2-(*terz*-Butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)propil esanoato

[1169]



[1170] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 44, il 3-((2-(*terz*-butossi)-2-
ossoetil)(nonil)ammino)propil esanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil nonilglicinato (250 mg, 0,97 mmol), 3-bromopropil esanoato (253 mg, 1,07 mmol), K₂CO₃ (270 mg, 1,94 mmol) e KI (16 mg, 0,10 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (335 mg, 83%).

15

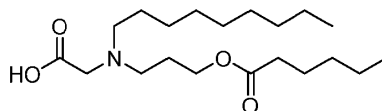
[1171] UPLC/ELSD: RT = 1,78 min (ES): m/z (MH⁺) 414,59 per C₂₄H₄₇NO₄.

[1172] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,14 (t, 2H); 3,23 (s, 2H); 2,68 (t, 2H); 2,58 (t, 2H); 2,30 (t, 2H); 1,79 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,55-1,20 (br, m, 27H); 0,91 (m, 6H).

20

Fase 3: N-(3-(esanoilossi)propil)-N-nonilglicina

[1173]



Formula chimica: $C_{20}H_{39}NO_4$

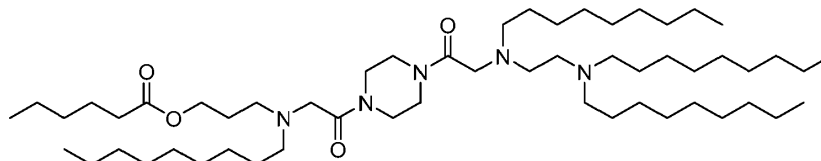
Peso molecolare: 357.54

[1174] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, *N*-(3-(esanoilossi)propil)-*N*-nonilglicina è stata sintetizzata da 3-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)propil esanoato (335 mg, 0,81 mmol) e TFA (3,1 mL, 40 mmol) in DCM (4 mL). Resa (284 mg, 98%).

5 [1175] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 4,11 (t, 2H); 3,17 (s, 2H); 2,68 (br. m, 4H); 2,30 (t, 2H); 1,87 (m, 2H); 1,63 (m, 2H); 1,48 (m, 2H); 1,28 (br. m, 16H); 0,91 (m, 6H).

Fase 4: 3-((2-(4-(*N*-(2-(Dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)propil esanoato

[1176]



10

[1177] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, 3-((2-(4-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)(nonil)ammino)propil esanoato è stato sintetizzato da *N*-(3-(esanoilossi)propil)-*N*-nonilglicina (111 mg, 0,31 mmol), 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (160 mg, 0,28 mmol), $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ (109 μL , 0,62 mmol) e T3P (soluzione al 50% di EtOAc, 0,51 mL, 0,81 mmol) in THF (10 mL). Resa (55 mg, 21%).

15

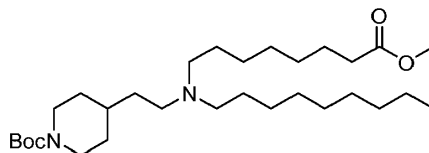
[1178] UPLC/ELSD: RT = 2,94 min. MS (ES): m/z (MH^+) 905,25 per $C_{55}H_{109}N_5O_4$

[1179] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : ppm 4,01 (t, 2H); 3,77-3,43 (br, m, 8H), 3,23 (m, 4H); 2,64-2,15 (m, 16H); 1,70 (m, 2H); 1,54 (m, 2H); 1,50-0,96 (br, m, 60H); 0,81 (m, 15H).

20 **BG: Composto 57: Metil 8-((2-(1-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)ottanoato**

Fase 1: *terz*-butil 4-(2-((8-metossi-8-ossottil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1180]



Formula chimica: $C_{30}H_{58}N_2O_4$

Peso molecolare: 510.80

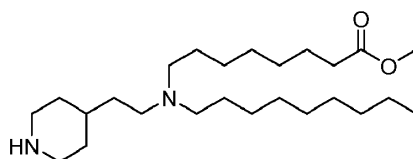
[1181] A una miscela di *terz*-butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (239 mg, 0,67 mmol) e metil 8-bromottanoato (192 mg, 0,81 mmol) in MeCN (10 mL) sono stati aggiunti K_2CO_3 (188 mg, 1,35 mmol) e KI (11 mg, 0,07 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 12 ore. La sospensione è stata raffreddata a TA e filtrata su un tampone di celite risciacquando con EtOAc e concentrata *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-80% EtOAc/esani) ha fornito *terz*-butil 4-(2-((8-metossi-8-ossottil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (241 mg, 70%).

[1182] UPLC/ELSD: RT = 1,87 min. MS (ES): m/z (MH^+) 512,76 per $C_{30}H_{58}N_2O_4$

[1183] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,07 (br, m, 2H); 3,69 (s, 3H); 2,70 (m, 2H); 2,37 (br, m, 8H); 1,75-1,00 (br, m, 40H); 0,90 (t, 3H).

Fase 2: Metil 8-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)ottanoato

15 [1184]



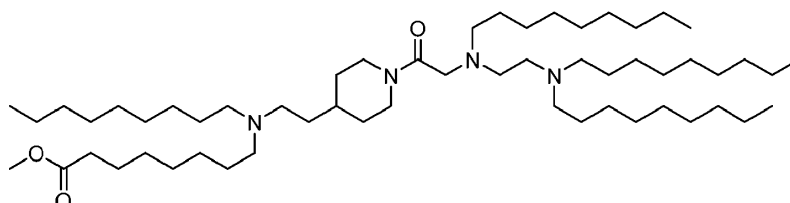
[1185] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il metil 8-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-((8-metossi)-8-ossottil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (241 mg, 0,47 mmol) e TFA (1,8 mL, 24 mmol) in DCM (2 mL). Resa (193 mg, 99%).

[1186] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69 (s, 3H); 3,08 (m, 2H); 2,60 (m, 2H); 2,49-2,24

(br, m, 8H); 2,06 (br, 1H); 1,78-1,02 (br, m, 31H); 0,90 (t, 3H).

Fase 3: Metil 8-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)ottanoato

[1187]



5

[1188] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, metil 8-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato da metil 8-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)ottanoato (141 mg, 0,34 mmol), N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicina (188 mg, 0,38 mmol), *i*Pr₂EtN (132 μ L, 0,76 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 614 μ L, 1,03 mmol) in THF (10 mL). Resa (70 mg, 23%).

10

[1189] UPLC/ELSD: RT = 2,97 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 890,24 per C₅₆H₁₁₂N₄O₃

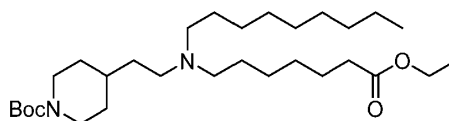
[1190] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 4,64-4,09 (br, m, 2H); 3,69 (s, 3H); 3,42-2,83 (br, m, 3H); 2,69-2,24 (br, m, 19H); 1,81-0,99 (br, m, 73H); 0,90 (t, 12H).

BH: Composto 58: Etil 7-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)eptanoato

15

Fase 1: *tert*-butil 4-(2-((7-etossi-7-ossoeptil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1191]



[1192] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *tert*-butil 4-(2-((7-etossi-7-ossoeptil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *tert*-butile 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (239 mg, 0,67 mmol), etil 7-bromoeptanoato (192 mg, 0,81 mmol), K₂CO₃ (188 mg, 1,35 mmol) e KI (11 mg, 0,07 mmol) in MeCN (10 mL).

20

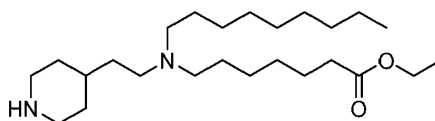
Resa (247 mg, 72%).

[1193] UPLC/ELSD: RT = 1,91 min. MS (ES): m/z (MH^+) 511,62 per $C_{30}H_{58}N_2O_4$

[1194] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,12 (br, m, 4H); 2,80-2,15 (br. m, 10H); 1,75-1,00 (br. m, 41H); 0,90 (t, 3H).

5 **Fase 2: Etil 7-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)eptanoato**

[1195]



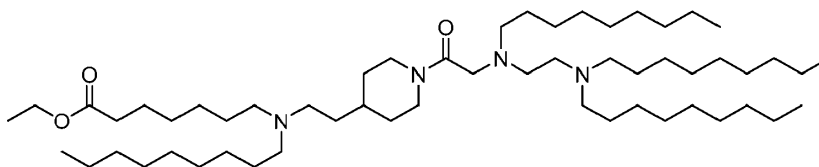
[1196] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, l'etil 7-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)eptanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-((7-etossi) -7-
10 osseptil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (247 mg, 0,48 mmol) e TFA (1,9 mL, 24 mmol) in DCM (2 mL). Resa (194 mg, 98%).

[1197] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,14 (t, 2H); 3,08 (m, 2H); 2,60 (m, 2H); 2,52-2,24 (br, m, 8H); 2,12 (br, 1H); 1,77-1,05 (br, m, 32H); 0,90 (t, 3H).

Etil 7-((2-(1-(N-(2-(dionilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)eptanoato

15

[1198]



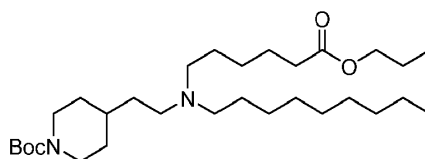
[1199] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, etil 7-((2-(1-(N-(2-(dionilammino)etil) -N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)eptanoato è stato
20 sintetizzato da metil 7-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)eptanoato (141 mg, 0,34 mmol), N-(2-(dionilammino)etil)-N-nonilglicina (188 mg, 0,38 mmol), iPr_2EtN (132 μL , 0,76 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 614 μL , 1,03 mmol) in THF (10 mL). Resa (42 mg, 14%).
UPLC/ELSD: RT = 3,00 min. MS (ES): m/z (MH^+) 890,32 per $C_{56}H_{112}N_4O_3$

[1200] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,55-3,95 (br. m, 4H); 3,38-2,72 (br. m, 4H); 2,66-2,10 (m, 18H); 1,72-0,91 (br. m, 74H); 0,81 (t, 12H).

BI: Composto 59: Propil 6-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)esanoato

5 **Fase 1: *terz*-Butil 4-(2-(nonil(6-osso-6-propossiesil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato**

[1201]



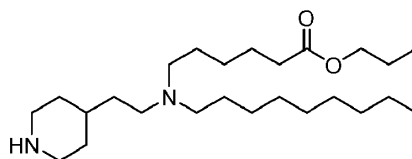
[1202] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *terz*-butil 4-(2-(nonil(6-osso-6-propossiesil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (239 mg, 0,67 mmol), propil 6-bromoesanoato (192 mg, 0,81 mmol), K₂CO₃ (188 mg, 1,35 mmol) e KI (11 mg, 0,07 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (240 mg, 70%).

[1203] UPLC/ELSD: RT = 1,93 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 511,78 per C₃₀H₅₈N₂O₄

[1204] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,05 (br. m, 4H); 2,80-2,20 (br. m, 10H); 1,85-1,04 (br. m, 38H); 0,92 (t, 6H).

Fase 2: Propil 6-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)esanoato

[1205]

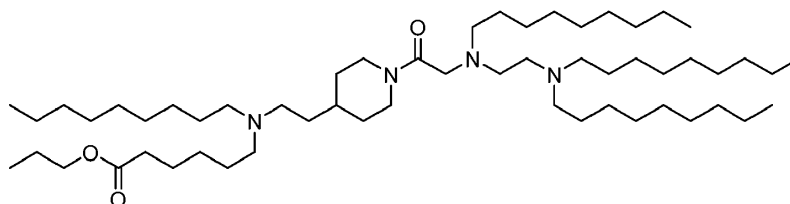


[1206] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il propil 6-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)esanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(nonil(6-)osso-6-propossiesil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (240 mg, 0,47 mmol) e TFA (1,8 mL, 23 mmol) in DCM (2 mL). Resa (183 mg, 95%).

[1207] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,04 (t, 2H); 3,08 (m, 2H); 2,60 (m, 2H); 2,35 (br, m, 8H); 1,95 (br, 1H); 1,75-1,00 (br, m, 29H); 0,92 (m, 6H).

Fase 3: Propil 6-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)esanoato

5 [1208]



[1209] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, propil 6-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil) -N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)esanoato è stato sintetizzato da propil 6-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)esanoato (141 mg, 0,34 mmol), N-
10 (2-(dinonilammino)etil) -N-nonilglicil (188 mg, 0,38 mmol), iPr₂EtN (132 μL, 0,76 mmol) e T3P (soluzione EtOAc al 50%, 614 μL, 1,03 mmol) in THF (10 mL). Resa (67 mg, 22%).

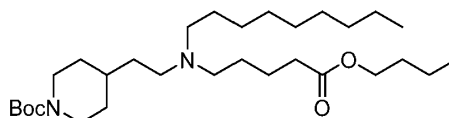
[1210] UPLC/ELSD: RT = 3,02 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 890,32 per C₅₆H₁₁₂N₄O₃

[1211] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,65-4,13 (br, m, 2H); 4,05 (t, 2H); 3,50-2,81 (br, m, 4H); 2,69-2,18 (br, m, 18H); 1,98-1,02 (br, m, 71H); 0,92 (br, m, 15H).

15 **BJ: Composto 60: Butil 5-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)pentanoato**

Fase 1: *terz*-butil 4-(2-((5-butossi-5-ossopentil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1212]



20

[1213] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *terz*-butil 4-(2-((5-butossi-5-ossopentil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butile 4-(2-

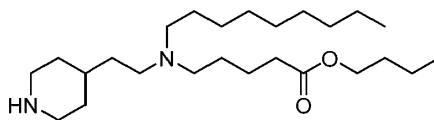
(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (239 mg, 0,67 mmol), butil 5-bromoopentanoato (192 mg, 0,81 mmol), K₂CO₃ (188 mg, 1,35 mmol) e KI (11 mg, 0,07 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (211 mg, 61%).

[1214] UPLC/ELSD: RT = 1,95 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 511,78 per C₃₀H₅₈N₂O₄

- 5 [1215] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,09 (br. m, 4H); 2,70 (br. m, 2H); 2,38 (br. m, 8H); 1,73-1,02(br. m, 38H); 0,93 (br. m, 6H).

Fase 2: Butil 5-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)pentanoato

[1216]



Formula chimica: C₂₅H₅₀N₂O₂

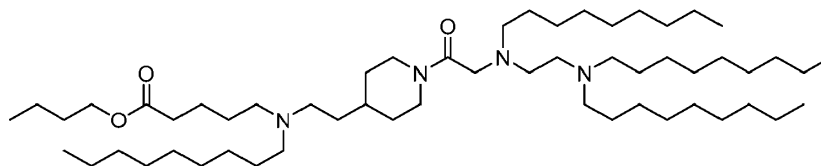
Peso molecolare: 410.69

- 10 [1217] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, l'etil 5-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)pentanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-((5-butossi)-5-ossopentil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (211 mg, 0,41 mmol) e TFA (1,6 mL, 21 mmol) in DCM (2 mL). Resa (169 mg, 99%).

- 15 [1218] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,09 (t, 2H); 3,07 (m, 2H); 2,60 (m, 2H); 2,37 (br. m, 8H); 1,83 (br, 1H); 1,76-1,04 (br, m, 29H); 0,93 (br. m, 6H).

Fase 3: Butil 5-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)pentanoato

[1219]



- 20 [1220] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, butil 5-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil) -N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)pentanoato è stato

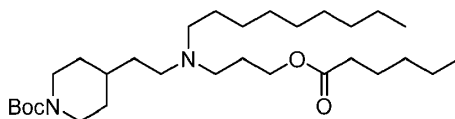
sintetizzato da butil 5-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)pentanoato (141 mg, 0,34 mmol), *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (188 mg, 0,38 mmol), *i*Pr₂EtN (132 μL, 0,76 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 614 μL, 1,03 mmol) in THF (10 mL). Resa (46 mg, 15%). UPLC/ELSD: RT = 3,03 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 890,32 per C₅₆H₁₁₂N₄O₃

5 [1221] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,62-4,13 (br, m, 2H); 4,09 (t, 2H); 3,41-2,84 (br, m, 4H); 2,72-2,25 (br, m, 18H); 1,82-1,02 (br, m, 71H); 0,91 (br, m, 15H).

BK: Composto 61: 3-((2-(1-(*N*-(2-(Dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)propil esanoato

Fase 1: *tert*-butil 4-(2-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato

10 [1222]



Formula chimica: C₃₀H₅₈N₂O₄

Peso molecolare: 510.80

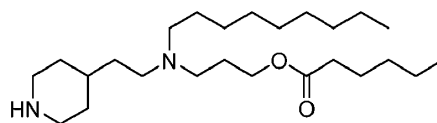
[1223] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *tert*-butil 4-(2-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *tert*-butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (239 mg, 0,67 mmol), 3-bromopropil esanoato (192 mg, 0,81 mmol), K₂CO₃ (188 mg, 1,35 mmol) e KI (11 mg, 0,07 mmol) in MeCN (10 mL). Resa (195 mg, 57%).

[1224] UPLC/ELSD: RT = 1,97 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 511,86 per C₃₀H₅₈N₂O₄

[1225] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,11 (br, m, 4H); 2,69 (m, 2H); 2,56-2,22 (br, m, 8H); 1,76 (m, 2H); 1,65 (m, 4H); 1,55-1,05 (br, m, 32H); 0,91 (m, 6H).

20 **Fase 2: 3-(Nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)propil esanoato**

[1226]

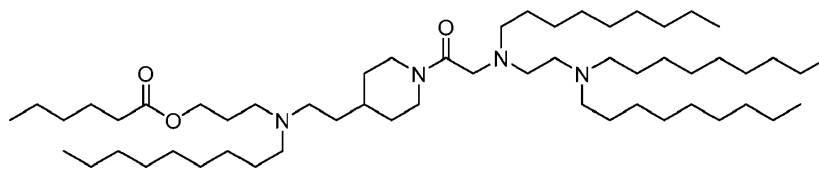


[1227] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il 3-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)propil esanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (195 mg, 0,38 mmol) e TFA (1,5 mL, 19 mmol) in DCM (2 mL). Resa (149 mg, 95%).

[1228] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,12 (t, 2H); 3,08 (m, 2H); 2,70-2,22 (br, m, 10H); 2,07 (br, 1H); 1,70 (br, m, 6H); 1,48-1,00 (br, m, 23H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: 3-((2-(1-(N-(2-(Dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)propil esanoato

10 [1229]



Formula chimica: C₅₆H₁₁₂N₄O₃

Peso molecolare: 889.54

[1230] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 3-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)propilesanoato è stato sintetizzato da 3-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)propilesanoato (141 mg, 0,34 mmol), N-(2-(dinilammino)etil)-N-nonilglicina (188 mg, 0,38 mmol), iPr₂EtN (132 μL, 0,76 mmol) e T3P (soluzione EtOAc al 50%, 614 μL, 1,03 mmol) in THF (10 mL). Resa (64 mg, 21%).

[1231] UPLC/ELSD: RT = 3,02 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 890,41 per C₅₆H₁₁₂N₄O₃

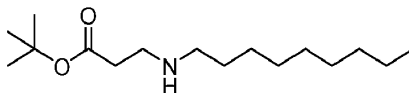
[1232] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,67 (br. m, 4H); 3,42-2,81 (br. m, 3H); 2,73-2,23 (br. m, 19H); 1,87-1,00 (br. m, 71H); 0,90 (t, 15H).

20 **BL: Composto 62: Pentil 4-((3-(4-(3-((2-(dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)-3-**

ossopropil)(nonil)ammino)butanoato

Fase 1: *terz*-butile 3-(nonilammino)propanoato

[1233]

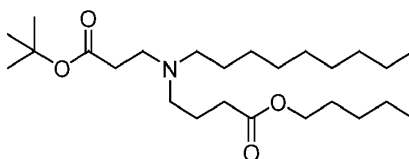


5 [1234] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 44, il *terz*-butil 3-(nonilammino)propanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-amminopropanoato cloridrato (2,8 g, 15 mmol), 1-bromononano (3,2 g, 15 mmol), K₂CO₃ (4,3 g, 31 mmol) e KI (256 mg, 1,54 mmol) in MeCN (200 mL). Resa (1,74 g, 42%).

[1235] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 2,86 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,46 (t, 2H); 1,65 (br, 10 1H); 1,47 (br, m, 11H); 1,29 (br, m, 12H); 0,90 (t, 3H).

Fase 2: Pentil 4-((3-(*terz*-butossi)-3-ossopropil)(nonil)ammino)butanoato

[1236]

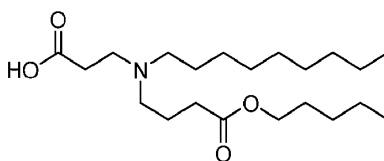


15 [1237] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 44, il pentil 4-((3-(*terz*-butossi)-3-ossopropil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(nonilammino)propanoato (750 mg, 2,76 mmol), pentil 4-bromobutanoato (786 mg, 3,31 mmol), K₂CO₃ (764 mg, 5,52 mmol) e KI (46 mg, 0,28 mmol) in MeCN (30 mL). Resa (934 mg, 79%). UPLC/ELSD: RT = 1,82 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 428,62 per C₂₅H₄₉NO₄

[1238] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 2,74 (t, 2H); 2,50-2,28 (br, m, 8H); 20 1,76 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,50-1,14 (br, m, 27H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: acido 3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propanoico

[1239]



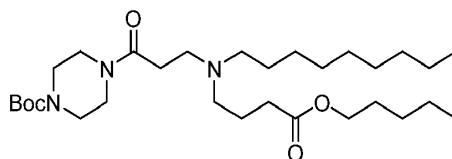
[1240] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, l'acido 3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propanoico è stato sintetizzato dal pentile 4-((3-(*terz*-butossi)-3-ossopropil)(nonil)ammino)butanoato (934 mg, 2,18 mmol) e TFA (8,4 mL, 109 mmol) in DCM (10 mL). Resa (793 mg, 98%).

[1241] UPLC/ELSD: RT = 1,23 min. MS (ES): m/z (MH^+) 372,52 per $C_{21}H_{41}NO_4$

[1242] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,10 (t, 2H); 2,88 (t, 2H); 2,70 (br, m, 4H); 2,52 (t, 2H); 2,38 (t, 2H); 1,90 (m, 2H); 1,73-1,49 (br, m, 4H); 1,47-1,17 (br, m, 16H); 0,92 (m, 6H).

Fase 4: *terz*-butil 4-(3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propanoil)piperazin-1-carbossilato

[1243]

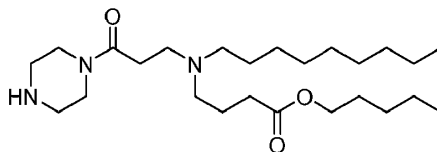


[1244] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 11, il *terz*-butil 4-(3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propanoil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato da acido 3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propanoico (793 mg, 2,13 mmol), 1-boc-piperazina (477 mg, 2,56 mmol), iPr_2EtN (0,82 mL, 4,7 mmol), e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 3,8 mL, 6,4 mmol). Resa (1,15 g, 99%).

[1245] UPLC/ELSD: RT = 1,86 min. MS (ES): m/z (MH^+) 540,65 per $C_{30}H_{57}N_3O_5$

Fase 5: Pentil 4-(nonil(3-osso-3-(piperazin-1-il)propil)ammino)butanoato

[1246]



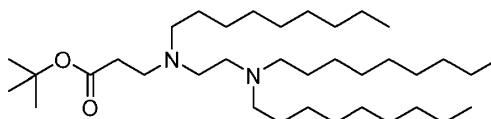
[1247] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, il pentil 4-(nonil(3-osso-3-(piperazin-1-il)propil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propanoil)piperazin-1-carbossilato (1,15 g, 2,13 mmol) e TFA (8,2 mL, 106 mmol) in DCM (10 mL). Resa (901 mg, 96%).

5 [1248] UPLC/ELSD: RT = 0,75 min. MS (ES): m/z (MH^+) 440,47 per $C_{25}H_{49}N_3O_3$

[1249] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,70-3,40 (br, m, 4H); 2,88 (br, m, 6H); 2,57 (br, m, 6H); 2,36 (t, 2H); 1,83 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,49 (m, 2H); 1,41-1,18 (br, m, 17H); 0,91 (m, 6H).

Fase 6: *terz*-butil 3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoato

10 [1250]



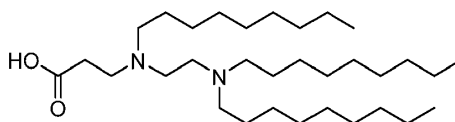
[1251] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 46, il *terz*-butil 3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(nonilammino)propanoato (1,13 mg, 4,14 mol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (1,65 g, 4,97 mmol), K_2CO_3 (1,15 g, 8,33 mmol) e KI (138 mg, 0,83 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (1,41 g, 60%).

15

[1252] UPLC/ELSD: RT = 2,90 min. MS (ES): m/z (MH^+) 567,79 per $C_{36}H_{74}N_2O_2$ 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 2,78 (t, 2H); 2,69-2,29 (br, m, 12H); 1,55-1,15 (br, m, 51H); 0,90 (t, 9H).

20 **Fase 7: Acido 3-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoico**

[1253]



[1254] Nello stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, l'acido 3-((2-

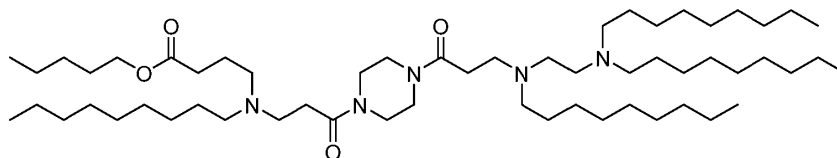
(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoico è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil) ammino) propanoato (1,41 g, 2,49 mmol) e TFA (9,6 mL, 124 mmol) in DCM (10 mL). Resa (924 mg, 73%).

[1255] UPLC/ELSD: RT = 2,26 min. MS (ES): m/z (MH^+) 511,78 per $C_{32}H_{66}N_2O_2$

5 [1256] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 2,76 (br, m, 6H); 2,61 (br, m, 6H); 2,47 (t, 2H); 1,52 (br, m, 6H); 1,40-1,10 (br, m, 36H); 0,90 (t, 9H).

Fase 8: Pentil 4-((3-(4-(3-((2-(dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)-3-ossopropil)(nonil)ammino)butanoato

[1257]



10

[1258] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, pentil 4-((3-(4-(3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)-

Il

3-

ossopropil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal pentile 4-(nonil(3-osso-3-(piperazin-1-il)propil)ammino)butanoato (268 mg, 0,61 mmol), 3-((2-

15 (dinonilammino)etil)(nonil)ammino)acido propanoico (343 mg, 0,67 mmol), iPr_2EtN (234 μL , 1,34 mmol) e T3P (soluzione al 50% di EtOAc, 1,09 mL, 1,83 mmol) in THF (20 mL). Resa (243 mg, 43%).

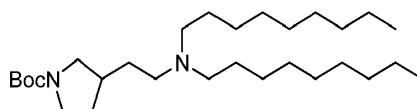
[1259] UPLC/ELSD: RT = 2,26 min. MS (ES): m/z (MH^+) 933,10 per $C_{57}H_{113}N_5O_4$ 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,07 (t, 2H); 3,72-3,40 (br, m, 8H); 2,81 (m, 4H); 2,66-2,28 (br, m, 20H); 1,77 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,54-1,08 (br, m, 60H); 0,90 (t, 15H).

20

BM: Composto 69: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-(2-(dinonilammino)etil)pirrolidin-1-il)etan-1-one

Fase 1: *terz*-butil 3-(2-(dinonilammino)etil)pirrolidin-1-carbossilato

[1260]



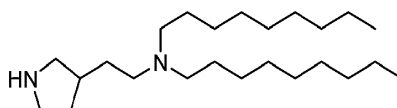
[1261] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 3-(2-(dionilammino)etil)pirrolidin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(2-amminoetil)pirrolidin-1-carbossilato (1,25 g, 5,47 mmol), 1-bromononano (1,13 g, 5,47 mmol),
5 K₂CO₃ (757 mg, 5,47 mmol) e KI (91 mg, 0,55 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (710 mg, 28%).

[1262] UPLC/ELSD: RT = 2,23 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 467,74 per C₂₉H₅₅N₂O₂

[1263] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,67-3,34 (br. m, 2H); 3,34-2,75 (br. m, 2H); 2,52-1,89 (m, 8H); 1,70-1,03 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

10 Fase 2: *N*-Nonil-*N*-(2-(pirrolidin-3-il)etil)nonan-1-ammina

[1264]



Formula chimica: C₂₄H₅₀N₂

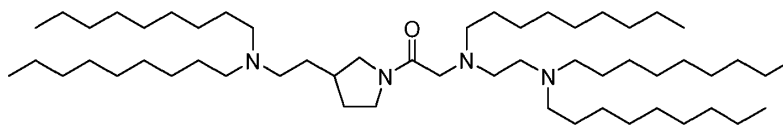
Peso molecolare: 366.68

[1265] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, la *N*-nonil-*N*-(2-(pirrolidin-3-il)etil)nonan-1-ammina è stata sintetizzata dal *terz*-butil 3-(2-(dionilammino)etil)pirrolidina-1-carbossilato (710 mg, 1,52 mmol) e TFA (5,8 mL, 76 mmol) in DCM (6 mL). Resa (541 mg,
15 97%).

[1266] UPLC/ELSD: RT = 1,23 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 367,70 per C₂₄H₅₀N₂ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,32-1,90 (br, m, 11H); 1,66-1,14 (br, m, 33H); 0,90 (t, 6H).

20 Fase 3: 2-((2-(Dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-(2-(dionilammino)etil)pirrolidin-1-il)etan-1-one

[1267]



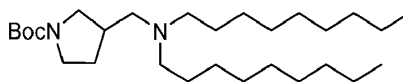
[1268] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-(2-(dionilammino)etil)pirrolidin-1-il) l'etan-1-one è stato sintetizzato da *N*-nonil-*N*-(2-(pirrolidin-3-il)etil)nonan-1-ammina (250 mg, 0,68 mmol), *N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-nonilglicina (308 mg, 0,62 mmol), *i*Pr₂EtN (0,24 mL, 1,4 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 1,1 mL, 1,9 mmol) in THF (10 mL). Resa (100 mg, 19%). UPLC/ELSD: RT = 3,17 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 846,20 per C₅₅H₁₁₂N₄O

[1269] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,82-2,90 (br. m, 6H); 2,74-1,94 (br. m, 16H); 1,83-1,00 (br. m, 75H); 0,90 (t, 15H).

10 **BN: Composto 70: 2-((2-(Dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-((dionilammino)metil)pirrolidin-1-il)etan-1-one**

Fase 1: *terz*-butil 3-((dionilammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato

[1270]



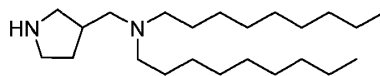
15 [1271] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 3-((dionilammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(amminometil)pirrolidin-1-carbossilato (2,0 g, 10,0 mmol), 1-bromononano (2,07 g, 10,0 mmol), K₂CO₃ (1,39 g, 10,0 mmol) e KI (166 mg, 1,00 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (1,16 g, 26%).

20 [1272] UPLC/ELSD: RT = 2,17 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 453,72 per C₂₉H₅₅N₂O₂

[1273] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,72-2,90 (br. m, 4H); 2,36 (br. m, 6H); 2,04-1,04 (br. m, 40H); 0,90 (t, 6H).

Fase 2: *N*-nonil-*N*-(pirrolidin-3-ilmetil)nonan-1-ammina

[1274]



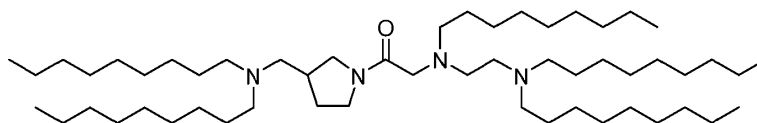
[1275] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, la *N*-nonyl-*N*-(pirrolidin-3-ilmetil)nonan-1-ammina è stata sintetizzata dalla *terz-butil* 3-((dionilammino)metil)pirrolidina-1-carbossilato (1,16 g, 2,56 mmol) e TFA (9,8 mL, 128 mmol) in DCM (10 mL). Resa (900 mg, 99%).

[1276] UPLC/ELSD: RT = 1,17 min. MS (ES): m/z (MH^+) 353,66 per $C_{23}H_{48}N_2$

[1277] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,33-2,23 (br, m, 10H); 1,99 (br, 1H); 1,65-1,00 (br, m, 31H); 0,90 (t, 6H).

10 **Fase 3: 2-((2-(Dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-((dionilammino)metil)pirrolidin-1-il)etan-1-one**

[1278]



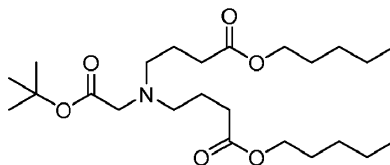
15 [1279] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(dionilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-((dionilammino)metil)pirrolidin-1-il)etan-1-one è stato sintetizzato da *N*-nonyl-*N*-(pirrolidin-3-ilmetil)nonan-1-ammina (200 mg, 0,57 mmol), *N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-nonilglicina (256 mg, 0,52 mmol), iPr_2EtN (0,198 mL, 1,14 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 0,92 mL, 1,56 mmol). Resa (114 mg, 27%). UPLC/ELSD: RT = 3,22 min. MS (ES): m/z (MH^+) 832,26 per $C_{54}H_{110}N_4O$

20 [1280] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,79-2,96 (br. m, 6H); 2,75-2,18 (br. m, 16H); 2,12-1,01 (br. m, 73H); 0,90 (t, 15H).

BO: Composto 72: Dipentil 4,4'-((2-(4-(*N*-(2-(dionilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)azandiil)dibutirrato

Fase 1: Dipentil 4,4'-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)azandiil)dibutirrato

[1281]



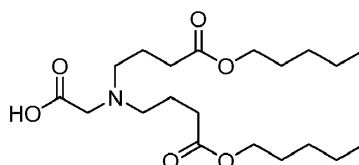
[1282] Ad una miscela di *ter*-butilglicina (200 mg, 1,52 mmol) e pentil 4-bromobutanoato (759 mg, 3,2 mmol) in MeCN (30 mL) è stato aggiunto K₂CO₃ (637 mg, 4,6 mmol) e KI (51 mg, 0,30 mmol) e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 12 ore. La sospensione è stata raffreddata a TA, filtrata su un tampone di celite risciacquando con EtOAc e concentrata sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di EtOAc/esani) ha fornito dipentil 4,4'-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)azandiil)dibutirrato (230 mg, 34%).

[1283] UPLC/ELSD: RT = 1,54 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 444,61 per C₂₄H₄₅NO₆

[1284] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,07 (t, 4H); 3,22 (s, 2H); 2,63 (t, 4H); 2,36 (t, 4H); 1,77 (m, 4H); 1,64 (m, 4H); 1,47 (s, 9H); 1,35 (br, m, 8H); 0,93 (t, 6H).

Fase 2: Bis(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicina

15 [1285]



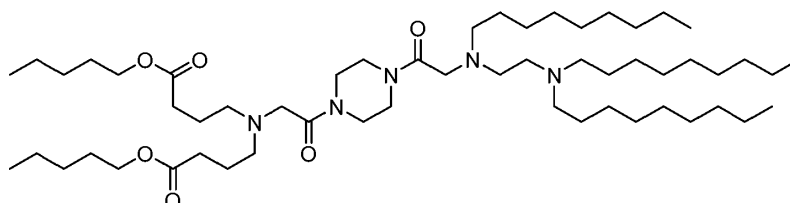
[1286] Allo stesso modo della Fase 4 per il composto 44, la bis(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicina è stata sintetizzata dal dipentil 4,4'-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetile)azandiil)dibutirrato (230 mg, 0,52 mmol) e TFA (2 mL, 26 mmol) in DCM (2 mL). Resa (200 mg, 99%).

[1287] UPLC/ELSD: RT = 0,80 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 388,51 per C₂₀H₃₇NO₆ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,05 (t, 4H); 3,10 (s, 2H); 2,58 (m, 4H); 2,32 (t, 4H); 1,80 (br, m,

4H); 1,63 (br, m, 4H); 1,32 (br, m, 8H); 0,92 (t, 6H).

Fase 3: Dipentil 4,4'-((2-(4-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)azandiil)dibutirrato

[1288]



5

[1289] Allo stesso modo della Fase 7 per il Composto 44, dipentil 4,4'-((2-(4-(N-(2-(dinilammino)etil)-N-nonilglicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)azandiil)dibutirrato è stato sintetizzato dalla bis(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicina (200 mg, 0,52 mmol), 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(piperazin-1-il)etan-1-one (265 mg, 0,47 mmol), iPr_2EtN (180 μL , 1,03 mmol) e T3P (soluzione EtOAc al 50%, 838 μL , 1,41 mmol) in THF (10 mL). Resa (250 mg, 57%).

10

[1290] UPLC/ELSD: RT = 2,85 min. MS (ES): m/z (MH^+) 935,26 per $C_{55}H_{107}N_5O_6$

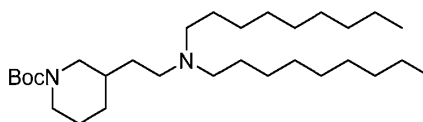
[1291] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 4H); 3,78-3,46 (br, m, 8H); 3,34 (br, m, 4H); 2,72-2,24 (br, m, 18H); 1,78 (m, 4H); 1,64 (m, 4H); 1,50-1,16 (br, m, 50H); 0,91 (m, 15H).

15

[1292] BP: Composto 73: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-(2-(dinonilammino)etil)piperidin-1-il)etan-1-one

Fase 1: *terz*-butil 3-(2-(dinonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1293]



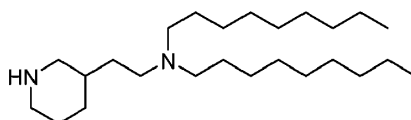
20

[1294] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 3-(2-(dinonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(2-amminoetil)piperidina-1-carbossilato (1,00 g, 4,38 mmol), 1-bromononano (907 mg, 4,38 mmol), K_2CO_3

(610 mg, 4,38 mmol) e KI (73 mg, 0,44 mmol) in MeCN (50 mL). Resa (514 mg, 24%). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,12-2,24 (br, m, 10H); 1,92-1,00 (br, m, 44H); 0,90 (t, 6H).

***N-N* onil-*N*-(2-(piperidin-3-il)etil)nonan-1-ammina**

[1295]



5

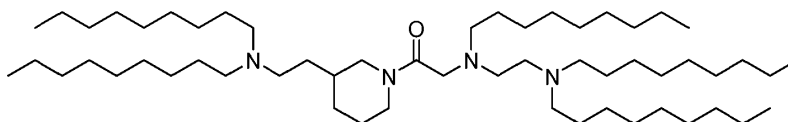
[1296] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, la *N*-nonil-*N*-(2-(piperidin-3-il)etil)nonan-1-ammina è stata sintetizzata dal *terz*-butil 3-(2-(dinonilammino)etil) piperidina-1-carbossilato (514 mg, 1,07 mmol) e TFA (4,1 mL, 53mmol) in DCM (4 mL). Resa (378 mg, 93%).

10 [1297] UPLC/ELSD: RT = 1,27 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 381,62 per C₂₅H₅₂N₂

[1298]H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,12-1,95 (br, m, 11H); 1,93-0,98 (br, m, 35H); 0,90 (t, 6H).

2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-(2-(dinonilammino)etil)piperidin-1-il)etan-1-one

15 [1299]



[1300] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(3-(2-(dinonilammino)etil)piperidin-1-il) l'etan-1-one è stato sintetizzato da *N*-nonil-*N*-(2-(piperidin-3-il)etil)nonan-1-ammina (250 mg, 0,66 mmol), *N*-

20 (2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (297 mg, 0,60 mmol), iPr₂EtN (0,23 mL, 1,3 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 1,06 mL, 1,8 mmol) in THF (10 mL). Resa (136 mg, 27%).

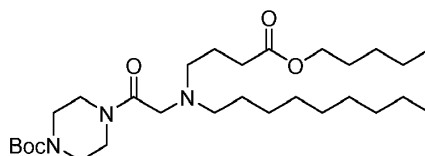
UPLC/ELSD: RT = 3,22 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 860,39 per C₅₆H₁₁₄N₄O

[1301] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,56-4,01 (br. m, 2H); 3,48-2,20 (br. m, 20H); 1,99-

1,00 (br. m, 77H); 0,90 (t. 15H).

BQ: Composto 71: Pentil 4-(nonil(2-(4-(N-nonil-N-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)glicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)ammino)butanoato Fase 1: terz-butile 4-(N-nonil-N-(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicil)plperazina-1-carbossilato

5 [1302]



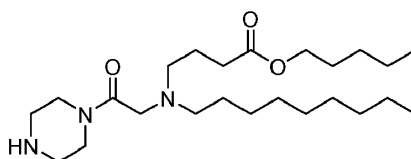
[1303] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 11, il *terz*-butil 4-(*N*-nonil-*N*-(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicil)piperazin-1-carbossilato è stato sintetizzato da *N*-nonil-*N*-(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicina (480 mg, 1,34 mmol), 1-boc-piperazina (275 mg, 1,48 mmol), iPr_2EtN (5,14 μ L, 2,95 mmol) e T3P (soluzione al 50% di EtOAc, 2,40 mL, 4,03 mmol) in THF (15 mL). Resa (700 mg, 99%).

[1304] UPLC/ELSD: RT = 1,90 min. MS (ES): m/z (MH^+) 526,79 per $C_{29}H_{55}N_3O_5$

[1305] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,70-3,10 (br, m, 14H); 2,45 (t, 2H); 2,13 (br, m, 2H); 2,00-1,00 (br, m, 29H); 0,91 (br, m, 6H).

15 **Fase 2: Pentil 4-(nonil(2-osso-2-(piperazin-1-il)etil)ammino)butanoato**

[1306]



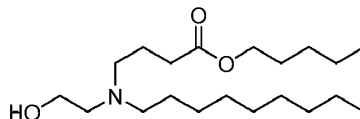
[1307] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il pentil 4-(nonil(2-osso-2-(piperazin-1-il)etil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(*N*-nonil-*N*-(4-osso-4-(pentilossi)butil)glicil)piperazin-1-carbossilato (700 mg, 1,33 mmol) e TFA (5,1 mL, 66,6 mmol) in DCM (5 mL). Resa (560 mg, 99%).

[1308] UPLC/ELSD: RT = 0,77 min. MS (ES): m/z (MH^+) 426,65 per $C_{24}H_{47}N_3O_3$

[1309] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,07 (t, 2H); 3,59 (br, m, 4H); 3,28 (s, 2H); 2,86 (br, m, 4H); 2,50 (br, m, 4H); 2,33 (t, 2H); 2,05 (br, 1H); 1,77 (m, 2H); 1,63 (m, 2H); 1,30 (br, m, 18H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: Pentil 4-((2-idrossietil)(nonil)ammino)butanoato

5 [1310]



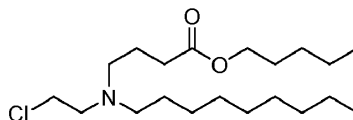
[1311] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 18, il pentil 4-((2-idrossietil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato da 2-(nonilammino)etan-1-olo (350 mg, 1,87 mmol), pentil 4-bromobutanoato (487 mg, 2,06 mmol), K₂CO₃ (572 mg, 4,11 mmol) e KI (31 mg, 0,19 mmol) in MeCN (40 mL). Resa (427 mg, 66%).

[1312] UPLC/ELSD: RT = 1,25 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 344,55 per C₂₀H₄₁NO₃

[1313] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,09 (t, 2H); 3,61 (t, 2H); 2,67 (t, 2H); 2,56 (m, 4H); 2,36 (t, 2H); 1,85 (m, 2H); 1,65 (m, 2H); 1,49 (m, 2H); 1,42-1,18 (br, m, 16H); 0,91 (m, 6H).

15 **Fase 4: Pentil 4-((2-cloroetil)(nonil)ammino)butanoato**

[1314]

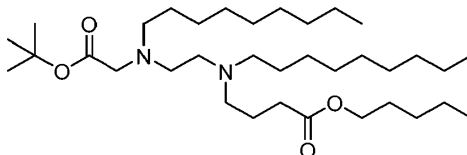


[1315] Allo stesso modo della Fase 2 per il Composto 18, il pentil 4-((2-cloroetil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal pentil 4-((2-idrossietil)(nonil)ammino)butanoato (427 mg, 1,27 mmol), metansolfonil cloruro (120 μL, 1,55 mmol) e trietilammina (225 μL, 1,62 mmol) in DCM (8 mL). Resa (448 mg, 99%). UPLC/ELSD: RT = 1,52 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 362,51 per C₂₀H₄₀ClNO₂

[1316] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,07-3,71 (br, m, 4H); 3,45-2,76 (br, m, 6H); 2,30 (br, m, 2H); 2,24-1,05 (br, m, 22H); 0,82 (br, m, 6H).

Fase 5: Pentil 4-((2-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)butanoato

5 [1317]



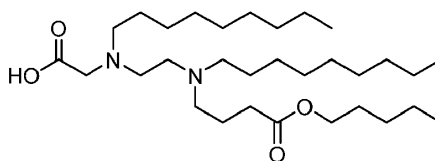
[1318] Allo stesso modo della Fase 4 per il composto 46, è stato sintetizzato il pentil 4-((2-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)butanoato da *terz*-butil nonilglicinato (338 mg, 1,31 mmol), pentil 4-((2-cloroetil)(nonil)ammino)butanoato (527 mg, 1,46 mmol), K₂CO₃ (402 mg, 2,89 mmol) e KI (22 mg, 0,13 mmol) in MeCN (30 mL). Resa (200 mg, 26%).

[1319] UPLC/ELSD: RT = 3,03 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 583,95 per C₃₅H₇₀N₂O₄

[1320] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,07 (t, 2H); 3,27 (s, 2H); 2,76-2,24 (br, m, 12H); 1,85-1,10 (br, m, 45H); 0,90 (m, 9H).

15 Fase 6: *N*-Nonil-*N*-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)glicina

[1321]



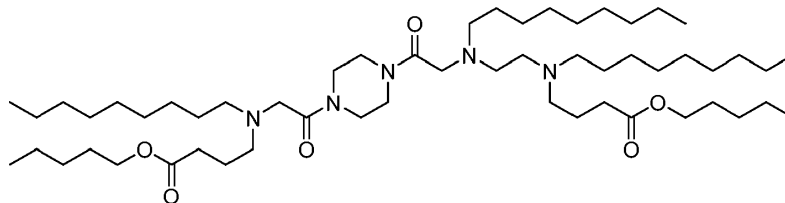
[1322] Allo stesso modo della Fase 5 per il Composto 46, la *N*-nonil-*N*-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)glicina è stata sintetizzata dal pentil 4-((2-((2-(*terz*-butossi)-2-ossoetil)(nonil)ammino)etil)(nonil)ammino)butanoato (200 mg, 0,34 mmol) e TFA (1,31 mL, 17,2 mmol), in DCM (2 mL). Resa (160 mg, 89%).

[1323] UPLC/ELSD: RT = 2,39 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 527,77 per C₃₁H₆₂N₂O₄

[1324] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,09 (t, 2H); 3,27 (s, 2H); 2,94-2,74 (br, m, 6H); 2,61 (t, 2H); 2,37 (m, 2H); 2,15-1,90 (br, m, 2H); 1,80-1,05 (br, m, 36H); 0,90 (m, 9H).

Fase 7: Pentil 4-(nonil(2-(4-(N-nonil-N-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)glicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)ammino)butanoato

5 [1325]



[1326] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, pentil 4-(nonil(2-(4-(N-nonil-N-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)glicil)piperazin-1-il)-2-ossoetil)ammino)butanoato è stato sintetizzato da pentile 4-(nonil(2-osso-2-(piperazin-1-il)etil)ammino)butanoato (142 mg, 0,33 mmol), N-nonil-N-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)glicina (160 mg, 0,30 mmol), iPr₂EtN (116 μL, 0,67 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 542 μl, 0,91 mmol). Resa (53 mg, 19%).

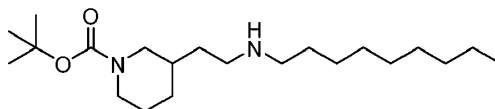
[1327] UPLC/ELSD: RT = 2,79 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 935,34 per C₅₅H₁₀₇N₅O₆

15 [1328] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 4H); 3,78-3,53 (br, m, 8H); 3,32 (br, m, 4H); 2,76-2,24 (br, m, 18H); 1,87-1,10 (br, m, 58H); 0,91 (br, m, 15H).

BR: Composto 80: Pentil 4-((2-(1-(N-(2-(dionilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-3-il)etil)(nonil)ammino)butanoato

Fase 1: *terz*-butil 3-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1329]



Formola chimica: C₂₁H₄₂N₂O₂

Peso molecolare: 354.58

20

[1330] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 3-(2-

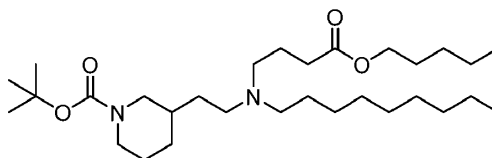
(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(2-amminoetil) piperidina-1-carbossilato (1,00 g, 4,38 mmol), 1-bromononano (907 mg, 4,38 mmol), K₂CO₃ (610 mg, 4,38 mmol) e KI (73 mg, 0,44 mmol) in MeCN (50 mL). Resa (474 mg, 31%).

[1331] UPLC/ELSD: RT = 1,23 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 355,58 per C₂₁H₄₂N₂O₂

5 [1332] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,88 (br, 2H); 3,00-2,43 (br, m, 6H); 1,92-0,97 (br, m, 30H), 0,90 (t, 3H).

Fase 2: *terz*-butil 3-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1333]



10

[1334] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *terz*-butil 3-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (474 mg, 1,34 mmol), pentile 4-bromobutanoato (380 mg, 1,6 mmol), K₂CO₃ (223 mg, 1,60 mmol) e KI (44 mg, 0,27 mmol) in MeCN (15 mL).

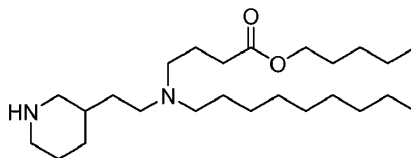
15 Resa (492 mg, 72%).

[1335] UPLC/ELSD: RT = 2,09 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 511,70 per C₃₀H₅₈N₂O₄

[1336] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,90 (br, m, 2H); 2,87-2,22 (br, m, 10H); 1,91-1,00 (br, m, 38H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: Pentil 4-(nonil(2-(piperidin-3-il)etil)ammino)butanoato

20 [1337]



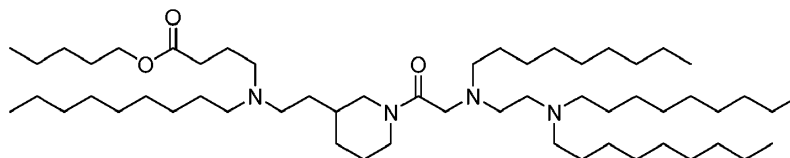
[1338] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il pentil 4-(nonil(2-(piperidin-3-

il)etil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (492 mg, 0,96 mmol) e TFA (3,7 mL, 48 mmol) in DCM (4 mL). Resa (390 mg, 99%).

[1339] UPLC/ELSD: RT = 0,85 min. MS (ES): m/z (MH^+) 411,72 for $C_{25}H_{50}N_2O_2$ 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,03 (br, m, 2H); 2,66-2,18 (br, m, 10H); 2,18-0,98 (br, m, 30H); 0,91 (m, 6H).

Fase 4: Pentil 4-((2-(1-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperidin-3-il)etil)(nonil)ammino)butanoato

[1340]



10

[1341] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, pentile 4-((2-(1-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)piperidin-3-il)etil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato da pentil 4-(nonil(2-(piperidin-3-il)etil)ammino)butanoato (250 mg, 0,61 mmol), *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (275 mg, 0,55 mmol), iPr_2EtN (0,21 mL, 1,2 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 0,98 mL, 1,7 mmol). Resa (96 mg, 20%).

15

[1342] UPLC/ELSD: RT = 3,08 min. MS (ES): m/z (MH^+) 890,32 per $C_{56}H_{112}N_4O_3$

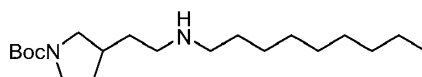
[1343] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,55-4,01 (br, m, 4H); 3,48-2,21 (br, m, 22H); 1,95-1,00 (br, m, 71H); 0,90 (m, 15H).

20

BS: Composto 81: Pentil 4-((2-(1-(*N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicil)pirrolidin-3-il)etil)(nonil)ammino)butanoato

Fase 1: *terz*-butil 3-(2-(nonilammino)etil)pirrolidin-1-carbossilato

[1344]



Formula chimica: $C_{20}H_{40}N_2O_2$

Peso molecolare: 340.55

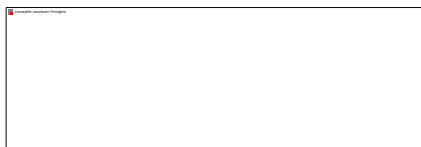
[1345] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *tert*-butil 3-(2-(nonilammino)etil)pirrolidin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *tert*-butil 3-(2-amminoetil)pirrolidin-1-carbossilato (1,25 g, 5,47 mmol), 1-bromononano (1,13 g, 5,47 mmol),
5 K_2CO_3 (757 mg, 5,47 mmol) e KI (91 mg, 0,55 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (420 mg, 23%).

[1346] UPLC/ELSD: RT = 1,08 min. MS (ES): m/z (MH^+) 341,52 per $C_{20}H_{40}N_2O_2$

[1347] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,68-1,91 (br. m, 9H); 1,71-1,12 (br. m, 28H); 0,90 (t, 3H).

10 **Fase 2: *tert*-butil 3-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)pirrolidin-1-carbossilato**

[1348]



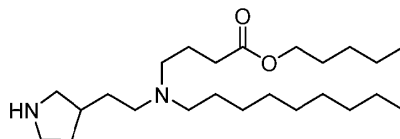
[1349] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *tert*-butil 3-(2-(nonil(4-osso-4-
15 (pentilossi)butil)ammino)etil)pirrolidin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *tert*-carbossilato butil 3-(2-(nonilammino)etil)pirrolidin-1-carbossilato (420 mg, 1,23 mmol), pentile 4-bromobutanoato (321 mg, 1,36 mmol), K_2CO_3 (187 mg, 1,36 mmol) e KI (41 mg, 0,25 mmol). Resa (390 mg, 64%).

[1350] UPLC/ELSD: RT = 1,98 min. MS (ES): m/z (MH^+) 497,67 per $C_{29}H_{56}N_2O_4$

20 [1351] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08(t, 2H); 3,50 (br. m, 2H); 3,34-2,76 (br. m., 2H); 2,52-1,87 (br, m, 10H); 1,87-1,02 (br. m, 34H); 0,91 (t, 6H).

Fase 3: Pentil 4-(nonil(2-(pirrolidin-3-il)etil)ammino)butanoato

[1352]



Formula chimica: $C_{24}H_{48}N_2O_2$

Peso molecolare: 396.66

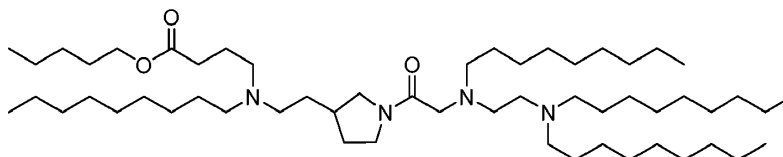
[1353] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il pentil 4-((2-(pirrolidin-3-il)etil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)pirrolidina-1-carbossilato (390 mg, 0,79 mmol) e TFA (3,0 mL, 40 mmol) in DCM (3 mL). Resa (298 mg, 96%).

[1354] UPLC/ELSD: RT = 0,81 min. MS (ES): m/z (MH^+) 397,62 per $C_{24}H_{48}N_2O_2$

[1355] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,20 -2,82 (br, m, 4H); 2,58-2,24 (br, m, 8H); 2,11-1,11 (br, m, 28H); 0,91 (m, 6H).

10 **Fase 4: Pentil 4-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)pirrolidin-3-il)etil)(nonil)ammino)butanoato**

[1356]



15 [1357] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, pentile 4-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)pirrolidin-3-il)etil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato da pentil 4-((2-(pirrolidin-3-il)etil)ammino)butanoato (202 mg, 0,51 mmol), N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicina (230 mg, 0,46 mmol), iPr_2EtN (0,177 mL, 1,0 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 0,82 mL, 1,4 mmol) in THF (10 mL). Resa (109 mg, 27%).

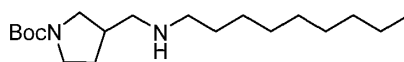
[1358] UPLC/ELSD: RT = 3,06 min. MS (ES): m/z (MH^+) 876,30 per $C_{55}H_{110}N_4O_3$

20 [1359] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,83 -2,85 (br, m, 7H); 2,78-1,88 (br, m, 19H); 1,83-1,14 (br, m, 67H); 0,90 (m, 15H).

BT: Composto 82: Pentil 4-(((1-(N(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)pirrolidin-3-il)metil)(nonil)ammino)butanoato

Fase 1: *terz*-butil 3-((nonilammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato

[1360]



Formula chimica: $C_{19}H_{38}N_2O_2$

Peso molecolare: 326.53

5

[1361] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 3-((nonilammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(amminometil)pirrolidin-1-carbossilato (2,0 g, 10,0 mmol), 1-bromononano (2,07 g, 10,0 mmol), K_2CO_3 (1,39 g, 10,0 mmol) e KI (166 mg, 1,00 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (1,53

10 g, 47%).

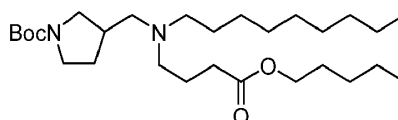
[1362] UPLC/ELSD: RT = 0,92 min. MS (ES): m/z (MH^+) 327,54 per $C_{19}H_{38}N_2O_2$

[1363] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,69-1,79 (br. m, 9H); 1,74-1,13 (br. m, 26H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: *terz*-butil 3-((nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato

15

[1364]



[1365] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *terz*-butil 3-((nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-((nonilammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato (500 mg, 1,53 mmol), pentil 4-bromobutanoato (400 mg, 1,68 mmol), K_2CO_3 (423 mg, 3,07 mmol) e KI (51 mg, 0,31 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (233 mg, 32%).

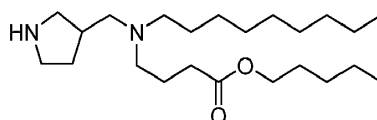
20

[1366] UPLC/ELSD: RT = 1,85 min. MS (ES): m/z (MH^+) 483,65 per $C_{28}H_{54}N_2O_4$

[1367] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,59 -2,91 (br, m, 4H); 2,49-1,83 (br, m, 10H); 1,83-1,13 (br, m, 32H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: Pentil 4-(nonil(pirrolidin-3-ilmetil)ammino)butanoato

[1368]



Formula chimica: C₂₃H₄₆N₂O₂

Peso molecolare: 382.63

5

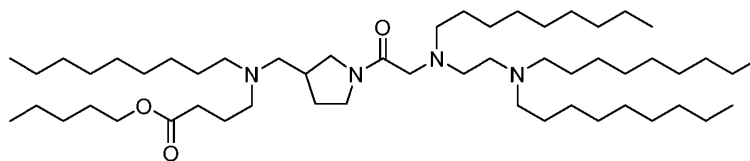
[1369] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il pentil 4-(nonil(pirrolidin-3-ilmetil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-((nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)metil)pirrolidin-1-carbossilato (233 mg, 0,48 mmol) e TFA (1,84 mL, 24 mmol) in DCM (2 mL). Resa (179 mg, 97%).

10 [1370] UPLC/ELSD: RT = 0,70 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 383,51 per C₂₃H₄₆N₂O₂

[1371] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,11 -2,81 (br, m, 3H); 2,67-1,51 (br, m, 16H); 1,51-1,03 (br, m, 19H); 0,91 (m, 6H).

Fase 4: Pentil 4-(((1-(N(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)pirrolidin-3-il)metil)(nonil)ammino)butanoato

15 [1372]



[1373] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, pentil 4-(((1-(N(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)pirrolidin-3-il)metil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato da pentil 4-(nonil(pirrolidin-3-ilmetil)ammino)butanoato (179 mg, 0,47 mmol), *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (211 mg, 0,43 mmol), iPr₂EtN (163 μL, 0,95 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 0,76 mL, 1,1 mmol). Resa (88 mg, 24%).

20

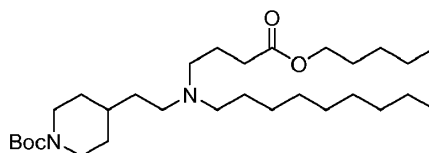
[1374] UPLC/ELSD: RT = 3,05 min. MS (ES): m/z (MH^+) 862,28 per $C_{54}H_{108}N_4O_3$

[1375] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,76-2,17 (br, m, 24H); 2,12-1,05 (br, m, 67H); 0,90 (m, 15H).

BU: Composto 83: Pentil 4-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)butanoato

Fase 1: *terz*-butil 4-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato

[1376]



Formula chimica: $C_{30}H_{58}N_2O_4$

Peso molecolare: 510.80

10 [1377] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *terz*-butil 4-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(nonilammino)etil)piperidina-1-carbossilato (500 mg, 1,41 mmol), pentile 4-bromobutanoato (368 mg, 1,55 mmol), K_2CO_3 (390 mg, 2,82 mmol) e KI (23 mg, 0,14 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (487 mg, 68%).

15 [1378] UPLC/ELSD: RT = 2,03 min. MS (ES): m/z (MH^+) 511,57 per $C_{30}H_{58}N_2O_4$

[1379] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (m, 4H); 2,69 (m, 2H); 2,51-2,25 (br, m, 8H); 1,83-1,55 (br, m, 6H); 1,53-1,02 (br, m, 32H); 0,91 (m, 6H).

Fase 2: Pentil 4-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)butanoato

[1380]



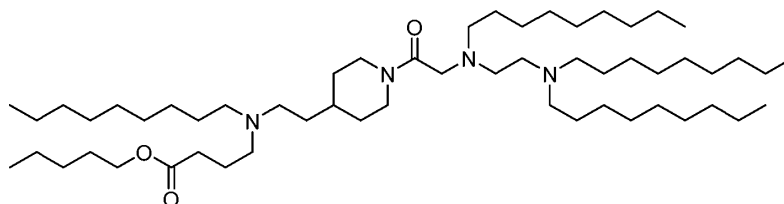
[1381] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il pentil 4-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(2-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)etil)piperidina-1-carbossilato (487 mg, 0,953 mmol) e TFA (3,6 mL, 48 mmol) in DCM (4 mL). Resa (386 mg, 98%).

5 [1382] UPLC/ELSD: RT = 0,87 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 411,43 per C₂₅H₅₀N₂O₂

[1383] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,07 (m, 2H); 2,60 (m, 2H); 2,50-2,28 (br, m, 8H); 2,03 (br, 1H); 1,86-1,55 (br, m, 6H); 1,52-1,02 (br, m, 23H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: Pentil 4-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)butanoato

10 [1384]



Formula chimica: C₅₆H₁₁₂N₄O₃

Peso molecolare: 889.54

[1385] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, pentile 4-((2-(1-(N-(2-(dinonilammino)etil)-N-nonilglicil)piperidin-4-il)etil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato da pentil 4-(nonil(2-(piperidin-4-il)etil)ammino)butanoato (351 mg, 0,855 mmol),

15 *N*-(2-(dinonilammino)etil)-*N*-nonilglicina (467 mg, 0,941 mmol), iPr₂EtN (328 μL, 1,88 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 1,53 mL, 2,56 mmol) in THF (15 mL). Resa (192 mg, 25%).

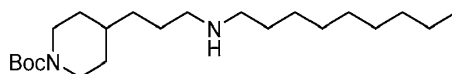
[1386] UPLC/ELSD: RT = 3,00 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 890,13 for C₅₆H₁₁₂N₄O₃ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,61-4,14 (br, m, 2H); 4,08 (t, 2H); 3,40-2,24 (br, m, 22H); 1,86-0,99 (br, m, 71H); 0,90 (m, 15H).

20 **BV: Composto 84: Pentil 4-((3-(1-(3-((2-(dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperidin-4-**

il)propil)(nonil)ammino)butanoato

Fase 1: *terz*-butil 4-(3-(nonilammino)propil)piperidina-1-carbossilato

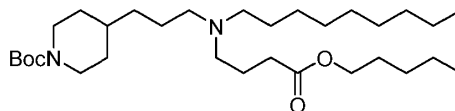
[1387]



- 5 [1388] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 4-(3-(nonilammino)propil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-amminopropil) piperidina-1-carbossilato (2,50 g, 10,3 mmol), 1-bromononano (2,14 g, 10,3 mmol), K₂CO₃ (2,85 g, 20,6 mmol) e KI (171 mg, 0,10 mmol) in MeCN (200 mL). Resa (1,27 g, 33%).
- 10 [1389] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (m, 2H); 2,69 (br. m, 6H); 1,79-0,98 (br. m, 32H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: *terz*-butil 4-(3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propil)piperidina-1-carbossilato

[1390]



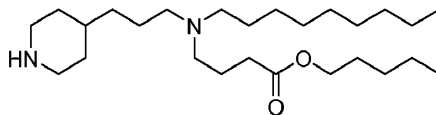
Formula chimica: C₃₁H₆₀N₂O₄

Peso molecolare: 524.83

- 15 [1391] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *terz*-butile 4-(3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-carbossilato-butil 4-(3-(nonilammino)propil)piperidina-1-carbossilato (500 mg, 1,36 mmol), pentil 4-bromobutanoato (354 mg, 1,49 mmol), K₂CO₃ (375 mg, 2,71 mmol) e KI (23 mg, 0,14
- 20 mmol) in MeCN (20 mL). Resa (624 mg, 88%).
- [1392] UPLC/ELSD: RT = 2,12 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 525,60 for C₃₁H₆₀N₂O₄ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (br, m, 4H); 2,69 (m, 2H); 2,38 (br, m, 8H); 1,85-1,55 (br, m, 6H); 1,54-1,00 (br, m, 34H); 0,91 (m, 6H).

Fase 3: Pentil 4-(nonil(3-(piperidin-4-il)propil)ammino)butanoato

[1393]



Formula chimica: $C_{26}H_{52}N_2O_2$

Peso molecolare: 424.71

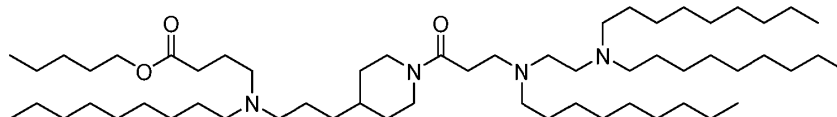
[1394] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, il pentil 4-(nonil(3-(piperidin-4-il)propil)ammino)butanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-(nonil(4-osso-4-(pentilossi)butil)ammino)propil)piperidina-1-carbossilato (624 mg, 1,19 mmol) e TFA (4,5 mL, 60 mmol) in DCM (5 mL). Resa (467 mg, 92%).

[1395] UPLC/ELSD: RT = 0,94 min. MS (ES): m/z (MH^+) 424,62 per $C_{26}H_{52}N_2O_2$

[1396] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,16 (m, 2H); 2,65 (m, 2H); 2,39 (br, m, 8H); 1,84-1,57 (br, m, 6H); 1,52-1,04 (br, m, 26H); 0,91 (m, 6H).

Fase 4: Pentil 4-((3-(1-(3-((2-(dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperidin-4-il)propil)(nonil)ammino)butanoato

[1397]



[1398] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, pentil 4-((3-(1-(3-((2-(dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperidin-4-il)propil)(nonil)ammino)butanoato è stato sintetizzato da pentil 4-(nonil(3-(piperidin-4-il)propil)ammino)butanoato (259 mg, 0,61 mmol), acido 3-((2-(dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propanoico (343 mg, 0,67 mmol), iPr_2EtN (234 μL , 1,34 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 1,09 mL, 1,83 mmol) in THF (20 mL). Resa (270 mg, 48%).

[1399] UPLC/ELSD: RT = 2,85 min. MS (ES): m/z (MH^+) 918,18 per $C_{58}H_{116}N_4O_3$

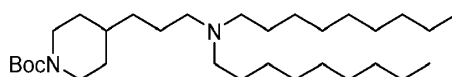
[1400] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,61 (m, 1H); 4,08 (t, 2H); 4,08 (m, 1H); 3,08-2,72

(br, m, 4H); 2,63-2,26 (br, m, 20H); 1,87-1,57 (br, m, 6H); 1,54-1,00 (br, m, 67H); 0,90 (m, 15H).

BW: Composto 85: 3-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(3-(dinonilammino)propil)piperidin-1-il)propan-1-one

5 **Fase 1: *terz*-Butil 4-(3-(dinonilammino)propil)piperidina-1-carbossilato**

[1401]



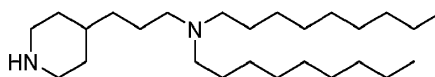
[1402] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 49, il *terz*-butil 4-(3-(dinonilammino)propil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-amminopropil) piperidina-1-carbossilato (2,50 g, 10,3 mmol), 1-bromononano (2,14 g, 10,3 mmol), K₂CO₃ (2,85 g, 20,6 mmol) e KI (171 mg, 0,10 mmol) in MeCN (200 mL). Resa (1,03 g, 20%).

[1403] UPLC/ELSD: RT = 2,46 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 495,66 per C₃₁H₆₂N₂O₂

[1404] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,09 (br. m, 2H); 2,69 (br. m, 2H); 2,39 (br. m, 6H); 1,75-1,00 (br. m, 46H); 0,90 (t, 6H).

Fase 2: *N*-Nonil-*N*-(3-(piperidin-4-il)propil)nonan-1-ammina

[1405]



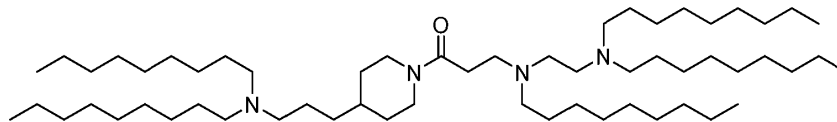
[1406] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, la *N*-nonil-*N*-(3-(piperidin-4-il)propil)nonan-1-ammina è stata sintetizzata dal *terz*-butil 4-(3-(dinonilammino)propil) piperidina-1-carbossilato (1,03 g, 2,08 mmol) e TFA (8,0 mL, 104 mmol) in DCM (10 mL). Resa (778 mg, 95%).

[1407] UPLC/ELSD: RT = 1,31 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 395,61 per C₂₆H₅₄N₂

[1408] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3.18-2.50 (br. m, 4H); 2.40 (br. m, 6H); 1.70 (m, 2H); 1.58-1.03 (br. m, 36H); 0.90 (t, 6H).

Fase 3: 3-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(3-(dinonilammino)propil)piperidin-1-il)propan-1-one

[1409]



5 [1410] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)-1-(4-(3-(dinonilammino)propil)piperidin-1-il)propan-1-one è stato sintetizzato da *N*-nonil-*N*-(3-(piperidin-4-il)propil)nonan-1-ammina (247 mg, 0,63 mmol), acido 3-((2-(dinonilammino)etile)(nonil)ammino)propanoico (352 mg, 0,69 mmol), *i*Pr₂EtN (240 μL, 1,4 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 1,1 mL, 1,9 mmol) in THF (20 mL). Resa (293 mg, 53%).

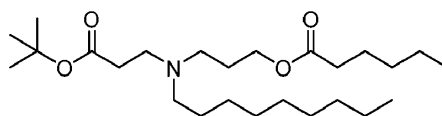
[1411] UPLC/ELSD: RT = 3,01 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 888,08 per C₅₈H₁₁₈N₄O

[1412] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,61 (m, 1H); 3,86 (m, 1H); 2,99 (m, 1H); 2,82 (m, 2H); 2,61-2,29 (br, m, 19H); 1,75 (m, 2H); 1,60-1,00 (br, m, 77H); 0,89 (t, 15H).

BX: Composto 86: 3-((3-(4-(3-((2-(Dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propil)esanoato

Fase 1: 3-((3-(*terz*-Butossi)-3-ossopropil)(nonil)ammino)propil esanoato

[1413]

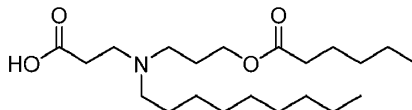


20 [1414] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 44, il 2-((3-(*terz*-butossi)-3-ossopropil)(nonil)ammino)etileptanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 3-(nonilammino)propanoato (750 mg, 2,76 mmol), 3-bromopropil esanoato (786 mg, 3,32 mmol), K₂CO₃ (764 mg, 5,53 mmol) e KI (46 mg, 0,28 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (661 mg, 56%).

[1415] UPLC/ELSD: RT = 1,80 min. MS (ES): m/z (MH^+) 428,49 for $C_{25}H_{49}NO_4$ 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,12 (t, 2H); 2,73 (t, 2H); 2,56-2,24 (br, m, 8H); 1,77 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,55-1,10 (br, m, 27H); 0,91 (m, 6H).

Fase 2: acido 3-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propanoico

5 [1416]



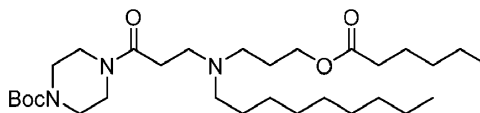
[1417] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 44, l'acido 3-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propanoico è stato sintetizzato da 3-((3-(*terz*-butossi)-3-ossopropil)(nonil)ammino)propil esanoato (661 mg, 1,55 mmol) e TFA (5,9 mL, 77 mmol) in
10 DCM (6 mL). Resa (556 mg, 97%).

[1418] UPLC/ELSD: RT = 1,14 min. MS (ES): m/z (MH^+) 372,31 per $C_{21}H_{41}NO_4$

[1419] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,13 (t, 2H); 2,84 (t, 2H); 2,72 (t, 2H); 2,62 (t, 2H); 2,46 (t, 2H); 2,31 (t, 2H); 1,90 (m, 2H); 1,72-1,10 (br, m, 20H); 0,90 (M, 6H).

Fase 3: *terz*-butil 4-(3-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-
15 **carbossilato**

[1420]



[1421] Allo stesso modo della Fase 3 per il Composto 11, *terz*-butil 4-(3-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propanoil)piperazina-1-carbossilato è stato sintetizzato da 3-
20 ((acido 3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propanoico (570 mg, 1,49 mmol), 1-boc-piperazina (334 mg, 1,80 mmol), iPr_2EtN (573 μL , 3,29 mmol) e T3P (50 % di soluzione di EtOAc, 2,67 mL, 4,49 mmol) in THF (20 mL). Resa (635 mg, 79%).

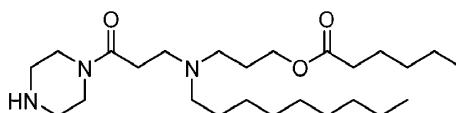
[1422] UPLC/ELSD: RT = 1,85 min. MS (ES): m/z (MH^+) 540,52 per $C_{30}H_{57}N_3O_5$

[1423] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,12 (t, 2H); 3,60 (m, 2H); 3,46 (br, m, 6H); 2,80

(m, 2H); 2,58-2,37 (br, m, 6H); 2,30 (t, 2H); 1,78 (m, 2H); 1,63 (m, 2H); 1,54-1,10 (br, m, 27H); 0,90 (m, 6H).

Fase 4: 3-(Nonil(3-osso-3-(piperazin-1-il)propil)ammino)propil esanoato

[1424]



5

[1425] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il 3-(nonil(3-osso-3-(piperazin-1-il)propil)ammino)propil esanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propanoil)piperazina-1-carbossilato (635 mg, 1,18 mmol) e TFA (4,5 mL, 59 mmol) in DCM (5 mL). Resa (510 mg, 99%).

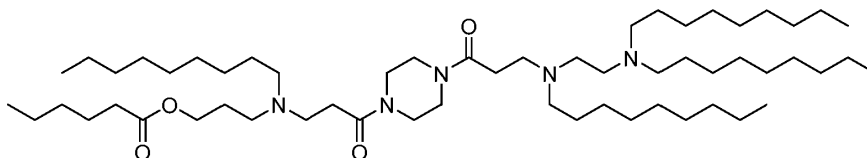
10 [1426] UPLC/ELSD: RT = 0,72 min. MS (ES): m/z (MH^+) 440,47 per $C_{25}H_{49}N_3O_3$

[1427] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,12 (t, 2H); 3,60 (m, 2H) 3,46 (m, 2H); 2,85 (br, m, 6H); 2,49 (br, m, 6H); 2,30 (t, 2H); 1,80 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,52-1,10 (br, m, 19H); 0,91 (m, 6H).

Fase 5: 3-((3-(4-(3-((2-(Dinonil)ammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)-3-ossopropil)(nonil)ammino)propil esanoato

15

[1428]



[1429] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 3-((3-(4-(3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperazin-1-il)-3-

20 ossopropil)(nonil)ammino)propil esanoato è stato sintetizzato da 3-(nonil(3-osso-3-(piperazin-1-il)propil)ammino)propil esanoato (154 mg, 0,351 mmol), acido 3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoico (197 mg, 0,386 mmol), iPr_2EtN (134 μ L, 0,77 mmol) e T3P (soluzione al 50% di EtOAc, 616 μ L, 1,05 mmol) in THF (10 mL). Resa (69 mg,

21%).

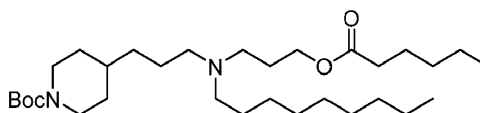
[1430] UPLC/ELSD: RT = 2,70 min. MS (ES): m/z (MH^+) 933,10 per $C_{57}H_{113}N_5O_4$

[1431] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,12 (t, 2H); 3,72-3,40 (br, m, 8H); 2,81 (br, m, 4H); 2,61-2,36 (br, m, 18H); 2,30 (t, 2H); 1,78 (m, 2H); 1,64 (m, 2H); 1,54-1,06 (br, m, 60H); 0,90 (m, 15H).

BY: Composto 87: 3-((3-(1-(3-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperidin-4-il)propil)(nonil)ammino)propil esanoato

Fase 1: *terz*-Butil 4-(3-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propil)piperidina-1-carbossilato

[1432]



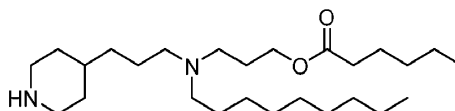
[1433] Allo stesso modo della Fase 1 per il Composto 57, il *terz*-butil 4-(3-((3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propil)piperidina-1-carbossilato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-(nonilammino)propil)piperidina-1-carbossilato (500 mg, 1,36 mmol), 3-bromopropil esanoato (386 mg, 1,63 mmol), K_2CO_3 (375 mg, 2,71 mmol) e KI (45 mg, 0,27 mmol) in MeCN (100 mL). Resa (322 mg, 45%).

[1434] UPLC/ELSD: RT = 2,09 min. MS (ES): m/z (MH^+) 525,60 per $C_{31}H_{60}N_2O_4$

[1435] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,12 (br, m, 4H); 2,67 (m, 2H); 2,56-2,24 (br, m, 8H); 1,90-1,00 (br, m, 40H); 0,91 (m, 6H).

Fase 2: 3-(Nonil(3-(piperidin-4-il)propil)ammino)propil esanoato

[1436]



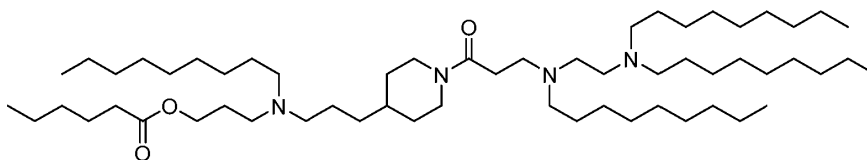
[1437] Allo stesso modo della Fase 4 per il Composto 11, il 3-(nonil(3-(piperidin-4-il)propil)ammino)propil esanoato è stato sintetizzato dal *terz*-butil 4-(3-(3-(esanoilossi)propil)(nonil)ammino)propil)piperidina-1-carbossilato (322 mg, 0,614 mmol) e TFA (2,3 mL, 31 mmol) in DCM (2,5 mL). Resa (260 mg, 99%).

5 [1438] UPLC/ELSD: RT = 0,89 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 425,54 per C₂₆H₅₂N₂O₂

[1439] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,12 (t, 2H); 3,12 (m, 2H); 2,75 -2,24 (br, m, 10H); 1,84-1,54 (br, m, 6H); 1,54-1,02 (br, m, 26H); 0,90 (m, 6H).

Fase 3: 3-((3-(1-(3-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperidin-4-il)propil)(nonil)ammino)propil esanoato

10 [1440]



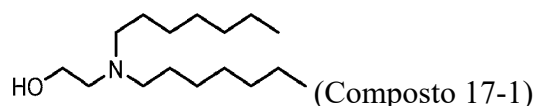
[1441] Allo stesso modo della Fase 11 per il Composto 11, 3-((3-(1-(3-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)propanoil)piperidin-4-il)propil)(nonil)ammino)propil esanoato è stato sintetizzato da 3-(nonil(3-(piperidin-4-il)propil)ammino)propil esanoato (149 mg, 0,351 mmol), acido 3-((2-(dinilammino)etil)(nonil)amino)propanoico (197 mg, 0,386 mmol), iPr₂EtN (134 μL, 0,77 mmol) e T3P (soluzione di EtOAc al 50%, 616 μL, 1,05 mmol) in THF (10 mL). Resa (39 mg, 12%).

[1442] UPLC/ELSD: RT = 2,83 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 918,01 per C₅₈H₁₁₆N₄O₃

15 [1443] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,61 (m, 1H); 4,12 (t, 2H); 3,87 (m, 1H); 3,08-2,74 (br, m, 4H); 2,70-2,23 (br, m, 20H); 1,82-1,56 (br, m, 6H); 1,56-1,00 (br, m, 67H); 0,90 (m, 15H).

BZ. Composto 17-1: 2-(Diesilammino)etan-1-olo

[1444]



[1445] A una soluzione 1-bromoesano (5 g, 82 mmol) in MeCN (380 mL) è stata aggiunta etanolamina (11,5 mL, 82 mmol), K₂CO₃ (22,7 g, 164 mmol) e KI (1,36 g, 8,2 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 48 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a
5 temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato estratto con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito 2-(desilammino)etan-1-olo (2,58 g, 14%).

[1446] UPLC/ELSD: RT = 0,41 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 229,95 per C₁₄H₃₁NO ¹H NMR (300
10 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,62 (t, 2H); 2,70 (t, 2H), 2,57 (t, 4H); 1,50 (br, m, 4H); 1,30 (br, 12H); 0,91 (t, 6H).

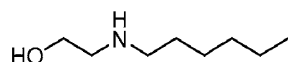
CA. Composto 17-2: 2-(esil((9 Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo

Fase 1: 2-(esilammino)etan-1-olo

Il 2-(esilammino)etan-1-olo è stato isolato dalla stessa reazione che ha prodotto con il

15 **Composto 1, 2-(diesilammino)etan-1-olo.**

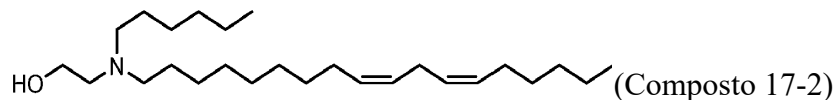
[1447]



[1448] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,62 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,62 (t, 2H); 2,10-1,80
(br, m, 2H); 1,49 (m, 2H); 1,30 (br, m, 6H); 0,89 (t, 3H).

20 **Fase 2: 2-(esil((9 Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo**

[1449]



[1450] A una soluzione di (6Z,9Z)-18-bromoottadeca-6,9-diene (0,2 g, 0,61 mmol) in MeCN (3,5 mL) è stato aggiunto 2-(esilammino)etan-1-olo (80 mg, 0,55 mmol), K₂CO₃ (76 mg, 0,55

mmol) e KI (9 mg, 0,06 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, aggiunta di acetato di etile ed estratta con acqua. Gli estratti combinati sono stati essiccati con Na₂SO₄, filtrati e concentrati *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO
5 (0-10% MeOH/DCM) ha fornito 2-(esil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo (23 mg, 11%).

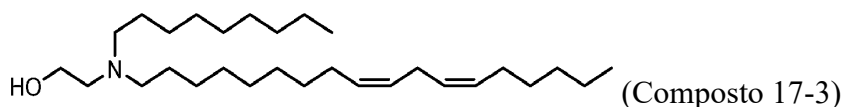
[1451] LC/ELSD: RT = 2,47 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 394,60 per C₂₆H₅₁NO

[1452] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,36 (m, 4H); 4,07 (m, 2H); 3,23-3,13 (m, 6H); 2,77 (m, 2H); 2,04 (m, 4H); 1,86 (m, 4H); 1,34 (m, 23H); 0,89 (m, 6H)

10 **CB. Composto 17-3: 2-(Nonil((9 Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo**

Il Composto 17-3 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-2.

[1453]

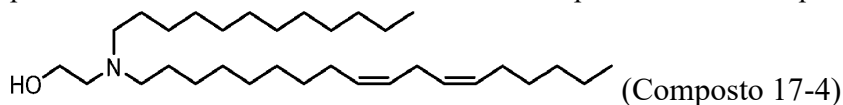


[1454] LC/ELSD: RT = 2,72 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 436,63 per C₂₉H₅₇NO

15 [1455] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,36 (m, 4H); 3,55 (t, 2H); 2,77 (t, 2H); 2,60 (t, 2H); 2,47 (m, 4H); 2,04 (m, 4H); 1,55-1,18 (br, m, 33H); 0,87 (m, 6H).

CD. Composto 17-4: 2-(Dodecil((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo

[1456] Il Composto 17-4 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-2.

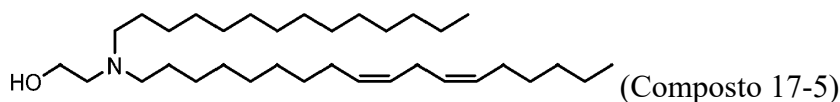


20 [1457] UPLC: RT = 3,18 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 478,516 per C₃₂H₆₃NO

[1458] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,33 (m, 4H); 3,53 (s, 2H); 2,75 (t, 2H); 2,58 (m, 2H); 2,45 (m, 4H); 2,03 (dt, 4H); 1,43 (m, 4H); 1,24 (m, 34H); 0,86 (m, 6H).

CE. Composto 17-5: 2-(((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)(tetradecil)ammino)etan-1-olo

[1459] Il Composto 17-5 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-2.



Formula chimica: $C_{34}H_{67}NO$

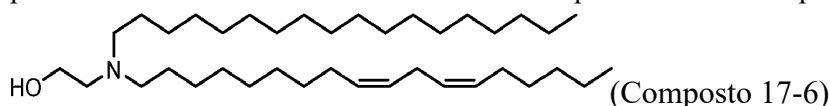
Peso molecolare: 505.92

[1460] LC/ELSD: RT = 3,39 min. MS (ES): m/z (MH^+) 506,56 per $C_{34}H_{67}NO$

[1461] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,37 (m, 4H); 3,58 (m, 2H); 2,80 (m, 2H); 2,69 - 2,42 (br, m, 5H); 2,07 (m, 4H); 1,56-1,18 (br, m, 44H); 0,91 (m, 6H).

5 **CF. Composto 17-6: 2-(((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)(ottadecil)ammino)etan-1-olo**

[1462] Il Composto 17-6 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-2.



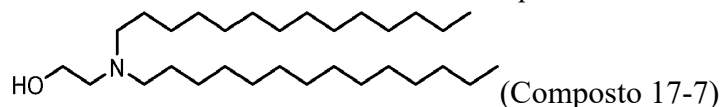
[1463] LC/ELSD: RT = 3,68 min. MS (ES): m/z (MH^+) 562,58 per $C_{38}H_{75}NO$

[1464] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,39 (m, 4H); 3,58 (m, 2H); 2,80 (m, 2H); 2,68 - 2,44 (br, m, 5H); 2,07 (m, 4H); 1,57-1,20 (br, m, 52H); 0,91 (m, 6H).

10

CG. Composto 17-7: 2-(Ditetradecilammino)etan-1-olo

[1465] Il Composto 17-7 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-1.



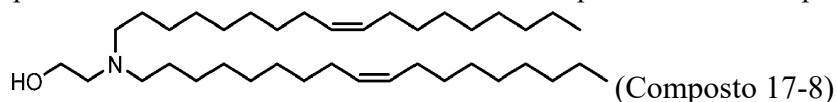
[1466] UPLC/ELSD: RT = 3,30 min. MS (ES): m/z (MH^+) 454,46 per $C_{30}H_{63}NO$

[1467] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,54 (br. m, 2H); 2,59 (br. m, 2H); 2,46 (br. m, 4H); 1,56-1,17 (br. m, 48H); 0,90 (br. m, 6H).

15

CG. Composto 17-8: 2-(Di((Z)-ottadec-9-en-1-il)ammino)etan-1-olo

[1468] Il Composto 17-8 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-1.



Formula chimica: $C_{38}H_{75}NO$

Peso molecolare: 562.02

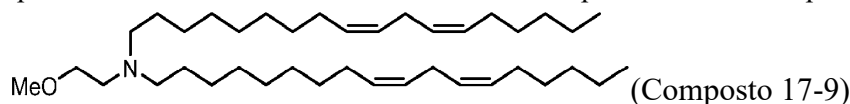
[1469] UPLC/ELSD: RT = 7,325 min. MS (ES): m/z (MH^+) 562,60 per $C_{38}H_{75}NO$ 1H -NMR

20

(300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 5,34 (m, 4H); 3,53 (t, 2H); 2,58 (t, 2H); 2,45 (t, 4H); 2,01 (m, 8H); 1,44 (m, 4H); 1,38-1,18 (br, m, 44H); 0,88 (t, 6H).

CH. Composto 17-9: (9Z,12Z)-N-(2-metossietil)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina

5 [1470] Il Composto 17-9 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-1.

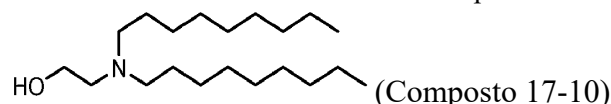


[1471] LC/ELSD: RT = 3,53 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 572,72 per C₃₉H₇₃NO

[1472] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 5,39 (m, 8H); 3,47 (m, 2H); 3,37 (s, 3H); 2,80 (m, 4H); 2,5 (m, 2H); 2,46 (m, 4H); 2,09 (m, 8H); 1,50-1,22 (m, 36H); 0,92 (m, 6H).

10 **CI. Composto 17-10: 2-(Dinonilammino)etan-1-olo**

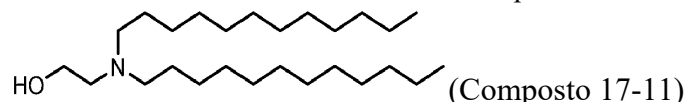
[1473] Il Composto 17-10 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-1.



[1474] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 3,57 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,49 (br. m, 4H); 1,48 (br. m, 4H); 1,29 (br. m, 24H); 0,91 (t, 6H).

15 **CJ: Composto 17-11: 2-(Didodecilammino)etan-1-olo**

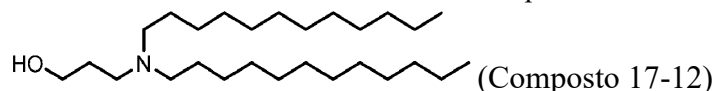
[1475] Il Composto 17-11 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-1.



[1476] UPLC/ELSD: RT = 2,69 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 398,56 per C₂₆H₅₅NO ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : ppm 3,57 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,49 (br, m, 4H); 1,48 (br, m, 4H); 1,29 (br, m, 36H); 0,91 (t, 6H).

CK. Composto 17-12: 3-(Didodecilammino)propan-1-olo

[1477] Il Composto 17-12 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 1.

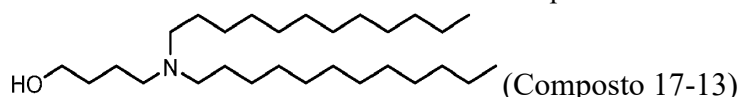


[1478] UPLC/ELSD: RT = 2,75 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 412,36 per C₂₇H₅₇NO

[1479] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,79 (t, 2H); 2,66 (t, 2H); 2,43 (br, m, 4H); 1,69 (br, m, 2H); 1,47 (br, m, 4H) 1,25 (br, m, 36H); 0,87 (t, 6H).

5 **CL. Composto 17-13: 4-(Didodecilammino)butan-1-olo**

[1480] Il Composto 17-13 è stato sintetizzato secondo la stessa procedura del Composto 17-1.



Formula chimica: C₂₈H₅₉NO

Peso molecolare: 425.79

[1481] UPLC/ELSD: RT = 2,80 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 426,42 per C₂₈H₅₉NO

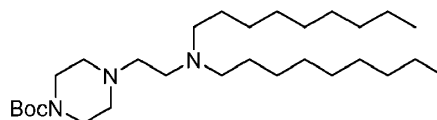
[1482] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,56 (br, m, 2H); 2,46 (br, m, 6H); 1,66 (br, m, 4H);

10 1,48 (br, m, 4H); 1,26 (br, m, 36H); 0,88 (t, 6H).

CM. Composto 19-1: N-nonil-N-(2-piperazin-1-il)etilnonan-1-ammina

Fase 1: *terz*-Butil 4-(2-(dinonilammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[1483]



15 [1484] Una miscela di 1-bromononano (1,81 g, 8,72 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (2,0 g, 8,72 mmol), K₂CO₃ (2,4 g, 17,4 mmol), KI (145 mg, 0,872 mmol) in 44 mL di MeCN è stato lasciato agitare a 65 °C per 16 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato estratto con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia

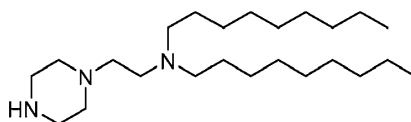
20 flash su silice ISCO (0-20% MeOH/DCM) ha fornito *terz*-butil 4-(2-(dinonilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (924 mg, 1,92 mmol, 44%).

[1485] UPLC/ELSD: RT = 1,99 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 482,36 per C₂₉H₅₉N₃O₂

[1486] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 3,45 (br, m, 4H); 3,10 (br, m, 2H); 2,59 (br, m, 2H); 2,44 (br, m, 8H); 1,60-1,00 (br, m, 37H); 0,91 (t, 6H).

Fase 2: Composto 19-1: *N*-nonil-*N*-(2-piperazin-1-il)etilnonan-1-ammina

[1487]



5

[1488] Una soluzione di *terz*-butil 4-(2-(dionilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (924 mg, 1,92 mmol) in 8 mL di DCM è stata trattata con TFA (7,4 mL, 96 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. La reazione è stata concentrata e il residuo grezzo è stato ripreso in cloroformio e lavato con Na_2CO_3 al 5% e soluzione salina, essiccato su Na_2SO_4 anidro, filtrato e concentrato *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% DCM/[DCM, 20% di MeOH, 1% di NH_4OH]) ha fornito *N*-nonil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)nonan-1- ammina (563 mg, 1,48 mmol, 77%).

10

[1489] UPLC/ELSD: RT = 1,27 min. MS (ES): m/z (MH^+) 382,54 per $\text{C}_{24}\text{H}_{51}\text{N}_3$

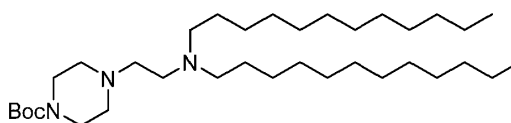
[1490] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 2,92 (br, m, 4H); 2,62 (br, m, 2H); 2,48 (br, m, 10H); 2,40-1,88 (br, m, 1H); 1,46 (br, m, 4H); 1,29 (br, m, 24H), 0,91 (t, 6H).

15

CN. Composto 19-2: *N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina

Fase 1: *terz*-Butil 4-(2-(dodecilammino)etil)piperazina-1-carbossilato

[1491]



20

[1492] Una miscela di 1-bromododecano (1,1 mL, 4,6 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (1,0 g, 4,4 mmol), K_2CO_3 (0,61 g, 4,4 mmol), in 10 mL di MeCN è stato lasciato agitare a temperatura ambiente. per 12 ore. Trascorso questo tempo la reazione è stata filtrata e concentrata. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-20%

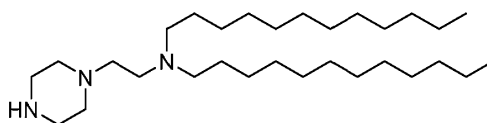
di MeOH in DCM con 1% di NH₄OH per fornire *terz*-butil 4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (450 mg, 0,80 mmol, 18%).

[1493] UPLC/ELSD: RT = 2,87 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 566,655 per C₃₅H₇₁N₃O₂

[1494] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,40 (m, 4H); 2,56 (m, 2H); 2,40 (m, 10H); 1,44 (s, 9H); 1,40-1,24 (m, 40H); 0,86 (t, 6H).

Fase 2: Composto 19-2: *N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina

[1495]



[1496] Una soluzione di *terz*-butil 4-(2-(didodecilammino)etil)piperazin-1-carbossilato (154 mg, 0,27 mmol) in 1 mL di DCM è stata trattata con TFA (0,21 mL, 2,7 mmol). La reazione è stata lasciata agitare per tutta la notte. Dopo questo tempo è stato aggiunto TFA (0,1 mL, 1,3 mmol).

Dopo altre 3 h la reazione è stata concentrata. Il residuo grezzo è stato ripreso in DCM e lavato con K₂CO₃ al 5% e soluzione salina, essiccato su Na₂SO₄, filtrato e concentrato. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-20% di MeOH in DCM con

1% NH₄OH) per fornire *N*-dodecil-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina (109 mg, 87%).

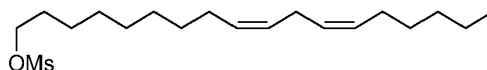
[1497] UPLC/ELSD: RT = 2,10 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 466,379 per C₃₀H₆₃N₃

[1498] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 2,88 (t, 4H); 2,61 (m, 2H); 2,45 (m, 10H); 1,43-1,24 (m, 40H); 0,86 (t, 6H).

CO. Composto 19-3: (9Z,12Z)-*N*-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)ottadeca-9,12-dien-1-ammina

Fase 1: (9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il metansolfonato

[1499]

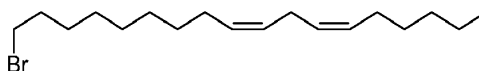


[1500] A una soluzione a 0 °C di alcol linoleilico (10 mL, 31,2 mmol) e trimetilammina (5,68 mL, 40,5 mmol) in DCM (50 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di metansolfonil cloruro (2,66 mL, 34,3 mmol) in DCM (20 mL). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e lasciata agitare per 4 ore. La miscela è stata spenta per
5 aggiunta di acqua ed estratta con DCM. Lo strato organico è stato lavato con NaHCO₃ saturato, soluzione salina, essiccato su Na₂SO₄ anidro, filtrato e concentrato *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-40% di EtOAc/esani) ha fornito (9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il metansolfonato (10,0 g, 93%).

[1501] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,35 (m, 4H); 4,22 (t, 2H); 2,99 (s, 3H); 2,77 (t, 2H); 2,04 (q, 4H); 1,74 (m, 2H); 1,30 (br. m, 16H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: (6Z,9Z)-18-Bromoottadeca-6,9-diene

[1502]

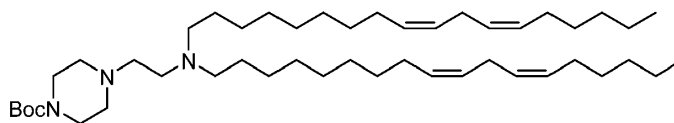


[1503] A una soluzione di (9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il metansolfonato (10,0 g, 29,0 mmol) in dietiletere (372 mL) è stato aggiunto bromuro di magnesio etil etere (22,5 g, 87,1 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. La miscela è stata spenta per aggiunta di acqua ed estratta con dietiletere. Gli strati organici combinati sono stati lavati con K₂CO₃ all'1%, soluzione salina, essiccati su Na₂SO₄ anidro, filtrati e concentrati *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO fornita (6Z,9Z)-18-
15 bromoottadeca-6,9-diene (8,9 g, 93%).

[1504] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,36 (m, 4H); 3,41 (t, 2H); 2,77 (t, 2H); 2,05 (q, 4H); 1,86 (m, 2H); 1,48-1,22 (br, m, 16H); 0,89 (t, 3H).

Fase 3: *terz*-Butil 4-(2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato

[1505]

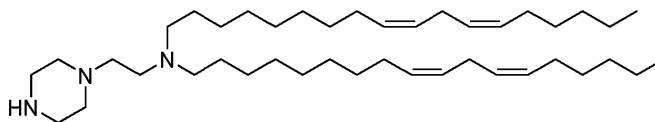


[1506] Una miscela di (6Z,9Z)-18-bromoottadeca-6,9-diene (1,5 g, 4,55 mmol), 4-(2-amminoetil)-1-boc-piperazina (1,04 g, 4,54 mmol), K₂CO₃ (1,27 g, 9,10 mmol), KI (75 mg, 0,452 mmol), in 22 mL di MeCN è stato lasciato agitare a temperatura ambiente per 48 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato estratto con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-50% di DCM/[DCM, 20% di MeOH, 1% di NH₄OH]) ha fornito *terz*-butil 4-(2-(di(9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (1,08 g, 1,49 mmol, 65%).

[1507] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,43-5,26 (br, m, 8H); 3,42 (t, 4H); 2,77 (m, 4H); 2,57 (m, 2H); 2,41 (br, m, 10H); 2,04 (br, m, 8H); 1,60-1,00 (br, m, 45H); 0,89 (t, 6H).

Fase 4: Composto 19-3: (9Z,12Z)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)-N-(2-(piperazin-1-il)etil)ottadeca-9,12-dien-1-ammina

[1508]



[1509] Una soluzione di *terz*-butile 4-(2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)piperazin-1-carbossilato (1,06 g, 1,46 mmol) in 6 mL di DCM sono stati trattati con TFA (5,6 mL, 73 mmol). Dopo 4 ore la miscela è stata concentrata. Il residuo grezzo è stato ripreso in cloroformio, lavato con Na₂CO₃ al 5%, soluzione salina, essiccato su Na₂SO₄ anidro e concentrato *sotto vuoto*. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% di DCM/[DCM, 20% di MeOH, 1% di NH₄OH]) e cromatografia flash ISCO C18 (50-100% [MeCN 1% TFA]/[H₂O 1% TFA]). Le frazioni desiderate sono state lavate con Na₂CO₃ al 5% ed estratte con esani. Gli esani sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su Na₂SO₄

anidro e concentrati *sotto vuoto* per fornire (9Z,12Z)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)-N-(2-(piperazin-1-il)etil)ottadeca-9,12-dien-1-ammina (108 mg, 12%).

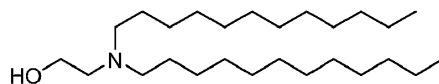
[1510] UPLC/ELSD: RT = 2,98 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 626,75 per C₄₂H₇₉N₃

[1511] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,47-5,25 (br, m, 8H); 2,92 (m, 4H); 2,76 (m, 4H);

5 2,66 (br, m, 2H); 2,50 (br, m, 10H); 2,05 (m, 8H); 1,60-1,10 (br, m, 36H), 0,89 (t, 6H).

CP. Composto 19-4: Intermedio 1 di N-dodecil-N-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina: 2-(Didodecilammino)etan-1-olo

[1512]



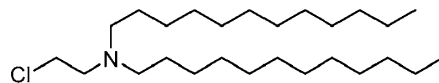
10 [1513] A una soluzione 1-bromododecano (10 g, 40,1 mmol) in MeCN (84 mL) è stata aggiunta etanolammina (1,10 mL, 18,2 mmol), K₂CO₃ (11,1 g, 80,1 mmol) e KI (302 mg, 1,82 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 48 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato estratto con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante
15 cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito 2-(didodecilammino)etan-1-olo (3,87 g, 53%).

[1514] UPLC/ELSD: RT = 2,69 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 398,56 per C₂₆H₅₅NO

[1515] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,57 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,49 (br. m, 4H); 1,48 (br. m, 4H); 1,29 (br. m, 36H); 0,91 (t, 6H).

20 **Fase 2: N-(2-cloroetil)-N-dodecildodecan-1-ammina**

[1516]



[1517] A una soluzione a 0 °C di 2-(didodecilammino)etan-1-olo (3,87 g, 9,73 mmol) trietilammina (1,76 mL, 12,6 mmol) in DCM (50 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una
25 soluzione di metansolfonil cloruro (0,941 mL, 12,2 mmol) in DCM (5 mL). La reazione è stata

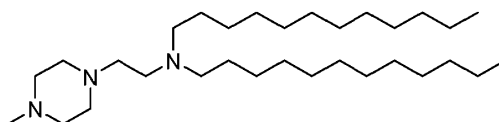
lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata per 16 ore. La miscela è stata spenta per aggiunta di acqua ed estratta con DCM. Lo strato organico è stato lavato con NaHCO₃ saturato, soluzione salina, essiccato su Na₂SO₄ anidro, filtrato e concentrato *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-10% di EtOAc/esani) ha fornito *N*-(2-cloroetil)-

5 *N*-dodecildodecan-1-ammina (1,92 g, 47%).

[1518] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,51 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,47 (br. m, 4H); 1,44 (br. m, 4H); 1,28 (br. m, 36H); 0,90 (t, 6H).

Fase 3: Composto 19-4: *N*-dodecil-*N*-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina

[1519]



10

[1520] Una miscela di *N*-metilpiperazina (40 μL, 0,36 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (166 mg, 0,4 mmol) e K₂CO₃ (50 mg, 0,36 mmol) in 2 mL di MeCN è stato lasciato agitare a 82 °C per 12 ore. La reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente, è stata filtrata e concentrata. Il materiale grezzo è stato purificato mediante

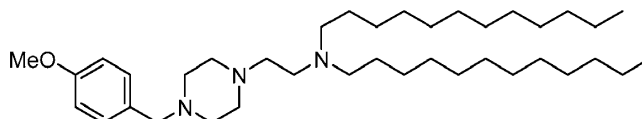
15 cromatografia su gel di silice (0-20% di MeOH in DCM con 1% di NH₄OH) per fornire *N*-dodecil-*N*-(2-(4-metilpiperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina (87,9 mg, 51%).

[1521] UPLC: RT = 2,24 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 480,662 per C₃₁H₆₅N₃

[1522] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 2,49 (m, 16H); 2,36 (s, 3H); 1,50 (m, 4H); 1,34 (m, 36H); 0,96 (t, 6H).

20 **CQ. Composto 19-5: *N*-dodecil-*N*-(2-(4-(4-metossibenzil)piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina**

[1523]



Formula chimica: $C_{38}H_{71}N_3O$

Peso molecolare: 586.01

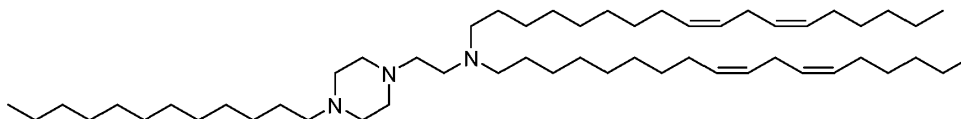
[1524] Una miscela di 1-(4-metossibenzil)piperazina (206 mg, 1,0 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (289 mg, 0,69 mmol), K_2CO_3 (286 mg, 2,07 mmol) e KI (11 mg, 0,069 mmol) in 3,5 mL di MeCN sono stati lasciati agitare a 80 °C per 2 ore. Dopo questo
5 tempo la reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente ed è stata spenta con acqua. La miscela è stata estratta tre volte con EtOAc. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su $MgSO_4$, filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-20% MeOH in DCM) per fornire *N*-dodecil-*N*-(2-(4-(4-metossibenzil)piperazin-1-il)etil)dodecan-1-ammina (0,24 g, 59%).

10 [1525] UPLC: RT = 2,30 min. MS (ES): m/z (MH^+) 586,92 per $C_{38}H_{71}N_3O$

[1526] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 7,19 (d, 2H); 6,83 (d, 2H); 3,78 (s, 3H); 3,42 (s, 2H); 2,99-2,45 (br, m, 16H); 1,71-1,24 (br, m, 40H); 0,86 (t, 6H).

CR. Composto 19-6: (9Z,12Z)-*N*-(2-(4-dodecilpiperazin-1-il)etil)-*N*-((9Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina

15 [1527]



Formula chimica: $C_{54}H_{103}N_3$

Peso molecolare: 794.44

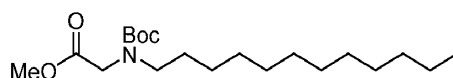
[1528] Una miscela di (9Z,12Z)-*N*-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)-*N*-(2-(piperazin-1-il)etil)ottadeca-9,12-dien-1-ammina (54 mg, 0,086 mmol), 1-bromododecano (24 mg, 0,095 mmol), K_2CO_3 (24 mg, 0,172 mmol), KI (2 mg, 0,012 mmol), in 1,5 mL di THF è stato lasciato
20 agitare a 65 °C per 16 ore. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, diluita con H_2O ed estratta con EtOAc. Le sostanze organiche sono state lavate con soluzione salina, essiccate su $MgSO_4$ anidro, filtrate e concentrate *sotto vuoto*. La purificazione mediante

cromatografia flash su silice ISCO (0-100% DCM/[DCM 20% MeOH 1% Et₃N]) ha fornito (9Z,12Z)-*N*-(2-(4-dodecylpiperazin-1-il)etile)-*N*-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina (51 mg, 0,064 mmol, 74%). UPLC: RT = 3,40 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 795,12 per C₅₄H₁₀₃N₃.

5 **CS. Composto 20-1: *N*-(2-(Didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina**

Fase 1: Metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-dodecilglicinato

[1529]

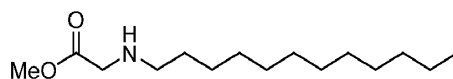


[1530] Una soluzione a 0 °C di *N*-(*terz*-butossicarbonil)glicina metil estere (7,7 g, 40,7 mmol) in DMF (100 mL) è stata trattata con NaH (60%, 1,71 g, 42,7 mmol) e la miscela è stata lasciato mescolare per 30 minuti. La soluzione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente prima dell'aggiunta di 1-bromododecano (15,2 g, 61,0 mmol) e la reazione è stata lasciata agitare per una notte. La reazione è stata spenta con acqua ed estratta con EtOAc. Gli estratti organici sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su Na₂SO₄ anidro, filtrati e concentrati nel vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% EtOAc/esani) ha fornito metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-dodecilglicinato (4,03 g, 28%).

[1531] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,01-3,84 (br, m, 2H); 3,75 (s, 3H); 3,27 (br, m, 2H); 1,67-1,39 (br, m, 11H); 1,28 (br, 18H); 0,90 (t, 3H).

Fase 2: Metil dodecilglicinato

20 [1532]



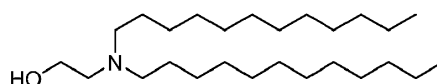
[1533] A una soluzione a 0 °C di metil *N*-(*terz*-butossicarbonil)-*N*-dodecilglicinato (4,03 g, 11,3 mmol) in DCM (17 mL) è stato aggiunto goccia a goccia TFA (17 mL, 226 mmol). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata per 6 ore. La miscela di reazione è stata concentrata sotto vuoto e il materiale grezzo è stato sciolto in DCM. La soluzione è stata lavata

con NaOH al 10%, soluzione salina, essiccata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e concentrata sotto vuoto per fornire metil dodecilglicinato (2,84 g, 98%).

[1534] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,75 (s, 3H); 3,44 (s, 2H); 2,62 (t, 2H); 1,70 (br, 1H); 1,51 (m, 2H); 1,29 (br, 18H); 0,90 (t, 3H).

5 **Fase 3: 2-(Didodecilammino)etan-1-olo**

[1535]



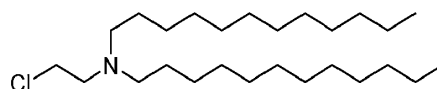
[1536] A una soluzione 1-bromododecano (10 g, 40,1 mmol) in MeCN (84 mL) è stata aggiunta etanolammina (1,10 mL, 18,2 mmol), K₂CO₃ (11,1 g, 80,1 mmol) e KI (302 mg, 1,82 mmol). La
10 reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 48 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato estratto con esani e gli estratti combinati sono stati concentrati sotto vuoto. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito 2-(didodecilammino)etan-1-olo (3,87 g, 53%).

15 [1537] UPLC/ELSD: RT = 2,69 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 398,56 per C₂₆H₅₅NO

[1538] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,57 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 2,49 (br, m, 4H); 1,48 (br, m, 4H); 1,29 (br, 36H); 0,91 (t, 6H).

Fase 4: N-(2-cloroetil)-N-dodecildodecan-1-ammina

[1539]



20

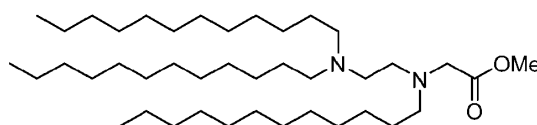
[1540] A una soluzione a 0 °C di 2-(didodecilammino)etan-1-olo (3,87 g, 9,73 mmol) e trietilammina (1,76 mL, 12,6 mmol) in DCM (50 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di metansolfonil cloruro (0,941 mL, 12,2 mmol) in DCM (5 mL). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata per 16 ore. La miscela è stata spenta per
25 aggiunta di acqua ed estratta con DCM. Lo strato organico è stato lavato con NaHCO₃ saturato,

soluzione salina, essiccato su Na₂SO₄ anidro, filtrato e concentrato *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-10% di EtOAc/esani) ha fornito *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (1,92 g, 47%).

[1541] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,51 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,47 (br, m, 4H); 1,44 (br, m, 4H); 1,28 (br, 36H); 0,90 (t, 6H).

Fase 5: Metil *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato

[1542]



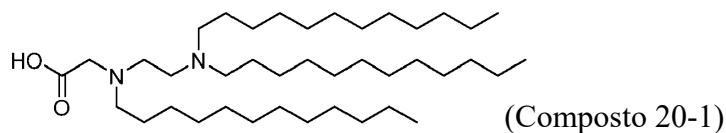
[1543] A una soluzione di metil dodecilglicinato (425 mg, 1,65 mmol) in MeCN (10 mL) è stata
aggiunta *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (825 mg, 1,98 mmol), K₂CO₃ (457 mg,
3,30 mmol) e KI (27 mg, 0,165 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 72 ore.
La miscela di reazione è stata filtrata e i solidi sono stati lavati con esani. Il filtrato è stato
concentrato sotto vuoto a dare il prodotto grezzo. La purificazione mediante cromatografia flash
su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito metil *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-
dodecilglicinato (652 mg, 62%).

[1544] UPLC/ELSD: RT = 3,77 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 638,18 per C₄₁H₈₄N₂O₂

[1545] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,72 (s, 3H); 3,41 (s, 2H); 2,90-2,20 (br. m, 10H);
1,60-1,00 (br. m, 60H); 0,90 (t, 9H).

Fase 6: *N*-(2-(Didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina

[1546]



Formula chimica: C₄₀H₈₂N₂O₂

Peso molecolare: 623.11

[1547] Una soluzione di metil *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicinato (652 mg, 1,02

mmol) in THF (6 mL) e LiOH da 1M (5 mL, 5 mmol) è stata lasciata agitare a 65 °C per 16 ore. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e acidificata con HCl al 10%. La miscela è stata estratta con cloroformio e le sostanze organiche sono state lavate con soluzione salina, essiccate su Na₂SO₄ anidro, filtrate e concentrate *sotto vuoto*. La purificazione mediante
5 cromatografia flash su silice ISCO (0-20% di MeOH/DCM) ha fornito *N*-(2-(didodecilammino)etil)-*N*-dodecilglicina (153 mg, 24%).

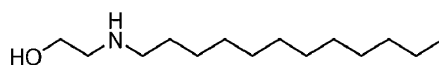
[1548] UPLC/ELSD: RT = 3,60 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 624,07 per C₄₀H₈₂N₂O₂

[1549] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,02-3,40 (br. m, 6H); 3,16 (br. 6H); 1,78 (br. 6H); 1,46-1,01 (br. m, 54H); 0,90 (t, 9H).

10 **CT. Composto 20-2: Pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato**

Fase 1: 2-(Dodecilammino)etan-1-olo

[1550]

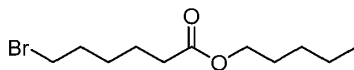


15 [1551] Il metil dodecilglicinato (3,4 g, 13,2 mmol) è stato sciolto in 2 mL di THF in atmosfera di N₂ e la beuta di reazione è stato lasciata raffreddare in un bagno di ghiaccio. Alla soluzione è stato aggiunto lentamente LiAlH₄ (0,55 g, 14,5 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione alla stessa temperatura per 1 ora. Dopo questo tempo la reazione è stata spenta
20 di H₂O. La reazione è stata quindi filtrata e il filtrato è stato concentrato *sotto vuoto*. Il materiale grezzo è stato purificato *mediante* cromatografia su gel di silice (0-20% di MeOH in DCM, con 1% di NH₄OH) per fornire 2-(dodecilammino)etan-1-olo (1,9 g, 8,28 mmol, resa al 63%).

[1552] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,63 (t, 2H); 2,78 (t, 2H); 2,63 (t, 2H); 1,48 (m, 2H); 2,14 (m, 18H); 0,88 (t, 3H).

25 **Fase 2: Pentil 6-bromoesanoato**

[1553]



Formula chimica: $C_{11}H_{21}BrO_2$

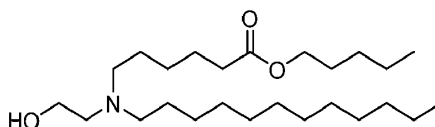
Peso molecolare: 265.19

[1554] A una soluzione di acido 6-bromoesanoico (2 g, 10,3 mmol) e pentan-1-olo (2,2 mL, 20,5 mmol) in 26 mL di DCM, EDC·HCl (1,97 g, 10,3 mmol) e DMAP (0,26 g, 2,1 mmol) sono stati aggiunti. La soluzione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. Dopo questo tempo la reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di acqua. La miscela è stata estratta tre volte con DCM. Le sostanze organiche sono state messe in pool e lavate con $NaHCO_3$ saturo, acido citrico al 10% e soluzione salina. Le sostanze organiche sono state quindi essiccate su $MgSO_4$, filtrate e concentrate *sotto vuoto*. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-30% di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato (2,3 g, 8,67 mmol).

[1555] 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,06 (t, 2H); 3,39 (t, 2H); 2,30 (t, 2H); 1,84 (m, 2H); 1,62(m, 4H);1,46 (m, 2H); 1,31 (m, 4H); 0,88 (t, 3H).

Fase 3: Pentil 6-(dodecil(2-idrossietil)ammino)esanoato

15 [1556]



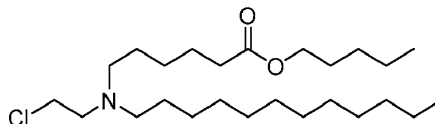
[1557] A una soluzione di 2-(dodecilammino)etan-1-olo (0,50 g, 2,18 mmol) in 10 mL di THF, è stato aggiunto pentile 6-bromoesanoato (0,87 g, 3,27 mmol) seguito da K_2CO_3 (0,60 g, 4,36 mmol) e KI (36 mg, 0,22 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione sotto N_2 a 65 °C per 24 ore. Dopo questo tempo la reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e la reazione è stata diluita con acqua. La miscela è stata estratta tre volte con EtOAc. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su $MgSO_4$, filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-20%

di EtOAc in esani) per ottenere pentil 6-(dodecil(2-idrossietil)ammino)esanoato (300 mg, 33%).

[1558] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 4,04 (t, 2H); 3,51 (m, 2H); 2,56 (m, 2H); 2,42 (m, 4H); 2,28 (t, 2H); 1,60 (m, 4H); 1,42 (m, 4H); 1,30-1,24 (m, 24); 0,87 (m, 6H).

Fase 4: Pentil 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato

5 [1559]

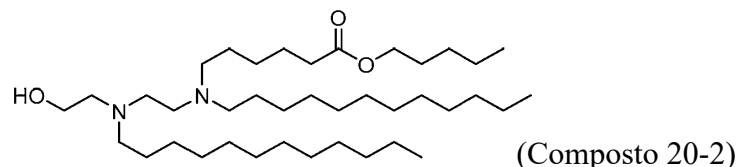


[1560] A una soluzione a 0 °C di pentil 6-(dodecil(2-idrossietil)ammino)esanoato (300 mg, 0,73 mmol) in 2 mL di DCM, è stato aggiunto metansolfonil cloruro (0,062 mL, 0,80 mmol), seguito da trietilammina (0,13 mL, 1,3 mmol). La reazione è stata lasciata riscaldare lentamente a temperatura ambiente e agitata per 12 ore sotto N_2 . La reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di acqua ed è stata estratta con DCM. Le sostanze organiche messe in pool sono state essiccate su MgSO_4 , filtrate e concentrate. Lo strato acquoso è stato riestratto tre volte con EtOAc. Le sostanze organiche sono state messe in pool e lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO_4 , filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato combinato e la purificazione mediante cromatografia su gel di silice (0-30% di EtOAc in esani) ha fornito pentil 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato (285 mg, 66%).

[1561] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 4,04 (t, 2H); 3,45 (t, 2H); 2,74 (t, 2H); 2,43 (m, 4H); 2,28 (t, 2H); 1,65-1,59 (m, 4H); 1,31-1,24 (m, 32H); 0,88 (m, 6H).

Fase 5: Pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato

20 [1562]



[1563] A una soluzione di pentil 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato (94 mg, 0,22 mmol) in MeCN (2 mL) e THF (2 mL) è stato aggiunto 2-(dodecilammino)etan-1-olo (50 mg, 0,22

mmol), K_2CO_3 (60 mg, 0,44 mmol) e KI (4 mg, 0,022 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 65 °C per 18 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani ed EtOAc. Il filtrato è stato estratto con EtOAc tre volte. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con acqua e soluzione salina, essiccate su Na_2SO_4 , filtrate e concentrate *sotto vuoto*. Purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% DCM, [20% MeOH, 1% NH_4OH]/DCM) fornito pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato (21 mg, 15%).

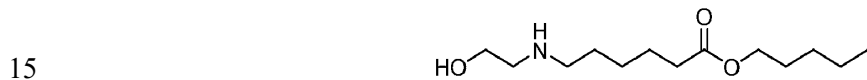
[1564] UPLC/ELSD: RT = 2,86 min. MS (ES): m/z (MH^+) 625,86 per $C_{39}H_{80}N_2O_3$

[1565] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,07-4,05 (m, 2H); 3,53 (m, 2H), 2,60-2,43 (br, m, 12H); 2,33-2,29 (m, 2H); 1,65-1,64 (m, 4H); 1,46 (m, 6H); 1,34-1,28 (br, m, 42H); 0,92-0,90 (m, 9H).

CU. Composto 20-3: Pentil 6-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino)esanoato

Fase 1: Pentil 6-((2-idrossietil)ammino)esanoato

[1566]



[1567] A una soluzione pentil 6-bromoesano (4,65 g, 17,5 mmol) in MeCN (88 mL) sono stati aggiunti etanolamina (1,10 mL, 17,5 mmol), K_2CO_3 (4,85 g, 35,1 mmol) e KI (291 mg, 1,75 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a 82 °C per 48 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, filtrata e i solidi sono stati lavati con esani ed EtOAc. Il filtrato è stato estratto con EtOAc tre volte. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con acqua e soluzione salina, essiccate su Na_2SO_4 , filtrate e concentrate *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-100% di DCM, [20% MeOH, 1% NH_4OH]/DCM) ha fornito pentil 6-((2-idrossietil)ammino)esanoato (1,74 g, 41%).

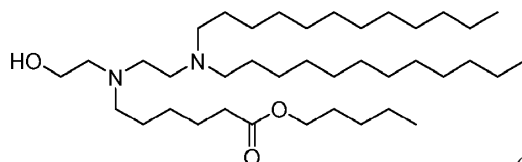
[1568] UPLC/ELSD: RT = 0,30 min. MS (ES): m/z (MH^+) 246,21 per $C_{13}H_{27}NO_3$

25 [1569] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,69 (t, 2H), 2,82 (t, 2H); 2,68 (t, 2H);

2,35-2,31 (m, 4H); 1,72-1,52 (br, m, 6H); 1,39-1,32 (br, m, 6H); 0,93 (t, 3H).

Fase 2: Pentil 6-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino)esanoato

[1570]



(Composto 20-3)

Formula chimica: $C_{39}H_{80}N_2O_3$

Peso molecolare: 625.08

5

[1571] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, pentil 6-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino) l'esanoato è stato sintetizzato da pentile 6-((2-idrossietil)ammino)esanoato

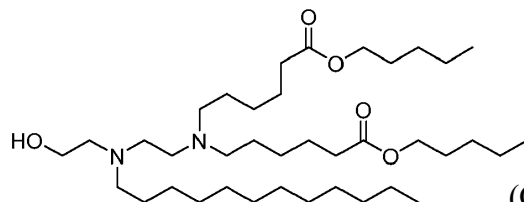
(108 mg, 0,44 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (183 mg, 0,44 mmol),
10 K_2CO_3 (122 mg, 0,88 mmol) e KI (7,3 mg, 0,044 mmol) in MeCN (1 mL) e THF (1 mL). Resa (88 mg, 32%).

[1572] UPLC/ELSD: RT = 2,92 min. MS (ES): m/z (MH^+) 626,0 per $C_{39}H_{80}N_2O_3$

[1573] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,07 (t, 2H); 3,53 (t, 2H), 2,62-2,40 (br, m, 12H); 2,31 (t, 2H); 1,70-1,60 (m, 4H); 1,53-1,43 (m, 6H); 1,27 (br, m, 42H); 0,91 (m, 9H).

15 **CV. Composto 20-4: Dipentil 6,6'-((2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)azandiil)diesanoato**

[1574]



(Composto 20-4)

[1575] Allo stesso modo del pentil-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, dipentil 6,6'-((2-(dodecil(2-

20

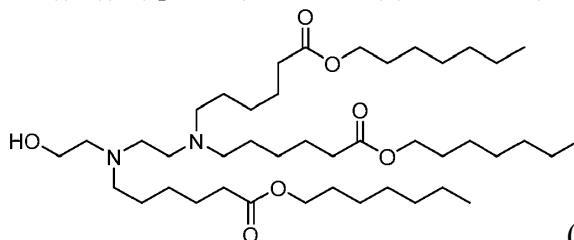
idrossietil)ammino)etile)azanedii)diesanoato è stato sintetizzato da 2-(dodecilammino)etan-1-olo (60 mg, 0,26 mmol), dipentil 6,6'-((2-cloroetil)azanedii)diesanoato (118 mg, 0,26 mmol), K₂CO₃ (73 mg, 0,53 mmol) e KI (5 mg, 0,026 mmol) in MeCN (1 mL) e THF (1 mL). Resa (60 mg, 36%).

5 [1576] UPLC/ELSD: RT = 2,37 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 641,95 per C₃₈H₇₆N₂O₅

[1577] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 4H); 3,57 (m, 2H), 2,64-2,53 (br, m, 12H); 2,32 (t, 4H); 1,72-1,60 (m, 8H); 1,50 (m, 6H); 1,38-1,28 (br, m, 30H); 0,95-0,88 (m, 9H).

CW. Composto 20-5:

[1578] Dieptil 6,6'-((2-((6-(eptilossi)-6-ossoesil)(2 idrossietil)ammino)etil)azandiil)diesanoato



(Composto 20-5)

10

[1579] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, dieptile 6,6'-((2-((6-(eptilossi)-6-ossoesil)(2-idrossietil)ammino)etil)azanedii)diesanoato è stato sintetizzato da eptil 6-((2-idrossietil)ammino)esanoato (100 mg, 0,37 mmol), dieptile 6,6'-((2-cloroetile)azanedii)diesanoato (184 mg, 0,37 mmol), K₂CO₃ (101 mg, 0,73 mmol) e KI (6 mg, 0,037 mmol) in MeCN (2 mL) e THF (2 mL). Resa (91 mg, 34%).

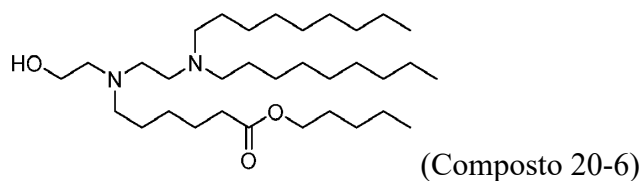
15

[1580] UPLC/ELSD: RT = 3,33 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 742,08 per C₄₃H₈₄N₂O₇ ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 6H); 3,66 (m, 2H), 3,23-2,53 (br, m, 12H); 2,37-2,30 (m, 6H); 1,74-1,31 (br, m, 48H); 0,93-0,89 (m, 9H).

20

CX. Composto 20-6: Pentil 6-((2-(dinonilammino)etil)(2-idrossietil)ammino)esanoato

[1581]



[1582] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, pentil 6-((2-(dionilammino)etil)(2-idrossietil)ammino) l'esanoato è stato sintetizzato da pentile 6-((2-idrossietil)ammino)esanoato

5 (100 mg, 0,41 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (101 mg, 0,41 mmol), K_2CO_3 (108 mg, 0,82 mmol) e KI (7 mg, 0,041 mmol) in MeCN (1 mL) e THF (1 mL). Resa (25 mg, 13%).

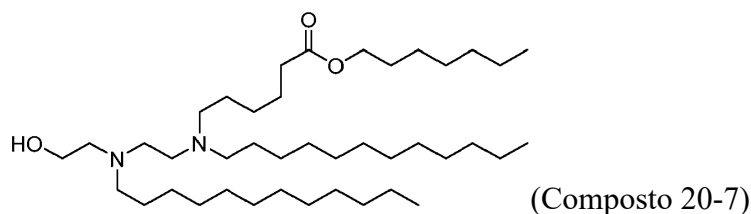
[1583] UPLC/ELSD: RT = 3,37 min. MS (ES): m/z (MH^+) 541,90 per $C_{33}H_{68}N_2O_3$

[1584] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 4,08 (t, 2H); 3,54 (t, 2H), 2,63-2,42 (br, m, 12H);

10 2,32 (t, 2H); 1,71-1,61 (m, 4H); 1,51-1,46 (m, 6H); 1,35-1,29 (br, m, 30H); 0,95-0,88 (m, 9H).

CX. Composto 20-7: Eptil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato

[1585]



15 [1586] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, eptil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etile)ammino)esanoato è stato sintetizzato da 2-(dodecilammino)etan-1-olo (100 mg, 0,37 mmol), eptil 6-((2-cloroetil)(dodecil)ammino)esanoato (152 mg, 0,37 mmol), K_2CO_3 (101 mg, 0,73 mmol) e KI (6 mg, 0,037 mmol) in MeCN (2 mL) e THF (2 mL). Resa

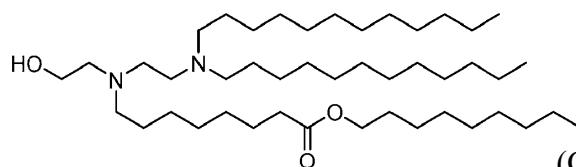
20 (41 mg, 17%).

[1587] UPLC/ELSD: RT = 3,14 min. MS (ES): m/z (MH^+) 654,0 per $C_{41}H_{84}N_2O_3$

[1588] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,55 (t, 2H), 2,63-2,45 (br, m, 12H); 2,32 (t, 2H); 1,71-1,59 (m, 4H); 1,54-1,28 (br, m, 52H); 0,92-0,88 (m, 9H).

CY. Composto 20-8: Nonil 8-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino)ottanoato

[1589]



(Composto 20-8)

5

[1590] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, nonil 8-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino) l'ottanoato è stato sintetizzato da nonil 8-((2-idrossietil)ammino)ottanoato (240 mg, 0,73 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (335 mg, 0,80 mmol), K₂CO₃ (121 mg, 0,88 mmol) e KI (12 mg, 0,072 mmol) in MeCN (1,5 mL) e THF (1,5 mL). Resa (122 mg, 24%).

10

[1591] UPLC/ELSD: RT = 3,41 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 709,93 per C₄₅H₉₂N₂O₃

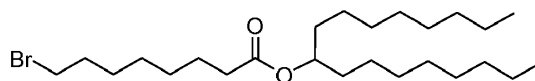
[1592] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,08 (t, 2H); 3,56 (m, 2H), 2,91-2,37 (br, m, 12H); 2,31 (m, 2H); 1,64(br, m, 4H); 1,55-1,20(br, m, 60H); 0,91 (m, 9H).

15

CZ: Composto 20-9: Eptadecan-9-il 8-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino)ottanoato

Fase 1: eptadecan-9-il 8-bromoottanoato

[1593]



20

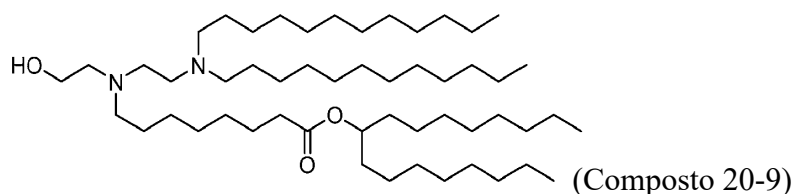
[1594] A una soluzione di acido 8-bromoottanoico (1,04 g, 4,6 mmol) ed eptadecan-9-olo (1,5 g, 5,8 mmol) in diclorometano (20 mL) è stato aggiunto *N*-(3-dimetilamminopropil)-*N*-etilcarbodiimide cloridrato (1,1 g, 5,8 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (3,3 mL, 18,7 mmol) e DMAP (114 mg, 0,9 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 18

ore. La reazione è stata diluita con diclorometano ed estratta con bicarbonato di sodio saturo. Lo strato organico è stato separato, lavato con soluzione salina ed essiccato su MgSO₄. Lo strato organico è stato filtrato e il filtrato è stato evaporato *sotto vuoto*. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-10% di etilacetato in esani) per ottenere eptadecan-9-il 8-bromoottanoato (875 mg, 1,9 mmol, 41%).

[1595] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,89 (m, 1H); 3,42 (m, 2H); 2,31 (m, 2H); 1,89 (m, 2H); 1,73-1,18 (br, m, 36H); 0,88 (m, 6H).

Fase 2: Eptadecan-9-il 8-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino)ottanoato

[1596]



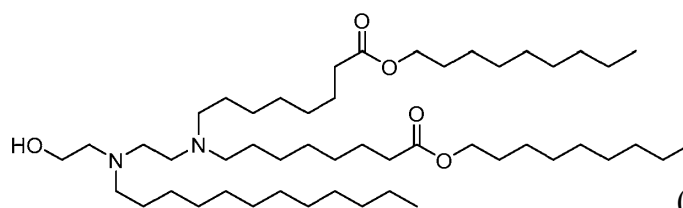
[1597] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, eptadecan-9-il 8-((2-(didodecilammino)etil)(2-idrossietil)ammino)ottanoato è stato sintetizzato da eptadecan-9-il 8-((2-idrossietil)ammino)ottanoato (100 mg, 0,23 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (94 mg, 0,23 mmol), K₂CO₃ (63 mg, 0,45 mmol) e KI (4 mg, 0,023 mmol) in MeCN (1 mL) e THF (1 mL). Resa (107 mg, 57%).

[1598] UPLC/ELSD: RT = 3,91 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 822,3 per C₅₃H₁₀₈N₂O₃

[1599] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,89 (p, 1H); 3,56 (m, 2H), 2,62-2,45 (br, m, 12H); 2,30 (t, 2H); 1,88-1,11 (br, m, 78H); 0,92-0,88 (m, 12H).

20 **DA. Composto 20-10: Dinonil 8,8'-((2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)azandiil)diottanoato**

[1600]



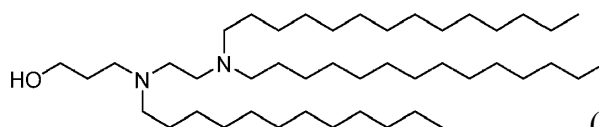
[1601] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, dinonil 8,8'-((2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)azanediil)diottanoato è stato sintetizzato da 2-(dodecilammino)etan-1-olo (100 mg, 0,44 mmol), dinonil 8,8'-((2-cloroetil)azanediil)diottanoato (269 mg, 0,44 mmol), K₂CO₃ (121 mg, 0,87 mmol) e KI (72 mg, 0,044 mmol) in MeCN (2,5 mL) e THF (2,5 mL). Resa (172 mg, 49%).

[1602] UPLC/ELSD: RT = 4,09 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 810,31 per C₅₀H₁₀₀N₂O₅

[1603] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 4,07 (t, 4H); 3,55 (m, 2H), 2,64-2,47 (br, m, 12H); 2,31 (t, 4H); 1,66-1,59 (br, m, 8H); 1,46-1,28 (br, m, 60H); 0,92-0,88 (m, 9H).

DB: Composto 20-11: 3-((2-(Ditradecilammino)etil)(dodecil)ammino)propan-1-olo

[1604]



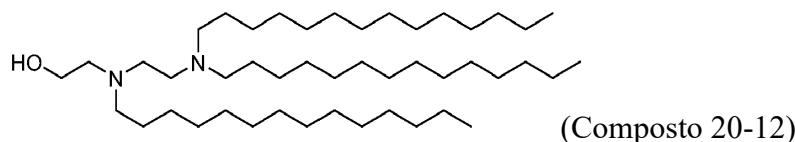
[1605] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 3-((2-(ditradecilammino)etil)(dodecil)ammino)propan-1-olo è stato sintetizzato da 3-(dodecilammino)propan-1-olottanoato (50 mg, 0,21 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-tetradeciltetradecan-1-ammina (109 mg, 0,23 mmol), K₂CO₃ (57 mg, 0,41 mmol) e KI (3,4 mg, 0,021 mmol) in MeCN (1 mL) e THF (1 mL). Resa (65 mg, 46%).

[1606] UPLC/ELSD: RT = 3,65 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 679,81 per C₄₅H₉₄N₂O

[1607] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,76 (t, 2H); 2,63-2,42 (br, m, 12H), 1,66-1,26 (br, m, 70H); 0,90-0,86 (m, 9H).

DC: Composto 20-12: 2-((2-(Ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etan-1-olo

[1608]



[1609] Allo stesso modo del pentile 6-(dodecil(2-(dodecil(2-

5 idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(ditetradecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 2-(tetradecilammino)etan-1-olo (100 mg, 0,39 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-tetradeciltetradecan-1-ammina (184 mg, 0,39 mmol), K_2CO_3 (107 mg, 0,78 mmol) e KI (6,5 mg, 0,039 mmol) in MeCN (2 mL) e THF (2 mL). Resa (87 mg, 32%).

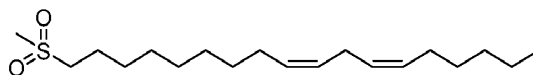
10 [1610] UPLC/ELSD: RT = 3,81 min. MS (ES): m/z (MH^+) 694,02 per $C_{46}H_{96}N_2O$

[1611] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,56 (m, 2H); 2,61-2,45 (br, m, 12H), 1,47-1,29 (br, m, 72H); 0,91 (m, 9H).

DD: Composto 20-13: 2-((2-(Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)(dodecil)ammino)etan-1-olo

15 **Fase 1: (6Z,9Z)-18-(metilsolfonil)ottadeca-6,9-diene**

[1612]



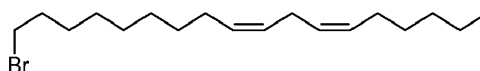
[1613] A una soluzione a 0 °C di alcol linoleilico (10 mL, 31,2 mmol) e trietilammina (5,68 mL, 40,5 mmol) in DCM (50 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di metansolfonil cloruro (2,66 mL, 34,3 mmol) in DCM (20 mL). La reazione è stata lasciata tornare a temperatura ambiente e lasciata agitare per 4 ore. La miscela è stata spenta per aggiunta di acqua ed estratta con DCM. Lo strato organico è stato lavato con $NaHCO_3$ saturato, soluzione salina, essiccato su Na_2SO_4 anidro, filtrato e concentrato *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO (0-40% EtOAc/esani) ha fornito (6Z,9Z)-18-

(metilsulfonil)ottadeca-6,9-diene (10,0 g, 93%).

[1614] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,35 (m, 4H); 4,22 (t, 2H); 2,99 (s, 3H); 2,77 (t, 2H); 2,04 (q, 4H); 1,74 (m, 2H); 1,30 (br. m, 16H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: (6Z,9Z)-18-Bromoottadeca-6,9-diene

5 [1615]

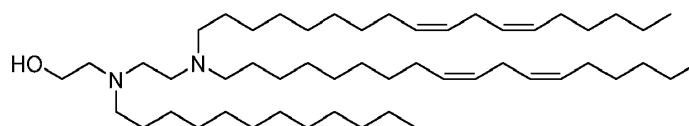


[1616] A una soluzione di (6Z,9Z)-18-(metilsulfonil)ottadeca-6,9-diene (10,0 g, 29,0 mmol) in dietiletere (372 mL) è stato aggiunto bromuro di magnesio etil etere (22,5 g, 87,1 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. La miscela è stata
10 spenta per aggiunta di acqua ed estratta con dietiletere. Gli strati organici combinati sono stati lavati con K₂CO₃ all'1%, soluzione salina, essiccati su Na₂SO₄ anidro, filtrati e concentrati *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO fornita (6Z,9Z)-18-bromoottadeca-6,9-diene (8,9 g, 93%).

[1617] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,36 (m, 4H); 3,41 (t, 2H); 2,77 (t, 2H); 2,05 (q, 4H); 1,86 (m, 2H); 1,48-1,22 (br, m, 16H); 0,89 (t, 3H).

Fase 3: 2-((2-(Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)(dodecil)ammino)etan-1-olo

[1618]



(Composto 20-13)

[1619] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(di(9 Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)(dodecil)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 2-(dodecilammino)etan-1-olo (50 mg, 0,22 mmol), (9Z,12Z)-N-(2-cloroetil)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina (126 mg, 0,22 mmol), K₂CO₃ (60 mg, 0,44 mmol) e KI (3,6 mg, 0,022 mmol) in MeCN (2 mL). Resa (33 mg, 20%).

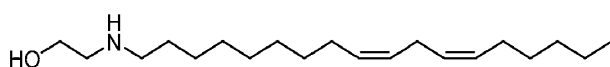
[1620] UPLC/ELSD: RT = 3,74 min. MS (ES): m/z (MH^+) 770,20 per $C_{52}H_{100}N_2O$

[1621] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5.39 (m, 8H); 3.55 (m, 2H), 2,80 (m, 4H); 2,61-2,44 (br, m, 12H); 2,07 (m, 8H); 1,46-1,29 (br, m, 56H); 0,92 (m, 9H).

DE: Composto 20-14: 2-((2-(Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)((9Z,12Z)-
5 ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo

Fase 1: 2-(((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo

[1622]



Formula chimica: $C_{20}H_{39}NO$

Peso molecolare: 309.54

10

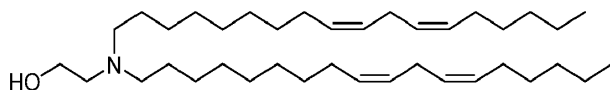
[1623] Allo stesso modo del 2-(dodecilammino)etan-1-olo, 2-(((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da etanolammina (0,37 mL, 6,1 mmol), (6Z,9Z)-18-bromoottadeca-6,9-diene (2,0 g, 6,1 mmol), K_2CO_3 (1,67 g, 12,1 mmol) e KI (101 mg, 0,607 mmol) in MeCN (28 mL). Resa (453 mg, 24%).

15 [1624] UPLC/ELSD: RT = 5,457 min. MS (ES): m/z (MH^+) 311,38 per $C_{20}H_{39}NO$

[1625] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,36 (m, 4H); 3,62 (t, 2H); 2,78 (m, 4H); 2,61 (t, 2H); 2,05 (m, 4H); 1,49 (m, 2H); 1,30 (br, m, 16H); 0,89 (t, 3H).

Fase 2: 2-(Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo

[1626]



20

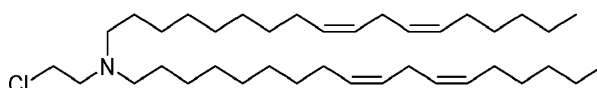
[1627] Allo stesso modo del 2-(didodecilammino)etan-1-olo, 2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da (6Z,9Z)-18-bromoottadeca-6,9-diene (4 g, 12,1 mmol), etanolammina, (0,334 mL, 5,52 mmol), K_2CO_3 (3,36 g, 24,3 mmol) e KI (92 mg, 0,552 mmol) in MeCN (26 mL). Resa (1,9 g, 62%).

[1628] UPLC/ELSD: RT = 6,80 min. MS (ES): m/z (MH^+) 557,94 per $C_{38}H_{71}NO$

[1629] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,35 (m, 8H); 3,52 (t, 2H); 2,77 (t, 4H); 2,57 (t, 2H); 2,43 (t, 4H); 2,04 (q, 8H); 1,48-1,18 (br. m, 36H); 0,89 (t, 6H).

Fase 3: (9Z,12Z)-N-(2-cloroetil)-N-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina

[1630]

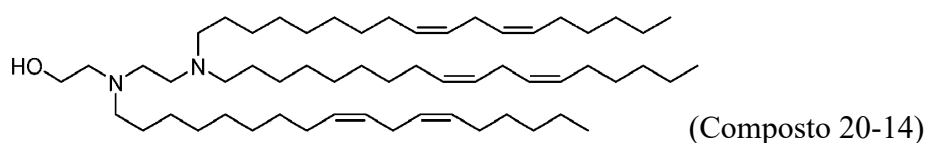


[1631] Allo stesso modo del composto *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina, (9Z,12Z)-*N*-(2-cloroetil)-*N*-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina è stata sintetizzata da 2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo (250 mg, 0,45 mmol), trietilammina (81 μ L, 0,58 mmol) e metansolfonil cloruro (38 μ L, 0,49 mmol) in DCM (2 mL). Resa (134 mg, 52%).

[1632] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,36 (m, 8H); 3,49 (t, 2H); 2,78 (m, 6H); 2,45 (t, 4H); 2,05 (q, 8H); 1,48-1,18 (br. m, 36H); 0,89 (t, 6H).

Fase 4; 2-((2-(Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo

[1633]



[1634] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etil)((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da (((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo (75 mg, 0,24 mmol), (9Z,12Z)-*N*-(2-cloroetil)-*N*-((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ottadeca-9,12-dien-1-ammina (154 mg, 0,27 mmol), K_2CO_3 (67 mg, 0,49 mmol), e KI (4 mg, 0,024 mmol) in MeCN (2 mL). Resa (35 mg,

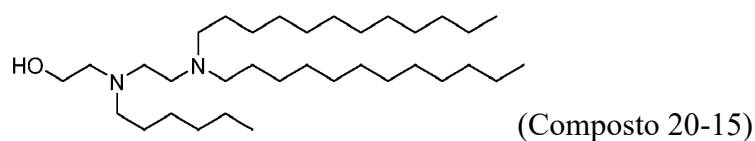
17%).

[1635] UPLC/ELSD: RT = 3,94 min. MS (ES): m/z (MH^+) 850,03 per $C_{58}H_{108}N_2O$

[1636] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,35 (br, m, 12H); 2,77 (t, 6H) 2,70-2,38 (br, m, 14H); 2,05 (m, 12H); 1,50-1,00 (br, m, 54H); 0,88 (t, 9H).

5 **DF: Composto 20-15: 2-((2-(Didodecilammino)etil)(esil)ammino)etan-1-olo**

[1637]



[1638] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(didodecilammino)etil)(esil)ammino)etan-1-olo

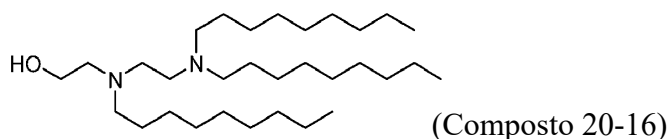
10 è stato sintetizzato da 2-(esilammino)etan-1-olo (50 mg, 0,34 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (143 mg, 0,34 mmol), K_2CO_3 (95 mg, 0,69 mmol) e KI (5,7 mg, 0,034 mmol) in MeCN (2 mL). Resa (145 mg, 80%).

[1639] UPLC/ELSD: RT = 2,73min. MS (ES): m/z (MH^+) 525,66 per $C_{34}H_{72}N_2O$

15 [1640] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,54 (m, 2H); 2,61-2,44 (br, m, 12H), 1,46-1,28 (br, m, 48H); 0,90 (m, 9H).

DG: Composto 20-16: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etan-1-olo

[1641]



20 [1642] A una soluzione di 2-((2-amminoetil)ammino)etan-1-olo (2,0 g, 18,6 mmol) e DCE (50 mL) a 0 °C è stato aggiunto nonanale (12,8 mL, 74,6 mmol), seguito da AcOH (3,2 mL, 55,9 mmol). La reazione è stata lasciata in agitazione a 0 °C per 20 minuti. È stato aggiunto $Na(OAc)_3BH$ (15,8 g, 74,6 mmol) e la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente e agitata per 18 ore a temperatura ambiente. La miscela è stata spenta mediante

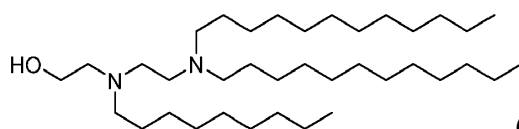
l'aggiunta lenta di NaHCO₃ acquoso saturo ed estratta con DCM tre volte. Gli strati organici combinati sono stati essiccati su Na₂SO₄ anidro, filtrati e concentrati *sotto vuoto*. La purificazione mediante cromatografia flash su silice ISCO ha fornito 2-((2-(dinonilammino)etil)(nonil)ammino)etan-1-olo. Resa (75 mg, 0,8%).

5 [1643] UPLC/ELSD: RT = 2,28 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 483,47 per C₂₁H₆₆N₂O

[1644] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,53 (m, 2H); 2,61-2,41 (br, m, 12H), 1,43-1,25 (br, m, 42H); 0,86 (m, 9H).

DH: Composto 20-17: 2-((2-(Didodecilammino)etil)(nonil)ammino)etan-1-olo

[1645]



(Composto 20-17)

10

[1646] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(didodecilammino)etil)(nonil)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 2-(nonilammino)etan-1-olo (50 mg, 0,27 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (111 mg, 0,27 mmol), K₂CO₃ (74 mg, 0,53 mmol) e KI (4,4 mg, 0,027 mmol) in 1,4-diossano (1,5 mL). Resa (29 mg, 19%).

15

[1647] UPLC/ELSD: RT = 3,05 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 567,91 per C₃₇H₇₈N₂O

[1648] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,71 (m, 2H); 3,14-2,97 (br, m, 8H), 2,80 (m, 2H); 2,66 (m, 2H); 1,70 (m, 4H); 1,53 (m, 2H); 1,34-1,28 (br, m, 48H); 0,90 (m, 9H).

DI: Composto 20-18: 2-((2-(Dinonilammino)etil)(dodecil)ammino)etan-1-olo

20 [1649]



(Composto 20-18)

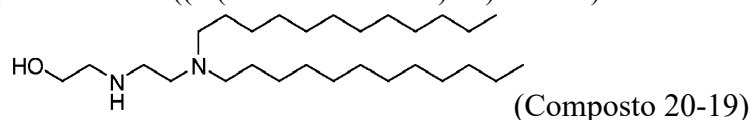
[1650] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(dinonilammino)etil)(dodecil)ammino)etan-1-

olo è stato sintetizzato da 2-(dodecilammino)etan-1-olo (100 mg, 0,44 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-nonilnonan-1-ammina (145 mg, 0,44 mmol), K₂CO₃ (120 mg, 0,87 mmol) e KI (7,2 mg, 0,044 mmol) in MeCN (1 mL) e THF (1 mL). Resa (155 mg, 67%).

[1651] UPLC/ELSD: RT = 2,78 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 525,99 per C₃₄H₇₂N₂O

5 [1652] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,55 (m, 2H); 2,63-2,47 (br, m, 12H), 1,47-1,28 (br, m, 48H); 0,90 (m, 9H).

[1653] DJ: Composto 20-19: 2-((2-(Didodecilammino)etil)ammino)etan-1-olo



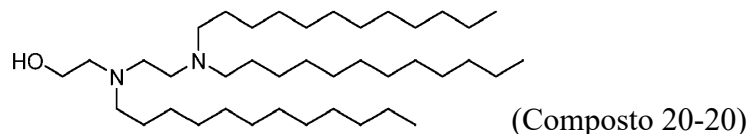
[1654] Etanolammina (50 mg, 0,82 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (0,75
10 g, 1,8 mmol), K₂CO₃ (0,25 g, 1,8 mmol) e KI (14 mg, 0,082) e 4 mL di THF sono stati
combinati in una beuta a fondo rotondo. La reazione è stata posta in un mantello riscaldante a 65
°C ed è stata lasciata sotto agitazione sotto N₂ per 12 h. Trascorso questo tempo la reazione è
stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente ed è stata filtrata. Il filtrato è stato lavato con
H₂O e soluzione salina, essiccato su MgSO₄, filtrato e concentrato. Il materiale grezzo è stato
15 purificato mediante cromatografia in fase inversa C18 (5-100% MeCN in H₂O con 0,1% di
TFA). Le frazioni sono state raggruppate e concentrate. Il materiale isolato è stato ripreso in
CHCl₃, lavato con NaOH al 10% e soluzione salina, essiccato su MgSO₄, filtrato e concentrato.
Il prodotto è stato quindi purificato nuovamente *mediante* cromatografia su gel di silice (0-20%
di MeOH in DCM con 1% NH₄OH) per fornire 2-((2-(didodecilammino)etil)ammino)etan-1-olo
20 (0,15 g, 41%).

[1655] UPLC/ELSD: RT = 2,15 min. MS (ES): *m/z* (MH⁺) 441,37 per C₂₈H₆₀N₂O

[1656] ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 3,59 (t, 2H); 2,75 (t, 2H); 2,62 (t, 2H); 2,50 (t, 2H);
2,37 (t, 4H); 1,39 (m, 4H); 1,24 (m 38H); 0,86 (t, 6H).

DK: Composto 20-20: 2-((2-(Didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etan-1-olo

[1657]



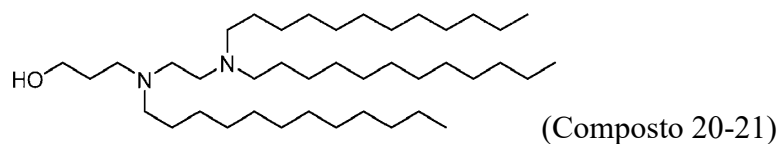
[1658] Una soluzione di 2-((2-amminoetil)ammino)etan-1-olo (2 g, 19,2 mmol) in 50 mL di DCE è stata lasciata raffreddare sotto N₂ in un bagno di ghiaccio. È stato aggiunto dodecanale (26 mL, 76,8 mmol) seguito da acido acetico (3,3 mL, 57,6 mmol). Dopo 20 minuti è stato aggiunto Na(OAc)₃BH (16,3 g, 76,8 mmol). La reazione è stata lasciata riscaldare lentamente a temperatura ambiente e agitata per 48 h. Dopo questo tempo la reazione è stata spenta *mediante* l'aggiunta a porzioni di NaHCO₃ saturo. La miscela è stata estratta tre volte con DCM. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-100% EtOAc in esani) due volte per ottenere 2-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)etan-1-olo (7,4 g, 63%) pulito.

[1659] UPLC/ELSD: RT = 3,20 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 609,97 per C₄₀H₈₄N₂O

[1660] ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : ppm 3,51 (t, 2H); 2,57-2,40 (br, m, 12H); 1,41-1,23 (br, m., 60H); 0,86 (t, 9H).

DL: Composto 20-21: 3-((2-(Didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)propan-1-olo

[1661]



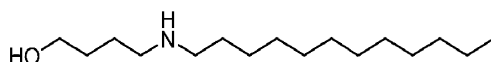
[1662] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 3-((2-(didodecil)ammino)etil)(dodecil)ammino)propan-1-olo è stato sintetizzato da 3-(dodecilammino)propan-1-olo (39 mg, 0,16 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (75 mg, 0,18 mmol), K₂CO₃ (44 mg, 0,32 mmol) e KI (2,7 mg, 0,016 mmol) in THF (1 mL). Resa (170 mg, > 98%).

[1663] UPLC/ELSD: RT = 3,29 min. MS (ES): m/z (MH^+) 623,71 per $C_{41}H_{86}N_2O$

[1664] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,76 (m, 2H); 2,64-2,39 (br, m, 12H); 1,66 (m, 2H); 1,44-1,26 (m, 60H); 0,88 (m, 9H).

DM: Composto 20-22: 4-((2-(Didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)butan-1-olo 4-(Dodecilammino)butan-1-olo

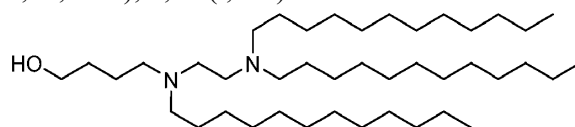
[1665]



[1666] Allo stesso modo del 2-(dodecilammino)etan-1-olo, il 4-(dodecilammino)butan-1-olo è stato sintetizzato dal 4-amminobutan-1-olo (2,5 mL, 27 mmol), 1-bromododecano (6,75 g, 27 mmol), K_2CO_3 (7,5 g, 54 mmol) e KI (450 mg, 2,7 mmol) in MeCN (125 mL). Resa (303 mg, 4%).

[1667] UPLC/ELSD: RT = 1,09 min. MS (ES): m/z (MH^+) 258,22 per $C_{16}H_{35}NO$

[1668] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,60 (t, 2H); 2,76-2,62 (br, m, 4H); 1,72-1,58 (br, m, 6H); 1,29 (br, m, 18H); 0,89 (t, 3H).



(Composto 20-22)

[1669] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 4-((2-(didodecilammino)etil)(dodecil)ammino)butan-1-olo è stato sintetizzato da 4-(dodecilammino)butan-1-olo (75 mg, 0,29 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (133 mg, 0,32 mmol), K_2CO_3 (80 mg, 0,58 mmol) e KI (5 mg, 0,029 mmol) in MeCN (2 mL). Resa (104 mg, 56%).

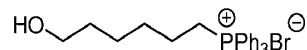
[1670] UPLC/ELSD: RT = 3,27 min. MS (ES): m/z (MH^+) 637,85 per $C_{42}H_{88}N_2O$

[1671] 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,56 (br, m, 2H); 2,58 (br, m, 4H); 2,45 (br, m, 8H); 1,65 (br, m, 4H); 1,45 (br, m, 6H); 1,25 (br, m, 54H); 0,88 (t, 9H).

DN: Composto 20-23: (Z)-2-((2-(Didodecilammino)etil)(dodec-6-en-1-il)ammino)etan-1-olo

Fase 1: (6-idrossiesil)trifenilfosfonio bromuro

[1672]

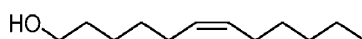


[1673] Il 6-bromo-1-esanolo (4,89 g, 27 mmol) e la trifenilfosfina (7,87 g, 30 mmol) e 50 mL di MeCN sono stati combinati in una beuta a fondo tondo. Ila beuta è stata dotata di un condensatore e posto in una mensola riscaldante e la reazione è stata lasciata sotto agitazione a 82 °C per 48 ore. Dopo questo tempo la reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e la soluzione è stata cannulata in 200 mL di Et₂O, producendo un precipitato bianco. I solidi sono stati lasciati decantare e il solvente è stato decantato. Sono stati aggiunti 20 mL di DCM per sciogliere i solidi e quindi sono stati aggiunti lentamente 100 mL di Et₂O per ottenere un precipitato bianco. Il solvente è stato quindi rimosso *sotto vuoto* per fornire bromuro di (6-idrossiesil)trifenilfosfonio pulito (9,4 g, 21,2 mmol, per una resa del 78%).

[1674] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 7,80 (m, 15H); 3,80 (m, 2H); 3,65 (m, 2H); 2,23 (m, 2H); 1,68 (m, 4H); 1,52 (m, 4H).

15 Fase 2: (Z)-Dodec-6-en-1-olo

[1675]



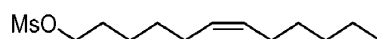
[1676] Una soluzione di (6-idrossiesil)trifenilfosfonio bromuro (3,0 g, 6,77 mmol) in 25 mL di THF è stata lasciata raffreddare in un bagno di ghiaccio secco/acetone a -78 °C. Una volta raffreddato *n*-BuLi (2,5 M in esani) (5,7 mL, 14,2 mmol) è stato aggiunto goccia a goccia. Dopo 1 ora, sono stati aggiunti altri 10 mL di THF e *n*-BuLi (1,35 mL) e l'agitazione è stata continuata alla stessa temperatura per 1 ora. Dopo questo tempo è stato aggiunto 1-esanale (1,6 mL, 13,5 mmol) e la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente e agitata per 3 ore. Dopo questo tempo la reazione è stata spenta mediante aggiunta di NH₄Cl saturato in eccesso. La soluzione è stata estratta tre volte con EtOAc. Le sostanze organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate *sotto vuoto*. Il materiale

grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-50% di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato come un olio limpido (0,76 g, 4,1 mmol, 61%).

[1677] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,34 (m, 2H); 3,62 (t, 2H); 2,01 (m, 4H); 1,56 (m, 2H); 1,35-1,27 (m, 11H); 0,87 (t, 3H).

5 Fase 3: (Z)-Dodec-6-en-1-il metansolfonato

[1678]



[1679] A una soluzione a 0 °C di (Z)-dodec-6-en-1-olo (1,81 g, 9,3 mmol) in 20 mL di DCM, è stato aggiunto Et₃N (1,7 mL, 12,1 mmol) e metansolfonil cloruro (0,80 mL, 10,2 mmol). La
10 reazione è stata lasciata riscaldare lentamente a temperatura ambiente e agitata per una notte. La reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di acqua e la miscela è stata estratta due volte con DCM. Le sostanze organiche sono state messe in pool, lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-30% di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato pulito (2,2 g, 8,4
15 mmol, 90%).

[1680] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,34 (m, 2H); 4,20 (t, 2H); 2,98 (s, 3H); 2,01 (m, 4H); 1,74 (m, 2H); 1,38-1,27 (m, 10H); 0,87 (t, 3H).

Fase 4: (Z)-1-Bromododec-6-ene

[1681]

20



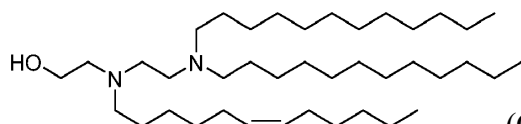
[1682] In una beuta a fondo tondo, sotto N₂, (Z)-dodec-6-en-1-il metansolfonato (2,2 g, 8,3 mmol) è stato sciolto in 40 mL di Et₂O. È stato aggiunto MgBr₂Et₂O (6,5 g, 25 mmol) e la reazione è stata lasciata sotto agitazione per 48 h. Dopo questo tempo la reazione è stata estinta dall'aggiunta di ghiaccio. La miscela è stata quindi estratta con Et₂O tre volte. Le sostanze
25 organiche messe in pool sono state lavate con soluzione salina, essiccate su MgSO₄, filtrate e concentrate. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (0-30%

di EtOAc in esani) per ottenere il prodotto desiderato (1,8 g, 7,28 mmol, 88%).

[1683] ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,34 (m, 2H); 3,39 (t, 2H); 2,01-1,84 (m, 6H); 1,28 (m, 10H); 0,87 (t, 3H).

Fase 5: (Z)-2-((2-(Didodecilammino)etil)(dodec-6-en-1-il)ammino)etan-1-olo

5 [1684]



(Composto 20-23)

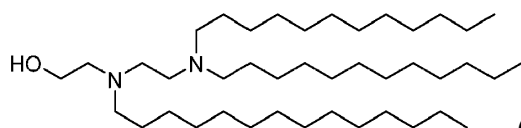
[1685] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, (Z)-2-((2-(didodecilammino)etil)(dodec-6-en-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da (Z)-2-(dodec-6-en-1-ilammino)etan-1-olo (100 mg, 0,44 mmol), N-(2-cloroetil)-N-dodecildodecan-1-ammina (183 mg, 0,44 mmol), K₂CO₃ (122 mg, 0,88 mmol) e KI (7,3 mg, 0,044 mmol) in MeCN (1 mL) e THF (1 mL). Resa (90 mg, 34%).

[1686] UPLC/ELSD: RT = 3,24 min. MS (ES): m/z (MH⁺) 608,08 per C₄₀H₈₂N₂O

15 [1687] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5,42-5,35 (m, 2H); 3,55 (m, 2H), 2,62-2,45 (br, m, 12H); 2,06-2,00 (m, 4H); 1,48-1,28 (br, m, 52H); 0,91 (m, 9H).

DO: Composto 20-24: 2-((2-(Didodecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etan-1-olo

[1688]



(Composto 20-24)

20 [1689] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(didodecilammino)etil)(tetradecil)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 2-(tetradecilammino)etan-1-olo (100 mg, 0,39 mmol), N-(2-cloroetil)-N-dodecildodecan-1-ammina (162 mg, 0,39 mmol), K₂CO₃ (107 mg, 0,78 mmol) e KI (6,5 mg, 0,039 mmol) in

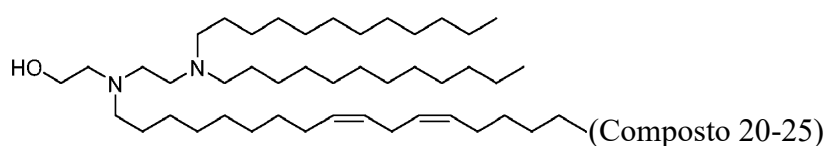
MeCN (3 mL). Resa (128 mg, 52%).

[1690] UPLC/ELSD: RT = 3,47 min. MS (ES): m/z (MH^+) 637,92 per $C_{42}H_{88}N_2O$

[1691] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 3,54 (m, 2H); 2,61-2,44 (br, m, 12H), 1,46-1,28 (br, m, 64H); 0,91 (m, 9H).

5 **DP: Composto 20-25: 2-((2-(Didodecilammino)etil)((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo**

[1692]



[1693] Allo stesso modo del pentil 6-(dodecil(2-(dodecil(2-

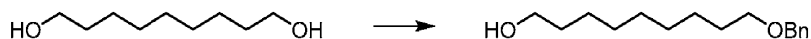
10 idrossietil)ammino)etil)ammino)esanoato, 2-((2-(didodecilammino)etil)((9Z, 12Z)-ottadeca - 9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo è stato sintetizzato da 2-(((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ammino)etan-1-olo (50 mg, 0,16 mmol), *N*-(2-cloroetil)-*N*-dodecildodecan-1-ammina (67 mg, 0,16 mmol), K_2CO_3 (45 mg, 0,32 mmol) e KI (3 mg, 0,016 mmol) in MeCN (2 mL). Resa (45 mg, 41%).

15 [1694] UPLC/ELSD: RT = 3,64 min. MS (ES): m/z (MH^+) 689,95 per $C_{46}H_{92}N_2O$

[1695] 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : ppm 5,39-5,32 (m, 4H); 3,56 (m, 2H), 2,80 (m, 2H); 2,62-2,52 (br, m, 12H); 2,08 (m, 4H); 1,48-1,28 (br, m, 58H); 0,91 (m, 9H).

DQ. Composto 21-1: 1-(2,2-Di((9 Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopropil) -*N,N* dimetilmetanammina

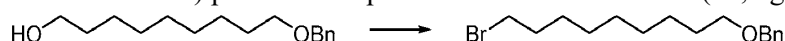
20 [1696]



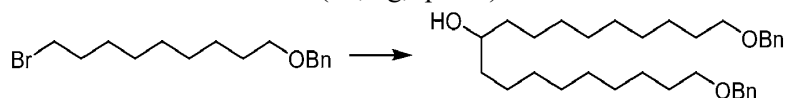
[1697] A 0 °C, una soluzione di nonan-1,9-diolo (96,16 g, 0,60 mol) in 100 mL di DMF è stata aggiunta lentamente a una sospensione di NaH (24,0 g, 0,60 mol) in 800 mL di DMF. Dopo aver agitato per 1 ora, è stata aggiunta lentamente una soluzione di benzil bromuro (71,4 mL,

25

0,60 moli) in 200 mL di DMF. Dopo l'aggiunta, la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La TLC ha mostrato che il materiale di partenza era quasi consumato. La miscela di reazione è stata versata su ghiaccio e quindi estratta con EtOAc (3 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua e soluzione salina e quindi essiccati su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: Dallo 0 al 100% di EtOAc/esani quindi dallo 0 al 5% di MeOH/diclorometano) per fornire il prodotto come olio incolore (74,4 g, 50%).

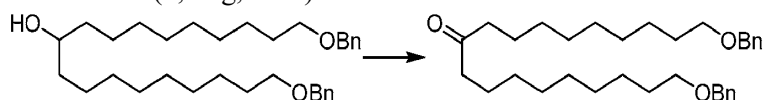


[1698] A 0 °C, a una soluzione di 9-(benzilossi)nonan-1-olo (14,88 g, 61,5 mmol) in 150 mL di diclorometano, è stato aggiunto CBr₄ (30,6 mmol, 92,2 mmol). E poi è stata aggiunta a porzioni la trifenilfosfina (27,4 g, 0,104 moli). Dopo l'agitazione a temperatura ambiente durante la notte, la TLC ha mostrato una reazione completa. La miscela di reazione è stata versata su ghiaccio e quindi estratta con diclorometano (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua e soluzione salina e quindi essiccati su solfato di magnesio. Dopo filtrazione e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (21,0 g, quant.).

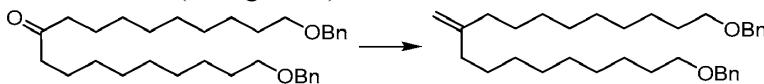


[1699] A una sospensione di magnesio (3,23 g, 0,134 moli) in 80 mL di THF, è stata aggiunta una quantità catalitica di iodio, e quindi agitata fino alla scomparsa del colore. Una soluzione di ((9-bromononyl)ossi)metil)benzene (21,0 g, 67,2 mmol) in 40 mL di THF è stata aggiunta lentamente in 15 minuti a temperatura ambiente, quindi la miscela è stata riscaldata a refluxo per 1 ora. Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di formiato di metile (4,2 mL, 67,2 mmol) in 10 mL di THF e la miscela è stata agitata per una notte. La reazione è stata spenta mediante aggiunta di HCl da 5 N e acqua, e la miscela è stata estratta con EtOAc (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con

soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo filtrazione e concentrazione, il residuo è stato sciolto in EtOH, quindi sono stati aggiunti KOH e acqua. Dopo l'agitazione per una notte, la miscela di reazione è stata concentrata a secco. È stata aggiunta acqua e quindi aggiustato il pH di ~7 con HCl da 1 N. La miscela è stata estratta con EtOAc (2 X) e lo strato organico combinato è stato essiccato su solfato di magnesio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il grezzo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (6,64 g, 40%).

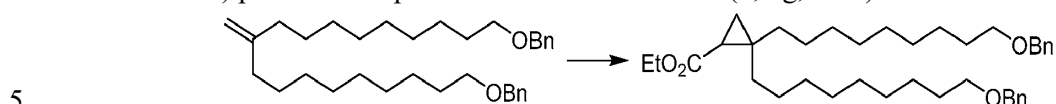


[1700] A 0 °C, una soluzione di 1,19-bis(benzilossi)nonadecan-10-olo (6,64 g, 13,4 mmol) in 30 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una soluzione di Dess-Martin periodicanano (7,94 g, 18,7 mmol) in 70 mL di diclorometano, quindi la miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 3 ore. La TLC ha mostrato che il materiale di partenza è stato consumato. La miscela di reazione è stata diluita con diclorometano, quindi sono state aggiunte una soluzione di Na₂S₂O₃ al 10% e una soluzione satura di bicarbonato di sodio. Dopo l'estrazione con diclorometano (2 X), gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina e concentrati. Il residuo è stato sciolto in etere e lavato con bicarbonato di sodio saturo e soluzione salina. Dopo l'essiccamento su solfato di sodio, la soluzione è stata filtrata e concentrata. Il grezzo è stato purificato da ISCO (SiO₂: dallo 0 al 20% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (6,23 g, 94%).



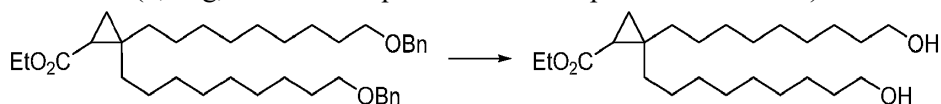
[1701] A 0 °C, il *terz*-butossido di potassio (1,70 g, 15,1 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di bromuro di metilfosfonio (5,40 g, 15,1 mmol) in 80 mL di THF che è stata spurgata con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di 1,19-bis(benzilossi)nonadecan-10-one (6,23 g, 12,6 mmol) in 20 mL di THF (spurgata con azoto 3 volte) è stata trasferita tramite cannula nella miscela di

reazione, quindi la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completata e la miscela di reazione è stata filtrata attraverso Celite. Dopo la concentrazione, il grezzo è stato purificato da ISCO (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (6,0 g, 96%).

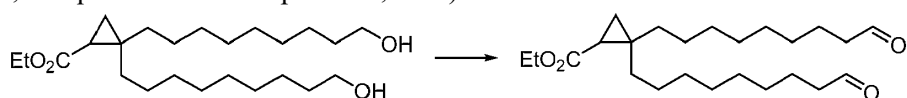


[1702] A una soluzione a refluxo di (((10-metilennonadecane-1,19-diil)bis(ossi))bis(metilene))dibenzene (2,99 g, 6,08 mmol) in 160 mL di diclorometano, è stata aggiunta una soluzione di Cu(acac)₂ (180 mg, 0,69 mmol) in 40 mL di diclorometano. E poi è stato aggiunto etil diazoacetato (contiene il 13% di diclorometano, 9 x 1,1 mL) ogni 30 minuti.

10 La MS ha mostrato la formazione del prodotto. La reazione è stata spenta con MeOH e agitata per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo la concentrazione, il grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna (SiO₂: dallo 0 al 10% di EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (3,65 g, contiene 1 equivalente di sottoprodotto di acetato).



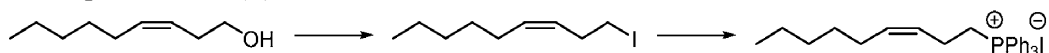
15 [1703] Una miscela di etil 2,2-bis(9-(benzilossi)nonil)ciclopropan-1-carbossilato (2,8 g, 4,8 mmol) e palladio su carbonio (10% in peso, 500 mg) in 500 mL di EtOAc è stata agitata a temperatura ambiente sotto pallone a idrogeno per 4,5 h. La MS e TLC hanno mostrato una reazione completa. La miscela di reazione è stata filtrata su Celite e lavata con EtOAc. Il filtrato è stato concentrato per fornire il prodotto miscelato con il sottoprodotto, dietil succinato (2,53 g, contiene 0,94 equivalenti di sottoprodotto, 94%).



[1704] A 0 °C, una soluzione di etil 2,2-bis(9-idrossinonil)ciclopropan-1-carbossilato (2,4 g, 6 mmol) in 100 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una sospensione di Dess-Martin periodanano (7,67 g, 18 mmol) in 100 mL di diclorometano, quindi la miscela di

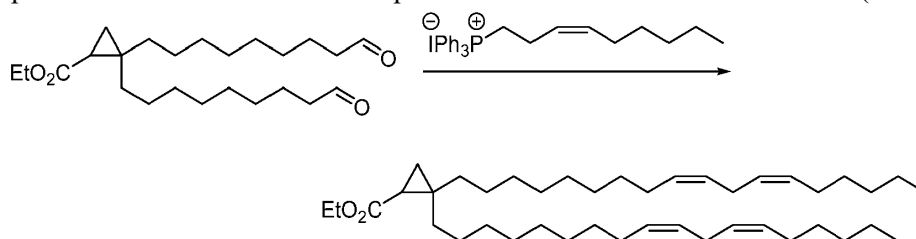
reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore. Dopo spegnimento con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ acquoso al 10% e bicarbonato di sodio saturo, la miscela è stata estratta con diclorometano (2 X). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio e concentrati per dare il prodotto come olio incolore (2,3 g, contiene circa 0,7 g di sottoprodotto).

5 [1705] Preparazione di (Z)-non-3-en-1-iltrifenilfosfonio ioduro:



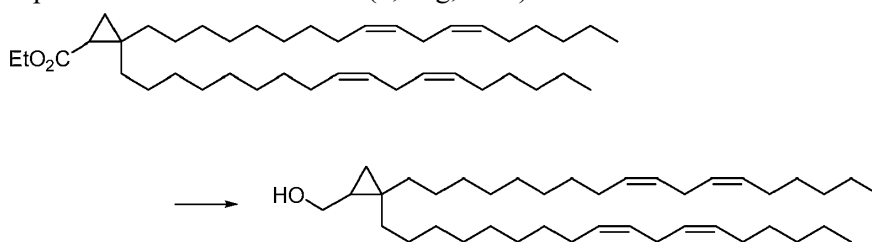
A 0 °C, una soluzione di trifenilfosfina (110 g, 0,419 moli) in 200 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una soluzione di (Z)-non-3-en-1-ol (49,6 g, 0,349 moli), imidazolo (50,0 g, 0,732 moli) e iodio (124 g, 0,488 moli) in 800 mL di diclorometano, e quindi la miscela di
 10 reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una piccola quantità di (Z)-non-3-en-1-olo restante. La miscela di reazione è stata concentrata e il residuo è stato triturato con esani. La soluzione è stata filtrata attraverso un tampone di gel di silice ed eluita con esani per fornire lo ioduro come liquido incolore (81 g, 92%).

[1706] Una soluzione di (Z)-1-iodonon-3-ene (81 g, 0,321 moli) e trifenilfosfina (169 g, 0,643
 15 moli) in acetonitrile (1,1 L) è stata portata a riflusso durante la notte. Dopo concentrato a secco, il residuo è stato triturato con esani. La gomma bianca è stata disciolta in diclorometano e purificata mediante cromatografia su colonna flash (SiO_2 : dallo 0 allo 5% di $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) per fornire il prodotto come olio incolore che poi si è trasformato in un solido bianco (114 g, 69%).

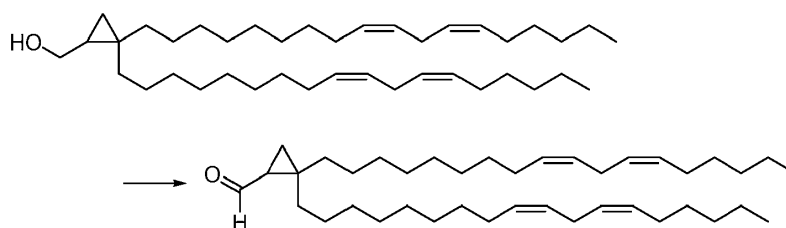


20 [1707] A 0 °C, il *terz*-butossido di potassio (1,98 g, 17,7 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di (Z)-non-3-en-1-iltrifenilfosfonio ioduro (9,2 g, 17,9 mmol) in 300 mL di THF che è stato spurgato con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di etil 2,2-bis(9-ossnonil)ciclopropan-1-carbossilato (2,05 g, 5,2 mmol) in 100 mL di THF (spurgata con azoto 3 volte) è stata trasferita

tramite cannula nella miscela di reazione, e quindi la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con esani (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo filtrazione e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 5% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (1,54 g, 48%).

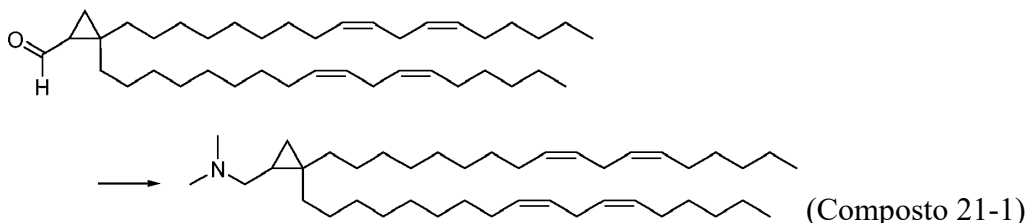


[1708] Una soluzione di idruro di litio e alluminio (2,0 M in THF, 1,9 mL, 3,8 mmol) è stata aggiunta lentamente a una soluzione di etil 2,2-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopropan-1-carbossilato (1,54 g, 2,52 mmol) in 150 mL di THF, e quindi la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 30 minuti. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta mediante aggiunta lenta di Na₂SO₄·10H₂O, quindi la miscela è stata filtrata e lavata con THF. Il filtrato è stato concentrato e purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 15% EtOAc/esani) per dare il prodotto come olio incolore (1,2 g, 84%).



[1709] A 0 °C, una soluzione di (2,2-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopropil)metanolo (1,04 g, 1,83 mmol) in 100 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una sospensione di periodinano Dess-Martin (1,18 g, 2,77 mmol) in 200 mL di diclorometano, e quindi la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore. Dopo l'estinzione con

bicarbonato di sodio saturo, la miscela è stata estratta con diclorometano (2 X). Lo strato organico combinato è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato per dare il prodotto come un olio incolore (0,95 g, 91%).



5 **Formula chimica:** C₄₂H₇₇N

Peso molecolare: 596,09

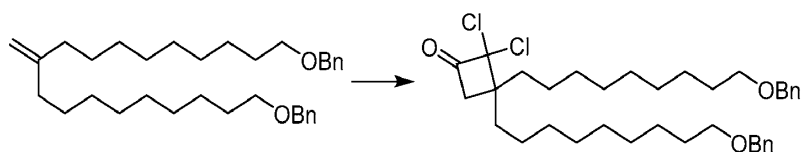
[1710] A una soluzione di 2,2-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopropan-1-carbaldeide (0,95 g, 1,68 mmol) in 300 mL di THF, dimetilammina (2,0 M in THF, 2 mL, 4 mmol), sodio triacetossiboroidruro (840 mg, 4 mmol) e acido acetico (0,23 mL, 4 mmol) sono stati aggiunti in sequenza e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La MS ha mostrato una reazione completata ed è stato aggiunto bicarbonato di sodio saturo per estinguere la reazione. La miscela è stata estratta con EtOAc (2 X) e gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 10% MeOH/diclorometano) per dare il prodotto 1-(2,2-Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopropil)-N,N-dimetilmetanamina come un olio incolore (0,56 g, 56%).

[1711] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,27-5,42 (m, 8 H), 2,76 (t, 4 H, *J* = 6,2 Hz), 2,38 (bs, 8 H), 2,04 (q, 8 H, *J* = 6,6 Hz), 1,18-1,41 (m, 38 H), 0,96-1,17 (m, 2 H), 0,88 (t, 6 H, *J* = 6,6 Hz), 0,66-0,76 (m, 1 H), 0,48-0,56 (m, 1 H), 0,05-0,13 (m, 1 H).

20 [1712] APCI: *m/z* = 596,6 [M+H]⁺.

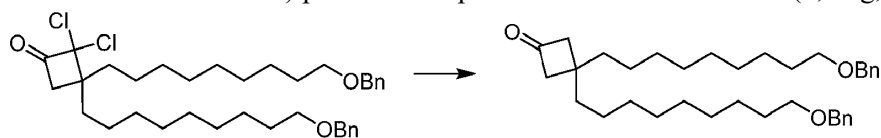
DR. Composto 21-2: 3,3-Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclobutil (dimetilammino)butanoato

[1713]



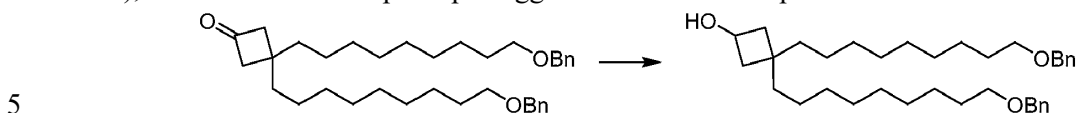
[1714] Preparazione della coppia Zn-Cu: Una sospensione di polvere di zinco (10 g) in 10 mL 4 M HCl è stata agitata per 10 minuti, quindi la fase acquosa è stata decantata. Dopo che il solido è stato lavato con acqua (2 × 20 mL), sono stati successivamente aggiunti 20 mL di acqua e solfato di rame (0,75 g). Dopo aver agitato per una notte, l'acqua è stata decantata e quindi il residuo è stato lavato con THF (2 × 10 mL). Il solido nero è stato essiccato sotto vuoto e conservato sotto azoto.

[1715] A una sospensione di coppia Zn-Cu (1,295 g, 19,8 mmol) in 30 mL di etere spurgata con azoto 3 volte, una soluzione di (((10-metilenonadecane-1,19-diil)bis(ossi))bis(metilene))dibenzene (2,96 g, 6,0 mmol) in 10 mL di etere spurgato con azoto è stato aggiunto, quindi una soluzione di POCl₃ (1,85 mL, 19,8 mmol) e 2,2,2-tricloroacetile cloruro (2,23 mL, 19,8 mmol) in 15 mL di etere spurgato con azoto è stato aggiunto goccia a goccia. Dopo l'aggiunta, la miscela è stata riscaldata a riflusso per 22 ore. La TLC ha mostrato tracce di materiale di partenza. La miscela di reazione è stata raffreddata in bagno di ghiaccio e quindi sono stati aggiunti 8,0 g di carbonato di potassio. 30 mL di MeOH sono stati aggiunti goccia a goccia e agitati fino a assenza di sviluppo di gas. È stato aggiunto EtOAc e la miscela è stata filtrata su Celite. Il filtrato è stato concentrato e il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (3,02 g, 83%).

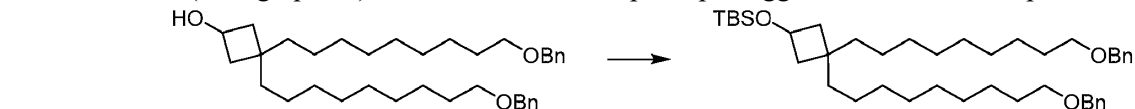


[1716] A una soluzione di 3,3-bis(9-(benzilossi)nonil)-2,2-diclorociclobutan-1-one (3,02 g, 5,0 mmol) in 80 mL di polvere di MeOH, Zn (1,96 g, 30 mmol) è stato aggiunto. Dopo aver agitato per 15 minuti, è stato aggiunto cloruro di ammonio (1,6 g, 30 mmol) e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore. La TLC ha mostrato una reazione completa e la

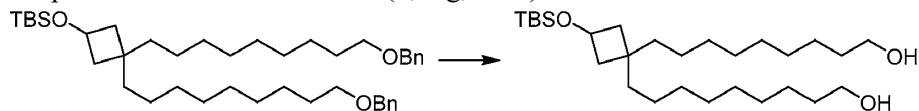
miscela è stata concentrata a secco. Sono stati aggiunti 100 mL di acqua e 100 mL di EtOAc e la miscela è stata filtrata attraverso Celite. Il filtrato è stato lavato con soluzione salina ed essiccato su solfato di magnesio. Dopo la filtrazione e la concentrazione si ottiene il prodotto (2,58 g, 97%), che viene utilizzato per il passaggio successivo senza purificazione.



[1717] A 0 °C, sodio boroidruro (0,51 g, 13,51 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di 3,3-bis(9-(benzilossi)nonil)ciclobutan-1-one (2,58 g, 4,82 mmol) in 48 mL di MeOH/THF (5:1), quindi la reazione è stata agitata a questa temperatura per 1 ora. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con bicarbonato di sodio saturo e quindi estratta con EtOAc (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il prodotto è stato ottenuto come olio incolore (2,68 g, quant.), che è stato utilizzato per il passaggio successivo senza purificazione.



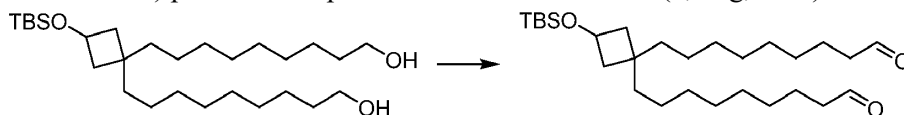
[1718] A una soluzione di 3,3-bis(9-(benzilossi)nonil)ciclobutan-1-olo (3,31 g, 6,17 mmol) e imidazolo (0,92 g, 13,57 mmol) in 50 mL di diclorometano, *terz*-butildimetilsilil cloruro (1,15 g, 7,28 mmol) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 4 ore. La TLC ha mostrato una reazione completa. È stata aggiunta acqua per estinguere la reazione e la miscela è stata estratta con diclorometano (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo filtrazione e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 20% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (3,53g, 90%).



[1719] Una miscela di (3,3-bis(9-(benzilossi)nonil)ciclobutossi)(*terz*-butil)dimetilsilano (3,53 g,

5,42 mmol) e palladio su carbonio (10% in peso, 0,71 g) in 350 mL di EtOAc è stato spurgato rispettivamente con azoto e idrogeno. Dopo aver agitato sotto un palloncino di idrogeno per una notte, la TLC ha mostrato una reazione completa, e quindi la miscela di reazione è stata filtrata attraverso Celite. Dopo concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo

5 0 al 70% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (2,35 g, 92%).

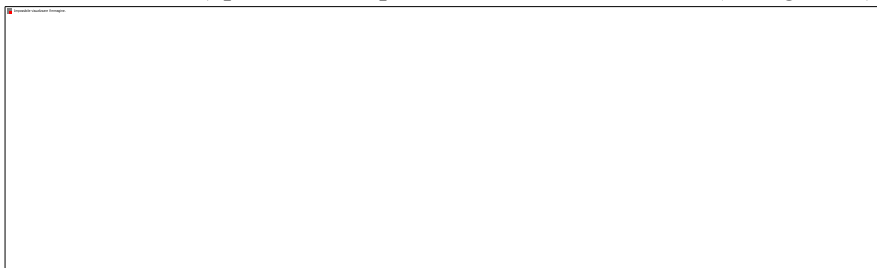


[1720] A 0 °C, una soluzione di 9,9'-(3-((*terz*-butildimetilsilil)ossi)ciclobutan-1,1-diil)bis(nonan-1-olo) (1,49 g, 3,16 mmol) in 20 mL di diclorometano è stata aggiunta

lentamente a una soluzione di Dess-Martin periodicanano (2,68 g, 6,33 mmol) in 70 mL di diclorometano, e quindi la miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 3 ore.

Dopo l'agitazione a temperatura ambiente per 1 ora, la miscela di reazione è stata diluita con diclorometano, quindi sono state aggiunte una soluzione di Na₂S₂O₃ al 10% e una soluzione satura di bicarbonato di sodio. Dopo l'estrazione con diclorometano (2 X), gli strati organici combinati sono stati lavati con bicarbonato di sodio saturo e soluzione salina. Lo strato organico

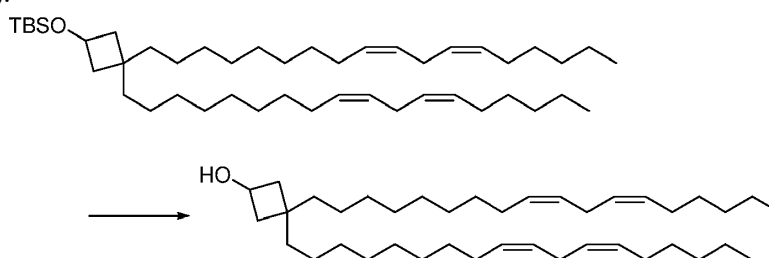
15 è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato. Il grezzo è stato purificato da ISCO (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (0,88 g, 60%).



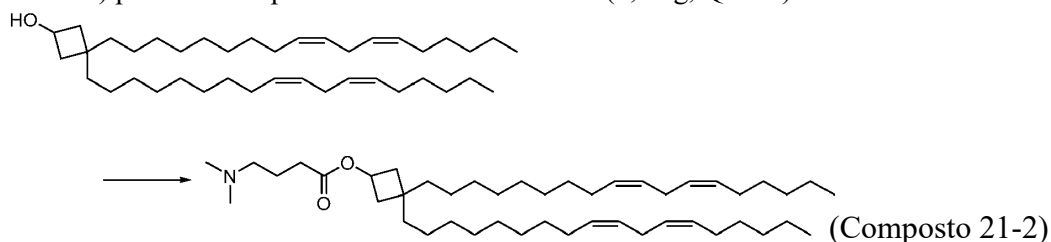
[1721] A 0 °C, il *terz*-butossido di potassio (0,51 g, 4,53 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di (*Z*)-non-3-en-1-iltrifenilfosfonio ioduro (2,33 g, 4,53 mmol) in 30 mL di THF che è stato

20 spurgato con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di 9,9'-(3-((*terz*-butildimetilsilil)ossi)ciclobutan-1,1-diil)dinonanale (0,88 g, 1,89 mmol) in 25 mL di THF

(purgata con azoto 3 volte) è stata trasferita tramite cannula nella miscela di reazione, quindi la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con EtOAc (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo filtrazione e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 20% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (543 mg, 42%).



[1722] A una soluzione di *terz*-butil(3,3-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclobutossi)dimetilsilano (0,67 g, 0,98 mmol) in 60 mL di THF, è stata aggiunta una soluzione di TBAF (1,0 M in THF, 9,8 mL, 9,8 mmol) e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore. La TLC ha mostrato una reazione completa. Il solvente è stato rimosso sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 20% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (0,64 g, Quant.).



15

Formula chimica: C₄₆H₈₃NO₂

Peso molecolare: 682.18

[1723] A 0 °C, piridina (2,4 mL) e la soluzione di anidride propilfosfonica (50% in peso in DMF, 2,4 mL, 4,16 mmol) sono state aggiunte a una soluzione di acido 4-

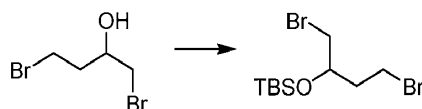
(dimetilammino)butanoico cloridrato (564 mg, 3,37 mmol) in 6 mL di DMF. Dopo aver agitato per 10 minuti, è stata utilizzata una soluzione di 3,3-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclobutan-1-olo (0,64 g, 1,12 mmol) in 4 mL di DMF aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La MS e la TLC hanno mostrato la
5 formazione del prodotto. È stata aggiunta una soluzione satura di bicarbonato di sodio per estinguere la reazione, quindi estratta con EtOAc (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua e soluzione salina. Dopo essiccato su solfato di sodio e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 100% EtOAc/esani) per fornire il prodotto 3,3-Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclobutile 4-(dimetilammino)butanoato come
10 un leggero olio giallo (479 mg, 63%).

[1724] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,28-5,42 (m, 8 H), 4,89-4,99 (m, 1 H), 2,76 (t, 4 H, *J* = 6,1 Hz), 2,30 (t, 4 H, *J* = 7,4 Hz), 2,23 (s, 6 H), 2,15-2,21 (m, 2H), 2,04 (q, 8 H, *J* = 6,6 Hz), 1,68-1,84 (m, 4 H), 1,08-1,40 (m, 40 H), 0,88 (t, 6 H, *J* = 6,6 Hz).

[1725] APCI: *m/z* = 682,6 [M+H]⁺.

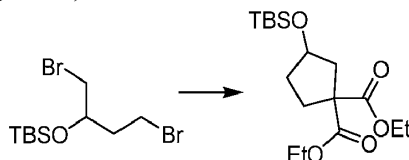
15 **DS. Composto 21-3: 3,3-Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopentil 3-(dimetilammino)propanoato**

[1726]

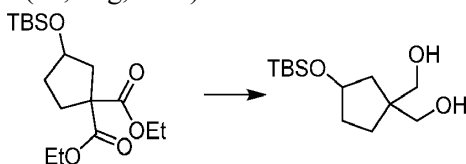


[1727] A 0 °C, a una soluzione di 1,4-dibromobutan-2-olo (75,0 g, 0,328 moli) e imidazolo
20 (49,0 g, 0,72 moli) in 500 mL di diclorometano, una soluzione di *terz*-butildimetilsilil cloruro (57,0 g, 0,36 moli) in 300 mL di diclorometano sono stati aggiunti goccia a goccia. Dopo l'aggiunta, la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e mantenuta in agitazione per una notte. La TLC ha mostrato una conversione pulita. La miscela di reazione è stata filtrata e lavata con diclorometano. Dopo la concentrazione, il residuo è stato ripreso con
25 diclorometano e lavato con acqua e soluzione salina. Lo strato organico è stato essiccato su

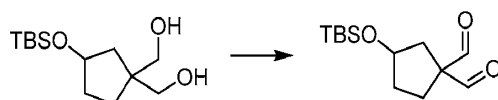
Na₂SO₄. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 10% etere/esani) per fornire un prodotto puro come liquido incolore (83,05 g, 71%).



- 5 [1728] Una soluzione di *terz*-butil((1,4-dibromobutan-2-il)ossi)dimetilsilano (53,7 g, 0,152 moli), dietil malonato (10,0 g, 0,138 moli), carbonato di potassio (47,6 g, 0,345 moli) e bromuro di tetrabutilammonio (4,45 g, 13,8 mmol) in 700 mL di DMF sono stati agitati a temperatura ambiente per 3 giorni. La TLC non ha mostrato quasi nessun materiale di partenza. La miscela di reazione è stata diluita con acqua ed estratta da EtOAc (3 X), e gli strati organici combinati
10 sono stati lavati con cloruro di ammonio saturo e soluzione salina. Dopo l'essiccamento su solfato di sodio, la soluzione è stata filtrata e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per dare il prodotto desiderato come olio incolore (36,92 g, 77%).



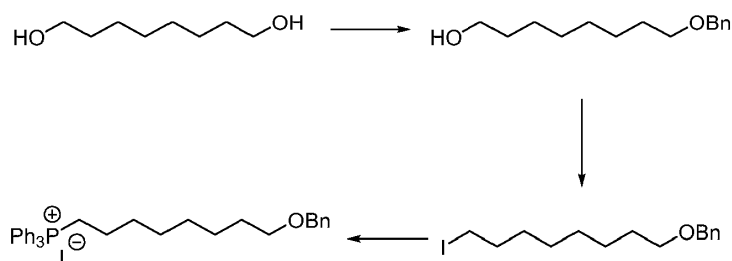
- 15 [1729] A 0 °C, una soluzione di idruro di litio e alluminio (2,0 M in THF, 43,2 mL, 86,4 mmol) è stata aggiunta a una soluzione di dietil 3-((*terz*-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-dicarbossilato (14,89 g, 43,2 mmol) in 60 mL di THF, quindi la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una conversione pulita. La reazione è stata spenta aggiungendo lentamente acqua (6 mL) e 1 N di NaOH (20 mL), e quindi
20 agitata per 30 minuti. La sospensione è stata filtrata su Celite e lavata con EtOAc. Dopo la concentrazione, il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 90% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (9,86 g, 88%).



[1730] A -78 °C, una soluzione di DMSO (2,15 mL, 30,3 mmol) in 10 mL di diclorometano è stata aggiunta goccia a goccia a una soluzione di ossalilcloruro (1,35 mL, 15,2 mmol) in 15 mL di diclorometano, e quindi una soluzione di (3-((*terz*-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-diil)dimetanolo (1,88 g, 7,2 mmol) in 15 mL di diclorometano è stata aggiunta immediatamente. Dopo aver agitato per 30 minuti, è stata aggiunta trietilammina (7,25 mL, 52,0 mmol) e la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente. La TLC ha mostrato una conversione pulita. La reazione è stata spenta con acqua ed estratta con etere (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con cloruro di ammonio saturo e soluzione salina. Dopo essiccamento su solfato di sodio, la soluzione è stata filtrata e concentrata per dare il prodotto come un olio giallo (2,00 g, quant.), che è stato utilizzato per il passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

Preparazione di ioduro di (8-(benzilossi)ottil)trifenilfosfonio:

[1731]



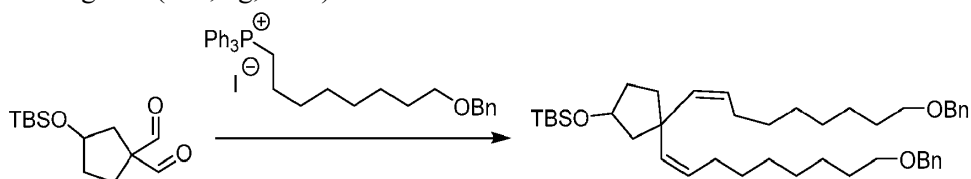
15

[1732] A 0 °C, una soluzione di ottano-1,8-diolo (100 g, 0,684 mol) in 100 mL di DMF è stata aggiunta lentamente a una sospensione di NaH (27,35 g, 0,684 mol) in 700 mL di DMF. Dopo aver agitato per 30 minuti, è stata aggiunta lentamente una soluzione di cloruro di benzile (78,7 mL, 0,684 moli) in 200 mL di DMF. Dopo l'aggiunta, la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La TLC ha mostrato che il materiale di partenza era quasi consumato. La miscela di reazione è stata versata su ghiaccio e quindi estratta da EtOAc (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua e soluzione salina e quindi

essiccati su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 60% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (85,83 g, 53%).

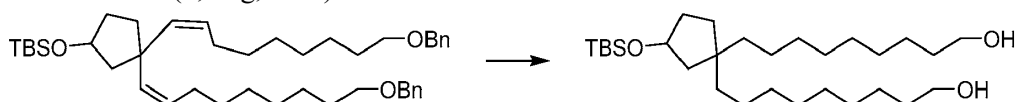
[1733] A 0 °C, una soluzione di trifenilfosfina (114,4 g, 0,436 moli) in 300 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una soluzione di 8-(benzilossi)ottan-1-olo (85,83 g, 0,363 moli), imidazolo (52 g, 0,76 moli) e iodio (129,1 g, 0,51 moli) in 1200 mL di diclorometano, e quindi la miscela di reazione è stata lasciata equilibrare a temperatura ambiente per 3 giorni. Dopo la filtrazione, il filtrato è stato concentrato e il residuo è stato triturato con esani. La soluzione è stata filtrata attraverso un tampone di gel di silice ed eluita con 10% di etere in esani per fornire il prodotto come liquido torbido (81,09 g). Il solido gommoso è stato sciolto in diclorometano e fatto passare attraverso gel di silice ed eluito con 10% di etere in esani per fornire un liquido torbido (20,0 g). Resa totale: 101,1 g (80%).

[1734] Una soluzione di (((8-iodoottil)ossi)metil)benzene (101,1 g, 0,293 moli) e trifenilfosfina (154,1 g, 0,586 moli) in acetonitrile (1 L) è stata portata a riflusso durante la notte. Dopo concentrato a secco, il residuo è stato sciolto in diclorometano e purificato mediante cromatografia flash su colonna (SiO₂: dallo 0 al 10% MeOH/CH₂Cl₂) per fornire il prodotto come un olio giallo (144,1 g, 81%).

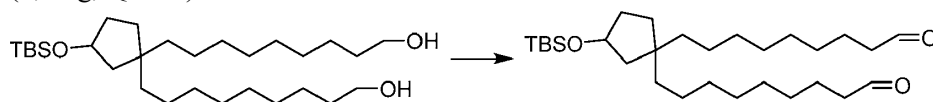


[1735] A 0 °C, il terz-butossido di potassio (2,42 g, 21,6 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di ioduro di (8-(benzilossi)ottil)trifenilfosfonio (14,2 g, 23,3 mmol) in 80 mL di THF che è stato spurgato con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di 3-((terz-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-dicarbaldeide (2,00 g, 7,2 mmol) in 20 mL di THF (spurgata con azoto 3 volte) è stata trasferita tramite cannula nella miscela di reazione, e quindi

la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con etere (2 X). Lo strato organico combinato è stato lavato con soluzione salina ed essiccato su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il residuo è stato purificato
5 mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 6% etere/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (3,77 g, 79%).

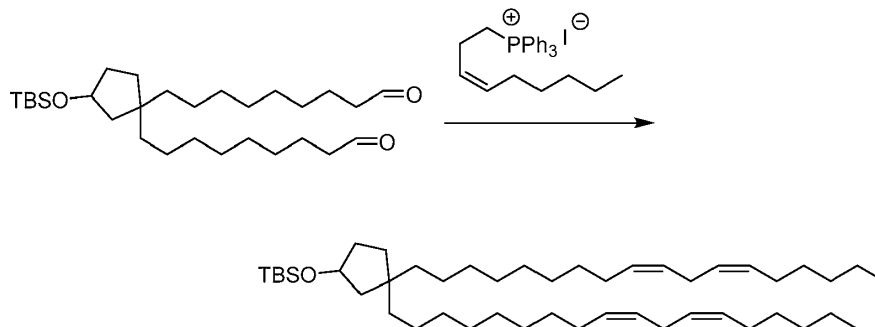


[1736] Una miscela di ((3,3-bis((Z)-9-(benzilossi)non-1-en-1-il)ciclopentil)ossi)(terz-butildimetilsilano (3,04 g, 4,6 mmol) e palladio su carbonio (10%, 600 mg) in 200 mL di
10 EtOAc è stato spurgato con azoto, quindi idrogeno e quindi agitato sotto idrogeno per una notte. La TLC e la MS hanno mostrato una reazione completa. La miscela di reazione è stata filtrata su Celite e lavata con EtOAc. Il filtrato è stato concentrato per dare il prodotto come un olio incolore (2,32 g, Quant.).

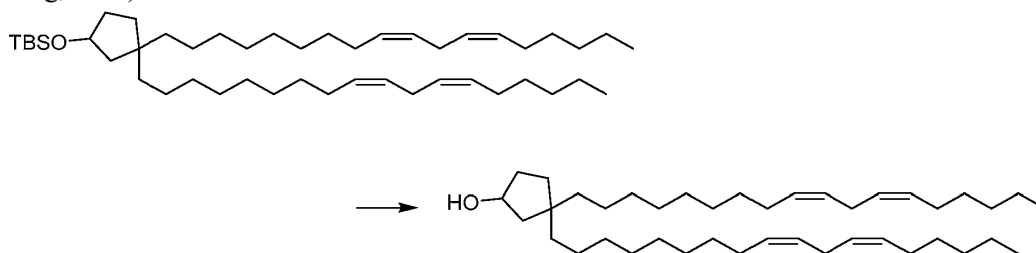


15 [1737] A 0 °C, una soluzione di 9,9'-(3-((terz-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-diil)bis(nonan-1-olo) (2,32 g, 4,6 mmol) in 30 mL di diclorometano è stato aggiunto lentamente a una soluzione di Dess-Martin periodicato (5,46 g, 12,88 mmol) in 70 mL di diclorometano, e quindi la miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 4 ore. La TLC ha mostrato che il materiale di partenza è stato consumato. La miscela di reazione è stata diluita con
20 diclorometano, quindi sono state aggiunte una soluzione di Na₂S₂O₃ al 10% e una soluzione satura di bicarbonato di sodio. Dopo l'estrazione con diclorometano (2 X), gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina e concentrati. Il residuo è stato sciolto in etere e lavato con bicarbonato di sodio saturo e soluzione salina. Dopo l'essiccamento su solfato di sodio, la soluzione è stata filtrata e concentrata. Il grezzo è stato purificato da ISCO (SiO₂: dallo

0 al 50% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (0,73 g, 16%).

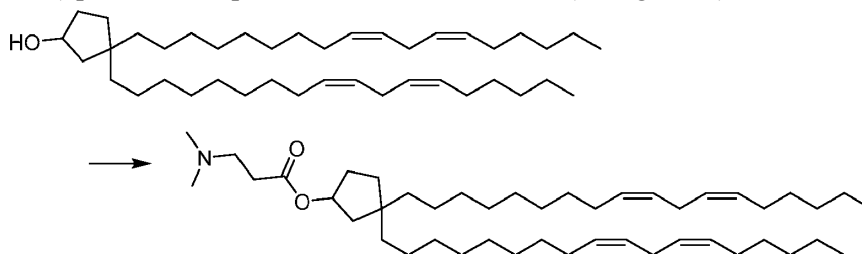


[1738] A 0 °C, il *terz*-butossido di potassio (363 mg, 3,23 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di (*Z*)-non-3-en-1-iltrifenilfosfonio ioduro (1,66 g, 3,23 mmol) in 30 mL di THF che è stato spurgato con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di 9,9'-(3-((*terz*-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-diil)dinonanal (0,52 g, 1,08 mmol) in 10 mL di THF (purgata con azoto 3 volte) è stata trasferita tramite cannula nella miscela di reazione, quindi la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con etere (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo filtrazione e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 5% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (170 mg, 22%).



15 [1739] A una soluzione di *terz*-butil(3,3-di((9*Z*,12*Z*)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopentil)ossi)dimetilsilano (170 mg, 0,24 mmol) in 20 mL di THF, è stata aggiunta una soluzione di TBAF (1,0 M in THF, 2,4 mL, 2,4 mmol) e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. La TLC ha mostrato una reazione completa. Il solvente è stato

rimosso sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 20% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (80 mg, 57%).



(Composto 21-3)

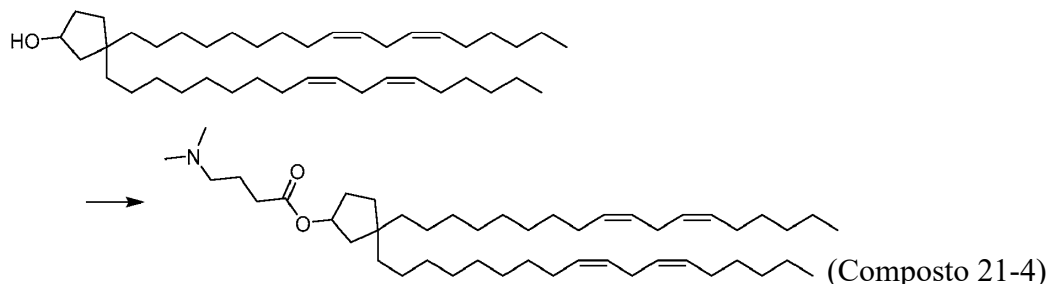
[1740] A 0 °C, piridina (0,1 mL) e una soluzione di anidride propilfosfonica (50% in peso in EtOAc, 0,51 mmol) sono state aggiunte a una soluzione di acido 3-(dimetilammino)propanoico cloridrato (63 mg, 0,41 mmol) in 3 mL di DMF. Dopo aver agitato per 10 minuti, è stata utilizzata una soluzione di 3,3-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopentan-1-olo (80 mg, 0,14 mmol) in 2 mL di DMF aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La MS e la TLC hanno mostrato la formazione del prodotto. È stata aggiunta una soluzione satura di bicarbonato di sodio per estinguere la reazione, quindi estratta con EtOAc (2 X). Lo strato organico combinato è stato lavato con acqua e soluzione salina. Dopo essere stato essiccato su solfato di sodio e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 100% EtOAc/esani) per fornire il prodotto 3,3-Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopentil 3-(dimetilammino)propanoato come olio incolore (59 mg, 62%).

[1741] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,28-5,42 (m, 8 H), 5,12-5,17 (m, 1 H), 2,76 (t, 4 H, J = 6,0 Hz), 2,59 (t, 2 H, J = 6,9 Hz), 2,42 (t, 2 H, J = 6,9 Hz), 2,23 (s, 6 H), 2,04 (q, 8 H, J = 6,9 Hz), 1,75-2,00 (m, 2 H), 1,38-1,72 (m, 5 H), 1,14-1,39 (m, 39 H), 0,88 (t, 6 H, J = 6,9 Hz).

[1742] APCI: m/z = 682,6 [M+H]⁺.

20 **DT. Composto 21-4: 3,3-Di((9 Z,12 Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopentile 4-(dimetilammino)butanoato**

[1743]



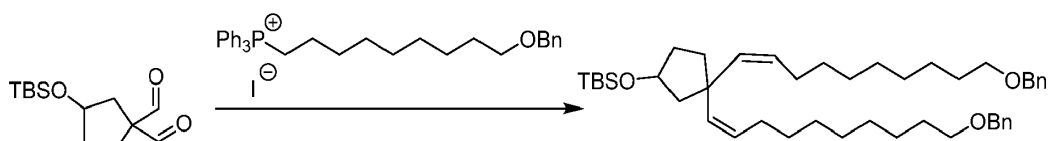
[1744] A 0 °C, piridina (0,6 mL) e la soluzione di anidride propilfosfonica (50% in peso in DMF, 2,4 mL, 4,16 mmol) sono state aggiunte a una soluzione di acido 4-(dimetilammino)butanoico cloridrato (565 mg, 3,37 mmol) in 3 mL di DMF. Dopo aver agitato per 10 minuti, è stata utilizzata una soluzione di 3,3-di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopentan-1-olo (0,65 g, 1,115 mmol) in 1 mL di DMF aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La MS e la TLC hanno mostrato la formazione del prodotto. È stata aggiunta una soluzione satura di bicarbonato di sodio per estinguere la reazione, quindi estratta con EtOAc (2 X). Lo strato organico combinato è stato lavato con acqua e soluzione salina. Dopo essiccato su solfato di sodio e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 100% EtOAc/esani) per fornire il prodotto 3,3-Di((9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dien-1-il)ciclopentil 4-(dimetilammino)butanoato come olio incolore (556 mg, 72%).

[1745] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,28-5,42 (m, 8 H), 5,06-5,15 (m, 1 H), 2,76 (t, 4 H, J = 6,0 Hz), 2,29 (t, 4 H, J = 7,4 Hz), 2,23 (s, 6 H), 2,04 (q, 8 H, J = 6,6 Hz), 1,14-1,99 (m, 48 H), 0,88 (t, 6 H, J = 6,9 Hz).

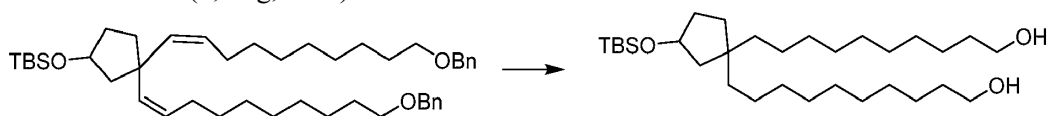
[1746] APCI: m/z = 696,6 [M+H]⁺.

DU. Composto 21-5: 3,3-Di((10Z,13Z)-nonadeca-10,13-dien-1-il)ciclopentile 3-(dimetilammino)propanoato

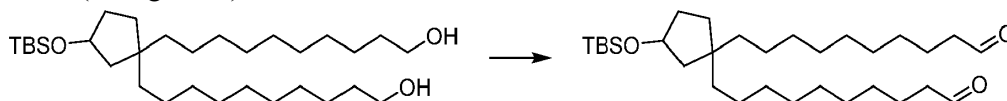
[1747]



[1748] A 0 °C, il *tert*-butossido di potassio (10,03 g, 89,4 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di ioduro di (9-(benzilossi)nonil)trifenilfosfonio (43,0 g, 69,0 mmol) in 160 mL di THF che è stato spurgato con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di 3-((*tert*-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-dicarbaldeide (7,70 g, 29,8 mmol) in 60 mL di THF (spurgata con azoto 3 volte) è stata trasferita tramite cannula nella miscela di reazione, e quindi la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con etere (2 X). Lo strato organico combinato è stato lavato con soluzione salina ed essiccato su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 6% etere/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (6,52 g, 32%).



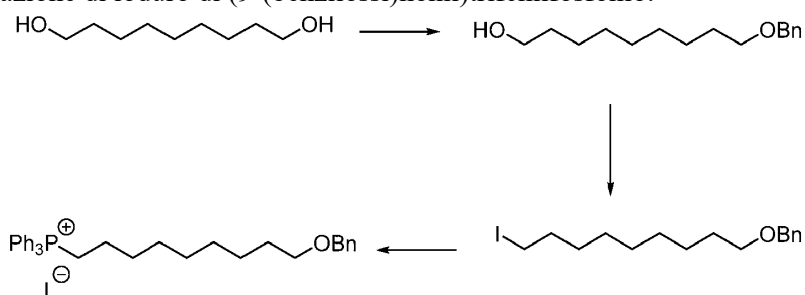
[1749] Una miscela di ((3,3-bis((*Z*)-10-(benzilossi)dec-1-en-1-il)ciclopentil)ossi)(*tert*-butil)dimetilsilano (6,52 g, 9,86 mmol) e palladio su carbonio (10%, 1,30 g) in 400 mL di EtOAc è stata spurgata con azoto, quindi idrogeno e quindi agitata sotto idrogeno per una notte. La TLC e la MS hanno mostrato una reazione completa. La miscela di reazione è stata filtrata su Celite e lavata con EtOAc. Il filtrato è stato concentrato e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 all'80% EtOAc/esani) per dare il prodotto come semisolido (4,60 g, 96%).



[1750] A 0 °C, una soluzione di 10,10'-3-((*tert*-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-diil)bis(decane-1-olo) (4,60 g, 9,49 mmol) in 100 mL di diclorometano è stata aggiunta

lentamente a una soluzione di Dess-Martin periodicanano (11,276 g, 26,6 mmol) in 50 mL di diclorometano, e quindi la miscela di reazione è stata agitata a questa temperatura per 2 ore. La miscela di reazione è stata diluita con diclorometano, quindi sono state aggiunte una soluzione di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% e una soluzione satura di bicarbonato di sodio. Dopo essere stato estratto con diclorometano (2 X), lo strato organico combinato è stato lavato con bicarbonato di sodio saturo e soluzione salina. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato. Il grezzo è stato purificato da ISCO (SiO_2 : dallo 0 al 80% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (1,20 g, 26%).

[1751] Preparazione di ioduro di (9-(benzilossi)nonil)trifenilfosfonio:



10

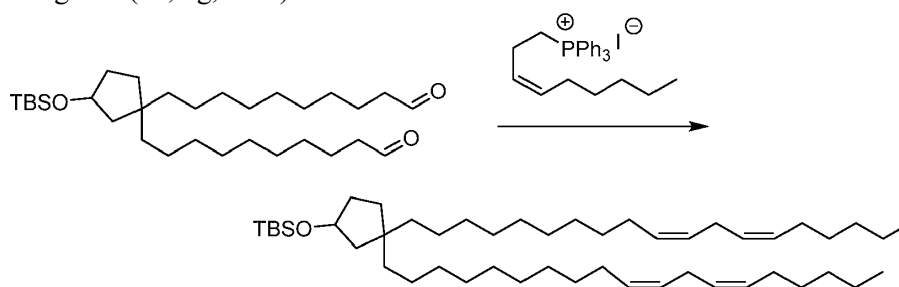
[1752] A 0 °C, una soluzione di nonan-1,9-diolo (96,16 g, 0,60 mol) in 100 mL di DMF è stata aggiunta lentamente a una sospensione di NaH (24,0 g, 0,60 mol) in 800 mL di DMF. Dopo aver agitato per 1 ora, è stata aggiunta lentamente una soluzione di benzil bromuro (71,4 mL, 0,60 moli) in 200 mL di DMF. Dopo l'aggiunta, la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La TLC ha mostrato è stato quasi consumato. La miscela di reazione è stata versata su ghiaccio e quindi estratta con EtOAc (3 X). Lo strato organico combinato è stato lavato con acqua e soluzione salina e poi essiccato su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO_2 : Dallo 0 al 100% di EtOAc/esani quindi dallo 0 al 5% di MeOH/diclorometano) per fornire il prodotto come olio incolore (74,4 g, 50%).

20

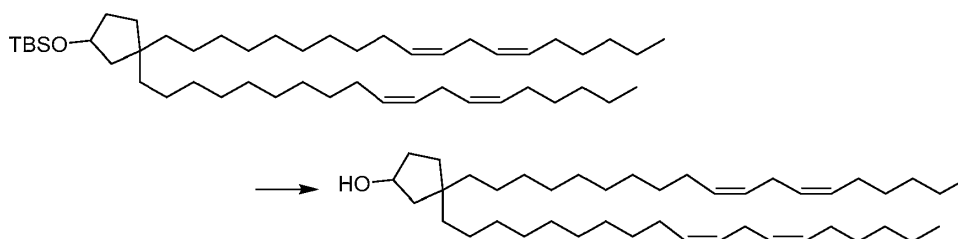
[1753] A 0 °C, una soluzione di trifetilfosfina (30,65 g, 0,117 moli) in 100 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una soluzione di 9-(benzilossi)nonan-1-olo (23,0 g,

0,097 moli), imidazolo (13,93 g, 0,204 moli) e iodio (34,60 g, 0,136 moli) in 200 mL di diclorometano, e quindi la miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per una notte. Dopo la filtrazione, il filtrato è stato concentrato e il residuo è stato triturato con esani. La soluzione è stata filtrata attraverso un tampone di gel di silice ed eluita con 10% di etere in esani per fornire il prodotto come liquido torbido (32,2 g, 95%).

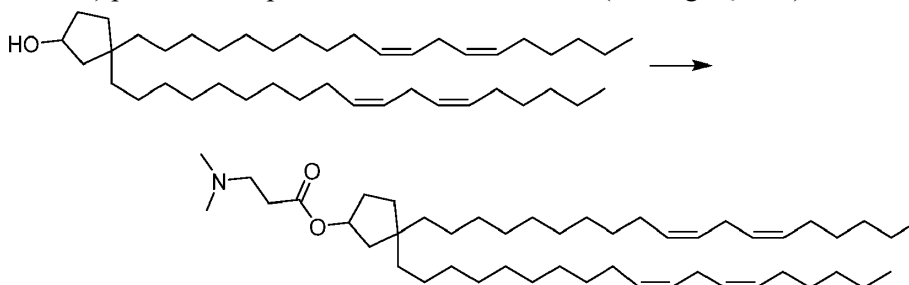
[1754] Una soluzione di (((9-iodononil)ossi)metil)benzene (32,2 g, 0,093 moli) e trifetilfosfina (48,93 g, 0,186 moli) in acetonitrile (500 mL) è stata portata a riflusso durante la notte. Dopo concentrato a secco, il residuo è stato sciolto in diclorometano e purificato mediante cromatografia flash su colonna (SiO₂: dallo 0 al 10% MeOH/CH₂Cl₂) per fornire il prodotto come un olio giallo (44,4 g, 78%).



[1755] A 0 °C, il *terz*-butossido di potassio (587 mg, 5,23 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di (*Z*)-non-3-en-1-iltrifenilfosfonio ioduro (3,69 g, 7,17 mmol) in 70 mL di THF che è stato spurgato con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di 10,10'-(3-((*terz*-butildimetilsilil)ossi)ciclopentan-1,1-diil)bis(decanal)9' (838 mg, 1.65 mmol) in 30 mL di THF (purgata con azoto 3 volte) è stata trasferita tramite cannula nella miscela di reazione, quindi la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con etere (2 X). Lo strato organico combinato è stato lavato con soluzione salina ed essiccato su solfato di sodio. Dopo filtrazione e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 5% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (926 mg, 77%).



[1756] A una soluzione di *terz*-butil(3,3-di((10*Z*,13*Z*)-nonadeca-10,13-dien-1-il)ciclopentil)ossi)dimetilsilano (926 mg, 1,27 mmol) in 100 mL di THF, è stata aggiunta una soluzione di TBAF (1,0 M in THF, 13,3 mL, 13,3 mmol) e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. La TLC ha mostrato una reazione completa. Il solvente è stato rimosso sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 20% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (830 mg, Quant.).



(Composto 21-5)

[1757] A 0 °C, piridina (0,35 mL) e la soluzione di anidride propilfosfonica (50% in peso in EtOAc, 0,7 mL, 1,21 mmol) sono state aggiunte a una soluzione di acido 3-(dimetilammino)propanoico cloridrato (151 mg, 0,98 mmol) in 6 mL di DMF. Dopo aver agitato per 10 minuti, è stata utilizzata una soluzione di 3,3-di((10*Z*,13*Z*)-nonadeca-10,13-dien-1-il)ciclopentan-1-olo (200 mg, 0,33 mmol) in 4 mL di DMF aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La MS e la TLC hanno mostrato la formazione del prodotto. È stata aggiunta una soluzione satura di bicarbonato di sodio per estinguere la reazione, quindi estratta con EtOAc (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua e soluzione salina. Dopo essere stato essiccato su solfato di sodio e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 100%

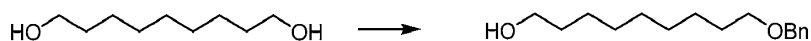
EtOAc/esani) per fornire il prodotto 3,3-Di((10Z,13Z)-nonadeca-10,13-dien-1-il)ciclopentil 3-(dimetilammino)propanoato come olio incolore (135 mg, 58%).

[1758] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,28-5,42 (m, 8 H), 5,10-5,17 (m, 1 H), 2,76 (t, 4 H, *J* = 6,1 Hz), 2,59 (t, 2 H, *J* = 6,9 Hz), 2,42 (t, 2 H, *J* = 6,9 Hz), 2,23 (s, 6 H), 2,04 (q, 8 H, *J* = 6,9 Hz), 1,75-2,00 (m, 2 H), 1,38-1,72 (m, 5 H), 1,14-1,39 (m, 43 H), 0,88 (t, 6 H, *J* = 6,9 Hz).

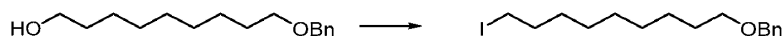
[1759] APCI: *m/z* = 710,7 [M+H]⁺.

DV. Composto 21-6: 1-(2,3-Di((8Z,11Z)-eptadeca-8,11-dien-1-il)ciclopropil)-N,N-dimetilmetanamina

[1760]

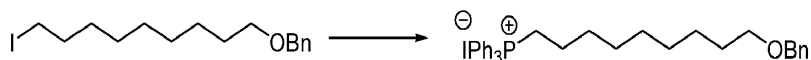


[1761] A 0 °C, una soluzione di nonan-1,9-diolo (96,16 g, 0,60 mol) in 100 mL di DMF è stata aggiunta lentamente a una sospensione di NaH (24,0 g, 0,60 mol) in 800 mL di DMF. Dopo aver agitato per 1 ora, è stata aggiunta lentamente una soluzione di benzil bromuro (71,4 mL, 0,60 moli) in 200 mL di DMF. Dopo l'aggiunta, la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per una notte. La TLC ha mostrato che il materiale di partenza era quasi consumato. La miscela di reazione è stata versata su ghiaccio e quindi estratta con EtOAc (3 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua e soluzione salina e quindi essiccati su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il grezzo è stato purificato con cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 100% di EtOAc/esani quindi dallo 0 al 5% di MeOH/diclorometano) per fornire il prodotto come olio incolore (74,4 g, 50%).

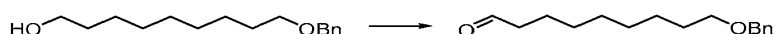


[1762] A 0 °C, una soluzione di trifenilfosfina (6,29 g, 24 mmol) in 100 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una soluzione di 9-(benzilossi)nonan-1-olo (5,0 g, 20 mmol), imidazolo (2,9 g, 42 mmol) e iodio (8,5 g, 33,6 mmol) in 100 mL di diclorometano, quindi la miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per una notte. Dopo la concentrazione, il residuo è stato tritato con esani per fornire il prodotto come liquido torbido

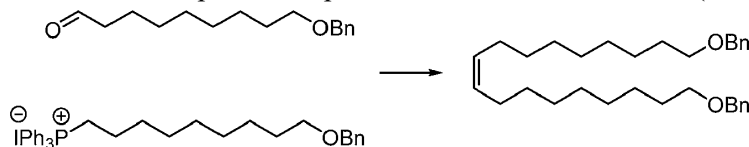
(5,38 g, 75%).



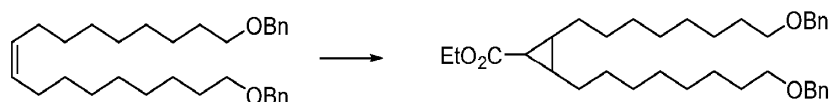
[1763] Una soluzione di (((9-iodononil)ossi)metil)benzene (5,38 g, 14,9 mmol) e trifetilfosfina (7,8 g, 29,8 mmol) in acetonitrile (100 mL) è stata portata a riflusso per una notte. Dopo
5 concentrato a secco, il residuo è stato sciolto in diclorometano e purificato mediante cromatografia flash su colonna (SiO₂: dallo 0 al 10% MeOH/CH₂Cl₂) per fornire il prodotto come un olio giallo (8,5 g, 92%).



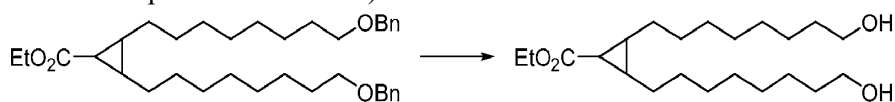
[1764] A 0 °C, una soluzione di 9-(benzilossi)nonan-1-olo (5,0 g, 20 mmol) in 50 mL di
10 diclorometano è stata aggiunta lentamente a una sospensione di Dess-Martin periodicanano (12,5 g, 29,5 mmol) in 100 mL di diclorometano, e quindi la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Dopo lo spegnimento con bicarbonato di sodio saturo, la miscela è stata estratta con diclorometano (2 X). Lo strato organico combinato è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato per dare il prodotto come un olio incolore (4,0 g, 80%).



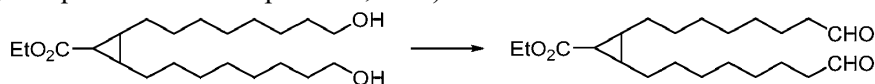
[1765] A 0 °C, il *terz*-butossido di potassio (1,54 g, 13,7 mmol) è stato aggiunto a una
sospensione di ioduro di (9-(benzilossi)nonil)trifenilfosfonio (8,5 g, 13,6 mmol) in 150 mL di
THF. Dopo 1 ora, è stata aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione una soluzione di 9-
(benzilossi)nonanale (3,0 g, 12 mmol) in 50 mL di THF, quindi la reazione è stata lasciata
20 riscaldare a temperatura ambiente per 4 ore. La TLC ha mostrato una reazione completa. La
reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con esani (2 X). Gli strati
organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la
concentrazione, il residuo è stato purificato con cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al
100% diclorometano/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (3,5 g, 63%).



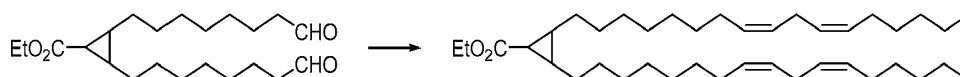
[1766] A una soluzione a riflusso di (Z)-1,18-bis(benzilossi)ottadec-9-ene (3,5 g, 7,5 mmol) in 200 mL di diclorometano, una soluzione di Cu(acac)₂ (200 mg, 0,76 mmol) in 40 mL di diclorometano è stata aggiunta. E poi è stato aggiunto etil diazoacetato (contiene il 13% di diclorometano, 9 × 1,3 mL) ogni 30 minuti. La SM ha mostrato la formazione del prodotto. La reazione è stata spenta con MeOH e agitata per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo la concentrazione, il grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (2,23 g, puro all'82% miscelato con un sottoprodotto di acetato).



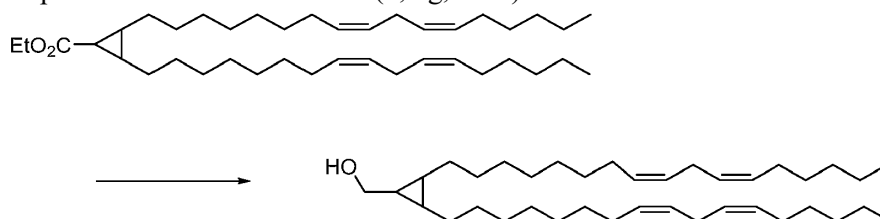
[1767] Una miscela di etil 2,3-bis(8-(benzilossi)ottil)ciclopropan-1-carbossilato (2,23 g, 4,05 mmol) e palladio su carbonio (10% in peso, 200 mg) in 200 mL di EtOAc è stata agitata a temperatura ambiente sotto pallone a idrogeno per 4,5 h. La MS e la TLC hanno mostrato una reazione completa. La miscela di reazione è stata filtrata su Celite e lavata con EtOAc. Il filtrato è stato concentrato per fornire il prodotto miscelato con il sottoprodotto, dietil succinato (1,62 g, contiene 0,55 equivalenti di sottoprodotto, 84%).



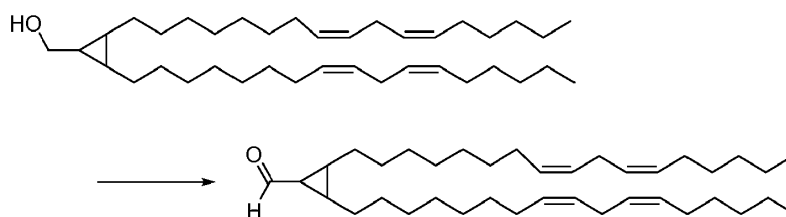
[1768] A 0 °C, una soluzione di etil 2,3-bis(8-idrossiottil)ciclopropan-1-carbossilato (1,43 g, 4,03 mmol) in 100 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una sospensione di Dess-Martin periodanano (3,63 g, 8,5 mmol) in 150 mL di diclorometano, quindi la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. Dopo lo spegnimento con bicarbonato di sodio saturo, la miscela è stata estratta con diclorometano (2 X). Lo strato organico combinato è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato per dare il prodotto come un olio incolore (1,2 g, 81%).



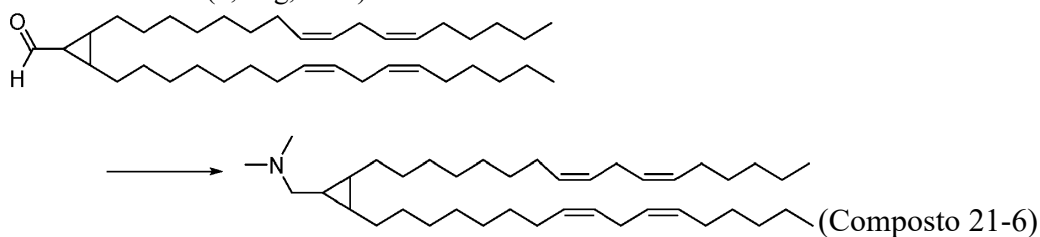
[1769] A 0 °C, il *terz*-butossido di potassio (1,7 g, 15,1 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di (Z)-non-3-en-1-iltrifenilfosfonio ioduro (5,8 g, 15,1 mmol) in 150 mL di THF che è stato spurgato con azoto 3 volte. Dopo 1 ora, una soluzione di etil 2,3-bis(8-ossoottil)ciclopropan-1-
5 carbossilato (1,2 g, 3,28 mmol) in 50 mL di THF (spurgata con azoto 3 volte) è stata trasferita tramite cannula nella miscela di reazione, e quindi la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per una notte. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e quindi estratta con esani (2 X). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo filtrazione
10 e concentrazione, il residuo è stato purificato mediante ISCO (SiO₂: dallo 0 al 3% EtOAc/esani) per fornire il prodotto come olio incolore (1,3 g, 68%).



[1770] Una soluzione di idruro di litio e alluminio (2,0 M in THF, 1,7 mL, 3,35 mmol) è stata aggiunta lentamente a una soluzione di etil 2,3-di((8Z,11Z)-eptadeca-8,11-dien-1-
15 il)ciclopropan-1-carbossilato (1,3 g, 2,23 mmol) in 150 mL di THF, e quindi la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 30 minuti. La TLC ha mostrato una reazione completa. La reazione è stata spenta mediante aggiunta lenta di Na₂SO₄·10H₂O, quindi la miscela è stata filtrata e lavata con THF. Il filtrato è stato concentrato e purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 10% EtOAc/esani) per dare il prodotto come
20 olio incolore (1,1 g, 91%).



[1771] A 0 °C, una soluzione di (2,3-di((8Z,11Z)-eptadeca-8,11-dien-1-il)ciclopropil)metanolo (1,1 g, 2,03 mmol) in 50 mL di diclorometano è stata aggiunta lentamente a una sospensione di periodinano Dess-Martin (1,30 g, 3,05 mmol) in 150 mL di diclorometano, e quindi la miscela
5 di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. Dopo lo spegnimento con bicarbonato di sodio saturo, la miscela è stata estratta con diclorometano (2 X). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio e concentrato per dare il prodotto come un olio incolore (0,87 g, 79%).



10 [1772] A una soluzione di 2,3-di((8Z,11Z)-eptadeca-8,11-dien-1-il)ciclopropan-1-carbaldeide (0,87 g, 1,61 mmol) in 200 mL di THF, dimetilammina (2,0 M in THF, 1,61 mL, 3,22 mmol), sodio triacetossiboroidruro (682 mg, 3,22 mmol) e acido acetico (0,19 mL, 3,22 mmol) sono stati aggiunti in sequenza e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una
15 notte. La MS ha mostrato una reazione completata ed è stato aggiunto bicarbonato di sodio saturo per estinguere la reazione. La miscela è stata estratta con EtOAc (2 X) e gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina ed essiccati su solfato di sodio. Dopo la filtrazione e la concentrazione, il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (SiO₂: dallo 0 al 10% MeOH/diclorometano) per dare al prodotto 1-(2,3-di((8Z,11Z)-
20 eptadeca-8,11-dien-1-il)ciclopropil)-N,N-dimetilmetanamina come incolore olio (620 mg, 65%).

[1773] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5,27-5,42 (m, 8 H), 2,76 (t, 4 H, $J = 6,0$ Hz), 2,38 (bs, 8 H), 2,04 (q, 8 H, $J = 6,6$ Hz), 1,18-1,59 (m, 36 H), 0,88 (t, 6 H, $J = 6,6$ Hz), 0,52-0,58 (m, 2 H), 0,28-0,38 (m, 1 H).

[1774] APCI: $m/z = 568,6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5 Esempio 2: produzione delle composizioni di nanoparticelle

produzione delle composizioni di nanoparticelle

[1775] Al fine di studiare composizioni di nanoparticelle sicure ed efficaci per l'uso nel rilascio di agenti terapeutici e/o profilattici nelle cellule, viene preparata e testata una gamma di formulazioni. Specificamente, vengono ottimizzati gli specifici elementi e loro rapporti nel componente lipidico delle composizioni di nanoparticelle sono.

[1776] Le nanoparticelle possono essere realizzate con processi di miscelazione come la microfluidica e la miscelazione con giunzione a T di due flussi di fluidi, uno dei quali contiene l'agente terapeutico e/o profilattico e l'altro ha i componenti lipidici.

[1777] Le composizioni lipidiche vengono preparate combinando un lipide secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-I), un fosfolipide (come DOPE o DSPC, ottenibile da Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), un lipide PEG (come 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol metossipolietilenglicole, noto anche come PEG-DMG, ottenibile da Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), e un lipide strutturale (come il colesterolo, ottenibile da Sigma -Aldrich, Taufkirchen, Germania) a concentrazioni di circa 50 mM in etanolo. Le soluzioni devono essere refrigerate per la conservazione, ad esempio, a -20 °C. I lipidi vengono combinati per ottenere i rapporti molari desiderati (si veda, ad esempio, Tabella 1) e diluiti con acqua ed etanolo fino a una concentrazione lipidica finale compresa tra circa 5,5 mM e circa 25 mM.

[1778] Le composizioni di nanoparticelle che includono un agente terapeutico e/o profilattico e un componente lipidico vengono preparate combinando la soluzione lipidica con una soluzione

che include l'agente terapeutico e/o profilattico dal componente lipidico all'agente terapeutico e/o profilattico rapporti peso: peso tra circa 5:1 e circa 50:1. La soluzione lipidica viene iniettata rapidamente utilizzando un sistema a base microfluidica NanoAssemblr a portate comprese tra circa 10 mL/min e circa 18 mL/min nella soluzione di agente terapeutico e/o profilattico per produrre una sospensione con un rapporto acqua/etanolo compreso tra circa 1:1 e circa 4:1.

[1779] Per le composizioni di nanoparticelle che includono un RNA, le soluzioni dell'RNA a concentrazioni di 0,1 mg/mL in acqua deionizzata vengono diluite in tampone di citrato di sodio 50 mM a un pH compreso tra 3 e 4 per formare una soluzione madre.

[1780] Le composizioni di nanoparticelle possono essere elaborate mediante dialisi per rimuovere l'etanolo e ottenere lo scambio del tampone. Le formulazioni vengono dializzate due volte contro soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), pH 7,4, a volumi pari a 200 volte quelli del prodotto primario utilizzando cassette Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) con un cutoff di peso molecolare di 10 kD. La prima dialisi viene effettuata a temperatura ambiente per 3 ore. Le formulazioni vengono quindi dializzate per una notte a 4 °C.

La sospensione di nanoparticelle risultante viene filtrata attraverso filtri sterili da 0,2 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Germania) in flaconcini in vetro e sigillate con chiusure corrugate. Si ottengono generalmente soluzioni di composizione di nanoparticelle da 0,01 mg/mL a 0,10 mg/mL.

[1781] Il metodo sopra descritto induce nanoprecipitazione e formazione di particelle. Per ottenere la stessa nanoprecipitazione possono essere utilizzati processi alternativi tra cui, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, giunzione a T e iniezione diretta.

Caratterizzazione di composizioni di nanoparticelle

[1782] Uno Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Regno Unito) può essere utilizzato per determinare la granulometria, l'indice di polidispersità (PDI) e il potenziale zeta delle composizioni di nanoparticelle in 1×PBS nella determinazione della

granulometria e 15 mM PBS nella determinazione del potenziale zeta.

[1783] La spettroscopia ultravioletta-visibile può essere utilizzata per determinare la concentrazione di un agente terapeutico e/o profilattico (ad es. RNA) nelle composizioni di nanoparticelle. 100 µL della formulazione diluita in 1xPBS viene aggiunto a 900 µl di una miscela 4:1 (v/v) di metanolo e cloroformio. Dopo la miscelazione, lo spettro di assorbanza della soluzione viene registrato, ad esempio, tra 230 nm e 330 nm su uno spettrofotometro DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). La concentrazione di agente terapeutico e/o profilattico nella composizione delle nanoparticelle può essere calcolata in base al coefficiente di estinzione dell'agente terapeutico e/o profilattico utilizzata nella composizione e alla differenza tra l'assorbanza a una lunghezza d'onda di, ad esempio, 260 nm e il valore di riferimento a una lunghezza d'onda di, ad esempio, 330 nm.

[1784] Per le composizioni di nanoparticelle che includono un RNA, un saggio QUANT-IT™ RIBOGREEN® RNA (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) può essere utilizzato per valutare l'incapsulamento di un RNA da parte della composizione di nanoparticelle. I campioni vengono diluiti a una concentrazione di circa 5 µg/mL in una soluzione tampone TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). 50 µL dei campioni diluiti vengono trasferiti su una piastra a 96 pozzetti di polistirene e ai pozzetti vengono aggiunti 50 µL di tampone TE o 50 µL di una soluzione di Triton X-100 al 2%. La piastra viene incubata ad una temperatura di 37 °C per 15 minuti. Il reagente RIBOGREEN® viene diluito 1:100 in tampone TE e 100 µL di questa soluzione vengono aggiunti a ciascun pozzetto. L'intensità della fluorescenza può essere misurata utilizzando un lettore di piastre a fluorescenza (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) a una lunghezza d'onda di eccitazione, ad esempio, di circa 480 nm e una lunghezza d'onda di emissione, ad esempio, di circa 520 nm. I valori di fluorescenza del bianco reagente vengono sottratti da quello di ciascuno dei campioni e la percentuale di RNA libero viene determinata dividendo l'intensità di fluorescenza del campione intatto (senza aggiunta di

Triton X-100) per il valore di fluorescenza del campione disgregato (causato dall'aggiunta di Triton X-100).

Studi di formulazione *in vivo*

[1785] Al fine di monitorare l'efficacia con cui varie composizioni di nanoparticelle rilasciano gli agenti terapeutici e/o profilattici nelle cellule bersaglio, vengono preparate diverse composizioni di nanoparticelle che includono uno specifico agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio, un RNA modificato o presente in natura come un mRNA) e vengono somministrate a popolazioni di roditori. Ai topi viene somministrata per via endovenosa, intramuscolare, intraarteriosa o intratumorale una singola dose comprendente una composizione di nanoparticelle con una formulazione come quelle fornite nella Tabella 1. In alcuni casi, ai topi le dosi possono essere fatte inalare. Le dimensioni della dose possono variare da 0,001 mg/kg a 10 mg/kg, dove 10 mg/kg descrive una dose che include 10 mg di un agente terapeutico e/o profilattico in una composizione di nanoparticelle per ogni 1 kg di massa corporea del topo. Può anche essere impiegata una composizione di controllo che include PBS.

[1786] Dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle ai topi, i profili di rilascio della dose, le risposte alla dose e la tossicità di specifiche formulazioni e dosi delle stesse possono essere misurati mediante saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), imaging bioluminescente o altri metodi. Per le composizioni di nanoparticelle che includono l'mRNA, è anche possibile valutare i corsi temporali dell'espressione proteica. I campioni raccolti dai roditori per la valutazione possono includere sangue, sieri e tessuto (ad esempio, tessuto muscolare dal sito di un'iniezione intramuscolare e tessuto interno); la raccolta dei campioni può prevedere la soppressione degli animali.

[1787] Le composizioni di nanoparticelle che includono l'mRNA sono utili nella valutazione dell'efficacia e dell'utilità di varie formulazioni per la somministrazione di agenti terapeutici e/o profilattici. Livelli più elevati di espressione proteica indotta dalla somministrazione di una

composizione che include un mRNA saranno indicativi di maggiori efficienze di traduzione dell'mRNA e/o di rilascio dell'mRNA della composizione di nanoparticelle. Poiché non si ritiene che i componenti non RNA influenzino i meccanismi traduzionali stessi, un livello più elevato di espressione proteica è probabilmente indicativo di una maggiore efficienza di rilascio

5 dell'agente terapeutico e/o profilattico da parte di una data composizione di nanoparticelle rispetto ad altre composizioni di nanoparticelle o della sua assenza.

Esempio 3: formulazioni campione

[1788] Le composizioni di nanoparticelle che includono un agente terapeutico e/o profilattico possono essere ottimizzate in base alla selezione di un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), la selezione

10 di lipidi aggiuntivi, la quantità di ciascun lipide nel componente lipidico, e il rapporto peso: peso del componente lipidico rispetto all'agente terapeutico e/o profilattico, come qui descritto.

[1789] Sono stati condotti studi iniziali per confrontare l'efficienza di rilascio di composizioni di nanoparticelle inclusi vari composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1). Il lipide cationico MC3 è uno standard

15 attuale nella tecnica. Di conseguenza, la formulazione con MC3 standard che include circa il 50% in moli di MC3, circa il 10% in moli di DSPC, circa il 38,5% in moli di colesterolo e circa l'1,5% in moli di PEG-DMG è stata utilizzata come base per questo studio. Composizioni di nanoparticelle che includono DOPE o DSPC come fosfolipide, colesterolo come lipide

20 strutturale, PEG-DMG come lipide PEG, un RNA e un composto secondo una delle formule qui descritte, ad esempio, selezionato da composti di formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-I), sono stati preparati secondo gli Esempi 1 e 2. I rapporti dei lipidi erano 40:20:38,5:1,5% in moli per il lipide qui descritto:DOPE:colesterolo:PEG-DMG o 50:10:38,5:1,5% in moli per il lipide qui

25 descritto: DSPC:colesterolo:PEG-DMG. L'RNA utilizzato era un mRNA che codifica per G5

luciferasi (Luc) o G5 hEPO. Le Tabelle 1, 1b, 17-1, 19-1, 20-1 e 21-1 riassumono il contenuto e le caratteristiche delle formulazioni.

[1790] Come mostrato nelle Tabelle 1 e 1a, le composizioni di nanoparticelle che includono il Composto 1 hanno prodotto le particelle più grandi tra quelle delle Tabelle 1 e 1a, mentre quelle che includono i Composti 34 e 50 hanno prodotto le particelle più piccole tra quelle delle Tabelle 1 e 1a. Le efficienze di incapsulamento tra quelle delle Tabelle 1 e 1a erano massime per composizioni che includevano i Composti 36, 37, 40 e 41 e più basse per quelle che includevano i Composti 1 e 24.

10 Tabella 1. Caratteristiche delle composizioni di nanoparticelle inclusi i composti di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|-----------------|-----------------|-------|--------|------|
| 1 | 203,2 | | 46,2 | 5,95 |
| 2* | 94,7 | 0,108 | 96 | 6,39 |
| 3 | 73,5 | 0,044 | 92,5 | n.r. |
| 4 | 89,7 | 0,120 | 96,78 | 7,12 |
| 5 | 85,1 | 0,140 | 98,1 | 7,01 |
| 6 | 81,4 | 0,160 | 98,9 | 6,62 |
| 7 | 85,1 | 0,130 | 99,1 | 6,94 |
| 8 | 83,3 | 0,110 | 98,5 | 6,87 |
| 9 | 78,0 | 0,170 | 99,5 | 6,76 |
| 10 | 81,3 | 0,130 | 99,2 | 6,58 |
| 11 | 87,4 | 0,099 | 99,5 | 6,54 |
| 12 | 87,8 | 0,096 | 96,9 | 5,44 |
| 13 | 97,7 | 0,080 | 64,2 | 6,30 |
| 14 | 88,7 | 0,008 | 96,6 | 6,31 |
| 15 [#] | 100,3 | 0,120 | 90,2 | 6,32 |
| 16 [#] | 77,4 | 0,140 | 98,2 | 6,28 |
| 17 | 82,3 | 0,180 | 96,6 | 6,67 |
| 18 | 767 | 0,120 | 98,4 | 6,17 |

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|-----------------|-----------------|-------|--------|------|
| 19 | 76,1 | 0,100 | 97,2 | 6,29 |
| 20 | 106,4 | 0,150 | 84,2 | 6,12 |
| 21 | 98,3 | 0,239 | 98,6 | 6,29 |
| 22 [#] | 75,4 | 0,130 | 98,3 | 6,15 |
| 23 | 85,4 | 0,058 | 82,9 | 6,07 |
| 24 [*] | 110,4 | 0,131 | 36,4 | 6,01 |
| 25 | 90,0 | 0,186 | 97,0 | 6,20 |
| 26 [*] | 74,2 | 0,112 | 84,9 | 6,19 |
| 27 | 86,4 | 0,211 | 97,9 | 6,14 |
| 28 | 87,4 | 0,099 | 80,2 | 6,04 |
| 29 | 105,3 | 0,060 | 48,8 | 5,97 |
| 30 | 95,0 | 0,110 | 74,3 | 6,09 |
| 31 | 87,9 | 0,130 | 77,5 | 6,31 |
| 32 | 79,3 | 0,160 | 83,6 | 6,28 |
| 33 | 797 | 0,138 | 98,1 | 6,06 |
| 34 [*] | 66,0 | 0,077 | 98,1 | 5,74 |
| 36 [*] | 100,8 | 0,110 | 100,2 | 7,81 |
| 37 [*] | 86,6 | 0,107 | 99,9 | 6,45 |
| 40 [*] | 78,9 | 0,210 | 100,0 | 6,78 |
| 41 [*] | 69,0 | 0,239 | 99,9 | 7,02 |
| 42 | 116,4 | 0,190 | 97,1 | 6,77 |
| 43 | 99,0 | 0,220 | 99,1 | 6,72 |
| 44 | 94,9 | 0,190 | 89,5 | 6,82 |
| 45 | 100,2 | 0,200 | 94,9 | 6,77 |
| 46 | 81,8 | 0,160 | 97,5 | 6,77 |
| 47 | 89,8 | 0,180 | 53,1 | 6,82 |
| 48 | 111,4 | 0,099 | 79,3 | 6,99 |
| 49 | 95,8 | 0,200 | 98,8 | 6,4 |
| 50 | 65,6 | 0,190 | 98,7 | 5,55 |
| 51 | 766 | 0,190 | 98,4 | 6,44 |
| 52 | 94,4 | 0,100 | 97,5 | 6,77 |

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|---|-----------------|-------|--------|------|
| Formula IV | 94,2 | | 97,6 | 6,25 |
| MC3 | 86,2 | 0,117 | 97,70 | n.d. |
| n.d.=non determinato *=Formulato con lipide:DSPC:Col:PEG-DMG 50:10:38,5:1,5 #=Formulato con hEPO mRNA | | | | |

Tabella 1b. Caratteristiche delle composizioni di nanoparticelle inclusi i composti di una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) |
|-------------|-----------------|------|--------|
| 53 | 103,0 | 0,23 | 82,8 |
| 54 | 93,0 | 0,23 | 96,9 |
| 55 | 119,5 | 0,23 | 95,2 |
| 56 | 117,4 | 0,24 | 99,0 |
| 57 | 101,9 | 0,23 | 98,8 |
| 58 | 112,8 | 0,23 | 98,9 |
| 59 | 104,7 | 0,23 | 98,6 |
| 60 | 105,7 | 0,23 | 98,8 |
| 61 | 86,8 | 0,23 | 99,1 |
| 62 | 61,7 | 0,18 | 97,73 |
| 69 | 74,4 | 0,24 | 99,31 |
| 70 | 79,8 | 0,24 | 99,14 |
| 71 | 99,9 | 0,18 | 91,0 |
| 72 | 102,5 | 0,22 | 92,7 |
| 73 | 84,3 | 0,25 | 98,85 |
| 80 | 65,8 | 0,2 | 98,93 |
| 81 | 65,3 | 0,17 | 99,27 |
| 82 | 76,1 | 0,24 | 99,23 |
| 83 | 73,2 | 0,22 | 99,12 |
| 84 | 68,6 | 0,19 | 98,48 |
| 85 | 69,9 | 0,24 | 99,18 |
| 86 | 53,6 | 0,14 | 97,42 |
| 87 | 80,9 | 0,21 | 98,67 |

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) |
|-------------|-----------------|------|--------|
| MC3 | 74,7 | 0,17 | 97,3 |

[1791] Come mostrato nella Tabella 17-1, i Composti 17-7 e 17-12 hanno prodotto le particelle più piccole tra quelle della Tabella 17-1, mentre i Composti 17-2 e 17-10 hanno prodotto le particelle più grandi tra quelle della Tabella 17-1. Le efficienze di incapsulamento per i composti 17-6 e 17-8 erano paragonabili a quelle per MC3. I composti 17-2 e 17-10 non hanno
5 incapsulato l'RNA con alta efficienza.

Tabella 17-1: Caratteristiche delle composizioni di nanoparticelle compresi i composti secondo la formula (17-1).

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|----------------------|-----------------|-------|--------|------|
| 17-2 | 136,9 | 0,104 | 57,2 | 6,92 |
| 17-3 | 117,9 | 0,095 | 82,1 | 6,69 |
| 17-4 | 95,6 | 0,154 | 94,5 | 6,34 |
| 17-5 | 88,4 | 0,137 | 94,2 | 6,92 |
| 17-6 | 80,2 | 0,117 | 97,3 | 6,73 |
| 17-7 | 68,5 | 0,110 | 95,6 | 5,68 |
| 17-8 | 86,4 | 0,20 | 96,9 | 6,16 |
| 17-9 | 87,1 | 0,138 | 95,0 | 4,93 |
| 17-10 | 165,0 | 0,239 | 30,3 | 2,85 |
| 17-11 | 87,3 | 0,24 | 88,7 | 6,76 |
| 17-12 | 76,1 | 0,148 | 95,04 | 6,83 |
| 17-13 | 90,4 | 0,176 | 89,22 | 6,89 |
| MC3 | 83,8 | 0,138 | 98,0 | n.d. |
| n.d.=non determinato | | | | |

[1792] Come mostrato nella Tabella 19-1, le composizioni che includono il Composto 19-6 hanno prodotto le particelle più grandi tra quelle della Tabella 19-1 con l'efficienza di
10 incapsulamento più bassa, mentre quelle che includono il Composto 19-3 hanno prodotto le particelle più piccole tra quelle della Tabella 19 -1 con la massima efficienza di incapsulamento.

Tabella 19-1: Caratteristiche delle composizioni di nanoparticelle compresi i composti secondo

la formula (19-1) o (19-11).

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|----------------------|-----------------|-------|--------|------|
| 19-1 | 98,0 | 0,071 | 83,4 | 6,76 |
| 19-2 | 72,0 | 0,239 | 98,8 | 7,32 |
| 19-3 | 47,9 | 0,076 | 99,7 | 7,24 |
| 19-4 | 111,4 | 0,071 | 95,2 | 7,09 |
| 19-5 | 106,9 | 0,204 | 93,6 | 6,32 |
| 19-6 | 137,7 | 0,088 | 16,9 | 5,89 |
| MC3 | 83,3 | 0,122 | 97,6 | n.d. |
| n.d.=non determinato | | | | |

[1793] Come mostrato nella Tabella 20-1, le composizioni che includono il Composto 20-12 hanno prodotto le particelle più grandi tra quelle della Tabella 20-1, mentre le composizioni che includono i Composti 20-8, 20-9 e 20-15 hanno prodotto le particelle più piccole tra quelli della Tabella 20-1. Le efficienze di incapsulamento per i composti della Tabella 20-1 erano massime per le composizioni che includevano il Composto 20-19.

Tabella 20-1: Caratteristiche delle composizioni di nanoparticelle compresi i composti secondo la formula (20-1).

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|-------------|-----------------|-------|--------|------|
| 20-1 * | 87,8 | 0,078 | 90,7 | 4,48 |
| 20-2 | 71,8 | 0,130 | 91,6 | 6,60 |
| 20-3 | 76,4 | 0,110 | 95,8 | 6,82 |
| 20-4 | 82,1 | 0,160 | 91,3 | 6,86 |
| 20-5 | 119,3 | 0,210 | 78,1 | 6,79 |
| 20-6 | 82,5 | 0,220 | 94,7 | 6,73 |
| 20-7 | 73,6 | 0,170 | 92,4 | 6,66 |
| 20-8 | 67,9 | 0,141 | 96,6 | 6,43 |
| 20-9 | 64,5 | 0,130 | 95,9 | 6,22 |
| 20-10 | 85,7 | 0,130 | 91,4 | 6,42 |
| 20-11 | 96,1 | 0,118 | 97,5 | 5,38 |
| 20-12 | 147,1 | 0,217 | 82,3 | 6,58 |

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|--|-----------------|-------|--------|------|
| 20-13 | 74,3 | 0,057 | 97,7 | 5,83 |
| 20-14 | 124,0 | 0,215 | 94,5 | 5,89 |
| 20-15 | 67,4 | 0,118 | 97,4 | 6,48 |
| 20-16 | 73,5 | 0,225 | 97,2 | 6,62 |
| 20-17 | 71,2 | 0,092 | 98,2 | 6,25 |
| 20-18 | 70,1 | 0,150 | 91,1 | 6,31 |
| 20-19 | 74,9 | 0,145 | 99,5 | 4,73 |
| 20-20 | 86,8 | 0,159 | 95,2 | 6,41 |
| 20-21 | 78,6 | 0,238 | 84,7 | 5,78 |
| 20-22 | 73,8 | 0,146 | 95,3 | 5,90 |
| 20-23 | 88,1 | 0,080 | 95,3 | 6,56 |
| 20-24 | 90,6 | 0,038 | 96,9 | 6,06 |
| 20-25 | 71,7 | 0,171 | 98,4 | 6,23 |
| MC3 | 84,0 | 0,117 | 97,4 | n.d. |
| n.d.=non determinato *=Formulato con DOPE | | | | |

[1794] Come mostrato nella Tabella 21-1, le composizioni che includono il Composto 21-1 hanno prodotto le particelle più grandi, tra quelle della Tabella 21-1 mentre quelle che includono il Composto 21-2 hanno prodotto le particelle più piccole tra quelle della Tabella 21-1. L'efficienza di incapsulamento per tutte le composizioni della Tabella 21-1 era maggiore del 98%.

Tabella 21-1: Caratteristiche delle composizioni di nanoparticelle compresi i composti secondo la formula (21-I).

| Composto n. | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa |
|----------------------|-----------------|--------|--------|------|
| 21-1 | 119,9 | 0,237 | 98,4 | 6,07 |
| 21-2 | 83,0 | 0,200 | 99,4 | 6,98 |
| 21-4 | 94,9 | 0,193 | 98,8 | 7,01 |
| 21-6 | 86,8 | 0,110 | 98,9 | 6,99 |
| MC3 | 91,4 | 0,1191 | 98,1 | n.d. |
| n.d.=non determinato | | | | |

Esempio 4: espressione di Luc indotta da formulazioni campione

[1795] L'efficacia delle composizioni di nanoparticelle presentate nelle Tabelle 1, 1a, 17-1, 19-1, 20-1 e 21-1 è stata valutata con uno studio di bioluminescenza. Le formulazioni sono state somministrate per via endovenosa ai topi (n = 6) a un dosaggio di 0,5 mg/kg (mpk) e la bioluminescenza è stata misurata a 3, 6 e 24 ore. La formulazione standard MC3 e un controllo PBS sono stati valutati per il confronto.

[1796] Come è evidente nella Tabella 2, il flusso totale per le composizioni ivi presentate era generalmente comparabile a 3 e 6 ore. Il flusso totale dopo 24 ore era generalmente inferiore a quello dei punti temporali precedenti. Tra le composizioni della Tabella 2, le composizioni che includevano i Composti 18, 23 e 30 mostravano il flusso più alto dopo 3 ore. Delle composizioni della Tabella 2, le composizioni che includevano i Composti 36 e 37 mostravano il flusso più basso dopo 24 ore. In generale, questi risultati suggeriscono che i composti qui descritti possono essere utili nelle applicazioni di trasfezione.

Tabella 2. Espressione della luciferasi indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 2 | 6,01E+09 | 3,23E+09 | 3,23E+09 |
| 3 | 3,75E+08 | 1,12E+09 | n.d. |
| 11 | 1,23E+10 | 3,81E+09 | 8,20E+08 |
| 12 | 1,06E+ 10 | 1,38E+10 | 6,03E+08 |
| 13 | 3,59E+09 | 3,80E+09 | 3,11E+08 |
| 14 | 9,86E+08 | 1,56E+09 | 1,02E+08 |
| 17 | 7,55E+09 | 2,49E+09 | 7,61E+08 |
| 18 | 2,13E+10 | 1,76E+10 | 7,00E+08 |
| 19 | 1,06E+ 10 | 6,52E+09 | 2,65E+09 |
| 20 | 1,00E+11 | 1,11E+11 | 4,60E+09 |

| Composto n. | Flusso totale | | |
|----------------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 21 | 1,13E+10 | 1,08E+10 | 1,18E+08 |
| 23 | 2,33E+10 | 3,40E+10 | 1,06E+09 |
| 25 | 1,06E+ 10 | 1,08E+10 | 2,72E+08 |
| 26 | 1,65E+07 | 1,04E+07 | 2,75E+06 |
| 27 | 4,56E+09 | 4,70E+09 | 1,36E+08 |
| 28 | 6,18E+09 | 7,28E+09 | 4,02E+08 |
| 29 | 1,22E+08 | 2,51E+08 | 2,69E+07 |
| 30 | 2,87E+10 | 1,59E+10 | 1,95E+09 |
| 31 | 1,43E+10 | 1,42E+10 | 3,07E+08 |
| 32 | 6,85E+08 | 5,88E+08 | 4,37E+07 |
| 33 | 1,64E+09 | 4,71E+09 | 1,54E+08 |
| 34 | 7,77E+06 | 1,88E+07 | 2,19E+06 |
| 36 | 6,90E+05 | 3,93E+05 | 1,68E+05 |
| 37 | 1,19E+07 | 6,66E+06 | 9,38E+05 |
| 40 | 1.24E+08 | 1,07E+07 | 5,62E+06 |
| 41 | 4,06E+07 | 2,04E+07 | 6,05E+07 |
| 42 | n.d. | 4,99E+10 | n.d. |
| 43 | n.d. | 4,54E+09 | n.d. |
| 44 | n.d. | 1,07E+10 | n.d. |
| 45 | n.d. | 7,86E+10 | n.d. |
| 46 | n.d. | 5,26E+09 | n.d. |
| 47 | n.d. | 2,64E+09 | n.d. |
| 48 | n.d. | 1,05E+08 | n.d. |
| 49 | n.d. | 5,67E+10 | n.d. |
| 50 | n.d. | 1,48E+08 | n.d. |
| 51 | n.d. | 6,70E+10 | n.d. |
| 52 | n.d. | 9,85E+10 | n.d. |
| MC3 | 1,63E+10 | 1,73E+10 | 1,16E+09 |
| n.d.=non determinato | | | |

[1797] Come è evidente nella Tabella 17-2, le composizioni di nanoparticelle che includono

MC3 hanno mostrato il flusso totale più alto della Tabella 17-2, mentre quelle che includono i Composti 17-4 e 17-8 hanno mostrato un flusso sostanzialmente più elevato rispetto alle composizioni che includono i Composti 17-2, 17-3 e 17-7. Il flusso totale a 6 ore era superiore a quello a 3 ore per alcune composizioni della Tabella 17-2. In generale, per le composizioni della

5 Tabella 17-2, il flusso totale a 24 ore era inferiore al flusso totale misurato a 3 o 6 ore.

Tabella 17-2: Espressione della luciferasi indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono composti secondo la formula (17-1).

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 17-2 | 2,83E+05 | 3,76E+05 | 2,64E+05 |
| 17-3 | 5,58E+05 | 1,38E+06 | 9,90E+05 |
| 17-4 | 1,22E+09 | 3,60E+08 | 6,05E+07 |
| 17-5 | 6,64E+08 | 8,54E+08 | 5,97E+07 |
| 17-6 | 6,27E+07 | 1,19E+08 | 1,27E+07 |
| 17-7 | 4,68E+05 | 6,82E+05 | 5,46E+05 |
| 17-8 | 1,02E+09 | 5,94E+08 | 3,79E+07 |
| 17-9 | 6,87E+06 | 9,97E+06 | 3,43E+05 |
| 17-10 | 6,61E+05 | 1,16E+06 | 4,06E+05 |
| 17-11 | 1,86E+06 | 2,82E+06 | 2,70E+05 |
| 17-12 | 2,94E+06 | 2,54E+06 | 4,66E+05 |
| 17-13 | 1,10E+06 | 1,80E+06 | 7,95E+05 |
| MC3 | 1,63E+10 | 2,13E+10 | 1,01E+09 |

[1798] Come è evidente nella Tabella 19-2, le composizioni che includono MC3 hanno indotto la massima espressione delle composizioni della Tabella 19-2 in ogni momento. Le

10 composizioni che includono i Composti 19-5 e 19-6 hanno prodotto il flusso successivo più alto della Tabella 19-2 in ogni momento, mentre quelle che includono il Composto 19-2 hanno prodotto il flusso totale più basso della Tabella 19-2 in ogni momento.

Tabella 19-2: Espressione della luciferasi indotta dalla somministrazione di composizioni di

nanoparticelle che includono composti secondo la formula (19-1) o (19-II).

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 19-1 | 6,77E+05 | 1,85E+06 | 2,75E+05 |
| 19-2 | 1,96E+05 | 3,51E+05 | 2,29E+05 |
| 19-3 | 1,69E+06 | 1,21E+06 | 3,39E+05 |
| 19-4 | 6,61E+05 | 4,75E+05 | 3,44E+05 |
| 19-5 | 2,37E+07 | 1,44E+07 | 2,76E+06 |
| 19-6 | 1,07E+07 | 1,27E+07 | 1,29E+06 |
| MC3 | 1,53E+10 | 1,73E+10 | 1,13E+09 |

[1799] Come è evidente nella Tabella 20-2, il flusso per le composizioni della Tabella 20-2 era generalmente massimo 3 ore dopo la somministrazione. Il flusso totale per le composizioni della Tabella 20-2 era massimo dopo 3 ore per composizioni che includevano MC3, Composto 20-6 o
5 Composto 20-7. Tra le composizioni della Tabella 20-2, l'espressione 24 ore dopo la somministrazione era più bassa per le composizioni che includevano i Composti 20-1, 20-6 e 20-16.

Tabella 20-2: Espressione della luciferasi indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono composti secondo la formula (20-1).

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 20-1 | 1,44E+06 | 8,30E+05 | 4,53E+05 |
| 20-2 | 1,35E+09 | 2,18E+09 | 6,49E+07 |
| 20-3 | 5,35E+09 | 3,00E+09 | 6,49E+07 |
| 20-4 | 3,01E+06 | 1,75E+06 | 6,82E+08 |
| 20-5 | 6,07E+07 | 1,99E+07 | 2,07E+06 |
| 20-6 | 3,39E+10 | 5,44E+06 | 5,48E+05 |
| 20-7 | 1,22E+10 | 8,94E+09 | 2,65E+08 |
| 20-8 | 2,76E+09 | 4,37E+09 | 1,30E+08 |
| 20-9 | 3,65E+08 | 6,91E+08 | 4,81E+07 |
| 20-10 | 5,05E+09 | 2,16E+09 | 2,54E+08 |

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 20-11 | 1,44E+09 | 8,83E+08 | 2,40E+07 |
| 20-12 | 1,57E+09 | 1,84E+09 | 1.24E+08 |
| 20-13 | 7,01E+08 | 1,82E+09 | 7,39E+07 |
| 20-14 | 1,76E+09 | 4,07E+08 | 8,10E+07 |
| 20-15 | 3,36E+08 | 2,25E+08 | 2,08E+07 |
| 20-16 | 7,88E+05 | 6,25E+05 | 2,16E+05 |
| 20-17 | 1,97E+07 | 1,44E+07 | 1,54E+06 |
| 20-18 | 5,80E+09 | 6,48E+09 | 1,54E+09 |
| 20-19 | 5,37E+05 | 7,60E+05 | 6,08E+05 |
| 20-20 | 4,56E+09 | 3,27E+09 | 3,56E+08 |
| 20-21 | 1,43E+09 | 1,02E+09 | 1,13E+08 |
| 20-22 | 4,00E+09 | 3,01E+09 | 2.20E+08 |
| 20-23 | 1,91E+09 | 1,42E+09 | 1,13E+08 |
| 20-24 | 7,47E+08 | 1,64E+08 | 9,72E+06 |
| 20-25 | 1,16E+09 | 1,78E+09 | 3,82E+07 |
| MC3 | 1,73E+10 | 1,94E+10 | 8,48E+08 |

[1800] Come è evidente nella Tabella 21-2, le composizioni che includevano MC3 producevano la più alta espressione di luciferasi della Tabella 21-2 in ogni momento, mentre, tra le composizioni della Tabella 21-2, quelle che includevano il Composto 21-2 mostravano la minore espressione a 3 e 6 ore. Ciascuna composizione della Tabella 21-2 mostrava un'espressione sostanziale. Il flusso generalmente è diminuito nel tempo. Questi risultati suggeriscono che i composti qui descritti possono essere utili nelle applicazioni di trasfezione.

Tabella 21-2: Espressione della luciferasi indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono composti secondo la formula (21-1).

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 21-1 | 3,66E+09 | 4,19E+09 | 4,19E+09 |
| 21-2 | 5,99E+08 | 8,09E+08 | 8,09E+08 |

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 21-4 | 1,15E+09 | 1,26E+09 | 1,26E+09 |
| 21-6 | 2,92E+09 | 4,54E+09 | 1,40E+08 |
| MC3 | 1,69E+10 | 2,87E+10 | 2,23E+10 |

Esempio 5: espressione di Luc indotta da formulazioni campione in diversi organi

[1801] L'efficacia delle composizioni di nanoparticelle presentate nelle Tabelle 1, 1a, 17-1, 19-1, 20-1 e 21-1 è stata ulteriormente valutata misurando l'espressione della luciferasi modificata nel fegato, polmone, milza e femore dopo la somministrazione di una data composizione. Le formulazioni sono state somministrate per via endovenosa ai topi (n = 3) ad un dosaggio di 0,5 mpk e la bioluminescenza misurata dopo 6 ore. Sono stati testati anche la formulazione standard con MC3 e un controllo di PBS.

[1802] Come è evidente nella Tabella 3, l'espressione era più alta nel fegato per tutte le formulazioni della Tabella 3. Delle composizioni della Tabella 3, il flusso totale più alto è stato misurato per composizioni che includevano il Composto 20. L'espressione del polmone e della milza era generalmente comparabile per i composti della Tabella 3, mentre l'espressione nel femore, dove misurata, era leggermente inferiore. Tabella 3. Espressione della luciferasi in vari organi 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | Flusso totale | | | |
|-------------|---------------|----------|----------|----------|
| | Fegato | Polmone | Milza | Femore |
| 2 | 3,33E+08 | 4,76E+05 | 1,14E+07 | n.d. |
| 3 | 1,36E+08 | 8,47E+05 | 9,51E+05 | n.d. |
| 11 | 1,67E+09 | 2,21E+06 | 7,21E+06 | 1,47E+06 |
| 12 | 1,05E+09 | 6,76E+06 | 1,11E+07 | n.d. |
| 13 | 6,10E+08 | 2,89E+06 | 3,63E+07 | 1,99E+06 |
| 14 | 2,62E+08 | 3,56E+06 | 1,46E+07 | n.d. |
| 17 | 4,26E+08 | 7,26E+05 | 3,20E+06 | 6,71E+05 |

| Composto n. | Flusso totale | | | |
|-------------|---------------|----------|----------|----------|
| | Fegato | Polmone | Milza | Femore |
| 18 | 3,91E+09 | 1,87E+07 | 1,60E+07 | 3,31E+06 |
| 19 | 1,89E+09 | 2,27E+06 | 8,28E+06 | 2,75E+06 |
| 20 | 1,42E+10 | 1,46E+08 | 6,11E+07 | 8,91E+06 |
| 21 | 1.24E+09 | 2,51E+06 | 1,17E+07 | n.d. |
| 23 | 4,94E+09 | 1,51E+07 | 2,95E+07 | 3,17E+06 |
| 25 | 2,68E+09 | 5,88E+06 | 6,00E+06 | n.d. |
| 26 | 2,35E+06 | 3,49E+04 | 2,30E+05 | n.d. |
| 27 | 7,84E+08 | 3,56E+06 | 3,34E+06 | n.d. |
| 28 | 8,10E+08 | 5,73E+06 | 5,67E+06 | 1,16E+06 |
| 29 | 2,27E+07 | 4,70E+05 | 2,97E+06 | n.d. |
| 30 | 2,42E+09 | 1,61E+07 | 7,18E+06 | 2,22E+06 |
| 31 | 1,54E+09 | 9,81E+06 | 1,28E+07 | 9,89E+05 |
| 32 | 8,36E+07 | 6,75E+05 | 9,38E+05 | 1,02E+05 |
| 33 | 6,15E+08 | 2,84E+06 | 4,82E+06 | 1,18E+06 |
| 34 | 2.79E+06 | 5,63E+04 | 1,22E+06 | n.d. |
| 36 | 5,85E+04 | 2,74E+04 | 1.24E+05 | n.d. |
| 37 | 1,92E+06 | 6,90E+05 | 9,75E+05 | n.d. |
| 40 | 1,33E+06 | 1,42E+05 | 5,68E+05 | n.d. |
| 41 | 3,00E+06 | 1,34E+05 | 2,13E+06 | n.d. |
| 42 | 5,53E+09 | n.d. | 2,29E+08 | n.d. |
| 43 | 2,60E+08 | n.d. | 4,52E+07 | n.d. |
| 44 | 1,11E+09 | n.d. | 1,19E+08 | n.d. |
| 45 | 7,87E+09 | n.d. | 1,70E+08 | n.d. |
| 46 | 3,84E+08 | n.d. | 4,35E+07 | n.d. |
| 47 | 4,95E+08 | n.d. | 1,42E+08 | n.d. |
| 48 | 1,04E+07 | n.d. | 1,50E+07 | n.d. |
| 49 | 1,21E+10 | n.d. | 6,65E+07 | n.d. |
| 50 | 2,14E+07 | n.d. | 1,94E+05 | n.d. |
| 51 | 3,55E+09 | n.d. | 2.24E+07 | n.d. |
| 52 | 1,18E+10 | n.d. | 8,74E+08 | n.d. |

| | Flusso totale | | | |
|----------------------|----------------------|----------------|--------------|---------------|
| Composto n. | Fegato | Polmone | Milza | Femore |
| EV | 9,15E+08 | n.d. | 6,15E+08 | n.d. |
| MC3 | 2,31E+09 | 8,61E+06 | 1,95E+07 | 3,08E+06 |
| n.d.=non determinato | | | | |

[1803] Come è evidente nella Tabella 17-3, il flusso totale per le composizioni della Tabella 17-3 era generalmente più elevato nel fegato che in altri organi. Il flusso totale nel fegato per le composizioni di nanoparticelle della Tabella 17-3 inclusi i Composti 17-5 e 17-8 era in qualche modo paragonabile a quelli che includevano MC3, che mostrava il flusso totale più alto della Tabella 17-3 in ciascun organo. Per le composizioni della Tabella 17-3, il flusso totale nella milza era generalmente superiore a quello nel polmone ed era più alto per le composizioni che includevano i Composti 17-4, 17-5 e 17-8.

Tabella 17-3: Espressione della luciferasi in vari organi 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (17-1).

| | Flusso totale | | | |
|----------------------|----------------------|----------------|--------------|---------------|
| Composto n. | Fegato | Polmone | Milza | Femore |
| 17-2 | 6,42E+04 | 1,96E+04 | 4,16E+04 | n.d. |
| 17-3 | 2,51E+05 | 1,56E+04 | 1,02E+05 | n.d. |
| 17-4 | 8,00E+07 | 1,95E+05 | 2,30E+06 | n.d. |
| 17-5 | 1,17E+08 | 8,13E+05 | 2,13E+06 | n.d. |
| 17-6 | 2,16E+07 | 1,54E+05 | 9,06E+05 | n.d. |
| 17-7 | 7,44E+04 | 1,35E+04 | 3,46E+04 | n.d. |
| 17-8 | 2,27E+08 | 6,11E+05 | 4,25E+06 | n.d. |
| 17-9 | 1,39E+06 | 1,40E+04 | 3,72E+05 | 2,29E+04 |
| 17-10 | 2,00E+05 | 2,52E+04 | 1,74E+04 | n.d. |
| 17-11 | 5,06E+05 | 1,20E+04 | 3,37E+05 | n.d. |
| 17-12 | 4,94E+05 | 4,89E+04 | 7,81E+04 | n.d. |
| 17-13 | 3,56E+05 | 4,66E+04 | 1,90E+05 | n.d. |
| MC3 | 2,75E+09 | 7,25E+06 | 2,62E+07 | 6,03E+06 |
| n.d.=non determinato | | | | |

[1804] Come è evidente nella Tabella 19-3, il flusso totale per le composizioni della Tabella 19-3 era più alto per le composizioni che includevano MC3. Per le composizioni della Tabella 19-3, l'espressione nel fegato era maggiore dell'espressione nel polmone e nella milza per tutti i composti della Tabella 19-3 testati. Delle composizioni della Tabella 19-3, le composizioni che includevano il Composto 19-2 fornivano il flusso totale più basso nel fegato.

Tabella 19-3: Espressione della luciferasi in vari organi 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (19-1) o (19-11).

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | Fegato | Polmone | Milza |
| 19-1 | 8,53E+05 | 1,06E+04 | 1,58E+04 |
| 19-2 | 5,73E+04 | 2,33E+04 | 3,56E+04 |
| 19-3 | 2,65E+05 | 3,00E+04 | 2,55E+05 |
| 19-4 | 1,46E+05 | 4,49E+04 | 3,69E+04 |
| 19-5 | 5,99E+06 | 3,46E+04 | 2,10E+05 |
| 19-6 | 3,27E+06 | 1,81E+05 | 3,47E+06 |
| MC3 | 2,39E+09 | 5,83E+06 | 2,45E+07 |

[1805] Come è evidente nella Tabella 20-3, l'espressione dei composti di terina era generalmente più alta nel fegato e più bassa nel polmone e nel femore. Il flusso totale per i composti della Tabella 20-3 nel fegato era il più alto per le composizioni che includevano MC3 o il Composto 20-7 e il più basso per quelle che includevano il Composto 20-16.

Tabella 20-3: Espressione della luciferasi in vari organi 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (20-1).

| Composto n. | Flusso totale | | | |
|-------------|---------------|----------|----------|----------|
| | Fegato | Polmone | Milza | Femore |
| 20-1 | 3,19E+05 | 3,79E+04 | 1,70E+05 | n.d. |
| 20-2 | 6,01E+08 | 4,52E+06 | 3,12E+07 | 1,07E+06 |
| 20-3 | 4,33E+08 | 6,08E+05 | 6,35E+06 | 1,73E+06 |
| 20-4 | 2,93E+05 | 1,11E+04 | 4,51E+04 | 2,09E+04 |
| 20-5 | 2,67E+06 | 5,80E+04 | 3,40E+06 | 9,53E+04 |

| Composto n. | Flusso totale | | | |
|----------------------|---------------|----------|----------|----------|
| | Fegato | Polmone | Milza | Femore |
| 20-6 | 7,75E+05 | 2,32E+04 | 2,35E+05 | n.d. |
| 20-7 | 1,00E+09 | 1,38E+07 | 4,58E+07 | n.d. |
| 20-8 | 8,09E+08 | 3,45E+06 | 2,70E+07 | 1,62E+06 |
| 20-9 | 1,57E+08 | 1,30E+06 | 5,11E+06 | 2,89E+05 |
| 20-10 | 4,40E+08 | 5,01E+06 | 9,67E+07 | 3,09E+06 |
| 20-11 | 3,60E+08 | 5,86E+05 | 9,24E+06 | n.d. |
| 20-12 | 3,08E+08 | 3,58E+06 | 6,15E+07 | 1,37E+06 |
| 20-13 | 1,65E+08 | 9,09E+05 | 1,04E+07 | 3,11E+05 |
| 20-14 | 5,22E+07 | 1,08E+05 | 7,03E+05 | n.d. |
| 20-15 | 6,74E+07 | 5,56E+05 | 1,86E+06 | n.d. |
| 20-16 | 9,55E+04 | 1,44E+04 | 6,57E+04 | n.d. |
| 20-17 | 2,99E+06 | 2,79E+04 | 9,56E+04 | n.d. |
| 20-18 | 4,83E+08 | 1,84E+06 | 2,36E+06 | 3,78E+05 |
| 20-19 | 3,80E+05 | 1,96E+04 | 2,74E+04 | n.d. |
| 20-20 | 8,92E+08 | 1,12E+06 | 1,39E+07 | n.d. |
| 20-21 | 1,27E+08 | 1,98E+05 | 2,20E+06 | n.d. |
| 20-22 | 2,88E+08 | 5,04E+05 | 1,65E+06 | n.d. |
| 20-23 | 3,06E+08 | 1,28E+06 | 4,19E+06 | 5,10E+05 |
| 20-24 | 4,05E+07 | 1,08E+05 | 1,11E+06 | n.d. |
| 20-25 | 1,88E+08 | 7,85E+05 | 4,16E+06 | 3,13E+05 |
| MC3 | 2,48E+09 | 1,28E+07 | 2,85E+07 | 2,60E+06 |
| n.d.=non determinato | | | | |

[1806] Come è evidente nella Tabella 21-3, l'espressione era più alta nel fegato e più bassa nel polmone per tutte le composizioni della Tabella 21-3. Delle composizioni della Tabella 21-3, le composizioni che includono MC3 hanno prodotto l'espressione più alta in ciascun organo, mentre le composizioni che includono i Composti 21-2 e 21-4 hanno prodotto l'espressione più

5 bassa in ciascun organo.

Tabella 21-3: Espressione della luciferasi in vari organi 6 ore dopo la somministrazione di

composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (21-1).

| Composto n. | Flusso totale | | |
|-------------|---------------|----------|----------|
| | Fegato | Polmone | Milza |
| 21-1 | 3,62E+08 | 5,44E+05 | 3,27E+07 |
| 21-2 | 5,50E+07 | 2,53E+05 | 1,56E+07 |
| 21-4 | 9,89E+07 | 2,13E+05 | 1,27E+07 |
| 21-6 | 4,79E+08 | 2,09E+06 | 1,94E+07 |
| MC3 | 3,05E+09 | 6,60E+06 | 4,73E+07 |

Esempio 6: produzione di citochine indotta da formulazioni campione

[1807] L'introduzione di materiale estraneo nel corpo di un mammifero induce una risposta immunitaria innata che promuove la produzione di citochine. Tali risposte immunitarie, ad esempio, a composizioni di nanoparticelle che includono agenti terapeutici e/o profilattici, sono indesiderabili. L'induzione di alcune citochine viene quindi misurata per valutare l'efficacia delle composizioni di nanoparticelle. Le concentrazioni di varie citochine nei topi dopo somministrazione endovenosa di composizioni di nanoparticelle presentate nelle Tabelle 1, 1a, 17-1, 19-1, 20-1 e 21-1 a un dosaggio di 0,5 mpk sono state misurate a 6 ore. Sono stati testati anche la formulazione standard con MC3 e un controllo di PBS.

[1808] Come è evidente nella Tabella 4, l'espressione di IP-10 era inferiore all'espressione di IL-6 per le composizioni della Tabella 4. Delle composizioni della Tabella 4, le composizioni che includono il Composto 13 hanno indotto l'espressione più alta sia di IL-6 che di IP-10, mentre le composizioni che includono il Composto 3 hanno indotto l'espressione di IL-6 più bassa e quelle che includono il Composto 36 hanno indotto l'espressione di IP-10 più bassa.

Tabella 4. Induzione di citochine 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|-------------|------|-------|
| 2 | n.d. | 3365 |

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|----------------------|-------------|--------------|
| 3 | 7 | 341 |
| 11 | 250 | 3305 |
| 12 | 31 | 2382 |
| 13 | 301 | 7266 |
| 14 | 17 | 209 |
| 17 | 164 | 545 |
| 18 | 263 | 655 |
| 19 | 70 | 2326 |
| 20 | 127 | 2080 |
| 21 | 48 | 652 |
| 23 | 259 | 3702 |
| 25 | 131 | 1823 |
| 26 | 17 | 175 |
| 27 | 42 | 2564 |
| 28 | 73 | 5364 |
| 29 | 108 | 3454 |
| 30 | 300 | 4235 |
| 31 | 188 | 2513 |
| 32 | 174 | 727 |
| 33 | 37 | 1577 |
| 34 | 28 | 159 |
| 36 | 41 | 118 |
| 37 | n.d. | 198 |
| 40 | 134 | 919 |
| 41 | 116 | 350 |
| MC3 | 92 | 438 |
| n.d.=non determinato | | |

[1809] Come è evidente nella Tabella 17-4, le composizioni di nanoparticelle della Tabella 17-4 hanno indotto livelli di IP-10 più elevati rispetto ai livelli di IL-6. Tra le composizioni di nanoparticelle della Tabella 17-4, le composizioni che includono MC3 e il Composto 17-4

hanno indotto i livelli più alti di IL-6 e IP-10 mentre quelle che includono i Composti 17-2, 17-3 e 17-10 hanno indotto i livelli più bassi di IL-6 e le composizioni, inclusi i composti 17-2 e 17-3, hanno indotto i livelli IP-10 più bassi.

Tabella 17-4: Induzione di citochine 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (17-1).

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|--------------------|-------------|--------------|
| 17-2 | 9,88 | 72,8 |
| 17-3 | 6,97 | 66,8 |
| 17-4 | 80,7 | 560 |
| 17-5 | 49,2 | 300 |
| 17-6 | 25,0 | 134 |
| 17-7 | 49,9 | 100 |
| 17-8 | n.d. | 135 |
| 17-9 | 35,2 | 112 |
| 17-10 | 7,33 | 243 |
| 17-11 | n.d. | n.d. |
| 17-12 | 83,1 | 148 |
| 17-13 | 84,3 | 222 |
| MC3 | 107 | 500 |

[1810] Come è evidente nella Tabella 19-4, delle composizioni di nanoparticelle della Tabella 19-4, le composizioni che includono il Composto 19-6 hanno indotto l'espressione di IL-6 più alta, mentre quelle che includono il Composto 19-3 hanno indotto l'espressione di IL-6 più bassa. Delle composizioni di nanoparticelle della Tabella 19-4, le composizioni che includevano i Composti 19-4 e 19-6 hanno prodotto l'espressione di IP-10 più alta, mentre quelle che includevano il Composto 19-1 hanno indotto l'espressione di IP-10 più bassa.

Tabella 19-4: Induzione di citochine 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (19-1) o (19-11).

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|--------------------|-------------|--------------|
| 19-1 | 144,4 | 51,1 |

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|----------------------|-------|-------|
| 19-2 | n.d. | n.d. |
| 19-3 | 5,4 | 177,5 |
| 19-4 | 129,2 | 430,9 |
| 19-5 | n.d. | n.d. |
| 19-6 | 7571 | 433 |
| MC3 | 65,7 | 323,9 |
| n.d.=non determinato | | |

[1811] Come è evidente nella Tabella 20-4, per le composizioni di nanoparticelle della Tabella 20-4, l'induzione di IP-10 era generalmente superiore all'induzione di IL-6. Per le composizioni di nanoparticelle della Tabella 20-4, l'induzione di IP-10 era massima per composizioni che includevano il Composto 20-14 e più bassa per composizioni che includevano il Composto 20-5 6. L'induzione di IL-6 era più alta per le composizioni che includevano il Composto 20-10 e più bassa per le composizioni che includevano il Composto 20-6 per le composizioni di nanoparticelle della Tabella 20-4.

Tabella 20-4: Induzione di citochine 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (20-1).

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|-------------|-------|--------|
| 20-1 | 62,4 | 2065,8 |
| 20-2 | 118,5 | 522,9 |
| 20-3 | 105,8 | 671,5 |
| 20-4 | 169,3 | 270,5 |
| 20-5 | 140,8 | 2012,3 |
| 20-6 | 0 | 25,3 |
| 20-7 | 24,5 | 696,3 |
| 20-8 | 18,4 | 134,0 |
| 20-9 | 152,1 | 271,1 |
| 20-10 | 739,0 | 2356,8 |
| 20-11 | 46,9 | 1700,5 |
| 20-12 | 445,7 | 3864,5 |

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|--------------------|-------------|--------------|
| 20-13 | 87,8 | 70,0 |
| 20-14 | 311,1 | 8436,6 |
| 20-15 | 49,4 | 136,3 |
| 20-16 | n.d. | 395,7 |
| 20-17 | 6,3 | 1207,0 |
| 20-18 | 102 | 572,7 |
| 20-19 | n.d. | 127,2 |
| 20-21 | 68,4 | 900,4 |
| 20-22 | 118,6 | 810,6 |
| 20-23 | 236,4 | 457,8 |
| 20-24 | 67,1 | 1678,6 |
| 20-25 | 20,6 | 188,0 |
| MC3 | 119,5 | 499,1 |

[1812] Come è evidente nella Tabella 21-4, l'induzione di IP-10 da parte delle composizioni ivi contenute era sostanzialmente superiore all'induzione di IL-6.

Tabella 20-4: Induzione di citochine 6 ore dopo la somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo la formula (21-1).

| Composto n. | IL-6 | IP-10 |
|--------------------|-------------|--------------|
| 21-1 | n.d. | 1265,1 |
| 21-2 | n.d. | 477,9 |
| 21-4 | n.d. | 577,2 |
| 21-6 | 10,2 | 641,3 |
| MC3 | 31,1 | 304,5 |

5 Esempio 7: espressione di hEPO indotta da formulazioni campione

[1813] Le formulazioni sono state preparate secondo la Tabella 5 e includevano mRNA che codifica per hEPO.

Tabella 5. Caratteristiche delle composizioni di nanoparticelle compresi i composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | Composizione (% in moli) | Componenti | Dimensione (nm) | PDI | EE (%) | pKa | Conc. (ug/mL) |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|------|--------|-------|---------------|
| 12 | 40:20:38,5:1,5 | Lipide:DOPE:Col: PEG-DMG | 87,5 | 0,13 | 93,79 | 5,444 | 320,14 |
| 14 | 40:20:38,5:1,5 | Lipide:DOPE:Col: PEG-DMG | 76,8 | 0,14 | 98,91 | 6,308 | 603,76 |
| 15 | 40:20:38,5:1,5 | Lipide:DOPE:Col: PEG-DMG | 100,3 | 0,12 | 90,15 | 6,323 | 713,00 |
| 16 | 40:20:38,5:1,5 | Lipide:DOPE:Col: PEG-DMG | 77,4 | 0,14 | 98,22 | 6,282 | 665,11 |
| 20 | 40:20:38,5:1,5 | Lipide:DOPE:Col: PEG-DMG | 114,5 | 0,14 | 94,39 | n.r. | 1264,28 |
| 22 | 40:20:38,5:1,5 | Lipide:DOPE:Col: PEG-DMG | 75,4 | 0,13 | 98,29 | 6,153 | 564,97 |
| 23 | 40:20:38,5:1,5 | Lipide:DOPE:Col: PEG-DMG | 98,5 | 0,16 | 77,19 | 6,070 | 438,20 |
| 23 | 50:10:38,5:1,5 | Lipide:DSPC:Col: PEG-DMG | 95,2 | 0,11 | 51,46 | 6,164 | 454,58 |
| MC3 | 50:10:38,5:1,5 | Lipide:DSPC:Col: PEG-DMG | 76,5 | 0,11 | 97,37 | n.r. | 470,45 |
| n.d.=non determinato | | | | | | | |

[1814] Le formulazioni sono state somministrate per via endovenosa a ratti (n=3 o 6) a un dosaggio di 0,2 mg/kg o 0,5 mg/kg (mpk) e livelli di hEPO misurati a 3, 6 e 24 ore. Dopo le 48 ore, i fegati e le milze sono stati raccolti e congelati. Come è evidente nella Tabella 6, le composizioni che includono MC3 hanno prodotto l'espressione di hEPO più alta in ogni momento, mentre le composizioni che includono il Composto 16 hanno prodotto l'espressione di hEPO più bassa in ogni momento.

Tabella 6. Espressione hEPO indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle comprendenti composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | hEPO (pg/mL) | | |
|-------------|--------------|--------|--------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 12 | 592260 | 424740 | 165404 |
| 14 | 280973 | 158520 | 58805 |

| Composto n. | hEPO (pg/mL) | | |
|----------------------|--------------|---------|--------|
| | 3 ore | 6 ore | 24 ore |
| 15 | 103773 | 125320 | 67965 |
| 16 | 35387 | 41720 | 17184 |
| 20 | n.d. | 227420 | n.d. |
| 22 | 181627 | 267680 | 75571 |
| 23 (DOPE) | 249213 | 275440 | 120104 |
| 23 (DSPC) | 86627 | 71360 | 29008 |
| MC3 | 1407947 | 1036013 | 436243 |
| n.d.=non determinato | | | |

[1815] Come mostrato nella Tabella 7a, l'espressione di hEPO nei topi era sostanzialmente più alta per le composizioni che includevano il Composto 12 rispetto a quelle che includevano MC3. Al contrario, l'espressione di hEPO nei ratti indotta dalla somministrazione di una composizione di nanoparticelle che include un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)- (Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), e (IIIa) era sostanzialmente inferiore a quello misurato per MC3. L'espressione di Luc nei topi era svariate volte superiore per il Composto 23 rispetto a MC3 ma significativamente inferiore per i Composti 12 e 14. La Tabella 7b mostra le espressioni di Luc nei topi CD-1 rispetto ai topi LDLr-/-. Le Tabelle 7c e 7d mostrano ulteriori espressioni proteiche e dati di clearance da composizioni con vari composti qui descritti rispetto a MC3. La Tabella 7e mostra i dati sull'esposizione di hEPO nei topi CD-1 a una dose di 0,5 mpk. Risultati simili sono stati ottenuti con diversi ceppi di topi, ad esempio topi chimerici con fegati umanizzati (PXB) o topi immunodeficienti (SCID).

Tabella 7a. Confronto dell'espressione indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono MC3 o composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | Lipid/MC3 Luc CD-1 (topi) | Lipid/MC3 hEPO CD-1 (topi) | Lipidi/MC3 hEPO SD (ratti) | % di dose rimanente a 6 h di topi CD-1 | % di dose rimanente a 24 h di topi CD-1 |
|-------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|--|---|
| 11 | 1,03 | n.d. | n.d. | | |

| Composto n. | Lipid/MC3 Luc CD-1 (topi) | Lipid/MC3 hEPO CD-1 (topi) | Lipidi/MC3 hEPO SD (ratti) | % di dose rimanente a 6 h di topi CD-1 | % di dose rimanente a 24 h di topi CD-1 |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|--|---|
| 12 | 0,21 | 2,3 | 0,32 | | |
| 14 | 0,070 | n.r. | 0,12 | | |
| 15 | n.d. | n.d. | 0,095 | | |
| 16 | n.d. | n.d. | 0,031 | | |
| 20 | 5,0 | n.d. | n.d. | | |
| 22 | n.d. | n.d. | 0,20 | | |
| 23 (DOPE) | 5,2 | 2,4 | 0,21 | | |
| 42 | 3,99 | n.d. | n.d. | 58 | 53 |
| 43 | 0,34 | | | 69 | 64 |
| 44 | 0,82 | n.r. | n.d. | <1 | <1 |
| 45 | 6,50 | n.d. | n.d. | 33 | 24 |
| 46 | 0,46 | | | 1 | <1 |
| 47 | 0,22 | | | 1 | <1 |
| 48 | 0,01 | | | <1 | <1 |
| 49 | 5,23 | n.d. | n.d. | 49 | 40 |
| 50 | 0,01 | | | 56 | 47 |
| 51 | 5,22 | n.d. | n.d. | 54 | 41 |
| 52 | 7,46 | n.d. | n.d. | 46 | 40 |
| MC3 | 1 | 1 | 1 | 88 | 55 |
| n.d.=non determinato | | | | | |

Tabella 7b. Confronto dell'espressione di Luc indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono MC3 o composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa) in topi CD-1 e topi LDLr-/-.

| Composto n. | Lipid/MC3 AUC CD-1 topi 0,5 mpk | Lipid/KL22 AUC LDLr-/- topi 0,5 mpk, LDLr | Livelli di LDL lipidico/LDLr-/- topi non trattati 0,5 mpk, LDLr |
|-------------|---------------------------------|---|---|
| 4 | 3,70 | 2,03 | 0,54 |
| 5 | 2,62 | 1,86 | 0,47 |
| 6 | 1,72 | 0,37 | 0,91 |

| Composto n. | Lipid/MC3 AUC CD-1 topi 0,5 mpk | Lipid/KL22 AUC LDLr/- topi 0,5 mpk, LDLr | Livelli di LDL lipidico/LDLr/-topi non trattati 0,5 mpk, LDLr |
|-------------|---------------------------------|--|---|
| 7 | 1,51 | 2,46 | 0,63 |
| 8 | 2,33 | 3,74 | 0,66 |
| 9 | 0,73 | 0,58 | 0,87 |
| 10 | 1,14 | 0,71 | 0,98 |
| MC3 | 1 | 0,15 | 0,55 |
| KL22 | | 1 | 0,51 |

Tabella 7c. Confronto dell'espressione indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono MC3 o composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | AUC (p/s*h) | Lipidi/MC3 AUC | Rapporto fegato/milza | % di dose rimanente a 6 ore | % di dose rimanente a 24 ore |
|-------------|-------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 53 | 9,22 E+09 | 0,07 | 17 | 1,35 | 0,77 |
| 54 | 1,89 E+10 | 0,13 | 32 | 5,18 | 4,77 |
| 55 | 2,00 E+10 | 0,14 | 9 | 2,58 | 1,60 |
| 56 | 1,77 E+11 | 1,25 | 29 | 1,21 | 0,16 |
| 57 | 1,21 E+11 | 0,85 | 15 | 0,88 | 0,24 |
| 58 | 1,38 E+11 | 0,97 | 11 | 1,37 | 0,61 |
| 59 | 1,19 E+11 | 0,84 | 5 | 6,99 | 5,03 |
| 60 | 2,84 E+11 | 2,00 | 15 | 21,18 | 15,98 |
| 61 | 4,65 E+11 | 3,27 | 30 | 1,31 | 0,13 |
| 71 | 1,77 E+11 | 1,25 | 25 | 12,39 | 9,25 |
| 72 | 6,53 | 0,46 | 6 | 7,06 | 6,40 |

| Composto n. | AUC (p/s*h) | Lipidi/MC3 AUC | Rapporto fegato/milza | % di dose rimanente a 6 ore | % di dose rimanente a 24 ore |
|-------------|--------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | E+10 | | | | |
| MC3 | 1,42 E+11 | - | 55 | 55,70 | 55,43 |

Tabella 7d. Confronto dell'espressione di hEPO nei ratti SD indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono MC3 o composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), e (IIIa).

| Composto n. | AUC (0,1 mpk) | AUC/MC3 0,1 mpk | AUC (1 mpk) | AUC/MC3 1 mpk | % dose rimanente Fegato di ratto (48 h) | % dose rimanente Fegato di topo (24 h) |
|-------------|---------------|-----------------|--------------|---------------|---|--|
| 4 | 2,12 E+06 | 1,3 | 6,79 E+07 | 0,58 | 37,82 | N.D. |
| 45 | 1,45 E+06 | 0,90 | 2,00 E+08 | 1,7 | 8,57 | 23,7 |
| 49 | 5,98 E+06 | 3,7 | 1,44 E+08 | 1,2 | 38,45 | 40,3 |
| MC3 | 1,62 E+06 | - | 1,17 E+08 | - | 43,11 | 55 |

5 Tabella 7e. Confronto dell'espressione di hEPO nei topi CD-1 indotta dalla somministrazione di composizioni di nanoparticelle che includono MC3 o composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), e (IIIa) alla dose di 0,5 mpk.

| Composto n. | AUC (p/s*h) topi CD-1 0,5 mpk | Lipidi/MC3 AUC |
|-------------|-------------------------------|----------------|
| 62 | 3,46 E+7 | 0,97 |
| 69 | 2,33 E+8 | 6,52 |
| 70 | 6,34 E+7 | 1,77 |
| 73 | 1,41 E+8 | 3,93 |
| 80 | 6,24 E+7 | 1,74 |
| 81 | 1,08 E+8 | 3,01 |
| 82 | 1,29 E+8 | 3,62 |
| 83 | 5,21 E+7 | 1,46 |
| 84 | 5,10 E+7 | 1,43 |

| Composto n. | AUC (p/s*h) topi CD-1 0,5 mpk | Lipidi/MC3 AUC |
|-------------|-------------------------------|----------------|
| 85 | 1,27 E+8 | 3,54 |
| 86 | 1,75 E+7 | 0,49 |
| 87 | 2,86 E+7 | 0,80 |

[1816] È stata anche misurata la quantità di lipidi nel fegato e nella milza 48 ore dopo la somministrazione di una composizione di nanoparticelle. Come mostrato nella Tabella 8, meno del 6% delle dosi inclusi i Composti 14, 15 e 16 è rimasto nel fegato dopo 48 ore. Al contrario, circa il 60% delle dosi compreso MC3 o Composto 22 è rimasto nel fegato dopo 48 ore. Meno del 3% della dose è rimasta nella milza per ciascuna composizione testata.

Tabella 8. Livelli di lipidi nel fegato e nella milza in seguito alla somministrazione di composizioni di nanoparticelle tra cui MC3 o composti secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III) e (IIIa).

| Composto n. | Lipidi nel fegato (ng/g) | % di dose rimanente nel fegato | Lipidi nella milza (ng/g) | % di dose rimanente nella milza |
|-------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 4 | 21950 | 38 | 5345 | 0,61 |
| 12 | 16850 | 23,8 | 2325 | 0,22 |
| 14 | 3990 | 5,54 | 1620 | 0,15 |
| 15 | 3070 | 4,22 | 971 | 0,089 |
| 16 | 597 | 0,79 | 293 | 0,026 |
| 22 | 36800 | 58,7 | 3887 | 0,41 |
| 23 (DOPE) | 32900 | 51,4 | 26100 | 2,72 |
| MC3 | 21750 | 51 | 2785 | 0,44 |

Esempio 8: ottimizzazione dei rapporti tra agenti terapeutici lipidici

10 [1817] Le quantità relative di componente lipidica e agente terapeutico e/o profilattico in una composizione di nanoparticelle possono essere ottimizzate in base a considerazioni di efficacia e tollerabilità. Per composizioni che includono un RNA come agente terapeutico e/o profilattico, il rapporto N:P può servire come metrica utile.

[1818] Poiché il rapporto N:P di una composizione di nanoparticelle controlla sia l'espressione

che la tollerabilità, sono desiderabili composizioni di nanoparticelle con bassi rapporti N:P e forte espressione. I rapporti N:P variano in base al rapporto tra lipidi e RNA in una composizione di nanoparticelle. Pertanto, il rapporto peso/peso tra lipidi totali e RNA varia tra 10:1, 15:1, 20:1, 32:1, 40:1, 50:1 e 60:1 per una formulazione lipidica che include circa 50 % in moli di un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1), circa il 10% in moli di fosfolipidi (ad es. DOPE o DSPC), circa il 38,5% in moli di lipidi strutturali (ad es. colesterolo), e circa 1,5% in moli di lipidi PEG (ad esempio, PEG-DMG). I rapporti N:P sono calcolati per ciascuna composizione di nanoparticelle ipotizzando un singolo atomo di azoto protonato. Vengono anche misurati l'efficienza di incapsulamento (EE), la dimensione e l'indice di polidispersità di ciascuna composizione.

[1819] In generale, le composizioni con rapporti lipidi totali:RNA più elevati producono particelle più piccole con efficienze di incapsulamento più elevate, entrambe le cose essendo desiderabili. Tuttavia, il rapporto N:P per tali formulazioni generalmente supera 4. Gli attuali standard nella tecnica come la formulazione con MC3 sopra descritta hanno rapporti N:P di 5,67. Pertanto, dovrebbe essere raggiunto un equilibrio tra il rapporto N:P, le dimensioni e l'efficienza di incapsulamento.

[1820] Al fine di esplorare l'efficacia delle composizioni di nanoparticelle con diversi rapporti N:P, viene esaminata l'espressione della luciferasi (Luc) o dell'eritropoietina umana (hEPO) nei topi dopo bassa (0,05 mg/kg) o alta (0,5 mg/kg) dose di composizioni di nanoparticelle somministrate per via endovenosa. La concentrazione di Luc o hEPO espressa viene misurata 3, 6 e/o 24 ore dopo la somministrazione.

Esempio 9: Ottimizzazione del contenuto di una composizione comprendente un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1)

[1821] Poiché sono generalmente desiderabili particelle più piccole con efficienze di incapsulamento più elevate, le quantità relative di vari elementi nei componenti lipidici delle composizioni di nanoparticelle sono ottimizzate in base a questi parametri.

[1822] Un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1) è selezionato per l'ottimizzazione. La quantità relativa del composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-1), (19-1), (19-11), (20-1) e (21-1) varia tra il 30% in moli e il 60% in moli nelle composizioni che includono DOPE o DSPC come fosfolipidi per determinare la quantità ottimale di il composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I) nelle formulazioni. Le formulazioni vengono preparate utilizzando un processo standardizzato con un rapporto acqua/etanolo nella soluzione di lipide-mRNA di 3:1 e una velocità di iniezione della soluzione lipidica nella soluzione di mRNA di 12 mL/min su un sistema a base microfluidica NanoAssemblr. Questo metodo induce nano-precipitazione e formazione di particelle. Per ottenere la stessa nanoprecipitazione possono essere utilizzati anche processi alternativi tra cui, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, giunzione a T e iniezione diretta.

[1823] Le formulazioni che producono le particelle più piccole con le massime efficienze di incapsulamento sono generalmente preferite, tuttavia possono essere desiderabili granulometrie più grandi o più piccole in base a una data applicazione (ad esempio, in base alla dimensione della fenestrazione di un organo bersaglio). Le composizioni vengono anche valutate per i loro livelli di espressione Luc o hEPO e per i profili delle citochine.

Esempio 10: ottimizzazione del fosfolipide

[1824] La quantità relativa di fosfolipide in un componente lipidico di una composizione di nanoparticelle viene variata per ottimizzare ulteriormente la formulazione. Un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-

II), (20-1) e (21-1) sono selezionati per l'uso nella composizione di nanoparticelle e DOPE e DSPC sono selezionati come fosfolipidi. Possono essere valutati anche ulteriori fosfolipidi. Le composizioni di nanoparticelle vengono preparate con il contenuto fosfolipidico relativo che varia tra lo 0% in moli e il 30% in moli. Le composizioni vengono valutate per le loro dimensioni, efficienza di incapsulamento, livelli di espressione di Luc o hEPO e profili di citochine.

Esempio 11: ottimizzazione del lipide strutturale

[1825] La quantità relativa di lipide strutturale in un componente lipidico di una composizione di nanoparticelle viene variata per ottimizzare ulteriormente la formulazione. Un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-1), (19-II), (20-1) e (21-1) è selezionato per l'uso nella composizione di nanoparticelle e il colesterolo è selezionato come lipide strutturale. Possono essere valutati anche ulteriori lipidi strutturali. Le composizioni di nanoparticelle vengono preparate con il contenuto di lipide strutturale relativo che varia tra il 18,5% in moli e il 48,5% in moli. Le composizioni vengono valutate per le loro dimensioni, efficienza di incapsulamento, livelli di espressione di Luc o hEPO e profili di citochine.

Esempio 12: ottimizzazione del lipide PEG

[1826] La quantità relativa di lipide PEG in un componente lipidico di una composizione di nanoparticelle viene variata per ottimizzare ulteriormente la formulazione. Un composto secondo una delle formule (I), (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-1) e (21-1) sono selezionati per l'uso nella composizione di nanoparticelle e PEG-DMG è selezionato come un lipide PEG. Possono essere valutati anche ulteriori lipidi PEG. Le composizioni di nanoparticelle vengono preparate con il contenuto di lipide PEG relativo che varia tra lo 0% in moli e il 10% in moli. Le composizioni vengono valutate per le loro dimensioni, efficienza di incapsulamento, livelli di espressione di Luc o hEPO e profili di

citochine.

[1827] Nella Tabella 9 sono presentate formulazioni esemplificative utili nell'ottimizzazione delle formulazioni della composizione di nanoparticelle.

Tabella 9. Formulazioni esemplificative comprendenti composti secondo una delle formule (I),

5 (Ia1)-(Ia6), (Ib), (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV), (17-I), (19-I), (19-II), (20-I) e (21-I).

| Composizione (% in moli) | Componenti |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 40:20:38,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 45:15:38,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 50:10:38,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 55:05:38,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 60:05:33,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 45:20:33,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 50:20:28,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 55:20:23,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 60:20:18,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 40:15:43,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 50:15:33,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 55:15:28,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 60:15:23,5:1,5 | Composto: Fosfolipidi: Col:PEG-DMG |
| 40:10:48,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 45:10:43,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 55:10:33,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 60:10:28,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 40:05:53,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 45:05:48,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi: Col:PEG-DMG |
| 50:05:43,5:1,5 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 40:20:40:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 45:20:35:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 50:20:30:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 55:20:25:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 60:20:20:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |

| Composizione (% in moli) | Componenti |
|--------------------------|-------------------------------------|
| 40:15:45:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 45:15:40:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 50:15:35:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 55:15:30:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 60:15:25:0 | Composto: Fosfolipidi: Col: PEG-DMG |
| 40:10:50:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 45: 10:45:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 50:00:48,5: 1,5 | Composto: Fosfolipidi: Col:PEG-DMG |
| 50:10:40:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 55: 10:35:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |
| 60:10:30:0 | Composto:Fosfolipidi:Col:PEG-DMG |

Esempio 13: ottimizzazione delle granulometrie

[1828] Le dimensioni della fenestrazione per i diversi organi corporei spesso variano; ad esempio, è noto che il rene ha una dimensione della fenestrazione inferiore rispetto al fegato. Pertanto, il rilascio mirato di un agente terapeutico e/o profilattico (ad esempio il rilascio

5 specifico) in uno specifico organo o gruppo di organi può richiedere la somministrazione di composizioni di nanoparticelle con granulometrie differenti. Al fine di studiare questo effetto, le composizioni di nanoparticelle con formulazioni come quelle incluse nella Tabella 9 vengono preparate con una varietà di granulometrie usando uno strumento Nanoassemblr. Le composizioni di nanoparticelle includono un RNA che codifica per la Luc. Ciascuna

10 composizione di nanoparticelle di dimensioni diverse viene successivamente somministrata ai topi per valutare l'effetto della granulometria sulla selettività del rilascio. L'espressione di Luc in due o più organi o gruppi di organi può essere misurata utilizzando la bioluminescenza per valutare l'espressione relativa in ciascun organo.

Esempio 14: somministrazione dopo il pretrattamento

15 [1829] La somministrazione di composizioni di nanoparticelle ai soggetti può provocare infiammazione, reazioni correlate all'infusione e altri effetti indesiderati indicativi di una bassa

tollerabilità. Questi effetti possono essere attribuiti a un'immunoattività indesiderabile.

[1830] Al fine di combattere gli effetti negativi, le composizioni di nanoparticelle vengono co-somministrate con una o più sostanze (ad es. co-farmaci o agenti terapeutici e/o profilattici aggiuntivi) ai soggetti. Ulteriori agenti terapeutici e/o profilattici potenzialmente utili includono

5 steroidi (ad esempio, corticosteroidi), antistaminici, bloccanti del recettore H1, bloccanti del recettore H2, composti antinfiammatori, statine, inibitori di BTK, agonisti della S1P1, modulatori del recettore per i glucocorticoidi (GRM) ed estradioli. I primati non umani vengono pretrattati con uno o più agenti terapeutici aggiuntivi selezionati tra desametasone e acetaminofene. L'agente terapeutico aggiuntivo viene somministrato 24 ore, 1 ora o sia 24 ore

10 sia 1 ora prima della somministrazione di una composizione di nanoparticelle. Il protocollo campione è riassunto nella Tabella 10. I profili delle citochine, l'infiammazione e altri parametri vengono misurati e confrontati per valutare l'efficacia del pretrattamento.

Tabella 10. Protocollo campione per lo studio di pretrattamento.

| Gruppo | Tempo pretrattamento | di Somministrazione di uno o più agenti terapeutici aggiuntivi |
|---------------|-----------------------------|---|
| 1 | Assente | Assente |
| 2 | 24 ore | Desametasone |
| 3 | 24 ore | Acetaminofene |
| 4 | 24 ore | Desametasone e Acetaminofene |
| 5 | 1 ora | Desametasone |
| 6 | 1 ora | Acetaminofene |
| 7 | 1 ora | Desametasone e Acetaminofene |
| 8 | 24 ore e 1 ora | Desametasone |
| 9 | 24 ore e 1 ora | Acetaminofene |
| 10 | 24 ore e 1 ora | Desametasone e Acetaminofene |

[1831] Ad esempio, un utile corso di trattamento terapeutico può prevedere la somministrazione

15 di una sostanza terapeutica e/o profilattica aggiuntiva sia il giorno prima sia il giorno (un'ora prima) della somministrazione di una composizione di nanoparticelle a un livello di dose di 1,3

mpk. Ulteriori agenti terapeutici e/o profilattici possono essere formulati per la somministrazione attraverso una varietà di vie differenti. Ad esempio, il desametasone può essere somministrato per via orale. In generale, vengono somministrati ulteriori agenti terapeutici e/o profilattici a livelli di dosaggio clinicamente approvati o tipici.

5 Esempio 15: somministrazione a primati non umani

[1832] La tollerabilità e l'efficacia delle composizioni di nanoparticelle sui primati non umani sono valutate nelle scimmie Cynomolgus. Alle scimmie viene somministrata una composizione di nanoparticelle ottimizzata che include un mRNA che codifica hEPO una volta alla settimana per quattro settimane. I livelli di proteine hEPO, mRNA e profili di citochine vengono misurati utilizzando tecniche basate su ELISA prima e 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 120 ore dopo ogni somministrazione.

[1833] Gli effetti del pretrattamento su primati non umani vengono valutati utilizzando una formulazione standard con MC3 includente un mRNA che codifica per hEPO. Il disegno dello studio è riassunto nella Tabella 11. Alle scimmie maschio viene somministrata la composizione di nanoparticelle una volta alla settimana per quattro settimane a una dose di 5 mL/kg/he vengono pretrattate con metotrexato o desametasone.

Tabella 11. Protocollo per lo studio di pretrattamento nelle scimmie Cynomolgus.

| Gruppo | Materiale di prova | Livello di dose (mg/kg) | Somministrazione di agente terapeutico aggiuntivo | Concentrazione della dose (mg/mL) | Numero di scimmie |
|--------|---------------------|-------------------------|---|-----------------------------------|-------------------|
| 1 | MC3 | 0 | Assente | 0 | 3 |
| 2 | mRNA di hEPO in MC3 | 0,3 | Assente | 0,06 | 3 |
| 3 | mRNA di hEPO in MC3 | 0,3 | Metotrexato | 0,06 | 3 |
| 4 | mRNA di hEPO in MC3 | 0,3 | Desametasone | 0,06 | 3 |

Esempio 16: metodi di trattamento di malattie e disturbi

[1834] Una formulazione di una composizione di nanoparticelle avente elevata tollerabilità (ad esempio che provoca una risposta immunitaria bassa) ed efficacia (ad esempio che facilita l'incapsulamento efficiente ed efficace di un agente terapeutico e/o profilattico e il rilascio dell'agente a un bersaglio desiderato) viene selezionata per l'utilizzo. Un agente terapeutico e/o profilattico per la formulazione con la composizione di nanoparticelle viene selezionata per l'uso in base alle condizioni di un soggetto. Ad esempio, un mRNA codificante per un fattore di crescita dell'endotelio vascolare A (VEGF-A) può essere selezionato per promuovere l'angiogenesi per il trattamento della malattia aterosclerotica renovascolare, mentre un siRNA in grado di abbattere l'apolipoproteina B (apoB) può essere selezionato per trattare una malattia metabolica o un disturbo come la dislipidemia.

[1835] Un soggetto che necessita di trattamento viene pretrattato con una piccola dose di desametasone una o più ore prima del trattamento con la composizione di nanoparticelle. La composizione di nanoparticelle viene preferibilmente somministrata al soggetto per via endovenosa, tuttavia sono accettabili anche le vie di somministrazione intramuscolare, intradermica, sottocutanea, intranasale o per inalazione. Il trattamento viene somministrato in dosi da circa 0,001 mg/kg a circa 10 mg/kg di agente terapeutico e/o profilattico e viene ripetuto giornalmente, settimanalmente, bisettimanalmente o mensilmente a seconda delle esigenze del soggetto.

Esempio 17: espressione indotta dalle formulazioni campione a seguito della somministrazione intramuscolare

[1836] Sono state preparate e somministrate per via intramuscolare al giorno 1 e al giorno 21 formulazioni di campioni che includevano sia l'mRNA della luciferasi modificata (Luc) che l'mRNA dell'H10 e l'espressione e l'immunogenicità risultanti sono state valutate simultaneamente. Le formulazioni che includevano i composti secondo la formula (20-1) sono

state preparate e somministrate a dosi di 0,001 e 0,01 mpk (ad es. dosi di 0,0005 mpk di una formulazione che includeva l'mRNA di Luc e una formulazione che includeva l'mRNA di H10 o dosi di 0,005 mpk di una formulazione che includeva Luc mRNA e una formulazione che include H10 mRNA). Come mostrato nella Tabella 20-4, il flusso totale era maggiore dopo la somministrazione della seconda dose per ciascuna composizione e ad ogni livello di dose. Il flusso totale era più alto per il livello di dose più alto.

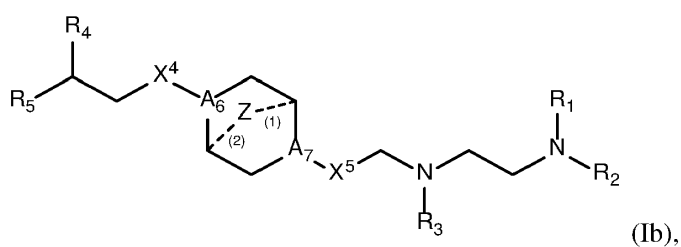
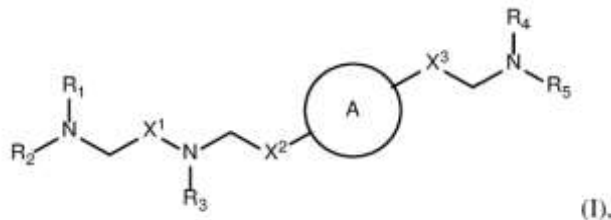
Tabella 12. Flusso totale (p/s) misurato 6 ore dopo la somministrazione intramuscolare di composizioni di nanoparticelle inclusi i composti secondo la formula (20-1).

| Composto | 0,001 mpk Dose 1 | 0,001 mpk Dose 2 | 0,01 mpk Dose 1 | 0,01 mpk Dose 2 |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 20-1 | 3,50E+05 | 1,99E+06 | 3,16E+06 | 1,04E+07 |
| 20-4 | 1,04E+06 | n.d. | 9,46E+06 | n.d. |
| 20-6 | 8,57E+05 | 9,79E+05 | 3,41E+06 | 6,04E+06 |
| MC3 | 1,23E+06 | 1,09E+06 | 1,79E+07 | 3,13E+07 |

[1837] Resta inteso che mentre i composti e i metodi della presente divulgazione sono stati descritti insieme alla loro descrizione dettagliata, la descrizione precedente intende illustrare e non limitare l'ambito della presente divulgazione, che è definito da l'ambito delle rivendicazioni allegate. Altri aspetti, vantaggi e modifiche rientrano nell'ambito delle seguenti rivendicazioni.

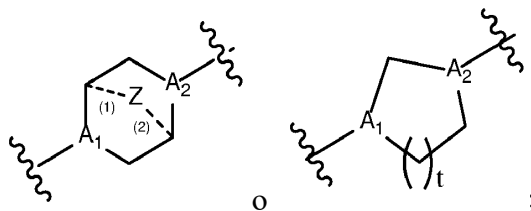
Rivendicazioni

1. composto avente formula (I) o formula (Ib):



o un suo sale o isomero, in cui

l'anello A è



t è 1 o 2;

A₁ e A₂ sono selezionati ciascuno indipendentemente tra CH o N;

A₆ e A₇ sono selezionati ciascuno indipendentemente da CH o N, in cui almeno uno tra A₆ e A₇ è N;

Z è CH₂ o assente in cui quando Z è CH₂, le linee tratteggiate (1) e (2) rappresentano ciascuna un legame singolo; e quando Z è assente, le linee tratteggiate (1) e (2) sono entrambe assenti;

R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀, alchenile C₅₋₂₀, -R"MR', -R *YR", -YR", e -R * OR";

ciascun M è selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(S)S-, -SC(S)-, -CH(OH)-, -P(O)(OR')O-, -S(O)₂ -, un gruppo arilico e un gruppo eteroarilico; in cui quando il composto è di formula (Ib), allora M non è -OC(O)O-;

X¹, X² e X³ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da un legame, -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

X⁴ e X⁵ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CHR-, -CHY-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)-, -C(O)O-CH₂-, -OC(O)-CH₂-, -CH₂-C(O)O-, -CH₂-OC(O)-, -CH(OH)-, -C(S)- e -CH(SH)-;

ciascun Y è indipendentemente un carbociclo C₃₋₆;

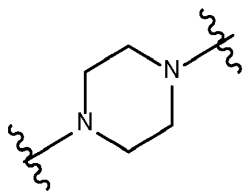
ciascun R* è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂ e alchenile C₂₋₁₂;

ciascun R indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₃ e carbociclo C₃₋₆;

ciascun R' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₁₋₁₂, alchenile C₂₋₁₂ e H; e

ciascun R'' è indipendentemente selezionato dal gruppo costituito da alchile C₃₋₁₂ e alchenile C₃₋₁₂;

in cui quando il composto è di formula (I) e quando l'anello A è



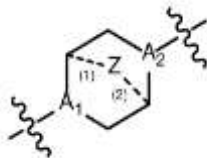
allora

i) almeno uno tra X¹, X² e X³ non è -CH₂-; e/o

ii) almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è -R''MR';

e

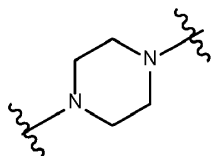
quando il composto è di Formula (I) e l'anello A è



e X¹, X² e X³ sono -CH₂, allora

almeno uno tra A¹ e A² è N, R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₆₋₂₀ e alchenile C₆₋₂₀, e

quando l'anello A è

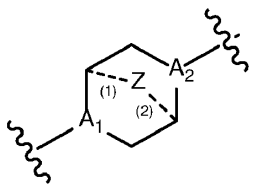


allora

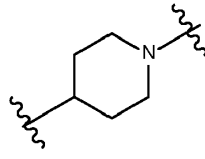
- i) R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ sono uguali, in cui R₁ non è alchile C₁₂, alchile C₁₈ o alchenile C₁₈;
- ii) solo uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è selezionato da alchenile C₆₋₂₀;
- iii) almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ ha un numero di atomi di carbonio diverso da almeno un altro di R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅;
- iv) R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀, e R₄ e R₅ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀; o
- v) R₁, R₂ e R₃ sono selezionati da alchile C₆₋₂₀ e R₄ e R₅ sono selezionati da alchenile C₆₋₂₀.

2. Il composto della rivendicazione 1, in cui il composto è di formula (I) e:

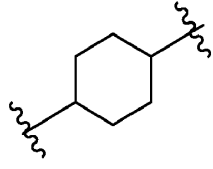
(i) l'anello A è



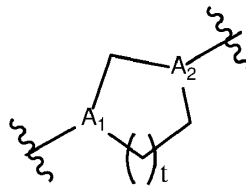
preferibilmente



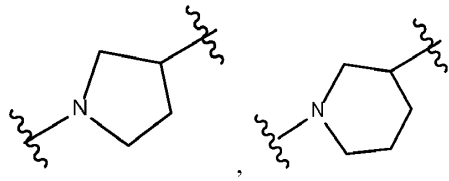
o



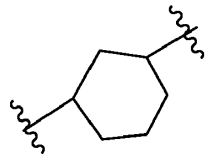
(ii) l'anello A è



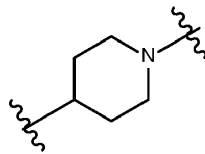
preferibilmente



o

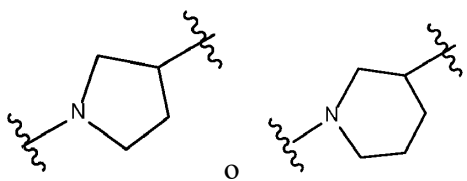


(iii) l'anello A è



in cui l'atomo N è collegato con X²; o

(iv) l'anello A è

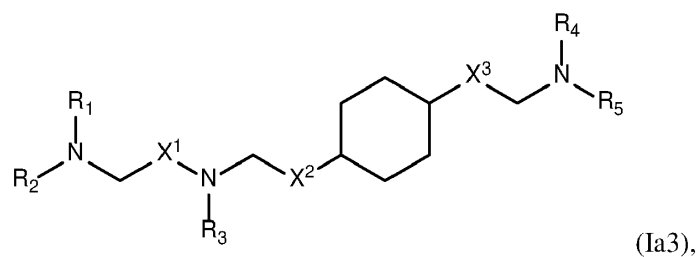
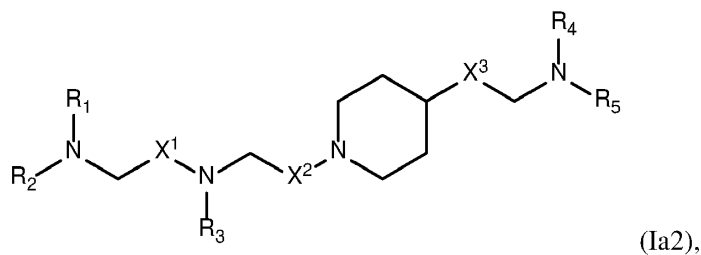
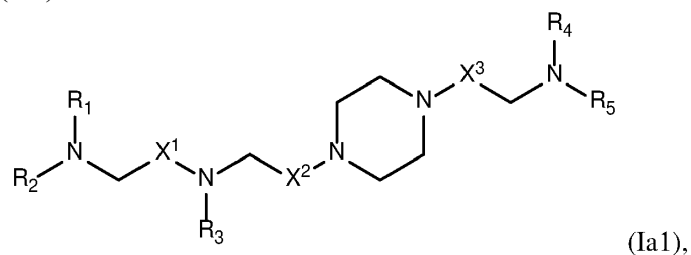


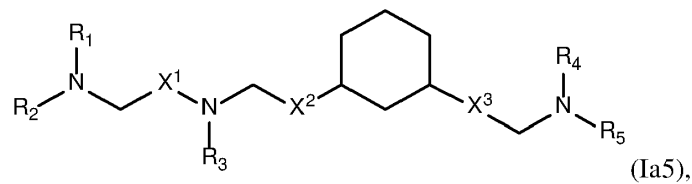
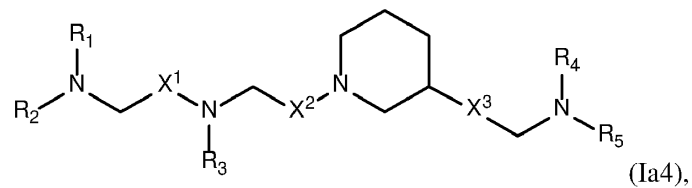
in cui l'atomo N è collegato con X^2 .

3. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui

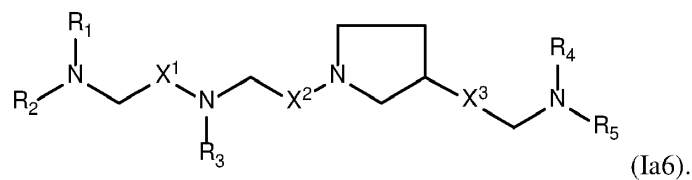
- (i) almeno uno tra A_1 e A_2 nella formula (I) è N;
- (ii) nella formula (I) A_1 è N e A_2 è CH;
- (iii) nella formula (I) A_1 è CH e A_2 è N, e/o nella formula (Ib) A_6 è CH e A_7 è N;
- (iv) nella formula (I) A_1 è N e A_2 è N, e/o nella formula (Ib) A_6 è N e A_7 è N; o
- (v) nella formula (I) ciascuno di A_1 e A_2 è CH.

4. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, essendo di una qualsiasi delle formule (Ia1)-(Ia6):

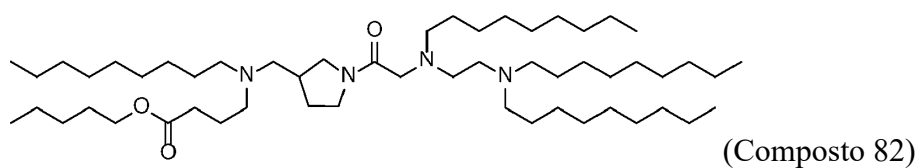
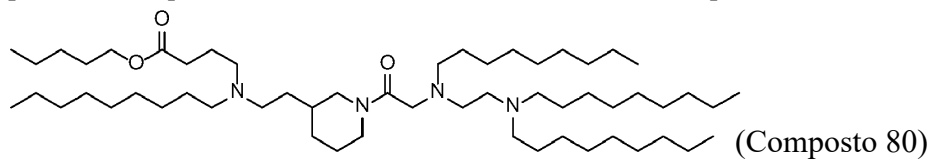




o

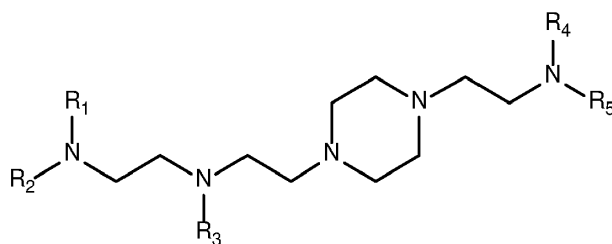


5. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui il composto è selezionato da:



e loro sali o isomeri.

6. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, essendo di formula (IIa)



(IIa).

7. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui R₁, R₂ e R₃ sono:

- (i) selezionato indipendentemente dal gruppo costituito da alchile C₅₋₂₀ e alchenile C₅₋₂₀;
- (ii) uguale;
- (iii) alchile C₆;
- (iv) alchile C₉;
- (v) alchile C₁₂;
- (vi) alchile C₁₄;
- (vii) alchenile C₁₈; o
- (viii) linoleile.

8. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui

- (i) almeno uno tra X¹ e X² non è -CH₂-;
- (ii) X¹ non è -CH₂-;
- (iii) X¹ è -C(O)-;
- (iv) X² non è -CH₂-; o
- (v) X² è -C(O)-.

9. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui quando A₆ è N e A₇ è N,

- allora (i) almeno uno di X⁴ e X⁵ non è -CH₂-; (ii) almeno uno di X⁴ e X⁵ è -C(O)-; e/o (iii) almeno uno tra R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅ è -R''MR'.

10. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui

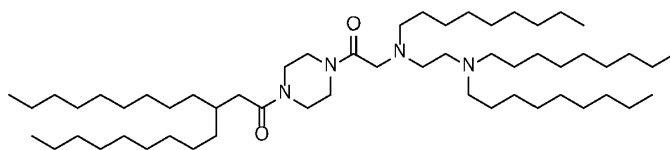
- (i) X⁴ è -CH₂- e X⁵ è -C(O)-; o

(ii) X^4 e X^5 sono $-C(O)-$.

11. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui R_2 , R_3 , R_4 e R_5 sono uguali.

12. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui R_2 , R_3 , R_4 e R_5 sono alchile C_9 .

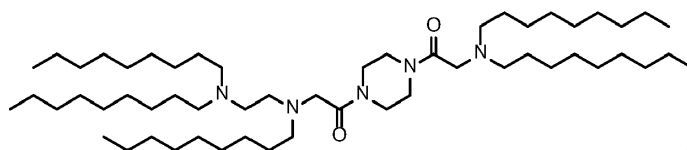
13. Il composto una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui il composto è selezionato dal Composto 67:



(Composto 67)

e loro sali o isomeri.

14. Il composto una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui il composto è selezionato dal Composto 4:



(Composto 4)

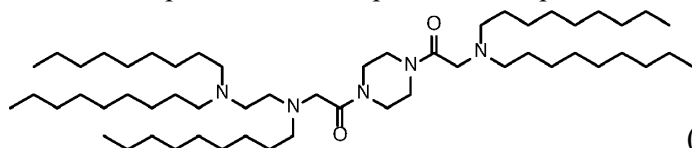
e loro sali o isomeri.

15. Composizione di nanoparticelle comprendente un componente lipidico comprendente un composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

16. La composizione di nanoparticelle secondo la rivendicazione 15, in cui il componente lipidico comprende inoltre: (i) un fosfolipide; (ii) un lipide strutturale e/o (iii) un lipide PEG.

17. La composizione di nanoparticelle di una qualsiasi delle rivendicazioni 15-16, in cui il lipide strutturale è selezionato dal gruppo costituito da colesterolo, fecosterolo, sitosterolo, ergosterolo, campesterolo, stigmasterolo, brassicasterolo, tomatidina, acido ursolico, alfa-tocoferolo e loro miscele.

18. La composizione di nanoparticelle di una qualsiasi delle rivendicazioni 15-17, comprendente inoltre un agente terapeutico e/o profilattico; facoltativamente in cui si trova l'agente terapeutico e/o profilattico
- (i) un vaccino o un composto in grado di suscitare una risposta immunitaria;
 - (ii) un acido nucleico; o
 - (iii) un acido ribonucleico (RNA), facoltativamente in cui l'RNA è selezionato dal gruppo costituito da un piccolo RNA interferente (siRNA), un RNA interferente asimmetrico (aiRNA), un microRNA (miRNA), un RNA Dicer-substrato (dsRNA), un piccolo RNA a forcina (shRNA), un RNA messaggero (mRNA) e loro miscele.
19. Composizione farmaceutica comprendente la composizione di nanoparticelle di una qualsiasi delle rivendicazioni 15-18 e un veicolo farmaceuticamente accettabile.
20. La composizione di nanoparticelle secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15-18, per l'uso in un metodo per trattare una malattia o un disturbo in un mammifero che ne ha bisogno, facoltativamente in cui il mammifero è un essere umano.
21. La composizione di nanoparticelle per l'uso secondo la rivendicazione 20, in cui la malattia o il disturbo è **caratterizzata/o da** attività proteica o polipeptidica disfunzionale o aberrante, o in cui la malattia o il disturbo è selezionata/o dal gruppo costituito da malattie infettive, cancro e malattie proliferative, malattie genetiche, malattie autoimmuni malattie, diabete, malattie neurodegenerative, malattie cardiovascolari e renovascolari e malattie metaboliche.
22. La composizione di nanoparticelle per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 20-21, in cui la composizione di nanoparticelle comprende il Composto 4:



(Composto 4)

- 23.** La composizione di nanoparticelle per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 20-22, in cui la composizione di nanoparticelle viene somministrata per via endovenosa, intramuscolare, intradermica, sottocutanea, intranasale o per inalazione.
- 24.** La composizione di nanoparticelle per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 20-23, in cui una dose da circa 0,01 mg/kg a circa 10 mg/kg dell'agente terapeutico e/o profilattico viene somministrata al mammifero.
- 25.** La composizione di nanoparticelle per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 20-24, in cui il metodo comprende inoltre, prima della fase di mettere a contatto o somministrare, pretrattare detto mammifero con uno o più composti aggiuntivi, in cui pretrattare comprende somministrare detti uno o più composti aggiuntivi a detti mammifero; facoltativamente in cui detto mammifero viene pretrattato 24 ore o meno prima della fase di contatto o somministrazione, facoltativamente circa un'ora prima della fase di contatto o somministrazione.
- 26.** La composizione di nanoparticelle per l'uso secondo la rivendicazione 25, in cui detti uno o più composti aggiuntivi sono selezionati dal gruppo costituito da composti antinfiammatori, steroidi, statine, estradioli, inibitori del BTK, agonisti S1P1, modulatori del recettore dei glucocorticoidi (GRM) e anti-istamine; facoltativamente in cui detti uno o più composti aggiuntivi sono selezionati dal gruppo costituito da desametasone, metotrexato, paracetamolo, un bloccante del recettore H1 e un bloccante del recettore H2.
- 27.** La composizione di nanoparticelle per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 20-26, in cui il mammifero (a) è carente di LDLR; (b) è carente di apoE; e/o (c) ha un'interazione LDLR-apoE anormale.
- 28.** La composizione di nanoparticelle per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 20-26, in cui il mammifero (a) non è carente di LDLR; (b) non è carente di apoE; e/o (c) ha una normale interazione LDLR-apoE.

* * * *

Seguono n° 8 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 10 giugno 2022.

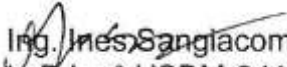
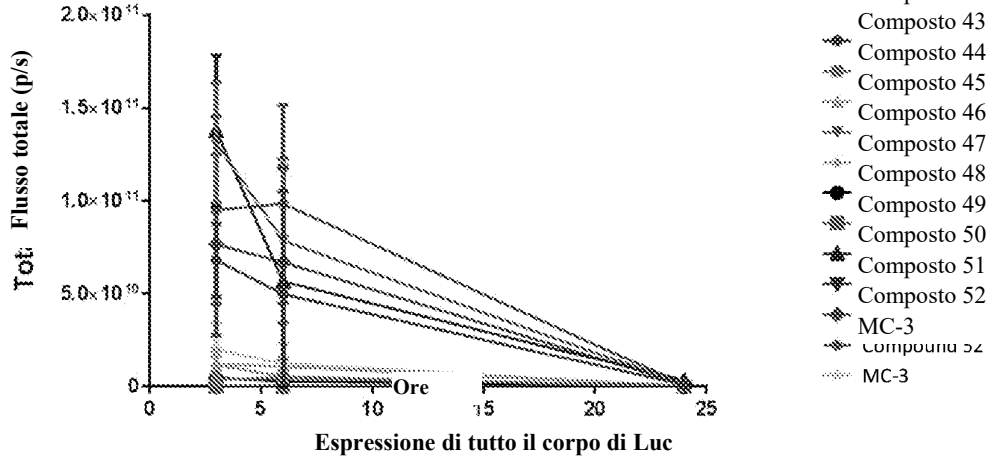

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIGURA 1

Espressione di tutto il corpo di Luc
Whole Body Luc Expression



Whole Body Luc Expression

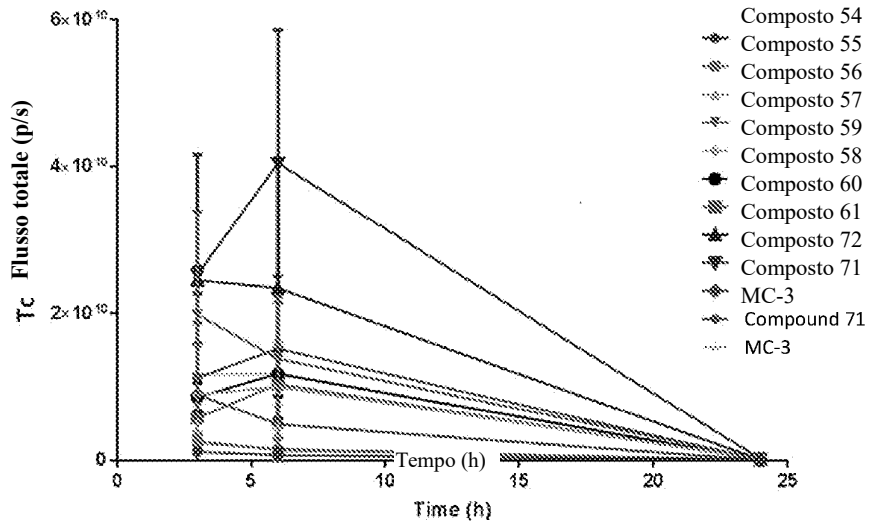


FIGURA 2

FIGURA 3

FIGURE 2

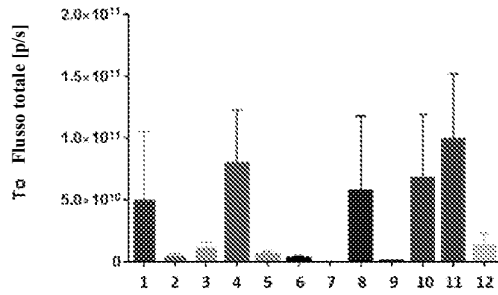
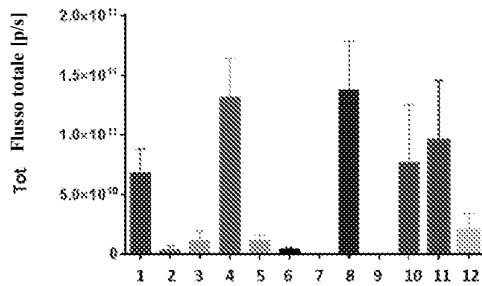
FIGURE 3

3 ore

6 ore

3Hrs

6hrs-



5

FIGURA 4

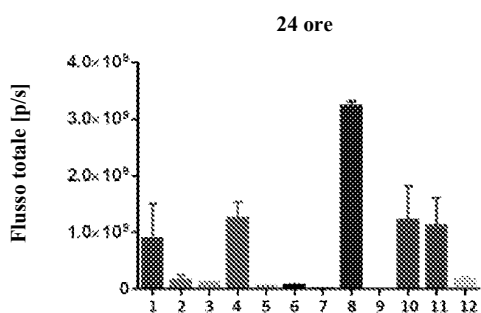


FIGURA 5

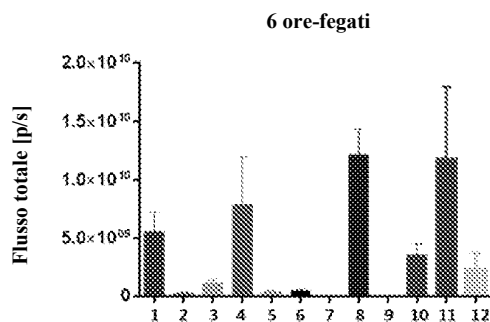


FIGURA 6

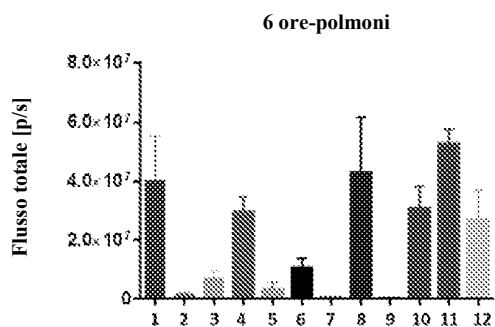


FIGURA 7

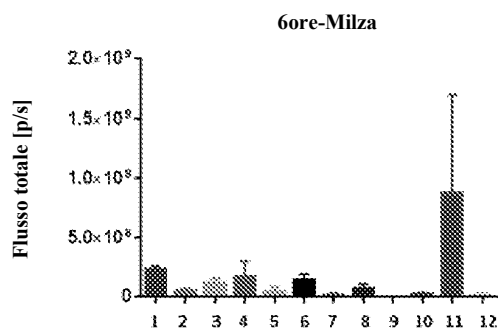


FIGURA 8

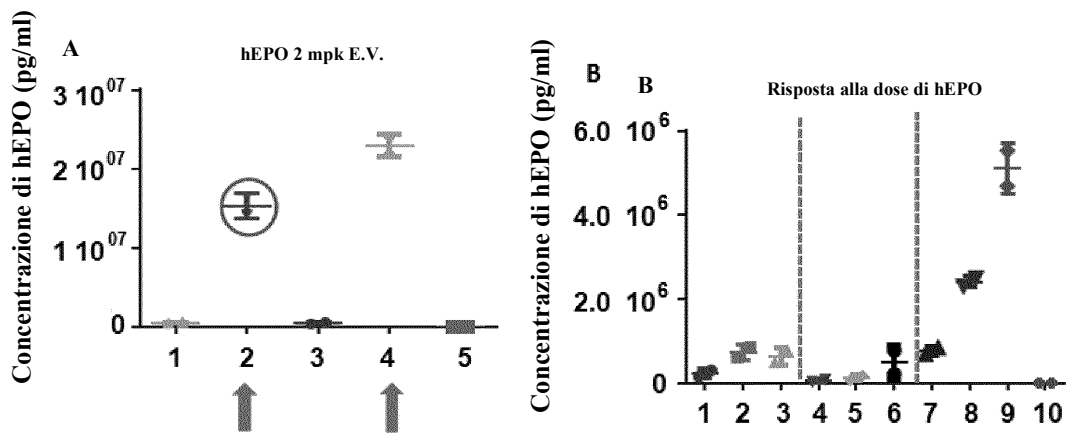


FIGURA 9

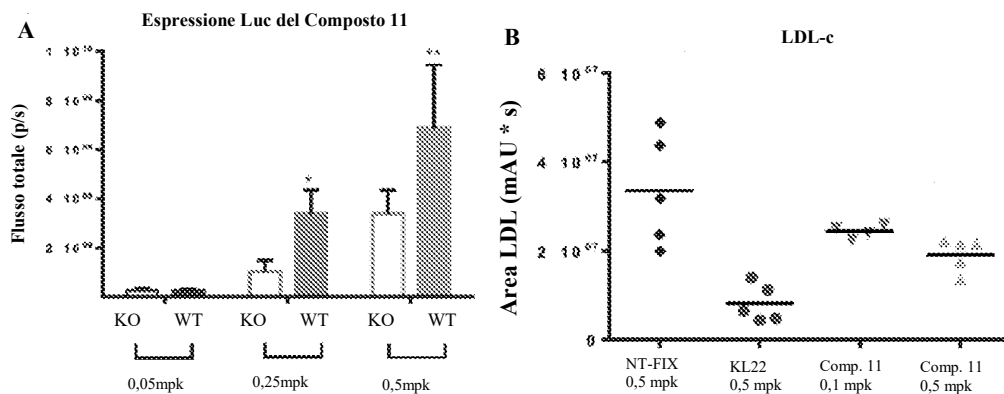


FIGURA 10

Composto 4, 0,01 mpk, espressione NHP di hEPO

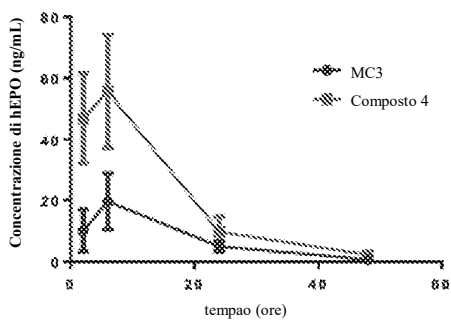


FIGURA 11

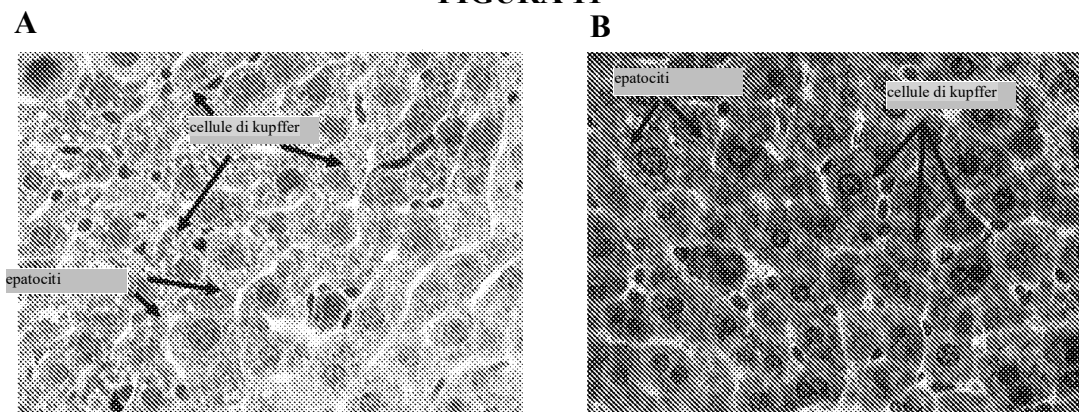


FIGURA 12

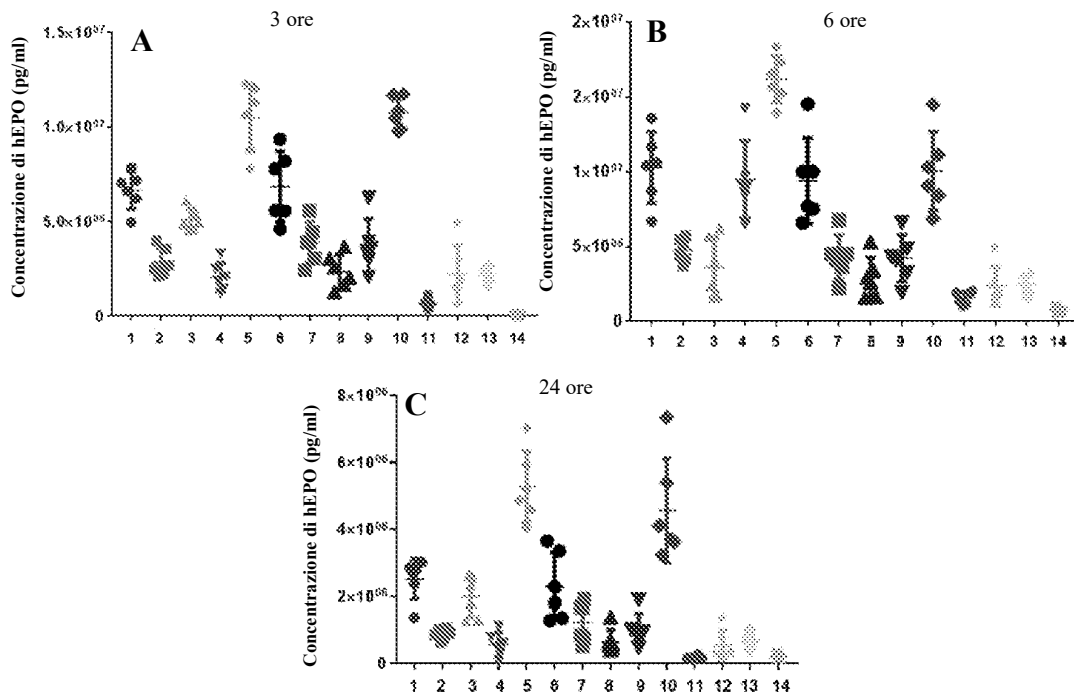


FIGURA 13

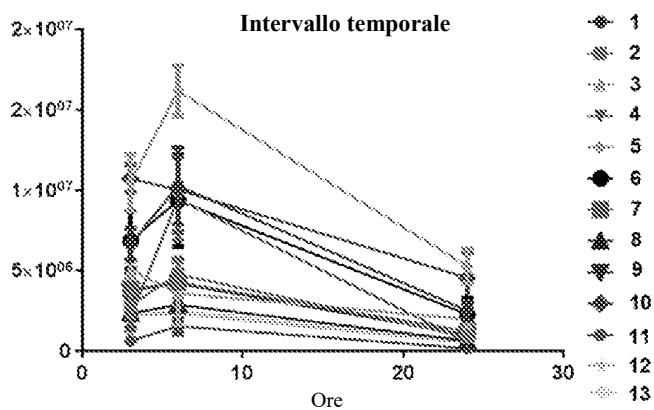


FIGURA 14

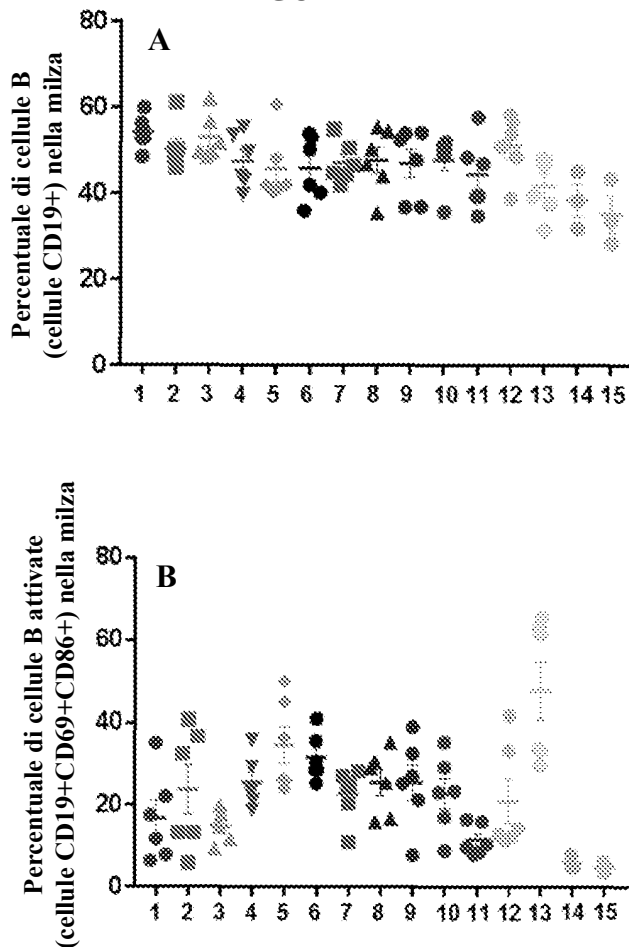


FIGURA 15

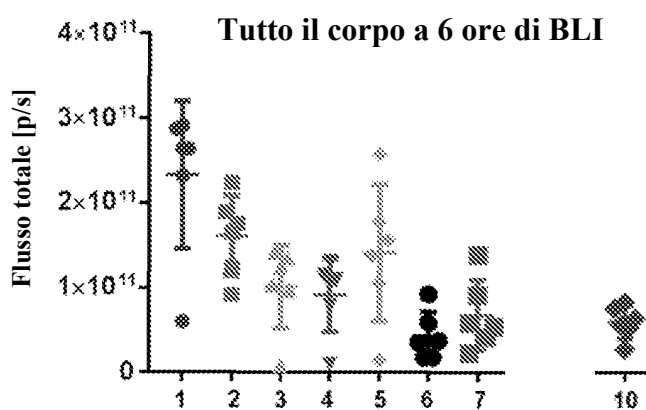


FIGURA 16

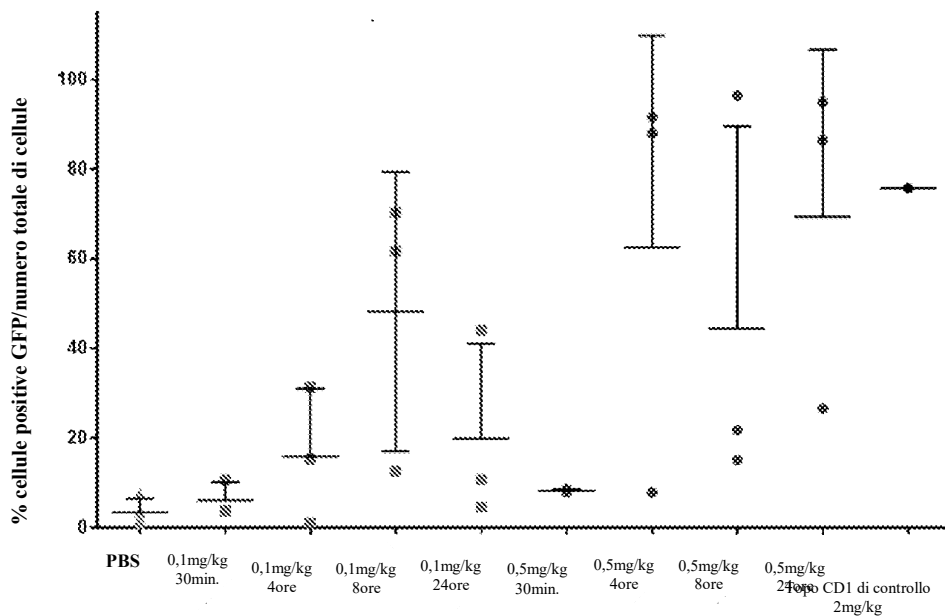


FIGURA 17

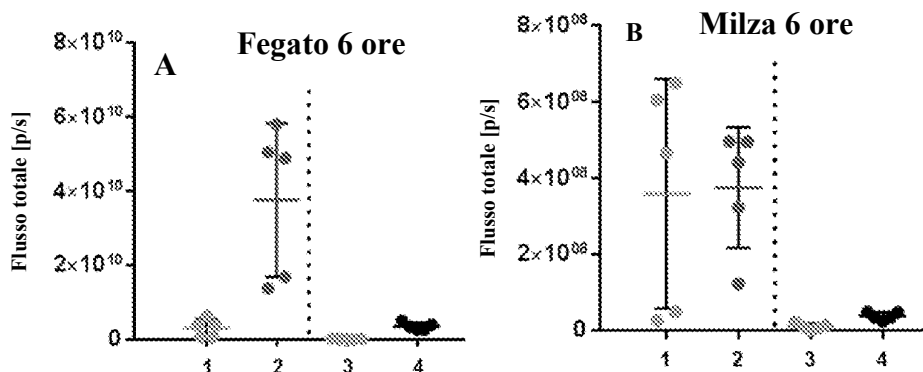


FIGURA 18

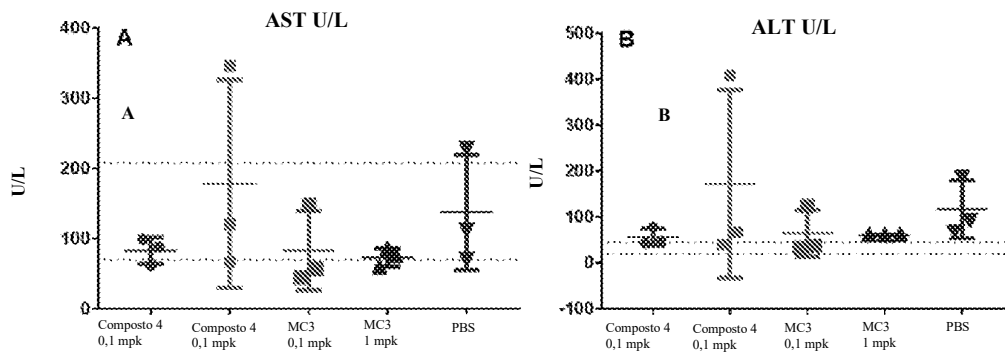


FIGURA 19

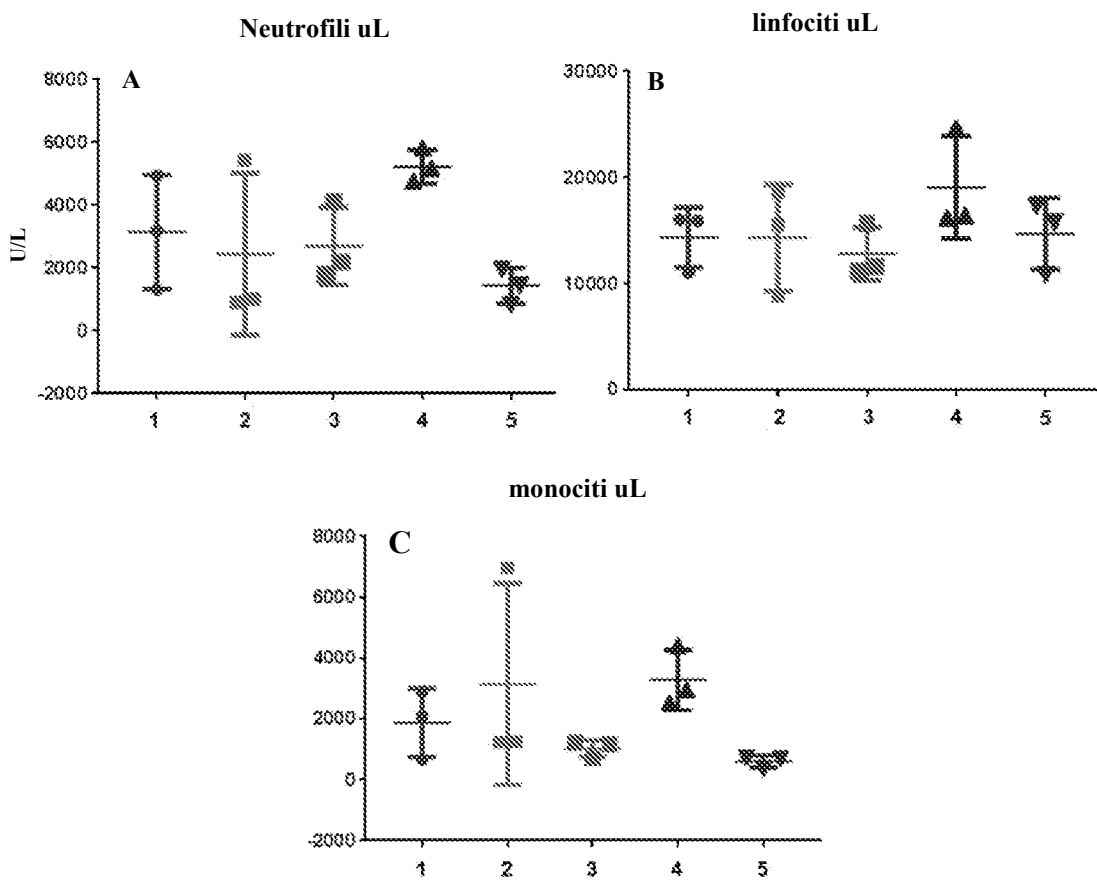


FIGURA 20

