



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 337 226**

② Número de solicitud: 200902389

⑤ Int. Cl.:

C07C 317/08 (2006.01)

C07C 315/04 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

C07C 317/18 (2006.01)

C07C 317/38 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **16.12.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.04.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Granada
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

⑦ Inventor/es: **Santoyo González, Francisco;
Osuna Carrillo de Albornoz, Antonio;
Morales Sanfrutos, Julia;
Megía Fernández, Alicia;
Cruz Bustos, Teresa y
González González, Gloria Maribel**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Sistemas lipídicos funcionalizados con vinilsulfonas. Síntesis y usos.**

⑤ Resumen:

Sistemas lipídicos funcionalizados con vinilsulfonas. Síntesis y usos.

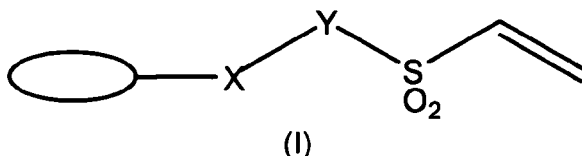
Compuesto que comprende una molécula de naturaleza lipídica y un grupo vinilsulfona que permite llevar a cabo la lipidación de biomoléculas de una forma altamente eficaz y sencilla. La invención también se refiere a sus procedimientos de obtención y a sus usos. Más concretamente se refiere al uso de estos compuestos en el desarrollo de dos nuevas aplicaciones de los ISCOMs basadas en la capacidad de nanoencapsulación y la incorporación de anticuerpos a la membrana de los mismos: a) Su empleo en inmunomarcaje fluorescente; b) Desarrollo de sistemas para el transporte dirigido de fármacos.

ES 2 337 226 A1

DESCRIPCIÓN

Sistemas lipídicos funcionalizados con vinilsulfonas. Síntesis y usos.

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto de fórmula general (I) que comprende una molécula de naturaleza lipídica y un grupo vinilsulfona que permite llevar a cabo la lipidación de biomoléculas de una forma altamente eficaz y sencilla. La presente invención también se refiere a sus procedimientos de obtención y a sus usos. Más particularmente se refiere al uso de estos compuestos en el desarrollo de dos nuevas aplicaciones de los ISCOMs basadas en la capacidad de nanoencapsulación y la incorporación de anticuerpos a la membrana de los mismos: a) Su empleo en inmunomarcaje fluorescente; b) Desarrollo de sistemas para el transporte dirigido de fármacos.



Estado de la técnica anterior

Tras el gran desarrollo de la genómica y la proteómica, la lipidómica (Wenk, M. R. *Nature Reviews Drug Discovery* (2005), vol. 4 (7), pp 594-610.) ha surgido como un nuevo campo de investigación que avanza rápidamente y que tiene una gran importancia ya que, al igual que los genes y las proteínas, los lípidos también desempeñan funciones cruciales en las células. La lipidómica se dedica al estudio y caracterización del conjunto de las especies lipídicas celulares, las moléculas y macromoléculas con las que interactúan y sus funciones biológicas.

A diferencia de lo que ocurre con otro tipo de biomoléculas, los lípidos no se definen mediante una característica estructural común sino por un comportamiento físico-químico: su insolubilidad en agua. Clásicamente se ha considerado que los lípidos cumplen dos funciones generales, una estructural, en las biomembranas, y como reserva energética. Sin embargo, los avances tecnológicos han puesto de manifiesto la existencia de miles de especies lipídicas diferentes en el cuerpo humano sugiriendo la existencia de funciones aún no exploradas como son la señalización celular, el direccionamiento de proteínas hacia su destino celular, el anclaje de proteínas a membranas y la entrada de toxinas, virus y bacterias. Así por ejemplo, los lípidos de membrana, a través de sus interacciones con las proteínas integrales o asociadas a membrana modulan la función de éstas, su anclaje y tráfico. De hecho, existen enfermedades asociadas a un balance defectuoso de lípidos como la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer.

Los principales objetivos de la lipidómica son:

- Nuevas aproximaciones analíticas para la caracterización del lipidoma.
- Aplicación de métodos biofísicos para el estudio de las interacciones lípido-proteína principalmente en los micro- y nanodominios de las membranas biológicas. Para este tipo de estudios es necesaria, entre otras cosas, la síntesis de lípidos específicos, análogos y sondas.
- Identificación de la red lipídica, incluyendo los mediadores lipídicos para la regulación metabólica y génica y su integración en sistemas de señalización no lipídicos.

La actividad de las proteínas no está únicamente controlada por la velocidad de síntesis y degradación sino también por procesos específicos y selectivos de modificación covalente o modificación post-transduccional que modulan interacciones moleculares, localización de proteínas y estabilidad. De las diferentes modificaciones post-transduccionales que pueden sufrir las proteínas una de ellas es la lipidación, siendo la más relevante la acilación con ácidos grasos. La acilación de proteínas con ácidos grasos implica principalmente a dos de ellos el palmítico y el mirístico. La unión a las proteínas puede darse a través de la formación de distintos tipos de enlaces:

- Formación de un enlace amida con un residuo de glicina N-terminal. o con el grupo ϵ -amino de las lisinas.
- Formación de un enlace tioéster con un residuo de cisteína a través de una S-acilación.
- Formación de un enlace éster con residuos de serina o treonina.

La incorporación de ácidos grasos a la estructura de las proteínas facilita la interacción de éstas con las membranas así como su transporte a través de las mismas. Además, modula ciertas interacciones proteína-proteína y diversos procesos de señalización. Debido al gran número de mecanismos celulares en los que las proteínas modificadas con grupos de naturaleza lipídica se encuentran implicadas, tiene un gran interés el estudio físico-químico de este tipo de proteínas y de las interacciones en las que intervienen (proteína-proteína y proteína-membrana). La purificación

de péptidos y proteínas modificadas con grupos lipídicos no es sencilla debido a su baja concentración celular y a la solubilidad de las mismas. Una posible alternativa consiste en la acilación química de proteínas para su posterior utilización en este tipo de estudios (Draper, J. M. *et al. Journal of Lipid Research* (2007), vol. 48 (8), pp 1873-1884).

- 5 Sin embargo, la acilación de proteínas presenta muchas otras aplicaciones. Así por ejemplo, se ha observado que aunque la modificación con ácidos grasos de péptidos antimicrobianos es bastante rara la obtención de conjugados sintéticos mejora esta actividad (Chu-Kung, A. F. *et al. Bioconjugate Chemistry* (2004), vol. 15 (3), pp 530-535). Los lipopéptidos pueden ser utilizados también en el etiquetado de receptores intracelulares (Thiam, K. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* (1999), vol.42 (18), pp 3732-3736) y en el desarrollo de vacunas sintéticas (Deprez, B. *et al. Vaccine* 1996, vol. 14 (5), pp 375-382).

- 15 El empleo de proteínas o péptidos terapéuticos para el tratamiento de ciertas enfermedades presenta una enorme importancia en farmacología y biotecnología, además, tiene un gran potencial debido a su elevada especificidad. Sin embargo, su aplicación clínica está limitada, entre otros motivos, por su baja permeabilidad a través de membranas biológicas debido al carácter hidrofílico de estas proteínas. La modificación de péptidos y proteínas con grupos hidrofóbicos, como los ácidos grasos, constituye hoy día una de las posibilidades para aumentar su transporte a través de membranas biológicas (Kocevar, N. *et al. Chemical Biology & Drug Design* (2007), vol. 69 (2), pp 124-131). Mediante esta metodología no sólo se mejora la capacidad de las proteínas para interaccionar con las membranas sino que, además, se mantiene la actividad biológica de las mismas. De hecho, esta es una de las metodologías que se utiliza para el transporte de agentes terapéuticos hasta el sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica (Kabanov, A. V. *et al. Current Pharmaceutical Design* (2004), vol. 10 (12), pp 1355-1363) para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

- 25 Los sistemas proteína-lípido van más allá. La incorporación de proteínas a liposomas está adquiriendo día a día un mayor interés debido, fundamentalmente, a dos razones:

- Estudios de procesos en membranas. El estudio de interacciones proteína-liposoma puede contribuir a entender los procesos que tienen lugar en las membranas naturales.
- 30 - Dirección de fármacos. La unión de ciertas proteínas a liposomas puede ayudar a crear sistemas de dirección de fármacos.

- 35 La incorporación de péptidos y proteínas a liposomas se puede llevar a cabo mediante dos estrategias diferentes: a través de la inclusión de proteínas en el liposoma durante la formación del mismo o mediante la unión de la proteína a la bicapa lipídica del liposoma. En esta última opción es necesario que la proteína contenga una región hidrofóbica para que se establezca la asociación y para ello, en muchas ocasiones, se ha llevado a cabo la incorporación química de ácidos grasos mediante unión covalente sobre la estructura de la proteína.

- 40 En terapia génica, la incorporación *in vivo* de material genético en el interior de células somáticas constituye la metodología ideal. De hecho, la incorporación de material genético en cultivos de células eucariotas es una técnica estándar de gran importancia para el desarrollo de la Biología Molecular moderna. Los vectores víricos, como los retrovirus o los adenovirus, son muy efectivos pero llevan asociados problemas de toxicidad e inmunogenicidad. Una alternativa es el empleo de métodos no virales entre los cuales los liposomas catiónicos parecen muy prometedores, de hecho ya se están empleando para llevar a cabo transfecciones en cultivos celulares. Sin embargo, los polímeros con cargas positivas, como la poli-L-lisina (PLL) o la polietilenimina (PEI), constituyen una alternativa muy atractiva ya que son capaces de unirse al ADN y facilitar su entrada a la célula. La incorporación de unidades hidrofóbicas a estos polímeros, como son los ácidos grasos, mejora la eficiencia de los procesos de transfección (Han, S. O. *et al. Bioconjugate Chemistry* (2001), vol. 12 (3), pp 337-345).

- 50 Para la modificación química de proteínas con grupos hidrofóbicos o la Incorporación de éstos a polímeros catiónicos se pueden utilizar diversas metodologías. Así por ejemplo, se puede llevar a cabo la reacción de los grupos amino de las proteínas o los polímeros con cloruros de ácido (Kocevar, N. *et al. Chemical Biology & Drug Design* (2007), vol. 69 (2), pp 124-131) o anhídridos (Pato, C. *et al. Journal of Protein Chemistry* (2002), vol. 21 (3), pp 195-201) dando lugar a la formación de enlaces amida. También es posible conseguir esta unión mediante el empleo de ésteres activados (Abbasi, M. *et al. Biomacromolecules* (2007) vol. 8 (4), pp 1059-1063). Otros métodos que se han utilizado han sido las modificaciones quimiosselectivas (Bonnet, D. *et al. Tetrahedron Letters* (2000), vol. 41 (1), pp 45-48) o el empleo de la “click-chemistry” (Musiol, H. J. *et al. ChemBiochem* (2005), vol. 6 (4), pp 625-628).

- 60 Uno de los problemas que presenta este tipo de modificaciones es la insolubilidad de los agentes acilantes en disoluciones acuosas. Para solucionar este problema algunos autores han propuesto el empleo de mezclas reversibles (Michel, F. *et al. Langmuir* (1994), vol. 10 (2), pp 390-394) como microreactores o han desarrollado agentes acilantes solubles en agua (Ekrami, H. M. *et al. Febs Letters* (1995), vol. 371 (3), pp 283-286).

- 65 El acrónimo ISCOMs (Barr, I. G. *et al. Immunology and Cell Biology* (1996), vol. 74 (1), pp 8-25) (“immunostimulating complex”) deriva de la capacidad que estas partículas presentan para actuar como complejos inmunoestimuladores cuando se utilizan en vacunas para animales. Las investigaciones de este tipo de sistemas explotan su capacidad para actuar como adyuvante (compuestos que actúan de manera no específica para incrementar la inmunidad frente a un antígeno).

En bibliografía se describen dos tipos de ISCOMs que difieren en su composición:

- ISCOM clásico, constituido por saponina, colesterol, fosfolípidos y proteínas.
- ISCOM básico, también denominado ISCOM matrix, formado únicamente por saponina, colesterol y fosfolípidos.

La base de la arquitectura de los ISCOMs son las interacciones que se establecen entre la saponina y el colesterol. Desde un punto de vista estructural son partículas esféricas, huecas y con forma de caja, con un tamaño heterogéneo en torno a los 40 nm de diámetro y con carga negativa. Cada ISCOM está constituido por 20 o más subunidades globulares ensambladas en un dodecaedro pentagonal, y una vez formados son tremendamente estables.

Los ISCOMs pueden ser preparados por diversos procedimientos, muchos de los cuales son adaptaciones de los métodos de preparación de liposomas. Hasta la fecha se han descrito en bibliografía cinco métodos diferentes: diálisis, centrifugación, hidratación de película lipídica, inyección de etanol e inyección de éter. De todos ellos los más extendidos son el de diálisis y el de centrifugación debido a su simplicidad y mayor facilidad para su escalado.

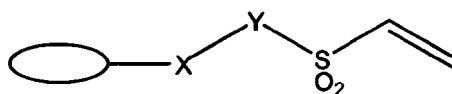
Para la incorporación de proteínas a un liposoma se dispone de dos estrategias diferentes. Sin embargo, en el caso de los ISCOMs el atrapamiento de proteínas no es posible debido al pequeño tamaño y volumen interno de los mismos. Por lo tanto, para conseguir la incorporación de proteínas a su estructura es necesario que éstas estén provistas de una región hidrofóbica y una de las alternativas existentes es la modificación química de la proteína con grupos de naturaleza lipídica.

Las aplicaciones de los ISCOMs se han centrado, sobre todo, en su empleo en vacunas (Sanders, M. T. *et al. Immunology and Cell Biology* (2005), vol. 83 (2), pp 119-128). La incorporación de antígenos a la estructura del ISCOM conduce a la obtención de una respuesta inmune mayor, posiblemente debido a la suma del efecto del anticuerpo y a la inmunoestimulación que produce la saponina. Sin embargo, también han encontrado aplicación como sistemas de vehiculización de anfotericina B y otros fármacos de naturaleza lipídica (Morein, B. *et al. Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials* (1997), 24th, 118). Además, se han utilizado como antígenos en inmunoensayos (Bjorkman, C. *et al. Parasite Immunology* (1994), vol. 16 (12), pp 643-648).

Descripción de la invención

En la presente invención se proporciona un nuevo compuesto de fórmula general (I) que comprende una molécula de naturaleza lipídica y un grupo vinilsulfona que permite llevar a cabo la lipidación de biomoléculas de una forma altamente eficaz y sencilla. Estos compuestos constituyen una alternativa a las derivatizaciones empleadas en lipidómica para la incorporación de restos lipídicos en biomoléculas. Además, se proporciona el empleo de estos compuestos en el desarrollo de dos nuevas aplicaciones de los ISCOMs basadas en su capacidad de nanoencapsulación y la incorporación de anticuerpos a la membrana de los ISCOMs: a) Su empleo en inmunomarcaje fluorescente; b) Desarrollo de sistemas para el transporte dirigido de fármacos.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) (a partir de ahora compuestos de la invención):



donde:

Y es un grupo -CH₂-SO₂R¹- o -CH₂-; preferiblemente Y es -CH₂-

R¹ es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo (C₁-C₁₀), un alquenilo (C₁-C₁₀), un alquini-
lo (C₁-C₁₀), un dialquilarilo (C₁-C₁₀)Ar(C₁-C₁₀) o un grupo (CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂; preferentemente R¹ es un grupo (CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂;

n toma valores de 1 a 20; preferiblemente n toma valores de entre 2 a 10, más preferidamente n es de 2 a 5 y aún más preferiblemente n es 2.

X es un grupo -CO-NH-R²-Z-CH₂-, -Z-CH₂- o -CH₂-;

Z es S ó O;

R² es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo (C₁-C₁₀), un alquenilo (C₁-C₁₀), un alquini-
lo (C₁-C₁₀), un dialquilarilo (C₁-C₁₀)Ar(C₁-C₁₀) ó un grupo (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂;

m toma valores de 1 a 20; preferiblemente m toma valores de entre 2 a 10, más preferidamente m es de 2 a 5 y aún más preferiblemente m es 2; y

5  representa un lípido.

Por “lípido” se entiende en la presente invención a una molécula de naturaleza apolar, como por ejemplo, hidrocarburos saturados o insaturados, como por ejemplo pero sin limitarse a grupos alquilos (C_1-C_{30}), alquenos (C_2-C_{30}), alquinos (C_2-C_{30}) o esteroides. La mayoría de este tipo de moléculas son biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno, que tienen como característica principal el ser hidrofóbicas o insolubles en agua y sí en disolventes orgánicos. Preferiblemente, el lípido es un esteroide o un hidrocarburo alifático saturado o insaturado.

Por “hidrocarburo alifático” se refiere, en la presente invención, a moléculas orgánicas constituidas por carbono e hidrógeno, en las cuales los átomos de carbono forman cadenas lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. Es decir, que pueden ser, tanto grupos alquilo (saturados) como alquenos o alquinos (insaturados). Preferiblemente el lípido se puede seleccionar de entre un hidrocarburo (C_4-C_{30}), saturado o insaturado. Y más preferiblemente el número de carbono es de entre 10 y 20.

Por “esteroide” se refiere en la presente invención a esteroides con 27 a 29 átomos de carbono. Su estructura química deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, una molécula de 17 carbonos formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal. Se puede seleccionar de la lista que comprende, pero sin limitarse a colesterol, epicolesterol, estigmasterol, lanosterol, ergosterol y coprostenol. Más preferiblemente el esteroide es colesterol.

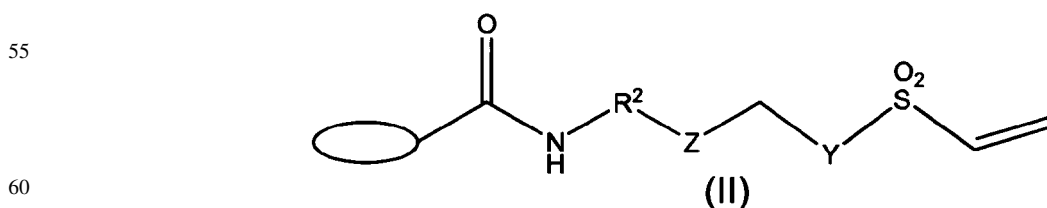
Por “alquilo” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Cuando nos referimos a lípidos serían cadenas alifáticas que tienen de 1 a 30 átomos de carbonos, más preferiblemente de 4 a 30 átomos de carbono y aún más preferiblemente de 10 a 20 átomos de carbono. Cuando nos referimos al grupo R^2 , independientemente, preferiblemente serían cadenas alifáticas que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a 5 átomos de carbono y aún más preferiblemente es un etilo.

Por “alqueno” se refiere en la presente invención a un radical alquilo, descrito anteriormente, y que tiene uno o más enlaces insaturados, concretamente tiene al menos un enlace doble, aunque también puede tener al menos un enlace triple. Los radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, nitro, etc.

Por “alquino” se refiere en la presente invención a un radical alquilo, descrito anteriormente, y que tiene uno o más enlaces insaturados, concretamente tiene al menos un enlace triple, aunque también puede tener al menos un enlace doble. Los radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, nitro, etc.

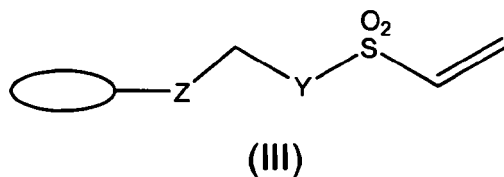
Por “dialquilarilo” se entiende en la presente invención a un grupo arilo que está sustituido con dos grupos alquilo, alqueno o alquino que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente tienen de 1 a 5 átomos de carbono. Los grupos alquilo, alqueno o alquino pueden ser iguales o diferentes, preferiblemente son iguales. Y por “arilo” se entiende en la presente invención a un sistema aromático o heteroaromático que tienen de 6 a 12 átomos de carbono o algún otro átomo, como por ejemplo O, N, S, etc..., pueden ser de anillo único o múltiple, separado y/o condensado. Los grupos arilo típicos contienen de 1 a 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta 10 aproximadamente 18 átomos de carbono de anillo, tales como radicales fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo.

50 Cuando X es un grupo $-CO-NH-R^2-Z-CH_2-$ los compuestos de la invención tienen la fórmula general (II):



65 donde: R^2 , Z, Y y , están definidos anteriormente.

Cuando X es un grupo $-Z-CH_2-$ los compuestos de la invención tienen la fórmula general (III):



donde: Z, Y y , están definidos anteriormente.

El compuesto de la invención sería de fórmula general (I), excepto el compuesto 1-(vinilsulfonyl)octadecano, es decir, cuando el lípido es un hexadecanilo, X e Y no pueden ser $-CH_2-$. En una realización preferida, el compuesto de la invención se selecciona de la lista que comprende:

N-(2-(2-(vinilsulfonyl)ethyl-thio)ethyl)oleamide,

N-(2-(2-(vinilsulfonyl)ethoxy)ethyl)oleamide,

N-(2-(2-(vinilsulfonyl)ethoxy)ethyl)stearamide,

N-(2-(2-(vinilsulfonyl)ethoxy)ethyl)dodecanamide,

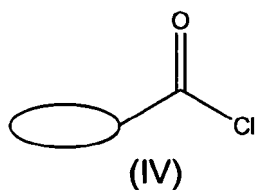
3-(2-(vinilsulfonyl)ethoxy)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-1H-ciclopenta[a]fenantreno, y

(Z)-1-(vinilsulfonyl)octadec-9-eno.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de los compuestos de la invención de fórmula general (II) y (III) y que comprende:

Para el caso de los compuestos de fórmula general (II):

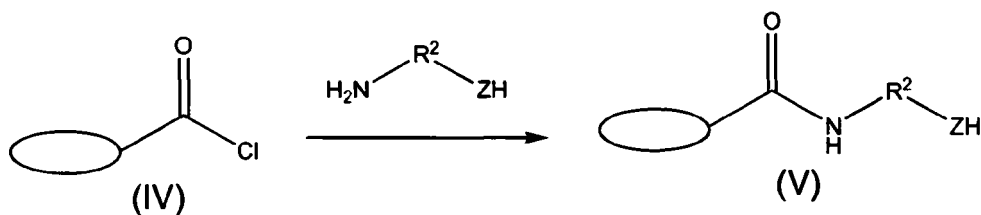
a) La reacción de un cloruro de ácido de fórmula general (IV):

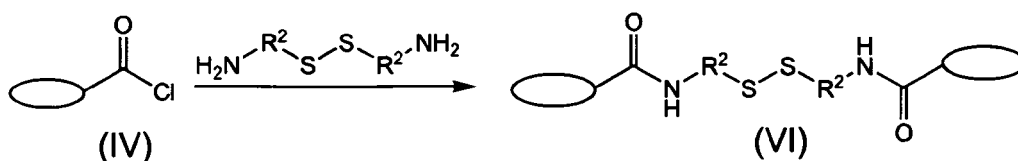


donde se ha definido anteriormente.

- con una amina de fórmula general H_2N-R^2-ZH o una diamina de fórmula general $H_2N-R^2-S-S-R^2-NH_2$ donde Z y R^2 están definidos anteriormente.

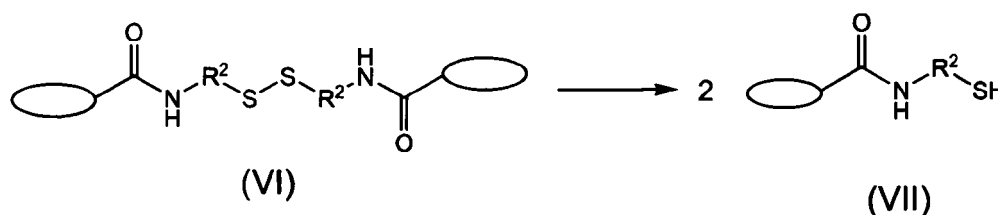
Dependiendo del tipo de amina que se utilice en la reacción de este paso (a) se obtendrá un compuesto de fórmula (V) o un compuesto de fórmula (VI), representados mediante los siguientes esquemas:



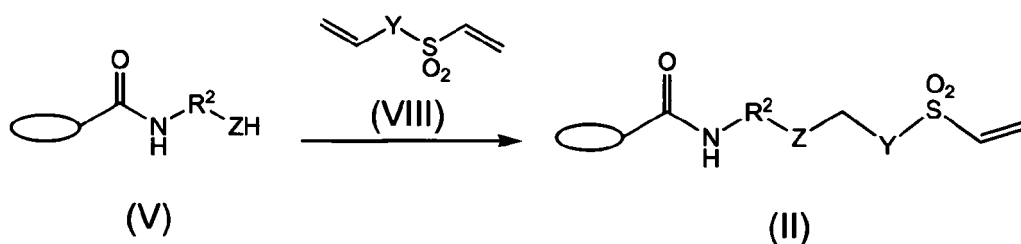


donde: Z, R² y , están definidos anteriormente.

- b) cuando tiene lugar la reacción en la que se forma el compuesto de fórmula (VI), sería necesaria la reducción del puente disulfuro del compuesto de fórmula general (VI) que conduce al compuesto de fórmula general (VII), que es mismo que el compuesto (V) cuando Z es S.



- c) reacción de un compuesto de fórmula general (V), incluido el compuesto de fórmula general (VII), con una bis-vinilsulfona de fórmula general (VIII):

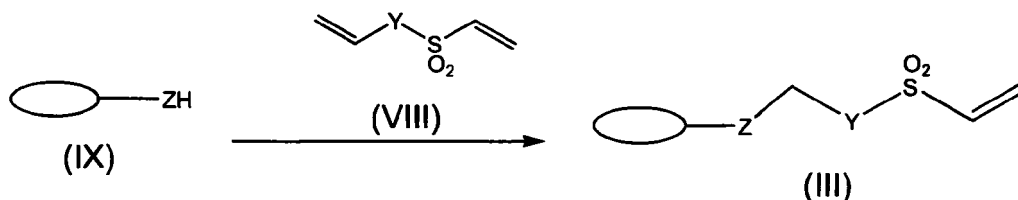


donde: Z, Y y , están definidos anteriormente.

En una realización preferida de la presente invención la bis-vinilsulfona es la divinilsulfona DVS (es decir, Y es -CH₂-).

Para el caso de los compuestos de fórmula general (III), el método de obtención de los compuestos de la invención comprende hacer reaccionar:

- un compuesto de fórmula general (IX) con una bis-vinilsulfona de fórmula (VIII):



donde: Z, Y y , están definidos anteriormente.

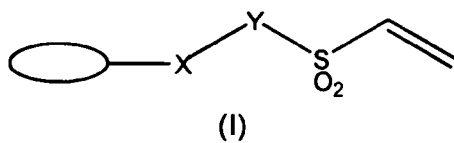
En una realización preferida de la presente invención la bis-vinilsulfona es la divinilsulfona DVS (es decir, Y es -CH₂-).

Los agentes de lipidación conteniendo vinilsulfonas (compuestos de fórmula general (I)) pueden ser ligados a cualquier biomolécula que contenga grupos funcionales complementarios (como por ejemplo, los grupos amino, tioles e imidazoles) presentes en las mismas de forma natural o artificial a través de una reacción de adición tipo Michael. Además, los compuestos son compatibles con la naturaleza biológica de las biomoléculas y la reacción de lipidación no requiere ninguna estrategia de activación.

El uso de la vinilsulfona como derivatización de los reactivos de lipidación para llevar a cabo la unión covalente biomolécula-compuesto de la invención, formando lo que llamamos bioconjugado covalente, presenta las siguientes ventajas:

- a) Estabilidad de los agentes de etiquetado.
- b) Formación de una unión covalente estable.
- c) La reacción es rápida y con altos rendimientos no generándose ningún tipo de subproducto.
- d) Las reacciones pueden llevarse a cabo bajo condiciones fisiológicas, medio acuoso, rango de pH estrecho, temperaturas suaves.
- e) Procesos de purificación y aislamiento sencillos.
- f) Existe una tolerancia hacia los otros grupos funcionales presentes en las biomoléculas distintos a los grupos amino, tioles e imidazoles con los que reaccionan las vinil-sulfonas.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) como agente de lipidación de moléculas, y más preferiblemente de biomoléculas.



donde: Z, Y y , están definidos anteriormente.

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) que se utilizan como agentes de lipidación de moléculas se pueden seleccionar de la lista que comprende:

- N-(2-(2-(vinilsulfonil)etil-tio)etil)oleamida,
- N-(2-(2-(vinilsulfonil)etoxi)etil)oleamida,
- N-(2-(2-(vinilsulfonil)etoxi)etil)estearamida,
- N-(2-(2-(vinilsulfonil)etoxi)etil)dodecanamida,
- 3-(2-(vinilsulfonil)etoxi)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-1H-ciclopenta[a]fenantreno,
- (Z)-1-(vinilsulfonil)octadec-9-eno, y
- 1-(vinilsulfonil)octadecano.

En una realización preferida de la presente invención, las biomoléculas seleccionadas son proteínas. En una realización aún más preferida de la presente invención, la proteína seleccionada es la proteína A (polipéptido de 42 kDa constituyente habitual de la pared de *Staphylococcus aureus* que posee afinidad por los anticuerpos a través de la porción Fe) o la proteína G (polipéptido de entre 30000 y 35000 Daltons aislado de la pared celular del estreptococo beta-hemolítico de las cepas C o G. Al igual que la proteína A posee afinidad por anticuerpos).

En una realización preferida de la presente invención la lipidación de proteínas, o de las moléculas en general, se realiza en una solución de las mismas en un tampón que no contenga aminos libres como por ejemplo, pero sin limitarse a, fosfato, HEPES o carbonato, de fuerza iónica moderada (50 - 200 mM) y pH básico (7,5-8,7) y reacción con un exceso de los reactivos de etiquetado de fórmula general (I) durante un tiempo suficiente (habitualmente durante unas horas a temperatura ambiente o a 4°C) eliminándose el exceso de reactivo mediante diálisis.

Otro aspecto de la presente invención es la incorporación de las biomoléculas modificadas con los agentes de lipidación de fórmula general (I), formando los bioconjugados covalentes, a una nanocaja, por ejemplo pero sin limitarse a los ISCOMs. En una realización preferida de la presente invención, las biomoléculas seleccionadas son proteínas. En una realización aún más preferida de la presente invención, la proteína seleccionada es la proteína A o la proteína G.

Por “nanocaja” se entiende en la presente invención a un tipo de sistema como los descritos en las publicaciones B. Morein K.L. Bengtsson, *Methods* 19, 94-102 (1999) y H.-X Sun, Y. Xie, Y.-P. Ye, *Vaccine* 27, 4388-4401 (2009).

Otro aspecto de la presente invención se refiere al empleo de los compuestos de fórmula general (I) en la preparación de nanocajas, preferiblemente ISCOMs funcionalizados con grupos vinilsulfona y la utilización de estos grupos vinilsulfona para ligar cualquier biomolécula que contenga grupos funcionales complementarios (grupos amino, tioles e imidazoles) presentes en las mismas de forma natural o artificial a través de una reacción de adición tipo Michael.

En una realización preferida de la presente invención, las biomoléculas seleccionadas son proteínas y compuesto de fórmula general (I) contiene una molécula de colesterol como molécula de naturaleza lipídica. En una realización aún más preferida de la presente invención, la proteína seleccionada es la proteína A o la proteína G.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la incorporación de anticuerpos a la membrana de las nanocajas lipídicas, más preferiblemente a los ISCOMs, a través de su unión con la biomolécula, preferiblemente proteína A o proteína G incorporada previamente (por cualquiera de las metodologías anteriormente descritas). En una realización preferida de la presente invención los anticuerpos son IgG frente a un parásito como *Trypanosoma cruzi*.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al empleo de estos sistemas, nanocajas lipídica-anticuerpo, más preferiblemente ISCOMs-anticuerpo, en el desarrollo de dos nuevas aplicaciones de los ISCOMs o sistemas similares, aprovechando su capacidad de nanoencapsulación: a) Su empleo en inmunomarcaje fluorescente; b) Desarrollo de sistemas para el transporte dirigido de fármacos.

En una realización preferida de la presente invención el sistema fluorescente encapsulado contiene una molécula fluorescente, preferiblemente la ficocianina.

En otra realización preferida de la presente invención, el sistema nanocajas lipídica-anticuerpo además contiene principio activo.

Por “principio activo” se entiende en la presente invención a un fármaco o a una molécula de origen biológico, por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos, y que son capaces de actuar bloqueando una reacción enzimática o afectar la biosíntesis de macro-moléculas por parte de la célula. Como principio activo se puede adicionar al sistema anterior, por ejemplo la actinomicina-D.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Control negativo del inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ficocianina.

Figura 2. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Control negativo del inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs-ficocianina.

Figura 3. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Control negativo del inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 4.

Figura 4. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 4-IgG frente a *Trypanosoma cruzi*.

Figura 5. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Control negativo del inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 25.

Figura 6. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 25-IgG frente a *Trypanosoma cruzi*.

Figura 7. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Control negativo del inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 1:1)-ficocianina-proteína A.

Figura 8. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 1:1)-ficocianina-proteína A-IgG frente a *Trypanosoma cruzi*.

Figura 9. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Control negativo del inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 2:3)-ficocianina-proteína A.

Figura 10. Micrografía tomada con microscopía láser confocal. Inmunofluoroensayo: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 2:3)-ficocianina-proteína A-IgG frente a *Trypanosoma cruzi*.

Figura 11. Tasa de supervivencia en los distintos ensayos de citotoxicidad: A.- Epimastigotes de *T. cruzi* tratados con Actinomicina D. ($0,05 \mu\text{g}$); B.- Epimastigotes de *T. cruzi* tratados con ISCOM-IgG frente a *T. cruzi* conteniendo un total de $2,88 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ de Actinomicina D; C.- Epimastigotes de *T. cruzi* tratados con ISCOM-IgG frente a *T. cruzi* conteniendo un total de $5,76 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ de Actinomicina D; D.- Epimastigotes de *T. cruzi* tratados con ISCOM-IgG frente a *T. cruzi* conteniendo un total de $11,52 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ de Actinomicina D.

Ejemplos

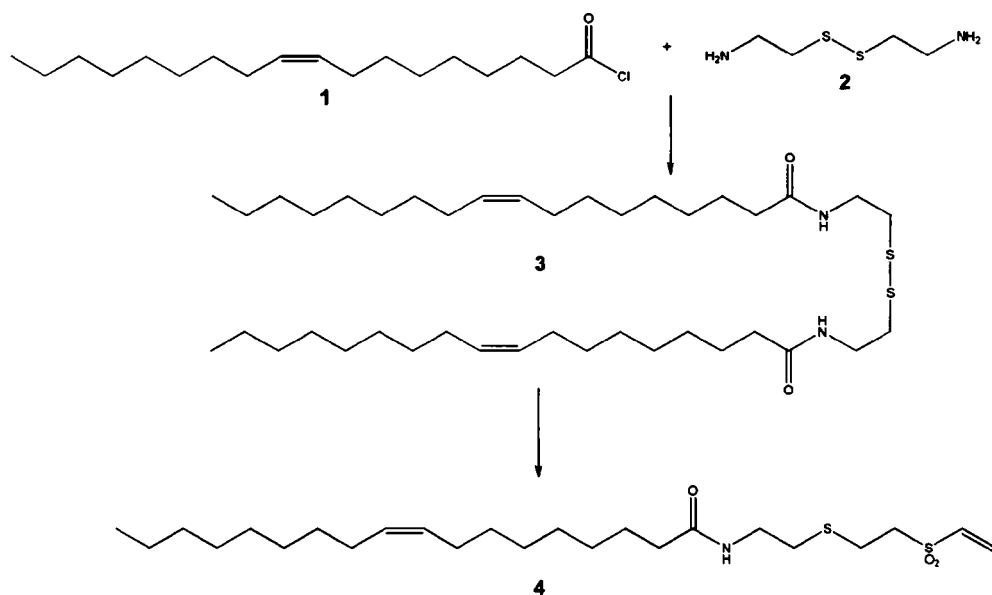
A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores,

Ejemplo 1

Síntesis de compuestos de fórmula general (II)

Ejemplo 1.1

Síntesis del derivado del ácido oleico 4



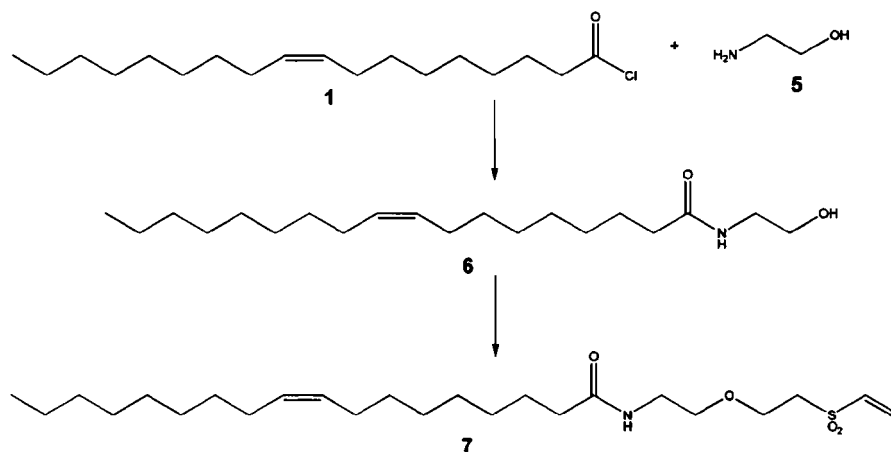
Compuesto 3: Una disolución de ácido oleico (850 mg, 3 mmol) en Cl_2SO (10 mL) se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro ($3 \times 15 \text{ mL}$). El crudo obtenido (1) se disolvió en Cl_2CH_2 anhidro (30 mL) y se añadió sobre una disolución de cistamina 2 (260 mg, 1,15 mmol) y Et_3N (0,98 mL, 6,9 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (30 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 15 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 2:1 $\rightarrow$ éter) obteniéndose 3 como un sólido (720 mg, 92%).

Compuesto 4: A una disolución de 3 (960 mg, 1,4 mmol) en AcOH (20 mL) se le añadió Zn (1,1 g, 17 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a 50°C durante 40 minutos. La disolución se dejó enfriar y se filtró sobre celita. Se adicionó Cl_2CH_2 (70 mL) y se lavó con H_2O ($2 \times 30 \text{ mL}$), NaHCO_3 sat ($2 \times 30 \text{ mL}$) y con H_2O (30 mL). La fracción orgánica secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo se disolvió en THF:isopropanol (2:1, 25 mL), al cual se le burbujó previamente Ar durante 5 minutos, y se le añadió divinilsulfona (DVS) ($809 \mu\text{L}$, 5,65 mmol) y Et_3N ($40 \mu\text{L}$, 0,28 mmol). La disolución resultante se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente y en atmósfera de Ar durante 1,5 horas. El disolvente se evaporó a

presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter) obteniéndose 4 como un sólido (890 mg, 69%).

Ejemplo 1.2

Síntesis del derivado del ácido oleico 7

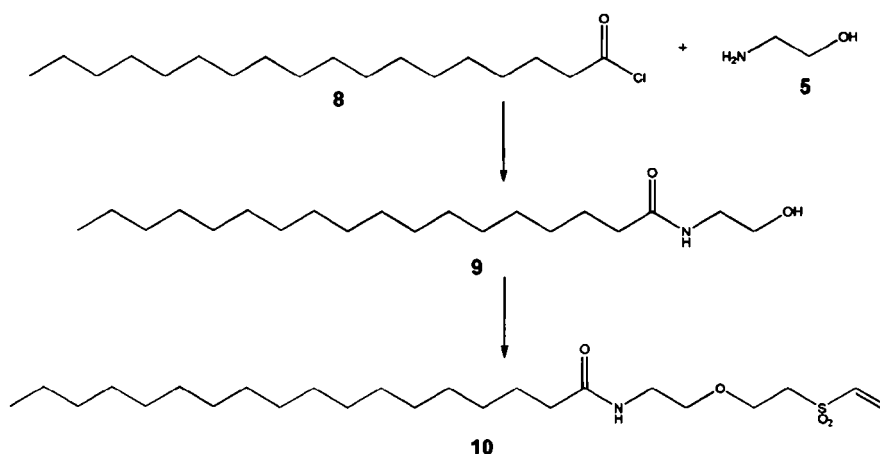


Compuesto 6: Una disolución de ácido oleico (1.9 g, 6.7 mmol) en Cl_2SO (15 mL) se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido (1) se disolvió en Cl_2CH_2 anhidro (50 mL) y se añadió sobre una disolución de 2-aminoetanol (0.608 mL, 10.1 mmol) y Et_3N (1.9 mL, 13.5 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (50 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt -hexano 2:1 $\rightarrow$ AcOEt) obteniéndose 6 como un sólido (1.93 g, 88%).

Compuesto 7: A una disolución de 6 (780 mg, 2.4 mmol) en THF (100 mL) se le añadió DVS (497 μL , 4.8 mmol) y t-BuOK (30 mg, 0.27 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt -hexano 2:1 $\rightarrow$ AcOEt) obteniéndose 7 como un sirope (538 mg, 51%).

Ejemplo 1.3

Síntesis del derivado del ácido esteárico 10



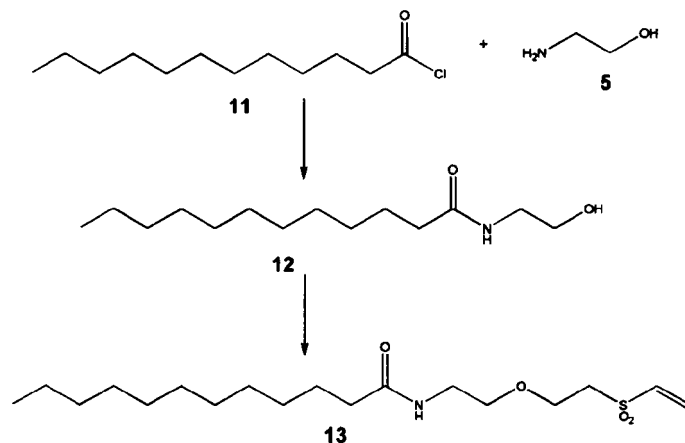
Compuesto 9: Una disolución de ácido esteárico (1.8 g, 6.3 mmol) en Cl_2SO (7 mL) se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido (8) se disolvió en THF anhidro (30 mL) y se añadió sobre una disolución de 2-aminoetanol (0.570 mL, 9.5 mmol) y Et_3N (1.8 mL, 12.7 mmol) en THF anhidro (30 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (Cl_2CH_2 -MeOH 15:1 $\rightarrow$ 5:1) obteniéndose 9 como un sólido (1.89 g, 91%).

ES 2 337 226 A1

Compuesto 10: A una disolución de 9 (480 mg, 1.5 mmol) en THF (100 mL) se le añadió DVS (310 μ L, 2.9 mmol) y t-BuOK (20 mg, 0.18 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 25 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt) obteniéndose 10 como un sólido (365 mg, 56%).

Ejemplo 1.4

Síntesis del derivado del ácido láurico 13



Compuesto 12: Una disolución de ácido láurico (2.7 g, 13.2 mmol) en Cl_2SO (10 mL) se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido (11) se disolvió en Cl_2CH_2 anhidro (30 mL) y se añadió sobre una disolución de 2-aminoetanol (1.2 mL, 19.8 mmol) y Et_3N (3.75 mL, 26.4 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (30 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt) obteniéndose 12 como un sólido (2.98 g, 93%).

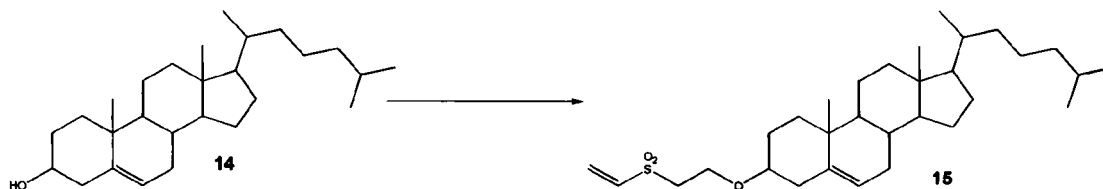
Compuesto 13: A una disolución de 12 (500 mg, 2.1 mmol) en THF (50 mL) se le añadió DVS (420 μ L, 4 mmol) y t-BuOK (23 mg, 0.2 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 25 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 2:1 $\rightarrow$ AcOEt) obteniéndose 13 como un sólido (394 mg, 53%).

Ejemplo 2

Síntesis de compuestos de fórmula general (III)

Ejemplo 2.1

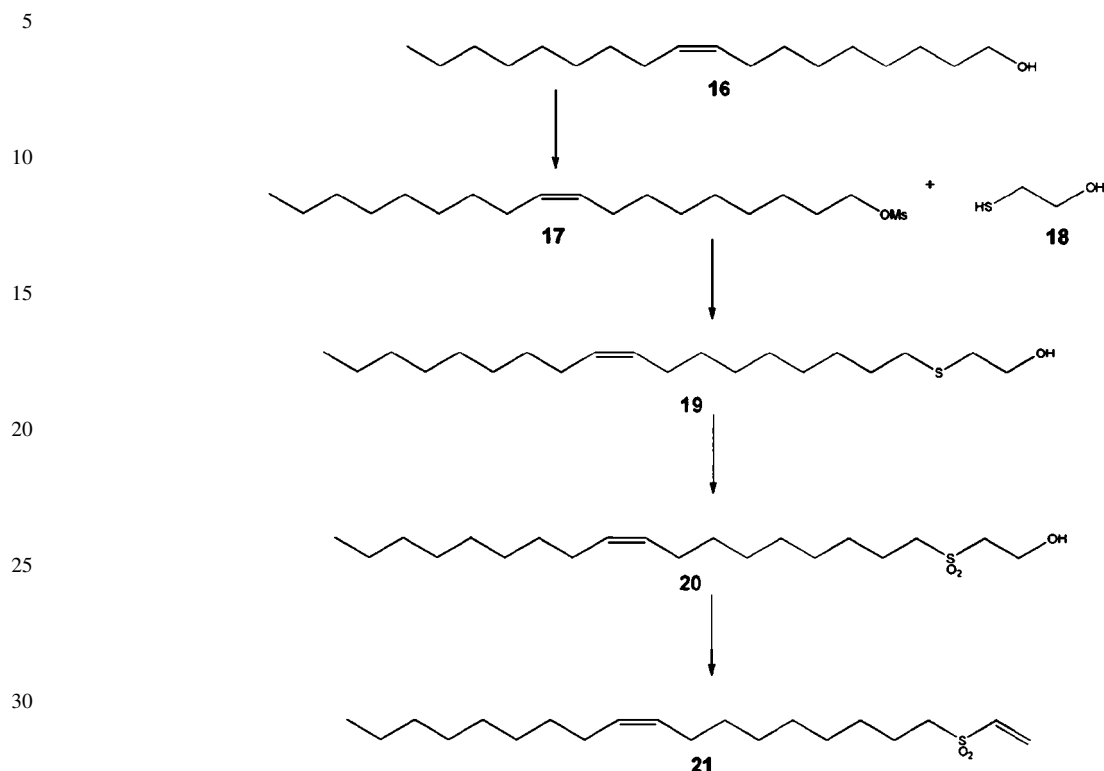
Síntesis del derivado de colesterol 15



Compuesto 15: A una disolución de colesterol 14 (300 mg, 0.77 mmol) en THF (20 mL) se le añadió DVS (0.12 mL, 1.16 mmol) y t-BuOK (9 mg, 0.077 mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se le adicionaron resinas ácidas (amberlita IR 120H) y se mantuvo bajo agitación a t.a durante 30 minutos. Las resinas se filtraron, el disolvente se evaporó a presión reducida y al crudo se le adicionó Ac_2O (8 mL) y piridina (4 mL) y se mantuvo a temperatura ambiente una noche. El Ac_2O y la piridina se eliminaron a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 1:2) obteniéndose 15 como un sólido (204 mg, 52%).

Ejemplo 3

Síntesis del compuesto 21



Compuesto 17: Una disolución de alcohol oleico (300 mg, 1.12 mmol) en 10 mL de THF se enfrió en un baño de hielo y se le adicionó Et₃N (0.47 mL, 3.35 mmol) y cloruro de mesilo (0.13 mL, 1.67 mmol). Tras 10 minutos el disolvente se evaporó en el rotavapor y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (hexano:éter 1:1) obteniéndose 17 como sirope (372 mg, 96%).

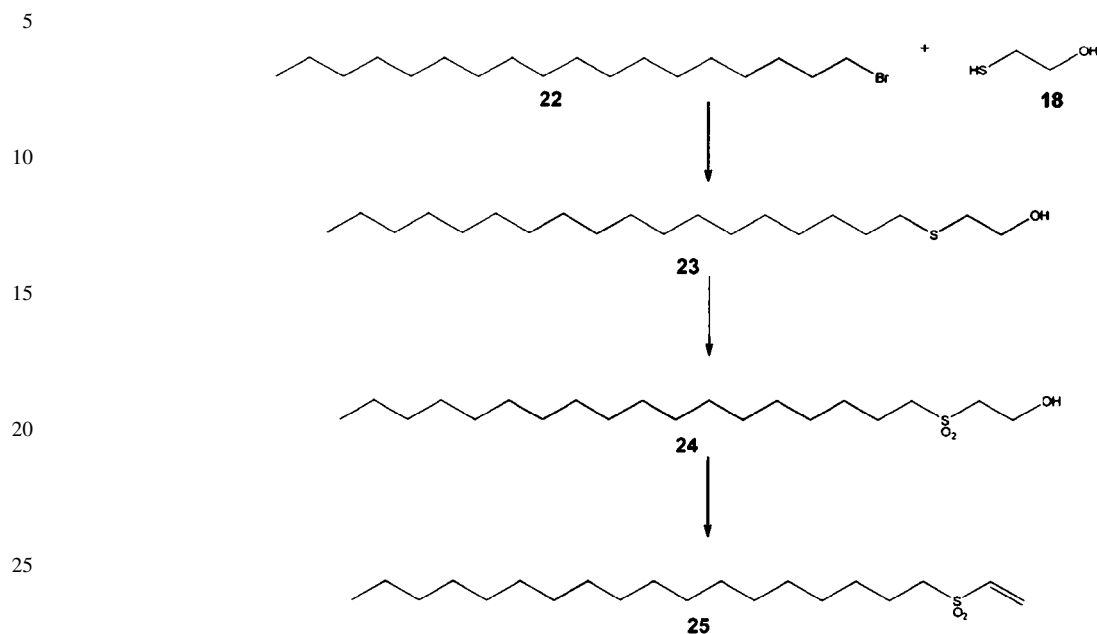
Compuesto 19: A una disolución de 2-tioetanol 18 (0.14 mL, 1.99 mmol) en 15 mL de CH₃CN se le pasó una corriente de argón y se le adicionó el compuesto 17 (347 mg, 1.01 mmol) y Cs₂CO₃ (652 mg, 2.00 mmol). La disolución se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (hexano:éter 1:1) obteniéndose 19 como un sirope (310 mg, 94%).

Compuesto 20: A una disolución del compuesto 19 (221 mg, 0.67 mmol) en 3.4 mL de AcOH se le adicionaron 1.3 mL de H₂O₂ 33%. El matraz se protegió de la luz y se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 7 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (hexano:AcOEt 1:1) obteniéndose 20 como un sirope (164 mg, 68%).

Compuesto 21: Una disolución del compuesto 20 (134 mg, 0.37 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ anhidro se enfrió en un baño de hielo y se le añadió Et₃N (0.32 mL, 2.24 mmol) y cloruro de mesilo (0.09 mL, 1.16 mmol). Se dejó que la disolución alcanzara la temperatura ambiente y se mantuvo bajo agitación magnética durante 6 horas. El disolvente se eliminó en el rotavapor y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (hexano:AcOEt 5:1) obteniéndose 21 como un líquido (102 mg, 80%).

Ejemplo 4

Síntesis del compuesto 25



30 Compuesto 23: A una disolución de 2-tioetanol 18 (200 mg, 2.56 mmol) en 30 mL de DMSO:THF (1:1) se le pasó una corriente de argón y se le adicionó el compuesto 22 (1.33 g, 3.84 mmol) y K_2CO_3 (531 mg, 3.84 mmol). La disolución se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas. La sal se filtró a vacío y el disolvente se eliminó a presión reducida. Al crudo se adicionaron 60 mL de agua y se extrajo con CH_2Cl_2 (2x60 mL). El extracto orgánico se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (hexano:éter 1:1) obteniéndose 23 como sólido (775 mg, 92%).

35 Compuesto 24: A una disolución del compuesto 23 (425 mg, 1.29 mmol) en 6.4 mL de AcOH se le adicionaron 2.6 mL de H_2O_2 33%. El matraz se protegió de la luz y se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (AcOEt) obteniéndose 24 como un sólido (397 mg, 85%).

40 Compuesto 25: Una disolución del compuesto 24 (173 mg, 0.48 mmol) en 10 mL de CH_2Cl_2 anhidro se enfrió en un baño de hielo y se le añadió Et_3N (0.2 mL, 1.42 mmol) y cloruro de mesilo (57 μ L, 0.73 mmol). Se dejó que la disolución alcanzara la temperatura ambiente y se mantuvo bajo agitación magnética durante 24 horas. El disolvente se eliminó en el rotavapor y el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna (hexano:éter 1:1) obteniéndose 25 como un sólido (133 mg, 81%).

Ejemplo 5

Lipidación de proteínas

Ejemplo 5.1

Lipidación de proteína A con los agentes de lipidación 4 y 25

50 Los compuestos 4 y 25 se solubilizan en metanol y tampón carbonato 0.125 M, pH 8 hasta alcanzar una concentración final de 20 mg/mL. Los compuestos se adicionan a una solución de proteína A (100 mg/mL) en una proporción 5:1. La disolución final se incubó 12 horas a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo se le añaden 20 μ L de tampón carbonato 0.125 M-glicina 1 M y se incubó 3 horas a 4°C.

Ejemplo 6

Incorporación de anticuerpos en la membrana de los ISCOMs y empleo en inmunomarcajes fluorescentes

5 a) *Preparación de ISCOMATRIX*

Se prepara una solución en 2 ml de agua destilada que contenga colesterol y fosfatidilcolina (1:1) a una concentración final de 15 mg/ml y 0.400 mg de Mega-10. Por otra parte se prepara una solución de Quil A a una concentración de 100 mg/ml. Una vez están preparadas las dos soluciones se toma la cantidad adecuada para obtener una proporción
10 1:1:5 de colesterol:fosfatidilcolina:Quil A en un volumen final de 12 mililitros. Se incuba una hora a temperatura ambiente y se concentra a un volumen de aproximadamente 1/5 del inicial. El concentrado se dializa durante 40 horas en PBS con cuatro cambios. Una vez se ha recogido el dializado se procede a purificar los ISCOMs formados mediante una centrifugación en gradiente de sacarosa a 50000 g durante 18 horas, y finalmente se vuelve a dializar.

15 b) *Unión de ficocianina a ISCOMs*

Tomamos 1 mL de una concentración de 1 mg/ml de ficocianina con 1 mg de ISCOMs liofilizados. La disolución final se incuba 12 horas a 4°C. Una vez incubados con la ficocianina fueron centrifugados a 50000 g durante 18 horas
20 a fin de eliminar la ficocianina no encapsulada.

c) *Incorporación de proteína A modificada con 4 y 25 a los ISCOMs con ficocianina*

25 Se mezcla en una proporción 1:3 (v/v) la solución que contiene los ISCOMs con ficocianina (20 µL) y la solución que contiene la proteína A modificada (60 µL de una concentración de 100 mg/mL). La disolución final se incuba 12 horas en agitación.

30 c) *Unión de IgG frente a Trypanosoma cruzi a ISCOMs con proteína A y ficocianina para inmunomarcaje*

Se mezcla la solución obtenida en el apartado anterior en proporción 1:3 con la IgG frente a *T. cruzi*. (457 µg/mL). La disolución resultante se incuba al menos 1 hora a 4°C en agitación.

35 d) *Ensayos de inmunofluorescencia directa*

A fin de comprobar la especificidad de la unión de los ISCOMs con el anticuerpo IgG frente a *Trypanosoma cruzi* a través de la proteína A modificada con los compuestos 4 y 25 se lleva a cabo un ensayo de inmunofluorescencia
40 directa y los resultados se observan mediante microscopía láser confocal.

1) *Preparación de los portaobjetos*

45 Los portaobjetos deben de estar limpios y libres de grasa, para lo cual se sumergen en acetona durante 24 horas y luego se dejan secar a temperatura ambiente.

2) *Preparación de las células*

50 Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* fueron cultivados en medio MTL suplementado con suero bovino fetal al 10% a 28°C durante 5 días.

55 3) *Protocolo de fijación de epimastigotes de Trypanosoma cruzi con formaldehído*

- Contar los parásitos en cámara de Neubauer. Se necesitan 1×10^8 parásitos totales.
- Centrifugar los parásitos a 1600 g durante 10 minutos a 4°C.
- 60 - Retirar el sobrenadante y resuspender en 10 mL de PBS.
- Lavar tres veces con PBS.
- 65 - Resuspender el botón de parásitos (1×10^8) en 1 mL de PBS.
- Añadir 1 mL de PBS al 4% de formaldehído para una concentración final de formaldehído del 2%.

ES 2 337 226 A1

- Leer la absorbancia de la mezcla de parásitos PBS con 2% de formaldehído.
- Dejar incubando toda la noche a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el botón de parásitos dos veces con PBS.
- Resuspender en PBS y ajustar la concentración de parásitos observando al microscopio de tal forma que en 10 μ L los parásitos estén separados.
- Agregar 10 μ L de la suspensión a cada pozo en los portaobjetos y dejar secar a temperatura ambiente.
- Guardar las placas a -20°C hasta el momento de su uso.

4) Procedimiento seguido para la inmunofluorescencia directa

- Añadir 10 μ L a cada pocillo de la muestra a ensayar.
 - a) Control con ficocianina purificada (figura 1).
 - b) Control con ISCOMs-ficocianina (figura 2).
 - c) Control con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 4 (figura 3).
 - d) ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 4-IgG frente a *Trypanosoma cruzi* (figura 4).
 - e) Control con ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 25 (figura 5).
 - f) ISCOMs-ficocianina-proteína A modificada con 25-IgG frente a *Trypanosoma cruzi* (figura 6).
- Poner los portas en la cámara húmeda e incubar durante 30 minutos a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$
- Retirar la cámara fría de la incubadora. También retirar el conjugado del almacenaje. Aclarar los pocillos con PBS durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante de PBS y repetir el lavado sin dejar que los pocillos se sequen.
- Añadir 2 ó 3 gotas de medio de montaje (glicerina tamponada) a cada porta y tapar con un cubreobjeto evitando que se formen burbujas.

Ejemplo 7

Obtención de ISCOMs funcionalizados con grupos vinilsulfona, incorporación de anticuerpos en la membrana de los ISCOMs y empleo en inmunomarcajes fluorescentes

a) Obtención de ISCOMs funcionalizados con grupo vinilsulfona a través del compuesto 15

Los ISCOMATRIX se preparan de la misma manera descrita anteriormente, pero se varía la composición del colesterol empleando distintas proporciones de colesterol: 15. Se prepara por una parte ISCOMATRIX con la formulación normal que va a servir de control positivo y por otra parte, manteniendo la concentración final de 15 mg/ml de colesterol, 15 y fosfatidilcolina, vamos a variar la composición usando 1:1 colesterol: 15 y 3:2 colesterol: 15.

b) Unión de proteína A a ISCOMs obtenidos con el compuesto 15

A los ISCOMs funcionalizados obtenidos en la etapa anterior se adicionan 10 ó 20 μ L de disolución de proteína A (100 mg/mL). La disolución final se incuba 12 horas a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo se le añaden 20 μ L de tampón carbonato 0.125 M-glicina 1 M y se incuban 2-3 horas más a 4°C.

c) Incorporación de ficocianina

Tomamos 1 mL de una solución de 1 mg/ml de ficocianina con 1 mg de ISCOMs-proteína A liofilizados. La disolución final se incuba 12 horas a 4°C. Una vez incubados con la ficocianina fueron centrifugados a 50000 g durante 18 horas a fin de eliminar la ficocianina no encapsulada.

c) *Unión de IgG frente a Trypanosoma cruzi a ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 y ficocianina para inmunomarcaje*

Se mezcla la solución obtenida en el apartado anterior en proporción 1:3 con la IgG frente a *T. cruzi*. La disolución resultante se incuba al menos 1 hora a 4°C en agitación.

d) *Ensayos de inmunofluorescencia directa*

A fin de comprobar la especificidad de la unión de los ISCOMs con el anticuerpo IgG frente a *Trypanosoma cruzi* a través de la proteína A unida covalentemente a la estructura de los ISCOMs aprovechando la reactividad de los grupos vinilsulfona incorporados mediante el compuesto 15 se lleva a cabo un ensayo de inmunofluorescencia directa y los resultados se observan mediante microscopía láser confocal. El protocolo seguido es el mismo descrito anteriormente y en este caso las muestras ensayadas son:

- a) Control con ficocianina purificada (figura 1).
- b) Control con ISCOMs-ficocianina (figura 2).
- c) Control con ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 1:1)- ficocianina-proteína A (figura 7).
- d) ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 1:1)-ficocianina- proteína A-IgG frente a *Trypanosoma cruzi* (figura 8).
- e) Control con ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 2:3)- ficocianina-proteína A (figura 9).
- f) ISCOMs obtenidos con el compuesto 15 (proporción 2:3)-ficocianina- proteína A-IgG frente a *Trypanosoma cruzi* (figura 10).

Ejemplo 8

Empleo de ISCOMs en el desarrollo de sistemas de transporte dirigido de fármacos

a) *Preparación de ISCOMs con actinomicina-D*

Se prepara una disolución en 2 ml de agua destilada que contiene colesterol y fosfatidilcolina (1:1) a una concentración final de 15 mg/ml además de 0.400 mg de Mega-10. Por otra parte se prepara una solución de Quil A, a una concentración de 100 mg/ml. Una vez preparadas ambas disoluciones se toma la cantidad adecuada de cada una de ellas para obtener una proporción 1:1:5 de colesterol:fosfatidilcolina:Quil A en un volumen final de 10 mL y se adicionan 2 mL de una solución stock de Actinomicina D (5 mg/ml). Se incuba una hora a temperatura ambiente y se concentra en un concentrador de proteínas hasta 1/5 del volumen inicial. Dializar durante 40 horas en PBS con cuatro cambios. Una vez se ha recogido el dializado se procede a purificar los ISCOMs formados mediante una centrifugación en gradiente de sacarosa a 50000 g durante 18 horas. Finalmente se procede de nuevo a dializar.

b) *Incorporación de proteína A modificada con 4 a los ISCOMs-actinomicina D*

A 20 µL de la solución de ISCOMs-actinomicina-D se le añaden 60 µL de la solución de proteína A modificada con 4. La solución final se incuba 12 horas en agitación.

c) *Unión de IgG frente a Trypanosoma cruzi a ISCOMs-actinomicina-D con proteína A modificada con 4*

A 30 µL de la solución de ISCOMs-actinomicina-D-proteína A modificada con 4 se le añaden 90 µL de IgG frente a *Trypanosoma cruzi* (457 mg/mL). La solución final se incuba al menos 1 hora a 4°C con agitación.

d) *Cálculo de la concentración de actinomicina-D en los ISCOMs*

La concentración de antibiótico atrapado en las nanopartículas (ISCOM- actinomicina D-IgG → 0.192 mg/mL de suspensión) se determinó espectrofotométricamente.

e) *Ensayo de citotoxicidad*

Para poder determinar la supervivencia de los Trypanosomas tras el tratamiento con los ISCOMs cargados de Actinomicina D y ligados en superficie con los anticuerpos frente al parásito usamos el kit CytoTox 96 Non-Radiactive Cytotoxicity Assay (promega) capaz de medir la liberación al medio del enzima lactato deshidrogenasa presente en el citoplasma de células intactas. Para ello se ajustó el numero de organismos (epimastigotes de *T. cruzi*) a $1 \times 10^{-5}/100 \mu\text{l}$ en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de fondo plano y se le añadió a cada uno de dichos pocillo una suspensión de ISCOMs cargados de Actinomicina D de 5, 15 y $30 \mu\text{l}$. El tiempo de interacción fue de 24 horas. Tras lo cual se determino la citotoxicidad en cada pocillo de una forma colorimétrica a 490 nm en un lector de placas. Cada una de los diferentes ensayos se llevó a cabo por triplicado. Para ello y siguiendo las instrucciones del Kit a cada uno de los pocillos se le añaden $15 \mu\text{l}$ de una solución de lisis y se incuba en estufa de CO_2 a 28°C durante 45 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga a 250 g durante 4 minutos. Se toman $50 \mu\text{l}$ del sobrenadante y se transfieren a otro pocillo de la placa donde además se le agregará $50 \mu\text{l}$ del sustrato, incubándose 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A fin de frenar la reacción enzimático del kit se añaden $50 \mu\text{l}$ de la solución de parada. Las placas como se indicó anteriormente fueron leídas en un lector de placas de ELISA a 490 nm (figura 11).

20

25

30

35

40

45

50

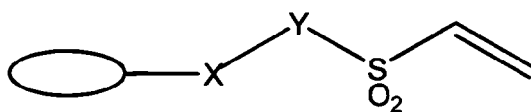
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



donde:

Y es un grupo $-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{R}^1-$ o $-\text{CH}_2-$;

R^1 es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo (C_1-C_{10}), un alquenilo (C_1-C_{10}), un alquinilo (C_1-C_{10}), un dialquilarilo (C_1-C_{10}) $\text{Ar}(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ o un grupo $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$;

n toma valores de 1 a 20;

X es un grupo $-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}^2-\text{Z}-\text{CH}_2-$, $-\text{Z}-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2-$;

Z es S ó O;

R^2 es un radical seleccionado del grupo que comprende un alquilo (C_1-C_{10}), un alquenilo (C_1-C_{10}), un alquinilo (C_1-C_{10}), un dialquilarilo (C_1-C_{10}) $\text{Ar}(\text{C}_1-\text{C}_{10})$ ó un grupo $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$;

m toma valores de 1 a 20; y

representa un lípido.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde el lípido es un estero.

3. Compuesto según la reivindicación 2, donde el estero se selecciona de la lista que comprende colesterol, epicolesterol, estigmasterol, lanosterol, ergosterol y coprostenol.

4. Compuesto según la reivindicación 3, donde el estero es colesterol.

5. Compuesto según la reivindicación 1, donde el lípido es un hidrocarburo alifático (C_4-C_{30}) saturado.

6. Compuesto según la reivindicación 1, donde el lípido es hidrocarburo alifático (C_4-C_{30}) insaturado.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, donde el lípido es hidrocarburo alifático ($\text{C}_{10}-\text{C}_{20}$).

8. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 7, donde X es un grupo $-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}^2-\text{Z}-\text{CH}_2-$ y Z se ha definido en la reivindicación 1.

9. Compuesto según la reivindicación 8 donde R^2 es un grupo alquilo (C_2-C_5).

10. Compuesto según la reivindicación 9 donde R^2 es un grupo etilo.

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde X es el grupo $-\text{Z}-\text{CH}_2-$ y Z se ha definido en la reivindicación 1.

12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde Z es O.

13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde Z es S.

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde X es $-\text{CH}_2-$.

15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el grupo Y es $-\text{CH}_2-$.

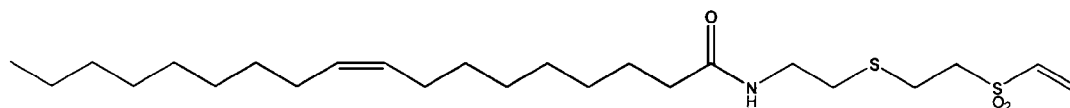
16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde R^1 es un grupo $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ y n toma valores de entre 1 a 10.

ES 2 337 226 A1

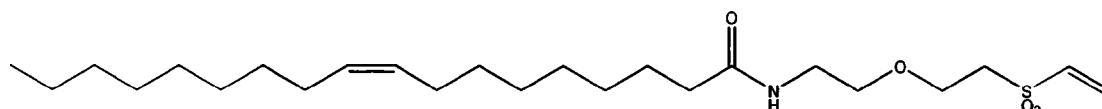
17. Compuesto según la reivindicación 16, donde n toma valores de entre 2 a 5.

18. Compuesto según la reivindicación 17, donde n es 2.

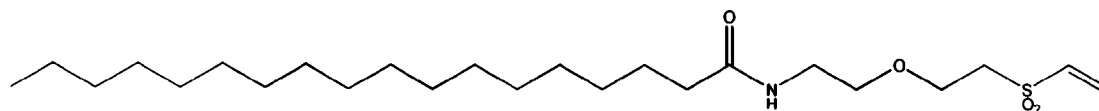
19. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



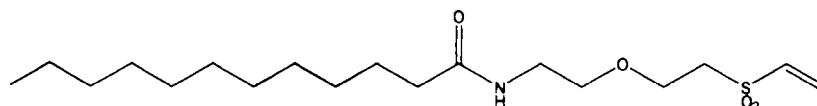
20. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



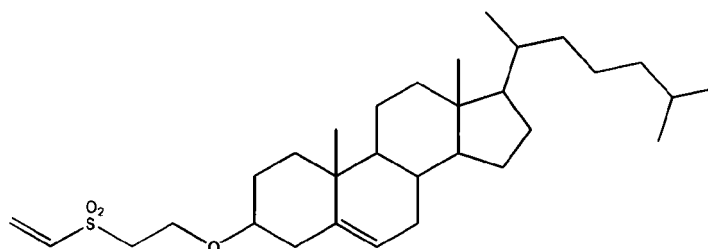
21. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:



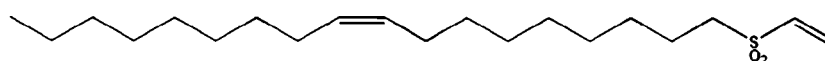
22. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:



23. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:

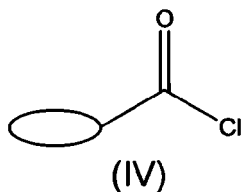


24. Compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:



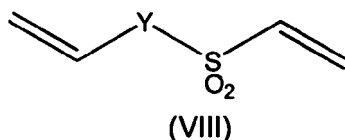
25. Método de obtención de los compuestos de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:

- a) reacción de una amina de fórmula general H_2N-R^2-ZH con un cloruro de ácido de fórmula general (IV).



donde: , Z y R^2 se han definido en la reivindicación 1.

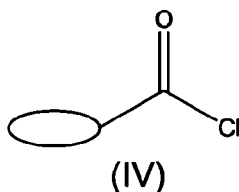
- b) Reacción del compuesto obtenido en el paso (a) con una bis-vinilsulfona de fórmula general (VIII):



donde: Y se ha definido en la reivindicación 1.

26. Método de obtención de los compuestos de fórmula general (I), según la reivindicación 13, que comprende:

- a) reacción de una diamina de fórmula general $H_2N-R^2-S-S-R^2-NH_2$ con un cloruro de ácido de fórmula general (IV):



Donde; y R^2 se han definido en la reivindicación 1.

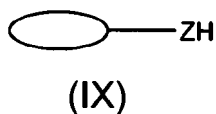
- b) reducción del puente disulfuro del compuesto obtenido en el paso (a).
c) reacción del compuesto obtenido en el paso (b) con una bis-vinilsulfona de fórmula general (VIII) descrita en la reivindicación 25.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, donde R^2 es un grupo alquilo C_2-C_5 .

28. Método según la reivindicación 27 donde R^2 es un grupo etilo.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, donde Y es el grupo $-CH_2-SO_2-R^1-$ y R^1 está definido en la reivindicación 1.

30. Método de obtención de los compuestos de fórmula general (I) según la reivindicación 11, que comprende la reacción de un compuesto de fórmula general (IX) con una bis-vinilsulfona de fórmula (VIII), descrita en la reivindicación 25:



Donde;  y Z se han definido en la reivindicación 1.

31. Método según la reivindicación 30 donde Y es el grupo $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{R}^1-$ y R^1 está definido en la reivindicación 1.

32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28 o 30, donde la bis-vinilsulfona de fórmula (VIII) es divinilsulfona.

33. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 como agente de lipidación.

34. Uso del compuesto según la reivindicación 33, para la lipidación de biomoléculas.

35. Uso del compuesto según la reivindicación 34 donde las biomoléculas son proteínas.

36. Uso del compuesto según la reivindicación 35 donde la proteína es la proteína A o la proteína G.

37. Bioconjugado covalente que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 y una biomolécula.

38. Bioconjugado según la reivindicación 37, donde la biomolécula es una proteína.

39. Bioconjugado según la reivindicación anterior, donde la proteína es la proteína A o la proteína G.

40. Sistema que comprende el bioconjugado según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39 incorporado en la membrana de una nanocaja.

41. Sistema según la reivindicación 40, donde la nanocaja es un ISCOM.

42. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 40 o 41, que además comprende un anticuerpo unido a la nanocaja a través de la biomolécula.

43. Complejo no covalente que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-24 incorporados a la estructura de una nanocaja.

44. Complejo según la reivindicación 43, donde la nanocaja es un ISCOM.

45. Uso de un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 43 o 44, para la unión de biomoléculas mediante los grupos vinilsulfona.

46. Uso del complejo según la reivindicación 45 donde las biomoléculas son proteínas.

47. Uso del complejo según la reivindicación 46 donde la proteína es proteína A o proteína G.

48. Sistema que comprende el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 43 o 44, y una biomolécula unida covalentemente a través de los grupos vinilsulfona.

49. Sistema según la reivindicación 48 donde la biomolécula es una proteína.

50. Sistema según la reivindicación 49 donde la biomolécula es la proteína A o la proteína G.

51. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 48 a 50, que además comprende un anticuerpo unido a la nanocaja a través de la biomolécula.

52. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42 ó 48 a 50, donde la nanocaja además contienen una molécula fluorescente.

ES 2 337 226 A1

53. Sistema según la reivindicación 52, donde la molécula fluorescente es ficocianina.

54. Uso del sistema según cualquiera de las reivindicaciones 52 o 53, para inmunomarcaje fluorescente.

5 55. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42 ó 48 a 50, que además comprende la incorporación de un principio activo.

56. Sistema según la reivindicación 55, donde el principio activo es actinomicida D.

10 57. Uso de los sistemas según cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56 en la elaboración de una composición farmacéutica.

58. Uso de los sistemas según cualquiera de las reivindicaciones 55 ó 56, para el transporte dirigido de fármacos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

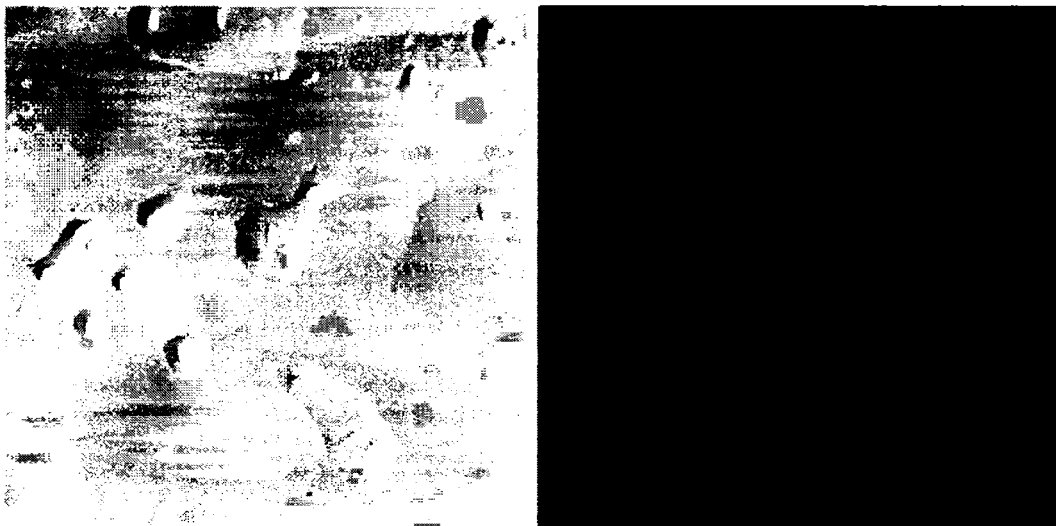


FIG.1

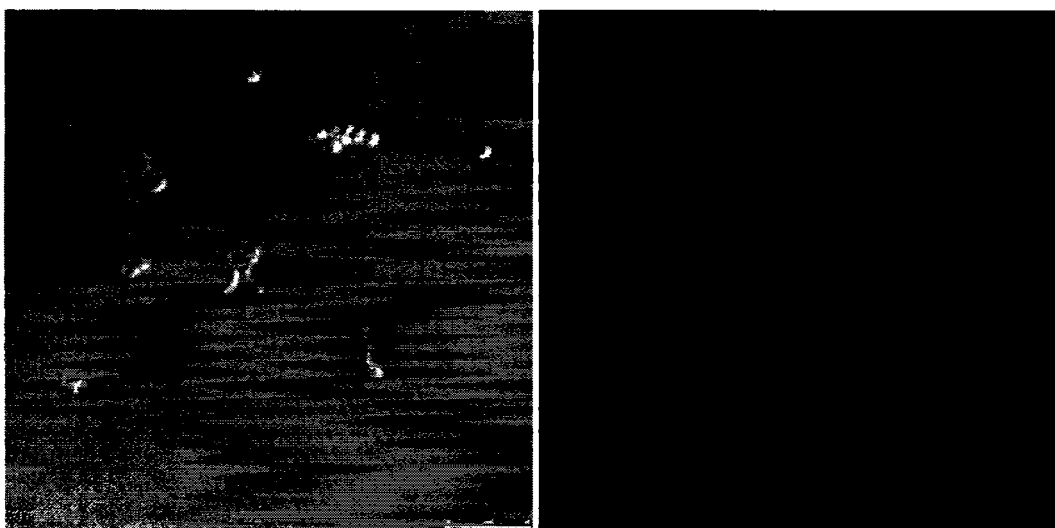


FIG.2

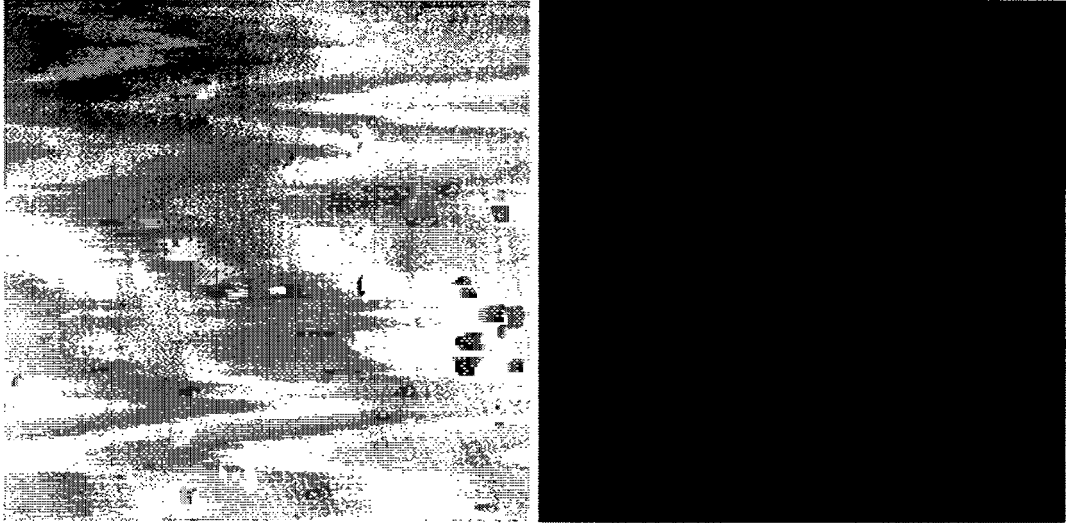


FIG. 3

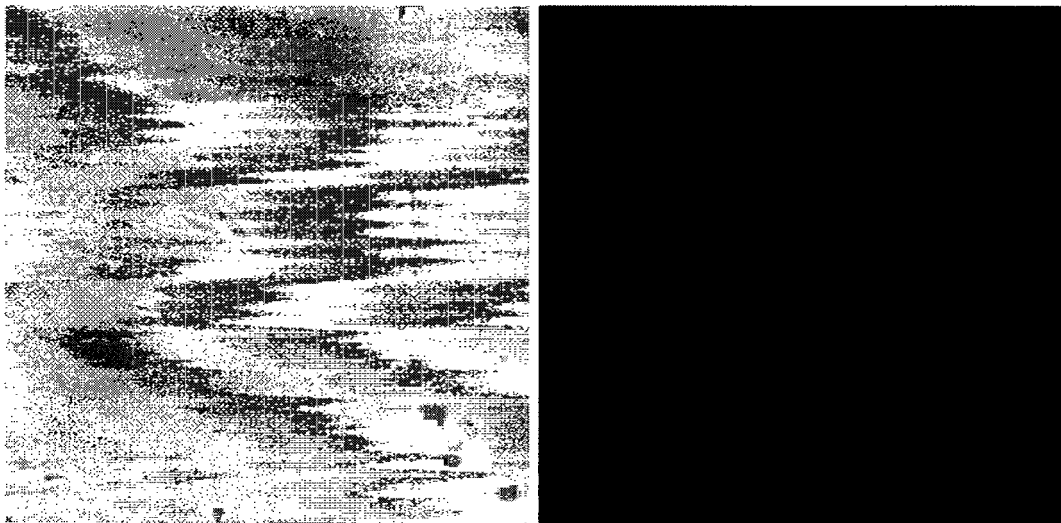


FIG. 4



FIG. 5

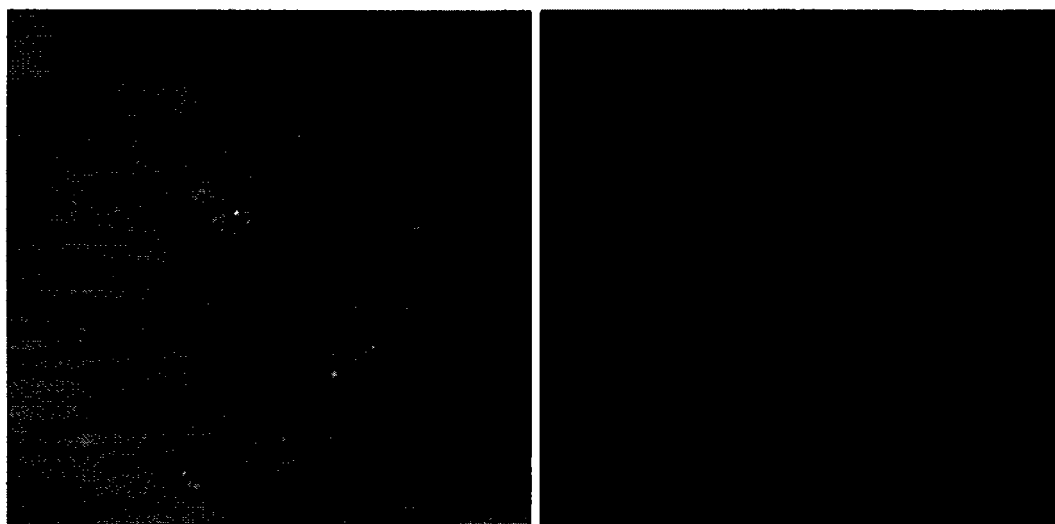


FIG. 6

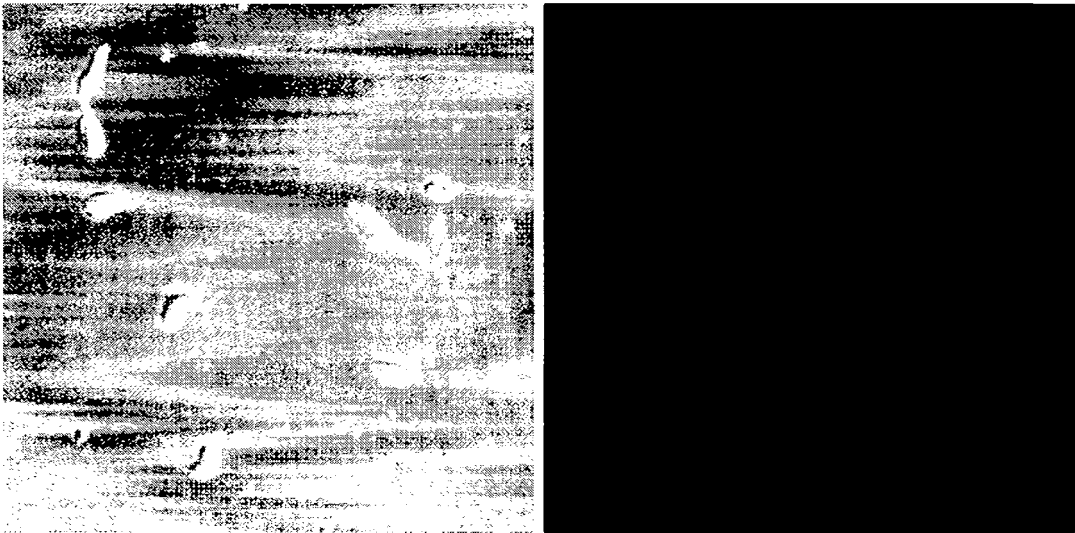


FIG. 7

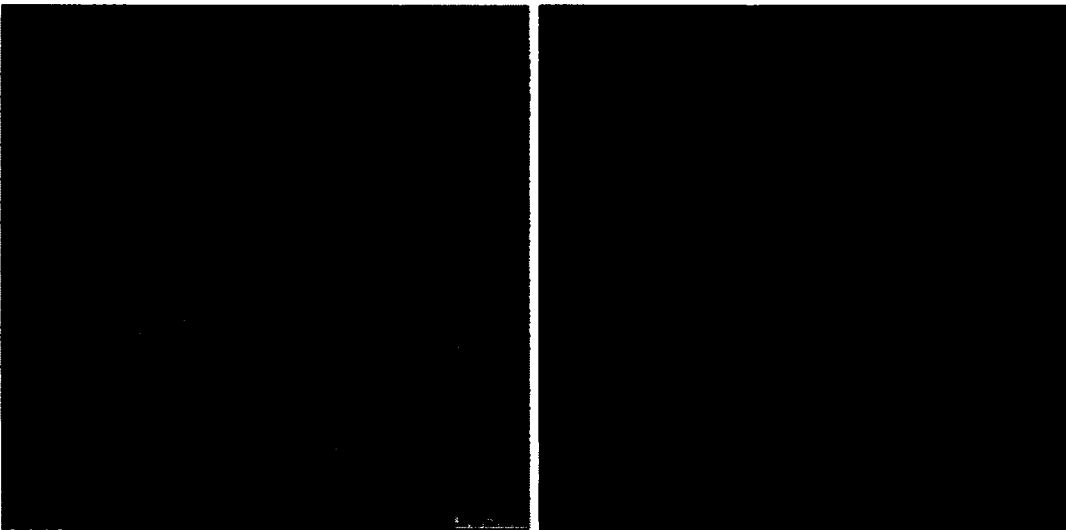


FIG. 8

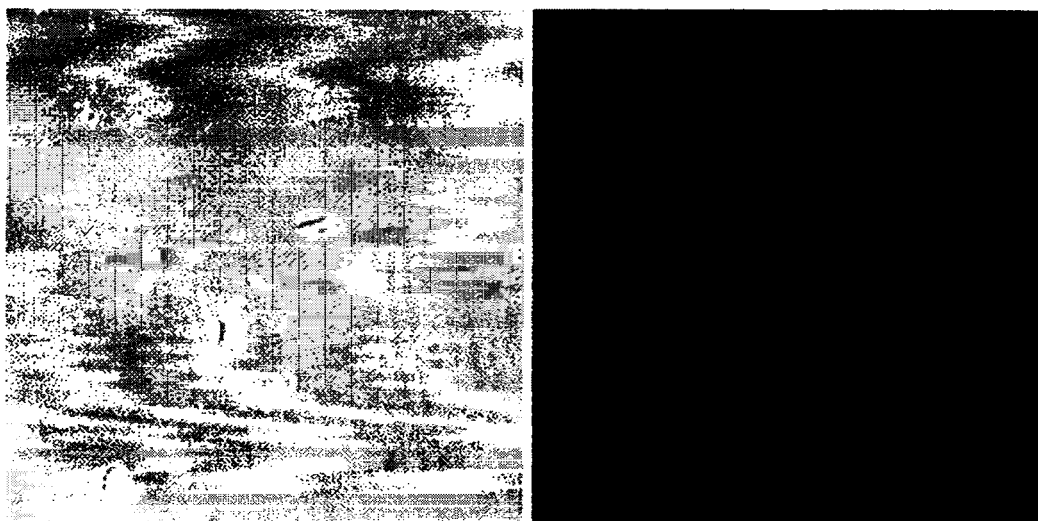


FIG. 9

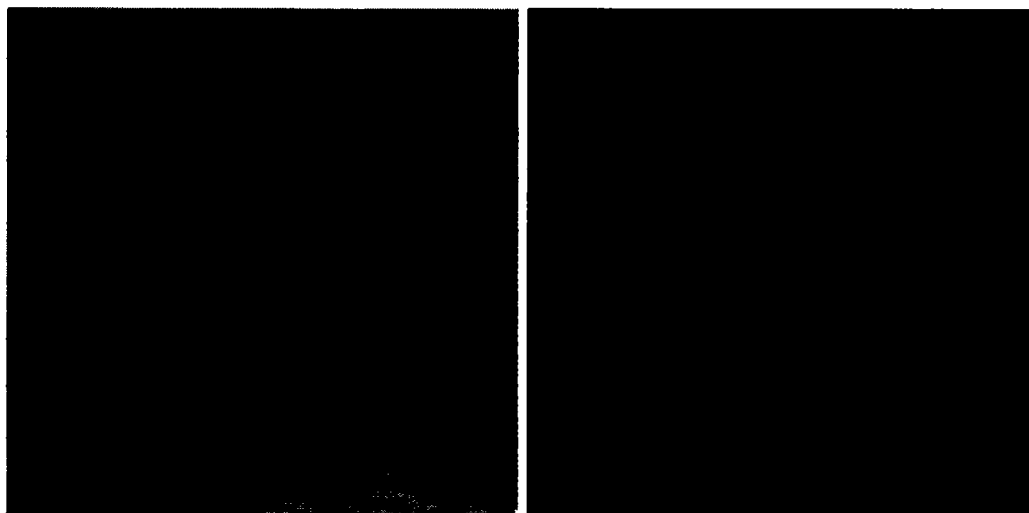


FIG. 10

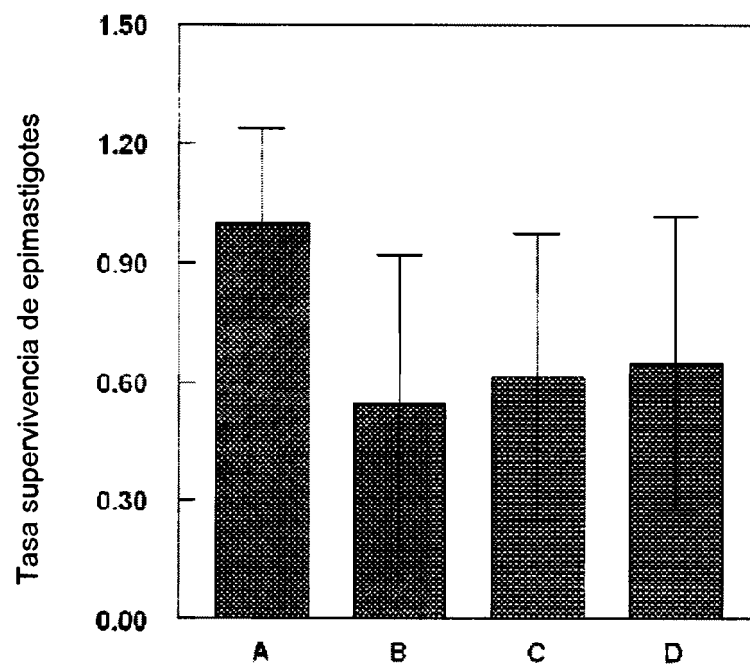


FIG. 11



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 337 226

⑫ Nº de solicitud: 200902389

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2009

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2002049676 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 27.06.2002, página 1, líneas 4-9; página 40, línea 7 - página 41, línea 18; página 37, líneas 22-25; página 38, líneas 13-27; página 89, ejemplo 56; página 6, líneas 17-28.	1-18,25-58
X	WO 2008156327 A2 (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 24.12.2008, página 3, párrafo [16]; página 5, párrafo [23]; página 11, tabla 1.	1-18,25-58
X	FR 2912410 A1 (SPECIFIC POLYMERS) 15.08.2008, página 4, líneas 8-15; página 5, párrafo [013].	1-18
X	US 5414135 A1 (SNOW, R.A. & LADD, D.L.) 09.05.1995, columna 7, línea 51 - columna 8, línea 11; columna 5, líneas 19-34; columna 7, líneas 14-42; columna 4, líneas 60-64; columna 9, línea 64 - columna 10, línea 34.	1-18,25-58
A	MOREIN, B. & LÖVGREN BENGTSSON, K: "Immunomodulation by Iscoms, Immune Stimulating Complexes". Methods 1999, Volumen 19, páginas 94-102. Ver especialmente páginas 94-95, apartado 1; página 102, columna 1.	40-44
A	SUN, H.-X. et al. "ISCOMs and ISCOMATRIX™". Vaccine 2009, Volumen 27, páginas 4388-4401. [Disponible en línea el 28.05.2009]. Ver especialmente página 4388, resumen; página 4389, apartado 2.	40-44
A	WO 2001005999 A1 (NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS, INC.) 25.01.2001, página 7, líneas 7-15; página 14, líneas 11-19.	52-54

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.03.2010

Examinador

G. Esteban García

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 317/08 (2006.01)

C07C 315/04 (2006.01)

A61K 31/10 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

C07C 317/18 (2006.01)

C07C 317/38 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K, B82B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, WPI, TXTE,REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS,NPL, XPESP,EMBASE, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	11-29,36,39,41,42,44,47,50-54,56	SÍ
	Reivindicaciones	1-10,30-35,37,38,40,43,45,46,48,49,55,57,58	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	19-24	SÍ
	Reivindicaciones	1-18,25-58	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2002/049676 A2	27-06-2002
D02	WO 2008/156327 A2	24-12-2008
D03	FR 2912410 A1	15-08-2008
D04	US 5414135 A1	09-05-1995

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un compuesto de fórmula general (I) derivado de un lípido funcionalizado con vinilsulfona, un método de obtención del mismo y su uso como agente de lipidación; un bioconjugado covalente que comprende un compuesto de fórmula (I) y una biomolécula, y un sistema que comprende el bioconjugado incorporado en la membrana de una nanocaja; un complejo no covalente que comprende un compuesto de fórmula (I) incorporado a la estructura de una nanocaja, el uso de dicho complejo para la unión de biomoléculas, un sistema que comprende el complejo y una biomolécula unida covalentemente, el uso de dicho sistema para inmunomarcaje fluorescente, para la elaboración de un medicamento y para el transporte de fármacos.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga un agente complejante que se incluye en una composición que contiene además un polímero y un agente terapéutico, de forma que el polímero interacciona con el agente complejante por medio de una unión huésped-hospedador (guest-host) y/o hospedador-huésped para formar un complejo de inclusión, siendo útil para el transporte de fármacos (ver página 1, líneas 4-9). El agente complejante puede representarse de forma esquemática mediante la fórmula: huésped/hospedador-(CH₂)_n-J_a-PEG_x-L_b-(grupo funcional)_y (ver página 40, línea 7-página 41, línea 18), donde la funcionalidad huésped/hospedador puede ser colesterol o adamantilo, **J** es un grupo tipo amida [-C(=O)NH-(CH₂)_d- ó -NHC(=O)-(CH₂)_d-], **PEG** es un polietilenglicol (CH₂CH₂O)₂₋₅₀₀, **L** puede ser un grupo vinilsulfona (SO₂-CH=CH₂), siendo **a** = **b** = **x** = **y** = 0 ó 1, **n** y **d** variando entre 0 y 6. El grupo funcional que aparece en la fórmula anterior es un ligando, un grupo hidrofílico o hidrofóbico o un agente terapéutico adicional que añade valor a la composición (ver página 37, líneas 22-25), como pueden ser señales de localización nuclear, péptidos o polímeros de liberación endosomal y agentes de permeabilización de membrana (ver página 38, líneas 13-27). Entre los numerosos ejemplos que se divulgan en el documento se encuentra un agente complejante que comprende una proteína, como es la transferrina, que se une a través de grupos lisina terminales a la funcionalidad vinilsulfona introducida previamente (ver página 89, ejemplo 56).

El documento divulga también complejos de inclusión derivados de dichos agentes complejantes, que son compuestos moleculares con características de un aducto, en los cuales una molécula hospedadora, en el presente caso compuestos del tipo de carcerandos, cavitandos, criptandos, calixerandos, etc, incluye al menos una parte de la molécula huésped (ver página 6, líneas 17-28).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-10, 30, 32 – 35, 37, 38, 40, 43, 45, 46, 48, 49, 55, 57, 58** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga un lípido que presenta un grupo funcional que se une covalentemente a una proteína del pelo o de la superficie de la piel (página 3, párrafo [14]), siendo la porción lipídica colesterol, un ácido graso o alcohol graso de 6 a 22 átomos de carbono o ácido 18-metileicosanoico (página 3, párrafo [16]), y vinilsulfona uno de los grupos funcionales preferidos (página 5, párrafo [23]). En concreto, el documento divulga los compuestos laurilvinilsulfona, estearilvinilsulfona y behenilvinilsulfona (ver página 11, tabla 1), que comprenden cadenas alifáticas de 12, 18 y 22 átomos de carbono, respectivamente, y que se engloban en la fórmula general (I) de la invención, siendo **X** = **Y** = CH₂, y el resto denominado "lípido" en la solicitud un hidrocarburo alifático de 10, 16 y 20 átomos de carbono, en cada uno de los tres compuestos divulgados.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 5, 7, 14, 15, 33-35** no es nuevo según lo divulgado en el documento D02.

Hoja adicional

El documento D03 divulga un compuesto de fórmula general $\text{CH}_2=\text{CH}[\text{CH}_2]_r\text{-SO}_2\text{-Z}$, donde **Z** puede ser, entre otras posibilidades, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 22 átomos de carbono, y **r** varía de 0 a 10. Esta fórmula general solapa con la fórmula general (I) de la invención cuando **r** es 0 y **Z** es un grupo alquilo de 3 ó más átomos de carbono, siendo en el compuesto de la invención **X** = **Y** = CH_2 y el "lípidio" un grupo alquilo de 1 a 20 átomos de carbono (ver página 4, líneas 8-15). En concreto, se divulgan explícitamente diversas vinilsulfonas, como son butilvinilsulfona, pentilvinilsulfona, hexilvinilsulfona, heptilvinilsulfona, octilvinilsulfona, nonilvinilsulfona, decilvinilsulfona, undecilvinilsulfona y dodecilvinilsulfona (ver página 5, párrafo [013]).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 5, 7, 14, 15** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D03.

Por lo tanto, se considera que el conjunto de las reivindicaciones **1-10, 30-35, 37, 38, 40, 43, 45, 46, 48, 49, 55, 57, 58** no presenta novedad según lo divulgado en el estado de la técnica.

Actividad inventiva (Artículo 8.1 de la Ley de Patentes):

El documento D04 divulga un compuesto derivado de vinilsulfona de fórmula general $\text{R}_4\text{-O-(PAO)-E-SO}_2\text{-A-B-C(R}_2\text{)=CH}_2$, en el que **PAO** un óxido de polialquileno con un peso molecular de 250 a 200.000 Dalton; **R₄** un grupo alquilo de 1 a 8 átomos de carbono; **E** un grupo alquileo de 1 a 8 átomos de carbono o un grupo alquilenilo de 2 a 8 átomos de carbono, entre otras posibilidades; **A** un grupo arileno o aralquileo de 6 a 8 átomos de carbono o un grupo alquileo de 1 a 8 carbonos que puede contener heteroátomos; **B** un átomo de azufre o un grupo sulfona; siendo **R₂** hidrógeno y **a** y **b**, 0 ó 1 (ver columna 7, línea 51-columna 8, línea 11). Estos compuestos se preparan por reacción del grupo hidroxilo libre del esqueleto de óxido de polialquileno con un reactivo que contiene la funcionalidad vinilsulfona (ver columna 5, líneas 19-34; columna 7, líneas 14-42).

Los compuestos divulgados en este documento tienen aplicación como reactivos para la modificación de proteínas, que serán útiles como agentes farmacéuticos y medicamentos (ver columna 4, líneas 60-64). De esta forma, la unión de un polipéptido o proteína a estos compuestos de óxido polialquileno a través del grupo sulfona de los mismos y de un átomo de azufre o nitrógeno presente en un grupo terminal de la proteína da lugar a los correspondientes aductos (ver columna 9, línea 64-columna 10, línea 34).

Los compuestos divulgados en el documento D04 presentan los mismos grupos funcionales que los de la invención. En los dos casos se trata de cadenas que, principalmente, alternan grupos alquílicos y polialcoxilo, presentando una vinilsulfona terminal sobre la que se produce la unión con la proteína. Aunque la fórmula general de la invención no se encuentra explícitamente recogida en este documento, se considera que algunas de las posibilidades que se engloban en ella constituyen tan sólo alternativas evidentes a la que el experto en la materia llegaría en el ejercicio de su actividad rutinaria, más aún teniendo en cuenta que la aplicación de los compuestos de la invención es la misma que la de los productos divulgados en D04, es decir, la modificación de proteínas, y ésta viene dada, en ambos casos, por la presencia del grupo funcional vinilsulfona.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 5-7, 11-18, 30-35, 37, 38** no presenta actividad inventiva a la luz de lo divulgado en el documento D04.

Por otro lado, el resto de las reivindicaciones se refieren, además de a ciertas alternativas respecto al procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula molecular (I), a diversas aplicaciones de dichos compuestos para la formación y el uso de bioconjugados y complejos derivados de los mismos. Puesto que dicha fórmula general (I) engloba un gran número de compuestos y, sin embargo, en la descripción sólo se recogen datos experimentales para un número reducido de ellos, que son los compuestos objeto de las reivindicaciones 19-24, no es posible reconocer actividad inventiva para dichas reivindicaciones 11-29, 36, 39, 41, 42, 44, 47, 50-54 y 56, ya que constituyen generalizaciones que, en algunos casos se encuentran divulgadas en el estado de la técnica y, en otros, no cuentan con los datos experimentales adecuados en descripción.

Por lo tanto, se considera que el conjunto de las reivindicaciones **11-29, 36, 39, 41, 42, 44, 47, 50-54 y 56** no cumple los requisitos de actividad inventiva respecto a lo divulgado en el estado de la técnica, según lo establecido en el Artículo 8.1 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, sí podría reconocerse novedad y actividad inventiva a los compuestos recogidos en las reivindicaciones 19-24, ya mencionados, así como al procedimiento de obtención de los mismos, su uso como agentes de lipidación, los bioconjugados, complejos y sistemas derivados de ellos, y las diferentes aplicaciones de éstos que se recogen en la solicitud.