



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 351 909**

② Número de solicitud: 201001350

⑤ Int. Cl.:

**C08G 83/00** (2006.01)

**C07C 233/36** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.10.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**14.02.2011**

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Granada  
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n  
18071 Granada, ES**

⑱ Inventor/es: **Morales Sanfrutos, Julia;  
Santoyo González, Francisco;  
Girón González, María Dolores;  
Megía Fernández, Alicia;  
Hernández Mateo, Fernando y  
Salto González, Rafael**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Dendrímeros basados en PAMAM derivatizado con grupos alquil sulfonilo.**

㉒ Resumen:

Dendrímeros basados en PAMAM derivatizado con grupos alquil sulfonilo.

La presente invención describe unos compuestos derivados de vinilsulfonas que comprenden un núcleo de PAMAM derivatizado con grupos alquilsulfonilo y el procedimiento de obtención de los mismos. Estos compuestos forman complejos con fragmentos de ADN que son útiles para la transfección de células, por lo que la presente invención también describe el uso de estos compuestos como agentes de transfección.

ES 2 351 909 A1

## DESCRIPCIÓN

Dendrimeros basados en PAMAM derivatizado con grupos alquil sulfonilo.

5 La presente invención describe unos compuestos derivados de vinilsulfonas que comprenden un núcleo de PAMAM derivatizado con grupos alquilsulfonilo, así como el procedimiento de obtención de estos compuestos y su uso como agentes de transfección.

10 **Estado de la técnica anterior**

La supuesta capacidad de la terapia génica para el tratamiento de enfermedades genéticas ha conducido a una gran actividad investigadora sobre el diseño de vectores para la administración de genes que sean capaces de compactar y proteger oligonucleótidos como DNA contra la degradación por DNAsas presentes en el suero. Los vectores no virales constituyen una alternativa atractiva al uso de virus, retrovirus y adenovirus, ya que resuelven problemas de los sistemas virales como la toxicidad, inmunogenicidad y los problemas de obtención a gran escala de estos sistemas virales. No obstante, los sistemas basados en virus tienen una elevada eficiencia de transfección. Aunque los sistemas no virales tienen *per se* una menor eficiencia de transfección (debido a las barreras intra y extracelulares que encuentran para una captación celular), estos vectores no virales pueden ser fácilmente modificados en su estructura de una manera sistemática para permitir el análisis de aquellos factores implicados en la modulación de su eficiencia.

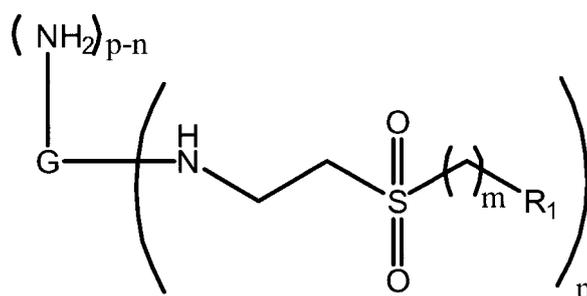
El diseño de compuestos de naturaleza catiónica, como lípidos, polímeros, dendrimeros y péptidos que interaccionen de manera fuerte y no covalentemente con el esqueleto cargado negativamente del DNA se ha demostrado como una estrategia útil para el desarrollo de eficientes agentes sintéticos de transfección. Así, dendrimeros altamente ramificados han demostrado un alto potencial como vectores para la administración de genes comparados con sistemas poliméricos clásicos, debido a sus propiedades exclusivas: una superficie multivalente funcionalizable, una arquitectura tridimensional bien definida, así como tamaños y pesos moleculares adecuados (O. Rolland, C. O. Turrin, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *New J. Chem.*, 2009, 33, 1809). En concreto, los dendrimeros basados en poli(amidoamina) (PAMAM) que contienen grupos amino terminales fácilmente protonables y grupos amino terciarios internos son una herramienta de laboratorio frecuente debido a su sencilla síntesis química y su disponibilidad (P. P. Kundu and V. Sharma, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2008, 12, 89 M. Labieniec and C. Watala, *Cent. Eur. J. Biol.*, 2009, 4, 434). Los complejos PAMAM-DNA, denominados dendriplexos y constituidos por la interacción entre grupos amino primarios (D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, J. Blasiak and M. Bryszewska, *J. Control. Release*, 2010, 141, 110), constituyen sistemas supramoleculares cargados positivamente que tienen la capacidad de interaccionar con la membrana plasmática celular cargada negativamente, permitiendo la entrada a la célula a través de un sistema endosomal, sin producir ni citotoxicidad ni inmunogenicidad de manera significativa. Una vez internalizados, la capacidad tampón de los grupos amino no protonados va a permitir que actúen como una esponja de protones en el entorno ácido de los endosomas, facilitando de esta manera la liberación del DNA desde el dendriplexo al citoplasma celular gracias a la inhibición de las nucleasas endosomales dependientes de pH.

La influencia de la generación del dendrímico en la eficiencia de transfección (también llamado efecto dendrímico) fue identificada hace tiempo y así, los dendrimeros de tamaño medios (G5-G10) son considerados como los más eficientes. Por otro lado, para incrementar el rendimiento de transfección de los PAMAMs se han desarrollado tres estrategias: a) incrementar la flexibilidad de las ramas, b) transformar el dendrímico en ambifílico y c) hacerlo biocompatible. La degradación térmica de PAMAMs de alta generación origina vectores "fracturados" con una alta flexibilidad y que son comerciales (Superfect™). Además, la modificación de la superficie mediante la funcionalización de la periferia del PAMAM se ha investigado extensamente para tratar de mejorar no solo la formación de complejos con el DNA, interacción con la membrana plasmática y liberación de los endosomas, sino también de reducir la citotoxicidad y tratar de incorporar grupos funcionales que produzca el direccionamiento de los dendriplexos a un tipo celular específico (K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta and N. K. Jain, *Int. J. Pharm.*, 2010, 394, 122). La conjugación de los grupos amino primarios con polietilenglicol, aminoácidos, péptidos, proteínas, azúcares, ciclodextrinas, lípidos y glucocorticoides se ha descrito y ha tenido unos resultados variables en cuanto a la eficiencia de transfección. Numerosos trabajos han demostrado las ventajas de incorporar motivos lipofílicos a los dendrimeros para transformarlos en moléculas ambifílicas capaces de producir una transfección aumentada. Así, PAMAMs modificados con lípidos se han construido con topologías en las que la porción hidrofílica dendrítica se localizaba en una parte de la molécula mientras que la porción hidrofóbica, fundamentalmente cadenas alquílicas de longitud variable, se localizaban en la parte opuesta de la molécula (T. Takahashi, C. Kojima, A. Harada and K. Kono, *Bioconjug. Chem.*, 2007, 18, 1349). De forma alternativa, dendrimeros de PAMAM con un interior hidrofílico y una corona hidrofóbica se han obtenido uniendo al azar colas alquílicas en la periferia (J. L. Santos, H. Oliveira, D. Pandita, J. Rodrigues, A. P. Pêgo, P. L. Granja and H. Tomás, *J. Controlled Release*, 2010, 144, 55.). En ambos casos, la influencia de parámetros como la generación dendrítica, la longitud de la cadena alquílica y el grado de funcionalización en la eficiencia de transfección y citotoxicidad se han evaluado. La adición de Michael de derivados de acrilato así como la acilación con esteres activados de ácidos grasos han sido las herramientas sintéticas utilizadas para la fabricación de este tipo de vectores

### Descripción de la invención

La presente invención describe una serie de compuestos ambifílicos derivados de PAMAM donde algunos grupos amino periféricos de estos dendrímeros se han unido a derivados de vinilsulfona conteniendo cadenas hidrofóbicas. Igualmente se describen las propiedades de transfección de los compuestos resultantes las cuales dependen de la naturaleza química de la cadena hidrofóbica y del grado de extensión de la modificación de superficie de los dendrímeros. Algunos de los dendrímeros derivados PAMAM demuestran ser vectores útiles para la transfección y poseen mejores propiedades que el PAMAM sin modificar o reactivos comerciales de transfección como la LipofectaMINA 2000: a) una mayor eficiencia de transfección, b) una menor citotoxicidad, c) la capacidad de mantener la transfección en presencia de suero y d) la posibilidad de transfectar distintos tipos de líneas celulares. Igualmente se describe la preparación de sondas fluorescentes para monitorizar las rutas de endocitosis útiles en la transfección mediada por estos dendrímeros y obtener información de los mecanismos de internalización empleados por estos vectores.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



(I)

donde

G representa un dendrímero aminado que se selecciona de entre PAMAM, polietileniminas, polilisininas o polipropilenimina,

R<sub>1</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o el grupo -Y-R<sub>2</sub>

Y se selecciona entre O ó S,

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-R<sub>3</sub> o un esteroil,

R<sub>3</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> o alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>,

m es un valor entre 1 y 4,

n es un valor entre 1 y p, siendo p el número de grupos -NH<sub>2</sub> de superficie del dendrímero aminado.

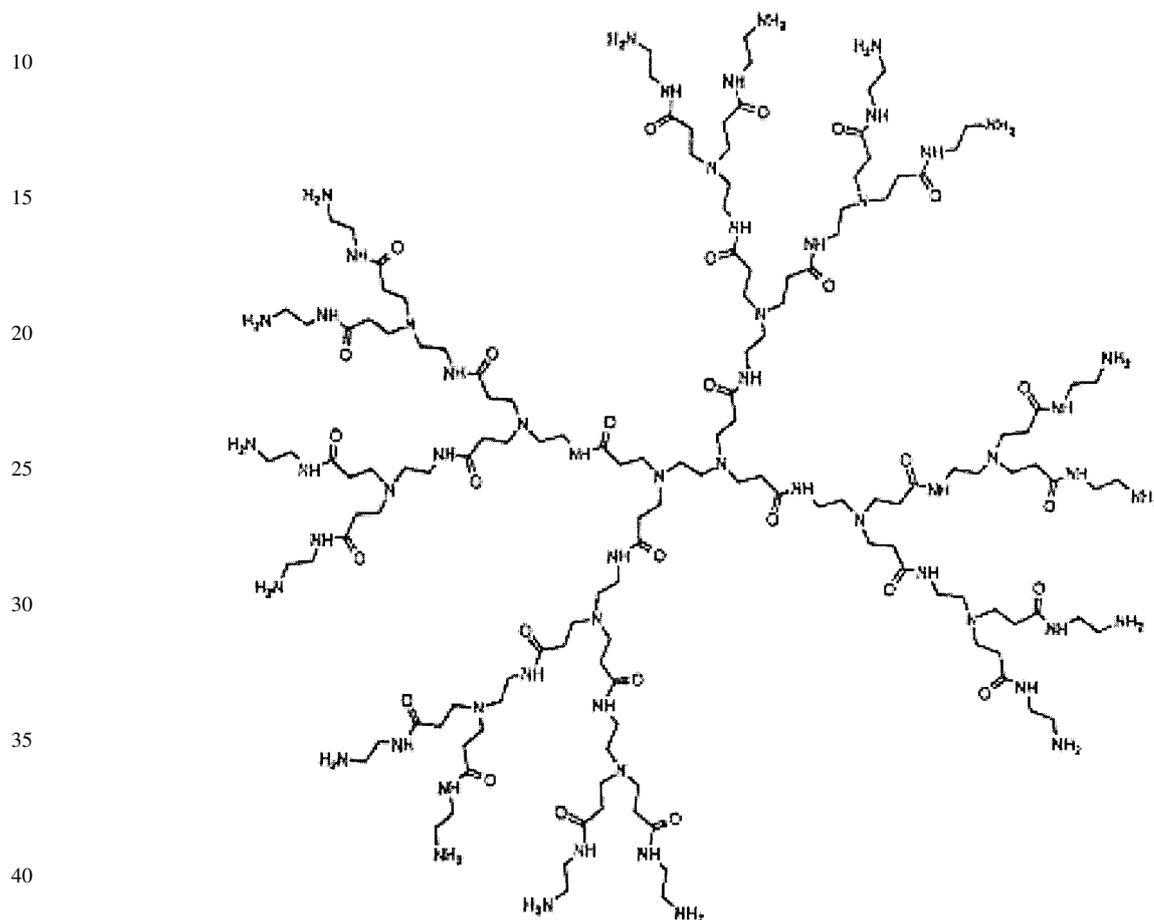
El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 18, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término "alqueno" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles y que tienen preferiblemente de 2 a 20 carbonos, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo etc. Los radicales alquenos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término "esteroil" se refiere a esferoides con 27 a 29 átomos de carbono. Su estructura química deriva del ciclopanoperhidrofenantreno o esterano, una molécula de 17 carbonos formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal. En los esteroides, se añade una cadena lateral de 8 ó más átomos de carbono en el carbono 17 y un grupo alcohol o hidroxilo (-OH) en el carbono 3. Ejemplos no limitantes de esteroides son colesterol, ergosterol, estigmasterol etc.

## ES 2 351 909 A1

Los PAMAM (poliamidoaminas) son polímeros de tipo dendrítico (macromoléculas tridimensionales hiper-ramificadas de construcción arborescente con una estructura química precisa), que presentan una forma de crecimiento generacional y que están formados por un núcleo de alquildiamina con ramificaciones que se generan a partir de aminas terciarias. Preferiblemente los PAMAM son de segunda a sexta generación y más preferiblemente, de segunda generación siendo  $p=16$  y presentando la siguiente estructura:



En una realización preferida,  $m$  es 1.

En una realización más preferida,  $R_1$  es un alquilo  $C_1-C_{18}$  y preferiblemente  $R_1$  se selecciona entre  $-(CH_2)_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_{10}CH_3$  o  $-(CH_2)_{16}CH_3$ .

En otra realización más preferida,  $R_1$  es un alquenoilo  $C_1-C_{18}$  y preferiblemente  $R_1$  es  $(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$ .

En otra realización preferida,  $m$  es 2.

En una realización más preferida,  $R_1$  es el grupo  $-O-R_2$ .

En otra realización más preferida,  $R_1$  es el grupo  $-S-R_2$ .

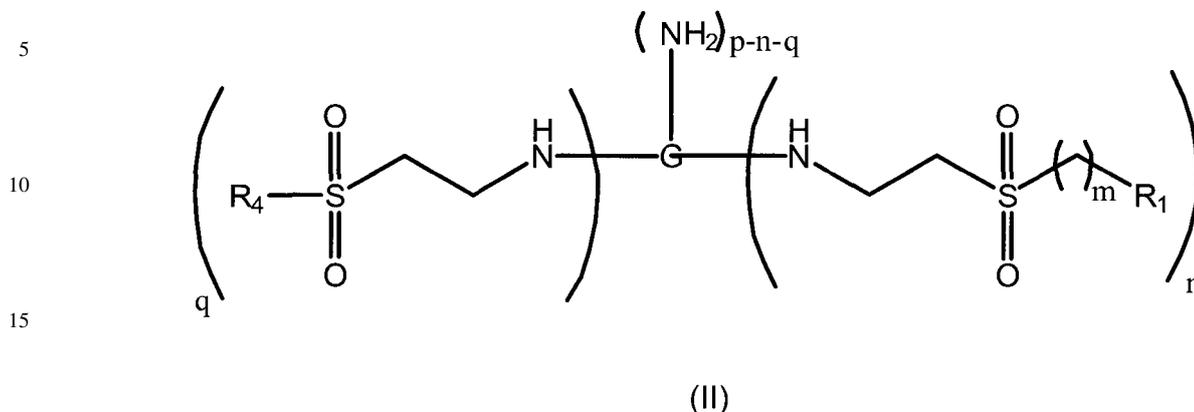
En otra realización más preferida,  $R_2$  es  $-CH_2-CH_2-NH-CO-R_3$ , siendo  $R_3$  un alquilo  $C_1-C_{18}$  y preferiblemente  $R_3$  se selecciona entre  $-(CH_2)_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_{10}CH_3$  o  $-(CH_2)_{16}CH_3$ .

En otra realización más preferida, es  $-CH_2-CH_2-NH-CO-R_3$ , siendo  $R_3$  un alquenoilo  $C_1-C_{18}$  y preferiblemente  $R_3$  es  $(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$ .

En una realización más preferida,  $R_2$  es un esteroil que se selecciona de la lista que comprende colesterol, epicolesterol, estigmasterol, lanosterol, ergosterol y coprostenol y preferiblemente colesterol.

En otra realización preferida,  $n$  es un valor que se selecciona entre 2 ó 1.

En otra realización preferida, la invención se refiere a un compuesto de fórmula general (II):



20 donde

G representa un dendrímtero aminado que se selecciona entre PAMAM, polietileniminas, polilisinias y polipropiliminina,

25 R<sub>1</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o el grupo -Y-R<sub>2</sub>

Y se selecciona entre O ó S,

30 R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-R<sub>3</sub> o un esteroil,

R<sub>3</sub> selecciona entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> o alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>,

R<sub>4</sub> es un grupo fluorogénico,

35 m es un valor entre 1 y 4,

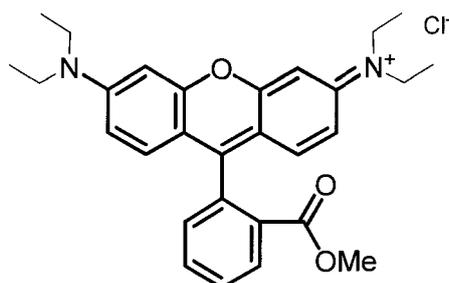
n es un valor entre 1 y p, siendo p el número de grupos NH<sub>2</sub> de superficie del dendrímtero aminado,

40 q es un valor que se selecciona entre 1 y 2.

45 “Grupo fluorogénico” se refiere a un grupo químico de pequeño tamaño que forma parte de una molécula mayor, el cual puede ser excitado por la luz para emitir fluorescencia. En algunas realizaciones, los fluoróforos producen fluorescencia eficientemente por excitación con luz de longitud de onda desde unos 200 nanómetros a unos 800 nanómetros. La intensidad y la longitud de onda de la radiación emitida dependen del fluoróforo y del entorno químico del mismo.

En una realización más preferida, q es 1.

50 En otra realización preferida, R<sub>4</sub> es rodamina o un derivado de la misma, preferiblemente el derivado que posee la siguiente estructura:



La rodamina es una fluorona que se emplea como marcador fluorescente en técnicas como microscopía de fluorescencia, citometría de flujo o ELISA. Otros ejemplos no limitantes de grupos fluorogénicos que pueden ser usados en la presente invención son: acridina, antracenos, alofococianina, BODIPY, cianinas, cumarinas, fluorescamina, fluoresceína, FAM (carboxifluoresceína), HEX (hexaclorofluoresceína), JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), Oregon Green, ficocianina, ficoeritrina, rodamina, ROX (carboxi-X-rodamina), TAMRA (carboxitetrametilrodamina), TET (tetracloro-fluoresceína), Texas red, tetrametilrodamina y xanthininas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o de fórmula (II) según se ha descrito anteriormente como agente de transfección génica.

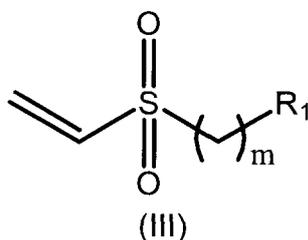
Otro aspecto de la invención se refiere a un complejo que comprende un compuesto de fórmula (I) y un fragmento de ADN.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del complejo según se ha descrito para la fabricación de una composición farmacéutica.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de fórmula (I), un compuesto de fórmula (II), un complejo según se ha definido anteriormente o cualquiera de sus combinaciones, caracterizada porque la relación estequiométrica entre G y los grupos sulfonados tiene un valor entre 0,5 y 2. Preferiblemente, esta relación estequiométrica G:grupos sulfonados es 0,5. Esta composición contiene tanto dendrímeros que han sido funcionalizados con grupos vinyl sulfona como dendrímeros sin funcionalizar.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición como se ha descrito anteriormente, como agente de transfección génica.

Un último aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende una reacción de adición de Michael del compuesto de fórmula (III):



donde m y R<sub>1</sub> se definen como anteriormente, a un dendrímero aminado que se selecciona entre PAMAM, polietilimininas, polilisininas y polipropiliminina y particularmente a un dendrímero PAMAM de segunda a sexta generación.

Un medio adecuado para la reacción anteriormente descrita es tetrahidrofurano/agua aunque también es posible realizarla en otros medios de reacción conocidos por cualquier experto en la materia, tales como, pero sin limitarse a, acetona-agua o acetonitrilo-agua.

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.

## 60 Descripción de las figuras

Fig. 1. *Ensayo de movilidad electroforética*. A.- Ensayo de movilidad electroforética del PAMAM-G2 o algunos derivados de PAMAM-G2 unidos a pDNA a relaciones N/P entre 0 (pEGFP-N3 solo) y 10. La ausencia de la banda del plásmido en los pocillos se relaciona con la inhibición de la movilidad electroforética del plásmido. B.- Relación N/P mínima necesaria para inhibir completamente la movilidad electroforética en el ensayo. C.- Ensayo de movilidad electroforética para PAMAM-G2 o derivados de PAMAM-G2 marcados con rodamina.

Fig. 2. *Experimentos de protección de la digestión con DNasa I.* A.- Muestras representativas de geles de agarosa correspondientes al plásmido pEGFP-N3 incubado en la ausencia (-) o presencia (+) de DNasa I como control. Las muestras de pEGFP-N3 que han sido pre complejadas con los derivados de PAMAM-G2 antes del tratamiento con DNasa I (como se describe en la sección experimental) se han corrido en paralelo. B.- Cuantificación de la intensidad relativa (al pEGFP-N3 sin tratar se le ha asignado un valor de 100) de la suma del plásmido relajado y sobre enrollado correspondiente a las muestra complejadas con los derivados de PAMAM-G2 y tratadas con DNasa I. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM (n=4). C.- Las muestras de derivados de PAMAM-G2 marcadas con rodamina se han procesado de manera similar y la protección de la digestión con DNasa I se ha medido mediante electroforesis en agarosa. (a) Complejos dendrímero-pDNA, (b) dendrímero marcado solo. Ya que los dendrímeros están marcados con fluorescencia, los geles se han fotografiado antes (UV) y después de la tinción con bromuro de etidio (EtBr). Debido a la interacción del dendrímero marcado libre con el SDS empleado en la preparación de las muestras, los dendrímeros marcados libres tienen una carga negativa durante la electroforesis.

Fig. 3 *Eficiencia in vitro de los derivados de PAMAM-G2 en células CHO-K1.* Las células CHO-k1 fueron transfectadas con dendriplexos utilizando el plásmido pEGFP-N3 como se describe en la sección experimental. Para cada condición, el DNA se mezcló con el derivado de PAMAM-G2 en una relación N/P de 2.5 a 50. Como un control positivo (Lp), se realiza una transfección con LP2000. La fluorescencia fue medida 48 horas después de la transfección. La relación fluorescencia/proteína para cada compuesto se muestra en las figuras. El valor de fluorescencia de la eGFP en la transfección con LP2000 se ha normalizado al 100% en cada experimento. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM (n=8).

Fig. 4 *Citotoxicidad de los complejos.* La citotoxicidad de los complejos formados entre el pDNA y los dendrímeros modificados se ha ensayado en células CHO-k1 24 horas después de la transfección mediante la medida del porcentaje de viabilidad celular utilizando un ensayo basado en el MTT. Se han ensayado aquellos dendrímeros con una mayor eficiencia de transfección. El ensayo se ha realizado utilizando la relación N/P más eficiente para la transfección de cada compuesto (6b-G2(I): 10; 6c-G2(I): 2,5; 6d-G2(I): 10; 9b-G2(I): 20; 9d-G2(III): 10; 11d-G2(III): 10). Los resultados se muestran como % de viabilidad, normalizando a un valor del 100% el de las células sin transfectar.

Fig. 5 *Factores que influyen en la eficiencia de transfección de los derivados de PAMAM-G2.* A.- Efecto del suero en el medio de transfección. La LP2000 (como control positivo) o 6c-G2(I) (relación N/P 2.5-50) se han complejado con el plásmido pEGFP-N3 y posteriormente empleado para la transfección de células CHO-K1 en la ausencia o presencia de 10% de suero bovino fetal en el medio de transfección. La fluorescencia fue medida 48 h después de la transfección. La relación fluorescencia/proteínas para cada condición se muestra en la gráfica. El valor de fluorescencia de la eGFP para la transfección con LP2000 en ausencia de suero bovino fetal se ha normalizado al 100%. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=7). B.- Tipo celular. Células CHO-k1, Neuro-2a o RAW 264.7 se han transfectado utilizando el compuesto 6c-G2(I) formando un complejo con el plásmido pEGFP-N3 como se describe en la sección experimental. Para cada condición, el DNA se mezcló con el derivado de PAMAM-G2 a una relación N/P ratios de 2.5 hasta 50. Para cada línea celular se ha utilizado como control positivo una transfección con LP2000. La fluorescencia ha sido determinada 48 h después de la transfección. Se muestra la relación fluorescencia/proteínas para cada condición. El valor de fluorescencia debida a la eGFP se ha normalizado al 100% en cada línea celular. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM (n=8).

Fig. 6 *Efecto de inhibidores de la transfección sobre los derivados de PAMAM-G2.* Células CHO-K1 se han pretratado con clorpromazina (14  $\mu$ M) o genisteína (200  $\mu$ M) durante 30 minutos antes de la transfección con los dendriplexos siguientes en la relación N/P más eficiente (6b-G2(I): 10; 6c-G2(I): 2,5; 6d-G2(I): 10; 9b-G2(I): 20; 9d-G2(III): 10; 11d-G2(III): 10). Como control (Lp), se ha realizado una transfección con LP2000. La fluorescencia se ha ensayado 48 h después de la transfección. La relación fluorescencia/proteína para cada compuesto se muestra en la gráfica. El valor de fluorescencia debido a la eGFP en la transfección con LP2000 se ha normalizado al 100%. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6).

Fig. 7 *Microscopía Confocal.* Células CHO-K1 se sembraron en cubres de microscopio y fueron transfectadas con los dendriplexos basados en el compuesto marcado con rodamina 9d-G2 (III) y pEGFP-N3 marcado con Cy5 a una relación N:P de 10. 24 horas después de la transfección, las células fueron fijadas y analizadas mediante microscopía confocal para detectar la proteína eGFP en las células transfectadas (verde), el compuesto marcado con rodamina 9d-G2 (III) (rojo) o el pEGFP DNA marcado con Cy5 (azul). Se muestra una imagen superpuesta así como imágenes individuales para cada canal independiente. A y B.- Células CHO-k1 transfectadas a dos aumentos diferentes. C.- Células CHO-k1 preincubadas con clorpromazina antes de la transfección.

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de la invención.

## ES 2 351 909 A1

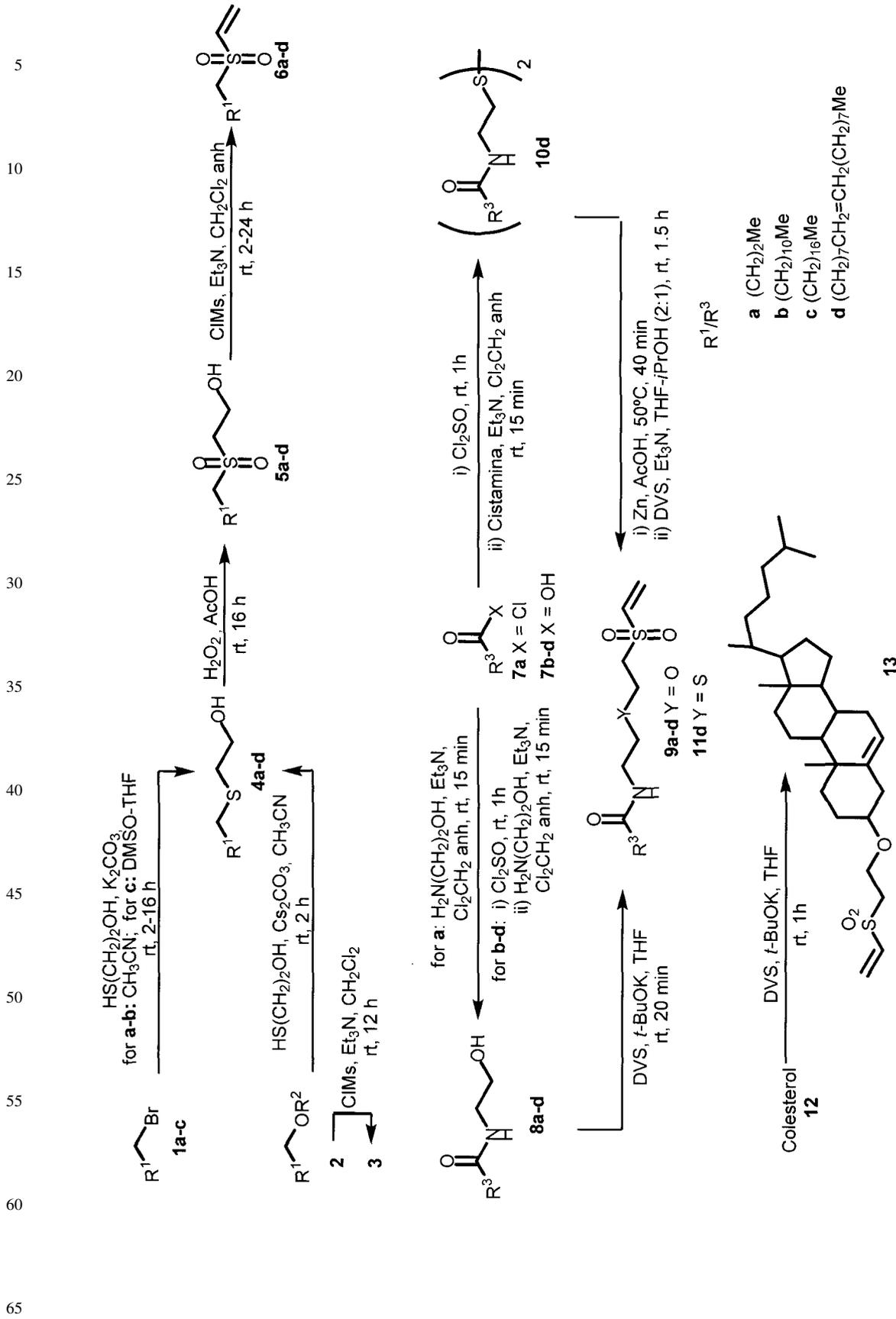
### *Síntesis de derivados de vinil sulfona para la funcionalización de PAMAM-G2*

5 Para obtener nuevos derivados de PAMAM-G2 útiles como vectores de transfección con una eficiencia mejorada y una baja toxicidad, se seleccionan un conjunto de compuestos que presentan cadenas hidrofóbicas para su conjugación con los grupos amino terminales de los dendrímeros. Para poder evaluar la importancia de la longitud de la cadena hidrofóbica en el proceso de transfección, se eligen reactivos comerciales con cadenas alquílicas de 4, 12 y 18 carbonos. Así se ha usado los derivados bromados 1a-c, alcohol oleico (*cis*-9-octadecenol) 2, cloruro de butanoilo 7a, ácido laurico (ácido dedecanoico) 7b, ácido esteárico (ácido octadecanoico) 7c y ácido oleico (ácido *cis*-9-octadecenoico) 7d. La adición tipo aza-Michael de derivados vinil sulfona de estas moléculas se considera como una herramienta sintética adecuada para su acoplamiento con los grupos amino periféricos dado el alto rendimiento y facilidad de esta reacción que puede ser llevada a cabo por simple mezcla de los compuestos en un disolvente adecuado sin la formación de productos secundarios no deseados.

15 La diferente funcionalidad de los compuestos 1a-c, 2 y 7a-b (bromuros de alquilo, alcoholes y ácidos carboxílicos, respectivamente) permite diseñar estrategias simples para la preparación de sus correspondientes derivados vinil sulfona y también para la introducción de variabilidad estructural en el espaciador que une la cadena alquílica hidrofóbica y el núcleo del dendrímero, cuya influencia en la eficiencia de transfección es también un parámetro objeto de evaluación. Así, el desplazamiento nucleofílico de los derivados bromados 1a-c y del derivado mesilado 3 del alcohol oleico 2 por el átomo de azufre del 2-tioetanol produce los hidroxietil tioéteres 4a-d con un alto rendimiento. La oxidación con ácido peracético y la subsecuente deshidratación de las hidroxisulfonas 5a-d mediante la formación de sus derivados mesilados conduce fácilmente a las vinil sulfonas 6a-d en las que la funcionalidad original ha sido reemplazada por el grupo vinil sulfona (Esquema 1). De manera alternativa, se ha diseñado una estrategia a partir de los ácidos grasos 7a-d que nos ha permitido introducir un espaciador de mayor longitud de la cadena alquílica hidrofóbica en la vinil sulfona. Así, la reacción con el 2-aminoetanol de los cloruros de ácidos grasos, utilizando el reactivo comercial 20 7a o bien obtenidos “*in situ*” mediante el tratamiento con cloruro de tionilo en el caso de los ácidos 7b-d, rinde las correspondiente 2-hidroxietil amidas 8a-d. La reacción de estos compuestos con la divinil sulfona (DVS) produce las vinil sulfona eter9a-d con rendimientos moderados (Esquema 1).

De manera adicional, en el caso del ácido oleico, la molécula homóloga a la vinilsulfona tioeter 11d también es preparada para evaluar la influencia del heteroátomo del espaciador en la eficiencia de transfección. Este compuesto se obtiene mediante la reacción del cloruro de ácido oleico con cistamina dihidrocloruro que produce el disulfuro 10d con un elevado rendimiento. La reducción con Zn en polvo de este compuesto seguida de la adición de Michael a DVS permite obtener el derivado tioeter 11d en un único paso (Esquema 1).

(Esquema pasa a página siguiente)



Esquema 1: Síntesis de derivados de vinil sulfona para la funcionalización de PAMAM-G2.

## ES 2 351 909 A1

5 Teniendo en cuenta que el colesterol se ha usado con frecuencia como motivo hidrofóbico en los agentes de transfección no virales incluyendo los derivados de PAMAM para introducir en ellos un carácter lipofílico, se prepara también un derivado vinil sulfona de este esteroide para poder sintetizar el correspondiente colesterol-PAMAM-G2 conjugado y evaluar si esta modificación estructural permite una optimización de la transfección. El tratamiento del colesterol comercial 12 con DVS produce el correspondiente derivado vinil sulfona 13 con un rendimiento moderado (Esquema 1).

### 10 *Síntesis química de dendrímeros ambifílicos PAMAM-G2 como vectores novirales*

10 La síntesis de los agentes de transfección se realizó mediante la adición de una solución de THF de los derivados vinil sulfona (6a-d, 9a-d, 11d y 13), a una solución acuosa de PAMAM-G2. Para evaluar el efecto del grado de funcionalización y poder determinar el valor mínimo estequiométrico que permite la obtención de los agentes de transfección más eficaces se usaron tres relaciones molares vinilsulfona:PAMAM-G2 (I=0.5, II=1.0 y III=2) obteniéndose los correspondientes conjugados [6a-d-G2(I-III), 9a-d-G2(I-III), 11d-G2(I-III) y 13-G2(I-III)] tras la eliminación del disolvente (Esquema 2). Para realizar estudios de captación celular de los dendrímeros y su localización subcelular, durante el proceso de transfección con los dendrímeros basados en PAMAM-G2, se lleva a cabo la síntesis de derivados de PAMAM-G2 fluorescentes para su uso en microscopía confocal de fluorescencia. El derivado rodamina vinil sulfona 14 (Esquema 2), permite incorporar fluorescencia de forma sencilla en la molécula original de PAMAM-G2 para dar el dendrímero PAMAM-G2-Rho que posteriormente es funcionalizado para incorporar los motivos hidrofóbicos que han demostrado un mejor comportamiento en los estudios de transfección realizados previamente.

25 (Esquema pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65



*Capacidades de transfección de los derivados funcionalizados de PAMAM-G2*

Se ha estudiado la capacidad de los nuevos derivados de PAMAM para neutralizar, unir y compactar DNA plasmídico (pDNA). El plásmido pEGFP-N3 [que codifica para la proteína fluorescente verde (eGFP)] se elige para la preparación de los complejos y los ensayos de transfección. Los conjugados de PAMAM son mezclados con el pDNA a diferentes relaciones N/P (0,5 a 50) para dar lugar a la formación de los correspondientes dendriplexos. El ensayo de movilidad electroforética en geles se realiza como una medida que refleja la capacidad de los derivados de PAMAM-G2 para compactar y proteger el plásmido. La formación de los complejos origina una menor movilidad electroforética respecto al pDNA desnudo. Adicionalmente, la tinción con bromuro de etidio tras la electroforesis se usa para evaluar la eficiencia de la protección del pDNA ya que cuando el pDNA es protegido de manera eficiente en los dendriplexos no queda accesible a la molécula de bromuro de etidio para intercalarse. Los experimentos de movilidad electroforética en geles revelaron que la mayoría de los derivados de PAMAM-G2 se unían a pDNA a una relación N/P de 0,5-1 (Fig. 1 y ESI Fig. 1).

La capacidad de proteger el pDNA de la degradación por endonucleasas es evaluada a continuación ya que este es un proceso clave para conseguir una elevada transfección, puesto que el pDNA no protegido es rápidamente degradado por las nucleasas presentes en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos con los derivados de PAMAM-G2 (Fig. 2 y ESI Fig. 2) muestran que ellos tienen la capacidad de proteger el pDNA de la degradación por endonucleasas mientras que el PAMAM-G2 sin modificar falla completamente en la protección del pDNA de la digestión.

En la siguiente etapa, la captación celular de los nuevos dendriplexos se ensaya en la línea celular CHO-k1, una línea celular estándar que normalmente se emplea con agentes de transfección de diferentes clases. El plásmido pEGFP-N3 que codifica para la proteína fluorescente verde permite evaluar la eficiencia de transfección ya que la fluorescencia medida en las células transfectadas 48 horas tras la transfección (para permitir la expresión de la proteína fluorescente verde) es proporcional a la eficiencia de la misma.

La captación celular se ensaya en ausencia de suero a relaciones N/P de 2.5-50 (Fig. 3). Un valor del 100% se adjudica al valor obtenido con la lipofectAMINE™ 2000 (LP2000), un reactivo comercial con una alta eficiencia de transfección en numerosos tipos celulares. Los resultados obtenidos claramente indican que mientras que el PAMAM-G2 sin modificar tiene una muy baja eficiencia de transfección (menos del 5% comparado con la LP2000). Este hecho está de acuerdo con resultados previamente publicados ya que el compuesto: a) no produce retardos en geles del pDNA (Fig. 1A) y b) no protege de la degradación con DNasa I (Fig. 2A). Esto, confirma los beneficios de la incorporación de un dominio hidrofóbico para facilitar la unión del dendrímero a las bases de naturaleza hidrofóbica del DNA. De hecho, se observa que la unión de un dominio moderadamente hidrofóbico como la rodamina es suficiente para posibilitar la unión del DNA al PAMAM-G2 (Fig. 1C) aunque no es capaz de protegerlo de la digestión con DNasa I (Fig. 2C).

De los resultados de transfección obtenidos se puede llegar a varias conclusiones sobre la influencia en la eficiencia de transfección de la estructura química de los PAMAM-G2 modificados. De los compuestos ensayados, la longitud mínima de la cadena alifática que permite una eficiente transfección en las células CHO-k1 es de 12 carbonos (compuestos 6b-G2 y 9b-G2). El derivado de PAMAM-G2 6b-G2(I) tiene una destacada eficiencia de transfección ( $p < 0.001$  comparado con el valor de LP2000) en una relación N/P entre 5 y 20 mientras que la eficiencia del compuesto 9b-G2(I) es inferior pero similar a la de LP2000 a una relación N/P de 20 (Fig. 3). Ambos compuestos tienen elevada capacidad de unir pDNA (Fig. 1), aunque como cabría esperar de su eficiencia de transfección, el compuesto 9b-G2(I) tiene una menor capacidad de proteger el DNA de la degradación por DNasa I (Fig. 2). El dendrímero funcionalizado 6c-G2(I) que porta una cadena hidrofóbica C18 tiene el mayor nivel de transfección en las células CHO-k1 (aproximadamente 3.1 veces más eficiente que la LP2000 ( $p < 0.001$ )), acompañado de una alta capacidad de formar complejos estables con el pDNA lo que permite una completa protección del mismo de la degradación (Fig. 2). No obstante, el compuesto 9c-G2 que tiene una cadena alifática de la misma longitud, tiene una baja eficiencia de transfección, lo que se correlaciona con la susceptibilidad a la digestión con endonucleasas del pDNA unido, en concreto la banda correspondiente al plásmido relajado (ESI Fig. 2). Los derivados de PAMAM-G2 conteniendo ácido oleico 6d-G2(I), 9d-G2(III) y 11d-G2(III), que presentan un doble enlace en la cadena alifática también tienen elevados niveles de transfección comparados con LP2000 (1.6 a 2.7 veces mayores que LP2000,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3). Estos dendrímeros también presentan elevadas capacidad de unión a pDNA (Fig. 1 y ESI Fig. 1) y protegen completamente el pDNA de las DNasas (Fig. 2, y ESI Fig. 2). En conjunto, se puede decir que aunque la inclusión de un dominio hidrofóbico es suficiente para obtener una unión fuerte al DNA, una cadena alifática de 18 carbonos es la óptima para una completa protección de las DNasa y una elevada eficiencia de transfección.

En lo relativo a la extensión de la funcionalidad debida a cadenas hidrofóbicas, la comparación de los dendrímeros de las series 6 y 9 indica que la mejor eficiencia de transfección está relacionada con el número de cadenas alifáticas unidas a cada dendrímero. Los compuestos de la serie 6 obtenidos usando una relación estequiométrica vinilsulfona:PAMAM-G2 de 0.5 son compuestos de transfección muy eficientes mientras que los dendrímeros funcionalizados de la serie 9 requieren una mayor relación estequiométrica vinilsulfona:PAMAM-G2 de 2 para transformarse en compuestos de transfección eficientes. La razón de este diferente comportamiento no es obvia aunque de ellos se deduce que una ventaja de la presente invención es la posibilidad de usar relaciones estequiométricas muy bajas vinilsulfona:PAMAM-G2 que facilitan la solubilidad en agua de los mencionados compuestos de transfección.

Por otra parte, la naturaleza del heteroátomo en el enlace éter, oxígeno para el compuesto 9d y azufre para el compuesto 11d, no parece tener influencia en la capacidad de transfección de los compuestos, similar en ambos (Fig. 3).

#### 5 Propiedades electrocinéticas de los derivados funcionalizados de PAMAM-G2

Las determinaciones de “dynamic light scattering” y “ $\zeta$ -potential” se han realizado para los mejores agentes de transfección en la relación N/P óptima para cada uno de ellos, con objeto de determinar sus propiedades electrocinéticas (Tabla 1). Como cabía esperar, los valores de potencial  $\zeta$  disminuyeron al formarse los complejos con el pDNA. No obstante, no se observa una relación entre el tamaño de partícula y la eficiencia de transfección, ya que los mejores compuestos 6c-G2(I) y 9d-G2(III) tienen  $524 \pm 18$  y  $226 \pm 3$  nm de tamaño, respectivamente.

TABLA 1

Diámetro hidrodinámico y Potencial  $\zeta$  para derivados de PAMAM-G2 y sus complejos con DNA

Compuesto	Potencial Z (mV)		Diámetro hidrodinámico (nm)		N/P
	Sin DNA	Con DNA	Sin DNA	Con DNA	
<b>6b-G2(I)</b>	+ 25.8 $\pm$ 0.9	+ 14.4 $\pm$ 0.3	367 $\pm$ 20	734 $\pm$ 33	2.5
<b>6c-G2(I)</b>	+ 29.6 $\pm$ 0.7	+ 14.8 $\pm$ 0.2	536 $\pm$ 84	524 $\pm$ 19	2.5
<b>6d-G2-(I)</b>	+ 29.9 $\pm$ 0.2	+ 12.2 $\pm$ 0.2	394 $\pm$ 41	736 $\pm$ 68	2.5
<b>9b-G2-(I)</b>	+ 29.5 $\pm$ 0.5	+ 21.8 $\pm$ 0.8	709 $\pm$ 95	515 $\pm$ 10	10
<b>9c-G2(I)</b>	+ 32.1 $\pm$ 0.6	+ 13.2 $\pm$ 1.6		627 $\pm$ 27	2.5
<b>9d-G2-(III)</b>	+ 38.1 $\pm$ 0.6	+ 28.2 $\pm$ 0.6	131 $\pm$ 26	226 $\pm$ 3	10
<b>11d-G2-(III)</b>	+ 27.3 $\pm$ 0.5	+ 17.8 $\pm$ 0.7	272 $\pm$ 24	288 $\pm$ 5	10
<b>13-G2(III)</b>	+ 23.5 $\pm$ 0.4	+ 21.3 $\pm$ 0.6	528 $\pm$ 92	329 $\pm$ 15	10

#### 35 Citotoxicidad de los derivados funcionalizados de PAMAM-G2

La citotoxicidad de los dendriplexos se evalúa mediante la determinación del porcentaje de las células viables con respecto a las células que no han sido expuestas a los agentes de transfección usando un ensayo basado en MTT (Fig. 4). Los ensayos se realizan en células CHO-k1 utilizando la relación N/P que proporciona mayor eficiencia de transfección para cada derivado de PAMAM-G2 ensayado. El PAMAM-G2 sin modificar en presencia de pDNA no muestra, como cabría esperar, ninguna toxicidad, mientras que los complejos con LP2000 presentan una toxicidad elevada ya que reducen la viabilidad celular en un 50% ( $p < 0.001$ ). Para los derivados de PAMAM-G2 los compuestos más eficientes 6c-G2(I) y 9d-G2(III), se obtuvo una alta viabilidad celular.

#### 45 Efecto de la presencia de suero en el medio sobre la eficiencia de la transfección

El efecto de la presencia de suero en el medio sobre la eficiencia de transfección se evalúa para el compuesto 6c-G2(I). Este compuesto se elige en base a que es el compuesto que mejor protege la degradación por DNAsas y es el que presenta mayor eficiencia de transfección a relaciones N/P muy bajas (Fig. 5A). En presencia de suero, los niveles de transfección fueron similares a aquellos obtenidos con LP2000 cuando se ha ensayado a relaciones 5-10 N/P. El incremento en la relación N/P en la transfección en presencia de suero también ha sido descrita previamente para reactivos de transfección basados en liposomas de naturaleza catiónica.

#### Capacidad de transfección de los derivados funcionalizados de PAMAM-G2 en otras líneas celulares

La capacidad de transfección del derivado de PAMAM-G2 6c-G2(I) se ensaya para la transfección de neuroblastomas (Neuro-2a) y una línea celular derivada de macrófagos (RAW 264.7) que usualmente presenta una baja eficiencia de transfección por agentes no-virales. Un valor del 100% se asigna a los niveles de transfección producidos por la LP2000 en cada línea celular. El compuesto 6c-G2(I) presenta la capacidad de transfectar ambas líneas celulares de una manera similar a la LP2000 (Fig. 5B).

#### Estudios sobre el mecanismo de captación celular e internalización de los derivados de PAMAM-G2

Los complejos de DNA con agentes de transfección no virales pueden entrar en las células a través de diferentes rutas de endocitosis. Por consiguiente, en el caso de nuevos agentes de transfección es importante determinar la vía de internalización ya que ella determinará el procesamiento intracelular y por tanto influye en la eficiencia de la transfección. La mayoría de los estudios previos sugieren que la vía de endocitosis es la principal puerta de entrada celular de los agentes de transfección no virales. Existen dos vías de endocitosis, dependientes e independientes de clatrina,

responsables de la entrada de estos complejos de DNA. En función del tipo celular, la naturaleza del transportador y el tamaño de la partícula se elige una vía u otra. La vía dependiente de clatrina es la preferida para partículas inferiores a 200 nm de tamaño. La vía independiente de clatrina incluye la entrada celular desde balsas lipídicas en caveolas o bien la entrada por una ruta dependiente de flotillina.

5 Para determinar la vía de endocitosis utilizada por los derivados de PAMAM-G2, se utilizan dos inhibidores de la endocitosis: clorpromacina como un inhibidor de la ruta dependiente de clatrina y genisteína como un inhibidor de la ruta independiente de clatrina. La Fig. 6 muestra que la clorpromacina incrementa de forma significativa ( $p < 0.001$ ) la eficiencia de transfección de la LP2000, 6c-G2(I) o 9d-G2(III) mientras que no modifica la eficiencia de transfección de los compuestos 6b-G2(I), 6d-G2(I), 9d-G2(III) y 11d-G2(III). De manera opuesta, la preincubación con genisteína disminuye la eficiencia de transfección de la mayoría de los compuestos, incluyendo LP2000. Por tanto, de estos datos se puede concluir que los PAMAM-G2 funcionalizados utilizan fundamentalmente una ruta independiente de clatrina.

15 Finalmente, el proceso de internalización de los complejos se ha observado mediante microscopía confocal utilizando pDNA marcado con Cy5 y los dendrímeros 6c-G2(III)-Rho y 9d-G2(III)-Rho marcados con rodamina. Estos compuestos fueron preparados utilizando la química de vinil sulfonas indicada en el esquema 2 que implica la funcionalización del PAMAM-G2-Rho con las vinil sulfonas de ácido esteárico y oleico 6c y 9d, respectivamente. Para el compuesto 9d-G2(III)-Rho se muestran las correspondientes imágenes confocales. Las células que son transfectadas se identifican mediante la expresión de eGFP ya que los experimentos se realizan utilizando el plásmido pEGFP-N3. Las imágenes se tomaron 24 h después de la transfección para permitir la expresión de la eGFP. La Fig. 7A que corresponde a imágenes de contraste diferencial visibles (Nomarki) y fluorescencia, muestra como la fluorescencia se localiza en todas las células, transfectadas o no. En todas ellas, la fluorescencia roja correspondiente a los dendrímeros marcados se puede observar en el citosol de las células próxima al núcleo. Casi toda la fluorescencia azul que corresponde con el DNA marcado se asocia con la fluorescencia roja de los dendrímeros (partículas purpura en las imágenes de fluorescencia superpuestas). Sólo en las células transfectadas, se observa fluorescencia libre azul correspondiendo con el DNA liberado desde el dendrímero y que puede ser observado en el interior del núcleo celular (Fig. 7B). No hay fluorescencia azul libre en los núcleos de las células no transfectadas. Los resultados obtenidos confirman que el paso limitante en la transfección mediada por derivados hidrofóbicos del PAMAM-G2 es la liberación del pDNA desde los endosomas al núcleo, ya que mientras que prácticamente todas las células son capaces de captar los dendriplexos, sólo en un conjunto de ellas el pDNA es liberado desde estos depósitos internos para llegar al núcleo. La Fig. 7C muestra células CHO-k1 que han sido preincubadas con clorpromacina antes de la transfección con el dendrímero marcado con rodamina 9d-G2(III)-Rho complejoado con pEGFP-N3 marcado con Cy5. En estas células la entrada de dendrímeros al espacio perinuclear esta muy reducida y muestra una distribución apical. No obstante, la eficiencia de transfección (la fluorescencia azul asociada con el pDNA liberado en el núcleo) se encuentra incrementada. Estos resultados apoyados por la eficiencia de transfección en presencia de inhibidores de la endocitosis, confirman que la ruta independiente de clatrina es la ruta productiva de endocitosis utilizada por estos derivados funcionalizados de PAMAM-G2.

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

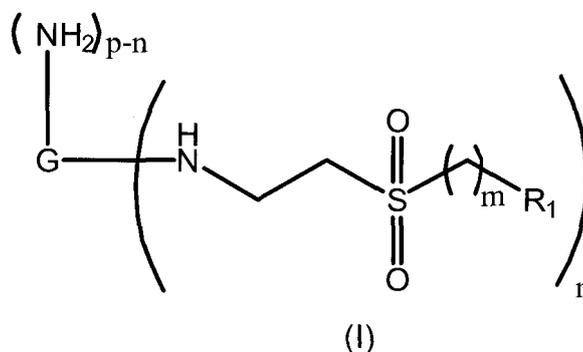
1. Compuesto de fórmula general (I):

5

10

15

20



donde

25

G representa un dendrímero aminado que se selecciona de entre PAMAM, polietileniminas, polilisininas o polipropiléniminas,

R<sub>1</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, alquénilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, o el grupo -Y-R<sub>2</sub>

30

Y se selecciona entre O ó S,

R<sub>2</sub> se selecciona entre el grupo -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-R<sub>3</sub> o un esteroil,

35

R<sub>3</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> o alquénilo C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>,

m es un valor entre 1 y 4,

n es un valor entre 1 y p, siendo p el número de grupos -NH<sub>2</sub> de superficie del dendrímero aminado.

40

2. Compuesto según la reivindicación 1 donde el dendrímero aminado es un PAMAM de segunda generación, siendo p=16.

3. Compuesto según la reivindicación 2 donde m es 1.

45

4. Compuesto según la reivindicación 3 donde R<sub>1</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>.

5. Compuesto según la reivindicación 4 donde R<sub>1</sub> se selecciona entre -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>.

50

6. Compuesto según la reivindicación 2 donde R<sub>1</sub> es un alquénilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>.

7. Compuesto según la reivindicación 6 donde R<sub>1</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>.

55

8. Compuesto según la reivindicación 2 donde m es 2.

9. Compuesto según la reivindicación 8 donde R<sub>1</sub> es el grupo -O-R<sub>2</sub>.

10. Compuesto según la reivindicación 8 donde R<sub>1</sub> es el grupo -S-R<sub>2</sub>.

60

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde R<sub>2</sub> es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-R<sub>3</sub>, siendo R<sub>3</sub> un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>.

12. Compuesto según la reivindicación 11 donde R<sub>3</sub> se selecciona entre -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>.

65

13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde R<sub>2</sub> es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-R<sub>3</sub>, siendo R<sub>3</sub> un alquénilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>.

14. Compuesto según la reivindicación 13 donde R<sub>3</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>.

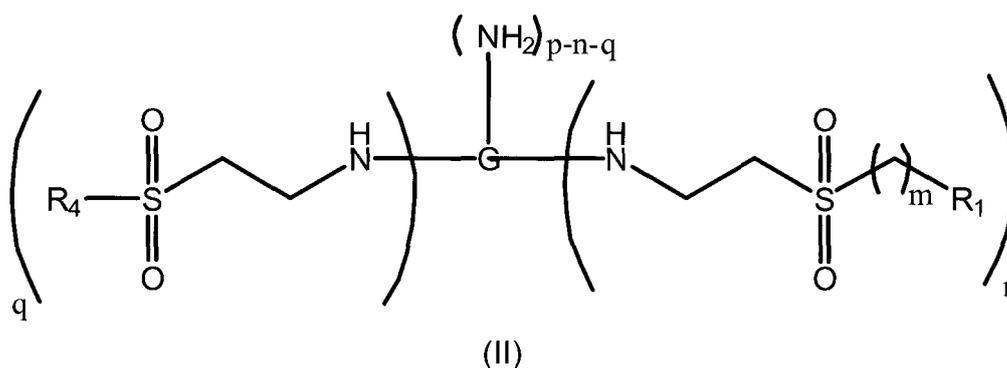
## ES 2 351 909 A1

15. Compuesto según la reivindicación 9 donde  $R_2$  es un esteroI que se selecciona de la lista que comprende colesterol, epicolesterol estigmasterol, lanosterol, ergosterol y coprostenol.

16. Compuesto según la reivindicación 15 donde  $R_2$  es colesterol.

17. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde  $n$  es un valor que se selecciona entre 2 ó 1.

18. Compuesto de fórmula general (II):



donde

G representa un dendrímero aminado que se selecciona de entre PAMAM, polietileniminas, polilisininas o polipropilenimina,

$R_1$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{20}$ , alquenilo  $C_2-C_{20}$ , o el grupo  $-Y-R_2$

Y se selecciona entre O ó S,

$R_2$  se selecciona entre el grupo  $-CH_2-CH_2-NH-CO-R_3$  o un esteroI,

$R_3$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{20}$  o alquenilo  $C_2-C_{20}$ ,

$R_4$  es un grupo fluorogénico,

$m$  es un valor entre 1 y 4,

$n$  es un valor entre 1 y  $p$ , siendo  $p$  el número de grupos  $-NH_2$  de superficie del dendrímero aminado,

$q$  es un valor que se selecciona entre 1 y 2.

19. Compuesto según la reivindicación 18 donde  $q$  es 1.

20. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 donde  $R_4$  es rodamina o un derivado de la misma.

21. Complejo que comprende un compuesto de fórmula (I) o un compuesto de fórmula (II) y un fragmento de ADN.

22. Uso del complejo según la reivindicación 21 para la fabricación de una composición farmacéutica.

23. Composición que comprende un compuesto de fórmula (I), un compuesto de fórmula (II), un complejo según la reivindicación 21 o cualquiera de sus combinaciones, caracterizada porque la relación estequiométrica entre G y los grupos sulfonados tiene un valor entre 0,5 y 2.

24. Composición según la reivindicación 23 donde la relación estequiométrica G:grupos sulfonados es 0,5.

25. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24 como agente de transfección génica.

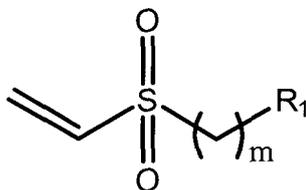
## ES 2 351 909 A1

26. Procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende una reacción de adición de Michael del compuesto de fórmula (III):

5

(III)

10



15 donde:

m y R<sub>1</sub> se definen como en la reivindicación 1, a un dendrímero aminado que se selecciona de entre PAMAM, polietileniminas, polilisinas o polipropilenimina.

20

27. Procedimiento según la reivindicación 26 donde el dendrímero aminado es un dendrímero PAMAM de segunda a sexta generación.

25

28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27 donde la reacción se produce en un medio tetrahydrofurano/agua.

30

35

40

45

50

55

60

65

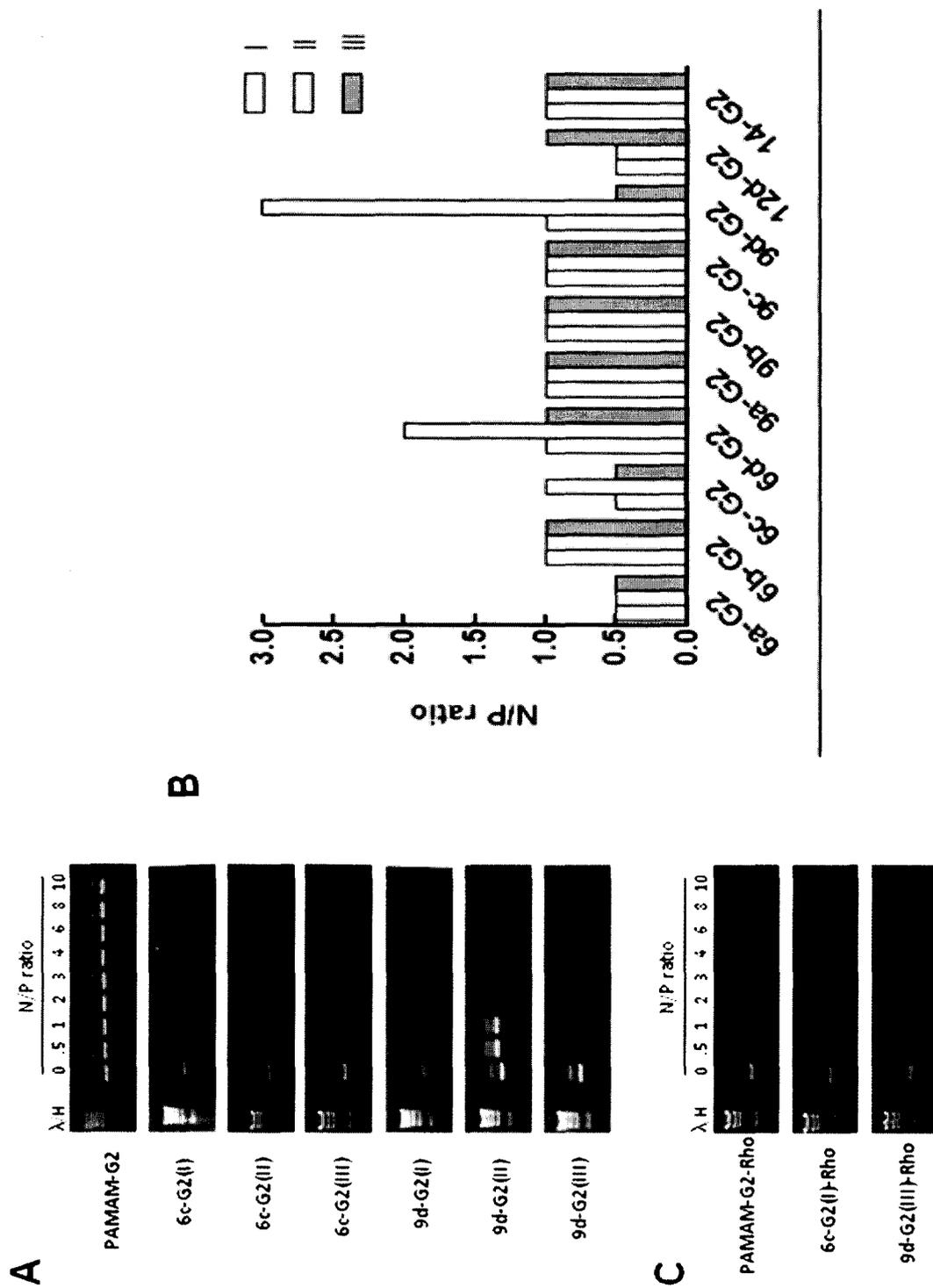


FIG. 1

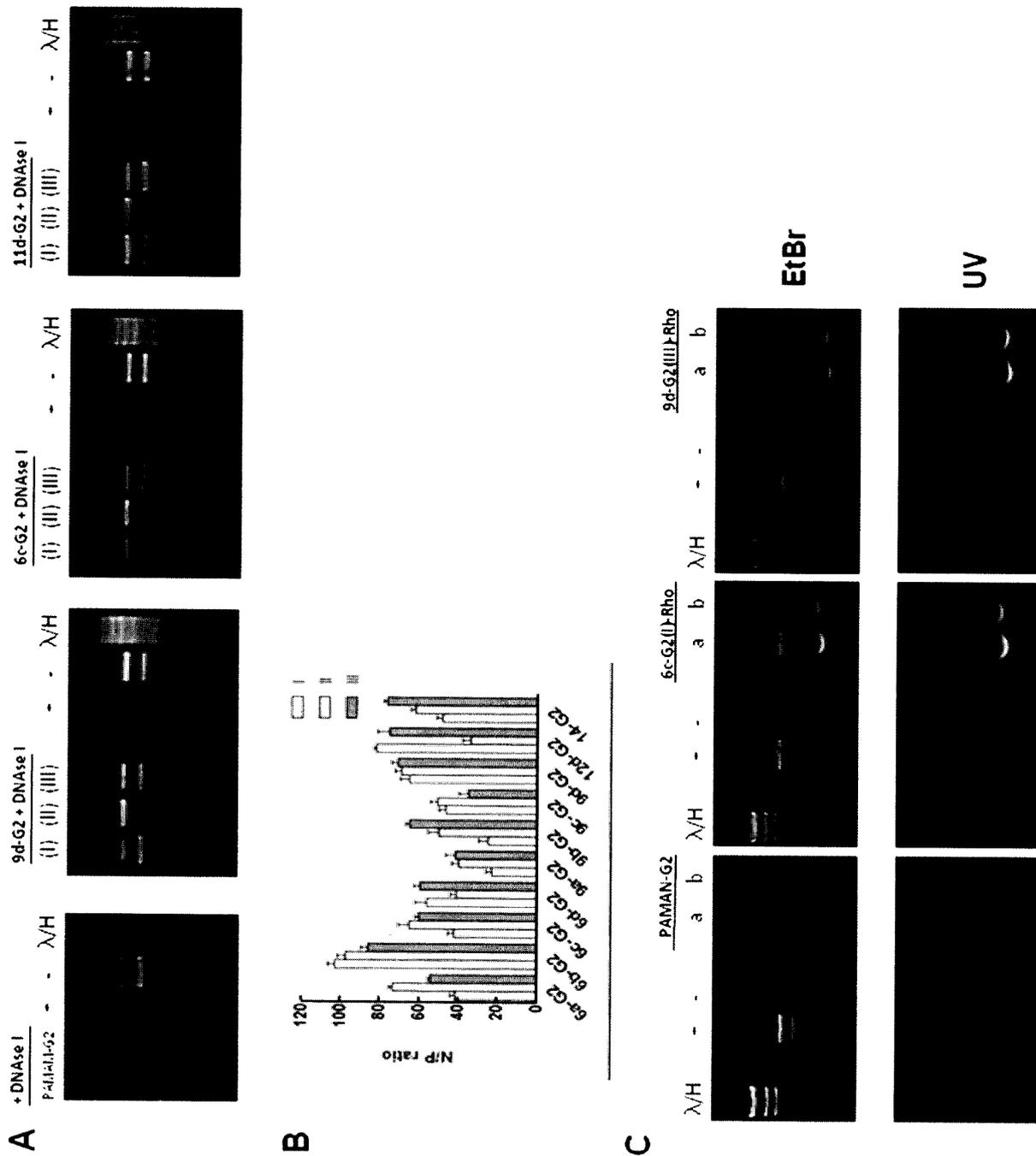


FIG. 2

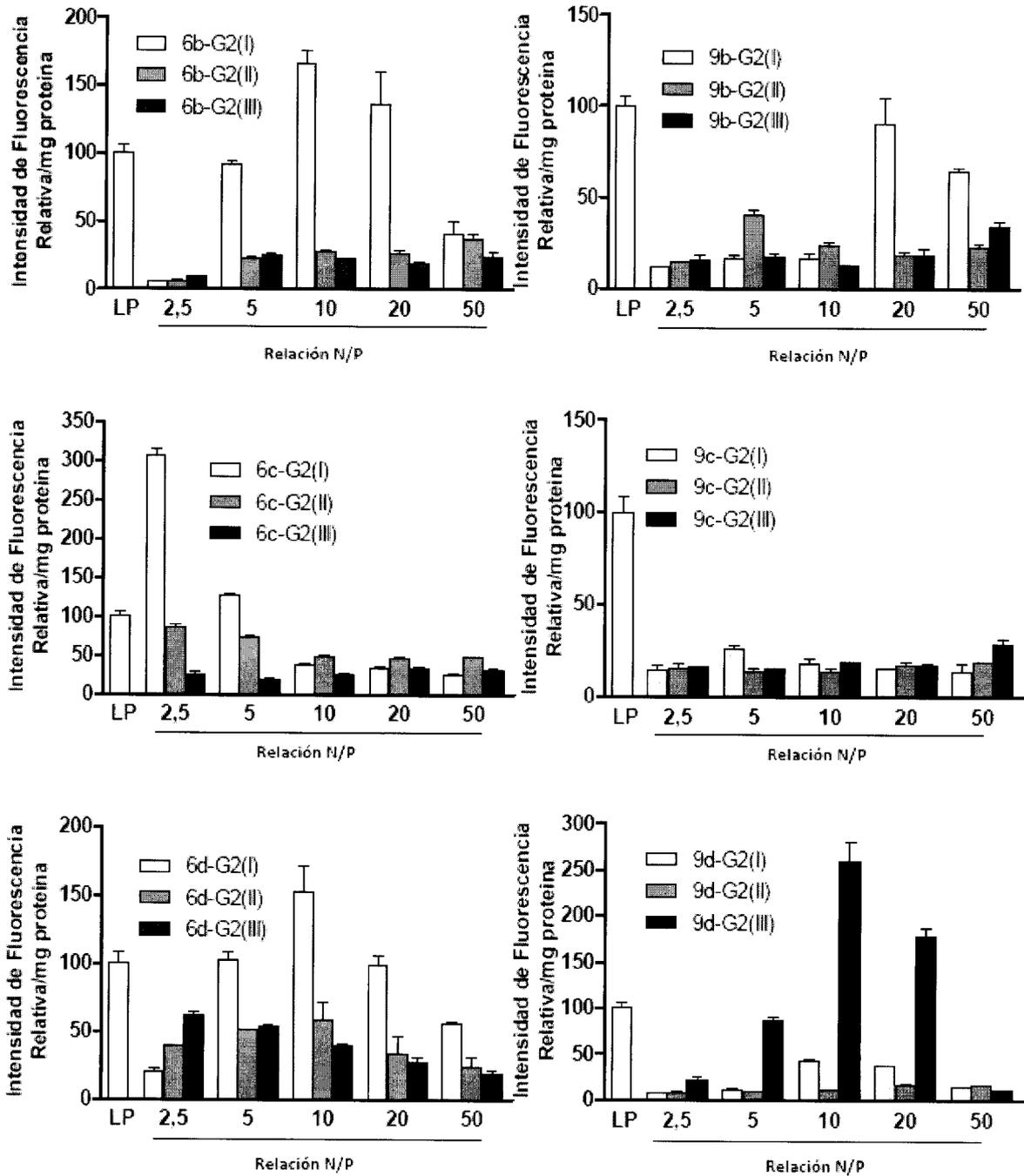


FIG. 3

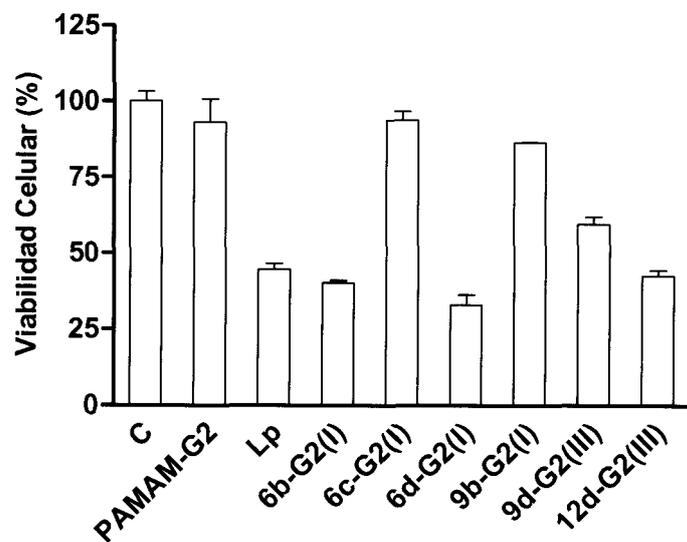


FIG. 4

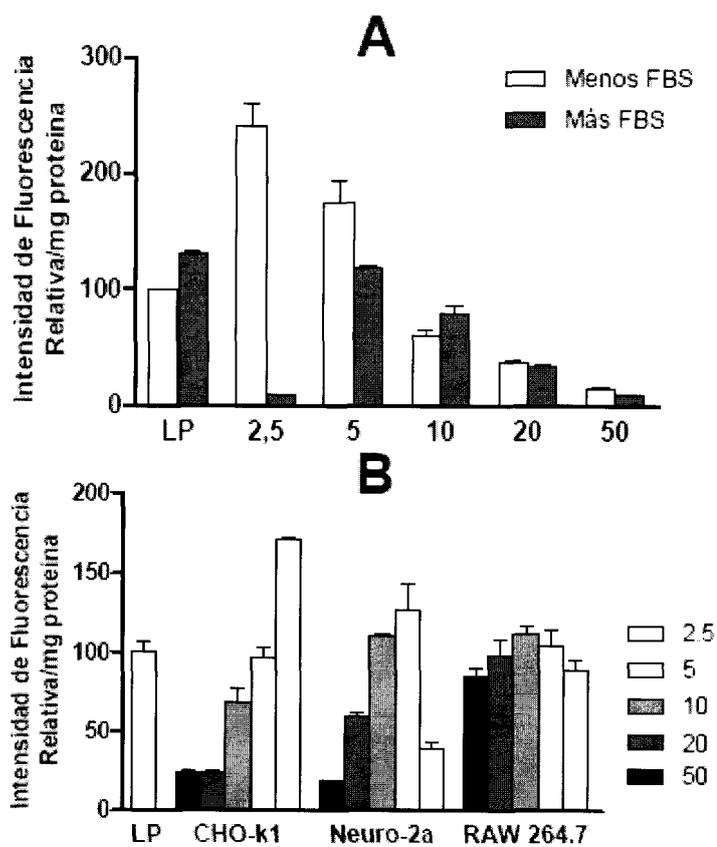


FIG. 5

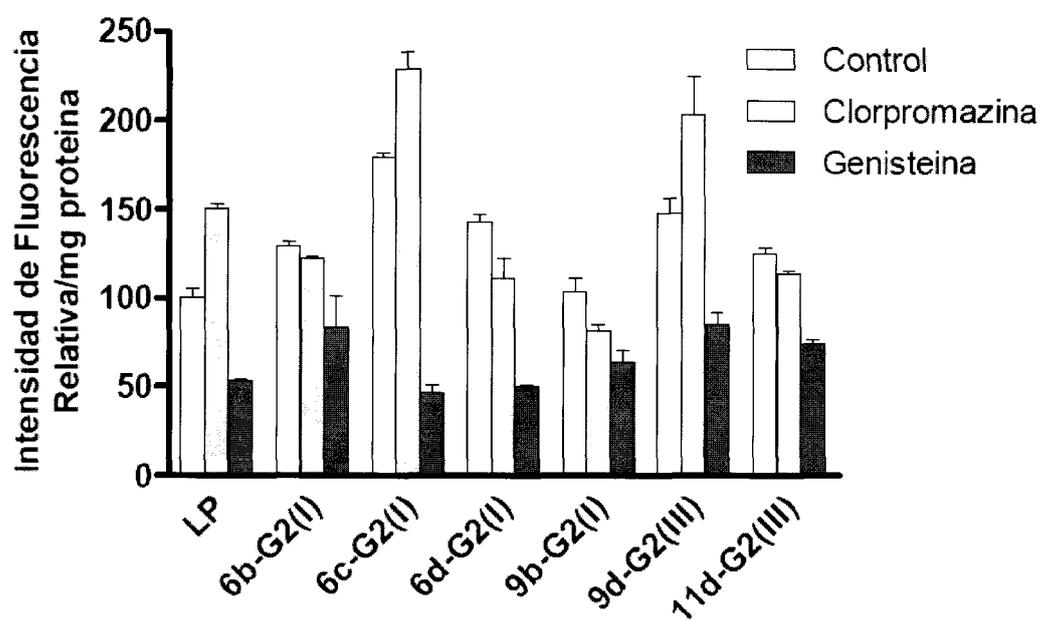


FIG. 6

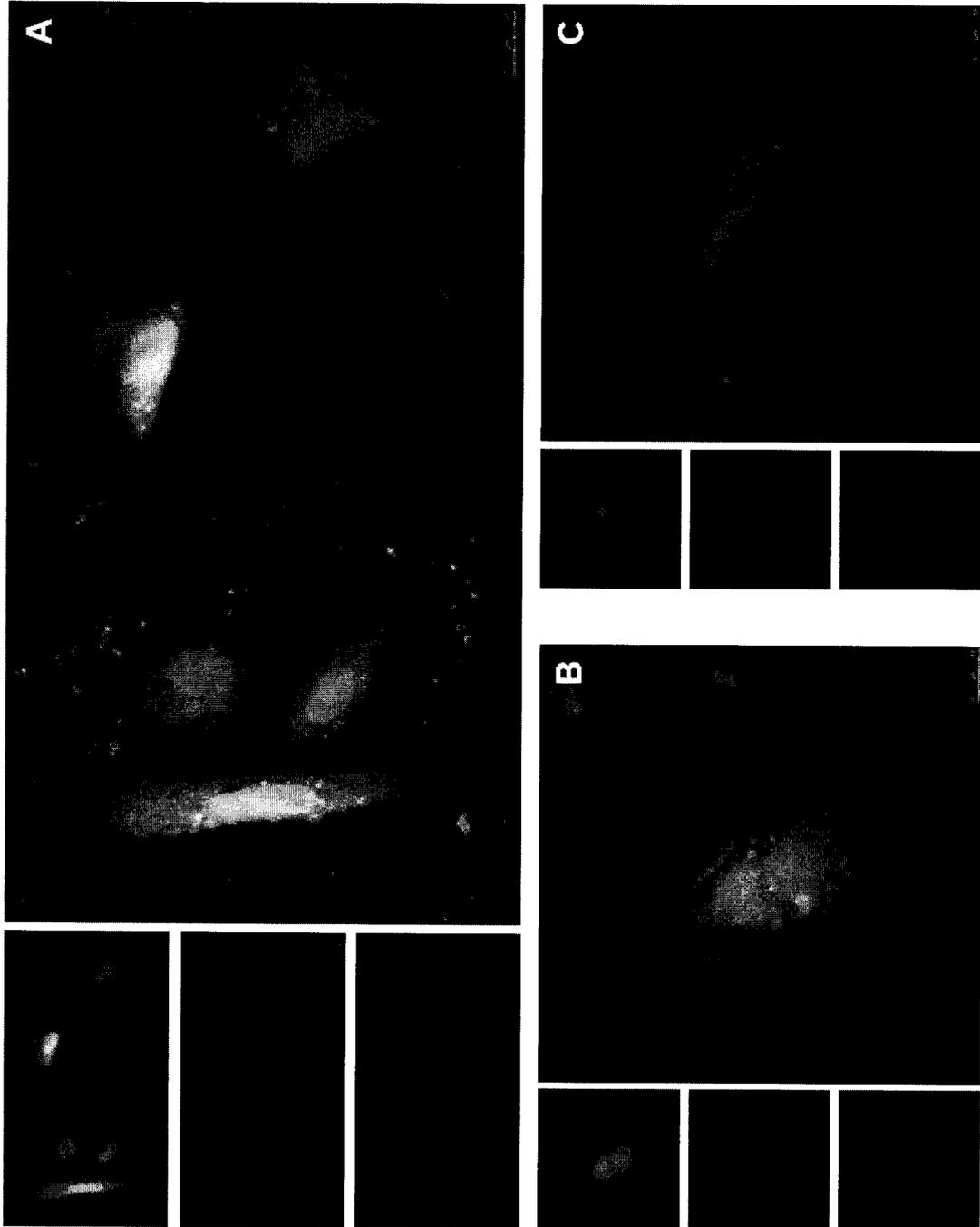


FIG. 7



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001350

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.10.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SANTOS, J.L. y col. Functionalization of poly(amidoamine) dendrimers with hydrophobic chains for improved gene delivery in mesenchymal stem cells. Journal of Controlled Release. 21 Mayo 2010, Vol. 144, N° 1, páginas 55-64. Todo el documento.	1-28
A	TAKAHASHI, T. y col. Synthesis of novel cationic lipids having polyamidoamine dendrons and their transfection activity. Bioconjugate Chem., 2003, Vol. 14 , N° 4, páginas 764-773. Todo el documento.	1-28
A	JONES, S.P. y col. Synergistic effects in gene delivery-a structure-activity approach to the optimization of hybrid dendritic-lipidic transfection agents. Chemical Communications. 2008, Vol. 39, páginas 4700-4702. Todo el documento.	1-28
A	JEVPRASESPHANT, R. y col. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity . Pharmaceutical Research. 2003, Vol. 20, N° 10, páginas 1543-1550. Todo el documento.	1-28
A	GUILLOT, M. y col. Effects of structural modification on gene transfection and self-assembling properties of amphiphilic dendrimers. Org. Biomol. Chem. 2006, Vol. 4, páginas 766-769. Todo el documento.	1-28

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  
29.12.2010

Examinador  
E. Albarrán Gómez

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C08G83/00** (01.01.2006)

**C07C233/36** (01.01.2006)

**A61K47/48** (01.01.2006)

**A61K48/00** (01.01.2006)

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

C08G, C07C, A61K

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

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, WPI, PUBMED, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.12.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-28	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-28	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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 se publica.

**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	SANTOS, J.L. y col. Functionalization of poly(amidoamine) dendrimers with hydrophobic chains for improved gene delivery in mesenchymal stem cells. Journal of Controlled Release. 21 Mayo 2010, Vol. 144, Nº 1, páginas 55-64.	
D02	TAKAHASHI, T. y col. Synthesis of novel cationic lipids having polyamidoamine dendrons and their transfection activity. Bioconjugate Chem., 2003, Vol. 14, Nº 4, páginas 764-773.	
D03	JONES, S.P. y col. Synergistic effects in gene delivery-a structure-activity approach to the optimization of hybrid dendritic-lipidic transfection agents. Chemical Communications. 2008, Vol. 39, páginas 4700-4702.	
D04	JEVPRASESPHANT, R. y col. Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity. Pharmaceutical Research. 2003, Vol. 20, Nº 10, páginas 1543-1550.	
D05	GUILLOT, M. y col. Effects of structural modification on gene transfection and self-assembling properties of amphiphilic dendrimers. Org. Biomol. Chem. 2006, Vol. 4, páginas 766-769.	

**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**

La presente invención se refiere a dendrímeros que comprenden un núcleo de PAMAM (G2) derivatizado con grupos alquil sulfonilo o colesterol-sulfonilo, a su procedimiento de obtención mediante reacciones de adición de Michael entre compuestos derivados de vinilsulfona y dendrímeros aminados tipo PAMAM, a los complejos que comprenden estos dendrímeros y un fragmento de ADN, a su uso para la preparación de una composición farmacéutica y al uso de las composiciones de estos dendrímeros como agentes de transfección génica.

El documento D01 se refiere a dendrímeros a PAMAM de tamaño medio G5 con alto contenido en grupos amino tanto en la periferia como en el interior, conjugados con los ácidos grasos: ácido laurico (ácido dodecanoico), ácido mirístico (ácido tetradecanoico) y ácido palmítico (ácido hexadecanoico), con el fin de obtener dendrímeros de PAMAM G5 unidos en la periferia a cadenas hidrofóbicas. Estos vectores mostraron capacidad de neutralización, unión y compactación de pDNA (DNA plasmídico), así como conferir protección contra nucleasas del suero. Los experimentos *in vitro* con cultivos de células madre mesenquimales (con relevancia en medicina clínica regenerativa) revelaron la remarcable capacidad de estos vectores de internalizar pDNA con bajos niveles de toxicidad, estando este efecto relacionado con el contenido de  $\square$ CH<sub>2</sub>- de la parte hidrofóbica. La expresión génica también fue potenciada utilizando estos vectores, la mayor eficacia de expresión génica corresponde al vector con la cadena hidrofóbica más corta (con ácido laurico).

El documento D02 divulga un estudio de transfección génica que utiliza dendrímeros de PAMAM de generaciones G1 a G4 funcionalizados con dos cadenas de dos grupos dodecilo. Los autores señalan que mientras el lipoplexo formado con G1 no tenía capacidad de transfección, los lipoplexos formados con G2, G3 y G4 tienen esta actividad, y que esta actividad aumenta al incrementarse la generación del dendrímero. La eficiencia de transfección del lipoplexo formado con G3 y complementado con dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) es superior a la del vector no viral ampliamente utilizado que lleva colesterol y conocido como DC-Chol.

En el documento D03 se hace referencia a dendrímeros de PAMAM G1 y G2 funcionalizados con 1 o 2 moléculas de colesterol como motivo hidrofóbico para estos agentes de transfección no virales.

El documento D04 utiliza dendrímeros de PAMAM de generaciones G2, G3 y G4 conjugados con cadenas de láurico.

El documento D05 divulga un estudio en que se utilizan dendrímeros anfifílicos formados por un dendrón lipofílico y otro dendrón hidrofílico unidos por un núcleo rígido de difeniletino.

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica dendrímeros tipo PAMAM funcionalizados con grupos alquil sulfonilo o colesterol-sulfonilo. En consecuencia, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1-28 de la presente solicitud tiene novedad e implican actividad inventiva (Art. 61. y 8.1 LP11/1986).