



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 140**

51 Int. Cl.:
C07C 237/12 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/225 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06701592 .5**
96 Fecha de presentación : **03.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1848684**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2007**

54 Título: **Compuestos tensioactivos "Gemini" con enlace éster para uso en terapia génica.**

30 Prioridad: **07.02.2005 GB 0502482**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2011

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Castro, Mariano Javier;**
Kitson, Christopher;
Ladlow, Mark y
Patel, Alpesh

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 140 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Esta invención se refiere a compuestos tensioactivos unidos a éster recién identificados, al uso de dichos compuestos y a su producción. La invención también se refiere al uso de los compuestos tensioactivos unidos a éster para facilitar la transferencia de compuestos a células para el suministro de fármacos. Los compuestos con propiedades relacionadas con las propiedades de los compuestos de la invención se denominan a menudo tensioactivos Gemini.

Los tensioactivos son sustancias que afectan de forma notable a las propiedades superficiales de un líquido, incluso en bajas concentraciones. Por ejemplo, los tensioactivos reducirán de forma significativa la tensión superficial cuando se disuelven en agua o disoluciones acuosas y reducirán la tensión interfacial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Esta propiedad de las moléculas tensioactivas se ha aprovechado en la industria, en particular en las industrias de detergentes y del petróleo. En los años 70 se describió una nueva clase de moléculas tensioactivas, caracterizadas por dos cadenas hidrófobas con cabezas polares que están unidas por un puente hidrófobo (Deinega, Y. et al., *Kolloidn. Zh.* 36, 649, 1974). Estas moléculas, que se han denominado "gemini" (Menger, F.M. y Littau, C.A., *J. Am. Chem. Soc.* 113, 1451, 1991), tienen muchas propiedades deseables con respecto a sus equivalentes monómeras. Por ejemplo, son muy eficaces en la reducción de la tensión interfacial entre aceite y líquidos basados en agua, y tienen una concentración micelar crítica muy baja (Menger, F.M. y Keiper, J.S., *Angewandte. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2000, 39, 1906).

Los tensioactivos catiónicos se han usado, entre otros, para la transfección de polinucleótidos en células en cultivo, y existen ejemplos de dichos agentes disponibles en el comercio para los científicos relacionados con las tecnologías genéticas (por ejemplo, el reactivo TfxTM-50 para la transfección de células eucariotas disponible en Promega Corp. WI, EE.UU.).

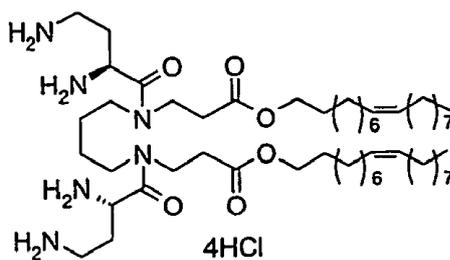
El suministro eficaz de ADN al interior de células *in vivo*, bien para terapia génica o para terapia antisentido, ha sido un objetivo prioritario durante muchos años. Se ha puesto mucha atención en el uso de virus como vehículos de suministro, por ejemplo adenovirus para células epiteliales en el tracto respiratorio con fines de terapia génica correctiva para la fibrosis quística (CF). Sin embargo, a pesar de algunas pruebas de transferencia génica satisfactoria en pacientes con CF, la vía de adenovirus sigue siendo problemática debido a efectos secundarios inflamatorios y una expresión transitoria limitada del gen transferido. Se han investigado varios métodos alternativos para el suministro de genes *in vivo*, incluyendo estudios que usan tensioactivos catiónicos. Gao, X. et al. *Gene Ther.* 2, 710-722, 1995, demostraron la idoneidad de esta técnica con un gen humano normal para el regulador de conductancia transmembrana en la CF (CFTR) en el epitelio respiratorio de ratones con CF usando lípidos catiónicos portadores de amina. Este grupo realizó un seguimiento con un ensayo de terapia génica para CF liposomal que, aunque solo con un éxito parcial, demostró la posibilidad de esta técnica en seres humanos (Caplen, N.J. et al., *Nature Medicine*, 1, 39-46, 1995). Más recientemente, otros grupos han investigado el potencial de otros lípidos catiónicos para el suministro de genes (Miller, A, *Angew. Int. Ed. Engl.*, 37, 1768-1785, 1998), por ejemplo derivados de colesterol (Oudrhiri, N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1651-1656, 1997). Este estudio limitado demostró la capacidad de estos compuestos basados en colesterol para facilitar la transferencia de genes en células epiteliales tanto *in vitro* como *in vivo*, apoyando de este modo la validez de esta técnica general.

Recientemente, se ha revisado el uso de vectores no víricos (lípidos catiónicos) para la transfección de genes, véase D. Niculescu-Duvaz, J. Heyes y C. J. Springer, *Curr. Med. Chem.*, 2003, 10, 1233.

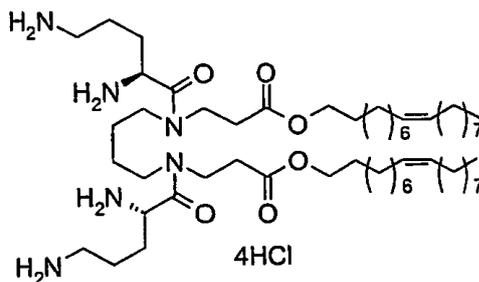
Estos estudios, y otros, muestran que en este nuevo campo de investigación existe una continua

saturada o insaturada, R₁ o R₂ de 10 a 24 átomos de carbono, se selecciona de:

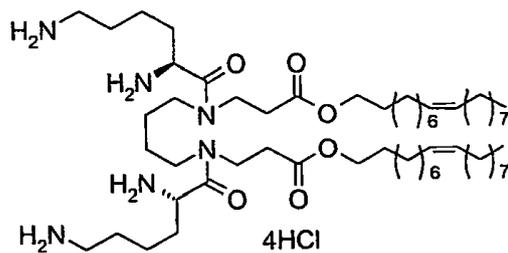
- 5
 - (CH₂)₁₀CH₃
 - (CH₂)₁₂CH₃
 - (CH₂)₁₄CH₃
 - (CH₂)₁₆CH₃
 - (CH₂)₁₈CH₃
 - (CH₂)₂₀CH₃
 - (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ mezcla natural
 - (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₅CH₃ mezcla natural
- 10
 - (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₅CH₃ Cis
 - (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ Cis
 - (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₅CH₃ Trans
 - (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ Trans
 - (CH₂)₇CH=HCH₂CH=CH(CH₂)₄CH₃
- 15
 - (CH₂)₇(CH=CHCH₂)₃CH₃
 - (CH₂)₃CH=CH(CH₂CH=CH)₃(CH₂)₄CH₃
 - (CH₂)₇CHCH(CH₂)₇CH₃
 - CH₂CH(CH₃)[CH₂CH₂CH₂CH(CH₃)]₃CH₃
 - o -(CH₂)₂₂CH₃.
- 20
 - Lo más preferiblemente, la cadena de hidrocarburo se selecciona de (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ mezcla natural, (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ Cis y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ Trans.
 - Preferiblemente n es de 3 a 6. Lo más preferiblemente n es 4.
 - Preferiblemente p es de 1 a 4. Lo más preferiblemente p es 2.
- 25
 - En una realización, un compuesto de la invención es un compuesto tensioactivo llamado "Gemini". Es decir, que el compuesto es simétrico en cuanto que cada Y es el mismo, y R₁ y R₂ son los mismos. En el contexto de la presente invención dichos compuestos se llaman "éster geminis".
 - En una realización más preferida, el éster gemini se selecciona del grupo que consiste en:



;

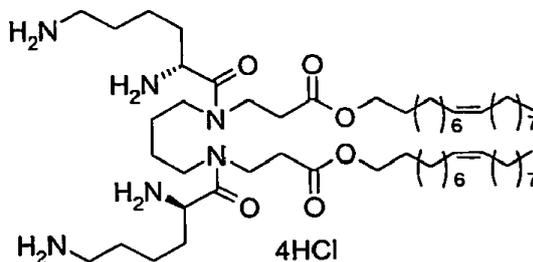


;



;

y



Los compuestos de la presente invención se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles fácilmente usando química de síntesis bien conocida por los expertos en la técnica. La figura 5 1 muestra un esquema general para la síntesis de compuestos preferidos de la invención en los que $p = 2$. Para compuestos en los que $p = 1$ o de 3 a 6, se pueden usar otros ácidos dicarboxílicos (compuesto intermedio 3 en la figura 1) como materiales de partida, usando técnicas bien conocidas en la materia, por ejemplo, Jaine, N. et al.; *Journal of Inorganic Biochemistry* 1994, 53(2), 79-94 para cuando $p = 1$; 10 Reppe et al.; JLACBF; *Justus Liebigs Ann. Chem.*; 596; 1955; 1.215 para cuando $p = 3$ y Gautier; Renault; *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*; 69; 1950; 421, 426 para cuando $p = 4$.

El experto en la técnica conoce diferentes estrategias alternativas, y se pueden diseñar estrategias adecuadas para cualquier patrón de sustitución final particular deseado. Para patrones de sustitución asimétricos, puede ser necesaria la separación física de productos o compuestos intermedios. 15 Los métodos de separación adecuados, por ejemplo métodos cromatográficos, son conocidos para el experto en la técnica.

Las sales de las moléculas de acuerdo con la invención se pueden preparar por técnicas convencionales.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para usar los compuestos tensioactivos unidos a éster. Dichos usos incluyen usar los compuestos de la invención para facilitar la transfección de 20 polinucleótidos en células en cultivo cuando se requiera dicha transferencia en, por ejemplo, estudios de expresión génica y experimentos de control antisentido, entre otros. Los protocolos para preparar dichos polinucleótidos y moléculas antisentido son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Cohen, JS ed. *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1989)). Los polinucleótidos se pueden mezclar con los compuestos, 25 añadirse a las células e incubarse para permitir la captación de los polinucleótidos. Después de una incubación adicional, las células se pueden ensayar para determinar el rasgo fenotípico proporcionado

por el ADN transfectado, o se pueden determinar los niveles de ARNm expresados para dicho ADN por transferencia Northern o usando procedimientos de cuantificación basada en PCR, por ejemplo, el método Taqman® (Perkin Elmer, Connecticut, USA). Los compuestos de la invención ofrecen una mejora significativa, normalmente de entre 3 y 6 veces, de la eficacia de la captación celular de ADN en células en cultivo, comparados con compuestos de la técnica anterior. En el protocolo de transfección, el compuesto tensioactivo espermidina se puede usar en combinación con uno o más complementos para aumentar la eficacia de la transfección. Tales complementos se pueden seleccionar de, por ejemplo:

(i) un vehículo neutro, por ejemplo dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE) (Farhood, H., et al (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 1235-1289);

(ii) un reactivo complejante, por ejemplo el reactivo disponible comercialmente PLUS (Life Technologies Inc. Maryland, EE.UU.) o péptidos, tales como péptidos polilisina o poliornitina o péptidos que comprenden fundamentalmente, pero no exclusivamente, aminoácidos básicos tales como lisina, ornitina y/o arginina. La lista anterior no pretende ser exhaustiva y se comprenderá que están dentro del alcance de la invención otros suplementos que aumentan la eficacia de la transfección.

Otro aspecto más de la invención se refiere a procedimientos para efectuar el suministro de compuestos farmacéuticos no basados en nucleótidos al interior de células in vitro usando los compuestos de la invención.

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados con frecuencia en la presente memoria.

"Aminoácido" se refiere a iones dipolares (híbridos o zwitteriónicos) de la forma $^+H_3NCH(R)CO_2^-$. Estos se diferencian por la naturaleza del grupo R, y cuando R es diferente de hidrógeno también pueden ser asimétricos, formando familias D y L. Existen 20 aminoácidos naturales en los que el grupo R puede ser, por ejemplo, no polar (por ejemplo, alanina, leucina, fenilalanina) o polar (por ejemplo, ácido glutámico, histidina, arginina y lisina). En el caso de aminoácidos no naturales, R puede ser cualquier otro grupo que no se encuentre en los aminoácidos encontrados en la naturaleza.

"Polinucleótido" se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificados o ARN o ADN. Los "polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN de cadena sencilla o doble, ADN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla o doble, ARN de cadena sencilla o doble y ARN que es una mezcla de regiones de cadena sencilla o doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena sencilla o, más típicamente de cadena doble, o una mezcla de regiones de cadena sencilla y doble. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones de triple cadena que comprenden ARN o ADN o ARN y ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con cadenas principales modificadas para la estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases no usuales como inosina. Se han realizado en el ADN y ARN una diversidad de modificaciones; así, "polinucleótido" incluye formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente tal como se encuentran típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. "Polinucleótido" también incluye polinucleótidos relativamente cortos, denominados con frecuencia oligonucleótidos.

"Transfección" se refiere al suministro de polinucleótidos en el interior de células en cultivo usando procedimientos que requieren la modificación de la membrana celular por medios químicos o físicos. Tales procedimientos se describen en, por ejemplo, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los polinucleótidos pueden ser lineales o circulares, de cadena sencilla o de doble cadena y pueden

incluir elementos que controlan la replicación del polinucleótido o la expresión de genes homólogos o heterólogos que pueden comprender parte del polinucleótido.

5 Se puede formar una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable por reacción de un compuesto de fórmula (I) con un ácido orgánico o inorgánico adecuado (tal como ácido bromhídrico, clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, succínico, maleico, fórmico, acético, propiónico, fumárico, cítrico, tartárico, láctico, benzoico, salicílico, glutámico, aspártico, p-toluenosulfónico, trifluoroacético, bencenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, naftalenosulfónico, tal como 2-naftalenosulfónico, o hexanoico), opcionalmente en un disolvente adecuado tal como un disolvente orgánico, para producir la sal que habitualmente se aísla, por ejemplo, por cristalización y filtración. Una sal de adición de ácido 10 farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) puede comprender o ser, por ejemplo, una sal hidrobromuro, hidrocloreuro, sulfato, nitrato, fosfato, succinato, maleato, formiato, acetato, propionato, fumarato, citrato, tartrato, lactato, benzoato, salicilato, glutamato, aspartato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, bencenosulfonato, metanosulfonato, etanosulfonato, naftalenosulfonato (por ejemplo, 2-naftalenosulfonato) o hexanoato.

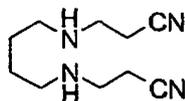
15 La invención incluye dentro de su alcance todas las posibles formas estequiométricas y no estequiométricas de las sales de los compuestos de fórmula (I), incluidos los hidratos y solvatos.

Ciertos compuestos de fórmula (I) son capaces de existir en formas estereoisoméricas. Se entenderá que la invención abarca todos los isómeros geométricos y ópticos de estos compuestos y sus mezclas, incluidos los racematos. Los tautómeros también forman un aspecto de la invención.

20 La invención se describirá ahora por medio de los siguientes ejemplos. No debe considerarse de ninguna forma que los ejemplos limiten el alcance de la invención.

Ejemplos

Descripción 1: N,N'-Bis-(2-cianoetil)-1,4-diaminobutano (2).

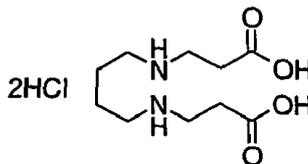


25 A una disolución de 1,4-diaminobutano 1 ($n = 4$; 25,0 g, 0,28 mol) en metanol (50 ml) se añadió gota a gota una disolución de acrilonitrilo (31,6 g, 0,60 mmol) en metanol (25 ml) a 0°C. Después de la adición, la mezcla se dejó que llegara a temperatura ambiente y después se agitó durante 18 h. Finalmente, el disolvente se separó a vacío, para dar la diamina 2 en forma de un líquido amarillo pálido (57,0 g, cuant.).

30 $R_{f\text{Silice}}$: 0,60 (MeOH-NH₃0,88 95:5).

RMN de ¹H (CDCl₃): δ_H 2,88 (m, 4H), 2,60 (m, 4H), 2,46 (m, 4H), 1,45 (m, 4H).

Descripción 2: Dihidrocloreuro de N,N'-Bis-(2-carboxietil)-1,4-diaminobutano (3).

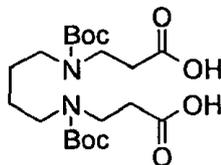


35 Una disolución del compuesto 2 ($n = 4$; 10,0 g, 51,5 mmol) en HCl 6 N (80 ml) se calentó a reflujo durante 18 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó parcialmente a vacío. Se añadió a la disolución residual EtOH (40 ml) y el sólido precipitado se separó

por filtración y se lavó con EtOH (10 ml) para proporcionar el ácido dicarboxílico 3 en forma de un sólido blanco (17,4 g, cuant.).

RMN de ^1H (d^6 DMSO): δ_{H} 12,70 (s ancho, 2H), 3,05 (t, $J = 7,5$, 4H), 2,88 (m, 4H), 2,72 (t, 4H), 1,65 (m, 4H).

- 5 **Descripción 3: N,N'-Bis-(2-carbetoxietil)-N,N'-bis-(terc-butoxicarbonil)-1,4-diaminobutano (4).**

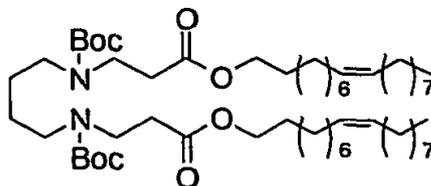


- 10 A una disolución del compuesto 3 ($n = 4$; 19,9 g, 65,3 mmol) en NaOH 1 N (350 ml) se añadió una disolución de dicarbonato de di-*terc*-butilo (57,0 g, 261 mmol) en dioxano (350 ml). La mezcla se agitó a t.a. durante 18 h, y después se concentró a la mitad del volumen. El residuo se ajustó a pH 3-4, y después se extrajo con diclorometano (250 ml x 3). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (150 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a vacío para dar el carbamato 4 en forma de un polvo blanco (24,4 g, 87%).

$R_{\text{f}}^{\text{Silice}}$: 0,31 (EtOAc-MeOH 2:1).

- 15 LC-MS (ESI): $t_{\text{R}} = 4,04$ min ($m/z = 433,1$ [$\text{M}+\text{H}^+$]).

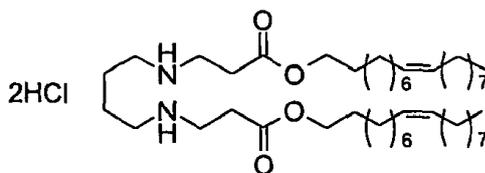
Descripción 4: Éster de octadec-8-enilo del ácido 3-(terc-butoxicarbonil-{4-[terc-butoxicarbonil-(2-octadec-8-eniloxicarboniletil)-amino]-butil}-amino)-propiónico (5).



- 20 A una disolución del aminoácido *N*-protegido 4 ($n = 4$; 15,2 g, 35,1 mmol), dimetilaminopiridina (1,70 g, 14,0 mmol) y alcohol oleílico (18,4 g, 68,4 mmol) en diclorometano (200 ml) se añadió una disolución de EDCI (13,1 g, 68,4 mmol) en diclorometano (50 ml) a 0°C . La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y después se agitó en atmósfera de N_2 durante 18 h. Se añadió diclorometano (250 ml) y la mezcla se lavó con salmuera (4 x 200 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró a vacío para dejar un aceite que se purificó por cromatografía en columna eluyendo con un gradiente de disolventes de CH_2Cl_2 (50-90%) en hexano para proporcionar el éster 5 como un aceite incoloro (13,0 g, 40%). $R_{\text{f}}^{\text{Silice}}$: 0,61 (Hex-EtOAc 7:3).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ_{H} 5,32 (m, 4H), 4,05 (t, $J = 7,0$, 4H), 3,42 (s ancho, 4H), 3,18 (s ancho, 4H), 2,53 (s ancho, 4H), 1,98 (m, 8H), 1,60 (m, 6H), 1,42 (m, 22H), 1,40-1,20 (m, 40H), 0,86 (t, $J = 7,0$, 6H).

- 30 **Descripción 5: Sal de bishidrocloruro del éster de octadec-9-enilo del ácido 3-[4-(2-octadec-9-eniloxicarbonil-etilamino)-butilamino]-propiónico (6)**



- El éster 5 ($n = 4$, $R = \text{oleilo}$; 13,0 g, 13,9 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (70 ml) y se trató con HCl 4 M en EtOAc (140 ml). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 2 h, después se separó el disolvente a vacío y el residuo se trituroó con éter dietílico anhidro (150 ml) para proporcionar un sólido que se secó a vacío para proporcionar el bis-hidrocloruro 6 en forma de un polvo blanco (10,23 g, 91%).

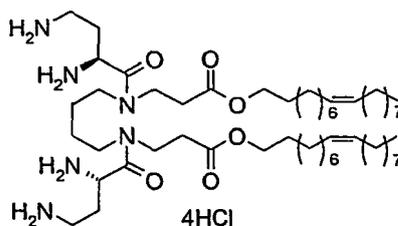
$R_{f\text{Silice}}$: 0,46 (MeOH-NH₃0,88 97:3).

LC-MS (ESI): $t_R = 8,07$ min ($m/z = 733,6$ [$M+H^+$]).

Descripción 6: Procedimiento general para preparar tensioactivos (8a-d).

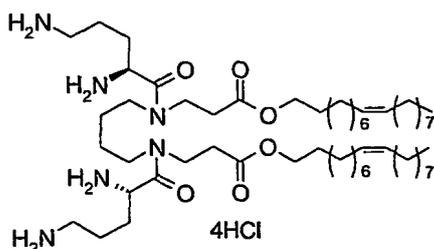
- El aminoácido *N*-terminal protegido (0,41 mmol, 2,6 eq.), HCTU (168 mg, 0,41 mmol, 2,6 eq.) y diisopropiletilamina (0,19 ml, 1,10 mmol, 7,0 eq.) se añadieron a una disolución del hidrocloruro de amina 6 ($n = 4$, $R = \text{oleilo}$; 150 mg, 0,156 mmol) en DMF- CH_2Cl_2 [1:1] (4,0 ml). La mezcla se agitó a t.a. en atmósfera de N_2 durante 18 h y después la mezcla se concentró hasta un volumen pequeño y se añadió EtOAc (30 ml). La disolución orgánica se lavó sucesivamente con disolución acuosa de KHSO_4 al 5% (3 x 8 ml), disolución acuosa de K_2CO_3 al 5% (3 x 8 ml) y salmuera (3 x 10 ml), después se secó (Na_2SO_4) y se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de fase inversa eluyendo con un gradiente de disolventes de MeOH (50-100%) en agua y después por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con un gradiente de disolventes de EtOAc (20-40%) en hexano. El residuo se disolvió en EtOAc (2,0 ml) y se añadió HCl 5,0 N en EtOAc (3,0 ml). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 2 h y después se concentró a vacío y el residuo sólido se trituroó con éter dietílico (5,0 ml) para proporcionar los tensioactivos 8a-d en forma de polvos blancos (75-93%).

Ejemplo 1 (8a)



LC-MS (ESI): $t_R = 12,18$ min ($m/z = 933,8$ [$M+H^+$] (100%)); HRMS (ESI) m/z calculado ($\text{C}_{54}\text{H}_{105}\text{N}_6\text{O}_6$) 933,8096, encontrado 933,8096 [$M+H^+$].

Ejemplo 2 (8b)

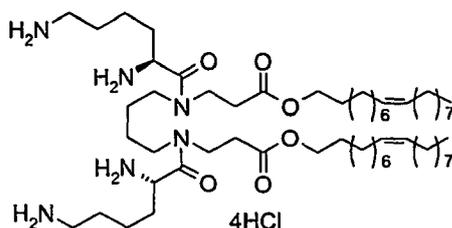


25

LC-MS (ESI): $t_R = 12,15$ min ($m/z = 961,8$ [$M+H^+$] (100%)); HRMS (ESI) m/z calculado

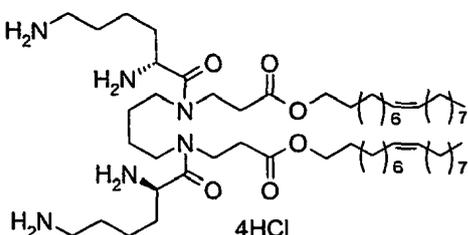
(C₅₆H₁₀₉N₆O₆) 961,8409, encontrado 933,8400 [M+H]⁺.

Ejemplo 3 (8c)



5 LC-MS (ESI): t_R = 12,18 min (m/z = 989,9 [M+H]⁺ (100%)); HRMS (ESI) m/z calculado (C₅₈H₁₁₃N₆O₆) 989,8722, encontrado 989,8718 [M+H]⁺.

Ejemplo 4 (8d)



10 LC-MS (ESI): t_R = 12,20 min (m/z = 989,9 [M+H]⁺ (100%)); HRMS (ESI) m/z calculado (C₅₈H₁₁₃N₆O₆) 989,8722, encontrado 989,8729 [M+H]⁺.

10 Ejemplo 5. Transfección de plásmido recombinante que expresa GFP en células usando compuestos tensioactivos unidos a éster

Se llevaron a cabo estudios de transfección usando la línea celular adherente CHO-K1, CV1, HepG2, 1321N1 y células NIH3T3. El medio completo consistía en F12 (para CHO-K1), y medio DMEM (para CV1, HepG2, 1321N1 y NIH3T3) complementado con suero bovino fetal al 10% en v/v y 1x L-Glutamina. Todos los medios y complementos se obtuvieron de Life Technologies.

Transfección génica in vitro

20 Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de cultivo tisular tratadas (Costar) 16-18 horas antes de la transfección con una densidad aproximada de 2 x 10⁴ células/pocillo. Se preparó una disolución de plásmido 0,025 µg/µl en Optimem. El plásmido usado era pCMV-eGFP obtenido de Clontech. El compuesto tensioactivo unido a éster se disolvió en Optimem como un concentrado 10x para lograr así una concentración final de 20, 10, 5 y 2,5 µg/ml en la mezcla de reacción final. Se mezclaron 10 µl del compuesto tensioactivo unido a éster con 10 µl del plásmido para cada pocillo. El complejo se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se separó el medio de las células en la placa y se lavaron una vez con 100 µl de PBS. Se añadió el complejo (20 µl) a cada pocillo y después se añadieron 25 80 µl de Optimem (sin suero) o medio de crecimiento (suero) para llegar a un volumen final de 100 µl. En el protocolo sin suero, la placa después se incubó durante 6 horas a 37°C y después se separó el medio y se añadió medio completo reciente a cada pocillo y se continuó la incubación durante 18 horas adicionales. En el protocolo del suero, la placa se incubó durante 24 h a 37°C.

30 Los ensayos del gen indicador se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics). Se separó el medio de la placa y las células se lavaron una vez con 100 µl de PBS. Después se añadieron a cada pocillo 100 µl de tampón de lisis indicador (HEPES 50 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, triton al 0,05% x100, DTT 2 mM). Después la placa se puso a -80°C durante 15 min y

posteriormente se dejó descongelar a temperatura ambiente. Después se midió la fluorescencia usando un lector de placa estándar (Tecan Ultra, Tecan) con longitud de onda de excitación a 485 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm.

5 Los resultados se muestran en las figuras 3 (CHO-K1), 4 (HepG2), 5 (CV-1), 6 (1321N1) y 7 (NIH-3T3). Los resultados muestran que los 3 compuestos éster gemini ensayados eran eficaces en la transfección del plásmido de GFP en células CHO-K1, aunque no con eficacias mayores que la Lipofectamina 2000.

Sin embargo, en células HepG2 los 3 compuestos de ensayo gemini eran, en la concentración óptima, más eficaces que la Lipofectamina 2000 con 5 µg/ml.

10 En células CV-1 el compuesto gemini del ejemplo 1 era superior con 10 y 20 µg/ml comparado con la Lipofectamina 2000 en todas las concentraciones. Los compuestos gemini de los ejemplos 3 y 4 parece que transfectaban células CV-1 menos eficazmente que los del ejemplo 1, pero a un nivel comparable con la Lipofectamina 2000.

15 Con respecto a las células 1321N1, los compuestos gemini de los ejemplos 1 y 2 eran casi 5 y 6 veces, respectivamente, más eficaces que la Lipofectamina 2000. En ambos casos, se encontró que la concentración más eficaz del compuesto gemini era la concentración más baja ensayada, es decir 2,5 µg/ml.

El compuesto gemini del ejemplo 4 no era eficaz en la transfección de células 1321N1.

20 Todos los compuestos gemini ensayados con células NIH-3T3 eran más eficaces que la Lipofectamina 2000 en la mayoría de las concentraciones ensayadas. El ejemplo 4 presentó el mejor efecto.

25 Estos resultados, en particular los resultados con células 1321N1 y NIH-3T3, muestran que para cada tipo de célula hay un compuesto gemini óptimo para la transfección con alta eficacia. Por lo tanto, para las células 1321N1 tanto el compuesto del ejemplo 1 como el del ejemplo 2 son agentes de transfección muy eficaces, mientras que el compuesto del ejemplo 4 no era eficaz en absoluto. En cambio, se encontró que el compuesto del ejemplo 4 era muy eficaz para transfectar células NIH-3T3 mientras que los compuestos de los ejemplos 1 y 2 eran significativamente menos eficaces.

30 Por lo tanto, usando los protocolos detallados en este ejemplo, el experto en la técnica puede determinar fácilmente mediante experimentación sencilla, que compuesto éster gemini, sea uno ilustrado en esta memoria o un compuesto no ilustrado pero que se puede hacer de acuerdo con los protocolos sintéticos descritos antes, es el más adecuado para la transfección de cualquier línea celular dada.

Ejemplo 6. Transfección de ARNs*i* en células usando compuestos tensioactivos unidos a éster

35 Se llevaron a cabo estudios de inactivación de genes usando las líneas celulares adherentes A549, CV1 y Caco2. El medio completo consistía en DMEM (para A549 y CV1) y medio EMEM (para Caco2) complementado con suero bovino fetal al 10% en v/v y 1x L-Glutamina. Todos los medios y complementos se obtuvieron de Life Technologies.

Transfección de ARNs*i* in vitro

40 Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de cultivo tisular tratadas (Costar) 16-18 horas antes de la transfección con una densidad aproximada de 2×10^4 células/pocillo. Se preparó una disolución 1 µM de ARNs*i* (que se dirige a JNK1 o control no dirigido) adquirido en Dharmacon, en Optimem. El compuesto tensioactivo unido a éster se disolvió en Optimem como un concentrado 10x para lograr así una concentración final de 5 µg/ml en la mezcla de reacción final. Se usó el reactivo comercial Lipofectamina 2000 con una concentración final de 2,5 µg/ml, siLentFect 1 µg/ml y X-

5 tremeGene en 0,5 µl/pocillo. Una muestra de 10 µl del lípido tensioactivo unido a éster (comercial) con 10 µl del ARNsi para cada pocillo. El complejo se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se separó el medio de las células en la placa y se lavaron una vez con 100 µl de PBS. El complejo (20 µl) se añadió a cada pocillo y después se añadieron 80 µl de medio de crecimiento para llegar a un volumen
 10 final de 100 µl, y la placa se incubó durante 24 h a 37°C. En este punto, las células se lavaron una vez usando 100 µl de PBS y después se lisaron en 100 µl de tampón de lisis de ARN (Promega). Se llevó a cabo la RT-PCR (Taqman) cuantitativa estándar para determinar la abundancia relativa de JNK1 comparado con el gen de mantenimiento GAPDH tanto en células con ARNsi de JNK1 dirigido como en las no destinatarias. El grado de inactivación se expresó como la relación de las copias tratadas (JNK1) de Jnk1 a las copias de control (no destinatarias) de JNK1.

15 Los resultados se muestran en la Figura 2. Se puede ver que en los 3 tipos de células ensayadas, el nivel de Jnk1 se redujo significativamente cuando se transfectaron dúplex de ARNsi en las células usando los compuestos gemini de la presente invención, comparado con las células de control no destinatarias. El nivel de expresión de Jnk1 era entre 70 y 85% inferior que los niveles observados en las células no tratadas. Se observó un efecto de inactivación similar en las células en las que se usó Lipofectamina 2000 para transfectar los dúplex de ARNsi, pero en todos los tipos de células el efecto era menos marcado que el observado con los compuestos éster gemini (entre 65 y 79% inferior que los controles no tratados).

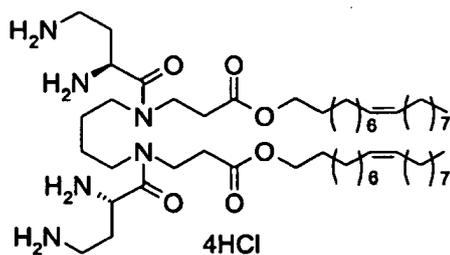
20 Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra un esquema general para la síntesis de un tensioactivo unido a éster.
 La figura 2 muestra la inactivación de la expresión de Jnk1 usando dúplex de ARNsi. El tipo de célula se indica a lo largo del eje X y la relación de las copias tratadas (JNK1) de Jnk1 a las copias de control (no destinatarias) de JNK1 se indica a lo largo del eje Y. Las barras con líneas cruzadas en diagonal se refieren a las células tratadas con el éster gemini del ejemplo 1 y las sombreadas con líneas
 25 discontinuas horizontales se refieren a las células tratadas con Lipofectamina 2000 (ejemplo 6).

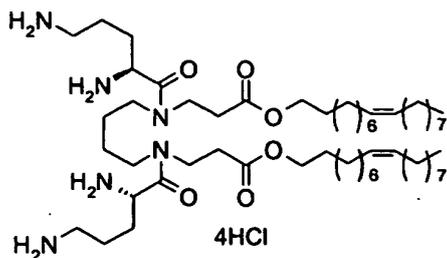
Las figuras 3 y 4 muestran la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células después de transfección de pCMV-eGFP, un plásmido que expresa GFP, en células CHO-K1 (figura 3) y células HepG2 (figura 4) usando ésteres geminis. El nivel de expresión de GFP en las células se muestra como un % del nivel de expresión logrado con la Lipofectamina 2000. Los datos se muestran en 3
 30 bloques de 4 barras, refiriéndose cada bloque a un éster gemini específico. El primer bloque de 4 barras muestra la eficacia de la transfección usando el éster Gemini del ejemplo 1; el segundo bloque el del ejemplo 3 y el tercer bloque el del ejemplo 4. Los Geminis se usó con cuatro concentraciones: 20 µg/ml (líneas cruzadas de arriba a la izquierda a abajo a la derecha); 10 µg/ml (líneas cruzadas de arriba a la derecha a abajo a la izquierda), 5 µg/ml (líneas discontinuas horizontales) y 2,5 µg/ml (líneas horizontales continuas). La Lipofectamina se muestra como una sola barra (LP2K) con 5 µg/ml.

35 Las figuras 5, 6 y 7 muestran la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células después de transfección de pCMV-eGFP, un plásmido que expresa GFP, en células CV-1 (fig. 5), células 1321N1 (fig. 6) y células NIH-3T3 (fig. 7) usando éter geminis. El nivel de expresión de GFP en las células se muestra como un % del nivel de expresión logrado con la Lipofectamina 2000. Los datos se muestran en 4 bloques de 4 barras, refiriéndose cada bloque a un éster gemini específico. El primer
 40 bloque de 4 barras muestra la eficacia de la transfección usando el éster Gemini del ejemplo 1; el segundo bloque el del ejemplo 3, el tercer bloque el del ejemplo 4 y el cuarto bloque la Lipofectamina 2000 (L2K). Los éster geminis y la Lipofectamina 2000 se usaron en cuatro concentraciones: 20 µg/ml (líneas cruzadas de arriba a la izquierda a abajo a la derecha); 10 µg/ml (líneas cruzadas de arriba a la

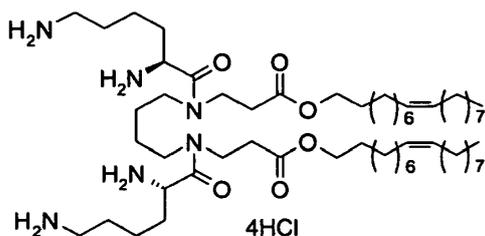
derecha a abajo a la izquierda), 5 $\mu\text{g/ml}$ (líneas discontinuas horizontales) y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (líneas horizontales continuas).



7. El compuesto de fórmula:

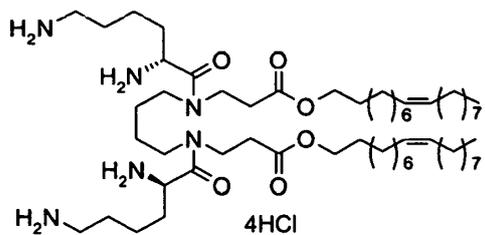


8. El compuesto de fórmula:



5

9. El compuesto de fórmula:



10

10. El uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para facilitar la transfección de ADN o ARN o análogos de los mismos en una célula eucariota o procarionta in vitro.

11. El uso de un compuesto según la reivindicación 10, en el que el compuesto se usa en combinación con uno o más complementos seleccionados del grupo consistente en:

- (i) un vehículo neutro; o
- (ii) un reactivo complejante.

15

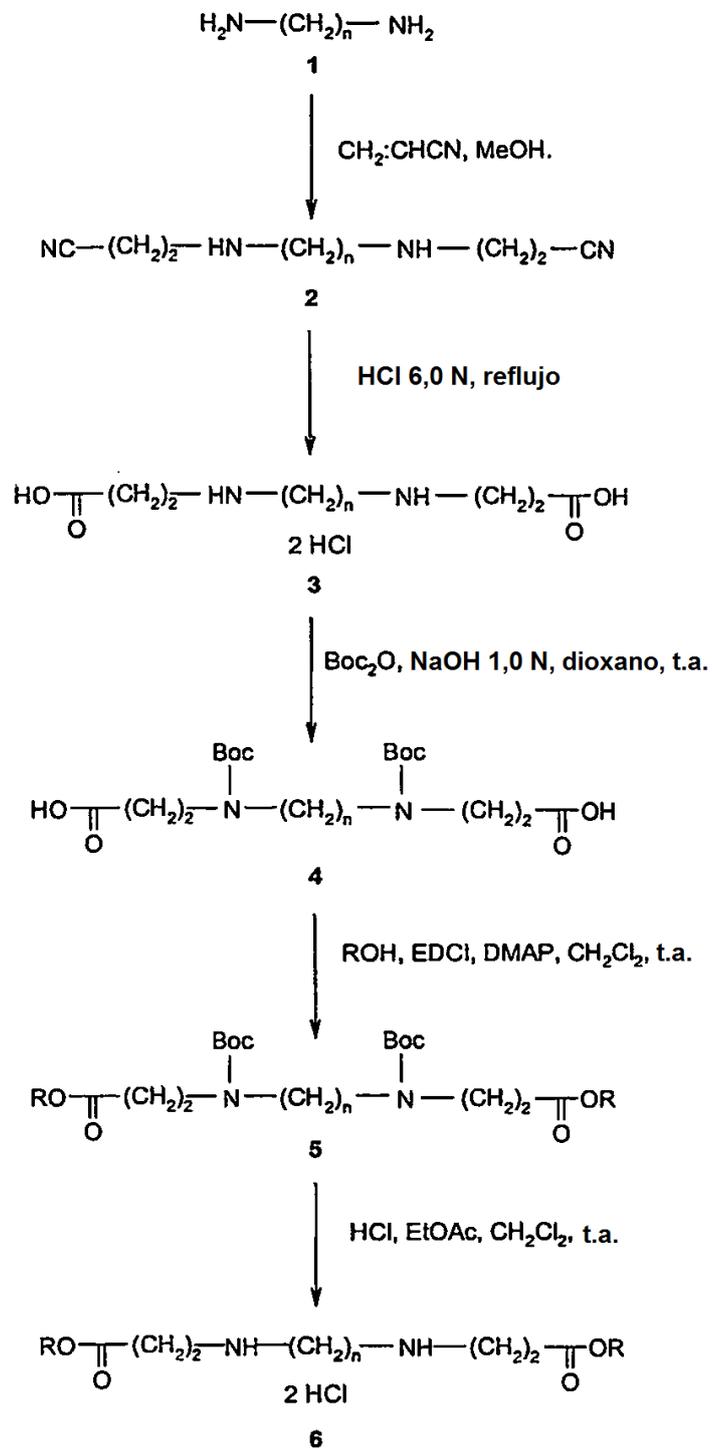
12. El uso según la reivindicación 11, en el que el vehículo neutro es dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE).

13. El uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que el reactivo complejante es el reactivo PLUS.

14. El uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que el reactivo complejante es un péptido que comprende fundamentalmente aminoácidos básicos.

15. El uso según la reivindicación 14, en el que el péptido consiste en aminoácidos básicos.
16. El uso según la reivindicación 15, en el que los aminoácidos básicos se seleccionan de lisina y arginina.
17. El uso según la reivindicación 15, en el que el péptido es polilisina o poliornitina.

Figura 1



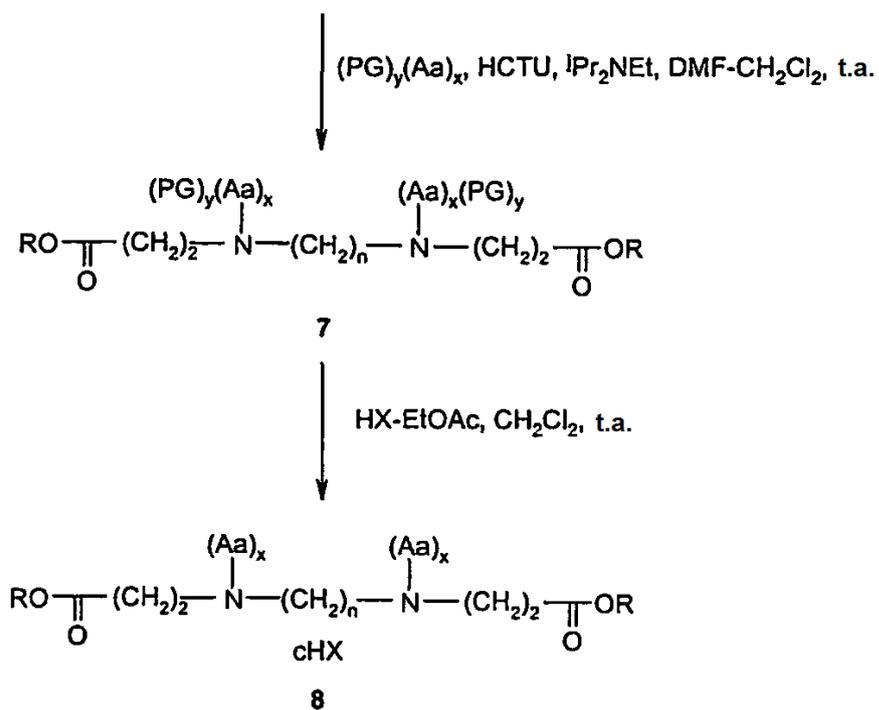
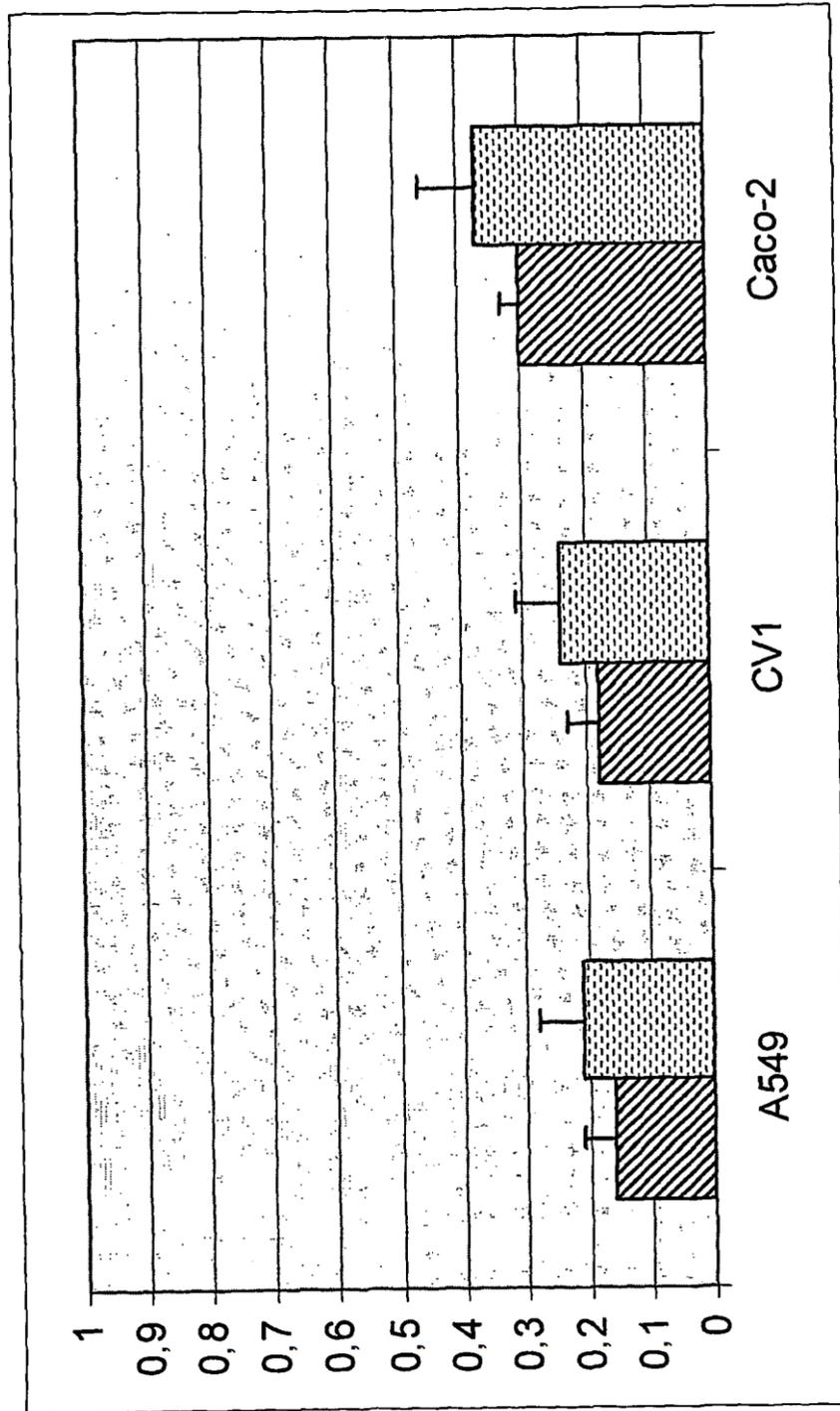


Figura 2



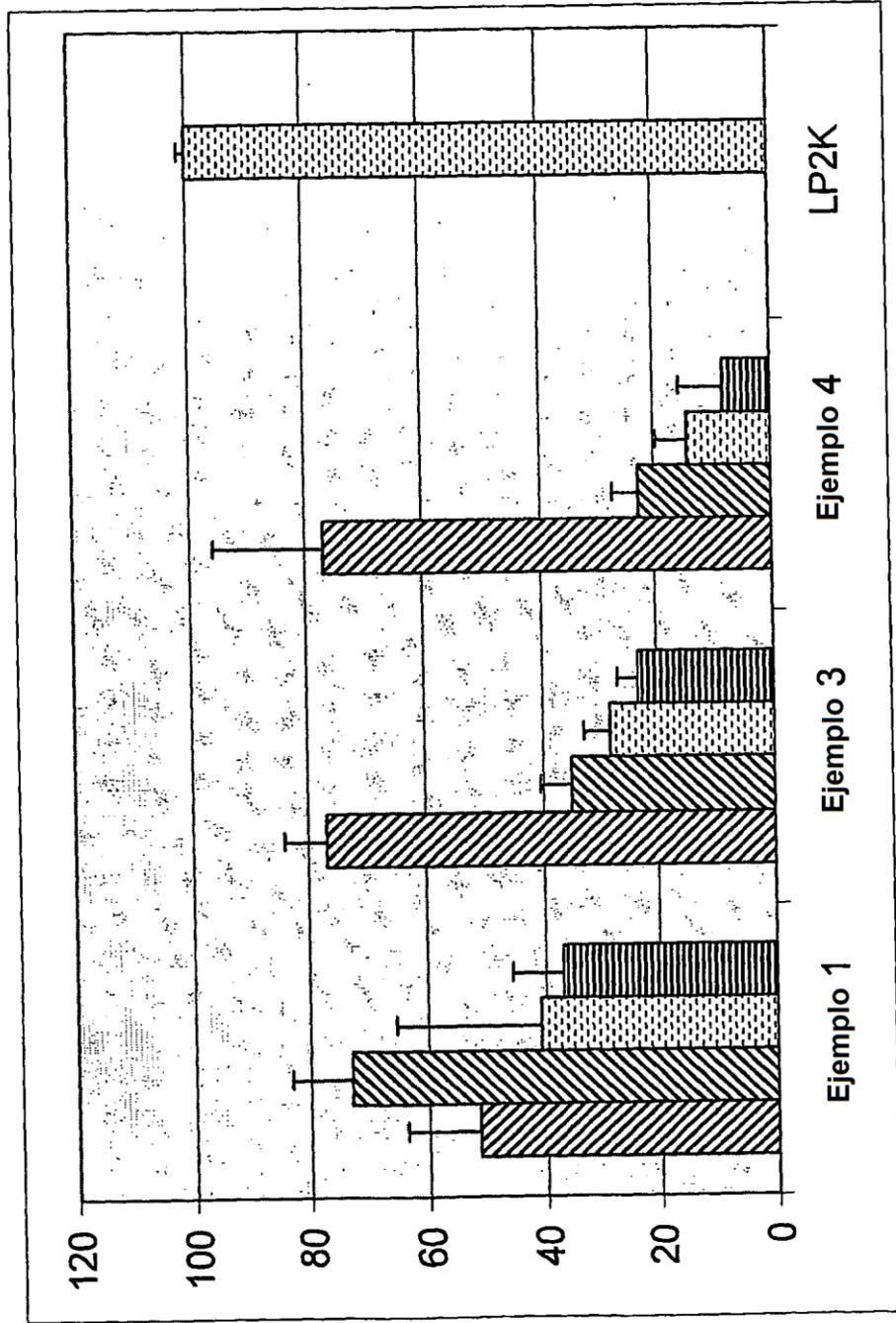


Figura 3

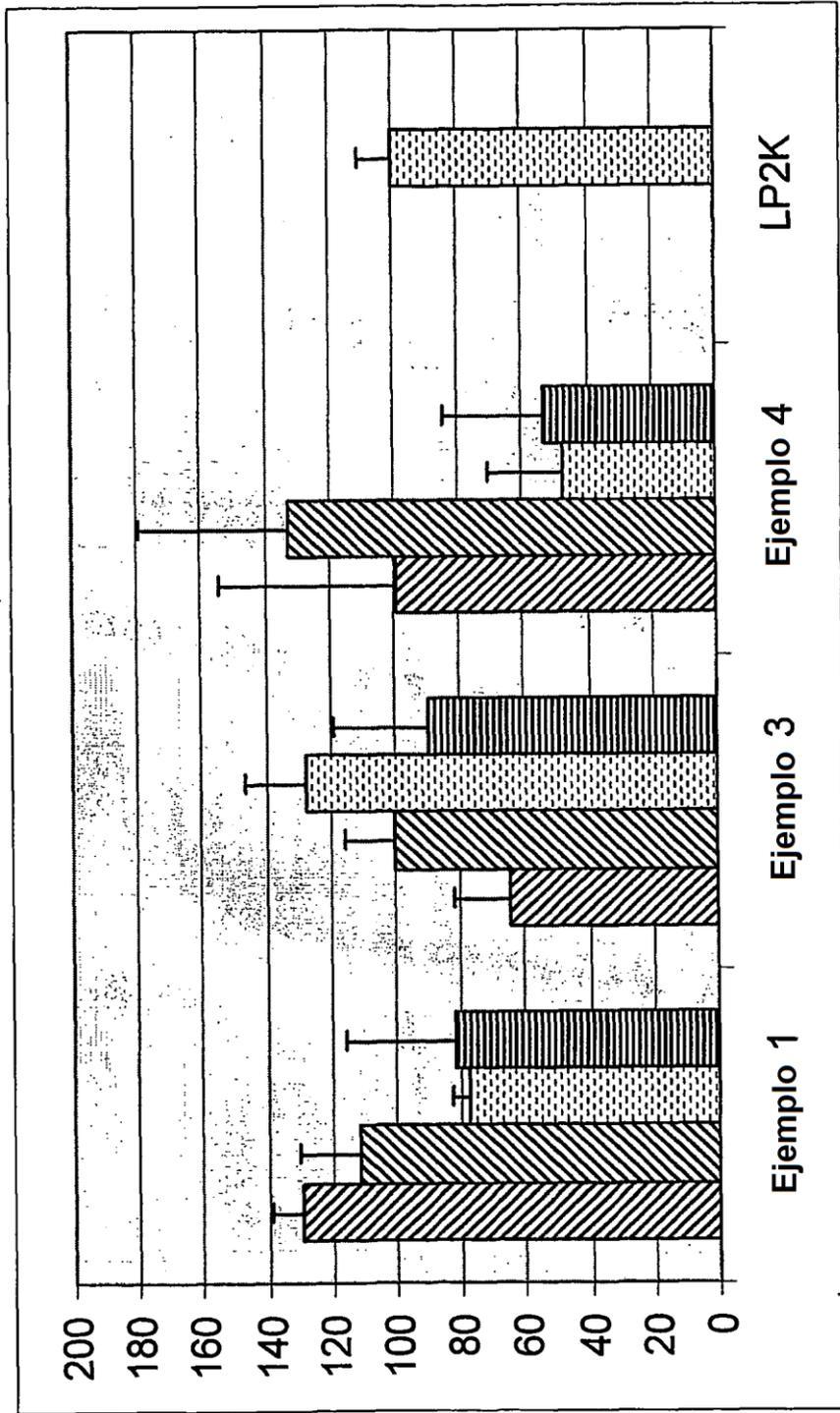


Figura 4

Figura 5

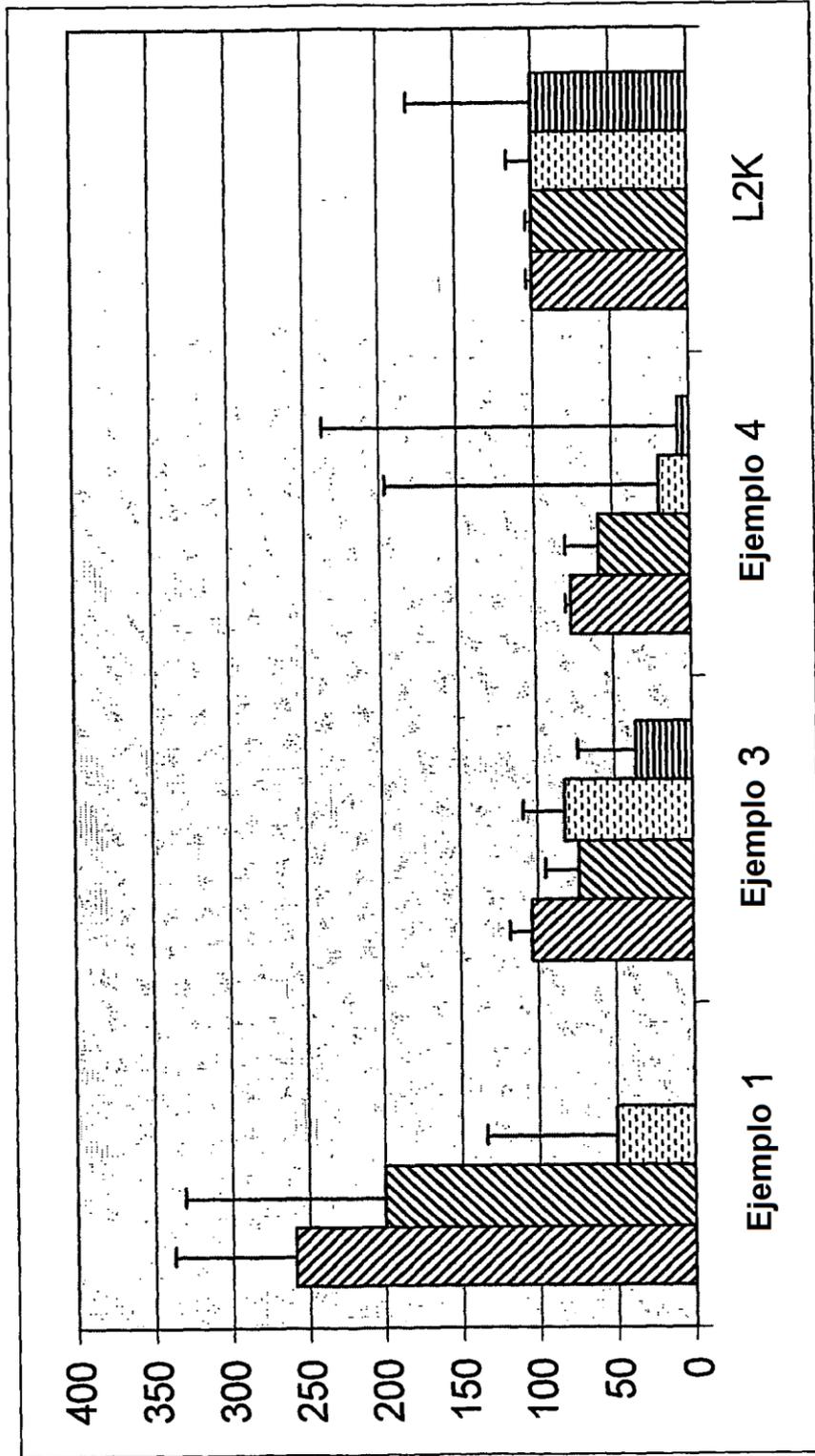
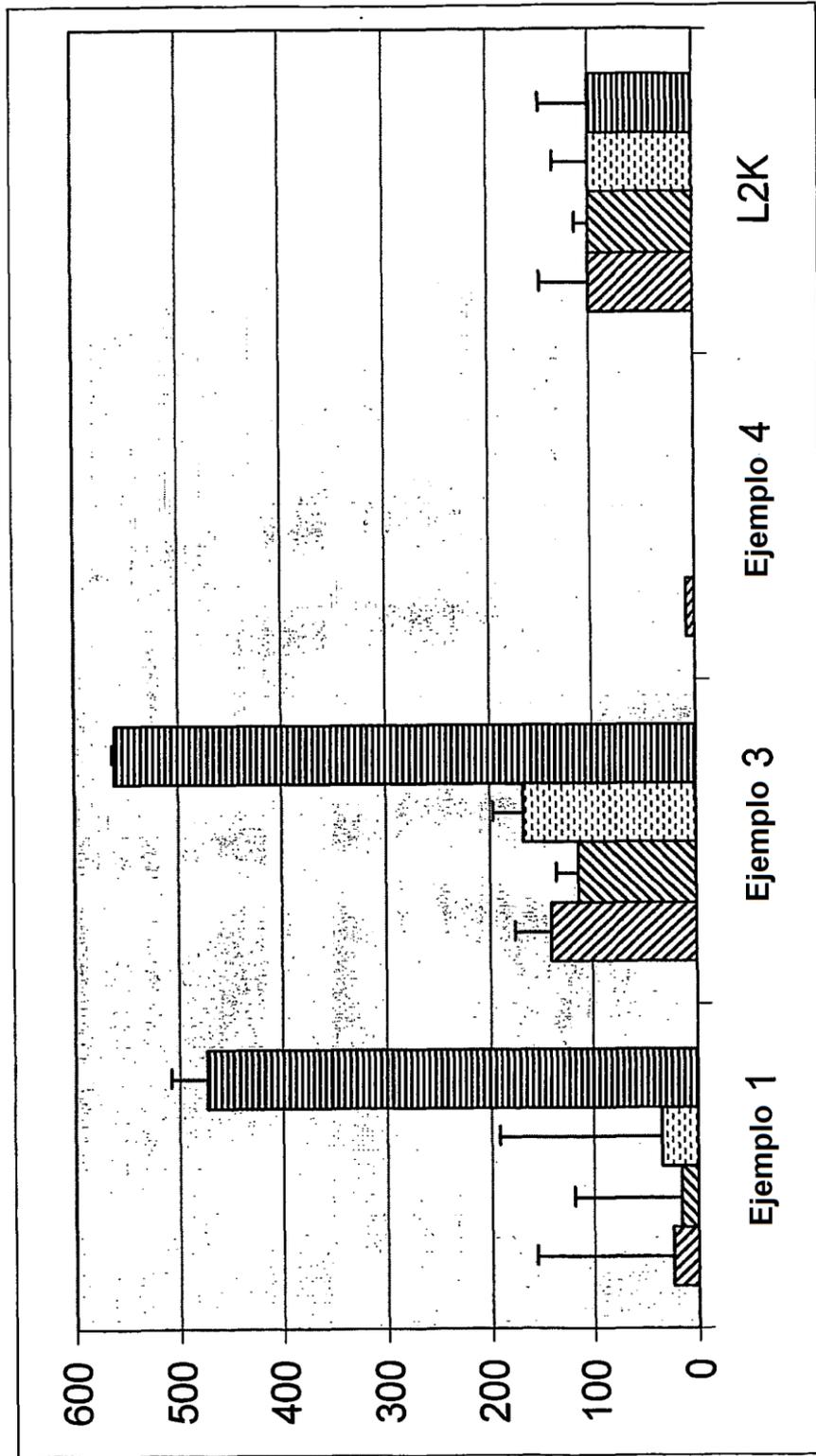


Figura 6



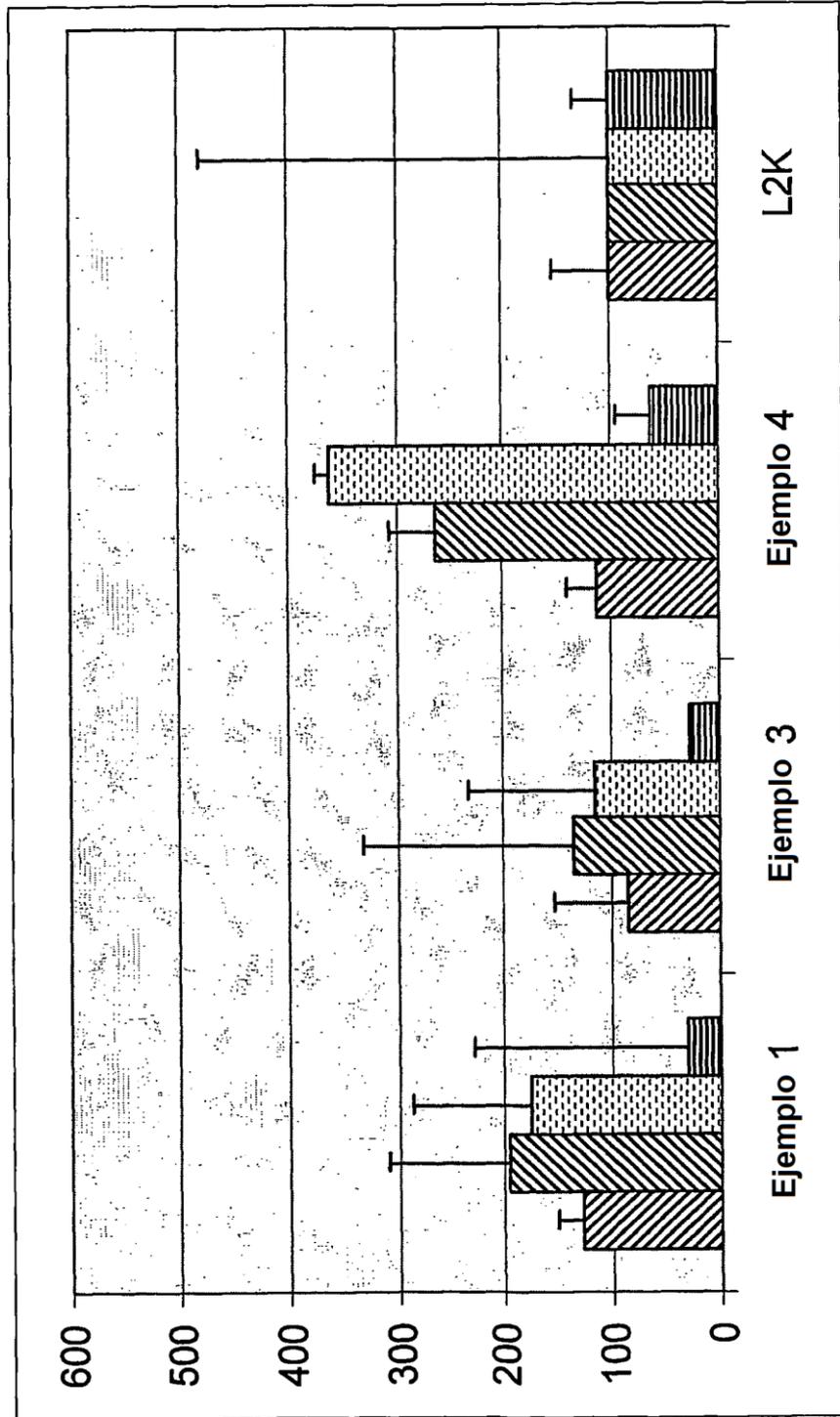


Figura 7