



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 364 264**

⑫ Número de solicitud: 201030233

⑬ Int. Cl.:
C08G 77/52 (2006.01)
C07F 7/18 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **18.02.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
30.08.2011

⑮ Solicitante/s:
Universidad de Alcalá de Henares (Titular al 50 %)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES
Hospital General Universitario
Gregorio Marañón (Titular al 50 %)

⑯ Inventor/es:
Mata de la Mata, Francisco Javier de la;
Gómez Ramírez, Rafael;
Muñoz Fernández, María Ángeles;
Sánchez-Nieves Fernández, Javier;
Rasines Moreno, Beatriz;
Arnaiz Garrido, Eduardo;
Chonco Jiménez, Louis y
Serramía Lobera, María Jesús

⑰ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑱ Título: **Dendrímeros carbosilanos y su uso como antivirales.**

⑲ Resumen:
Dendrímeros carbosilanos y su uso como antivirales.
Macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifuncional, de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos aniónicos que dan a la macromolécula una carga neta negativa. Además, la invención se refiere al uso de los dendrímeros como antimicrobiano y el procedimiento de obtención de los mismos.

ES 2 364 264 A1

DESCRIPCIÓN

Dendrimeros carbosilanos y su uso como antivirales.

5 La presente invención se refiere a macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo poli-funcional, denominadas dendrimeros, de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos aniónicos que dan a la macromolécula una carga neta negativa. Además la invención se refiere a su procedimiento de obtención y sus usos en biomedicina.

10 **Estado de la técnica anterior**

Los dendrimeros son moléculas hiperramificadas de construcción arborescente, de tamaño y estructura tridimensional bien definidos y que poseen unas propiedades químicas uniformes debidas en parte a su baja polidispersidad. La naturaleza y propiedades de los dendrimeros se pueden controlar actuando sobre el núcleo de crecimiento del dendrí-
15 mero, sobre las unidades o ramas de crecimiento o sobre la periferia del dendrímero que es susceptible de incorporar una variedad muy grande de grupos funcionales. Los primeros trabajos describiendo la síntesis de dendrimeros fueron publicados hace algo más de dos décadas. Desde entonces ha crecido la capacidad de diseño de nuevas estructuras dendríticas, lo que ha dado lugar a un gran número de publicaciones en este campo y a su vez ha atraído la atención de investigadores de diferentes disciplinas científicas ante la variedad de aplicaciones que pueden presentar este tipo de compuestos. En la última década se ha empezado a investigar el potencial de los dendrimeros en aplicaciones biomédicas, descubriendo su utilidad en campos como por ejemplo terapia génica, donde el dendrímero actúa como un vehículo de transporte no viral de biomoléculas tratando de optimizar el efecto terapéutico de estas. También se han descrito aplicaciones de los dendrimeros como agentes de contraste de imagen en resonancia magnética nuclear o transporte de boro 10 en la terapia de captura de neutrones utilizada en determinados tumores. Sin embargo, es bastante reciente el descubrimiento de que los dendrimeros por si mismos pueden tener una actividad biológica, actuando así por ejemplo como agentes antibacterianos o antivirales.

De esta manera, se han sintetizado moléculas dendríticas que contienen en su superficie grupos adecuados para formar complejos con receptores celulares o virales rompiendo la interacción virus-célula, incluyendo la unión inicial
30 del virus a la pared celular. Algunas de estas moléculas han mostrado actividad *in vitro* frente a una variedad de virus, como VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), VHS (Virus del Herpes Simple), Virus de la gripe u otros.

La capacidad de los dendrimeros para interferir en la interacción virus-célula sugiere que ellos podrían actuar como microbicidas tópicos, es decir, compuestos aplicados sobre la mucosa vaginal o rectal para impedir enfermedades de
35 transmisión sexual.

Los dendrimeros descritos en la bibliografía y potencialmente útiles como agentes antivirales pueden presentar distintos tipos de esqueletos, pero en lo que se refiere a los grupos funcionales que presentan en su periferia, que son los verdaderos responsables de su actividad antiviral, pueden ser agrupados en tres tipos: carbohidratos, péptidos y aniones.
40

Dendrimeros funcionalizados con carbohidratos: los glicodendrimeros han sido las macromoléculas dendríticas más comúnmente utilizadas hasta la fecha como antivirales. Se han estudiado frente a varios tipos de virus, pero uno de los estudios más exhaustivos ha sido frente al virus de la gripe. Estudios *in vivo* utilizando dendrimeros tipo
45 PAMAM funcionalizados en la periferia con ácido siálico demostró que estos compuestos protegen completamente frente a la infección en un modelo de gripe murino, observándose que los dendrimeros utilizados no eran tóxicos ni inmunogénicos. También se estudiaron los efectos de estos dendrimeros PAMAM funcionalizados con ácido siálico y sus resultados indicaban que la especificidad del carbohidrato no era lo único que determinaba el éxito o el fracaso en el diseño de un inhibidor basado en carbohidratos, sino que también había que considerar como es la unión y la orientación de los carbohidratos al esqueleto del dendrímero. Muy recientemente, se ha descrito el uso de glicodendrimeros basados en un esqueleto carbosilano para bloquear la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe.
50

Los glicodendrimeros también han mostrado ser efectivos frente al VIH. Así, hay estudios que muestran que dendrimeros polipropilenimina (PPI) funcionalizados con grupos galactosa polisulfatados producen la inhibición del VIH-1 de forma tan eficiente como el sulfato de dextrano utilizado como control (cfr. R.D. Kensinger, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 1614).
55

Dendrimeros funcionalizados con péptidos: El uso de dendrimeros funcionalizados en su superficie con péptidos es otra posibilidad para abordar la síntesis de nuevos microbicidas, aunque se han estudiado menos que el uso de glicodendrimeros o de dendrimeros aniónicos. De tal forma que algunos estudios muestran que dendrimeros funcionalizados con péptidos inhiben la infección viral *in vitro*. Otros estudios han mostrado la potencialidad de estos dendrimeros como vacunas (cfr. L. J. Cruz, *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 2004, 15, 112) indicando que estos dendrimeros son mejores inmunógenos que otros vehículos macromoleculares funcionalizados con los mismos péptidos.
60

Dendrimeros funcionalizados con aniones: Existen varios tipos de dendrimeros o polímeros dendronizados con carga neta negativa en la superficie, ya que muchos tipos de virus, como por ejemplo el VIH o VHS, se unen a compuestos polianiónicos. Así, polisacáridos sulfatados son inhibidores efectivos típicos de la inhibición viral. Dentro de este tipo de dendrimeros polianiónicos, se han descrito por ejemplo dendrimeros polilisina con grupos terminales
65

carboxilato y sulfonato que son capaces de bloquear de forma efectiva la infección por VHS (cfr. Gong, Y. *et al. Antiviral Res.*, 2002, 55(2), 319-329). Los mismos autores realizaron estudios en ratones en los que mostraron que estos dendrímeros protegían a los animales frente a la infección vaginal y que los derivados sulfonato eran capaces de interferir en las etapas finales de replicación del virus en las células infectadas.

Dendrímeros similares con un esqueleto polilisina y grupos terminales carboxilato o sulfonato, también han mostrado ser eficaces en la inhibición del VIH en modelos celulares *in vitro* (cfr. McCarthy, TD *et al. Mol Pharm.* 2005 Jul-Aug; 2(4):312-8) y los dendrímeros polianiónicos inhiben la entrada del virus en la célula, e inhiben la actividad de dos enzimas virales, la transcriptasa reversa y la integrasa, lo que indica que estos derivados polianiónicos pueden actuar en diferentes ciclos replicativos del VIH dependiendo de cómo se integren y se sitúan en la célula. Otros estudios más recientes, muestran que dendrímeros con grupos sulfonato protegen a macacos hembra frente a la infección vaginal del virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS).

En este apartado, hay que destacar el dendrímero cargado negativamente, formulado como un gel y denominado SPL7013. Este dendrímero ha sido desarrollado por una compañía farmacéutica australiana y los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado que es el mejor candidato para acceder al mercado, convirtiéndose en el primer dendrímero comercial con una aplicación biomédica definida. El SPL7013 es un dendrímero basado en lisina con grupos ácido naftaleno disulfónico en su superficie y es el principio activo de un gel microbicida vaginal denominado VivaGel®. Es un potente inhibidor *in vitro* frente a numerosas cepas del VIH-1. Se está utilizando en la prevención de la transmisión vaginal del VIH y del herpes genital. Así, un estudio desarrollado por Dezutti y colaboradores ha mostrado que una formulación de este dendrímero (5%) tiene una toxicidad muy baja en células epiteliales y es efectivo en la prevención de la infección por el VIH-1 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), macrófagos y en la transferencia del VIH-1 desde las células epiteliales a las CMSP. Estudios posteriores han mostrado que la aplicación diaria del gel SPL7013 en proporciones de 1-3% eran bien toleradas. Además se obtuvieron resultados similares en la prevención de la infección por el VIH-1 en la aplicación rectal del gel. También se han realizado estudios aplicando a nivel vaginal el gel SPL7013 en macacos y han mostrado que no produce ningún signo de irritación de la mucosa vaginal y que es capaz de proteger de la infección por el VIS al 100% de los macacos si se aplica en un 5%. También se han preparado otros dendrímeros similares al SPL7013 utilizando esqueletos tipo PAMAM y PPI, que presentaban actividades biológicas similares, pero se han descartado para su utilización comercial debido a las dificultades en el proceso de síntesis.

Otros dendrímeros aniónicos descritos como agentes antivirales son: el BRI2923 que es un dendrímero de tipo poliamidoamina (PAMAM) crecido a partir de un núcleo de amoniaco y funcionalizado en la superficie con 24 grupos ácido naftaleno disulfónico. El BRI6195, que también es un dendrímero tipo PAMAM, crecido en este caso a partir de un núcleo de etilendiamina y que está funcionalizado con 32 grupos fenildicarboxilato. Estos dendrímeros son capaces de inhibir la replicación de diferentes cepas del VIH en la línea celular MT-4 (cfr. Y. H. Jiang, *et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2005, 21, 207).

También se ha publicado la síntesis de dendrímeros basados en un esqueleto conteniendo átomos de fósforo, funcionalizados en su superficie con grupos aniónicos fosfonato (cfr. L. Griffe, *et al., Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 2523). Estos dendrímeros muestran una gran actividad en la activación y multiplicación de células natural killers (NK). Estos datos son prometedores ya que abren la puerta a la utilización de inmunoterapias antivirales o anticancerígenas, donde un gran número de células NK podrían ser necesarias.

En los últimos años, también ha aparecido descrita la síntesis de nuevos dendrímeros aniónicos, que probablemente mostrarán nuevos avances en el campo de su utilización como agentes terapéuticos, por ejemplo una familia de dendrímeros aniónicos solubles en agua, capaces de unirse reversiblemente de forma electrostática a cationes de acetilcolina o dendrímeros con diferentes grupos aniónicos como sulfato, sulfonato o carboxilato, utilizado el método sintético conocido como “click-chemistry” para su funcionalización.

Por otro lado, se han descrito también dendrímeros de estructura carbosilano de naturaleza catiónica que pueden ser potencialmente útiles como agentes de transfección en terapia génica, ya que presentan una toxicidad baja en las líneas celulares en las que se han ensayado, retienen eficazmente material genético como oligonucleótidos antisentido o siRNA e internalizan este material en el interior de las células en porcentajes similares e incluso en algún caso superiores a las de otros transfectantes comerciales (cfr. N. Weber, *et al., J. of Controlled Release* 2008, 132, 55). Así mismo, estos dendrímeros son capaces de proteger al material genético de la unión a proteínas séricas y actuar como agentes terapéuticos, con capacidad antibacteriana.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifuncional, denominadas dendrímeros, de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos carboxílicos, fosfónicos o sulfónicos, preferiblemente aniónicos que dotan a la macromolécula de una carga neta negativa. Además, la invención proporciona un procedimiento para su obtención y sus usos en biomedicina.

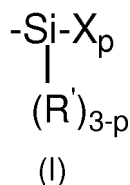
Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un dendrímero carbosilano que comprende:

- un núcleo polifuncional,

ES 2 364 264 A1

- al menos una generación, y

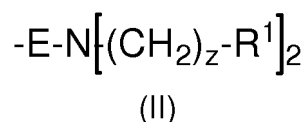
- una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde: R' es un grupo alquilo (C₁-C₄),

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 1, y

X es el siguiente grupo de fórmula (II):



donde: E es un grupo enlazante situado entre el silicio de la fórmula general (I) y el nitrógeno del grupo amina,

z es un número entero y varía entre 1 y 4,

R¹ se selecciona de un grupo de la lista que comprende -COOR², -SO₃R² o -PO₃(R²)₂, y

R² es hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄).

Por “dendrúmero carbosilano” se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada con forma esférica, donde el núcleo de crecimiento del dendrúmero es polifuncional, las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano y la capa externa, superficie o periferia del dendrúmero incorpora grupos funcionales. Esta superficie o periferia sería la correspondiente a las extremidades de las ramificaciones.

Por “núcleo polifuncional” se entiende en la presente invención a un elemento o compuesto polivalente enlazado de la manera covalente con al menos dos ramificaciones, es decir, al menos deberá ser divalente. Preferiblemente el núcleo es tetravalente y más preferiblemente el núcleo es de silicio.

El término “generación” se refiere al número de ramificaciones iterativas que son necesarias para la preparación del dendrúmero.

El término “alquilo” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo o sec-butilo. Preferiblemente el grupo alquilo es un metilo.

Por “grupo enlazante” se entiende en la presente invención cualquier grupo que une las ramificaciones, que su vez se encuentran unidas al núcleo, con los grupos funcionales de la capa externa del dendrúmero. El grupo enlazante E se puede seleccionar preferiblemente entre un alquilo (C₁-C₁₀) o un grupo -(CH₂)_x-R³, donde R³ puede ser un grupo triazol o fenol y x es un número entero que varía entre 1 y 6.

En una realización preferida el grupo enlazante (E) es un grupo alquilo (C₁-C₄) según se describe anteriormente, más preferiblemente E es un propilo.

En otra realización preferida el grupo enlazante (E) es el grupo -(CH₂)_x-R³ y R³ es triazol, más preferiblemente x es 4.

En otra realización preferida el grupo enlazante (E) es el grupo -(CH₂)_x-R³ y R³ es fenol, más preferiblemente x es 1.

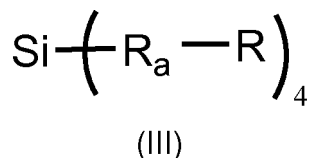
Cuando R¹ es el grupo -COOR² o el grupo -SO₃R², preferiblemente R² es hidrógeno o metilo y más preferiblemente z es 2.

Cuando R^1 es el grupo $-PO_3(R^2)_2$, preferiblemente R^2 es hidrógeno o metilo y más preferiblemente z es 1.

El dendrímero de la presente invención además puede ser aniónico, formando los grupos carboxilato, fosfonato o sulfonato.

Por lo tanto, la presente invención no solo incluye los dendrímeros por si mismos, sino cualquiera de sus sales, por ejemplo, sales de metal alcalino ó metal alcalinotérreo, que se pueden seleccionar entre sales de sodio, potasio ó calcio, preferiblemente las sales son de sodio.

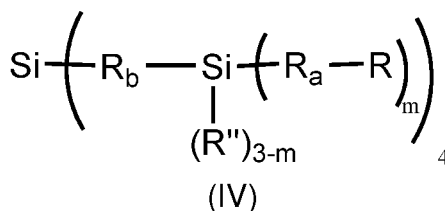
En otra realización preferida el dendrímero es al menos de primera generación, y se puede representar con la siguiente fórmula (III):



donde: R_a es un grupo alquilo (C_1 - C_6); y

R es el grupo terminal de fórmula general (I) según se ha descrito anteriormente.

En otra realización preferida, el dendrímero es al menos de segunda generación y se puede representar con la siguiente fórmula (IV):

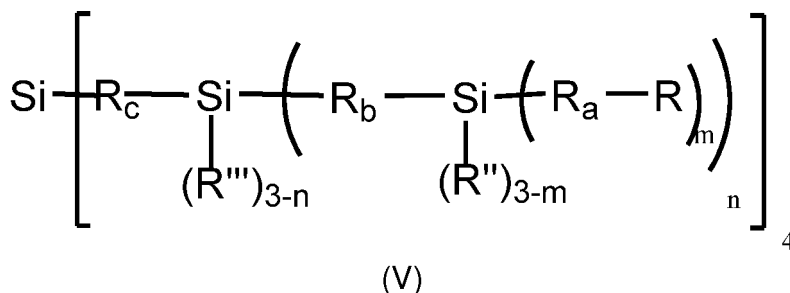


donde: R_a , R_b y R'' , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_1 - C_6);

m es un valor entero y tiene un valor de 1 a 3, más preferiblemente m es 2; y

R es el grupo terminal de fórmula general (I) según se ha descrito anteriormente.

En otra realización preferida, el dendrímero es al menos de tercera generación y se puede representar con la siguiente fórmula (V):



donde: R_a , R_b , R_c , R'' y R''' , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_1 - C_6);

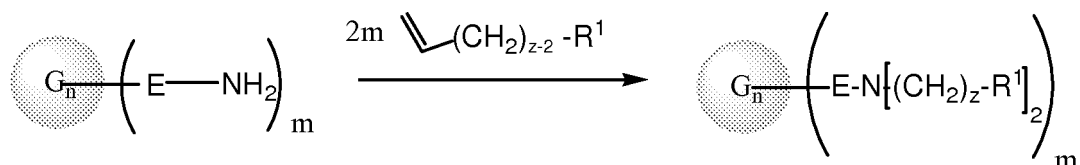
m y n son iguales o diferentes y tienen un valor de 1 a 3, preferiblemente m y/o n es 2; y

R es el grupo terminal de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente.

En estos dendrímeros de al menos primera, segunda y tercera generación los radicales R_a , R_b o R_c , pueden ser iguales o diferentes, y preferiblemente representan un grupo alquilo (C_2 - C_4). Más preferiblemente R'' y/o R''' representa un grupo alquilo (C_1 - C_4) y aún más preferiblemente R'' y/o R''' son un grupo metilo.

Esta familia de dendrímeros de naturaleza carbosilano que se describe puede ser preparada siguiendo un procedimiento de síntesis divergente (crecimiento desde dentro hacia fuera), a partir de un núcleo polivalente, preferiblemente de silicio tetraalilo y posterior funcionalización de la superficie con diferentes grupos funcionales, preferiblemente aniónicos.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los dendrímeros según se han descrito anteriormente, que comprende la síntesis de dendrímeros con terminaciones -NH_2 y posterior funcionalización de estos grupos amino terminales con grupos carboxílicos, sulfónicos o fosfóricos. Un esquema podría ser el siguiente:



Donde: E, z y R^1 se han descrito anteriormente,

n representa el número de generaciones (G) y m el número de grupos terminales, que va a depender del número de generaciones.

En una realización preferida del procedimiento de obtención de los dendrímeros de la invención, los dendrímeros con terminaciones -NH_2 se pueden obtener mediante la hidrosililación de alilamina sobre dendrímeros carbosilano de diferentes generaciones con enlaces terminales Si-H.

En otra realización preferida del procedimiento de obtención de los dendrímeros de la invención, los dendrímeros con terminaciones -NH_2 se pueden obtener mediante la metodología "click chemistry" para la unión de propargilamina en dendrímeros carbosilanos sobre dendrímeros carbosilanos de diferentes generaciones funcionalizados con grupos azida terminales.

Sin embargo, la funcionalización de las terminaciones aminas con los grupos carboxílicos, sulfónicos o fosfóricos puede ser anterior a su unión a las superficies de los esqueletos de los dendrímeros.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los dendrímeros de la invención, que comprende la funcionalización inicial de aminas orgánicas con los grupos carboxílicos, sulfónicos o fosfóricos o sus grupos precursores, y su posterior unión a dendrímeros carbosilano de diferentes generaciones con enlaces terminales Si-H o funcionalizados con grupos azida terminales.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (VI):



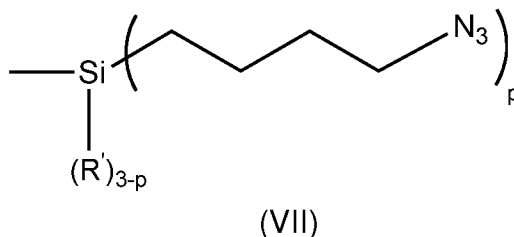
donde: Et es un grupo etilo y

R es el grupo terminal de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente o un grupo $-(\text{R}')_{3-p}\text{Si}-[(\text{CH}_2)_4-\text{N}_3]_p$, donde R' es un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), y p varía entre 1 y 3.

Por tanto, otros intermedios de reacción pueden ser los dendrímeros carbosilano funcionalizados con grupos azida terminales que comprende:

- un núcleo polifuncional, preferiblemente de silicio tetraalilo,
- al menos una generación, y

- una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (VII):



donde: R' y p se han descrito anteriormente.

Los dendrímeros de la invención pueden tener aplicación en diferentes campos de la biomedicina, entre los que cabe destacar su utilización como agentes terapéuticos, antivirales, antibacterianos o antiprionicos. Además de su actividad microbicida, también tienen actividad antiinflamatoria, haciendo que mejore sus propiedades profilácticas puesto que la probabilidad de infección frente al VIH aumentan significativamente en presencia de procesos inflamatorios. Está claro que un buen microbicida tópico vaginal debe prevenir de la infección por el VIH y mantener íntegra la barrera vaginal epitelial. En este sentido un proceso de inflamación vaginal podría aumentar la infección por el VIH al activar a las células dendríticas y reclutar células T (dianas del VIH) al sitio de la inflamación incrementando el riesgo de la infección por el VIH y activando el proceso de transcripción vía citoquinas, regulando el factor de transcripción NF-kappaB que a su vez une y activa el promotor del VIH. El factor de transcripción NF-kappaB es una de las mayores dianas farmacológicas para los compuestos antiinflamatorios. La propiedad antiinflamatoria de los dendrímeros de la invención es una ventaja adicional con respecto a otros dendrímeros con actividad antivirales, antibacterianos o antiprionicos conocidos en el estado de técnica.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a los dendrímeros como medicamento *per se*. Siendo este medicamento preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos. Y más preferiblemente cuando la enfermedad es causada por cepas del VIH.

Como antiviral, el dendrímero de la invención, de tamaño nanoscópico, impide el correcto proceso de adhesión a la célula diana, así como la infección de esta y su correspondiente producción de nuevas partículas virales.

Además de esta aplicación profiláctica, debido a los resultados obtenidos en los experimentos, también los dendrímeros de la invención tienen efecto terapéutico, ya que en pacientes infectados por el VIH esta nanopartícula podría impedir la infección de células aún no infectadas, sobre todo tienen efecto terapéutico para las enfermedades de transmisión sexual (ETS) (antiviral, antibacteriano o antifúngico).

Por “enfermedad de transmisión sexual” se entiende en la presente invención a infecciones que se adquieren por tener relaciones sexuales con alguien que esté infectado, y dicha infección puede ser causada por bacterias, hongos, protozoos o virus, por ejemplo la infección causada por el VIH. La gran mayoría de las infecciones por el VIH ocurren debido a la carencia de protección cuando se mantienen relaciones sexuales con una persona seropositiva.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un dendrímero según se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, esta composición farmacéutica puede comprender otro principio activo.

Los “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por un experto en la materia.

Como ejemplos de preparaciones farmacéuticas se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (geles, soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, nasal, tópica o parenteral, preferiblemente la administración será tópica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende al menos un dendrímero de la invención. Preferiblemente la administración de la composición se puede realizar por vía oral, nasal, tópica o parenteral.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la enfermedad, y de la ruta y frecuencia de administración.

También es posible el uso de los dendrímeros de la invención como vehículos de transporte de moléculas, preferiblemente moléculas con actividad farmacológica (principios activos), y más preferiblemente moléculas con carga positiva.

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

Descripción de las figuras

Figura. 1. Muestra la viabilidad de las tres generaciones de dendrímeros aniónicos con terminaciones carboxilato (G1COO8, G2COO16 y G3COO32) y sulfonato (G1SF8, G2SF16 y G3SF32) a una concentración de 10 μ M en HEC-1A (células epiteliales de endometrio humano). Figura 1A, ensayo de LDH (Liberación de Lactato DesHidrogenasa). El Tx-100 (triton x-100) al 1% representa el 100% de toxicidad. Figura 1B, ensayo de MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. El DMSO al 20% representa el 100% de toxicidad. Dx (Dextrano) se utiliza como control de molécula inocua, DxS (Dextrano Sulfonato) y Suramin son moléculas con grupos sulfonato utilizadas como control positivo de inhibición del VIH.

Figura 2. Muestra la viabilidad de las CMSP en presencia de distintas concentraciones de G2COO16 y G2SF16. Figura 2A, ensayo de LDH y Figura 2B, ensayo de MTT.

Figura 3. Muestra la toxicidad del dendrímero G2SF16 sobre eritrocitos de sangre humana (liberación de hemoglobina al sobrenadante).

Figura 4. Representa un ensayo linfoproliferativo de 4 días en CMSP. Se estimulan las CMSP con 2 μ g/mL de PHA (fitohemaglutinina purificada). En la Figura 4A se muestra que el dendrímero G2SF16 no tiene efecto mitogénico. En la Figura 4B, se muestra que el dendrímero G2SF16 inhibe el efecto mitogénico de la PHA en las CMSP.

Figura 5. Representa un ensayo de adsorción de las partículas virales a la monocapa de células epiteliales en presencia de un pretratamiento con los dendrímeros, G2SF16 y G2COO16, a distintos tiempos. Se evalúa la cantidad de VIH realizando un inmunoensayo enzimático para la cuantificación del Agp24 en el sobrenadante del cultivo (ELISA p24). Tras 24 horas de infección (Figura 5A) y tras 72 horas de infección (Figura 5B).

Figura 6. Muestra un ensayo de internalización de las partículas virales por la línea celular HEC-1A. Se pretrataron las células durante 1 h con los dendrímeros antes de infectarlas con el aislado X4 VIH NL4.3 durante 3 h. Tras la infección se lisaron las HEC-1A con TX-100 al 0.2% para cuantificar las partículas virales en el interior celular.

Figura 7. Muestra el mecanismo de interacción entre los dendrímeros y las partículas virales. Las cepas X4 VIH NL4.3 y R5 VIH Bal fueron pretratadas con los dendrímeros antes de exponerse a las CMSP. El sobrenadante viral se recogió a los 4 días.

Figura 8. Muestra la inhibición de la transcitosi en HEC-1A. Se evaluó la cantidad de Agp24 en el sobrenadante basolateral de los dispositivos de transwell utilizados para simular una monocapa de la mucosa vaginal.

Figura 9. Muestra la evaluación del efecto profiláctico y terapéutico del dendrímero G2SF16 en CMSP. Se trataron las CMSP a distintos tiempos antes y después de ser infectadas por el VIH para analizar la actividad del dendrímero G2SF16. T-20 es un inhibidor de fusión de la membrana viral con la membrana celular a través de la proteína gp41, inhibe la entrada del virus en la célula y el AZT es un inhibidor de la transcriptasa inversa. En resumen ambos inhibidores de la replicación viral y se utilizan como controles para ver que inhiben la replicación del virus. La Figura 9A es pretratamiento, es decir, primero se añade el dendrímero y después se infecta; la Figura 9B es posttratamiento, es decir primero se infecta y luego se añade el virus.

Figura 10. Muestra la inhibición de la entrada del VIH en células dendríticas y macrófagos. Se pretrataron las células durante 1 h con el dendrímero G2SF16. Se infectaron con las cepas X4 VIH NL4.3(columnas negras) y R5 VIH Bal (columnas grises).

Figura 11. Muestra el efecto bactericida de los dendrímeros aniónicos de estructura carbosilano. Representación del efecto dependiente de la concentración de ampicilina y los dendrímeros G2COO16 y G2SF16 a las 24 h posttratamiento de *S. aureus*. La pendiente del triángulo representa la disminución de la concentración de antibiótico (2; 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125; 0.0156 μ g/mL) o dendrímero (160; 80; 40; 20; 10; 5; 2.5; 1.25 μ M). La barra gris representa el dendrímero a 10 μ M.

Figura 12. Muestra el efecto bacterioestático de los dendrímeros aniónicos de estructura carbosilano. Representación del efecto dependiente de la concentración de ampicilina y los dendrímeros G2COO16 y G2SF16 a las 24 h post-

tratamiento de *S. aureus*. La pendiente del triángulo representa la disminución de la concentración de antibiótico (2; 1; 0.5; 0.25; 1.12; 0.6; 0.3; 0.15 $\mu\text{g/mL}$) o dendrímero (160; 80; 40; 20; 10; 5; 2.5; 1.25 μM). La barra gris representa el dendrímero a 10 μM .

Figura 13. Muestra los estudio de biocompatibilidad y efecto inhibitor de la entrada de VIH de dendrímeros click. La Figura 13A representa una curva de toxicidad de los dendrímeros en HEC-1A. La Figura 13B muestra la inhibición de la entrada del VIH en células HEC-1A tras pretratarlas con los dendrímeros G2CKC0016 y G2CKP32 1 h antes de la infección.

Figura 14. Muestra el estudio de la inhibición del TNF- α (TNF) en linfocitos T. Transfección de células Jurkat con el plásmido pTNF-luc, en presencia de G2SF16. aTNF es anti-TNF- α .

Figura 15. Muestra la transfección de células Jurkat con el plásmido pNF-kB-luc, en presencia de G2SF16.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de los dendrímeros carbosilano y sus procedimientos de síntesis.

Obtención de los dendrímeros de la invención

Se llevaron a cabo mediante dos métodos que a continuación se detallan:

Método 1

Síntesis de los dendrímeros carbosilanos a partir de un núcleo de silicio tetraalilo con grupos amino terminales

La síntesis de dendrímeros de estructura carbosilano con grupos amina terminales se llevó a cabo de dos maneras diferentes: a) hidrosililación de alilamina sobre dendrímeros carbosilano de diferentes generaciones con enlaces terminales Si-H, o b) utilización de la metodología *click chemistry* para la unión de propargilamina sobre dendrímeros carbosilano de diferentes generaciones con funcionalidades azida terminales.

Método 1(a)

Síntesis de dendrímeros aniónicos a partir de dendrímeros con grupos amino terminales obtenidos por hidrosililación de alilamina

En general, para simplificar la forma de nombrar los dendrímeros que se describen en estos ejemplos se pueden representar como **Gn-(Fp)x**, donde:

n indica el número de la generación **G**.

F, indica la naturaleza de los grupos funcionales situados en la periferia del dendrímero.

p indica el número de grupos funcionales en cada rama.

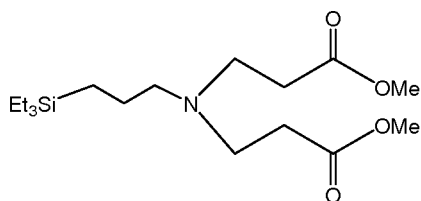
x denota el número de unidades terminales presentes en el dendrímero.

Se prepararon dendrímeros aniónicos siguiendo esta ruta sintética que parte de dendrímeros carbosilano con grupos amino terminales $n\text{G}[\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (1); $n = 1$, $x = 4$ (2); $n = 2$, $x = 8$ (3); $n = 3$, $x = 16$ (4)). Estos dendrímeros de diferentes generaciones se pueden preparar siguiendo reacciones descritas en la bibliografía a través de procedimientos divergentes (M. Ángeles Muñoz-Fernández *et al.* "Water-Soluble Carbosilane Dendrimers: Synthesis, Biocompatibility and Complexation with Oligonucleotides; evaluation for Medical Applications" *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 483-495). A partir de estos compuestos, la obtención de dendrímeros aniónicos con grupos carboxilato, sulfonato o fosfonato se produce finalmente siguiendo los procedimientos que se describen a continuación.

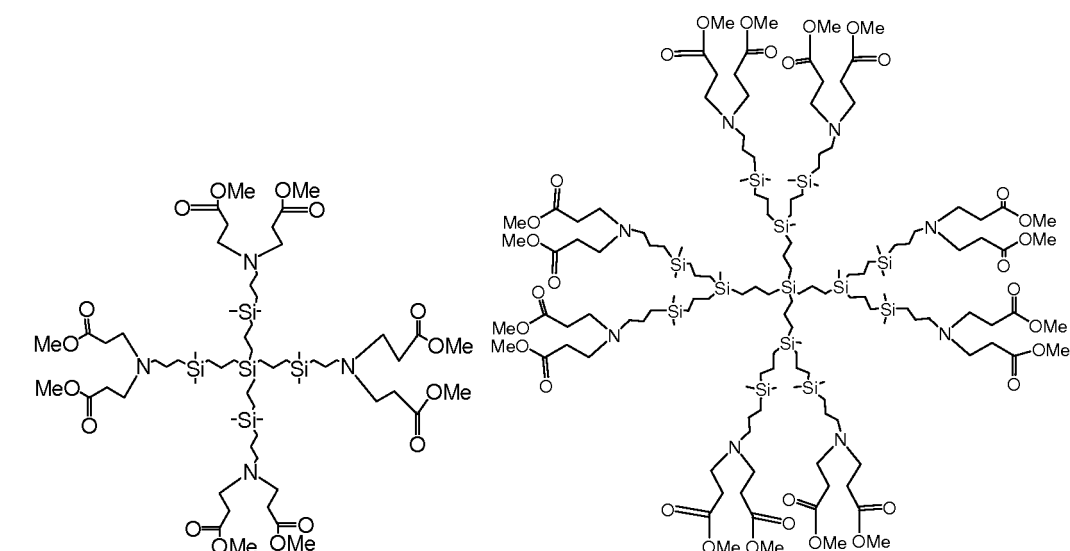
Método 1(a) para dendrímeros carboxilato

La síntesis de dendrímeros carboxilato aniónicos de diferentes generaciones se realizó a través de una reacción de adición de Michael de acrilato de metilo sobre los dendrímeros terminados en grupos $-\text{NH}_2$, 1-4, descritos anteriormente. Las condiciones de reacción se describen en el esquema 1 y de esta forma se obtienen los dendrímeros $\text{Gn}[\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (5); $n = 1$, $x = 4$ (6); $n = 2$, $x = 8$ (7); $n = 3$, $x = 16$ (8))

como aceites incoloros solubles en disolventes orgánicos de uso común, pero insolubles en agua. Estructuras de los dendrímeros Gn-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]_x (n = 0 (triethyl silane), x = 1 (5); n = 1, x = 4 (6); n = 2, x = 8 (7); n = 3, x = 16 (8)):



G₀-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]
(5)

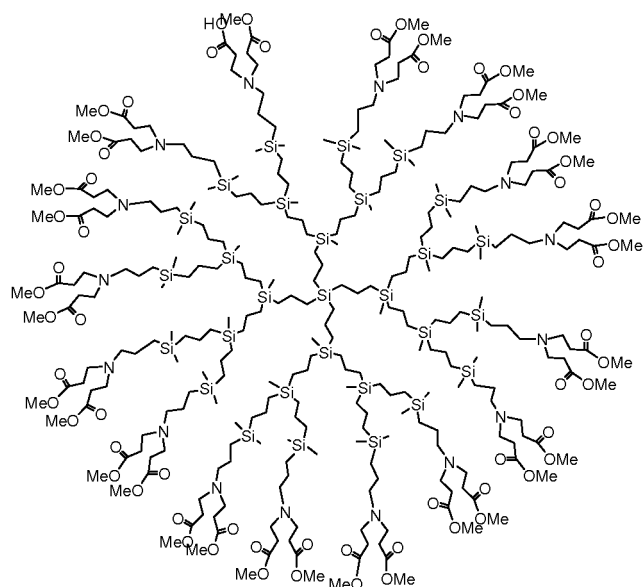


G₁-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]₄

(6)

G₂-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]₈

(7)



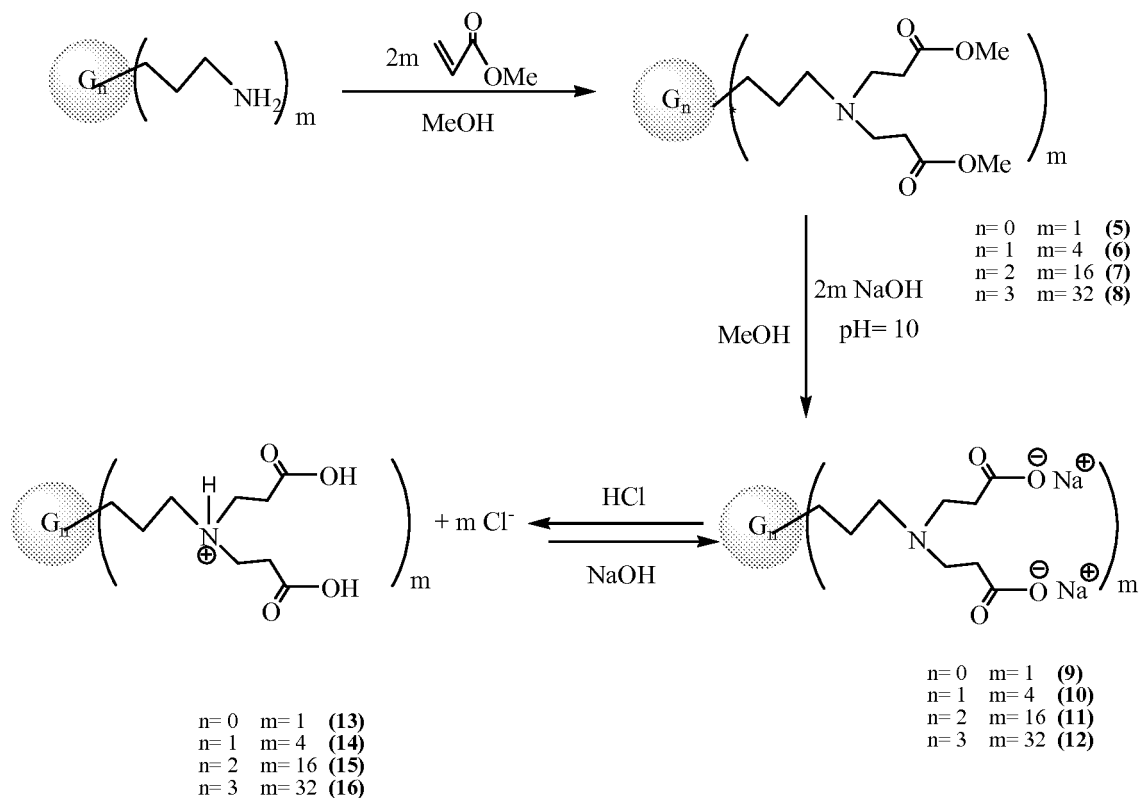
G₃-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]₁₆

(8)

ES 2 364 264 A1

Los derivados 5-8, se pueden transformar en los correspondientes derivados carboxilato aniónicos por tratamiento con NaOH, dando lugar a los compuestos $G_n-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2COONa)_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (9); $n = 1$, $x = 4$ (10); $n = 2$, $x = 8$ (11); $n = 3$, $x = 16$ (12)), que se aíslan como sólidos blancos solubles en agua con rendimiento elevado (esquema 1). Adicionalmente, el tratamiento de los compuestos 9-12 con una disolución acuosa de HCl 1M conduce a los derivados catiónicos $G_n-[Si(CH_2)_3N^+H(CH_2CH_2COOH)_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (13); $n = 1$, $x = 4$ (14); $n = 2$, $x = 8$ (15); $n = 3$, $x = 16$ (16)) (esquema 1).

Esquema 1

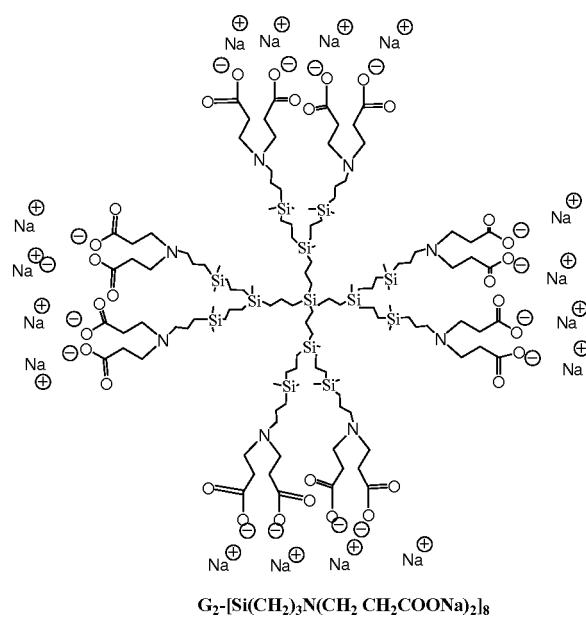
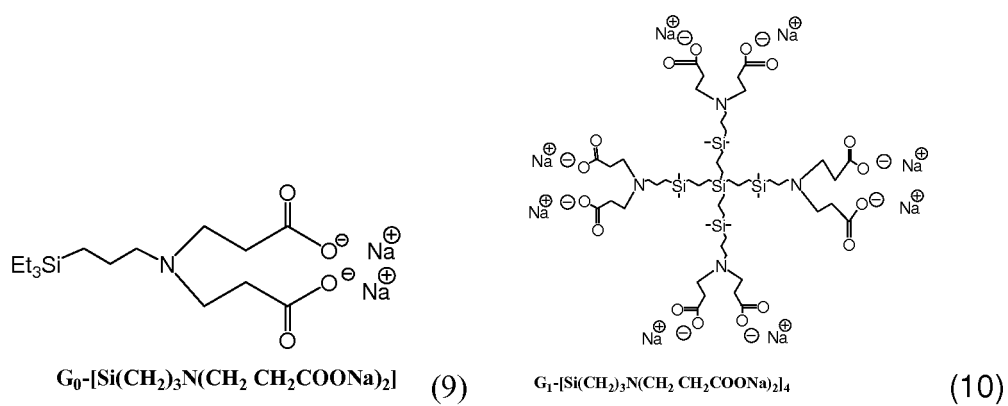


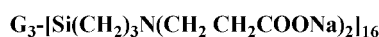
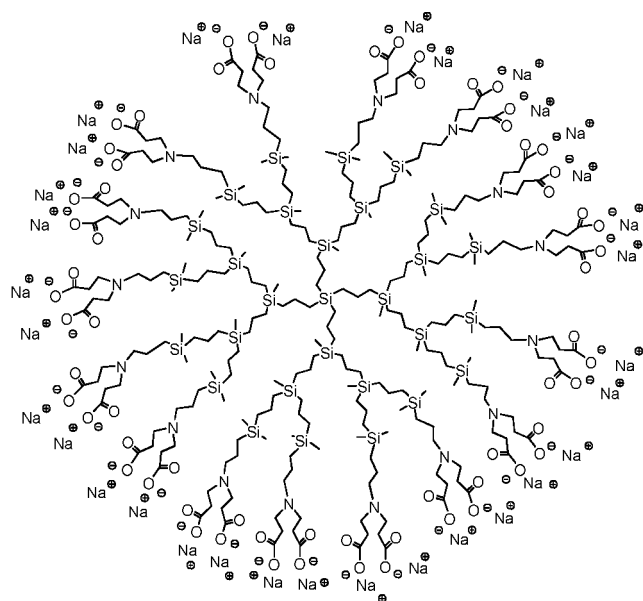
Los derivados 13-16 también se convierten a través de un proceso reversible en los dendrímeros aniónicos 9-12 por tratamiento con una disolución de NaOH, quienes revierten a los primeros si se tratan nuevamente con una disolución acuosa de HCl 1M (esquema 1).

(Esquema pasa a página siguiente)

ES 2 364 264 A1

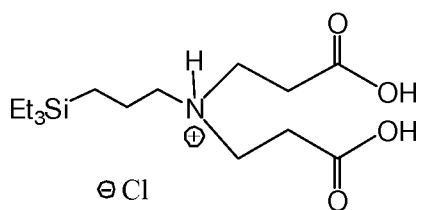
Las estructuras de los dendrímeros carboxilato $G_n-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2COONa)_2]_x$ ($n = 0$ (trietil silano), $x = 1$ (9); $n = 1$, $x = 4$ (10); $n = 2$, $x = 8$ (11); $n = 3$, $x = 16$ (12)):



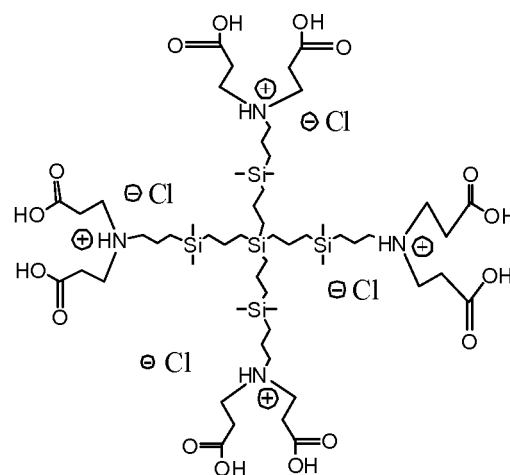


(12)

Obteniéndose también los siguientes dendrímeros de estructuras $G_n-[Si(CH_2)_3N^+H(CH_2CH_2COOH)_2]_x$ ($n = 0$ (trietil silano), $x = 1$ (13); $n = 1$, $x = 4$ (14); $n = 2$, $x = 8$ (15); $n = 3$, $x = 16$ (16)), son estructuras similares a las de los dendrímeros 5 a 8, tal y como se deriva del esquema 1, así por ejemplo los dendrímeros 13 y 14 serían:



(13)

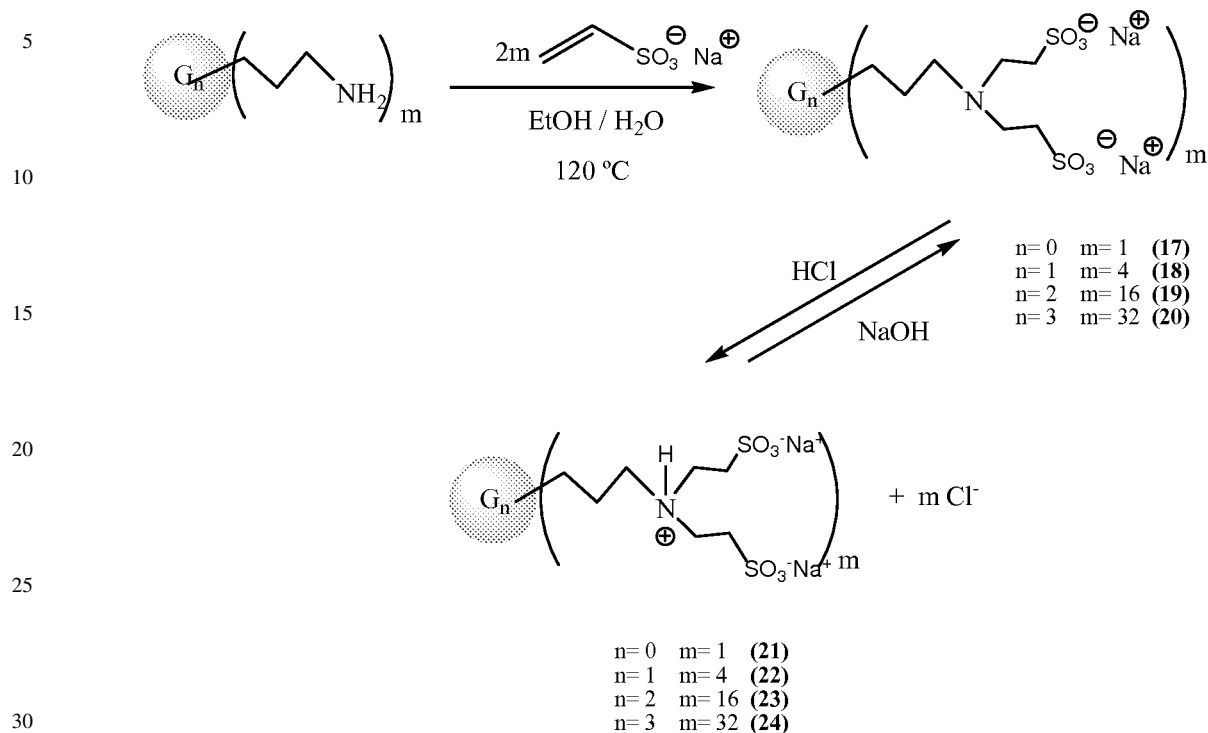


(14)

Método 1(a) para dendrímeros sulfonato

La síntesis de dendrímeros aniónicos de diferentes generaciones con grupos terminales de naturaleza sulfonato, se ha realizado a través de una reacción de adición de Michael de vinil sulfonato de sodio sobre los dendrímeros terminados en grupos $-NH_2$, 1- 4. La reacción se lleva a cabo en una mezcla de etanol-agua, calentando a $120^\circ C$, obteniéndose los derivados aniónicos $G_n-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3Na)_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (17); $n = 1$, $x = 4$ (18); $n = 2$, $x = 8$ (19); $n = 3$, $x = 16$ (20)), como sólidos blancos solubles en agua con un rendimiento elevado y se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo sin mostrar signos de descomposición. (Esquema 2).

Esquema 2



35 Al igual que en los derivados carboxilato, los dendrímeros aniónicos 17-20, se pueden protonar por tratamiento con un exceso de una disolución de HCl 1M en agua, obteniéndose los dendrímeros catiónicos $G_n-[Si(CH_2)_3N^+H(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)_2]_x$ ($n=0$ (trietil sililo), $x=1$ (21); $n=1$, $x=4$ (22); $n=2$, $x=8$ (23); $n=3$, $x=16$ (24)), quienes de nuevo pueden revertir a los primeros por tratamiento con una disolución de NaOH (esquema 2).

40 Los dendrímeros de estructura $G_n-[Si(CH_2)_3N^+H(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)_2]_x$ ($n=0$ (trietil sililo), $x=1$ (21); $n=1$, $x=4$ (22); $n=2$, $x=8$ (23); $n=3$, $x=16$ (24)) serán estructuralmente similares a los carboxilato descritos anteriormente.

Método 1(a) para dendrímeros fosfonato

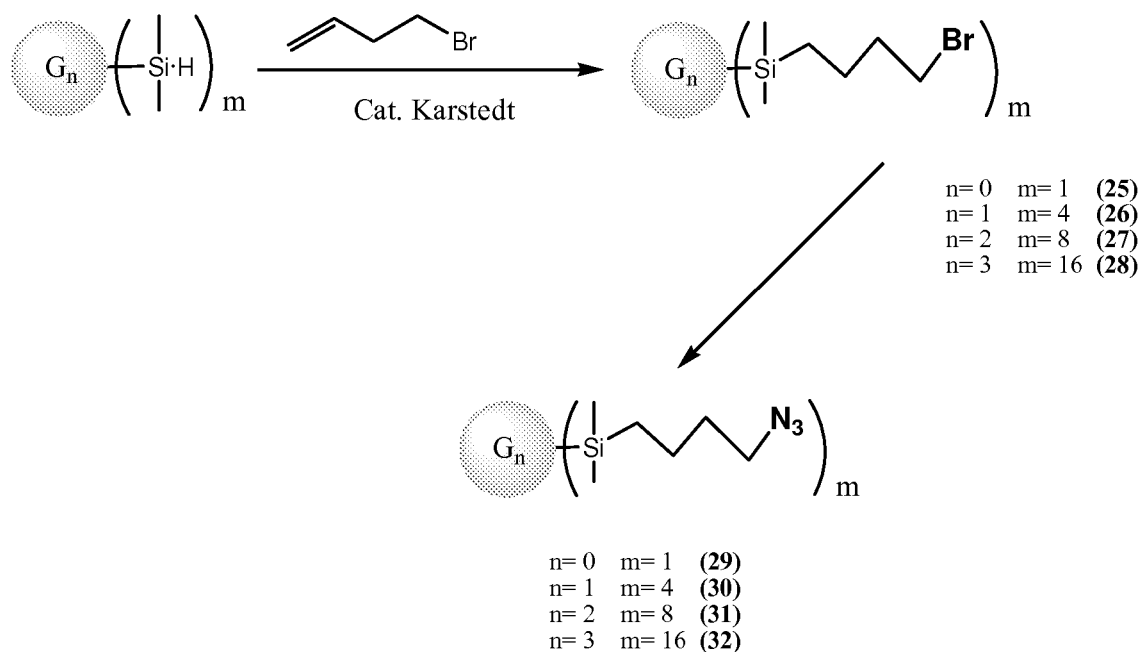
45 La síntesis de dendrímeros aniónicos con grupos fosfonato en la periferia no se puede obtener a partir de dendrímeros carbosilano con grupos $-NH_2$ terminales preparados por hidrosililación con alilamina, ya que la reacción de estos derivados con formaldehído y fosfito de dimetilo, $HPO(OMe)_2$, no conduce a la funcionalización de los sistemas dendríticos con grupos fosfonato.

50 Método 1(b)

55 *Síntesis de dendrímeros aniónicos a partir de dendrímeros con grupos amino terminales obtenidos por acoplamiento de propargil amina sobre dendrímeros terminados en grupos azida vía click chemistry*

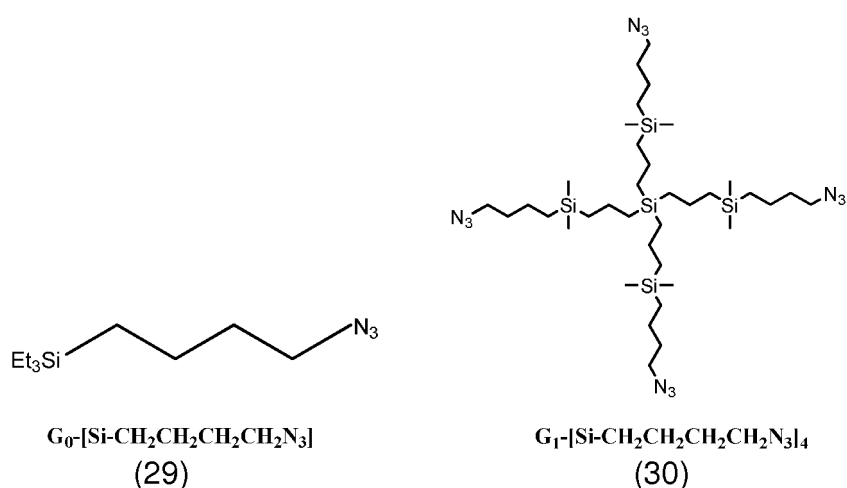
Esta ruta sintética conlleva inicialmente la preparación de dendrímeros carbosilano, crecidos a partir de un núcleo de silicio tetraalilo, con grupos azida terminales. La preparación de estos derivados azida se ha llevado a cabo a partir de dendrímeros conteniendo enlaces terminales Si-H, del tipo $G_n-[Si-H]_x$ ³³, en dos etapas (esquema 3). Primero la reacción de hidrosililación de $nG-[Si-H]_x$ con 4-bromobuteno conduce a dendrímeros carbosilano de diferentes generaciones con grupos $-CH_2Br$ terminales, $G_n-[Si-CH_2CH_2CH_2CH_2Br]_x$ ($n=0$ (trietil silano), $x=1$ (25); $n=1$, $x=4$ (26); $n=2$, $x=8$ (27); $n=3$, $x=16$ (28)). La posterior reacción de los derivados 25-28 con azida de sodio da lugar a los dendrímeros de estructura carbosilano con grupos azida terminales $G_n-[Si-CH_2CH_2CH_2CH_2N_3]_x$ ($n=0$ (trietil silano), $x=1$ (29); $n=1$, $x=4$ (30); $n=2$, $x=8$ (31); $n=3$, $x=16$ (32)) (ver esquema 3).

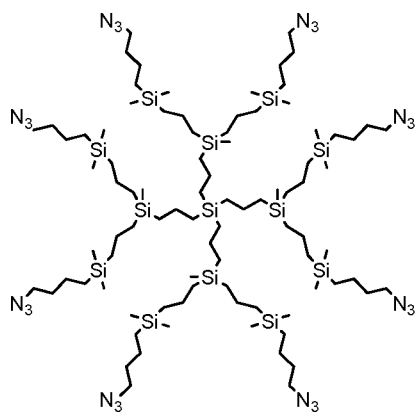
Esquema 3



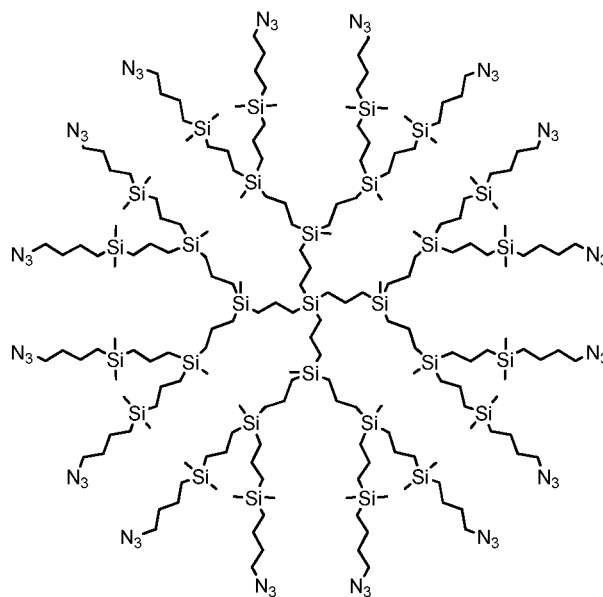
Los compuestos 25 a 32 son sólidos aceitosos estables al aire y a la humedad, solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos de uso común y pueden ser almacenados sin descomposición durante largos periodos de tiempo. Los dendrímeros de estructura: $G_n\text{--}[\text{Si--CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}]_x$ ($n=0$ (triethyl silano), $x=1$ (25); $n=1$, $x=4$ (26); $n=2$, $x=8$ (27); $n=3$, $x=16$ (28))

Y los dendrímeros con estructura: $G_n\text{--}[\text{Si}(\text{CH}_2)_4\text{N}_3]_x$ ($n=0$ (triethyl sililo), $x=1$ (29); $n=1$, $x=4$ (30); $n=2$, $x=8$ (31); $n=3$, $x=16$ (32)):





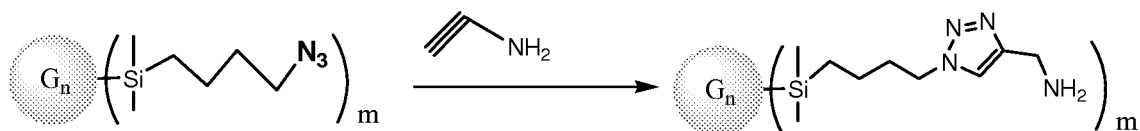
$G_2-[Si-CH_2CH_2CH_2CH_2N_3]_8$
(31)



$G_3-[Si-CH_2CH_2CH_2CH_2N_3]_{16}$
(32)

Una vez preparados los dendrímeros con grupos azida terminales, la síntesis de dendrímeros con grupos amino (-NH₂) en la superficie se produce por una reacción de tipo *click chemistry*, entre los compuestos 29-32 y propargil amina, dando lugar a los derivados *ck*-Gn-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NH₂]_x (*n* = 0 (trietil sililo), *x* = 1 (33); *n* = 1, *x* = 4 (34); *n* = 2, *x* = 8 (35); *n* = 3, *x* = 16 (36)) (ver esquema 4).

Esquema 4



n=0 *m*=1 (29)
n=1 *m*=4 (30)
n=2 *m*=8 (31)
n=3 *m*=16 (32)

n=0 *m*=1 (33)
n=1 *m*=4 (34)
n=2 *m*=8 (35)
n=3 *m*=16 (36)

En general los dendrímeros que se describen a continuación se pueden simplificar, representándolos como *ck*-Gn-(Fp)*x*, donde:

ck indica que se trata de dendrímeros obtenidos por acoplamiento *click* entre un grupo azida y un triple enlace carbono carbono.

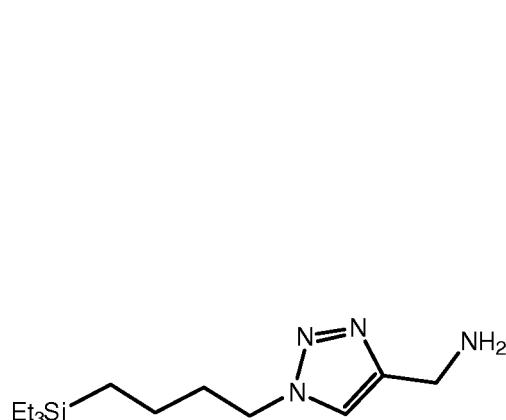
n indica el número de la generación *G*.

F, indica la naturaleza de los grupos funcionales situados en la periferia del dendrímero.

p indica el número de grupos funcionales en cada rama.

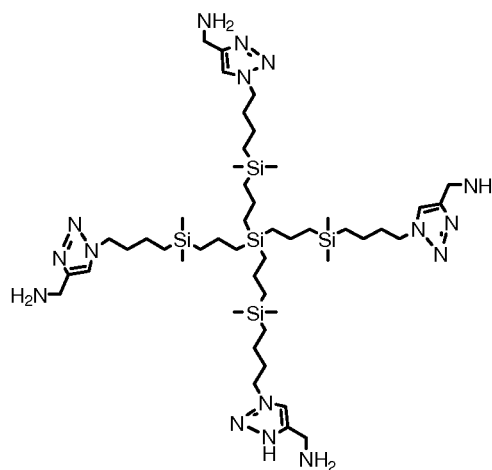
x denota el número de unidades terminales presentes en el dendrímero.

La preparación de dendrímeros aniónicos siguiendo esta ruta sintética parte de los dendrímeros carbosilano con grupos amino terminales $ck\text{-Gn-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NH}_2]_x$, (33) a (36). Estructuras de los dendrímeros $ck\text{-Gn-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NH}_2]_x$ ($n = 0$ (triethyl sililo), $x = 1$ (33); $n = 1$, $x = 4$ (34); $n = 2$, $x = 8$ (35); $n = 3$, $x = 16$ (36))



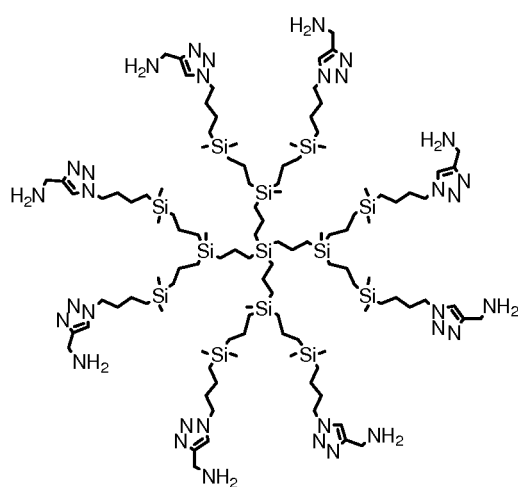
$ck\text{-G}_0\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NH}_2]$

(33)



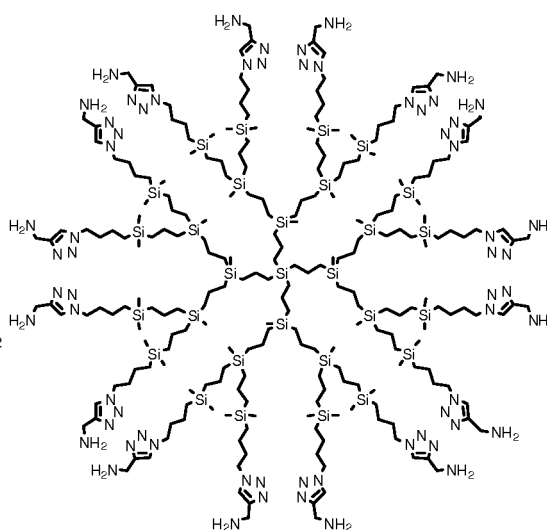
$ck\text{-G}_1\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NH}_2]_4$

(34)



$ck\text{-G}_2\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NH}_2]_8$

(35)



$ck\text{-G}_3\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NH}_2]_{16}$

(36)

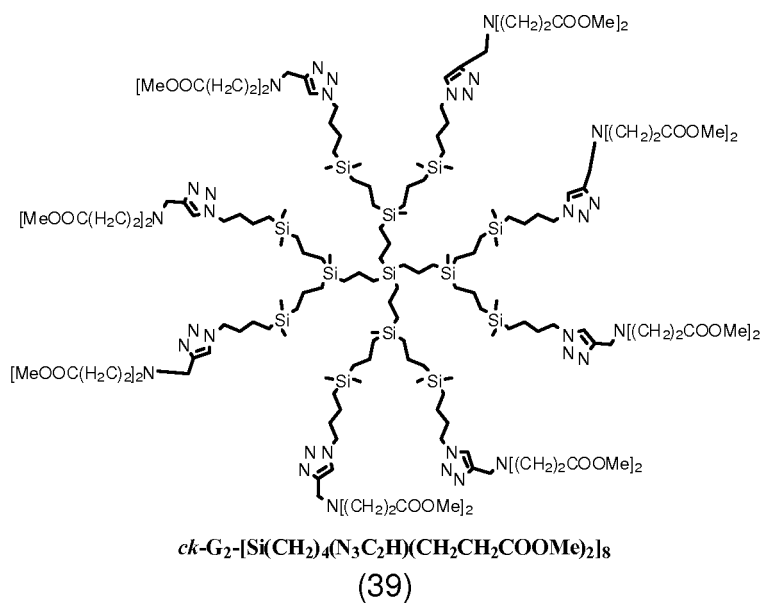
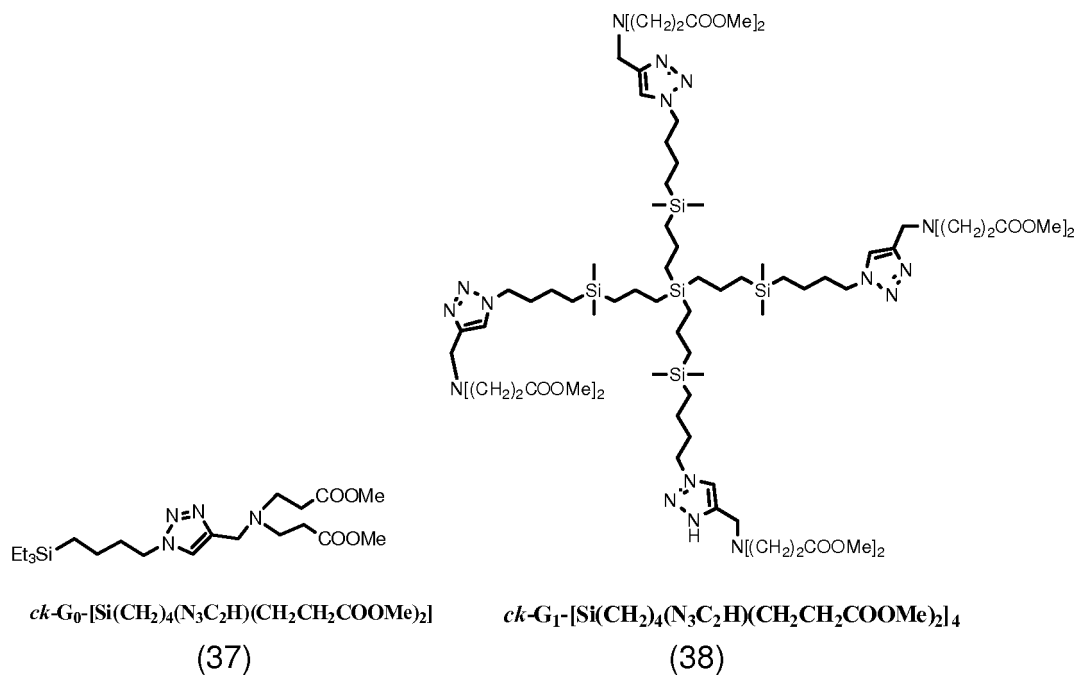
A partir de estos compuestos, la obtención de dendrímeros aniónicos con grupos por ejemplo carboxilato, sulfonato o fosfonato se produce finalmente siguiendo procedimientos análogos a los descritos en la sección anterior para los dendrímeros con grupos -NH_2 terminales obtenidos a partir de la hidrosililación de alilamina. Así hemos obtenido las familias de compuestos que se describen a continuación

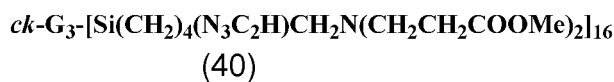
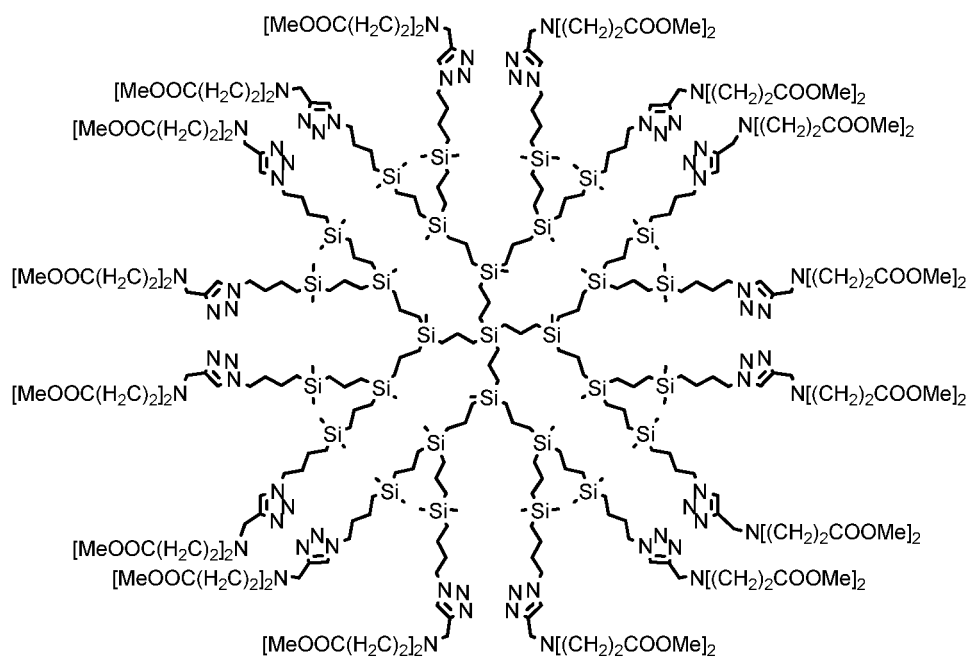
Método 1(b) para dendrímeros aniónicos con grupos carboxilato

La reacción de adición de Michael de acrilato de metilo sobre los dendrímeros terminados en grupos -NH_2 , 33-36, utilizando las condiciones de reacción descritas en el esquema 5 permiten obtener los dendrímeros $ck\text{-Gn-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{N(CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_x$ ($n = 0$ (triethyl sililo), $x = 1$ (37); $n = 1$, $x = 4$ (38); $n = 2$, $x = 8$ (39); $n = 3$, $x = 16$ (40)) como aceites incoloros solubles en disolventes orgánicos de uso común, pero insolubles en agua.

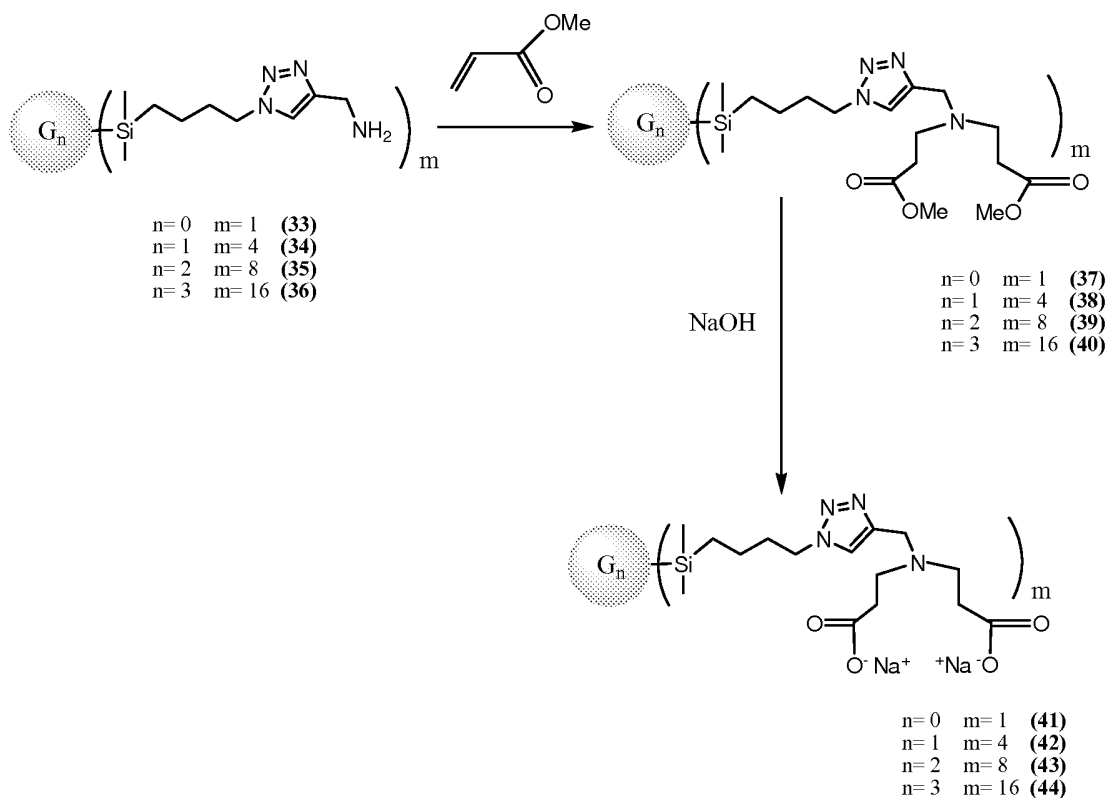
ES 2 364 264 A1

Los dendrímeros del 37 al 40 tienen las estructuras: $ck\text{-Gn-}[\text{Si}(\text{CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_x$ ($n = 0$ (triethyl sililo), $x = 1$ (37); $n = 1$, $x = 4$ (38); $n = 2$, $x = 8$ (39); $n = 3$, $x = 16$ (40)):



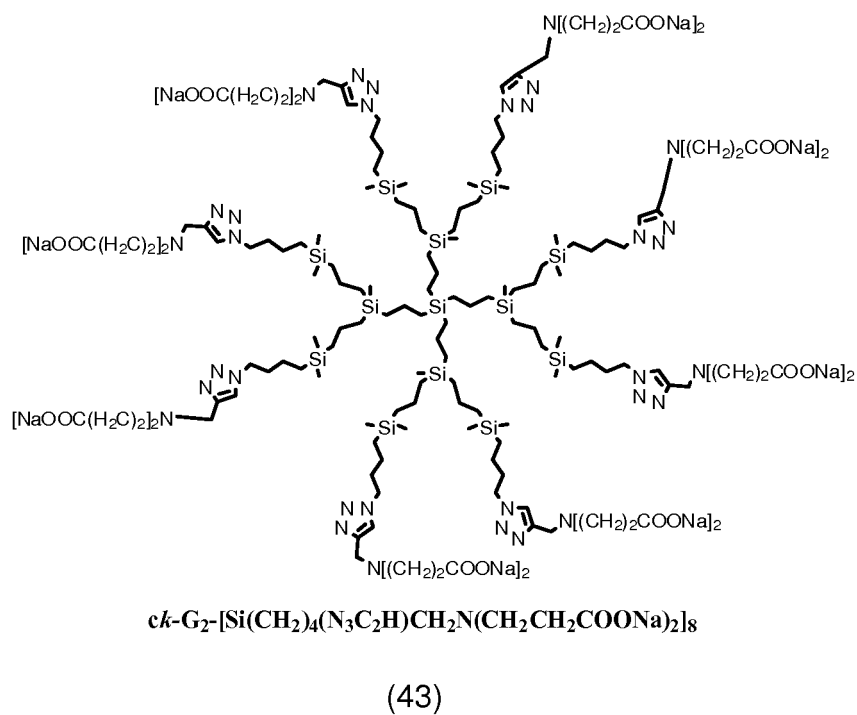
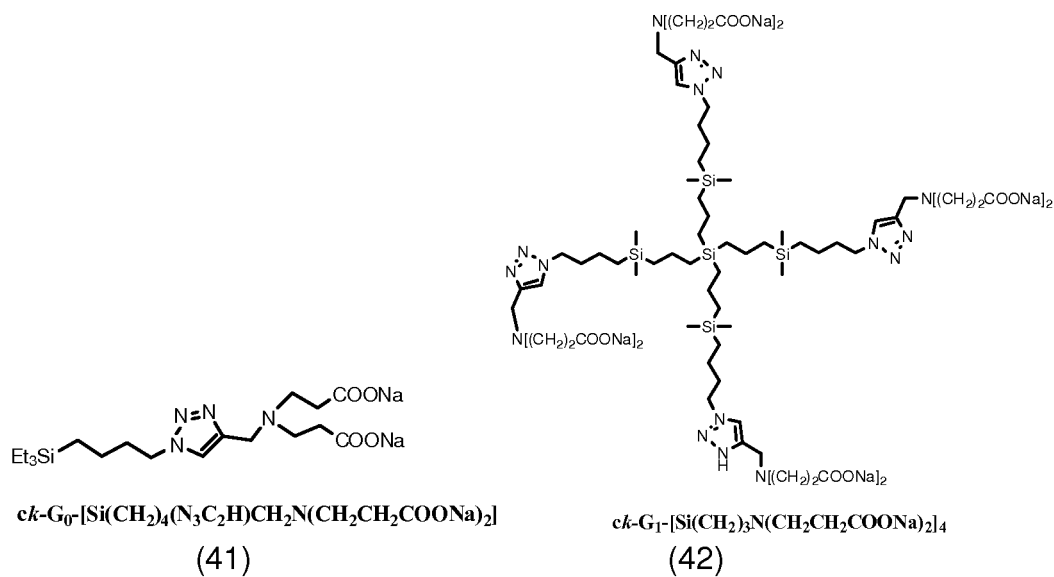


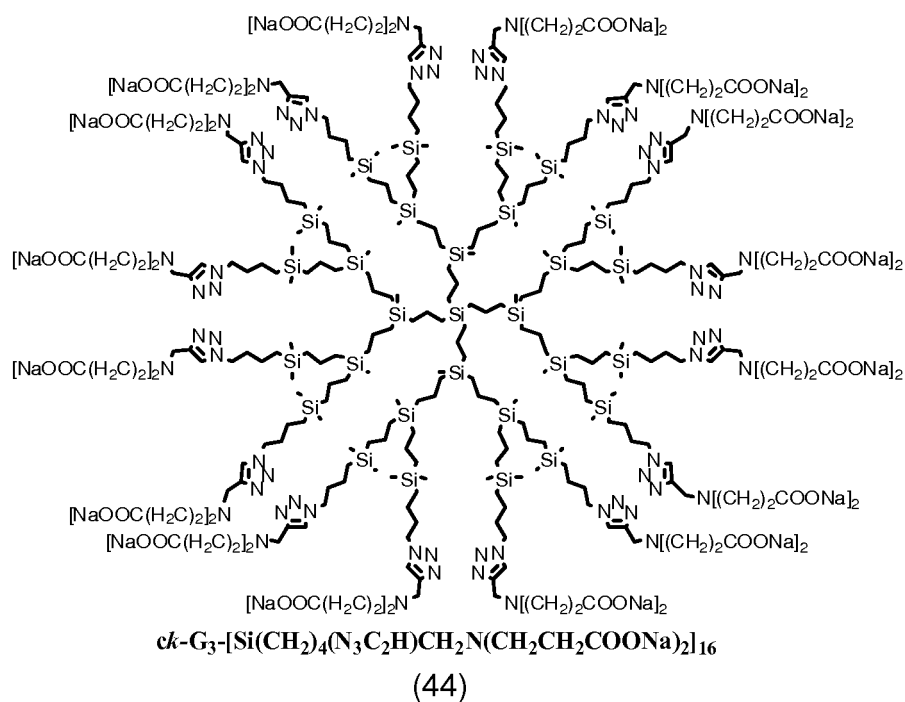
Los derivados 37-40, se pueden transformar en los correspondientes derivados aniónicos carboxilato por tratamiento con NaOH, dando lugar a los compuestos $ck-G_n-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2N(CH_2CH_2COONa)_2]_x$ ($n = 0$ (triethyl silano), $x = 1$ (41); $n = 1$, $x = 4$ (42); $n = 2$, $x = 8$ (43); $n = 3$, $x = 16$ (44)), que se aíslan como sólidos blancos solubles en agua con rendimiento elevado (esquema 5).



ES 2 364 264 A1

Los dendrímeros con estructura: $ck\text{-Gn-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{N(CH}_2\text{CH}_2\text{COONa})_2]_x$ ($n = 0$ (triethyl silano), $x = 1$ (41); $n = 1$, $x = 4$ (42); $n = 2$, $x = 8$ (43); $n = 3$, $x = 16$ (44)):

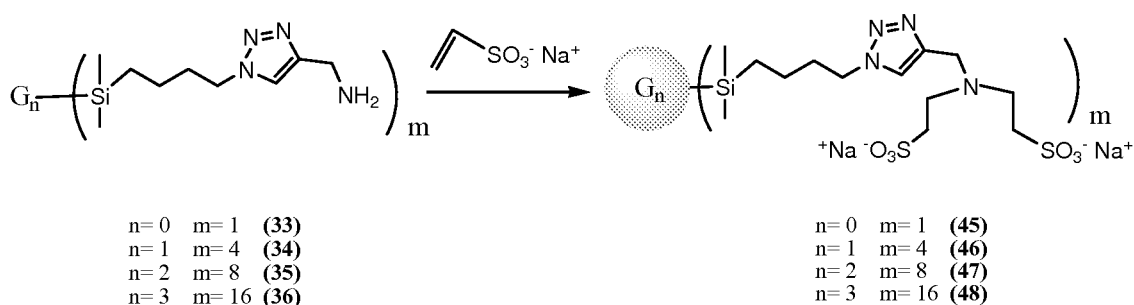




Método 1(b) para dendrímeros aniónicos con grupos sulfonato

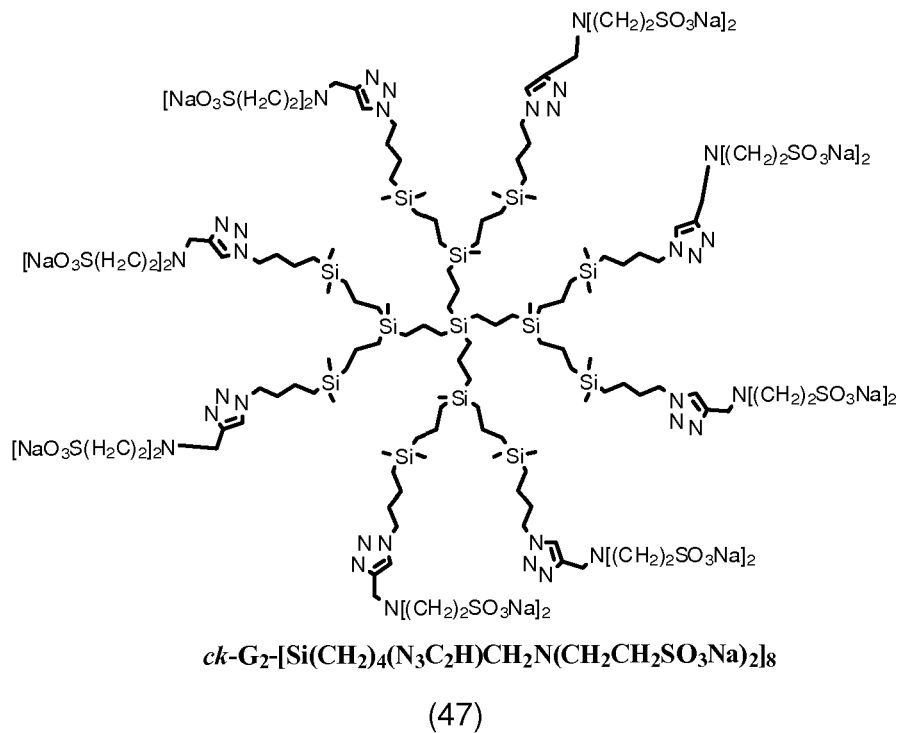
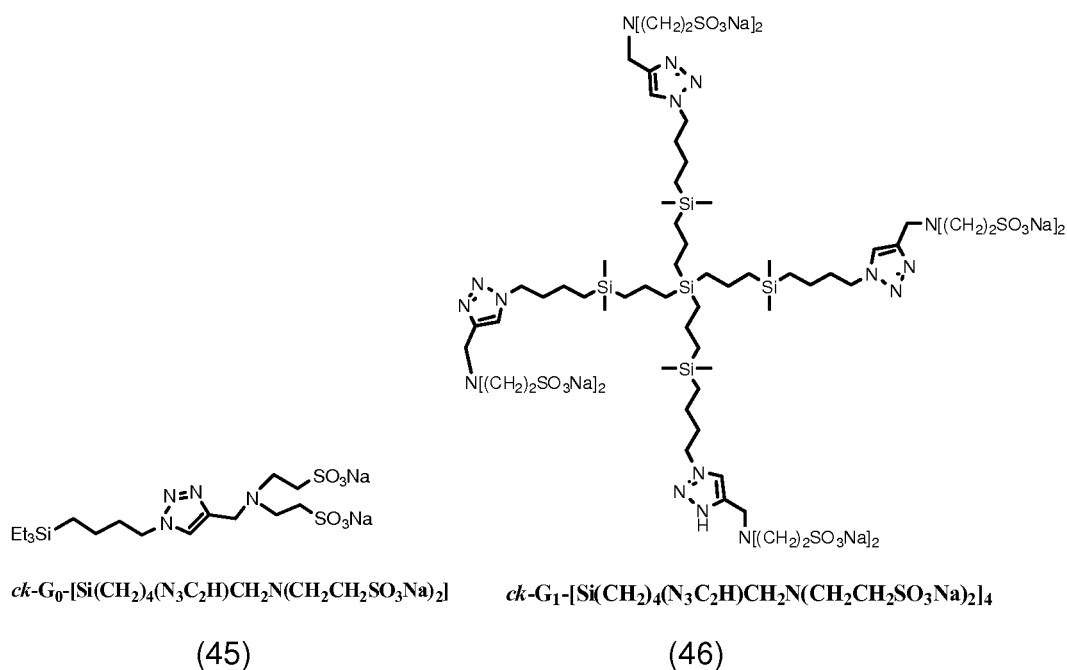
La adición de Michael de vinil sulfonato de sodio sobre los dendrímeros terminados en grupos -NH₂, 33-36, en una mezcla de etanol-agua a 120°C, da lugar a los derivados aniónicos ck-G_n-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂N(CH₂CH₂SO₃Na)₂]_x ($n = 0$ (triethyl sililo), $x = 1$ (45); $n = 1$, $x = 4$ (46); $n = 2$, $x = 8$ (47); $n = 3$, $x = 16$ (48)), como sólidos blancos solubles en agua con un rendimiento elevado y se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo sin mostrar signos de descomposición. (esquema 6).

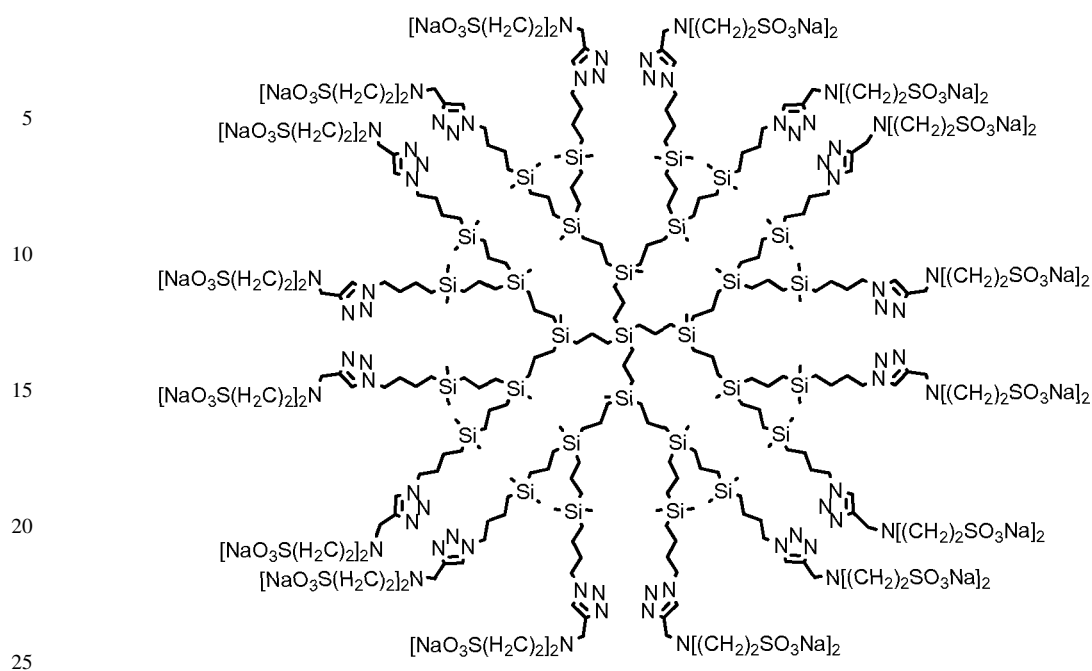
Esquema 6



ES 2 364 264 A1

Los dendrímeros con estructura: $ck\text{-Gn-}[\text{Si}(\text{CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na})_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (45); $n = 1$, $x = 4$ (46); $n = 2$, $x = 8$ (47); $n = 3$, $x = 16$ (48))

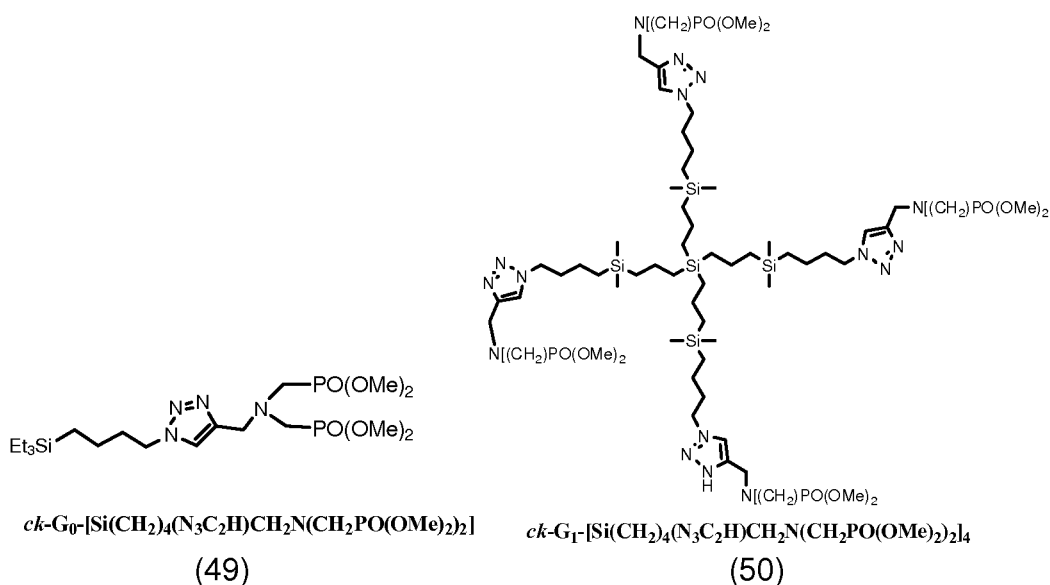




(48)

Método 1(b) para dendrímeros aniónicos con grupos fosfonato

Los dendrímeros terminados en grupos $-NH_2$, 33-36, reaccionan con formaldehído en THF durante 1 hora a temperatura ambiente, a continuación “*in situ*” se añade fosfito de metilo, $HPO(OMe)_2$, y se calienta la mezcla a $40^\circ C$ durante 3 horas, dando lugar a los derivados aniónicos $ck-G_n-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2N(CH_2PO(OMe)_2)_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (49); $n = 1$, $x = 4$ (50); $n = 2$, $x = 8$ (51); $n = 3$, $x = 16$ (52)), como aceites incoloros con un rendimiento elevado y se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo sin mostrar signos de descomposición. (esquema 7). Tienen como estructura estos dendrímeros: $ck-G_n-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2N(CH_2PO(OMe)_2)_2]_x$ ($n = 0$ (trietil sililo), $x = 1$ (49); $n = 1$, $x = 4$ (50); $n = 2$, $x = 8$ (51); $n = 3$, $x = 16$ (52)):

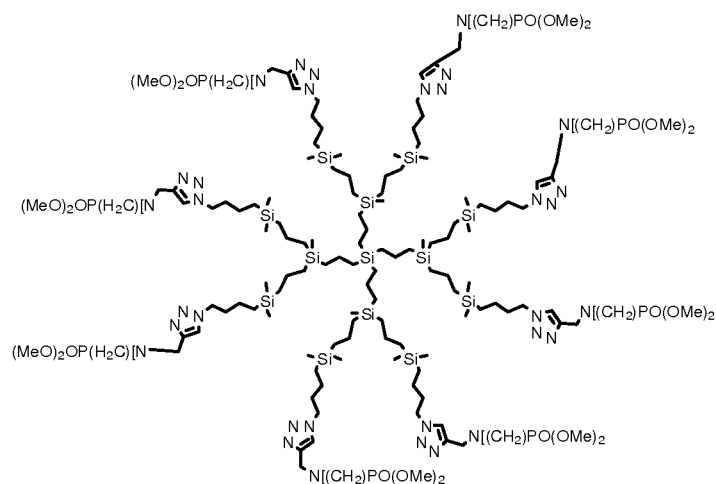


(49)



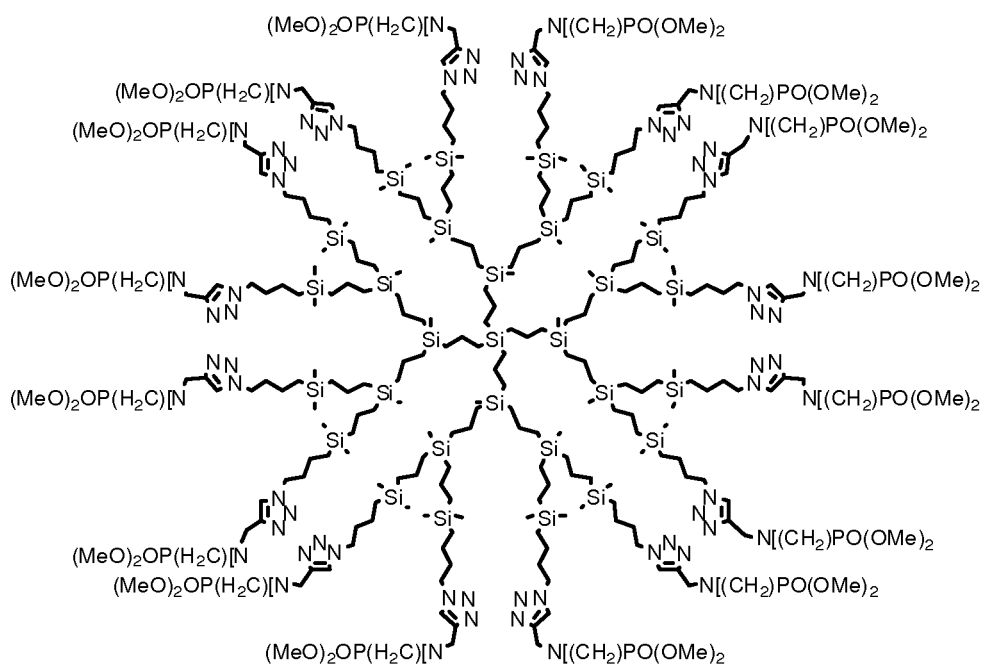
(50)

ES 2 364 264 A1



ck-G₂-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂N(CH₂PO(OMe)₂)₂]₈

(51)



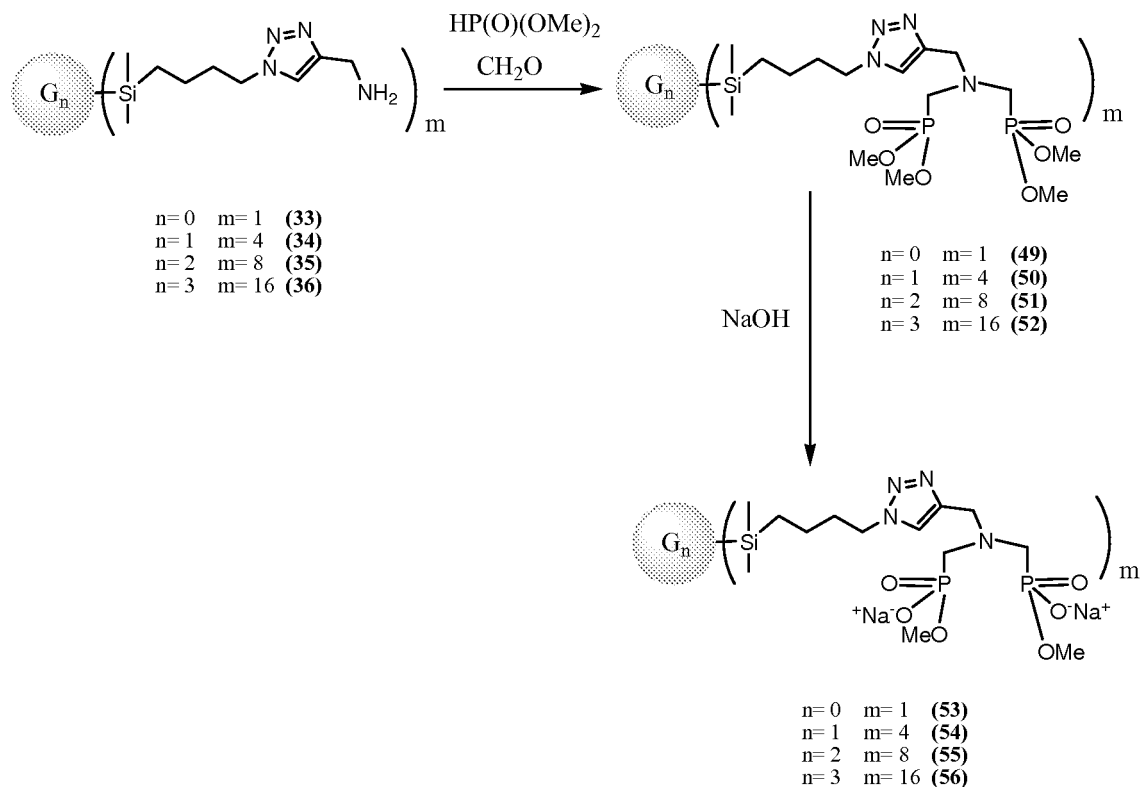
ck-G₃-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂N(CH₂PO(OMe)₂)₂]₁₆

(52)

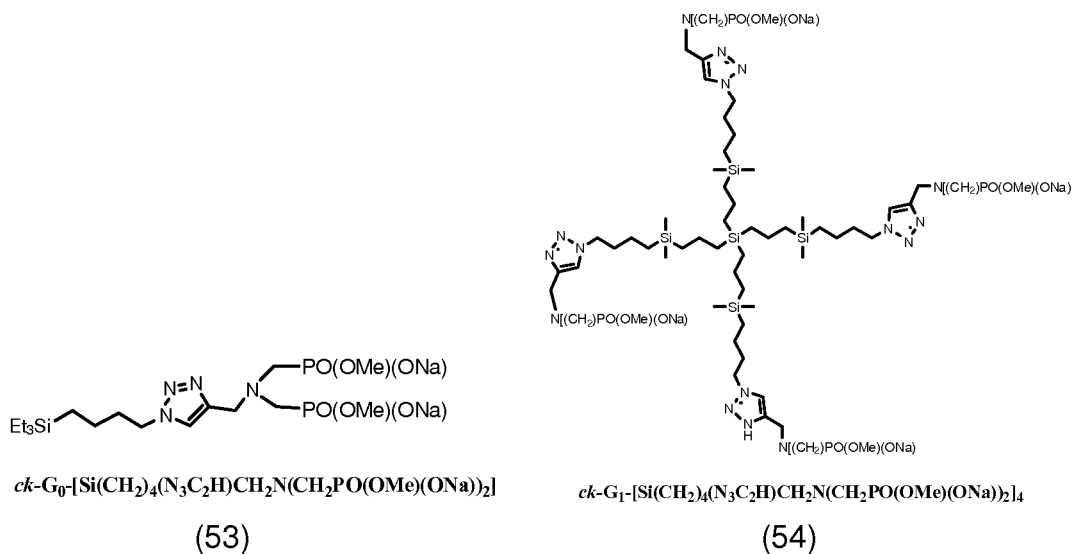
ES 2 364 264 A1

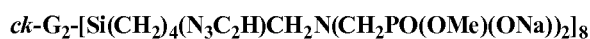
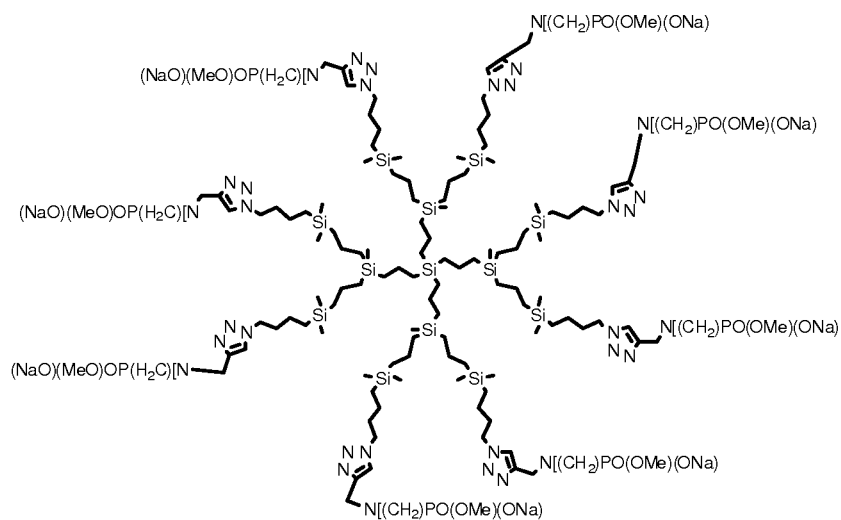
Los derivados 49-52, se pueden transformar en dendrímeros carbosilano aniónicos con grupos fosfonato terminales *ck*-G_n-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂N(CH₂PO(ONa)₂)₂]_x (*n* = 0 (triethyl silano), *x* = 1 (53); *n* = 1, *x* = 4 (54); *n* = 2, *x* = 8 (55); *n* = 3, *x* = 16 (56)) (Esquema 7), por tratamiento con NaOH

Esquema 7

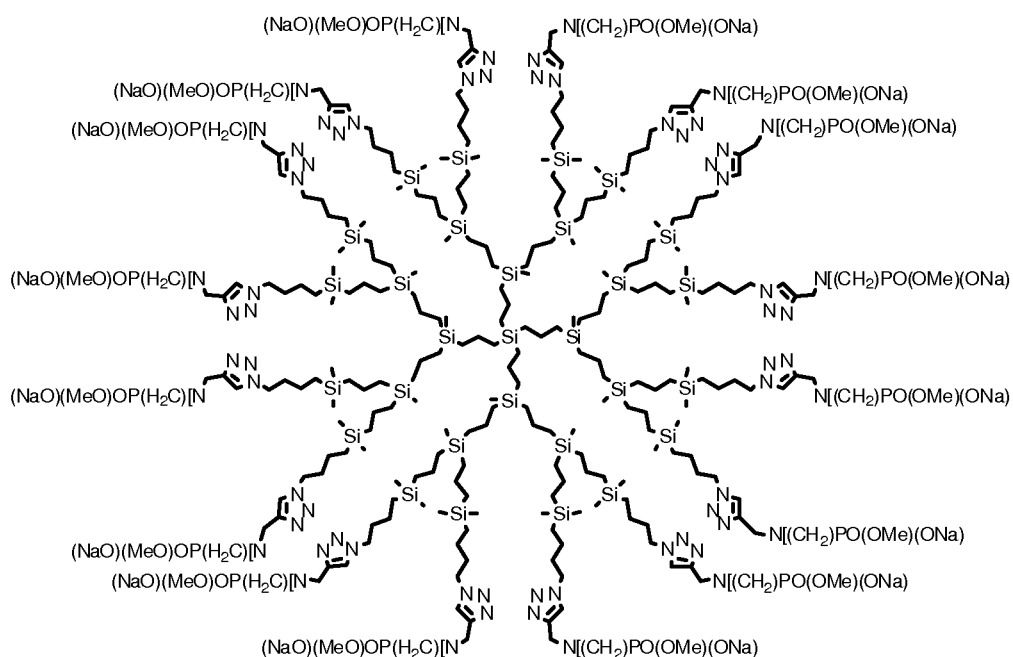


Estos dendrímeros se aíslan como sólidos blancos solubles en agua y se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo sin mostrar signos de descomposición. Y tienen como estructura:





(55)

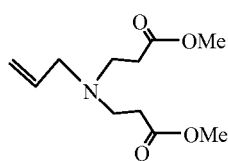
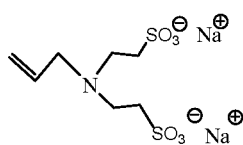
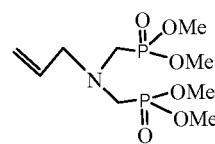
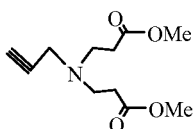
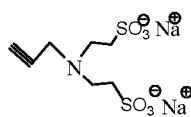
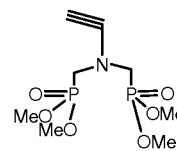
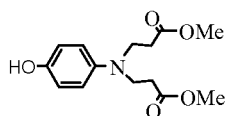
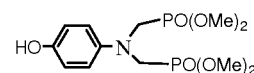


(56)

Método 2

Funcionalización de aminas orgánicas con grupos aniónicos y posterior anclaje de las mismas a un dendrímero de naturaleza carbosilano

Para llevar a cabo la síntesis de estos compuestos, se ha llevado a cabo inicialmente la funcionalización de una serie de aminas orgánicas, alifáticas y aromáticas, con grupos aniónicos o precursores de grupos aniónicos. Estas aminas, disponen además de otro grupo funcional que va a permitir su anclaje a un dendrímero de estructura carbosilano a través de los grupos terminales de este:

**A****B****C****D****E****F****G****H**

Se sintetizaron derivados alilo que contienen grupos carboxilato (A), sulfonato (B) o fosfonato (C) que se podrían utilizar para su anclaje a un dendrímero carbosilano a través de una reacción de hidrosililación con dendrímeros que contengan enlaces Si-H terminales, del tipo $G_n-(SiH)_x$ ($n = 0$ (triethyl silano), 1, 2, 3; $x = 1, 4, 8$ y 16).

Otra familia de compuestos sintetizada, deriva de la funcionalización de propargil amina con grupos carboxilato (D), sulfonato (E) o fosfonato (F). En este caso, la presencia del triple enlace carbono-carbono presente en estos derivados permite su unión a dendrímeros carbosilano con grupos azida terminales, del tipo $G_n-[Si-CH_2CH_2CH_2CH_2N_3]_x$, a través de una reacción de acoplamiento *click* entre el derivado propargilo y el grupo azida del dendrímero.

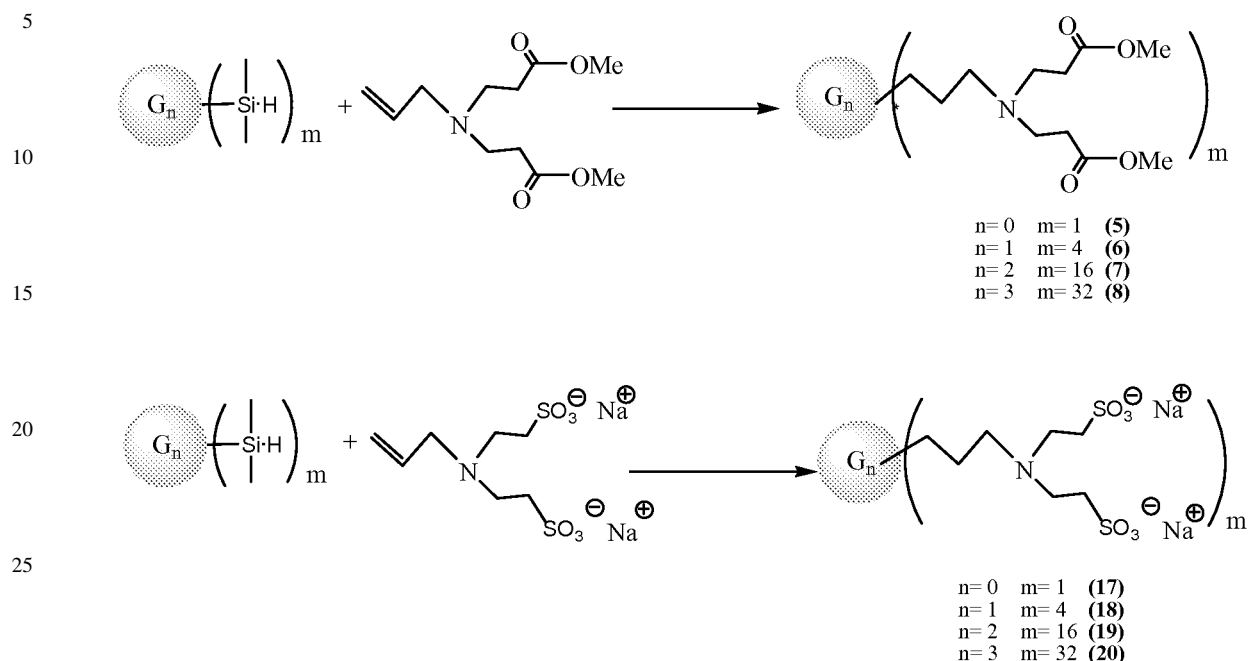
Un tercer tipo de compuestos preparados son aquellos obtenidos a partir de la funcionalización del grupo $-NH_2$ de 4-amino fenol con derivados carboxilato (G), o fosfonato (H). En este caso, la unión de estos compuestos a dendrímeros carbosilano se realiza a través de una reacción de fenólisis de dendrímeros que contienen enlaces terminales Si-Cl ó $SiCH_2-Cl$ (esquema 10).

Método 2(a). Funcionalización de alilamina

La síntesis de los compuestos A-B, se ha realizado a través de una reacción de adición de Michael de alilamina con acrilato de metilo, y vinil sulfonato de sodio respectivamente. En la síntesis del derivado A, la adición de Michael se completa en THF a temperatura ambiente y en tan sólo 3 horas. El derivado B se prepara a través de una adición de Michael de vinil sulfonato de sodio sobre alilamina. En este caso la reacción se lleva a cabo en H_2O como disolvente, a $120^\circ C$ y durante 48 horas. En el caso del derivado C, su preparación se lleva a cabo en una reacción en dos pasos, a partir de alilamina. Inicialmente se hace reaccionar alilamina con formaldehído en THF durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación "*in situ*" se añade fosfito de dimetilo y se calienta la mezcla a $40^\circ C$ durante 3 horas, dando lugar al derivado C como un aceite incoloro.

Una vez obtenidos los derivados alilo A-C, la reacción de hidrosililación de estos derivados con dendrímeros carbosilano crecidos a partir de un núcleo de silicio tetraalilo con enlaces terminales Si-H, de generaciones 1 a 3, del tipo $G_n-(SiH)_x$ ($n = 0$ (triethyl silano), 1, 2, 3; $x = 1, 4, 8$ y 16) da lugar a la síntesis de los dendrímeros carbosilano funcionalizados con grupos acrilato de metilo, 5-8, o sulfonato de sodio, 17-20, que ya han sido descritos en el apartado anterior (ver esquema 8).

Esquema 8



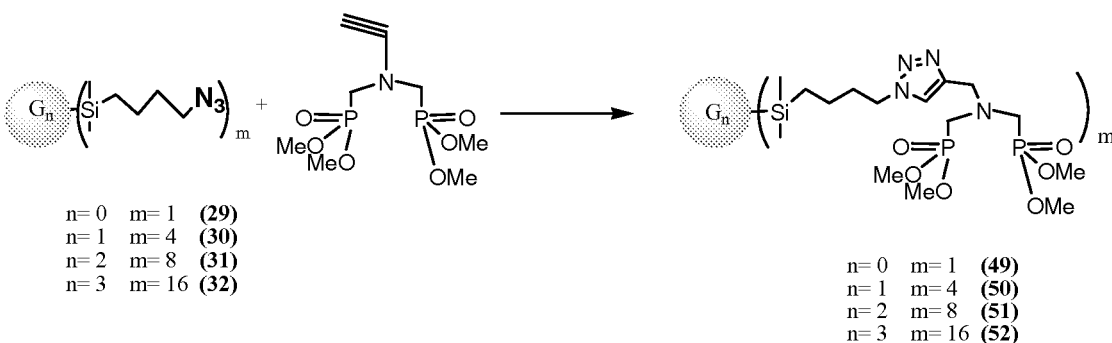
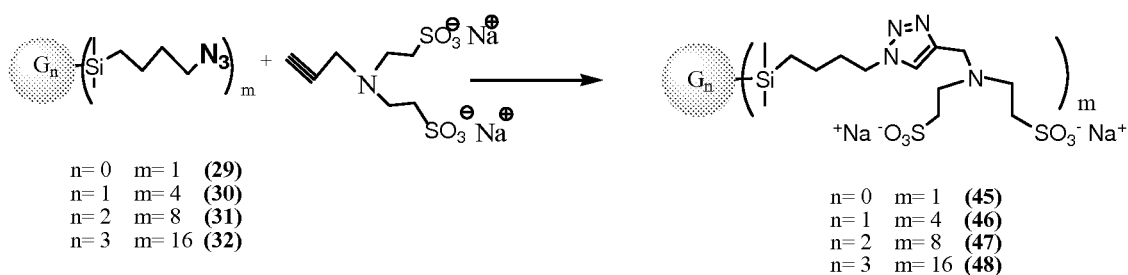
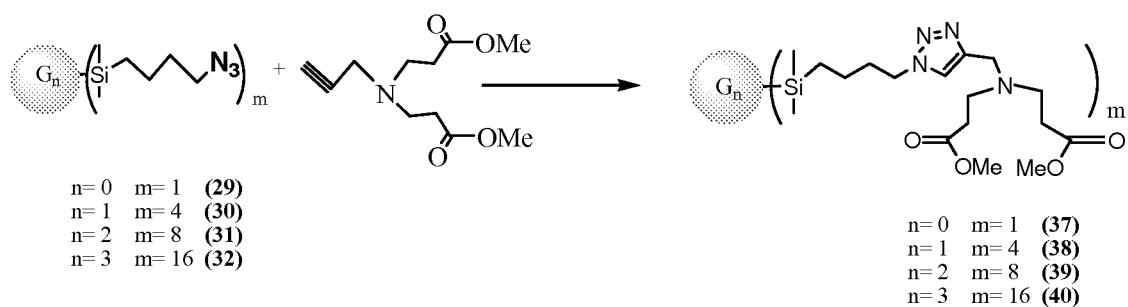
Los derivados 5-8 se pueden transformar en los dendrímeros aniónicos correspondientes, con grupos carboxilato, 9-12, por tratamiento con una disolución de NaOH (ver esquema 1).

Método 2(b). Funcionalización de propargil amina

La síntesis de los compuestos D y E, se ha realizado a través de una reacción de adición de Michael de propargilamina con acrilato de metilo, y vinil sulfonato de sodio respectivamente. En la síntesis del derivado D, la adición de Michael se completa en THF a temperatura ambiente y en tan sólo 3 horas. El derivado E se prepara a través de una adición de Michael de vinil sulfonato de sodio sobre propargilamina. En este caso la reacción se lleva a cabo en H₂O como disolvente, a 120°C y durante 48 horas. En el caso del derivado F, su preparación se lleva a cabo en una reacción en dos pasos, a partir de propargilamina. Inicialmente se hace reaccionar propargilamina con formaldehído en THF durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación “*in situ*” se añade fosfito de dimetilo y se calienta la mezcla a 40°C durante 3 horas, dando lugar al derivado F como un aceite incoloro.

Una vez obtenidos los derivados D-F, la reacción de acoplamiento *click* de estos derivados con dendrímeros carbo-silano crecidos a partir de un núcleo de silicio tetraalilo con grupos terminales azida, de generaciones 1 a 3, del tipo Gn-[Si-CH₂CH₂CH₂CH₂N₃]_x (*n* = 0 (trietil silano), *x* = 1 (29); *n* = 1, *x* = 4 (30); *n* = 2, *x* = 8 (31); *n* = 3, *x* = 16 (32)) da lugar a la síntesis de los dendrímeros carbo-silano funcionalizados con grupos ester, 37-40, sulfonato de sodio, 45-48 o grupos fosfonato de metilo *ck*-Gn-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)₂CH₂N(CH₂PO(OMe)₂)₂]_x (*n* = 0 (trietil silano), *x* = 1 (49); *n* = 1, *x* = 4 (50); *n* = 2, *x* = 8 (51); *n* = 3, *x* = 16 (52)). (Esquema 9)

Esquema 9



Estos dendrímeros con grupos carboxilato, sulfonato o fosfonato ya han sido descritos anteriormente en la presente invención.

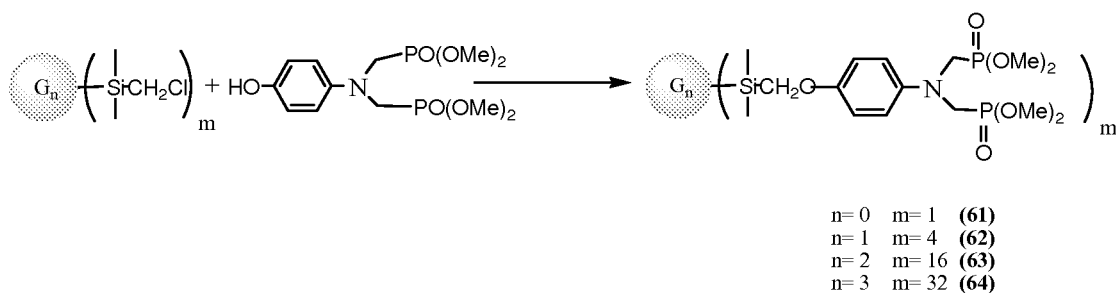
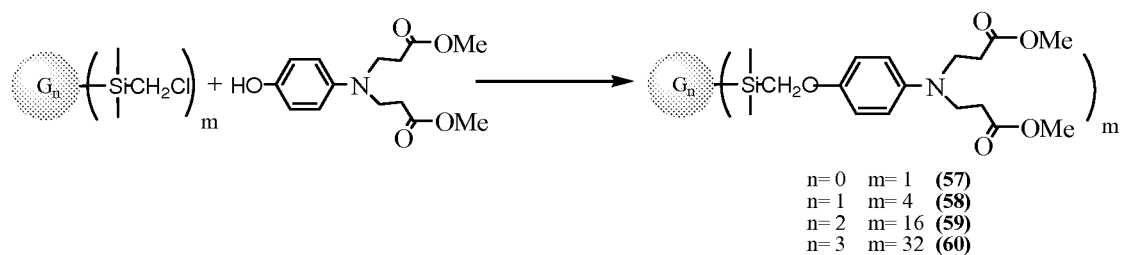
Método 2(c), Funcionalización de 4-aminofenol

La síntesis del compuesto G se ha realizado a través de una reacción de adición de Michael de acrilato de metilo sobre 4-amino fenol. Este derivado se encuentra descrito en la bibliografía. El derivado H se prepara a partir de una reacción en dos pasos, a partir de 4-aminofenol. Inicialmente se hace reaccionar 4-aminofenol con formaldehído en THF durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación “*in situ*” se añade fosfonato de dimetilo y se calienta la mezcla a 40°C durante 3 horas, dando lugar al derivado H como un aceite incoloro.

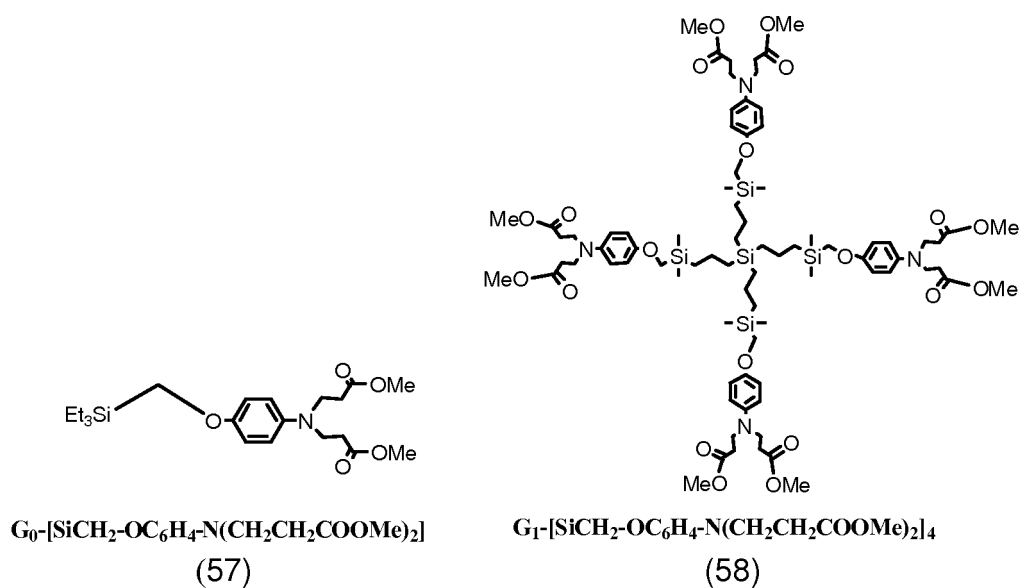
Una vez obtenidos los derivados G y H, la reacción de fenolisis de estos derivados con dendrímeros carbosilano crecidos a partir de un núcleo de silicio tetraalilo con grupos terminales Si-Cl o Si-CH₂Cl, de generaciones 1 a 3, da lugar a la síntesis de los dendrímeros carbosilano funcionalizados con grupos acrilato de metilo, Gn-[SiCH₂-OC₆H₄-N(CH₂CH₂COOMe)₂]_x ($n=0$ (trietil silano), $x=1$ (57); $n=1$, $x=4$ (58); $n=2$, $x=8$ (59); $n=3$, $x=16$ (60)), o grupos fosfonato de metilo Gn-[SiCH₂-OC₆H₄-N(CH₂PO(OMe)₂)₂]_x ($n=0$ (trietil sililo), $x=1$ (61); $n=1$, $x=4$ (62); $n=2$, $x=8$ (63); $n=3$, $x=16$ (64)), esquema 10. Los compuestos 57-64 se obtienen como aceites incoloros solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos de uso común, pero insolubles en agua.

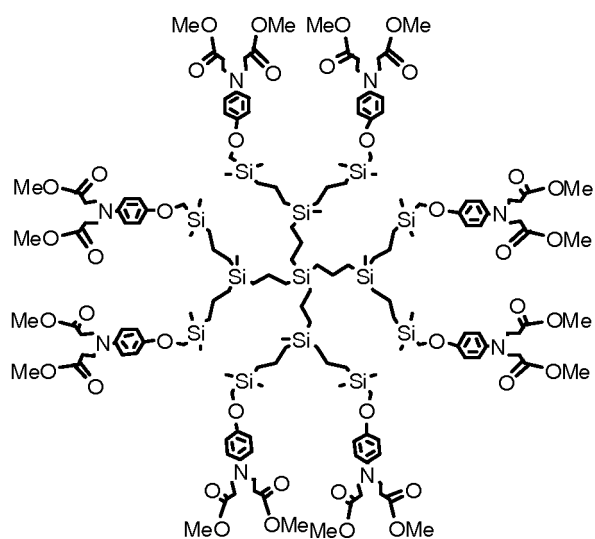
ES 2 364 264 A1

Esquema 10

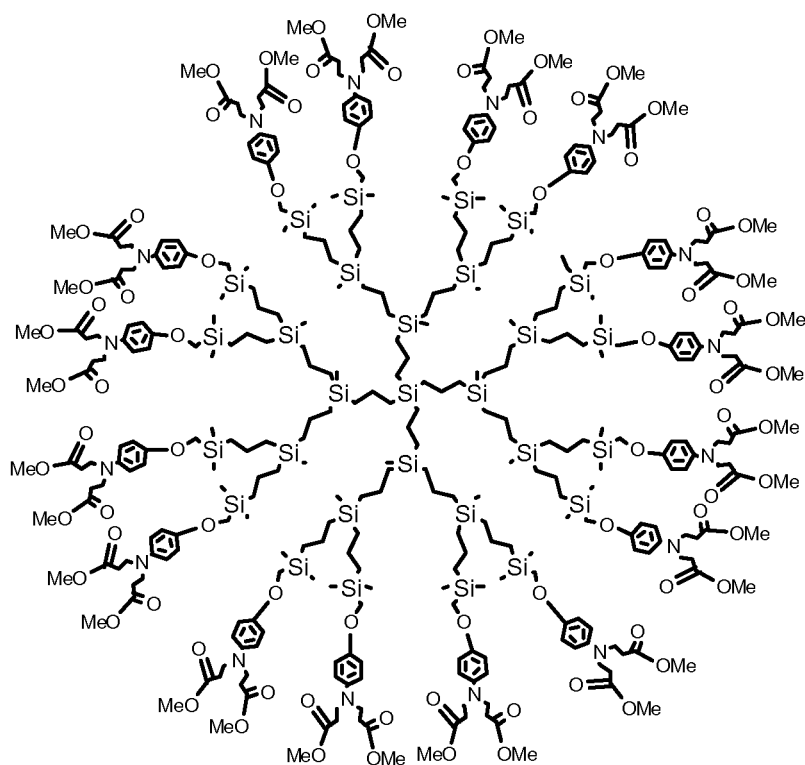


Estos dendrímeros han sido caracterizados por análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno, resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , ^{29}Si y ^{31}P , y espectrometría de masas. Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con las estructuras propuestas. $\text{G}_n\text{-}[\text{SiCH}_2\text{-OC}_6\text{H}_4\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_x$ ($n=0$ (trietil sililo), $x=1$ (57); $n=1$, $x=4$ (58); $n=2$, $x=8$ (59); $n=3$, $x=16$ (60))





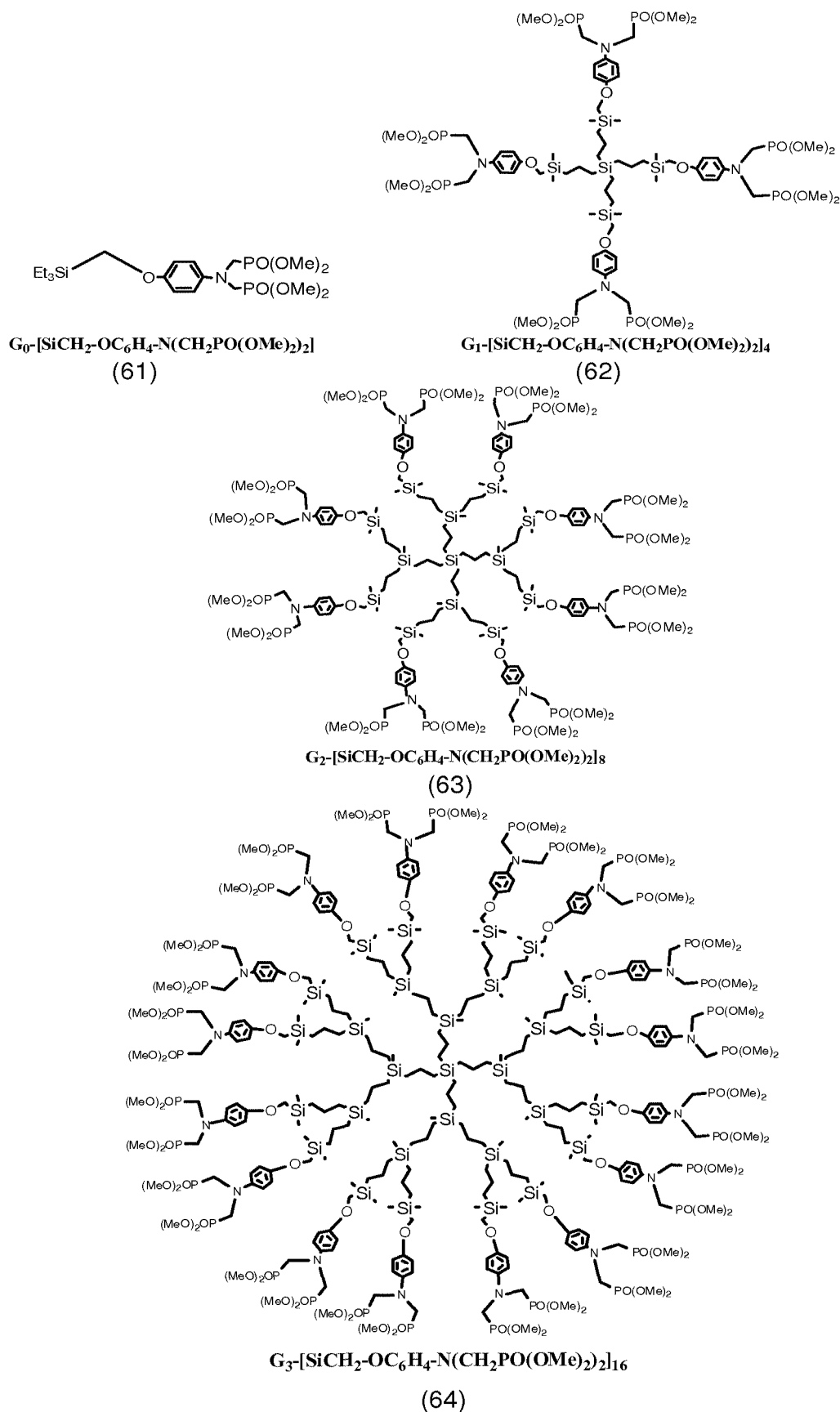
$G_2-[SiCH_2-OC_6H_4-N(CH_2CH_2COOMe)_2]_8$
(59)



$G_3-[SiCH_2-OC_6H_4-N(CH_2CH_2COOMe)_2]_{16}$
(60)

ES 2 364 264 A1

Y las estructuras de los dendrímeros $G_n-[SiCH_2-OC_6H_4-N(CH_2PO(OMe)_2)_2]_x$ ($n = 0$ (triethyl silano), $x = 1$ (61); $n = 1$, $x = 4$ (62); $n = 2$, $x = 8$ (63); $n = 3$, $x = 16$ (64)):



Síntesis y caracterización de dendrímeros carbosilano

Los dendrímeros descritos en el apartado anterior fueron caracterizados por análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno, resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , ^{29}Si y ^{31}P , y espectrometría de masas. Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con las estructuras propuestas para estos derivados.

Ejemplo 1

10 *Síntesis de G_1 -[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]₄ (6)*

Método 1

Sobre una disolución en MeOH del compuesto G_1 -[(CH₂)₃NH₂]₄ (0.88 g, 1.34 mmol), preparado como se describe en la bibliografía (S.W. Krska, D. Seyferth, J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 3604-3612), se añade el reactivo comercial CH₂=CHCOOMe (1.0 ml, 11.1 mmol). La mezcla así preparada se mantiene a temperatura ambiente y con agitación constante durante 12 h, tras las cuales se elimina el disolvente a vacío. De este modo se obtiene el compuesto 6 como un aceite incoloro (1.79 g, 99%).

Método 2

Sobre una disolución en tolueno del dendrímero G_1 -[Si-H]₄ (0.24 g, 0.05 mmol), se añade el derivado CH₂=CHCH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂ (0.5 g, 2.18 mmol) y una gota de una disolución de catalizador de Karstedt [(3-3.5% en Pt) en poli(dimetilsiloxano)]. La mezcla así preparada se mantiene con agitación constante a temperatura ambiente durante 12 h, tras las cuales se elimina el disolvente por evaporación a vacío. De este modo se obtiene el compuesto 6 (0.58 g, 80%).

RMN- ^1H (CDCl₃): δ 3.64 (s, 24H, -OMe), 2.75 (t, 16H, -NCH₂CH₂COOMe), 2.42 (m, 16H, -NCH₂CH₂COOMe y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.32 (m, 16H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.54 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.37 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), -0.06 (s, 24H, -SiMe₂). RMN- ^{13}C { ^1H } (CDCl₃): δ 173.0 (COOMe), 57.5 (SiCH₂CH₂CH₂N-), 51.5 (-OMe), 49.3 (-NCH₂CH₂COOMe), 32.4 (-NCH₂CH₂COOMe), 21.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.3, 18.5, 18.0 (Si(CH₂)₃Si-), 13.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.3 (-SiMe₂). RMN- ^{29}Si { ^1H } (CDCl₃): δ 0.8 (G₀-Si), 1.9 (G₁-Si). Análisis elemental C₆₄H₁₂₈N₄O₁₆Si₅: Calc. %: C, 56.93; H, 9.56; N, 4.15; Exp. %: C 57.09; H, 10.06; N, 4.34. GPC: PDI exp = 1.04.

Ejemplo 2

40 *Síntesis de G_2 -[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]₈ (7)*

El dendrímero de segunda generación se sintetiza siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto 6 partiendo del dendrímero G_2 -[(CH₂)₃NH₂]₈ en MeOH (0.65 g, 0.39 mmol) y de un exceso de acrilato de metilo, CH₂=CHCOOMe (1 ml, 11.1 mmol). De este modo se obtiene el compuesto 7 como un aceite incoloro (1.09 g, 92%).

RMN- ^1H (CDCl₃): δ 3.64 (s, 48H, -OMe), 2.75 (m, 32H, -NCH₂CH₂COOMe), 2.42 (m, 48H, -NCH₂CH₂COOMe y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.31 (m, 40H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.53 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.38 (m, 16H, SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.06 (s, 48H, -SiMe₂), -0.1 (s, 12H, -SiMe). RMN- ^{13}C { ^1H } (CDCl₃): δ 173.0 (-COOMe), 57.5 ((-SiCH₂CH₂CH₂N-), 51.5 OMe), 49.2 (-NCH₂CH₂COOMe), 32.5 (-NCH₂CH₂COOMe), 21.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.1 - 17.7 (Si(CH₂)₃Si-), 12.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.3 (-SiMe₂) -5.0 (-SiMe). RMN- ^{29}Si { ^1H } (CDCl₃): δ (G₀-Si no se observa), 0.78 (G₁-Si), 1.88 (G₂-Si). Análisis elemental C₁₄₄H₂₉₂N₈O₃₂Si₁₃: Calc. %: C, 57.40; H, 9.77; N, 3.72; Exp. %: C 56.76; H, 9.78; N, 3.88. GPC: PDI exp = 1.3

Ejemplo 3

55 *Síntesis de G_3 -[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COOMe)₂]₁₆ (8)*

El dendrímero de tercera generación se prepara del mismo modo que los dendrímeros de 1ª y 2ª generación, partiendo del dendrímero G_3 -[(CH₂)₃NH₂]₁₆ disuelto en MeOH (0.25 g, 0.06 mmol), y de un exceso de acrilato de metilo, CH₂=CHCOOMe (1 ml, 11.1 mmol). De este modo se obtiene el compuesto 8 como un aceite incoloro (0.39 g, 99%).

RMN- ^1H (CDCl₃): δ 3.63 (s, 96H, -OMe), 2.74 (m, 64H, -NCH₂CH₂COOMe), 2.41 (m, 96H, -NCH₂CH₂COOMe y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.31 (m, 88H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.53 (m, 112H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.37 (m, 32H, SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.07 (s, 96H, -SiMe₂), -0.1 (s, 36H, -SiMe). RMN- ^{13}C { ^1H } (CDCl₃): δ 173.0 (-COOMe), 57.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 51.5 (-OMe), 49.2 (-NCH₂CH₂COOMe), 32.5 (-NCH₂CH₂COOMe), 21.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.1 - 17.9 (Si(CH₂)₃Si-), 12.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.3 (-SiMe₂) -5.0 (-SiMe).

ES 2 364 264 A1

RMN-²⁹Si{¹H} (CDCl₃): δ (G₀-Si y G₁-Si no se observan), 0.8 (G₂-Si), 1.9 (G₃-Si). Análisis elemental C₃₀₄H₆₂₀N₁₆O₆₄Si₂₉: Calc. %: C, 57.60; H, 9.86; N, 3.54; Exp. %: C 58.38; H, 9.86; N, 3.08. GPC: PDI exp = 1.3.

5 Ejemplo 4

Síntesis de G₁-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COONa)₂]₄ (10)

Sobre una disolución del dendrímero 6 (1.80 g, 1.34 mmol) en etanol, se añade un exceso de una disolución de hidróxido sódico de pH= 10. Esta mezcla se mantiene con agitación constante durante 2 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente y lavar con éter dietílico se obtiene el compuesto 10 como un sólido blanco (1,86 g, 98%), soluble en agua.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.57 (m, 8H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.72 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.16 (m, 16H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.25 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.43 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.27 (t, 8H, SiCH₂CH₂CH₂N), -0.20 (s, 24H, -SiMe₂). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 179.9 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 55.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 48.6 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 32.7 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 18.4, 17.5 y 15.9 (Si(CH₂)₃Si), 11.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -4.8 (-SiMe₂). RMN-²⁹Si{¹H} (D₂O): δ 1.1 (G₀-Si), 1.8 (G₁-Si). RMN-¹⁵N{¹H} (D₂O): δ -322.6. Análisis elemental C₅₆H₁₀₄N₄Na₈O₁₆Si₅: Calc. %: C, 47.57; H, 7.41; N, 3.96; Exp. %: C 46,15; H, 7.53; N, 3.62.

Ejemplo 5

Síntesis de G₂-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COONa)₂]₈ (11)

El dendrímero de segunda generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto 10. Partiendo de una disolución del dendrímero de segunda generación 7 (1.05 g, 0.35 mmol) en etanol, se añade un exceso de una disolución de hidróxido sódico de pH= 10. Esta mezcla se deja agitando durante 2 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente y lavar con éter dietílico se obtiene el compuesto 11 como un sólido blanco (1.06 g, 97%), soluble en agua.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.61 (m, 32H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.31 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.17 (m, 32H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.31 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-, 1.20 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.42 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.26 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.17 (s ancho, 48H, -SiMe₂), -0.21 (s ancho, 12H, -SiMe). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 180.5 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 56.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 49.7 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 33.7 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 19.3 - 17.9 (Si(CH₂)₃Si), 12.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.4 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe). RMN-²⁹Si{¹H} (D₂O): δ (G₀-Si no se observa), 1.2 (G₁-Si), 1.9 (G₂-Si). RMN-¹⁵N{¹H} (D₂O): δ -329. Análisis elemental C₁₂₈H₂₄₄N₈Na₁₆O₃₂Si₁₃: Calc. %: C, 48.96; H, 7.83; N, 3.57; Exp. %: C, 49.03; H, 7.79; N, 3.31.

Ejemplo 6

Síntesis de G₃-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂COONa)₂]₁₆ (12)

El dendrímero de tercera generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1ª y 2ª generación 10 y 11, partiendo de una disolución del dendrímero 8 (0.39 g, 0.07 mmol) en etanol, sobre el que se añade un exceso de una disolución de hidróxido sódico de pH= 10. Esta mezcla mantiene agitando durante 2 h a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente y lavar con éter dietílico se obtiene el compuesto 12 como un sólido blanco (1.07 g, 95%) soluble en agua.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.54 (m, 64H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.22 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.14 (m, 64H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.20 (m, 88H, -SiCH₂CH₂CH₂N-, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.42 (m, 112H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.25 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.17 (s ancho, 96H, -SiMe₂), -0.25 (s ancho, 36H, -SiMe). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 181.2 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 57.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 49.6 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 34.3 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 20.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 19.5 - 18.0 (Si(CH₂)₃Si), 13.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.4(-SiMe₂), -4.5 (-SiMe). RMN-²⁹Si{¹H} (D₂O): δ (G₀-Si y G₁-Si no se observan), 1.1 (G₂-Si), 2.0 (G₃-Si).

60 Ejemplo 7

Síntesis de G₁-[Si(CH₂)₃N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂]₄ 4 Cl⁻ (14)

El dendrímero de primera generación se prepara partiendo de una disolución en MeOH del dendrímero 10 (1.36 g, 1.01 mmol), y de un exceso de HCl al 37% (2.36 mmol). La mezcla de reacción se mantiene temperatura ambiente y con agitación constante durante 3 h, tras las cuales se elimina el disolvente por evaporación a vacío calentando con un baño de agua a 50°C. El residuo resultante se lava con dietil éter frío (2 x 25 ml), así se obtiene el compuesto 14 como un sólido blanco (1.17 g, 84%).

ES 2 364 264 A1

RMN-¹H (D₂O): δ 3.30 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 2.99 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.70 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 1.57 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.21 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.44 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.15 (s ancho, 6H, -SiMe₂). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 174.0 (-COOH), 55.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.1 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 28.4 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 19.6, 18.5, 18.2 (Si(CH₂)₃Si), 17.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.6 (-SiMe₂). RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -325 (-N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂). RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 2.2 (G₁-Si). Análisis elemental C₅₆H₁₁₆Cl₄N₄O₁₆Si₅: Calc. %: C, 48.61; H, 8.45; N, 4.05; Exp. C, 48.78; H, 8.41; N, 4.00.

10 Ejemplo 8

Síntesis de G₂-[Si(CH₂)₃N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂]₈ 8 Cl⁻ (15)

El dendrímero de segunda generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto 14, partiendo de una disolución del dendrímero de segunda generación 11 (1.0 g, 0.33 mmol) en MeOH y de un exceso de HCl al 37% (2.65 mmol). De este modo se obtiene el compuesto 15 como un sólido blanco soluble en agua (0.98 g, 96%).

RMN-¹H (D₂O): δ 3.30 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 3.01 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.74 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 1.57 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.20 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.42 (m, 64H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.14 (s ancho, 60H, -SiMe₂ y -SiMe). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 173.8 (-COOH), 55.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.1 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 28.4 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 19.6-17.0 (Si(CH₂)₃Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.5 (-SiMe₂ y -SiMe). RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si no se observan), 1.1 (G₁-Si), 2.2 (G₂-Si). Análisis elemental C₁₂₈H₂₆₈Cl₈N₈O₃₂Si₁₃: Calc. %: C, 49.91; H, 8.77; N, 3.64; Exp. %: C, 50.64; H, 8.61; N, 3.45.

Ejemplo 9

Síntesis de G₃-[Si(CH₂)₃N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂]₁₆ 16 Cl⁻ (16)

El dendrímero de tercera generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación 14 y 15, partiendo de una disolución del dendrímero 12 (1.0, 0.17 mmol) en MeOH, sobre la que se añade un exceso de HCl al 37% (2.52 mmol). De este modo se obtiene el compuesto 16 (0.8 g, 86%) como un sólido blanco soluble en agua.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.29 (m, 64H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 3.0 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.71 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 1.57 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.19 (m, 56H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.40 (m, 144H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.14 (s ancho, 132H, -SiMe₂ y -SiMe). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 174.6 (-COOH), 55.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.4 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 28.9 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 19.8-17.2 (Si(CH₂)₃Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.5 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe). RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si, G₁-Si y G₂-Si no se observan), 2.5 (G₃-Si). Análisis elemental C₂₇₂H₅₇₂Cl₁₆N₁₆O₆₄Si₂₉: Calc. %: C, 50.47; H, 8.91; N, 3.46; Exp. %: C, 50.99; H, 8.61; N, 2.99.

45 Ejemplo 10

Síntesis de G₁-[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂SO₃Na)₂]₄ (18)

Sobre una disolución del dendrímero G₁-[CH₂CH₂CH₂NH₂]₄ (1.16 g, 1.75 mmol) en etanol, se añade el reactivo comercial CH₂=CHSO₃Na 30% en peso, en H₂O (5.16 ml, 14.0 mmol). Esta mezcla se deja agitando durante 3 días a 120°C. Transcurrido este tiempo se elimina la disolución sobrenadante por filtración y el residuo sólido se lava con MeOH. De este modo se obtiene el dendrímero 18 como un sólido blanco (2.25 g, 73%).

RMN-¹H (D₂O): δ 2.86 (m, 16H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.77 (m, 16H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.27 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.39 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.21 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-) 0.42 (m, 9H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.20 (s, 24H, -SiMe₂). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 56.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 47.8 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 47.0 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.4 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), 19.4, 16.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N- y SiCH₂CH₂CH₂Si-), 18.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 12.3 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), -3.8 (-SiMe₂). RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -339.1 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺). RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si no se observa), 1.8 (G₁-Si). Análisis elemental C₅₂H₁₁₆N₄Na₈O₂₄S₈Si₅: Calc. %: C, 35.44; H, 6.63; N, 3.18; S, 14.56; Exp. %: C, 34.54; H, 6.56; N, 3.02; S, 15.28.

ES 2 364 264 A1

Ejemplo 11

Síntesis de G_2 -[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂SO₃Na)₂]₈ (19)

- 5 Sobre una disolución del dendrímero G_2 -[CH₂CH₂CH₂NH₂]₈ (0.5 g, 0.31 mmol) en etanol, se añaden el reactivo comercial CH₂=CHSO₃Na 30% en peso en H₂O (1.8 ml, 4.91 mmol). Esta mezcla se deja agitando durante 3 días a 120°C. Transcurrido este tiempo se elimina la disolución sobrenadante por filtración y el residuo sólido se lava con MeOH. De este modo se obtiene 19 como un sólido blanco (0.91 g, 80%).
- 10 RMN-¹H (D₂O): δ 2.86 (m, 32H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.76 (m, 32H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.28 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.21 (m, 40H, -SiCH₂CH₂CH₂N-, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.43 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.28 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.16 (s ancho, 48H, -SiMe₂), -0.21 (s ancho, 12H, -SiMe). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 56.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 48.0 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 46.7 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 18.5-17.7 (Si(CH₂)₃Si), 12.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.5 (SiMe₂), -4.4 (SiMe). RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -348.5 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺). RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si no se observa), 1.1 (G₁-Si), 2.1 (G₂-Si). Análisis elemental C₁₁₂H₂₄₄N₈Na₁₆O₄₈Si₁₆Si₁₃: Calc. %: C, 36.19; H, 6.62; N, 3.01; S, 13.80; Exp. %: C, 36.06; H, 7.04; N, 2.63; S, 13.91.

20 Ejemplo 12

Síntesis de G_3 -[Si(CH₂)₃N(CH₂CH₂SO₃Na)₂]₁₆ (20)

- 25 Sobre una disolución del dendrímero G_3 -[CH₂CH₂CH₂NH₂]₁₆ (0.52 g, 0.14 mmol) en etanol, se añade el reactivo comercial CH₂=CHSO₃Na 30% en peso en H₂O (1.70 ml, 4.64 mmol). Esta mezcla se deja agitando durante 3 días a 120°C. Transcurrido este tiempo se elimina la disolución sobrenadante por filtración y el residuo sólido se lava con MeOH. De este modo se obtiene el dendrímero 20 como un sólido blanco (0.79 g, 73%).
- 30 RMN-¹H (D₂O): δ 2.85 (m, 64H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.78 (m, 64H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.27 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.24 (m, 88H, -SiCH₂CH₂CH₂N-, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.44 (m, 144H, SiCH₂CH₂CH₂Si-, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.15 (s ancho, 132H, -SiMe₂ y -SiMe). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 57.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 47.9 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 47.1 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.0-18.0 (Si(CH₂)₃Si), 12.7 (-SiCH₂CH₂CH₂Si-), -3.4 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe). RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -349.7. RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si y G₁-Si no se observan), 1.2 (G₂-Si), 2.0 (G₃-Si). Análisis elemental C₂₂₄H₄₉₂N₁₆Na₃₂O₉₆Si₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 35.76; H, 6.59; N, 2.98; S, 13.64; Exp. %: C, 36.93; H, 7.19; N, 2.58; S, 12.86.

Ejemplo 13

40 Síntesis de G_1 -[Si(CH₂)₃N⁺H(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₄ 4 Cl⁻ (22)

- Sobre una disolución de un equivalente del dendrímero 18 (0.05 g, 0.03 mmol), en agua, se añade un exceso de una disolución de una disolución de HCl 1M en dietil éter (0.5 ml, 0.23 mmol). La mezcla así preparada se mantiene con agitación constante durante 12 h, tras las cuales se elimina el disolvente por evaporación a vacío. El residuo resultante se lava con éter dietílico (2 x 25 ml) y se cromatografía en columna de sephadex con agua como eluyente. De este modo se aísla el compuesto 22 como un sólido blanco (0.04 g, 80%), soluble en agua.

- 50 RMN-¹H (D₂O): δ 3.44 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 3.16 (m, 24H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.56 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H- y -SO₃⁻Na⁺), 1.21 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-) 0.42 (m, 9H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.16 (s ancho, 24H, -SiMe₂). RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 56.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.4 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 44.8 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 19.6 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), 18.5, 18.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H- y SiCH₂CH₂CH₂Si-), 17.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.4 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), -3.5 (-SiMe₂). RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -338.5 (N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺). RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si no se observa), 2.3 (G₁-Si). Análisis elemental C₄₆H₁₁₂Cl₄N₄O₂₄S₈Si₅: Calc. %: C, 33.60; H, 6.87; N, 3.41; S, 15.60; Exp. %: C, 32.52; H, 5.87; N, 3.72; S, 14.58.

Ejemplo 14

60 Síntesis de G_2 -[Si(CH₂)₃N⁺H(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₈ 8 Cl⁻ (23)

- El dendrímero de segunda generación se prepara de un modo similar al descrito para el compuesto 22, partiendo de una disolución en agua del dendrímero 19 (0.07 g, 0.02 mmol) y de un exceso de una disolución 1M en dietil éter de HCl (0.5 ml, 0.3 mmol). De este modo se obtiene el compuesto 23 como un sólido blanco (0.04 g, 60%), soluble en agua.

- 65 RMN-¹H (D₂O): δ 3.47 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 3.17 (m, 48H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.58 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H- y -SO₃⁻Na⁺), 1.23 (m, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y SiCH₂CH₂CH₂Si-).

ES 2 364 264 A1

Si-), 0.46 (m, 64H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si-}$, $\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si-}$ y $\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$), -0.11 (s ancho, 60H, -SiMe_2 y -SiMe). RMN- ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (D_2O): δ 55.6 ($\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$), 48.4 ($\text{-N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$), 43.9 ($\text{-N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$), 20.5 - 17.1 ($\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$ y $\text{Si(CH}_2)_3\text{Si}$), 10.6 ($\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$), -3.3 (-SiMe_2 y -SiMe). RMN- ^{29}Si $\{^1\text{H}\}$ (D_2O): δ ($\text{G}_0\text{-Si}$ no se observa), 0.7 ($\text{G}_1\text{-Si}$), 2.2 ($\text{G}_2\text{-Si}$). Análisis elemental $\text{C}_{112}\text{H}_{268}\text{Cl}_8\text{N}_8\text{O}_{48}\text{Si}_{13}$: Calc. %: C, 36.78; H, 7.39; N, 3.06; S, 14.03; Exp. %: C, 35.93; H, 7.46; N, 3.43; S, 13.97.

Ejemplo 15

Síntesis de $\text{G}_3\text{-[Si(CH}_2)_3\text{N}^+\text{H(CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_{16} \text{16 Cl}^-$ (24)

El dendrímero de tercera generación se prepara de un modo similar al descrito para los compuestos 22 y 23, partiendo de una disolución en agua del dendrímero 20 (0.06 g, 0.008 mmol) y de un exceso de una disolución 1M en dietil éter de HCl (0.5 ml, 0.3 mmol). De este modo se obtiene el compuesto 24 como un sólido blanco (0.04 g, 60%), soluble en agua.

RMN- ^1H (D_2O): δ 3.47 (m, 64H, $\text{-N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$), 3.16 (m, 96H, $\text{-N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ y $\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$), 1.57 (m, 64H, $\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$ y $\text{-SO}_3^-\text{Na}^+$), 1.21 (m, 56H, $\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si-}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si-}$), 0.44 (m, 144H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si-}$, $\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si-}$ y $\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$), -0.11 (s ancho, 132H, -SiMe_2 y -SiMe). RMN- ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (D_2O): δ 56.5 ($\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H-}$), 45.1 y 44.9 ($\text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ y $\text{-N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$), 20.0-17.8 ($\text{-SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}$ y $\text{Si(CH}_2)_3\text{Si}$), 11.6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), -3.3 (-SiMe_2), -4.4 (-SiMe). Análisis elemental $\text{C}_{224}\text{H}_{540}\text{Cl}_{16}\text{N}_{16}\text{O}_{96}\text{S}_{32}\text{Si}_{29}$: Calc. %: C, 36.34; H, 7.35; N, 3.03; S, 13.86; Exp. %: C, 35.87; H, 7.84; N, 3.34; S, 12.96.

Ejemplo 16

Síntesis de $\text{G}_1\text{-[SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}]_4$ (26)

En una ampolla de vidrio se disuelven 1.52 g del dendrímero $\text{G}_1\text{-[Si-H]}_4$ (3.52 mmol) en hexano (5 mL) y se le añaden 1.61 mL de 4-bromobuteno (15.85 mmol). A continuación se añaden 5 gotas del catalizador de Karstedt y se agita vigorosamente durante 5 días a 60°C. Transcurrido este tiempo la reacción se concentra a sequedad y se redisuelve en diclorometano. La mezcla se filtra por carbón activo y celite y se lleva a sequedad para dar un aceite amarillento que se identifica como el dendrímero de primera generación 26 (2.32 g, 68%).

RMN- ^1H (CDCl_3): δ 3.40 (8H, t, CH_2Br), 1.85 (8H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 1.37 (16H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.51 (24H, m, CH_2 unidos a Si), -0.05 (24H, s, SiCH_3). RMN- ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ 36.4 (CH_2Br), 33.7 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 22.5 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 20.2 (SiCH_2), 18.6 (SiCH_2), 17.6 (SiCH_2), 14.5 (SiCH_2), -3.281 (SiCH_3). Análisis elemental $\text{C}_{36}\text{H}_{80}\text{Br}_4\text{Si}_5$: Calc. %: C, 44.44; H, 8.29; Exp. %: C, 44.24; H, 8.18.

Ejemplo 17

Síntesis de $\text{G}_2\text{-[SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}]_8$ (27)

El dendrímero de segunda generación 27, se prepara siguiendo un procedimiento de síntesis similar a 26. De este modo, se disuelven 0.38 g del dendrímero $\text{G}_2\text{-[Si-H]}_8$ en hexano (10 mL) en una ampolla de vidrio y se añaden 0.28 mL de 4-bromobuteno (2.7 mmol). A continuación se añaden 2 gotas del catalizador de Karstedt y se agita vigorosamente durante 16 horas 60°C. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se concentra a sequedad y se redisuelve en diclorometano. A continuación se filtra por carbón activo y celite y se lleva a sequedad para dar el compuesto 27 como un aceite amarillento (0.61 g, 83%).

RMN- ^1H (CDCl_3): δ 3.40 (16H, t, CH_2Br), 1.85 (16H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 1.31 (40H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.53 (64H, m, CH_2 unidos a Si), -0.05 (48H, s, $\text{Si(CH}_3)_2$), -0.09 (12H, s, SiCH_3). RMN- ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ 36.8 (CH_2Br), 34.0 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 22.93 (SiCH_2CH_2), 20.5 (SiCH_2CH_2), 19.6 (SiCH_2CH_2), 19.3 (SiCH_2), 19.1 (SiCH_2), 18.9 (SiCH_2), 18.2 (SiCH_2), 14.9 (SiCH_2), -2.8 (SiCH_3), -4.5 (SiCH_3). Análisis elemental $\text{C}_{88}\text{H}_{196}\text{Br}_8\text{Si}_{13}$: Calc. %: C, 46.79; H, 8.75; Exp. %: C, 46.51; H, 8.75.

Ejemplo 18

Síntesis de $\text{G}_3\text{-[SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}]_{16}$ (28)

El dendrímero de tercera generación 28, se prepara siguiendo un procedimiento de síntesis similar a 26. Se disuelven 0.81 g del dendrímero $\text{G}_3\text{-[Si-H]}_{16}$ (0.31 mmol) en hexano (20 mL) en una ampolla de vidrio y se añaden 0.51 mL de 4-bromobuteno (5.04 mmol). A continuación, se añaden 2 gotas del catalizador de Karstedt y se agita vigorosamente durante 16 horas a 60°C. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se concentra a sequedad y se redisuelve en diclorometano. A continuación, se filtra por carbón activo y celite y se lleva a sequedad para dar el compuesto 28 como un aceite amarillento (0.1.27 g, 86%).

ES 2 364 264 A1

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.40 (32H, t, CH₂Br), 1.85 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 1.30 (88H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.53 (144H, m, CH₂ unidos a Si), -0.05 (120H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃), -0.09 (12H, s, SiCH₃). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 36.4 (CH₂Br), 33.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂Br), 22.5 (SiCH₂CH₂), 20.1 (SiCH₂CH₂), 19.0-14.5 (SiCH₂), -3.3 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃, ambas señales). Análisis elemental C₁₉₂H₄₂₈Br₁₆Si₂₉: Calc. %: C, 47.74; H, 8.93; Exp. %: C, 48.62; H, 9.00.

Ejemplo 19

10 Síntesis de G₁-[SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃]₄ (30)

En una ampolla de vidrio se disuelve 0.5 g del dendrímero 26 (0.52 mmol) en DMF (20 mL), a continuación se añaden 0.34 g de azida sódica (5.16 mmol) y una punta de espátula de ioduro sódico. La mezcla se calienta a 90°C durante 16 horas. A continuación se deja enfriar a temperatura ambiente y la mezcla se concentra a sequedad. El residuo resultante se disuelve en diclorometano (20 mL) y se lava con agua destilada (10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, y se concentra a vacío obteniéndose el producto 30 como un aceite amarillento (0.35 g, 81%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.24 (8H, t, CH₂N₃), 1.60 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.35 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃ y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.52 (24H, m, CH₂ unidos a Si), -0.06 (24H, s, Si(CH₃)₂). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 51.1 (CH₂N₃), 32.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 21.1 (SiCH₂CH₂), 20.2 (SiCH₂CH₂), 18.6 (SiCH₂), 17.5 (SiCH₂), 15.0 (SiCH₂), -3.3 (SiCH₃).

Ejemplo 20

25 Síntesis de G₂-[SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃]₈ (31)

En una ampolla de vidrio se disuelve 1.00 g del dendrímero de segunda generación 27 (0.44 mmol) en DMF (30 mL), a continuación se añaden 0.43 g de azida sódica (6.64 mmol) y una punta de espátula de ioduro sódico. La mezcla se calienta a 90°C durante 16 horas y posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a sequedad y el residuo resultante se disuelve en diclorometano (30 mL) y se lava con agua destilada (15 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, y se concentra a vacío obteniéndose el compuesto 31 como un aceite amarillento (0.67 g, 78%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.24 (16H, t, CH₂N₃), 1.60 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.29 (40H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃ y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.51 (64H, m, CH₂ unidos a Si), -0.06 (48H, s, Si(CH₃)₂), -0.10 (24H, s, SiCH₃). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 51.1 (CH₂N₃), 32.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 21.2 (SiCH₂CH₂), 20.5 (SiCH₂CH₂), 19.2 (SiCH₂CH₂), 18.8 (SiCH₂), 18.6 (SiCH₂), 18.5 (SiCH₂), 17.7 (SiCH₂), 15.0 (SiCH₂), -3.3 (Si(CH₃)₂), -4.9 (SiCH₃). Análisis elemental C₈₈H₁₉₆N₂₄Si₁₃: Calc. %: C, 54.04; H, 10.10; N, 17.19; Exp. %: C, 54.81; H, 9.72; N, 12.94.

Ejemplo 21

45 Síntesis de G₃-[SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃]₁₆ (32)

En una ampolla de vidrio se disuelven 1.82 g del dendrímero de tercera generación 28 (0.38 mmol) en una mezcla de DMF (30 mL) y THF (10 mL). A continuación, se añaden 0.50 g de azida sódica (7.70 mmol) y una punta de espátula de ioduro sódico. La mezcla se calienta a 90°C durante 16 horas, posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a sequedad y el residuo resultante se disuelve en diclorometano (30 mL) y se lava con agua destilada (15 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, y se concentra a vacío obteniéndose el compuesto 32 como un aceite amarillento (1.33 g, 82%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.24 (32H, t, CH₂N₃), 1.60 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 1.32 (88H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃ y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.54 (144H, m, CH₂ unidos a Si), -0.05 (120H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃), -0.09 (12H, s, SiCH₃). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 51.1 (CH₂N₃), 32.6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃), 21.2 (SiCH₂CH₂), 20.0 (SiCH₂CH₂), 19.0-17.5 (SiCH₂), 15.0 (SiCH₂), -3.3 (Si(CH₃)₂), -4.9 (SiCH₃). Análisis elemental C₁₉₂H₄₂₈N₄₈Si₂₉: Calc. %: C, 54.59; H, 10.21; N, 15.92; Exp. %: C, 56.08; H, 9.58; N, 11.08.

60 Ejemplo 22

Síntesis de ck-G₁-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NH₂]₄ (34)

Se disuelven 0.31 g (0.38 mmol) de G₁-[SiCH₂CH₂CH₂CH₂N₃]₄ en 10 mL de THF, sobre éste, se añaden 0.11 mL (1.66 mmol) de propargilamina. A continuación se añade una disolución recién preparada de ascorbato sódico (0.04 g, 0.11 mmol) en 1.25 mL de agua destilada y seguidamente otra disolución recién preparada de CuSO₄ (0.02 mg, 0.07 mmol) en 1.25 mL de agua destilada. La mezcla se agita vigorosamente durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo la reacción se interrumpe añadiendo 2 mL de una disolución de amoníaco al 15%, y la mezcla se agita 10 minutos. A

ES 2 364 264 A1

continuación, se extrae con acetato de etilo (3x10 mL), y las fases orgánicas se juntan y se lavan con una disolución de cloruro sódico saturada. Las fases orgánicas se secan sobre MgSO_4 se filtran y se elimina el disolvente a vacío, para obtener el dendrímero de primera generación 34 un aceite amarillo.

- 5 RMN^{-1}H (CDCl_3): δ 7.41 (4H, s, NCHCN), 4.30 (8H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.97 (8H, sa, NH_2), 1.88 ((8H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.27 (16H, m, SiCH_2CH_2), 0.54 (24H, m, SiCH_2), 0.08 (24H, s, SiCH_3).

Ejemplo 23

- 10 *Síntesis de $\text{ck-G}_1\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{N(CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe)}_2\text{]}_4$ (38)*

Se disuelven 0.30 g del derivado $\text{G}_1\text{-[SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3\text{]}_4$ en 5 mL de THF (0.37 mmol) y se añade sobre esta mezcla 0.33 g (1.46 mmol) de la propargilamina funcionalizada con grupos ester (D). A continuación se añade una
15 disolución recién preparada de ascorbato sódico (35 mg, 0.18 mmol) en 0.75 mL de agua destilada y seguidamente otra disolución recién preparada de CuSO_4 (18 mg, 0.073 mmol) en 0.75 mL de agua destilada. La mezcla se agita vigorosamente durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo la reacción se interrumpe añadiendo 4 mL de una disolución de amoníaco al 15%, y la mezcla se agita 10 minutos. A continuación, se extrae con acetato de etilo (3x10 mL), y las fases orgánicas se juntan y se lavan con una disolución de cloruro sódico saturada. Las fases orgánicas se secan
20 sobre MgSO_4 se filtran y se elimina el disolvente a vacío. Tras cromatografía de exclusión de tamaños se obtiene el dendrímero de primera generación 38 como un aceite amarillo (0.43 g, 68%).

- 25 RMN^{-1}H (CDCl_3): δ 7.43 (4H, s, NCHCN), 4.3 (8H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.78 (8H, s, CCH_2N), 3.64 (24H, s, OCH_3), 2.78 (16H, t, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$), 2.47 (16H, t, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)}$), 1.90 (8H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.27 (16H, m, SiCH_2CH_2), 0.52 (24H, m, SiCH_2), -0.08 (24H, s, SiCH_3). RMN^{-13}C { ^1H } (CDCl_3): δ 172.8 (CO_2CH_3), 144.6 (NCCCH_2), 122.2 (NCCCH_2), 51.5 (OCH_3), 49.9 (CH_2N), 48.9 (CH_2N), 48.7 (CH_2N), 34.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 32.6 (CH_2CO), 21.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 20.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 18.5 (SiCH_2), 17.5 (SiCH_2), 14.9 (SiCH_2), -3.4 (SiCH_3).

Ejemplo 24

- 30 *Síntesis de $\text{ck-G}_1\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{N(CH}_2\text{PO(OMe)}_2\text{)}_2\text{]}_4$ (50)*

Se disuelven 0.30 g (0.37 mmol) del derivado $\text{G}_1\text{-[SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3\text{]}_4$ en 10 mL de THF y se añade sobre esta
35 mezcla la propargil amina funcionalizada con grupos fosfito (F), (0.44 g, 1.46 mmol). A continuación se añade una disolución recién preparada de ascorbato sódico (35 mg, 0.18 mmol) en 1.25 mL de agua destilada y seguidamente otra disolución recién preparada de CuSO_4 (18 mg, 0.073 mmol) en 1.25 mL de agua destilada. La mezcla se agita vigorosamente durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo la reacción se interrumpe añadiendo 2 mL de una disolución de amoníaco al 15%, y la mezcla se agita 10 minutos. A continuación, se extrae con acetato de etilo (3x10 mL), y las
40 fases orgánicas se juntan y se lavan con una disolución de cloruro sódico saturada. Las fases orgánicas se secan sobre MgSO_4 se filtran y se elimina el disolvente a vacío, para obtener el dendrímero de primera generación 50 como un aceite amarillo (0.16 g, 65%).

- 45 RMN^{-1}H (CDCl_3): δ 7.6 (4H, s, NCHCN), 4.32 (8H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.13 (8H, s, CCH_2N), 3.76 (48H, d, OCH_3), 3.15 (4H, d, NCH_2P), 1.89 (8H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.27 (16H, m, SiCH_2CH_2), 0.54 (24H, m, SiCH_2), -0.08 (24H, s, SiCH_3). RMN^{-13}C { ^1H } (CDCl_3): δ 143.1 (NCCCH_2), 123.0 (NCCCH_2), 52.7 (d, OCH_3), 51.2 (t, CCH_2N), 50.0, 49.0 (dd, NCH_2P), 34.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 21.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 18.5 (SiCH_2), 17.5 (SiCH_2), 14.9 (SiCH_2), -3.4 (SiCH_3).

- 50 *Actividad biológica de los dendrímeros de la invención*

A continuación se muestra una evaluación de la citotoxicidad, mitogenicidad y efecto microbicida/microestático de los nuevos dendrímeros aniónicos sintetizados según la presente invención en distintas líneas celulares (vaginales
55 y linfoides), en diferentes poblaciones fisiológicas (células mononucleares de sangre periférica, hematíes, macrófagos y células dendríticas) y en cultivos bacterianos.

Materiales y métodos

- 60 1. Células

Human Endometrial Carcinoma cells (HEC-1A): línea celular endometrial humana, derivada de un adenocarcinoma humano de endometrio. Se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC). Las HEC-1A se cultivaron
65 en medio completo [RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal de Ternera (SFT), 2 mM L-glutamina y antibióticos (1% cloxaciclina, 1% ampicilina y 0.32% gentamicina)] en placas de 24 o 96 pocillos o placas transwell de 12 pocillos con soporte permeable de policarbonato de 0.4 μm de poro (Costar, Cambridge, MA), en condiciones de cultivo (37°C en una atmósfera de 5% CO_2 y 95% de humedad relativa).

Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP): La sangre se obtuvo de *buffy coats* procedentes de donantes sanos del Centro de Transfusiones de Madrid. Dicha sangre se diluye 1/2 con solución salina tamponada con fosfato 6.7 mM (PBS, Bio-Whittaker®) y se procede a su centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Isopaque®). Tras dicha centrifugación se recupera el halo que contiene las CMSP y se procede a dos ciclos de lavado-centrifugado posteriores con PBS (10 minutos a 1500 r.p.m.). Las CMSP resultantes se resuspenden en medio de completo y en condiciones de cultivo.

MT-2: Línea celular de leucemia de células T con ADN de HTLV-1 integrado. Se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron en medio completo en diferentes formatos de placa (6, 24 o 96 pocillos) y en condiciones de cultivo.

Células Dendríticas (CD): Se realizó una separación de CMSP por gradiente de densidad como se ha descrito anteriormente. Los monocitos se obtuvieron por separación inmunomagnética con anticuerpos monoclonales anti-humano CD14 (MicroBeads) mediante separación en columnas (MACS®, Miltenyi Biotec, Alemania). Los monocitos purificados se resuspendieron en medio completo en placa de fondo plano de 6 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/pocillo en un volumen final de 3 mL. Se cultivaron con 50 ng/ml rh GM-CSF y 20 ng/ml rh IL-4 (ImmunoTools, Alemania), en condiciones de cultivo. Se añadió medio fresco completo con 50 ng/ml rh GM-CSF y 20 ng/ml rh IL-4 a los 3 días a las células inmaduras (CDi). Se maduraron las células a los 6 días con 20 ng/ml LPS (Sigma) durante 2 días (CDm). Los marcadores de CDi y CDm se analizaron mediante un citómetro Beckman-Coulter® de 4 colores y se utilizó el software EPICs® de Beckman-Coulter®.

Macrófagos: Se realizó una separación de CMSP por gradiente de densidad y una separación inmunomagnética con anticuerpos monoclonales anti-humano CD14 (MicroBeads) como se describe anteriormente. Los monocitos purificados se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero humano AB, 2 mM L-glutamina y antibióticos (1% cloxaciclina, 1% ampicilina y 0.32% gentamicina) en placa de fondo plano de 6 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/pocillo en un volumen final de 3 mL. Se cultivaron con 50 ng/ml rh M-CSF y se añadió medio fresco con 50 ng/ml rh M-CSF a los 3 días. A los 7 días, los marcadores de macrófagos se analizaron mediante un citómetro Beckman-Coulter® de 4 colores y se utilizó el software EPICs® de Beckman-Coulter®.

Línea celular T Jurkat clon E6 (ATCC; línea celular de linfocitos T) se creció de forma rutinaria en RPMI 1640 (Biochrom KG Seromed, Berlin, Alemania) suplementado con 5% suero fetal de ternera (FCS) inactivado por calor, 1% penicilina/streptomicina, y 2 mM L-glutamina (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA-U.S.A.) a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂.

2. Dendrimeros

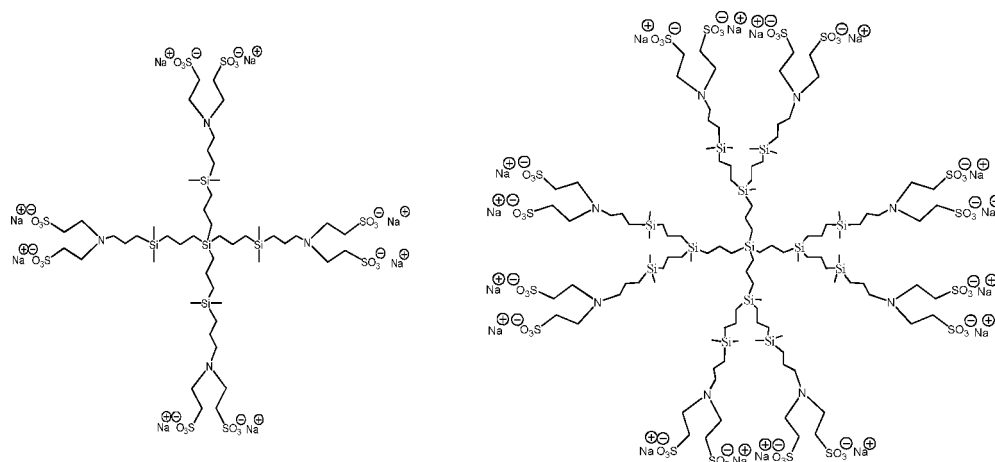
La síntesis de los dendrímeros carbosilano con terminaciones sulfonato (G1SF8, G2SF16 y G3SF32) y carboxilato (G1COO8, G2COO16, G3COO32) fue la descrita en el apartado anterior. Además de los dendrímeros G2CKCOO16 y G2CKP32.

Los dendrímeros G1SF8, G2SF16, G3SF32 se corresponden con los dendrímeros $G_n-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3Na)_2]_x$ ($n = 1, x = 4$ (18); $n = 2, x = 8$ (19); $n = 3, x = 16$ (20)) cuya síntesis y caracterización ha sido descrito en los apartados anteriores. De la misma forma, los dendrímeros G1COO8, G2COO16 y G3COO32 se corresponden con los dendrímeros $G_n-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2COONa)_2]_x$ ($n = 1, x = 4$ (10); $n = 2, x = 8$ (11); $n = 3, x = 16$ (12)). Del mismo modo los dendrímeros G2CKCOO16 y G2CKP32, se corresponden con los compuestos $ck-G_2-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2N(CH_2CH_2COONa)_2]_8$ (43) y $ck-G_2-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2N(CH_2PO(OMe)_2)_2]_8$ (51) respectivamente.

Esta nueva nomenclatura para esta parte de la presente invención se ha adoptado para simplificar la representación de estos dendrímeros en su estudio biomédico y así facilitar el seguimiento de esta discusión de resultados.

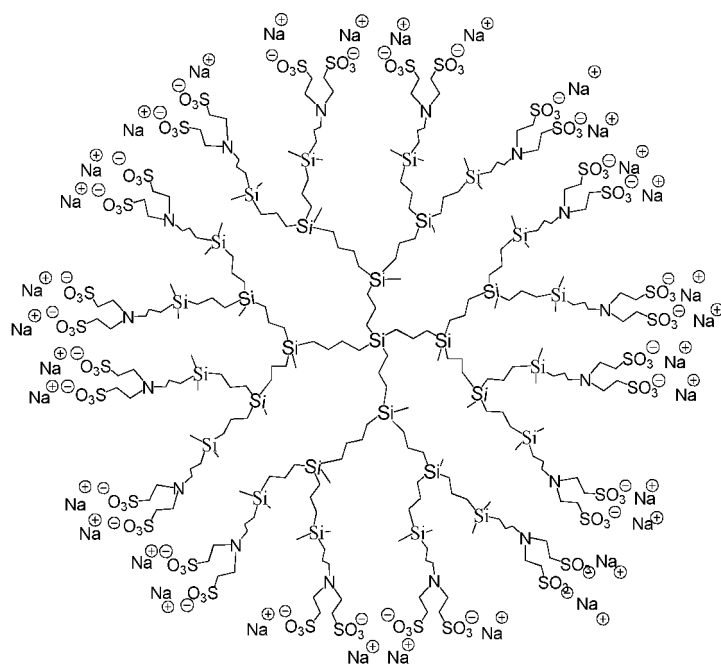
Estos dendrímeros organosilano se pueden preparar de diferentes generaciones con rendimientos elevados usando reacciones bien conocidas, a través de métodos divergentes. Los dendrímeros carboxilato y sulfonato han sido caracterizados por las técnicas habituales de espectroscopía de RMN de ¹H, ¹³C y ²⁹Si además de análisis elemental de C, H y N. Son dendrímeros estables y solubles en agua. En función del pH podemos obtener los dendrímeros como sales sódicas o como ácidos, lo que puede proporcionar mayor versatilidad en sus aplicaciones futuras. Su síntesis es relativamente sencilla, lo que facilita su obtención en grandes cantidades.

Además, los dendrímeros carbosilano presentan una gran inercia química, lo que es muy útil para el estudio de cualquier aplicación biomédica. Se presentan a continuación la estructura química de los dendrímeros de estructura carbosilano estudiados:



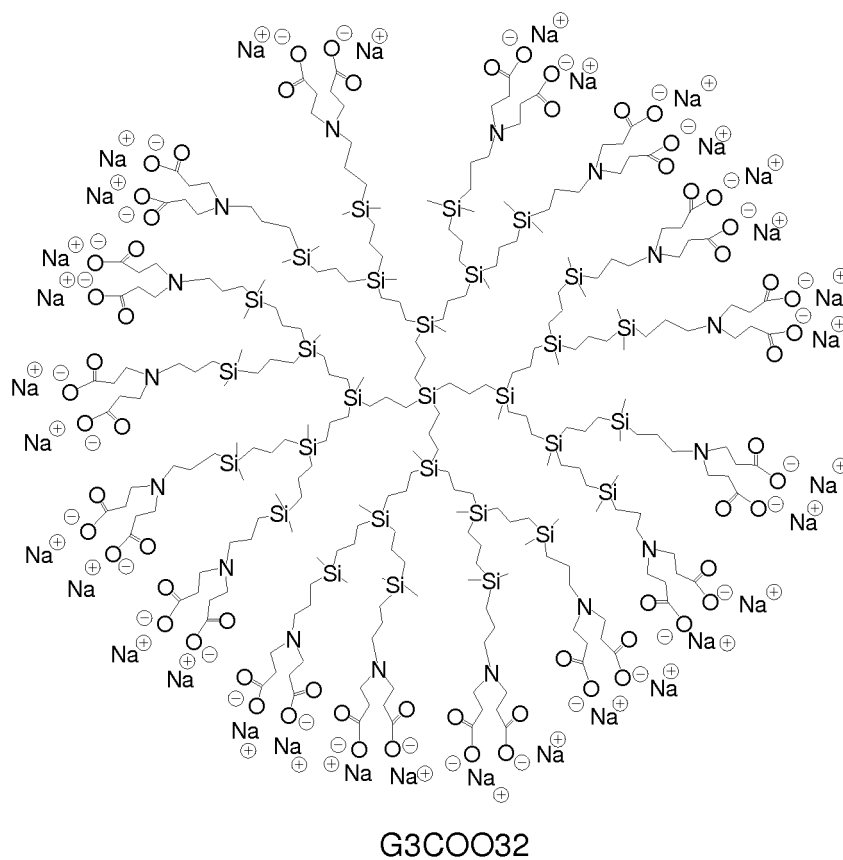
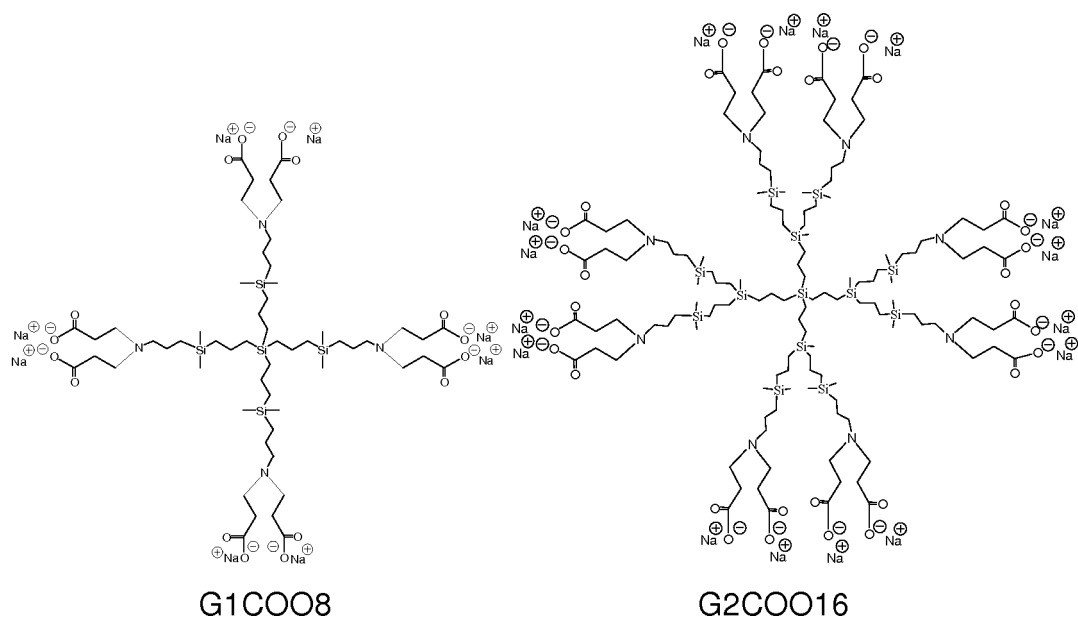
G1SF8

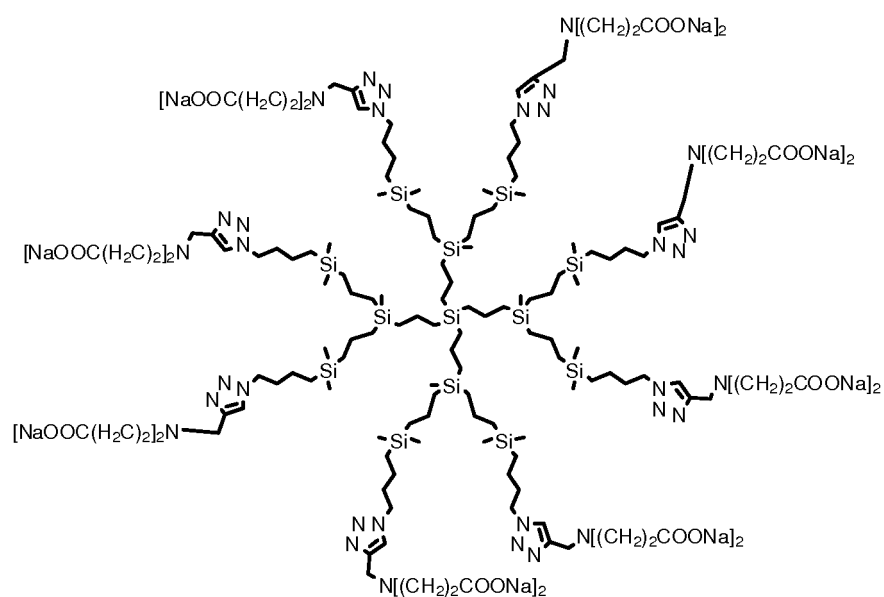
G2SF16



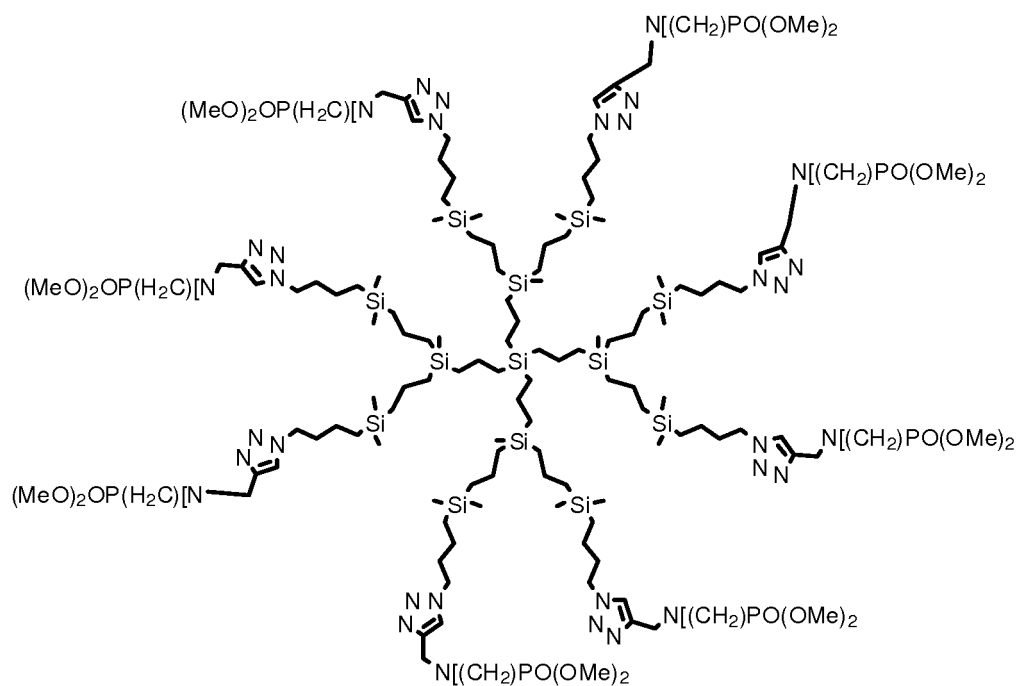
G3SF32

ES 2 364 264 A1





G2CKCOO16



G2CKP32

3. Evaluación de la toxicidad

Se utilizaron distintas técnicas con el fin de evaluar la viabilidad en diferentes aspectos: integridad de membrana (tinciones con azul tripán y ensayo de LDH), actividad mitocondrial (reactivo MTT) y proliferación celular (incorporación de BrdU). Estas técnicas se aplicaron para el estudio de la toxicidad de las generaciones de dendrímeros en HEC-1A y en CMSP humanas. Adicionalmente, se ha estudiado la toxicidad de los dendrímeros en hematíes humanos mediante un ensayo para evaluar la presencia de hemaglutinación y hemólisis.

3.1. Tinciones con azul tripán

Se preparó una solución con azul tripán (Sigma®) al 0,8%. Las células tratadas con los dendrímeros se centrifugaron y se decantó el sobrenadante; tras resuspender el sedimento celular, se trató con la solución de azul tripán durante 30 segundos, procediéndose a centrifugación-lavado posteriormente con PBS dos veces. Las células se observaron bajo microscopía óptica y se contaron las positivas para la presencia de azul tripán (células azules, muertas) en relación con el porcentaje de células negativas (células vivas). Para ello se seleccionó un campo amplio con al menos 100 células cada vez.

3.2. Ensayo MTT

Esta técnica se utilizó para evidenciar efectos deletéreos sobre el metabolismo celular. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células viables para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma®) en cristales insolubles de formazán. Tras el tiempo deseado de incubación de las distintas poblaciones celulares con diferentes concentraciones de dendrímeros en placa de 96 pocillos (100.000 células/pocillo respectivamente), y con 3 pocillos como control positivo de inactividad celular [20% de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma®)], el sobrenadante que contenía dendrímero se retiró y se sustituyó por 200 µL de un medio de cultivo sin suero ni rojo fenol (Opti-MEM®). Además de los 200 µL de Opti-MEM®, se añadieron 20 µL de MTT filtrado previamente para conseguir su esterilidad (Azul de Tiazolil, Sigma®) en PBS a una concentración de 5 mg/mL (concentración final en pocillo de 0,5 mg MTT/mL). Después de 4 horas de incubación en condiciones de cultivo, se procedió a la centrifugación de la placa a 2000 r.p.m. 10 minutos y a la posterior retirada del sobrenadante con el exceso MTT que no reaccionó. Los cristales de formazán se observaron al microscopio de contraste de fase y se disolvieron posteriormente con 200 µL de DMSO. La placa se agitó a 700 r.p.m. en un agitador Eppendorf® para asegurar la correcta disolución de dichos cristales. La concentración de formazán se determinó por espectrofotometría utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm con una referencia de 690 nm. El espectrofotómetro se calibró a 0 utilizando Opti-MEM® sin células. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calculó en base a la fórmula: $[A] \text{ test}/[A] \text{ control} \times 100$. Cada concentración de dendrímero se ensayó por triplicado, siguiendo las directivas del ATCC.

3.3. Ensayo de LDH

Esta técnica (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) se utilizó para evaluar el daño en la superficie de la membrana celular debido a la presencia de los distintos grupos periféricos aniónicos de los dendrímeros. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se libera en el citoplasma debido a la lisis celular. El ensayo de LDH, por lo tanto, es una medida de la integridad de la membrana, que se basa en la oxidación de LDH a piruvato y la reducción de sales de tetrazolio a cristales de formazán por el piruvato. Se dispensaron en placa de 96 pocillos de fondo redondo 1×10^5 células/pocillo en un volumen de 100 µL de medio completo y se añadió el dendrímero en un volumen de 100 µL, para obtener un volumen final en el pocillo de 200 µL. Controles: 1. 200 µL de medio completo sin células (background control); 2. 100 µL de células + 100 µL de medio completo; 3. 100 µL de células + 100 µL de tritón X-100 al 0,2%; 4. 100 µL de células + 100 µL con el dendrímero a la concentración deseada. Se incubaron en condiciones de cultivo durante las primeras 24 hs. Se centrifugó la placa a 1500 r.p.m. 10 minutos y se retiraron 100 µL de sobrenadante, con cuidado de no llevarse las células. Se añadió 100 µL de mezcla de reacción preparada en el momento sobre los 100 µL de sobrenadante y se incubó a temperatura ambiente 30 minutos y en oscuridad. Finalmente, se midió a 490 nm y 690 nm de referencia. La citotoxicidad se obtuvo de la siguiente fórmula: $\text{Citotoxicidad}(\%) = (4 - 2)/(3 - 2) \times 100$.

3.4. Ensayo de hemólisis

Los hematíes se obtuvieron tras ser separados de las CMSP mediante el mismo gradiente de Ficoll detallado anteriormente. Los mismos se diluyeron adecuadamente en PBS hasta poder ser visualizados de forma individualizada. Después se resuspendieron en 500 µL de PBS y se cultivaron en placa de 24 pocillos (300.000/pocillo). Como control positivo se utilizaron células tratadas con Tritón X-100 al 0,2%. Control negativo: células tratadas solo con PBS. Los hematíes se incubaron con distintas concentraciones de dendrímero. Se evaluó la presencia de hemaglutinación, número de células y liberación de hemoglobina a la hora mediante la recogida de 100 µL de sobrenadante y medición de absorbancias por espectrofotometría utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 550 nm y 690 nm como referencia.

4. Ensayo linfoproliferativo

Para evaluar la capacidad antigénica de los dendrímeros, se realizó un ensayo de proliferación celular. Se preparó el experimento por triplicado en placa de 96 pocillos de fondo plano (100.000 células por pocillo en 200 µL de medio completo). El experimento incluye un control negativo de proliferación (células sin tratar), pocillos tratados con distintas concentraciones de dendrímero y otro control positivo de proliferación tratado con 2 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA). Tras 4 días de incubación en condiciones de cultivo, se procedió a la retirada del sobrenadante y

a la preparación de las muestras para el Kit de proliferación celular de BrdU (Bromodeoxyuridine Cell Proliferation Assay, Chemicon International). Se realizó el protocolo indicado por el kit y se obtuvo la incorporación de BrdU en ADN de nueva síntesis. A mayor incorporación de BrdU, mayor proliferación celular.

5. Ensayos de inhibición del VIH

5.1. Preparación de la cepa X4 VIH-1_{NL4-3}

El aislado viral X4 VIH-1_{NL4-3} es una cepa viral de laboratorio establecida y se utilizaron células MT-2 para la expansión del virus. Se lavaron 2×10^6 MT-2 dos veces con medio completo y se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL a una concentración de 2×10^6 células/mL en medio completo. Posteriormente, se añadió VIH-1_{NL4-3} a una concentración de 1 partícula por célula o lo que es lo mismo, 1 M.O.I. (Multiplicity Of Infection). Se cultivaron las MT-2 con el virus durante 2 horas en condiciones de cultivo, agitando el cultivo cada 15-30 minutos. Finalmente se lavaron los cultivos (células-virus) dos veces para retirar el virus no integrado en el genoma celular. Las células se transfirieron a un pocillo de p6 en un volumen de 3-4 mL. Se dejó en cultivo durante 2-3 días y se observó la presencia de sincitios en el pocillo. Cuando la presencia de sincitios alcanzó un 80-90% de producción, se añadieron 12 mL de medio completo con 20×10^6 MT-2 y se dispensaron en placa petri. A los 2-3 días, se centrifugó todo el volumen y se recogió el sobrenadante. Se añadieron 12 mL de medio completo con 20×10^6 MT-2 a las células anteriores (MT-2 infectadas) y se dispensaron en placa petri. Se repitió este proceso hasta 3 veces. El sobrenadante se alicuotó y se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido, para posteriormente ser titulado.

5.2. Preparación de la cepa R5 VIH-1_{Ba-L}

El aislado viral R5 VIH-1_{Ba-L} es una cepa de laboratorio establecida y el proceso de expansión del virus se realizó de forma similar al VIH-1_{NL4-3}, pero se utilizó en este caso CMSP estimuladas como se indica más adelante en el apartado 3. 8. 5. El sobrenadante se alicuotó y se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido, para posteriormente ser titulado.

5.3. Titulación de los virus

El aislado viral VIH-1_{NL4-3} y VIH-2_{CBL23} se tituló en la línea celular MT-2. Se cultivaron 2×10^4 células MT-2 con medio completo en placas de 96 pocillos y se añadieron 40 μ L de la preparación viral a distintas concentraciones, para lo que se realizaron las correspondientes diluciones. Se dispusieron las diluciones por octuplicado y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante una semana. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la titulación por visualización del efecto citopático. El título se calculó aplicando la fórmula de Spearman-Kärber. También se tituló mediante cuantificación de proteína p24 por un inmunoensayo enzimático (ELISA p24. INNOTESTTM HIV antigen mAB, Innogenetics®) y se establece la relación partículas infectivas por mL y μ g de virus por mL. El aislado viral VIH-1_{Ba-L} se tituló mediante cuantificación de proteína p24 por ELISA. Para asegurar la pureza del virus, las alícuotas descongeladas se filtraron a través de filtros de 0.22 μ m antes de la cuantificación.

5.4. Infección *in vitro* de las diferentes poblaciones celulares

Las CMSP se estimularon durante 48 horas con 2 μ g/mL de PHA y 50 UI de IL-2, para provocar una activación policlonal; a las 48 horas se lavan las células con PBS. La concentración deseada de células se incubó con el número de partículas de VIH deseado en medio completo durante 2 horas en condiciones de cultivo. Tras este tiempo se recogieron las células del cultivo y se lavaron tres veces con PBS para eliminar el virus no integrado en el genoma celular, tras lo cual se depositaron en placa de 24 pocillos o 96 pocillos (dependiendo del ensayo) en medio completo con 50 UI/mL de IL-2. MT-2, HEC-1A, CDi, CDm y macrófagos se recogieron el día del experimento y se lavaron 2 veces con PBS antes de ser infectadas con el VIH durante 2 o 3 horas, según el experimento.

5.5. Ensayos de adhesión/internalización

Para estos ensayos se utilizaron HEC-1A confluentes en placas de 24 pocillos. Se procedió al cultivo de 3×10^5 células en 500 μ L de medio completo por pocillo y se cultivaron durante 3 días. En los ensayos de adhesión, se pre-trataron las células con los dendrímeros 2 h, 1 h y 30 minutos antes de la infección con el VIH-1_{NL4-3}. Una vez cumplido el tiempo estimado, se procedió a infectar con el VIH-1_{NL4-3} cada pocillo durante 3 horas. Tras este tiempo, se procedió a lavar 3 veces la monocapa con PBS y se dejó en condiciones de cultivo. A las 24 h y 72 h, se recogió sobrenadante para cuantificar antígeno p24 por ELISA. Para el ensayo de internalización, el procedimiento inicial fue el indicado anteriormente. Tras las 3 horas de infección, se lavó 3 veces la monocapa con PBS y se procedió a la lisis celular mediante la adición de Tritón x-100 0,2% durante 45 minutos a 37°C. El sobrenadante se recogió para cuantificar antígeno p24 por ELISA.

5.6. Estudio del mecanismo de acción del DEC

Se utilizó para este experimento una placa de 96 pocillos de fondo plano con Poli-L-Lisina (PLL, Sigma®) recubriendo el fondo del pocillo. Para ello, 50 µL de PLL se incubaron a 37°C durante una hora. Tras lavar los pocillos 3 veces con PBS, se incubaron 4 ng de VIH toda la noche a 4°C, para asegurar que las partículas virales se adhirieron al fondo del pocillo. Se lavó cada pocillo 3 veces con PBS para retirar el VIH no adherido a la placa y se procedió al tratamiento de cada pocillo con distintas concentraciones de dendrímero durante una hora. Tras este tiempo, se lavó 3 veces con PBS y se añadieron CMSP previamente estimuladas. El sobrenadante de este cultivo se recogió a los 4 días y se cuantificó antígeno p24 por ELISA para evaluar la cantidad de VIH producida por las CMSP en los distintos tratamientos. Se utilizó como control positivo de lisis de las partículas virales Tritón x-100 al 1%.

5.7. Monocapa de HEC-1A

Para obtener una perfecta monocapa de células epiteliales polarizadas, las HEC-1A se crecieron en medio completo sobre un soporte de policarbonato permeable de 0.4 µm de poro (Costar, Cambridge, MA). Se procedió al cultivo de 2×10^5 células por pocillo y se cultivaron durante 7 días, con cambios de medio cada 2-3 días. El dendrímero se añadió una hora antes de la infección. Después de añadir las partículas virales a la zona apical de la monocapa (100 ng), se recogió el sobrenadante de la cámara de la zona basolateral a las 24/48 horas. La concentración viral se cuantificó por ELISA.

6. Efecto bactericida/bacteriostático de los dendrímeros carbosilano

25 *Staphylococcus aureus*. Cepa y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa FDA209 (ATCC 6538) para estudiar la capacidad de los dendrímeros como bactericidas. Las bacterias se crecieron en placas de Mueller Hinton agar (Sigma™) durante toda la noche a 37°C antes de cada experimento.

30 6.1. *Experimento de biomasa*: El día del ensayo, una colonia de *S. aureus* se crecía en 15 mL de medio Mueller Hinton durante 5 h. Tras este tiempo, se contaba el número de *S. aureus* y se dispensaban 10^5 *S. aureus* por punto (100 µL de medio Mueller Hinton en placa de 96 pocillos de fondo en U). Se añadieron diluciones seriadas de los dendrímeros evaluados hasta completar un volumen de 200 µL por punto. Se utilizó ampicilina (Gobemicina®, Laboratorios Normon) como control positivo de bactericida. La cantidad de biomasa formada 24 h después del tratamiento con el dendrímero, se cuantificó espectrofotométricamente con un lector de placas (Biowhitakermicroplate reader 2001, Innogenetics®. $\lambda=550$ nm).

40 6.2. *Experimento de proliferación*: Para evaluar la proliferación de *S. aureus* en presencia del dendrímero, se utilizó el kit de proliferación celular 24 h después del tratamiento (Bromodeoxyuridine Cell Proliferation Assay, Chemicon International. Lectura en Biowhitakermicroplate reader 2001, Innogenetics®. $\lambda=450$ y referencia $\lambda=550$ nm). El número de células, tratamiento con los dendrímeros y tiempo de exposición se describen en el experimento de biomasa.

45 7. Efecto antiinflamatorio de los dendrímeros carbosilano

Experimentos de inflamación: Para los experimentos se realizaron transfección transitoria utilizando los plásmidos indicadores pTNF-luc y pNF-κB-luc que contiene 3 copias en tandem del sitio NF-κB del promotor de la conalbumina. La línea celular Jurkat fue nucleofectada con el nucleofector de AMAXA siguiendo el protocolo de la casa comercial “cell line nucleofector kit V” y el programa específico utilizado en el X-005. Las células transfectadas se estimularon durante 16 horas con los diferentes estímulos que aparecen en las gráficas (TNF-α, anticuerpo monoclonal anti-TNF-α y diferentes concentraciones (5 y 10 micromolar) del dendrímero aniónico sulfonato. Tras los diferentes tratamientos, las células transfectadas se recogieron por centrifugación y se lisaron con tampón de lisis comercial “Dual-luciferase Assay System Kit” (Promega), según las recomendaciones del fabricante. Se midió la cantidad de proteína en 5 microlitros de lisado celular por el método de BSA-BCA (Pierce, Rockford, USA). Una vez cuantificado, se normalizaron los valores de proteína de todas las muestras a 20 microgramos para medir durante 10 segundos la actividad luciferasa en un luminómetro 1450 Microbeta Luminiscence Counter (Wallax, Trilux). Los valores de actividad de luciferasa de luciérnaga se expresan como inducción respecto a las células control.

60 7.1 *Experimento de transfección con TNF-α (citocina proinflamatoria)*. Las células Jurkat clon E6 transfectadas con el pTNF-α fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-TNF como control positivo de la inhibición de la actividad transcripcional del TNF. Como se puede observar el dendrímero sulfonato fue capaz de disminuir la actividad promotora del plásmido pTNF-luc a las dosis de 5 y 10 micromolar (en una medida dos y tres veces inferior con respecto al control de células sin estimular en una serie de tres experimentos independientes). El dendrímero aniónico disminuye la actividad transcripcional del TNF-α.

7.2 *Experimento de transfección con el plásmido pNF-kB-luc.* Las células Jurkat se transfectaron con el plásmido pNF-kB-luc, se cultivaron en presencia de sulfonato (10 micromolar) durante 16 horas y se midió la actividad luciferasa. Se utilizó TNF (20 ng/ml) como control positivo. En el experimento claramente se observa una disminución de la actividad del plásmido pNF-kB-luc en presencia del sulfonato, similar a la obtenida cuando las células se tratan con 10 microgramos mililitro de un anticuerpo anti-TNF-alpha. Además, cuando se tratan las células con sulfonato+TNF-alpha se observa una reversión de la inducción de NF-kB-luc. Los resultados presentados están expresados como índice de inducción normalizado con los valores control de células sin tratamiento y es un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Resultados

Evaluación de la citotoxicidad de los dendrímeros

Para realizar una completa caracterización de las tres generaciones de cada nuevo dendrímero sintetizado, se elaboró un sistema de screening para determinar las concentraciones biocompatibles que requerían un estudio más detallado. Antes de nada, se establecieron los límites de solubilidad de los dendrímeros de cada generación en agua. Se disolvieron los dendrímeros a concentraciones de 3 mM, 2 mM y 1 mM, siendo esta última la que mejor solubilidad presentaba sin la ayuda de factores físicos adicionales para su perfecta solubilización (vortex, calor, etc). Una vez asentada la concentración de partida en todos los dendrímeros testados, se procedió a evaluar su citotoxicidad en las células diana de nuestro estudio, las células epiteliales vaginales (HEC-1A) y las CMSP. A concentraciones crecientes de dendrímero y se contó el porcentaje de células muertas a las 24 hs mediante la técnica de azul tripán.

Las células mostraron tinción azul superior al control a partir de 20 μ M de dendrímero, por lo que se decidió centrar los estudios de viabilidad en una concentración determinada, 10 μ M. Para evaluar el daño a la membrana celular que pueden causar las cargas aniónicas de la periferia (formando poros debido a interacción con diversos receptores celulares o por interacción electrostática con zonas positivas de la membrana), se realizó ensayos de liberación de lactato deshidrogenasa al sobrenadante. Estos estudios se complementaron con ensayos de actividad celular de la mitocondria, donde la reducción de sales de tetrazolio a cristales de formazan es un reflejo indirecto del correcto metabolismo de las células. Véase la Figura 1, donde se evaluaron inicialmente las 3 generaciones de los dos tipos de dendrímeros con núcleo de silicio, obteniendo unos niveles aceptables de biocompatibilidad y siempre dentro de los márgenes de aceptabilidad indicados para ambos ensayos (no más del 10% de LDH en sobrenadante y no más de una disminución del 20% en la actividad celular). Este experimento se llevó a cabo en las células donde los dendrímeros se expondrán más tiempo, en las células epiteliales del endometrio de la vagina (HEC-1A). Se puede establecer una buena viabilidad de la membrana celular a tiempos cortos por el ensayo de LDH, ya que ningún dendrímero produce una liberación de LDH superior al 10% tras una hora de contacto con las células. El suramin, una molécula formada por 6 grupos ácido naftaleno disulfónico y un grupo central de urea, no muestra toxicidad pese a su alta concentración. A las 24 horas de tratamiento, el control de células tratadas con una molécula inerte como el dextrano (Dx), mostró cerca de un 10% de concentración de LDH en el sobrenadante respecto al control. El dextrano con grupos sulfonato en la periferia (DxS) mostró similar toxicidad. De esta manera, un 10% de LDH se consideró aceptable a las 24 horas debido a que la presencia de una molécula externa *per se*, parece estar ocasionando una ligera perturbación en las células con una membrana celular menos íntegra. Se obtuvo similar resultado con los dendrímeros carboxilato y sulfonato, aunque se observó que la segunda y tercera generación de carboxilato no mostró valores significativos de LDH.

La viabilidad celular se estableció paralelamente cuantificando la reducción de sales de tetrazolio (MTT) por la mitocondria de las HEC-1A tratadas 24 h con los dendrímeros. Se obtuvieron niveles de producción de cristales de formazán por encima de un 80% y se determinó que la concentración de dendrímero de 10 μ M es biocompatible con el metabolismo celular de las HEC-1A.

Para ampliar este estudio, se diseñó un experimento para evaluar el daño celular que estos dendrímeros pudieran ocasionar en un modelo terapéutico de tratamiento de la infección, además de la posibilidad de impedir la infección de las CMSP (linfocitos TCD4+) que se encuentran entre la monocapa múltiple estratificada del epitelio vaginal y bajo la misma.

Para reproducir la toxicidad en una línea más fisiológica, se evaluó la toxicidad en CMSP. La viabilidad en este caso se reduce en todos los casos y se hace más visible el punto de inflexión a partir de 10 μ M. Véase la Figura 2.

Se observó una buena integridad de la membrana a las 24 horas con respecto al control. Otros factores pueden modificar la lectura por espectrofotometría, y se aceptó ese ligero aumento de la viabilidad debido a la presencia del dendrímero. El control positivo de liberación de LDH, el Tx-100 al 0.2%, funcionó en ambos experimentos y representó el 0% de viabilidad frente al control. La toxicidad se presentó a partir de 10 μ M, excepto para el dendrímero con terminación carboxilato. La actividad mitocondrial se mostró estable a la concentración de 10 μ M. El bajo daño que produce a la membrana de células fisiológicas como las CMSP, unido a la óptima actividad mitocondrial de las células en presencia de una concentración de 10 μ M, determinó que el G2SF16 se seleccionara para poner a punto los ensayos de inhibición de la adherencia virus-célula, internalización e infección del VIH en células epiteliales y CMSP. Para ver el daño que este dendrímero produce en los eritrocitos a la concentración de uso, se enfrentaron los eritrocitos a distintas concentraciones de dendrímero.

Se observó un 100% de hemólisis en el control de hematíes tratados con Tritón X-100 0.2% (las células estaban todas muertas y rotas) y un 5% de hemólisis en el control negativo de células tratadas sólo con PBS. Cada pocillo se expresa como el porcentaje respecto a la D.O (densidad óptica) del Tritón X-100 al 0.2%, que se considera el 100%; además a ese porcentaje se le resta el 5% de hemólisis del control negativo de células no tratadas, encontrándose una buena biocompatibilidad a 10 μ M, además de una carencia de hemaglutinación al microscopio óptico. Véase la Figura 3.

Linfoproliferativo

Es muy importante cuando se quiere conocer el perfil de biocompatibilidad de una nueva molécula, el saber si la misma puede constituir un estímulo antigénico inespecífico. Esto sería un inconveniente, por cuanto las células del sistema inmune podrían reconocer a dicha molécula como un elemento extraño contra el cual se desencadenaría una respuesta que muy probablemente resultaría deletérea para el organismo. Por ello, se realizó un estudio de proliferación linfocitaria en presencia de los distintos dendrímeros, con el fin de comparar la capacidad de estimulación linfocitaria que tendrían los mismos en contraste con un estímulo mitogénico clásico como es la fitohematoglutina (PHA). Las CMSP se cultivaron en p96, y se trataron con los diferentes estímulos durante 4 días. Se utilizó la concentración de dendrímero de 10 μ M, seleccionada para todos los experimentos de infección con el VIH. Los resultados se expresan en porcentaje de BrdU incorporada en las células que han proliferado frente al control. En la figura 4A, se aprecia un aumento de la incorporación de BrdU en el nuevo ADN sintetizado por las células en división, debido a la presencia de PHA. El dendrímero solo a la concentración de 10 μ M carece de efecto mitogénico en las CMSP. El tratamiento con dendrímero a la vez que PHA, disminuye ligeramente el efecto mitogénico. Para comprobar si el dendrímero G2SF16 retrasa la proliferación celular en presencia de un mitógeno, en la figura 4B se utilizaron CMSP estimuladas previamente 3 días con PHA. Al cuarto día se trataron las células con igual cantidad de PHA, PHA más G2SF16 y G2SF16 solo, encontrándose una disminución de la incorporación de BrdU tras 4 días de tratamiento. Esto indica que el dendrímero está inhibiendo el estímulo mitogénico, un dato interesante en el estudio de la inflamación a nivel local en el momento de administrar este tipo de dendrímero *in vivo*. Véase la Figura 4.

Ensayos de adhesión/internalización

Los dendrímeros que iban a ser expuestos sobre la monocapa de células epiteliales habían demostrado no ser tóxicos ni mitogénicos a la concentración de 10 μ M. Para su posible uso como microbicida, se decidió evaluar la capacidad de interactuar con el virus en el proceso de adhesión de éste a la superficie de la membrana celular. La molécula de dendrímero actuaría así como una barrera física en la prevención de la infección por VIH de las células endometriales y de su paso a la cavidad interna del útero.

Para evaluar la eficacia de impedimento de adhesión a la superficie celular, así como la capacidad de frenar la internalización del virus en las HEC-1A, se diseñó un experimento con las segundas generaciones de dendrímeros con terminación carboxilato y sulfonato. La idea de un uso tópico de esta molécula hace necesario evaluar si los tiempos de tratamiento previos a la infección (pretratamiento) son limitantes a la hora de comprobar la eficacia.

La gráfica expuesta a continuación muestra como el pre-tratamiento de las HEC-1A a distintos tiempos no modifica significativamente la eficacia del 60% de inhibición de la adhesión del VIH-1 NL4.3. Este dato se pudo verificar recogiendo los sobrenadantes de cultivo a dos tiempos diferentes tras la infección, el pretratamiento es durante 30 min, 1 hora y 2 horas, luego se infecta con el VIH y el cultivo se mantiene 24 horas (Figura 5A) se recoge el sobrenadante y se mide el Agp24 y se infecta se mantiene 72 horas (Figura 5B) se recoge el sobrenadante y se cuantifica el Agp24. El suramin se seleccionó como control positivo de la inhibición de la adhesión ya que se ha demostrado su unión electrostática a la gp120 de la región V3 de VIH, lo que impide que su maquinaria de infección funcione correctamente. p24 representa el antígeno p24 (material genético del virus) que es detectado en el sobrenadante de los cultivos celulares mediante un kit de ELISA (INNOTEST™ HIV antigen mAb -Innogenetics®). Véase Figura 5.

El siguiente experimento se realizó para cuantificar el número de partículas virales que se encontraban en el interior de las células previamente tratadas con dendrímero. Se comprobó que durante las 3 h de infección, la cantidad de virus detectada por ELISA era un 70% menor que en las células control, lo que confirma el dato anterior y refuerza la teoría de que el dendrímero polianiónico está ejerciendo de barrera sobre las células ante el ataque viral. Se utilizó una concentración de 10 μ M de todos los reactivos. Véase la figura 6.

Mecanismos de acción

Una vez comprobada la eficacia del dendrímero en bloquear la adhesión e internalización de las partículas virales, se procedió a intentar comprender el mecanismo de acción. Para ello, se diseñó un experimento que consistía en exponer las partículas virales a la presencia del dendrímero, para posteriormente usar esta combinación en cultivos de CMSP estimuladas (preparadas para la infección viral). Se utilizó VIH-1 NL4.3 (tropismo X4) y VIH-1 BaL (tropismo R5), para analizar el efecto que pudiera tener el dendrímero polianiónico con la V3 de la gp120 de ambos tipos virales, y si el uso de un coreceptor distinto variaba la eficacia de inhibición. Los resultados del ELISA de cuantificación de antígeno p24 a los 4 días de cultivo, muestran una mínima presencia de VIH en el sobrenadante de las CMSP tratadas con 10 μ M del dendrímero G2SF16. Esto se traduce en una capacidad encapsuladora o interferente del dendrímero con el normal funcionamiento del VIH para infectar las CMSP. Véase la Figura 7.

Ensayos de inhibición

Para reproducir de la mejor forma posible la función que el dendrímero aniónico desarrollaría en la superficie del endometrio y estudiar el paso de las viriones a través de la mucosa estratificada del epitelio vaginal, se utilizaron dispositivos de transwell que permiten recrear el fenómeno de transcitosis (transporte de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro a través del citoplasma de una célula por medio de una vesícula endocítica) debido a la posibilidad de formar una monocapa perfecta de células adherentes en su interior y recolectar información de los sobrenadantes de la cara apical y basolateral de la monocapa. En la gráfica siguiente, se muestra el efecto del dendrímero sobre el paso de las partículas virales a través de la monocapa. Este efecto se reduce en un 40% en ambos casos, pero como dato destacable indicar que en el caso de virus con tropismo R5, nuestro control positivo (suramin) carece del efecto inhibidor. Por tanto, la estructura interna del dendrímero está implicada en la capacidad antiviral de la molécula. Véase Figura 8, sobre la monocapa de HEC-1A, se redujo la concentración de 10 μM a 5 μM de G2SF16 para evitar cualquier posible daño a la monocapa perfectamente formada en las membranas de transwell. En esta gráfica se muestra el efecto del dendrímero sobre el paso de las partículas del VIH a través de la monocapa. Se recogió sobrenadante de la zona basolateral a las 24 y a las 48 horas tras la infección.

La segunda generación de sulfonatos se evaluó por su posible efecto profiláctico y terapéutico en CMSP mostrando un 80% de inhibición en los ensayos de pre tratamiento de las células con el dendrímero y un 60% en los ensayos de pos tratamiento, lo que confirma las dos aplicaciones de este dendrímero en un sistema más fisiológico como es una línea primaria linfóide. Se utilizó T-20 (Fuzeon) y AZT como controles de inhibición de la fusión viral y de la retrotranscriptasa inversa. Véase la Figura 9. El G2SF16 mostró un 80% de inhibición en los ensayos de pre-tratamiento de las células con el dendrímero antes de la infección por el VIH-1 NL4.3 y un 60% en los ensayos de post-tratamiento, lo que confirma las dos aplicaciones de este dendrímero en un sistema más fisiológico como es una línea primaria linfóide. Se potencia de esta forma la prevención de la infección por el VIH, así como la inhibición de la replicación viral en células ya infectadas por el VIH.

Se evaluó la capacidad de liberación de partículas virales por las células dendríticas y macrófagos. Se probaron controles como dextrano, suramin y mannan en dendríticas. Se utilizó NL4.3 y Bal para un ensayo de internalización del virus en presencia de nanopartículas inhibitoras. Se observó una clara disminución de antígeno p24 en el sobrenadante de macrófagos en presencia de G2SF16. En dendríticas inmaduras, la disminución de antígeno p24 fue significativa para suramin, mannan y G2SF16. Véase figura 10, donde, como se ha contado anteriormente, se evaluó la capacidad de liberación de partículas virales por las células y se infectó a 50 ng para asegurar una buena cuantificación. Se probaron controles como dextrano, suramin y mannan en dendríticas. Se utilizó NL4.3 (columnas negras) y Bal (columnas blancas) para un ensayo de internalización del virus en presencia de nanopartículas inhibitoras. Se observó una clara disminución de antígeno p24 en el sobrenadante de macrófagos en presencia de G2SF16. En dendríticas inmaduras, la disminución de antígeno p24 fue significativa para suramin, mannan y G2SF16.

También se determinó el efecto antibactericida que tienen estos dendrímeros en presencia de bacterias. Para ello se ha elegido *Staphylococcus aureus* como modelo de experimentación. En estos experimentos hemos observado que a la concentración utilizada de 10 μM los dendrímeros presentan aproximadamente un 50% de efecto bactericida (Figura 11) y un 85% de efecto bacteriostático (Figura 12). Así mismo, hemos observado que los dendrímeros terminados en grupos sulfonato son bactericidas más potentes que los análogos terminados en grupos carboxilato.

Por otro lado, es importante destacar que en los experimentos preliminares realizados se observa que los dendrímeros descritos en la presente invención muestran un efecto antiinflamatorio. Los datos obtenidos en los experimentos de transfección de células Jurkat con los plásmidos pTNF-luc (Figura 14) y pNF-kB-luc (Figura 15) en presencia del dendrímero aniónico G2SF16 claramente indican que el dendrímero aniónico disminuye la actividad transcripcional de NF-kappa y por lo tanto el proceso de inflamación.

Biocompatibilidad y efecto inhibidor de la entrada de los dendrímeros aniónicos

Los nuevos dendrímeros click con terminaciones carboxilato y fosfonato (G2CKCOO16 y G2CKP32) también se evaluaron para obtener los rangos de biocompatibilidad en la población celular más expuesta a su acción, las células epiteliales de endometrio. En la Figura 13A se puede apreciar la buena viabilidad celular hasta 10 μM , mientras que en la Figura 13B se aprecia la inhibición de la entrada en la misma línea celular pretratando estas con dendrímero una hora antes de la infección con VIH_{NL4-3}. Esta inhibición es dependiente de la concentración de dendrímero y se obtiene hasta un 50% en el caso de la concentración de 10 μM .

Estos resultados muestran que los dendrímeros carbosilano aniónicos obtenidos con rutas sintéticas basadas en la denominada "clik-chemistry", se comportan también como potentes microbicidas, de forma similar a los dendrímeros aniónicos con grupos sulfonato y carboxilato descritos anteriormente.

Los dendrímeros previamente descritos en la presente invención han demostrado ser capaces de inhibir la infección causada por distintos virus, interfiriendo tanto con la entrada del virus en las células como en pasos posteriores de replicación viral. Ese es el caso por ejemplo del Herpes Simplex, cuya infección se ve inhibida *in vitro* por efecto de dendrímeros de polilisina modificados. También se ha conseguido inhibir la replicación del VIH, tanto a nivel de la entrada celular como en pasos posteriores, en este caso mediante la utilización de dendrímeros PAMAM modi-

5 ficados covalentemente, que demostraron ser capaces de interferir con la retrotranscriptasa y la integrasa del virus. Aprovechando estas propiedades, se han desarrollado geles vaginales para la prevención de enfermedades de transmisión sexual con formulaciones basadas en dendrímeros, como es el caso de VivaGel™ (Starpharma), cuyo ingrediente activo es un dendrímero de polilisina funcionalizado con restos naftalendisulfonato que parece ser efectivo en la prevención de la infección del VIH gracias a su capacidad de unirse a la glicoproteína gp120 de la superficie del virus. Aunque en el diseño de dendrímeros antivirales se tiene preferencia por aquellos que presentan en su superficie grupos que mimetizan los que se encuentran presentes en la superficie celular y que, por ello, son capaces de competir con las células por la unión al virus, se ha diseñado también un dendrímero con grupos amida de superficie que funciona como inhibidor del virus respiratorio sincitial, se cree que por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos periféricos del dendrímero con la proteína de fusión del virus, por lo que es de esperar que dendrímeros funcionalizados con otros grupos capaces de formar puentes de hidrógeno con proteínas virales implicadas en la interacción con la superficie celular sean capaces también de interferir con distintos virus, inhibiendo la infección provocada por ellos.

15 En otros casos, los dendrímeros han sido utilizados como antibacterianos o para desestructurar las membranas celulares de algunos hongos. Cuando se diseñan para esta finalidad, se tiene preferencia por los dendrímeros con grupos catiónicos en su superficie, tales como aminas o grupos tetraalquilamonio, que facilitan la adherencia de los dendrímeros a la membrana bacteriana, causando la lisis de la bacteria. Tal es el caso de los dendrímeros de poli(propilenimina) (PPI) con grupos alquilamonio terciarios en su superficie, que han demostrado una amplia actividad bactericida tanto contra bacterias Gram positivas como contra bacterias Gram negativas [Chen, C.Z. y S.L. Cooper, 20 *Biomaterials*, 2002, 23, 3359-68; Chen C.Z. et al, *Biomacromolecules*, 2000, 1, 473-80]. Estos dendrímeros presentan una mayor capacidad bactericida que otros polímeros hiperramificados. En el caso de dendrímeros funcionalizados con grupos aniónicos, se está estudiando el efecto bacteriostático o fungistático que estructuras como los dendrímeros pueden producir a nivel celular. La capacidad de agregar distintos patógenos e impedir su crecimiento puede favorecer la eliminación de los microorganismos por medio de las células polimorfonucleares del sistema inmune.

25 Los dendrímeros de la presente invención, funcionalizados con restos que contienen grupos aniónicos carboxilato y sulfonato, representan una opción para ser utilizados como microestáticos.

30 Los dendrímeros de la presente invención suponen interesantes alternativas para estas áreas de la Biomedicina y se describe aquí la naturaleza química de los dendrímeros, los estudios referentes a su biocompatibilidad (realizados en líneas celulares, en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y en hematíes), los estudios de antigenicidad, los estudios de impedimento de adherencia e internalización de partículas de VIH a la superficie celular y estudios de inhibición de transcitosis a través de monocapas de epitelio vaginal. Además de esta aplicación profiláctica, también se evalúa su efecto terapéutico, ya que en pacientes infectados el dendrímero podría impedir la progresión de la infección a células sanas.

40

45

50

55

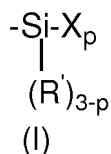
60

65

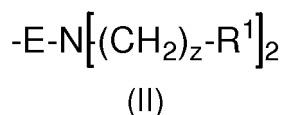
REIVINDICACIONES

1. Dendrúmero carbosilano que comprende

- un núcleo polifuncional,
- al menos una generación, y
- una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde: R' es un grupo alquilo (C₁-C₄),
p varía entre 1 y 3, y
X es el siguiente grupo de fórmula (II):



donde: E es un grupo enlazante entre el silicio y el grupo amina,
z varía entre 1 y 4,
R¹ se selecciona de un grupo de la lista que comprende -COOR², -SO₃R² o -PO₃(R²)₂, y
R² es hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄).

2. Dendrúmero según la reivindicación 1, donde el núcleo es de silicio.

3. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde p es 1.

4. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R' es metilo.

5. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde E se selecciona de entre un alquilo (C₁-C₁₀) o un grupo -(CH₂)_x-R³, donde R³ es un grupo triazol o fenol y x varía entre 1 y 6.

6. Dendrúmero según la reivindicación 5 donde el grupo alquilo de E es un propilo.

7. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R² es hidrógeno o metilo.

8. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde E es el grupo -(CH₂)_x-R³ y R³ es triazol.

9. Dendrúmero según la reivindicación 8, donde x es 4.

10. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde E es el grupo -(CH₂)_x-R³ y R³ es fenol.

11. Dendrúmero según la reivindicación 10, donde x es 1.

12. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde R¹ es el grupo -COOR².

13. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde R¹ es el grupo -SO₃R².

14. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde R¹ es el grupo -PO₃(R²)₂.

ES 2 364 264 A1

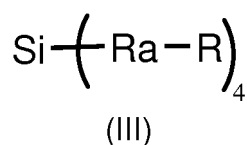
15. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde z es 2.

16. Dendrímero según la reivindicación 14, donde z es 1.

5 17. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde dicho dendrímero está en forma de sal aniónica.

18. Dendrímero según la reivindicación 17, donde la sal es de Na⁺.

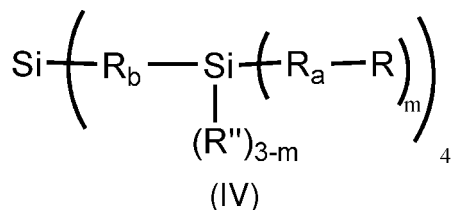
10 19. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde dicho dendrímero es al menos de primera generación con la siguiente fórmula (III):



donde: R_a es un grupo alquilo (C₁-C₆); y

R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

20. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde dicho dendrímero es al menos de segunda generación con la siguiente fórmula:

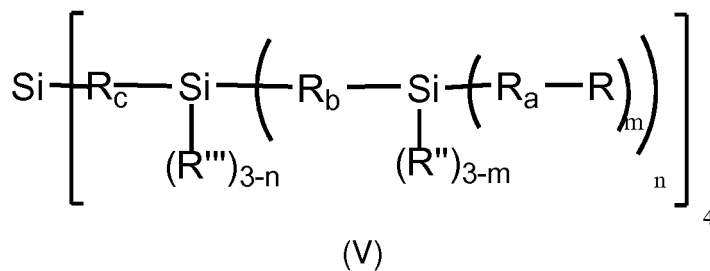


donde: R_a, R_b y R'', son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆);

m tiene un valor de 1 a 3; y

R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

21. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde dicho dendrímero es al menos de tercera generación con la siguiente fórmula (V):



donde: R_a, R_b, R_c, R'' y R''', son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆);

m y n son iguales o diferentes y tienen un valor de 1 a 3; y

R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

ES 2 364 264 A1

22. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, donde R_a , R_b o R_c , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_2-C_4).

23. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, donde R'' y/o R''' son un grupo metilo.

24. Compuesto de fórmula:

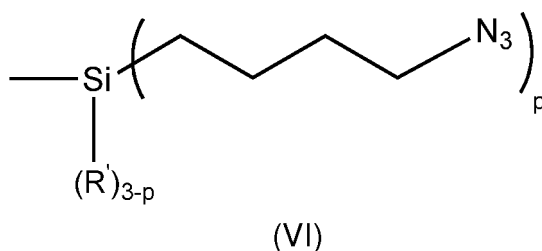


donde: Et es un grupo etilo y

R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 o un grupo $-(R')_{3-p}Si-[(CH_2)_4-N_3]_p$, donde R' es un grupo alquilo (C_1-C_4), y p varía entre 1 y 3.

25. Dendrúmero carbosilano que comprende:

- un núcleo de silicio,
- al menos una generación, y
- una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (VI):



donde: R' es un grupo alquilo (C_1-C_4), y
p varía entre 1 ó 3.

26. Dendrúmero según la reivindicación 25, donde p es 1.

27. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, donde R' es un metilo.

28. Procedimiento de obtención de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende:

- síntesis de dendrímeros con terminaciones $-NH_2$ y posterior funcionalización de estos grupos amino terminales con grupos carboxílicos, sulfonatos o fosfonato.

29. Procedimiento de obtención de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende:

- funcionalización inicial de aminas orgánicas con los grupos carboxílicos, sulfonatos, fosfonato o sus grupos precursores y su posterior unión de dichas aminas funcionalizadas a la superficie de los dendrímeros carbosilanos.

30. Uso de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, para la elaboración de un medicamento.

31. Uso de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos.

32. Uso según cualquiera de la reivindicación 31, donde la enfermedad es causado por el VIH.

33. Composición farmacéutica que comprende al menos un dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y un vehículo farmacéuticamente activo.

ES 2 364 264 A1

34. Composición según la reivindicación 33, que además comprende otro principio activo.

35. Uso de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 como vehículos de transporte de moléculas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

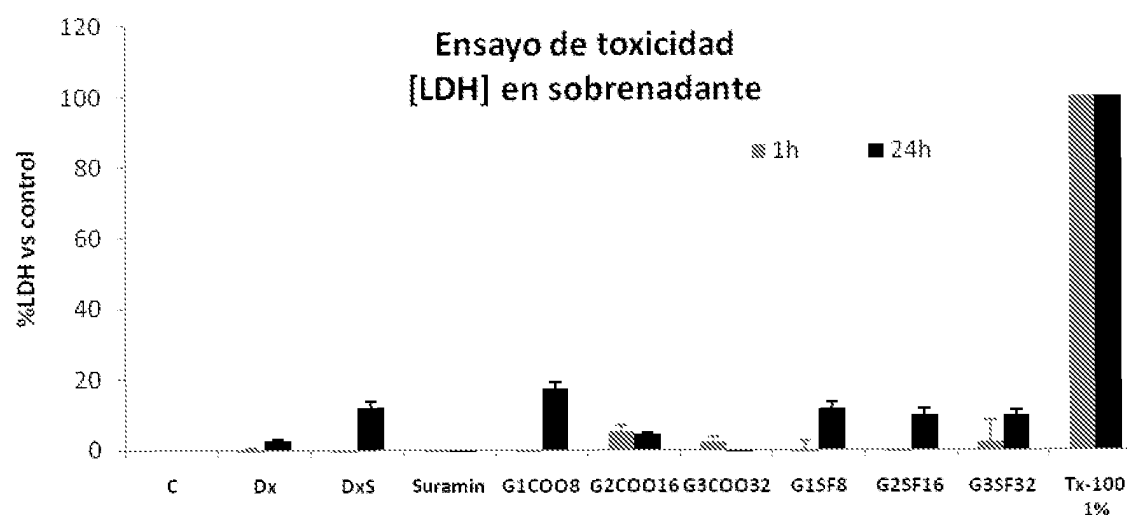


FIG. 1A

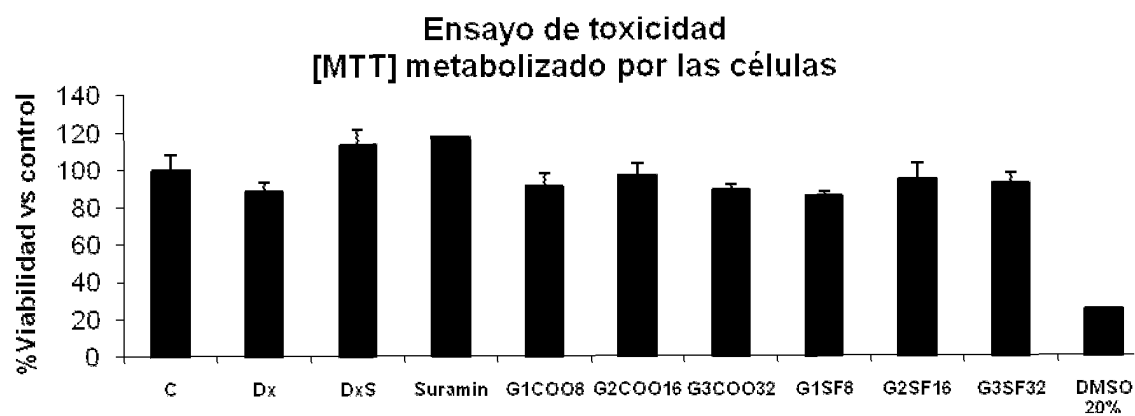


FIG. 1B

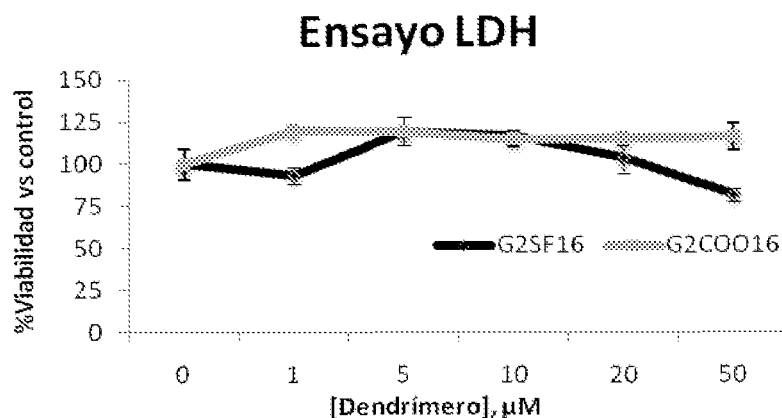


FIG. 2A

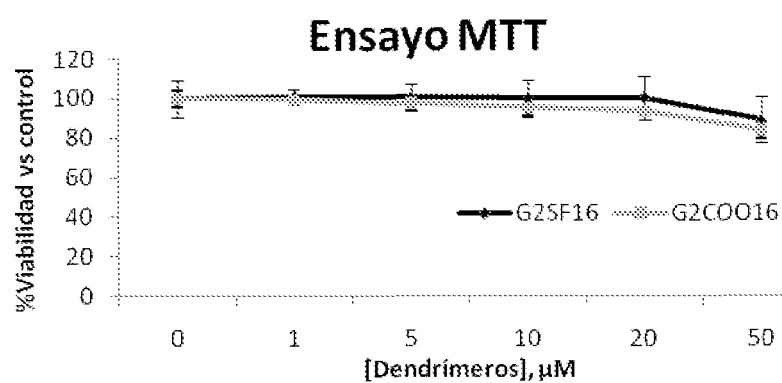


FIG. 2B

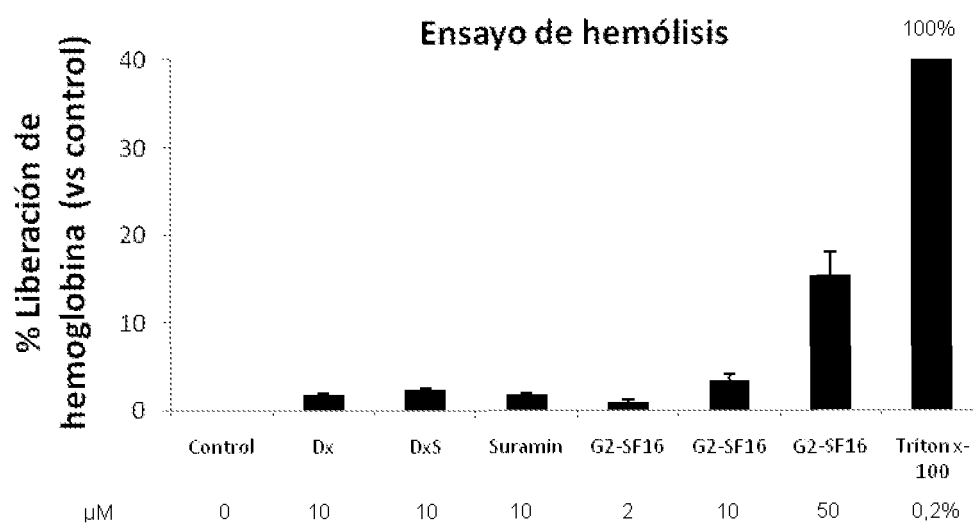


FIG. 3

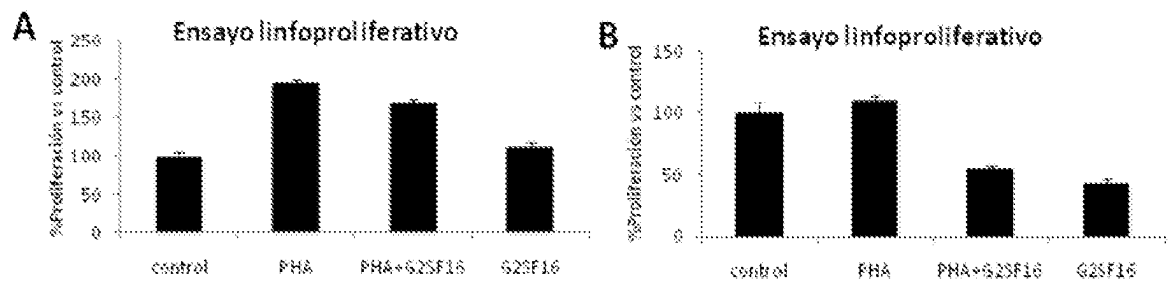


FIG. 4

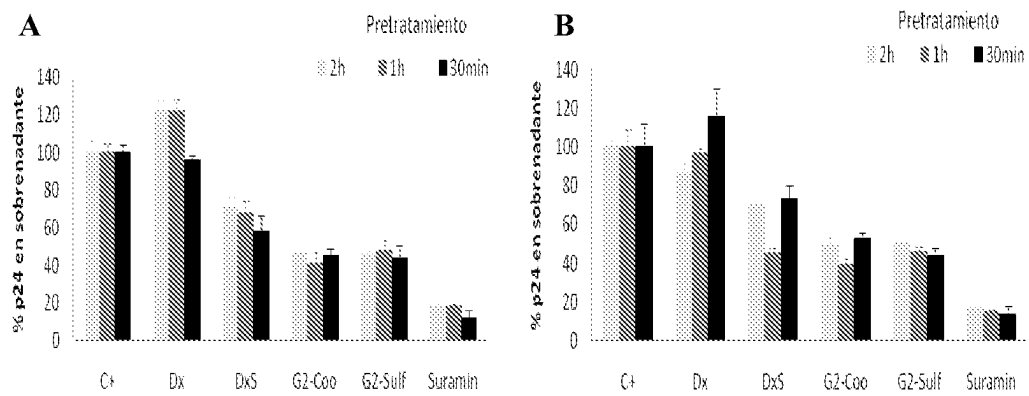


FIG. 5

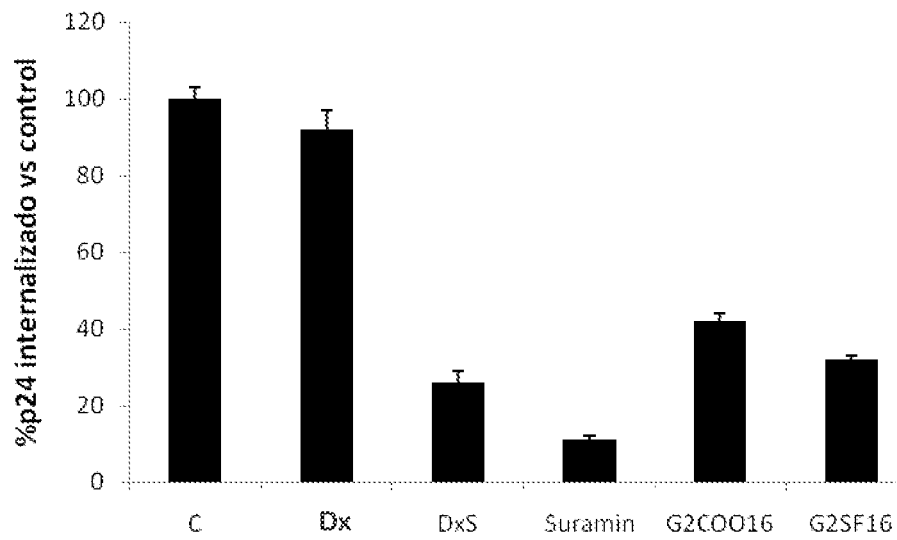


FIG. 6

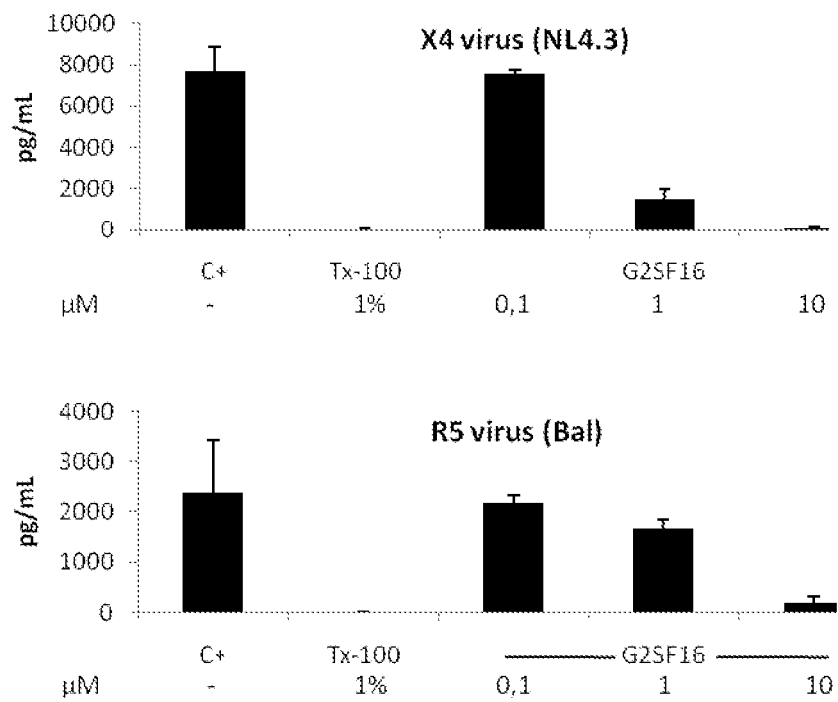


FIG. 7

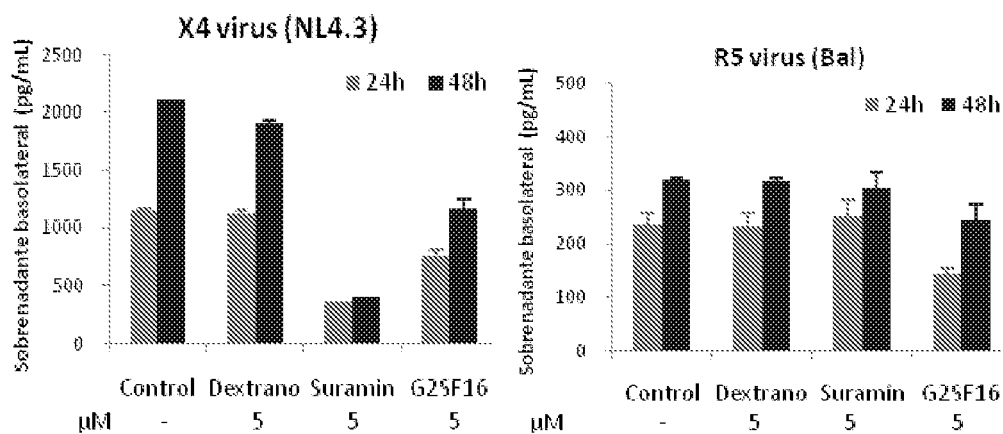


FIG. 8

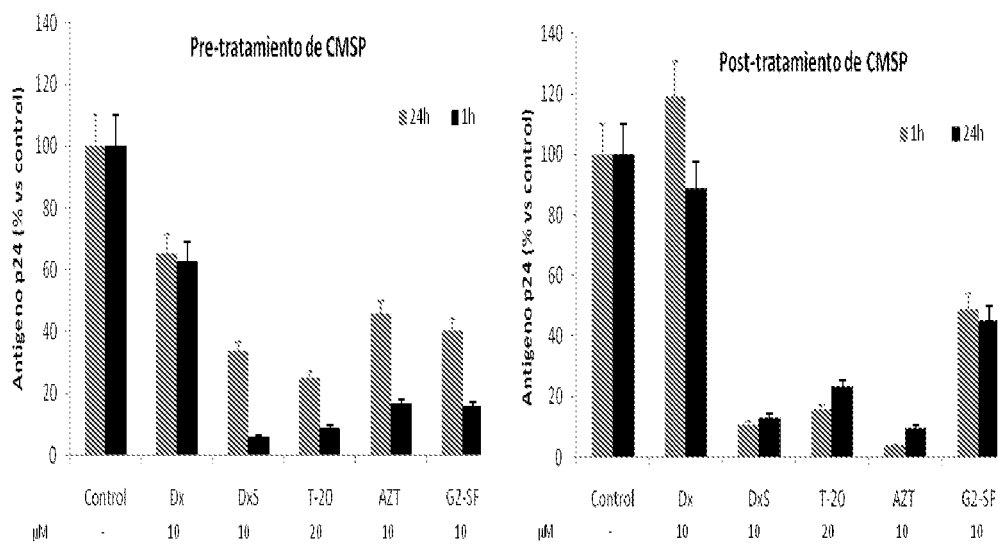


FIG. 9

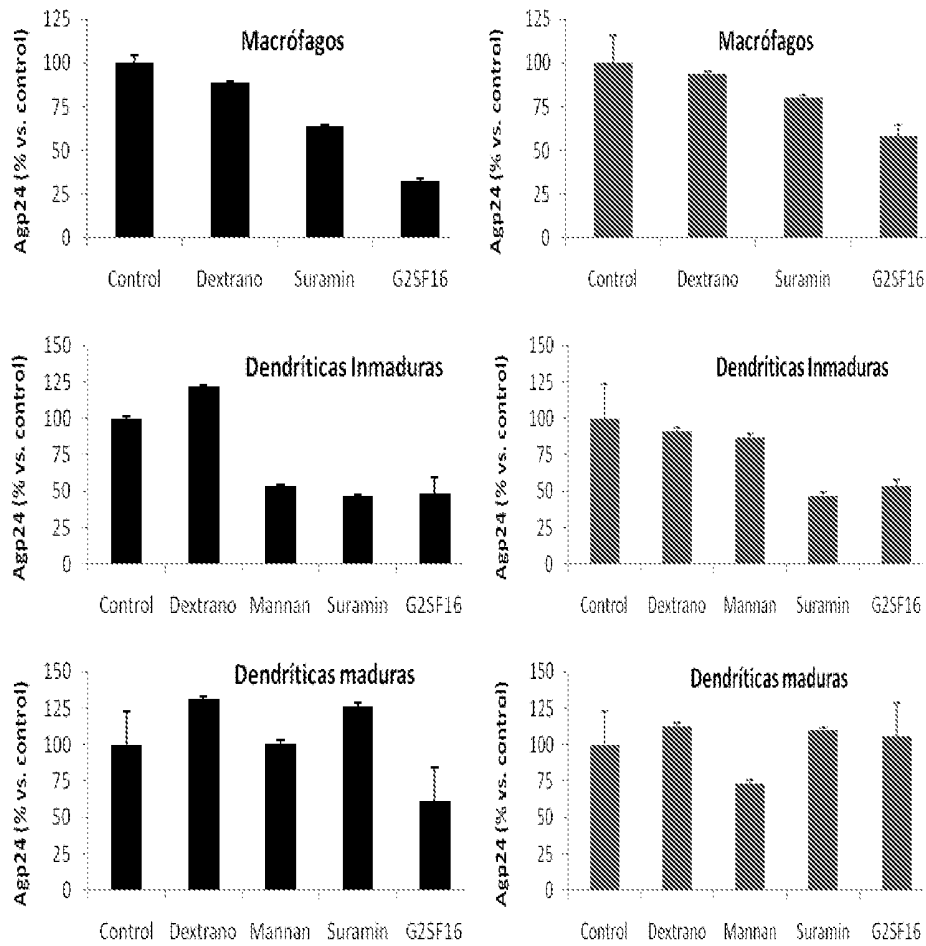


FIG. 10

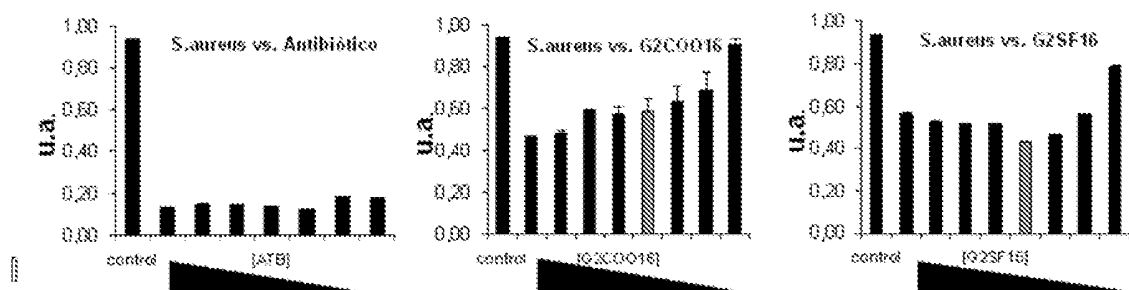


FIG. 11

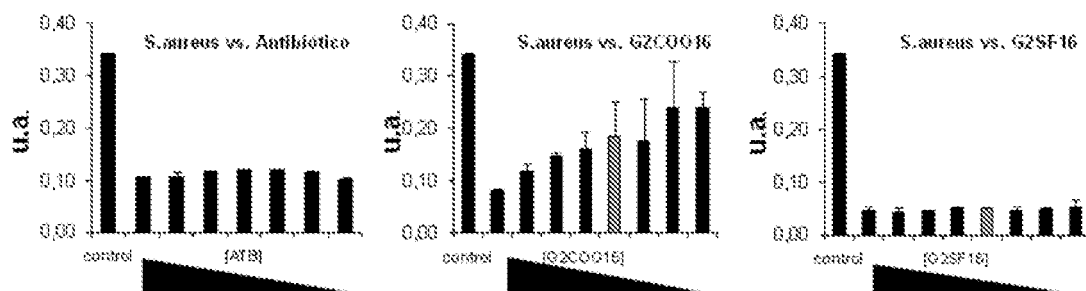


FIG. 12

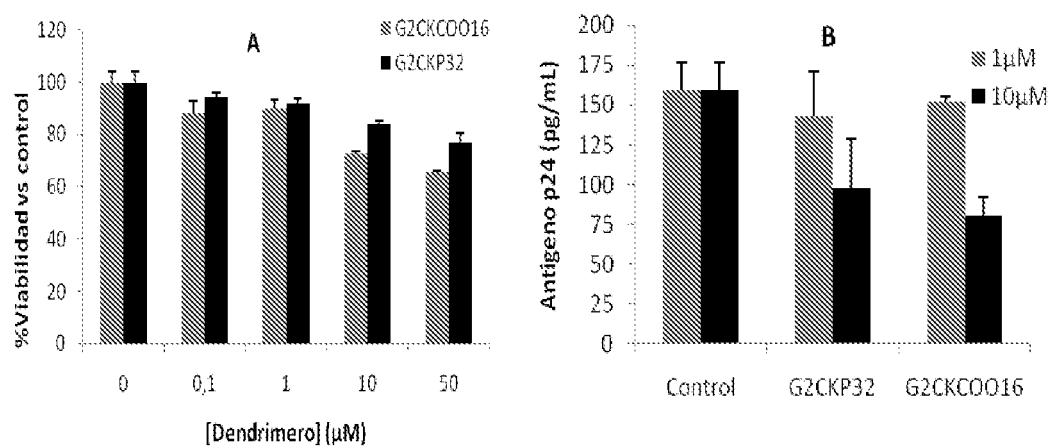


FIG. 13

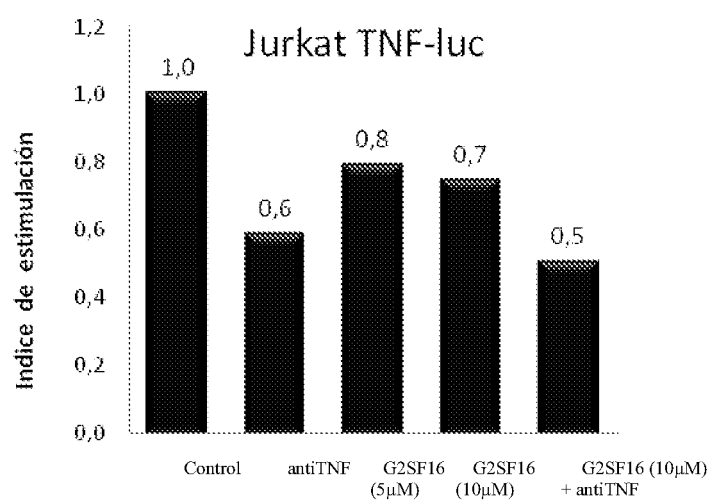


FIG. 14

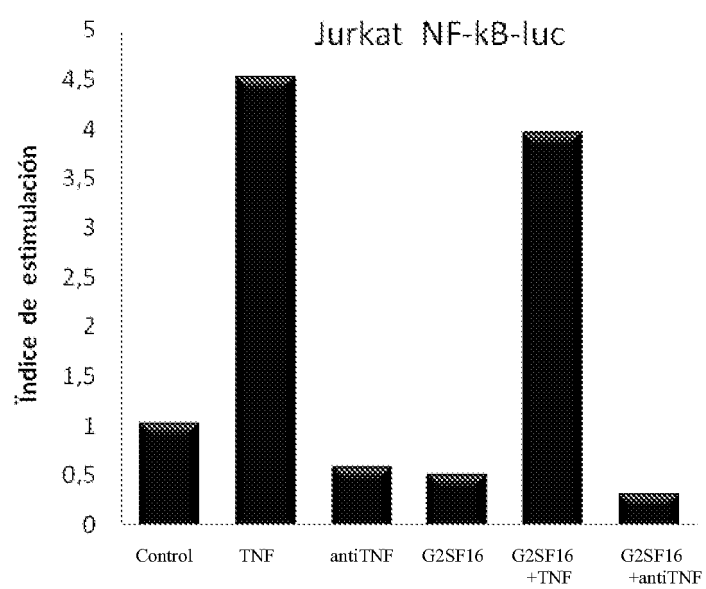


FIG. 15



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030233

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.02.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	J BERMEJO et al, Chemistry European Journal 2007, vol 13, páginas 483-495. "Water-soluble carbosilane dendimers: Synthesis, biocompatibility and complexation with oligonucleotides. Evaluation for medical applications" página 486 compuesto 18	1-34
A	P ORTEGA et al, Organic Biomolecular Chemistry 2008, vol 6, páginas 3264-3269. "Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies" página 3266 fórmula 4	1-34

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
04.04.2011

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G77/52 (2006.01)**C07F7/18** (2006.01)**A61K47/48** (2006.01)

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

C08G, C07F, 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, WPI, CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-34	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	J BERMEJO et al, Chemistry European Journal 2007, vol 13, páginas 483-495. "Water-soluble carbosilane dendimers: Synthesis, biocompatibility and complexation with oligonucleotides. Evaluation for medical applications" página 486 compuesto 18	2007
D02	P ORTEGA et al, Organic Biomolecular Chemistry 2008, vol 6, páginas 3264-3269. "Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies" página 3266 fórmula 4	2008

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 solicitud se refiere a dendrímeros carbosilanos (reivindicaciones 1-18) que comprenden:

- un núcleo polifuncional (Si)
- al menos una generación, y
- una capa externa que consiste en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I) (reivindicación 1), y pueden ser de primera, segunda y tercera generación (reivindicaciones 19-21). La reivindicación 25 se refiere al dendrímero carbosilano en el que la capa externa está formada por unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (VI). También se reivindica el procedimiento de obtención (reivindicaciones 28 y 29) y su uso para preparar una composición farmacéutica.

El documento D1 divulga (página 486, compuesto 18) dendrímeros carbosilanos con grupos terminales amonio y sus propiedades como antibacterianos, el documento D2 divulga (página 3266 fórmula 4 y página 3265) dendrímeros carbosilanos con grupos O-Ph-amonio terminales y su procedimiento de síntesis. Los grupos terminales divulgados en D1 y D2 son distintos a los descritos en la solicitud como se puede ver en las fórmulas desarrolladas de las páginas 19, 27, 29 y 43 de la solicitud, en estas fórmulas el N terminal lleva sustituyentes carboxilato, sulfonato o fosfonato y se une a la cadena a través de un triazol o un grupo O-Ph, lo que significa que los dendrímeros descritos en la solicitud no están divulgados con anterioridad, por lo que se considera que son nuevos y tienen actividad inventiva ya que las propiedades de los dendrímeros dependen en gran medida de los grupos terminales.

Por consiguiente se considera que las reivindicaciones 1-34 de la solicitud cumplen las condiciones de novedad y actividad inventiva según los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.