



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 365 685**

② Número de solicitud: 201030450

⑤ 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: **25.03.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
10.10.2011

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá de Henares
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES
Hospital General Universitario Gregorio Marañón**

⑱ Inventor/es:
**Mata de la Mata, Francisco Javier de la;
Gómez Ramirez, Rafael;
Sánchez-Nieves Fernández, Javier;
Ortega López, Paula;
Muñoz Fernández, María Ángeles;
Chonco Jiménez, Louis y
Serramia Lobera, María Jesús**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Dendrímeros carbosilanos con un núcleo polifenólico y su uso como antivirales.**

㉑ Resumen:

Dendrímeros carbosilanos con un núcleo polifenólico y su uso como antivirales.

Macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifenólico, 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 como agentes antivirales, antibacterianos y antifúngicos.

ES 2 365 685 A1

DESCRIPCIÓN

Dendrimeros carbosilanos con un núcleo polifenólico y su uso como antivirales.

5 La presente invención se refiere a macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifenólico, 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 dendrimer, sobre las unidades o ramas de crecimiento o sobre la periferia del dendrimer 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 dendrimer 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 sí 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 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 a la mucosa vaginal o rectal para impedir la expansión de enfermedades de 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.

Glicodendrimeros: Son dendrimeros que contienen grupos terminales carbohidratos. 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 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 eran no tóxicos y no inmunogénicos. También se estudiaron los efectos de estos dendrimeros PAMAM funcionalizados con ácido siálico y sus resultados apuntaron el hecho de que la especificidad del carbohidrato no es el único aspecto que determina el éxito o el fracaso en el diseño de un inhibidor basado en carbohidratos, sino que también hay que considerar cómo es la unión y la orientación de los carbohidratos al esqueleto del dendrimer. 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.

Los glicodendrimeros también se han mostrado efectivos frente al VIH. Así, hay estudios que muestran que dendrimeros polipropiliminina (PPI) funcionalizados con grupos galactosa polisulfatados producen la inhibición del virus 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).

Dendrimeros funcionalizados con péptidos: El uso de dendrimeros funcionalizados en su superficie con péptidos es otra de las posibilidades para abordar la síntesis de nuevos microbicidas, aunque esta vía ha sido menos explorada que el uso de glicodendrimeros o el uso de dendrimeros aniónicos. No obstante, algunos estudios muestran que este tipo de dendrimeros puede inhibir la infección viral *in vitro*. Otros estudios han demostrado la potencialidad de estos dendrimeros funcionalizados con péptidos para ser usados como vacunas. En este sentido, Cruz y colaboradores (cfr. L. J. Cruz, *et al.*, *Bioconj. Chem.*, 2004, 15, 112) indican que estos dendrimeros son mejores inmunógenos que otros vehículos macromoleculares funcionalizados con los mismos péptidos.

Dendrimeros polianiónicos: Se han descrito en la bibliografía varios tipos de dendrimeros o polímeros dendronizados con una carga neta negativa en la superficie, ya que es conocido que muchos tipos de virus, como por ejemplo

el VIH o VHS, se unen a compuestos polianiónicos. Esta tendencia se confirma con el hecho de que polisacáridos sulfatados son inhibidores efectivos típicos de la inhibición viral. Dentro de este tipo de dendrímeros polianiónicos, se han descrito por ejemplo dendrímeros polilisina con grupos terminales carboxilato y sulfonato que son capaces de bloquear efectivamente la infección por VHS (cfr. M. Witvrouw, E. De Clerq. *Gen. Pharmacol.*, 1997, 29, 497; US2003036562). Los mismos autores posteriormente llevaron a cabo también estudios *in vivo* con ratones en los que demostraron que estos dendrímeros no sólo protegen a los animales frente a la infección vaginal sino que también los derivados sulfonato son capaces de interferir las etapas finales de replicación del virus en las células infectadas.

Dendrímeros similares con un esqueleto polilisina y grupos terminales carboxilato o sulfonato, también se han mostrado eficaces en la inhibición del VIH *in vitro*. En este caso se ha observado que los dendrímeros polianiónicos no sólo inhiben la entrada del virus en la célula, sino que también inhiben la actividad de dos enzimas, transcriptasa reversa e integrasa, lo que indica que estos derivados polianiónicos pueden actuar en diferentes ciclos replicativos del virus dependiendo de cómo se integren y se sitúen 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 sin duda un dendrímero cargado negativamente, formulado como un gel y denominado SPL7013. Este dendrímero ha sido desarrollado por una compañía farmacéutica australiana y los estudios llevados a cabo con él, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo han convertido, hasta ahora, como 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 disulfónico naftaleno en su superficie y es el principio activo de un gel microbicida vaginal denominado VivaGel®. Es un potente inhibidor de VIH-1 *in vitro*, mostrándose activo frente a numerosas cepas. Está siendo usado en la prevención de la transmisión vaginal de VIH y el herpes genital. Así por ejemplo, un estudio desarrollado por Dezutti y colaboradores ha mostrado que una formulación de este dendrímero (5%) presenta una toxicidad muy baja en células epiteliales y es efectivo para prevenir la infección de VIH-1 de CMSP (Células Mononucleares de Sangre Periférica), macrófagos y la transferencia del virus desde las células epiteliales a CMSP. Estudios posteriores más detallados han mostrado que la aplicación diaria del gel SPL7013 en proporciones de 1-3% son bien toleradas, y similares resultados se obtuvieron también en el caso de aplicación rectal. También se han desarrollado estudios *in vivo* mediante la aplicación vaginal del gel SPL7013 en macacos, mostrando que no produce ningún signo de irritación de la mucosa vaginal y es capaz de proteger al 100% de los macacos utilizados si se aplica en un 5%. Dendrímeros similares al SPL7013 han sido preparados utilizando esqueletos tipo PAMAM y PPI. Estos presentan actividades biológicas similares, pero dificultades que aparecen en el proceso de síntesis de estos últimos, los han descartado para su utilización comercial.

Otros dendrímeros aniónicos también han sido descritos como agentes antivirales, uno es el conocido como 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 naftil disulfonato. El otro dendrímero se conoce como BRI6195, también es un dendrímero de tipo PAMAM, crecido en este caso a partir de un núcleo de etilendiamina y que está funcionalizado con 32 grupos fenildicarboxilato. Estos dendrímeros se han mostrado capaces de inhibir la replicación de diferentes variedades de virus HIV en células MT-4 (cfr. Y. H. Jiang, *et al.*, *AIDS Res. Hum. Reprviruses*, 2005, 21, 207).

También se ha publicado la síntesis de dendrímeros basados en un esqueleto que contiene 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 NK (natural killers). 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, se ha preparado 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 ha ensayado, reteniendo eficazmente material nucleico 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 Released* 2008, 132, 55). Así mismo, estos dendrímeros son capaces de proteger al material nucleico del ataque de las proteínas del suero y actuar como agentes terapéuticos, con capacidad antibacteriana.

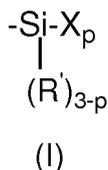
Descripción de la invención

La presente invención proporciona macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifenólico, 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.

ES 2 365 685 A1

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

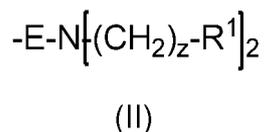
- a) un núcleo polifenólico,
- b) al menos una generación, y
- c) una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula general (I):



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

p es un número entero y puede ser 1, 2 ó 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 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).

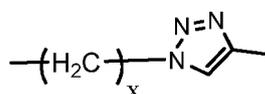
Por "dendrímero carbosilano" se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada con forma esférica, donde el núcleo de crecimiento del dendrímero es un polifuncional, en este caso el núcleo es un polifenol, las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano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

El término "generación" se refiere al número de ramificaciones iterativas que son necesarias para la preparación del dendrímero.

Por "polifenol" se entiende en la presente invención a una molécula de benceno sustituido por al menos dos grupos hidroxilo en cualquiera de sus posiciones, por ejemplo 1,4-dihidroxibenceno, 1,2-dihidroxibenceno o 1,3-dihidroxibenceno, más preferiblemente es hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno), pero puede tener tres, cuatro, cinco o seis grupos hidroxilo. Más preferiblemente el polifenol es trisustituido, aún más preferiblemente 1,3,5-trihidroxibenceno.

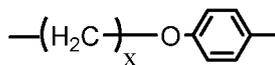
Por "grupo enlazante" se entiende en la presente invención cualquier grupo que une las ramificaciones, que a su vez se encuentran unidas al núcleo, con los grupos funcionales de la capa externa del dendrímero. El grupo enlazante E se puede seleccionar preferiblemente entre un alquilo (C₁-C₁₀) o un grupo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

Cuando R³ es un grupo triazol, E sería un grupo de fórmula:



ES 2 365 685 A1

Por otro lado, cuando R^3 es un grupo fenoxo, E sería un grupo de fórmula:



donde x para ambos casos está descrito anteriormente.

El término “alquilo” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas. En el caso de R^1 y R^2 , estas cadenas 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. En el caso de un grupo enlazante (E), estas cadenas tienen de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente el grupo alquilo es una cadena que tiene de 1 a 4 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo enlazante (E) es un grupo propilo.

En una realización preferida, el grupo enlazante E es el grupo $-(\text{CH}_2)_x-\text{R}^3$ y R^3 es triazol. Más preferiblemente x es 4.

En otra realización preferida, el grupo enlazante E es el grupo $-(\text{CH}_2)_x-\text{R}^3$ y R^3 es fenoxo. Más preferiblemente, donde x es 1.

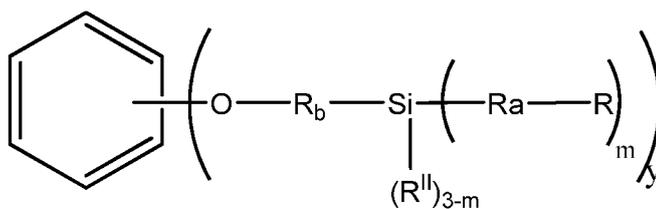
Cuando R^1 es el grupo $-\text{COOR}^2$ o el grupo $-\text{SO}_3\text{R}^2$, preferiblemente R^2 es hidrógeno o metilo y más preferiblemente z es 2.

Cuando R^1 es el grupo $-\text{PO}_3(\text{R}^2)_2$, 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 sí 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 que se puede representar con la siguiente fórmula (III):



(III)

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

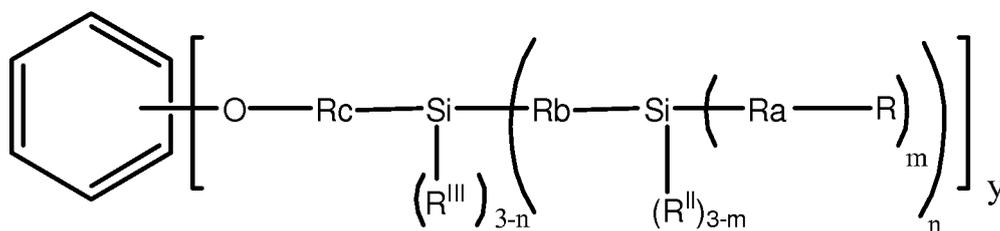
m es un número entero que varía entre 1 y 3; preferiblemente m es 2.

y es un número entero que varía entre 2 y 6; preferiblemente y es 3.

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

ES 2 365 685 A1

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



(IV)

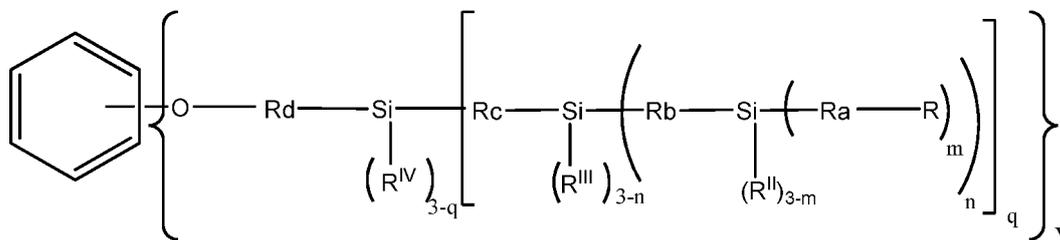
donde: $\text{R}_a, \text{R}_b, \text{R}_c, \text{R}^{\text{II}}$ y R^{III} , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$);

m y n son iguales o diferentes y es un número entero que varía entre de 1 y 3; preferiblemente m y/o n es 2

y es un número entero que varía entre 2 y 6; preferiblemente es 3

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):



(V)

donde: $\text{R}_a, \text{R}_b, \text{R}_c, \text{R}_d, \text{R}^{\text{II}}, \text{R}^{\text{III}}$ y R^{IV} son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$);

m, n y q son iguales o diferentes y es un número entero que varía entre 1 y 3; preferiblemente es 2

y es un número entero que varía entre 2 y 6; preferiblemente es 3

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

En estos dendrímeros de al menos primera, segunda y tercera generación los radicales $\text{R}_a, \text{R}_b, \text{R}_c$ o R_d pueden ser iguales o diferentes, y preferiblemente representan un grupo alquilo ($\text{C}_2\text{-C}_4$).

En otra realización preferida, los radicales $\text{R}^{\text{II}}, \text{R}^{\text{III}}$ o R^{IV} son, independiente unos de otros, y representan un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), más preferiblemente son un grupo metilo.

Estos dendrímeros organosilano de la invención se pueden preparar de diferentes generaciones con rendimientos elevados usando reacciones bien conocidas, a través de métodos divergentes. Los dendrímeros carboxilato y sulfonato son dendrímeros estables y solubles en agua. En función del pH se pueden obtener los dendrímeros como sales sódicas, ácidos o aminoácidos, lo que proporciona mayor versatilidad en sus aplicaciones. Su síntesis es relativamente sencilla, lo que facilita su obtención en grandes cantidades.

ES 2 365 685 A1

La síntesis de cuñas dendríticas o dendrones de naturaleza carbosilano que tienen un grupo funcional en el punto focal, permiten el acoplamiento de varias de estas cuñas sobre un núcleo polifenólico. La adecuada funcionalización posterior de la periferia de los dendrímeros obtenidos permite la obtención de dendrímeros aniónicos con grupos terminales como por ejemplo carboxilato, sulfonato o fosfonato. Es decir, la preparación de estos derivados aniónicos se puede hacer siguiendo una secuencia sintética de 3 pasos que implican:

- Síntesis de dendrones o cuñas dendríticas con un punto focal y una periferia adecuadamente funcionalizados.
- Acoplamiento de dendrones o cuñas dendríticas de los sintetizados en el apartado anterior sobre un núcleo polifenólico.
- Funcionalización de la periferia de los dendrímeros obtenidos en el apartado anterior con grupos aniónicos de diferente naturaleza, como por ejemplo, carboxilato, sulfonato o fosfonato.

Para la síntesis de estas cuñas dendríticas se puede partir de un haloalqueno, más preferiblemente bromoalqueno, como por ejemplo bromuro de alilo o 4-bromobuteno y se puede utilizar una estrategia de crecimiento divergente. Dependiendo del tipo de funcionalización que se alcance en la periferia de estos dendrones, se pueden obtener cuñas dendríticas diferentes que permiten posteriormente, una gran versatilidad de procedimientos preparativos para la obtención de dendrímeros carbosilano aniónicos. De esta forma se pueden preparar cuñas dendríticas que tienen en su punto focal un grupo bromo alquilo, $\text{BrCH}_2\text{-Dendr}$, y que presentan su superficie funcionalizada con diferentes grupos como por ejemplo: grupos alilo, enlaces Si-H o Si-Cl terminales, grupos éster, etc. Un esquema general de estas cuñas dendríticas se muestra en la Fig. 1.

Los dendrones pueden presentar en su punto focal una funcionalidad $\text{-CH}_2\text{Br}$, por lo que pueden ser anclados sobre un núcleo polifenólico, como por ejemplo hidroquinona o 1,3,5-trihidroxibenceno, para dar lugar a dendrímeros con diferentes grupos funcionales en la superficie. Esta reacción de acoplamiento de cuñas dendríticas con enlaces C-Br en el punto focal sobre derivados polifenólicos, se puede realizar de forma general en un disolvente, como por ejemplo acetona, tetrahidrofurano (THF) o dimetilformamida (DMF), calentado a temperaturas entre 60 y 100°C durante varias horas en presencia de una base como por ejemplo carbonato potásico (K_2CO_3) o carbonato de cesio (Cs_2CO_3) y añadiendo éter corona, por ejemplo 18-C-6, para favorecer la solubilidad de la sal inorgánica en el disolvente orgánico utilizado.

Una vez sintetizados los dendrímeros descritos anteriormente, la obtención de dendrímeros con grupos carboxílicos, fosfónicos o sulfónicos, y más preferiblemente sus grupos aniónicos, en la superficie puede abordarse de formas diversas dependiendo en primer lugar de las funcionalidades presentes en el dendrímero de partida y en segundo lugar de la naturaleza de los grupos aniónicos que se deseen en el dendrímero final:

Así, para la obtención de derivados carboxilato se pueden utilizar dos métodos diferentes, el primero consiste en la reacción de hidrosililación de alilamina sobre dendrímeros acabados en enlaces Si-H utilizando para ello un catalizador de platino, seguido de la adición de Michael de acrilato de metilo sobre los grupos amino, -NH_2 , terminales del dendrímero y posterior transformación de los grupos éster resultantes en grupos carboxilato por tratamiento con una base, como por ejemplo NaOH. El segundo método consiste en preparar inicialmente una alil amina con grupos éster terminales mediante adición de Michael de acrilato de metilo sobre alilamina y posterior hidrosililación de esta alilamina funcionalizada sobre el dendrímero acabado en grupos Si-H terminales. En este caso también el paso final consistiría en la transformación de los grupos éster terminales en grupos carboxilato por adición de una base.

Por otro lado, los dendrímeros con grupos sulfonato se pueden preparar llevando a cabo inicialmente la hidrosililación de alilamina sobre dendrímeros terminados en grupos Si-H y posterior adición de Michael de vinil sulfonato de sodio sobre los dendrímeros acabados en grupos -NH_2 resultantes en la primera etapa.

En el caso de los derivados fosfonato se pueden preparar inicialmente los dendrímeros acabados en grupos -NH_2 y a partir de ellos se introducen los grupos fosfonato mediante reacción con formaldehído en THF durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación adición "*in situ*" de fosfito de metilo, $\text{HPO}(\text{OMe})_2$. También en este caso la obtención de derivados aniónicos con grupos fosfonato terminales se puede conseguir por adición de base, por ejemplo NaOH, sobre los dendrímeros anteriores.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los dendrímeros de la invención, que comprende la adición de Michael de un dendrímero que contiene un núcleo polifenólico y grupos -NH_2 terminales con un grupo que se selecciona de la lista que comprende acrilato de metilo, vinil sulfonato y dimetil fosfonato.

En una realización preferida, el dendrímero que contiene un núcleo polifenólico y grupos -NH_2 se obtiene mediante:

- a) la síntesis de dendrones con un punto focal haloalquilo y funcionalizada por grupos alilo a partir de un haloalqueno;

ES 2 365 685 A1

- b) acoplamiento de los dendrones obtenidos en el paso (a) a un núcleo polifenólico; y
- c) la funcionalización del dendrímero obtenido en (b) con grupos $-NH_2$ terminales.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los dendrímeros de la invención, que comprende la hidrosililación de un dendrímero que contiene un núcleo polifenólico y grupos $-Si-H$ terminales con un grupo alilamina funcionalizado con grupos carboxílicos, fosfónicos o sulfónicos.

10 En una realización preferida, el dendrímero que contienen núcleos polifenólicos y grupos $-Si-H$ terminales se obtiene mediante:

- a) la síntesis de dendrones con un punto focal haloalquilo y funcionalizada por grupos $-Si-H$ a partir de un haloalqueno; y
- 15 b) acoplamiento de los dendrones obtenidos en el paso (a) a un núcleo polifenólico; o de manera alternativa
- a') la síntesis de dendrones con un punto focal haloalquilo y funcionalizada por grupos alilo a partir de un haloalqueno;
- 20 b') acoplamiento de los dendrones obtenidos en el paso (a') a un núcleo polifenólico; y
- c') la funcionalización del dendrímero obtenido en (b') con grupos $-Si-H$ terminales.

25

Por "haloalqueno" se entiende en la presente invención a un alqueno (C_1-C_6) sustituido por un halógeno, por ejemplo un átomo de bromo, yodo o cloro, más preferiblemente es un bromoalqueno (C_1-C_6), aún más preferiblemente es un bromoalqueno (C_2-C_4), como por ejemplo el 4-bromobuteno.

30

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 contagios frente a VIH aumentan significativamente en presencia de procesos de irritación vaginal o 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.

35

40

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a los dendrímeros de la invención para su uso como medicamento. 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 el virus VIH. Más preferiblemente estos dendrímeros son aniónicos.

45

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 ésta y su correspondiente producción de partículas virales nuevas.

50

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

55

Por tanto, en una realización preferida de la presente invención las enfermedades son enfermedades de transmisión sexual (antiviral, antibacteriano y antifúngico).

60

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 no protección cuando se mantienen relaciones sexuales con una persona seropositiva.

65

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.

ES 2 365 685 A1

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

5 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.

10 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 parental.

15 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.

20 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 cuando los dendrímeros tienen carga negativa.

25 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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

30 Fig. 1.- Representa esquemáticamente una cuña dendrítica de naturaleza carbosilano con doble funcionalidad, en el punto focal (F.p.f) y en la periferia (F.P.).

Fig. 2.- Muestra un estudio de la liberación de LDH tras 24 h de contacto entre las tres generaciones de dendrímero y las células MT-2.

35 Fig. 3.- Muestra un estudio de la liberación de LDH tras 24 h de contacto entre las tres generaciones de dendrímero y las CMSP.

40 Fig. 4.- Muestra un estudio de la actividad mitocondrial de las CMSP en contacto con distintas concentraciones de dendrímero a las 24 h.

Fig. 5.- Representa la inhibición de la transcitosis de VIH en monocapa de HEC-1A. Se trató con 70 ng de virus Bal en la parte apical tras 1 h de pretratamiento con el dendrímero y se recogió sobrenadante basolateral a las 48 h.

45 Fig. 6.- Representa la inhibición de la infección de CMSP pretratadas 1 h con G2O3SF24. Todos los reactivos se añadieron a una concentración final en el pocillo de 10 μ M.

Fig. 7.- Muestra un ensayo de inhibición de la infección en macrófagos (M), células dendríticas inmaduras (Di) y células dendríticas maduras (Dm) a los 4 días. Se pretrataron 1 h antes de infectar con NL4.3 (3 ng)

50 Fig. 8.- Representación del efecto bactericida dependiente de la concentración de ampicilina (antibiótico comercial) y G2O3SF24 a las 24 h post-tratamiento de *S. aureus*. La pendiente del triángulo representa el decremento de la concentración de Antibiótico (2; 1; 0.5; 0.25; 1.12; 0.6; 0.3; 0.15 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.

55 Fig. 9.- Representación del efecto bacterioestático dependiente de la concentración de ampicilina (antibiótico comercial) y G2O3SF24 a las 24 h post-tratamiento de *S. aureus*. La pendiente del triángulo representa el decremento de la concentración de Antibiótico (2; 1; 0.5; 0.25; 1.12; 0.6; 0.3; 0.15 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.

60 Fig. 10.- Representación del efecto fungicida dependiente de la concentración de anfotericina B (fungicida comercial) y G2O3SF24 a las 24 h post-tratamiento de *C. albicans*. La pendiente del triángulo representa el decremento de la concentración de Anfotericina B (2; 1; 0.5; 0.25; 1.12; 0.6; 0.3; 0.15 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.

65 Fig. 11.- Representación del efecto fungiestático dependiente de la concentración de anfotericina B (fungicida comercial) y G2O3SF24 a las 24 h post-tratamiento de *C. albicans*. La pendiente del triángulo representa el decremento de la concentración de Anfotericina B (2; 1; 0.5; 0.25; 1.12; 0.6; 0.3; 0.15 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.

Ejemplos

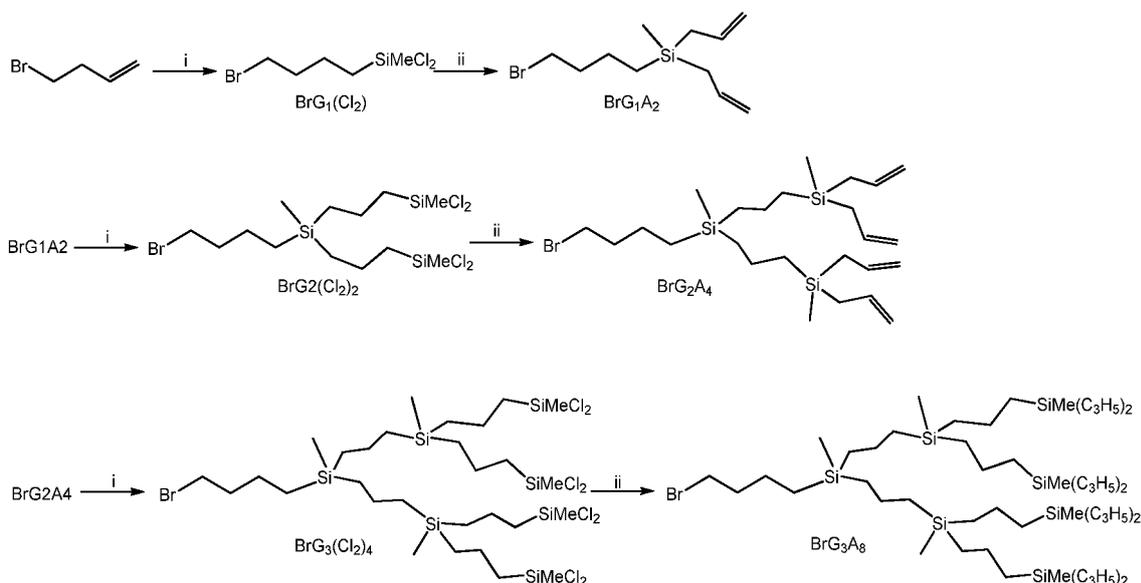
A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de los dendrímeros carbosilano y sus procedimientos de síntesis.

Síntesis de los dendrímeros de la invención

A.- Síntesis de dendrones o cuñas dendríticas con un punto focal y una periferia adecuadamente funcionalizados

En el esquema 1 se describe el procedimiento de síntesis de cuñas dendríticas de 1^a, 2^a y 3^a generación con grupos alilo terminales a partir de un bromo alqueno como el 4-bromo buteno. En un primer paso, la hidrosililación del doble enlace del alqueno con HSiMeCl_2 conduce a la cuña dendrítica de 1^a generación con enlaces Si-Cl terminales, BrG_1Cl_2 (1), la cual se puede transformar en una cuña dendrítica de 1^a generación con grupos alilo terminales por reacción con bromuro de alil magnesio, $\text{BrMg}(\text{C}_3\text{H}_5)$, y que denominamos BrG_1A_2 (2). La repetición de las dos reacciones anteriores sobre BrG_1A_2 , conduce a los dendrones de 2^a generación, BrG_2Cl_4 (3) y BrG_2A_4 (4) y si se repiten nuevamente, ahora sobre la cuña BrG_2A_4 , se obtienen los dendrones de 3^a generación BrG_3Cl_8 (5) y BrG_3A_8 (6).

Esquema 1

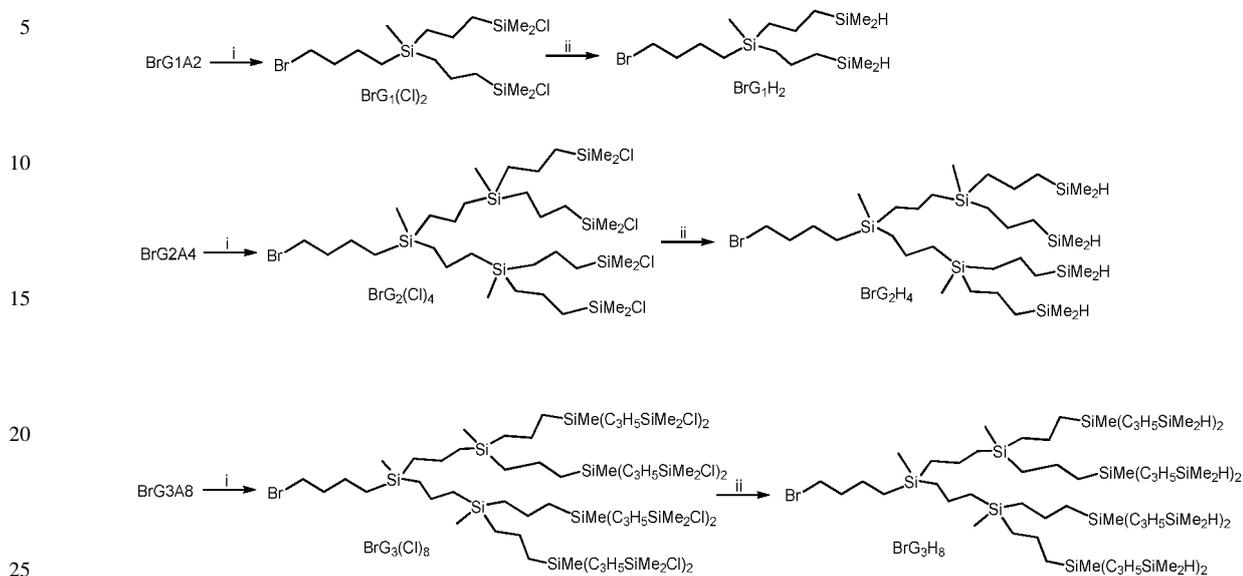


Donde: i) HSiMeCl_2 , catalizador de platino; ii) $\text{BrMg}(\text{C}_3\text{H}_5)$.

La funcionalización de las cuñas dendríticas anteriores con enlaces terminales Si-H, se lleva a cabo a través de una reacción en dos pasos que conlleva primero, la hidrosililación de clorodimetil silano, SiMe_2ClH , sobre los dendrones terminados en grupos alilo y posteriormente la transformación de los enlaces Si-Cl resultantes a enlaces Si-H terminales con tetrahidruro de litio y aluminio, LiAlH_4 , tal y como se describe en el esquema 2. Operando de esta forma, a partir del dendrón de primera generación BrG_1A_2 (2), obtendríamos la cuña dendrítica BrG_1H_2 (7). Si partimos del derivado de segunda generación 4, obtendríamos BrG_2H_4 (8), y si llevamos a cabo la funcionalización a partir del dendrón de tercera generación 6, llegaríamos a la cuña dendrítica con 8 enlaces terminales Si-H, BrG_3H_8 (9).

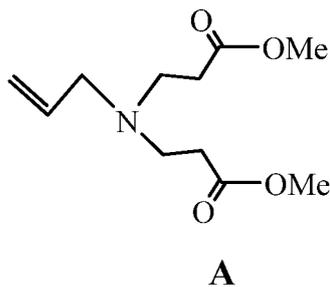
ES 2 365 685 A1

Esquema 2



Donde: i) HSiMe_2Cl , catalizador de platino; ii) LiAlH_4 .

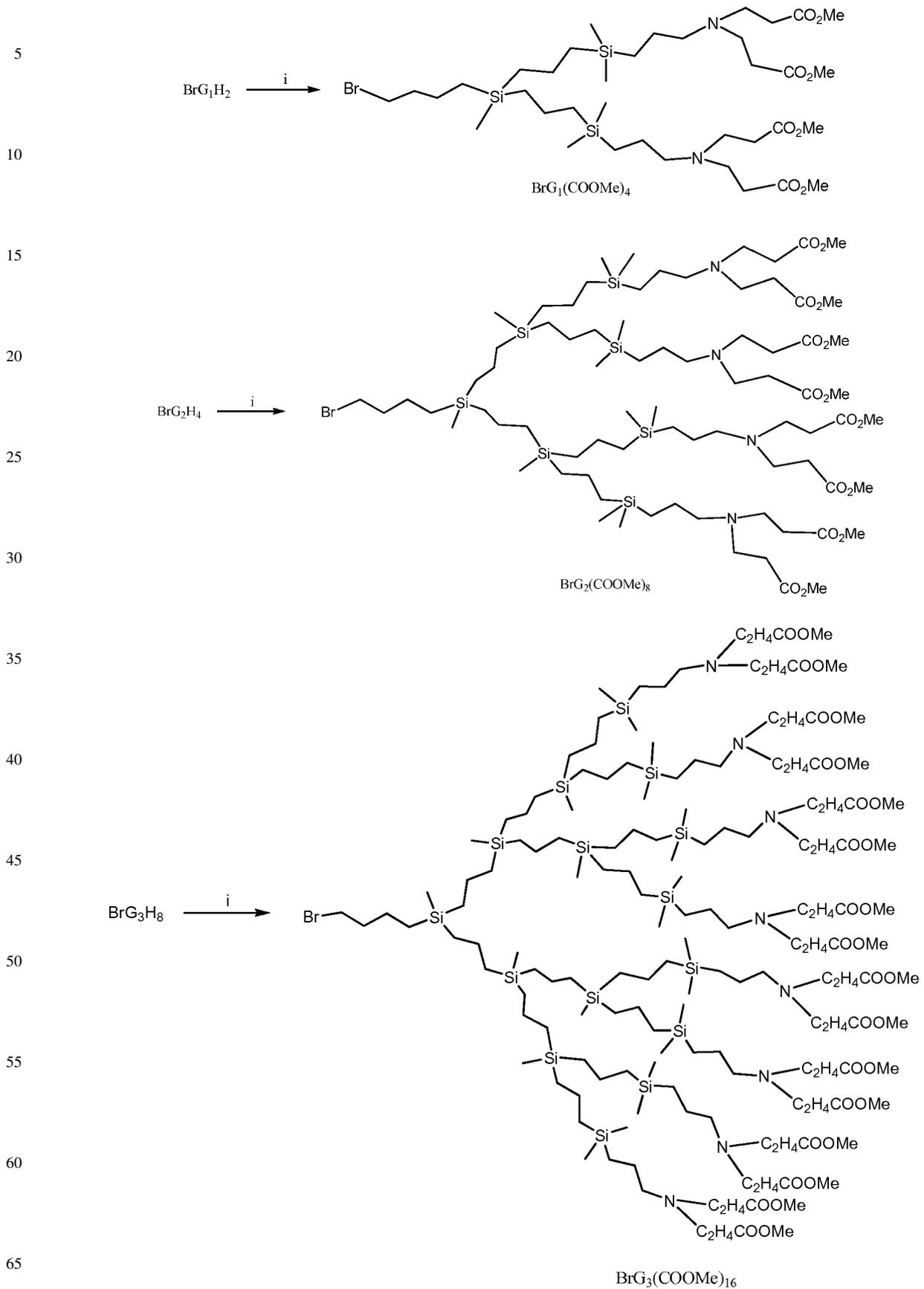
Un tercer tipo de cuñas dendríticas que se recogen en esta invención, son aquellas que presentan en su punto focal un grupo funcional $-\text{CH}_2\text{Br}$, y su periferia se encuentra funcionalizada con grupos éster, que son grupos precursores de ligandos aniónicos, tal y como hemos descrito en la primera parte de esta Memoria. Se han preparado estas cuñas dendríticas hasta una tercera generación siguiendo la ruta sintética que se describe en el esquema 3. La reacción que se describe en este esquema es una reacción de hidrosililación de cuñas dendríticas de naturaleza carbosilano que contienen enlaces terminales Si-H con una alilamina funcionalizada con grupos acrilato de metilo, utilizando el catalizador de Karstedt. La alilamina utilizada en esta síntesis, es la que hemos descrito como compuesto A



Así pues, si la reacción parte de la cuña dendrítica de primera generación 7, su reacción de hidrosililación con A, conduce a la cuña dendrítica de primera generación con grupos acrilato de metilo terminales $\text{BrG1}(\text{COOMe})_4$ (10). Si se parte de la cuña de segunda generación 8, se obtiene la cuña de segunda generación $\text{BrG}_2(\text{COOMe})_8$ (11), que tiene 8 grupos acrilato en la superficie, y si se lleva a cabo la reacción de hidrosililación empezando con la cuña de tercera generación 9 y la alilamina A, se obtiene el dendrón de tercera generación $\text{BrG}_3(\text{COOMe})_{16}$ (12), que cuenta con 16 grupos acrilato en la periferia.

ES 2 365 685 A1

Esquema 3



Donde: i) $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOMe})_2$, catalizador de platino.

ES 2 365 685 A1

Los dendrones o cuñas dendríticas descritas en este apartado, 1-12, han sido caracterizados por análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno, resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , y espectrometría de masas, que se detallan a continuación:

5

Síntesis de BrG_1Cl_2 (1)

A una disolución de 4-Bromo-1-buteno (4.00 g, 0.030 mol) en hexano (4 mL) enfriada a 0°C se adiciona HSiMeCl_2 (5.10 g, 0.045 mol) y catalizador de Kardsted (3% mol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante una noche y a continuación se lleva a sequedad. Se adiciona hexano (15 mL) y se filtra la disolución a través de carbono activo. Se evapora el disolvente y se obtiene el compuesto BrG_1Cl_2 como un líquido incoloro (7.03 g, 95%). El derivado 1 es sensible a la humedad y debe almacenarse bajo atmósfera inerte.

^1H -RMN (CDCl_3): δ 0.77 (s, 3 H, MeSiCl_2), 1.11 (m, 2 H, CH_2Si), 1.65 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.93 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.41 (t, J = 6.6 Hz, 2 H, BrCH_2); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ 5.1 (MeSiCl_2), 20.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 21.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 32.8 (BrCH_2CH_2), 34.9 (BrCH_2CH_2); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 32.3 (MeSiCl_2).

Síntesis de BrG_1A_2 (2)

Sobre una disolución de $\text{BrG}_1(\text{SiCl}_2)$ (10.00 g, 0.040 mol) en Et_2O (25 mL) enfriada a 0°C se adiciona lentamente $\text{BrMg}(\text{C}_3\text{H}_5)$ (0.085 mol) y se agita a temperatura ambiente durante una noche. Transcurrido este tiempo se adiciona en frío una disolución de NH_4Cl en agua (12%, 50 mL). A continuación, se realiza una extracción agua/éter (3 veces), la fase orgánica se seca con MgSO_4 y finalmente se lleva a sequedad, obteniéndose el compuesto BrG_1A_2 como un líquido incoloro (8.35 g, 80%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.02 (s, 3 H, $\text{MeSi}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_2$), 0.53 (m, 2 H, CH_2Si), 1.44 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.54 (d, J = 8.5 Hz, 4 H, SiCH_2CH), 1.85 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, J = 6.6 Hz, 2 H, BrCH_2), 4.84 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.74 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.9 (e), 12.0 (d), 21.2 (f), 22.1 (c), 33.5 (a), 36.2 (b), 113.3 (h), 134.5 (g); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 0.99 (MeSi). Anal. Calc. $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{BrSi}$ (261,27 g/mol): C, 50.57; H, 8.10; Exp.: C, 51.03; H, 8.17.

Síntesis de BrG_2Cl_4 (3)

Este compuesto se prepara a partir de BrG_1A_2 (4.30 g, 0.016 mol), HSiMeCl_2 (3.41 g, 0.03 mol) y catalizador de Kardsted (3% mol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1Cl_2 , obteniéndose BrG_2Cl_4 como un aceite incoloro (7.60 g, 94%). El derivado 3 es sensible a la humedad y debe almacenarse bajo atmósfera inerte.

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.03 (s, 3 H, MeSi), 0.53 (m, 2 H, SiCH_2), 0.66 (m, 4 H, SiCH_2), 0.75 (s, 6 H, MeSiCl_2), 1.19 (m, 4 H, CH_2SiCl_2), 1.50 (m, 6 H, CH_2), 1.85 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, J = 6.6 Hz, 2 H, BrCH_2); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.1 (MeSi), 5.1 (MeSiCl_2), 12.5 (SiCH_2), 17.3 (CH_2), 17.9 (CH_2), 22.3 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 25.9 (CH_2SiCl_2), 33.7 (BrCH_2), 36.4 (BrCH_2CH_2); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 2.3 (MeSi), 32.1 (MeSiCl_2).

Síntesis de BrG_2A_4 (4)

Este compuesto se prepara a partir de BrG_2Cl_4 (6.25 g, 0.013 mol) y $\text{BrMg}(\text{C}_3\text{H}_5)$ (0.055 mol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1A_2 , obteniéndose BrG_2A_4 como un aceite incoloro (5.10 g, 78%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.08 (s, 3 H, MeSi), -0.04 (s, 6 H, MeSi), 0.56 (m, 10 H, SiCH_2), 1.25 (m, 6 H, CH_2), 1.52 (d, J = 8.4 Hz, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.84 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, J = 6.6 Hz, 2 H, BrCH_2), 4.84 (m, 8 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.74 (m, 4 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.7 (MeSi), -5.1 (MeSi), 12.9 (SiCH_2), 17.9, 18.2 y 18.6 (CH_2), 21.4 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 22.5 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.6 (BrCH_2), 36.3 (BrCH_2CH_2), 113.0 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 134.8 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 0.1 (MeSi), 1.8 (MeSi). Anal. Calc. $\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{BrSi}_3$ (513.82 g/mol): C, 58.44; H, 9.61; Exp.: C, 58.01; H, 9.53.

Síntesis de BrG_3Cl_8 (5)

Este compuesto se prepara a partir de BrG_2A_4 (2.50 g, 4.86 mmol), HSiMeCl_2 (3.80 g, 0.033 mol) y catalizador de Kardsted (3% mol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1Cl_2 , obteniéndose BrG_3Cl_8 como un aceite incoloro (4.45 g, 94%). El derivado 5 es sensible a la humedad y debe almacenarse bajo atmósfera inerte.

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.07 (s, 3 H, MeSi), -0.04 (s, 6 H, MeSi), 0.58 (m, 18 H, SiCH_2), 0.75 (s, 12 H, MeSiCl_2), 0.87 (m, 8 H, CH_2), 1.16 (m, 8 H, CH_2SiCl_2), 1.52 (m, 6 H, CH_2), 1.85 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, J = 6.6 Hz, 2 H, BrCH_2); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.2 (MeSi), 5.5 (MeSiCl_2), 12.9 (SiCH_2), 17.3 y 17.5 (CH_2), 18.4, 18.6 y 18.7 (CH_2), 22.6 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 25.9 (CH_2SiCl_2), 33.6 (BrCH_2), 36.3 (BrCH_2CH_2); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 1.4 (MeSi), 1.8 (MeSi), 32.1 (MeSiCl_2).

ES 2 365 685 A1

Síntesis de BrG_3A_8 (6)

Este compuesto se prepara a partir de BrG_3Cl_8 (3.30 g, 3.39 mmol) y $\text{BrMg}(\text{C}_3\text{H}_5)$ (0.031 mol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1A_2 , obteniéndose BrG_3A_8 como un aceite incoloro (2.62 g, 76%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ -0.10 (s, 3 H, *MeSi*), -0.08 (s, 6 H, *MeSi*), -0.04 (s, 12 H, *MeSi*), 0.55 (m, 26 H, SiCH_2), 1.31 (m, 16 H, CH_2), 1.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 16 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.84 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H, BrCH_2), 4.84 (m, 16 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.73 (m, 8 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); $^{13}\text{C-RMN}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ -5.7 (*MeSi*), -5.1 (*MeSi*), -4.9 (*MeSi*), 13.0 (SiCH_2), 17.9, 18.3, 18.5, 18.8 y 18.9 (CH_2), 21.5 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 22.6 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.6 (BrCH_2), 36.4 (BrCH_2CH_2), 113.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 134.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$); $^{29}\text{Si-RMN}$ (CDCl_3): δ 0.1 (*MeSi*), 0.9 (*MeSi*), 1.8 (*MeSi*). Anal. Calc. $\text{C}_{53}\text{H}_{105}\text{BrSi}_7$ (1018.90 g/mol): C, 62.48; H, 10.39; Exp.: C, 61.92; H, 10.33.

Síntesis de BrG_1H_2 (7)

Una disolución de $\text{BrG}_1(\text{SiCl}_2)$ (2.00 g, 4.44 mmol) en Et_2O (25 mL) se adiciona lentamente sobre una disolución de LiAlH_4 (7.76 mmol) en Et_2O (25 mL) a 0°C . Una vez completada la adición se agita a temperatura ambiente durante una noche. A continuación se añade en frío una disolución acuosa de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NaCl}$ (12%, 50 mL) y se realiza una extracción agua/éter (3 veces). La fase orgánica se seca con MgSO_4 y finalmente se lleva a sequedad, obteniéndose el compuesto 7 como un líquido incoloro (1.20 g, 71%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ -0.08 (s, 3 H, *MeSi*), 0.04 (d, $J = 4.2$ Hz, 12 H, Me_2SiH), 0.52 (m, 2 H, SiCH_2), 0.58 (m, 8 H, SiCH_2), 1.38 (m, 6 H, CH_2), 1.85 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H, BrCH_2), 3.82 (m, 2 H, *SiH*); $^{13}\text{C-RMN}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ -5.1 (*MeSi*), -4.3 (Me_2SiH), 12.9 (SiCH_2), 17.9 (CH_2), 18.8 y 19.0 (CH_2), 22.5 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.7 (BrCH_2), 36.4 (BrCH_2CH_2); $^{29}\text{Si-RMN}$ (CDCl_3): δ -14.6 (Me_2SiH), 2.1 (*MeSi*). Anal. Calc. $\text{C}_{15}\text{H}_{37}\text{BrSi}_3$ (381.61 g/mol): C, 47.21; H, 9.77; Obt.: C, 47.89; H, 9.53.

Síntesis de BrG_2H_4 (8)

Este compuesto se prepara a partir de $\text{BrG}_2(\text{SiCl}_4)$ (3.15 g, 3.53 mmol) y LiAlH_4 (10.60 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1H_2 , obteniéndose BrG_2H_4 , 8, como un aceite incoloro (1.76 g, 66%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ -0.10 (s, 6 H, *MeSi*), -0.08 (s, 3 H, *MeSi*), 0.04 (d, $J = 4.2$ Hz, 12 H, Me_2SiH), 0.54 (m, 26 H, SiCH_2), 1.35 (m, 14 H, CH_2), 1.85 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H, BrCH_2), 3.82 (m, 4 H, *SiH*); $^{13}\text{C-RMN}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ -5.0 (*MeSi*), -4.38 (Me_2SiH), 13.0 (SiCH_2), 18.2, 18.5, 18.7, 18.8, 19.0 (CH_2), 22.5 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.6 (BrCH_2), 36.4 (BrCH_2CH_2); $^{29}\text{Si-RMN}$ (CDCl_3): δ -14.1 (Me_2SiH), 1.0 (*MeSi*), 1.8 (*MeSi*). Anal. Calc. $\text{C}_{33}\text{H}_{81}\text{BrSi}_7$ (754.50 g/mol): C, 52.53; H, 10.82; Obt.: C, 53.00; H, 10.25.

Síntesis de BrG_3H_8 (9)

Este compuesto se prepara a partir de $\text{BrG}_3(\text{SiCl}_8)$ (2.00 g, 1.13 mmol) y LiAlH_4 (6.75 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1H_2 , obteniéndose BrG_3H_8 , 9, como un aceite incoloro (1.11 g, 66%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ -0.10 (s, 21 H, *MeSi*), 0.04 (d, $J = 4.2$ Hz, 48 H, Me_2SiH), 0.58 (m, 58 H, SiCH_2), 1.31 (m, 30 H, CH_2), 1.82 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 3.40 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H, BrCH_2), 3.83 (m, 8 H, *SiH*); $^{13}\text{C-RMN}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): -5.0 (*MeSi*), -4.3 (Me_2SiH), 13.0 (SiCH_2), 18.2-19.0 (CH_2), 22.6 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.5 (BrCH_2), 36.5 (BrCH_2CH_2); $^{29}\text{Si-RMN}$ (CDCl_3): δ -14.6 (Me_2SiH), 1.4 (*MeSi*). Anal. Calc. $\text{C}_{69}\text{H}_{169}\text{BrSi}_{15}$ (1500.27 g/mol): C, 55.24; H, 11.35; Obt.: C, 54.88; H, 10.73.

Síntesis de $\text{BrG}_1(\text{COOMe})_4$ (10)

A una disolución de BrG_1H_2 (1.00 g, 2.62 mmol) en hexano (2 mL) se adiciona $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}(\text{C}_2\text{H}_4\text{COOMe})_2$ (1.21 g, 5.24 mmol) en presencia de catalizador de Kardstedt (3% mol) y la reacción se agita durante una noche. A continuación se añade hexano (15 ml) y la disolución se filtra a través de carbono activo. Se evapora el disolvente y se obtiene el derivado $\text{BrG}_1(\text{COOMe})_4$, 10, como un aceite incoloro (2.04 g, 92%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ -0.10 (s, 3 H, *MeSi*), -0.08 (s, 12 H, Me_2Si), 0.33 (m, 4 H, SiCH_2), 0.52 (m, 10 H, SiCH_2), 1.27 (m, 4 H, CH_2), 1.35 (m, 6 H, CH_2), 1.83 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 2.33 (m, 4 H, CH_2N), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 8 H, CH_2N), 2.74 (t, $J = 7.3$ Hz, 8 H, CH_2CO), 3.39 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H, BrCH_2), 3.61 (s, 12 H, *OMe*). $^{13}\text{C-RMN}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3): δ -5.1 (*MeSi*), -3.3 (Me_2Si), 12.8 (SiCH_2), 12.9 (SiCH_2), 18.4 (CH_2), 18.6 y 20.1 (CH_2), 21.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 22.5 ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 32.5 (CH_2CO), 33.7 (BrCH_2), 36.4 (BrCH_2CH_2), 49.2 (CH_2N), 51.6 (*OMe*), 57.5 (CH_2N), 173.1 (*CO*). Anal. Calc. $\text{C}_{37}\text{H}_{75}\text{BrN}_2\text{O}_8\text{Si}_3$ (840.16 g/mol): C, 52.89; H, 9.00; Obt.: C, 52.29; H, 8.63.

ES 2 365 685 A1

Síntesis de $\text{BrG}_2(\text{COOMe})_8$ (11)

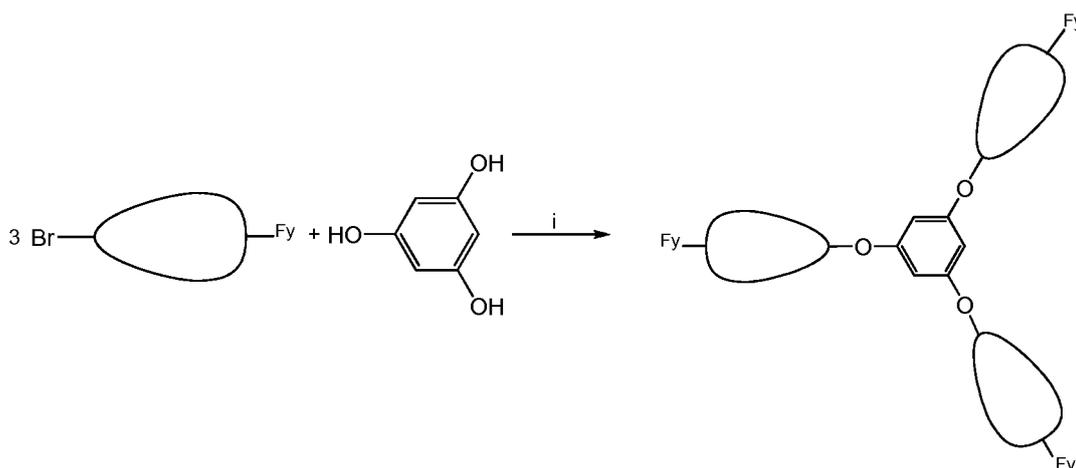
Este compuesto se prepara a partir de BrG_2H_4 (0.30 g, 0.40 mmol) y $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}(\text{C}_2\text{H}_4\text{CO}_2\text{Me})_2$ (0.40 g, 1.75 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para $\text{BrG}_1(\text{CO}_2\text{Me})_4$, obteniéndose $\text{BrG}_2(\text{CO}_2\text{Me})_8$ como un aceite incoloro (0.53 g, 80%) tras realizar una cromatografía de permeación de gel en tolueno.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ -0.10 (s, 6 H, MeSi), -0.08 (s, 3 H, MeSi), -0.07 (s, 24 H, Me_2Si), 0.37 (m, 8 H, SiCH_2), 0.52 (m, 26 H, SiCH_2), 1.33 (m, 22 H, CH_2), 1.83 (m, 2 H, BrCH_2CH_2), 2.33 (m, 8 H, CH_2N), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 16 H, CH_2N), 2.74 (t, $J = 7.3$ Hz, 16 H, CH_2CO), 3.39 (t, $J = 6.6$ Hz, 2 H, BrCH_2), 3.61 (s, 24 H, OMe).

B.- Acoplamiento de dendrones o cuñas dendríticas de los sintetizados en el apartado anterior sobre un núcleo polifenólico

Todos los dendrones descritos en el apartado anterior presentan en su punto focal una funcionalidad $-\text{CH}_2\text{Br}$, por lo que pueden ser anclados sobre un núcleo polifenólicos, como hidroquinona o 1,3,5-trihidroxibenceno, para dar lugar a dendrímeros con diferentes grupos funcionales en la superficie. Esta reacción de acoplamiento de cuñas dendríticas con enlaces C-Br en el punto focal sobre derivados polifenólicos, se realiza de forma general en acetona a 80°C durante 3 días y con la presencia de carbonato potásico (K_2CO_3) y el éter corona 18-C-6, tal y como se describe en el esquema 4:

Esquema 4



Donde: i) K_2CO_3 , $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_6$, Acetona, 80°C ; F son los grupos funcionales e y el número de grupos funcionales

En estos dendrímeros que se describen a continuación se ha utilizado una nomenclatura del tipo GnOxFy , donde:

Gn: Indica la generación del dendrímero obtenido por acoplamiento de cuñas dendríticas sobre núcleos polifenólicos.

Ox: O indica que las cuñas dendríticas han sido acopladas al núcleo del dendrímero a través de un átomo de oxígeno de los grupos fenólicos presentes inicialmente en dicho núcleo. El número x indica el número de grupos fenólicos presentes en el derivado polifenólico inicial. Así O2, indica acoplamiento a un núcleo de hidroquinona que posee dos grupos fenol y O3 indica acoplamiento a un núcleo de 1,3,5-trihidroxibenceno, que presenta tres grupos fenol.

F: representa una o varias letras que indican la naturaleza de los grupos funcionales presentes en la superficie del dendrímero, así **A** representa un grupo alilo, **Cl**, grupos terminales con enlaces Si-Cl, **H** grupos terminales con enlaces Si-H, **N** grupos amino terminales, etc.

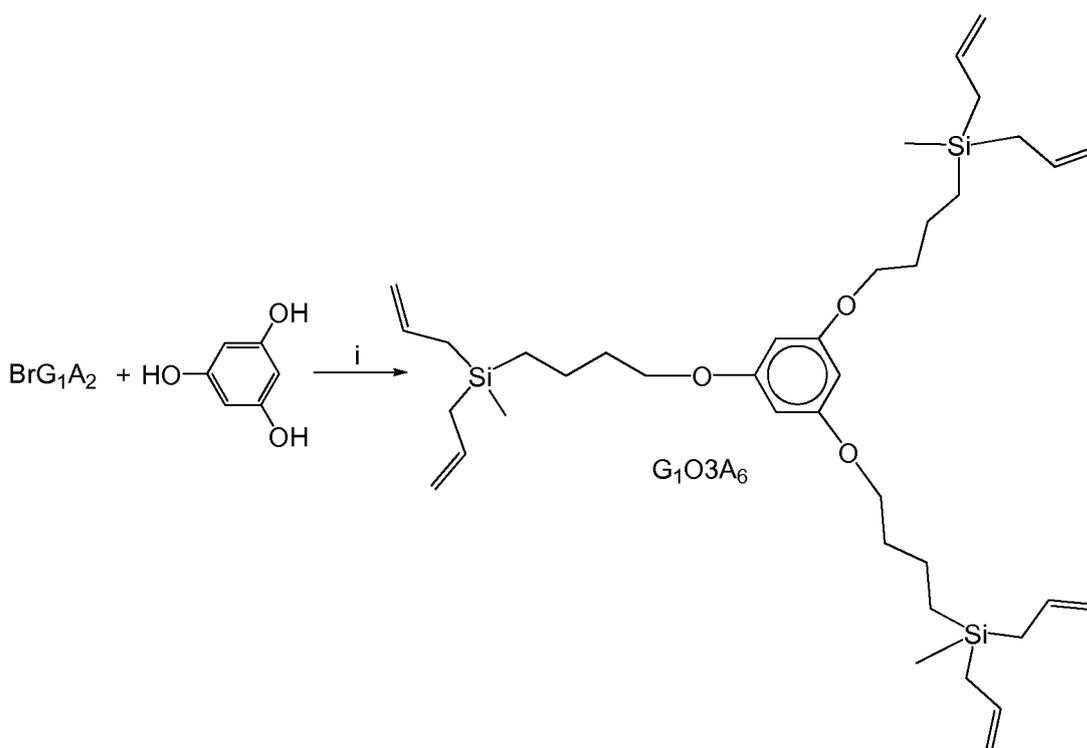
y: representa el número de grupos funcionales presentes en la superficie del dendrímero.

ES 2 365 685 A1

Preparación de dendrímeros con grupos alilo terminales

La reacción de acoplamiento de cuñas dendríticas que poseen un enlace C-Br en el punto focal y funcionalidades alilo en la superficie, sobre un núcleo polifenólico, conduce a la formación de dendrímeros esféricos con grupos alilo terminales, tal y como se esquematiza en el esquema 5 para un dendrímero de primera generación. Así por ejemplo, la reacción de 1,3,5-trihidroxibenceno con la cuña dendrítica BrG_1A_2 (2) conduce a la formación del dendrímero $\text{G}_1\text{O}_3\text{A}_6$ (13) que contiene 6 grupos alilo en la superficie. Si se utiliza la cuña dendrítica de segunda generación BrG_2A_4 (4) en la reacción de acoplamiento se obtiene el dendrímero de segunda generación $\text{G}_2\text{O}_3\text{A}_{12}$ (14) y si lo que se utiliza es la cuña de tercera generación BrG_3A_8 (6), se obtiene el dendrímero de tercera generación $\text{G}_3\text{O}_3\text{A}_{24}$ (15).

Esquema 5



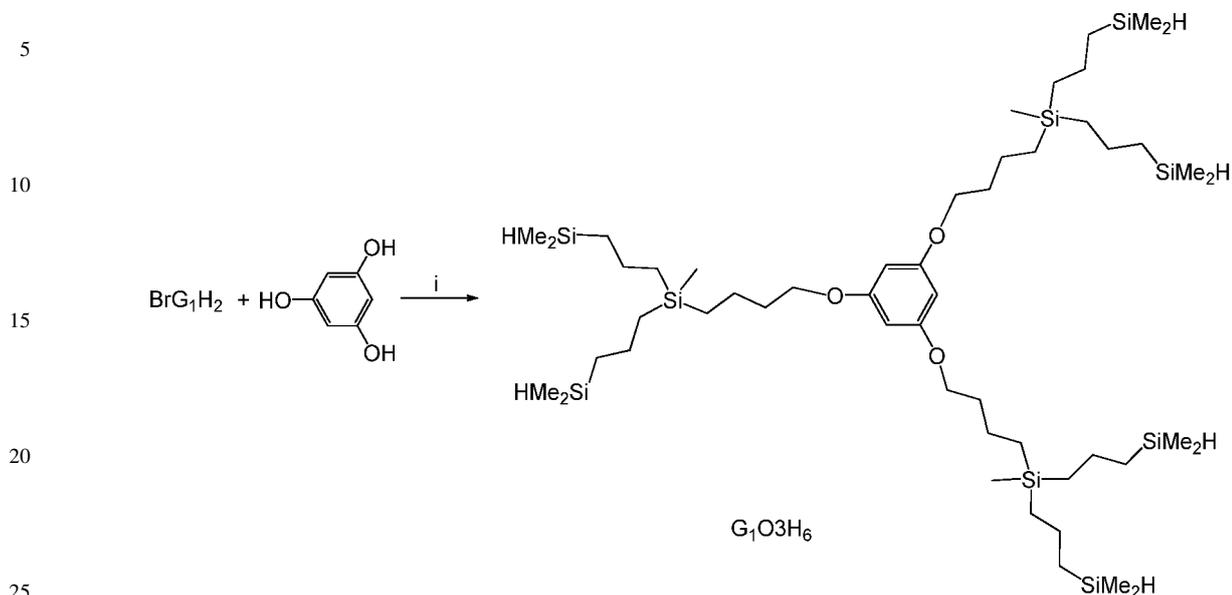
Donde: i) K_2CO_3 , 18C6 (10%), Acetona, 80°C .

Preparación de dendrímeros con enlaces Si-H terminales

La reacción de acoplamiento de cuñas dendríticas que poseen un enlace C-Br en el punto focal y enlaces Si-H en la superficie, sobre un núcleo polifenólico, conduce a la formación de dendrímeros esféricos funcionalizados con enlaces Si-H terminales, que se esquematiza en el esquema 6 para el derivado de primera generación. De esta forma a partir de BrG_1H_2 (7), se obtiene el dendrímero de primera generación $\text{G}_1\text{O}_3\text{H}_6$ (16), si partimos de BrG_2H_4 llegamos al dendrímero de segunda generación $\text{G}_2\text{O}_3\text{H}_{12}$ (17) y si lo hacemos de BrG_3H_8 (9) obtenemos el dendrímero $\text{G}_3\text{O}_3\text{H}_{24}$ (18) que contiene 24 ramas con enlaces Si-H terminales.

Estos derivados se pueden obtener también a partir de los dendrímeros con grupos alilo terminales 13-15, a través de un proceso de dos etapas: primero hidrosililación de los dendrímeros alilo con HSiMe_2Cl y posterior reducción de los enlaces Si-Cl terminales con LiAlH_4 para obtener los dendrímeros con enlaces Si-H en la superficie, 16-18, descritos anteriormente.

Esquema 6



Donde: i) K_2CO_3 , 18C6(10%), Acetona, $80^\circ C$.

30

Preparación de dendrímeros con grupos acrilato de metilo terminales

De forma similar a lo descrito en los dos apartados anteriores, si se realiza la reacción de acoplamiento de cuñas dendríticas que poseen un enlace C-Br en el punto focal y grupos acrilato de metilo en la superficie, sobre un núcleo polifenólico, conduce a la formación de dendrímeros esféricos funcionalizados con grupos éster terminales (método A). El esquema 7 muestra la preparación de un dendrímero de esta familia de primera generación. De esta forma a partir de $BrG_1(COOMe)_4$ (10), se obtiene el dendrímero de primera generación $G_1O_3(COOMe)_{12}$ (19), si partimos de $BrG_2(COOMe)_8$ (11) llegamos al dendrímero de segunda generación $G_2O_3(COOMe)_{24}$ (20) y si lo hacemos de $BrG_3(COOMe)_{16}$ (12), obtenemos el dendrímero $G_3O_3(COOMe)_{48}$ (21) que contiene 48 grupos éster terminales. También, se pueden preparar estos compuestos por hidrosililación sobre dendrímeros con grupos Si-H terminales (16-18) con la alilamina A, descrita anteriormente (método B) o bien, por adición tipo Michael de acrilato de metilo sobre dendrímeros funcionalizados con grupos $-NH_2$ terminales (22-24) (método C). El esquema 8 recoge la síntesis de estos dendrímeros con grupos éster terminales preparados por los métodos B y C.

45

(Esquema pasa a página siguiente)

50

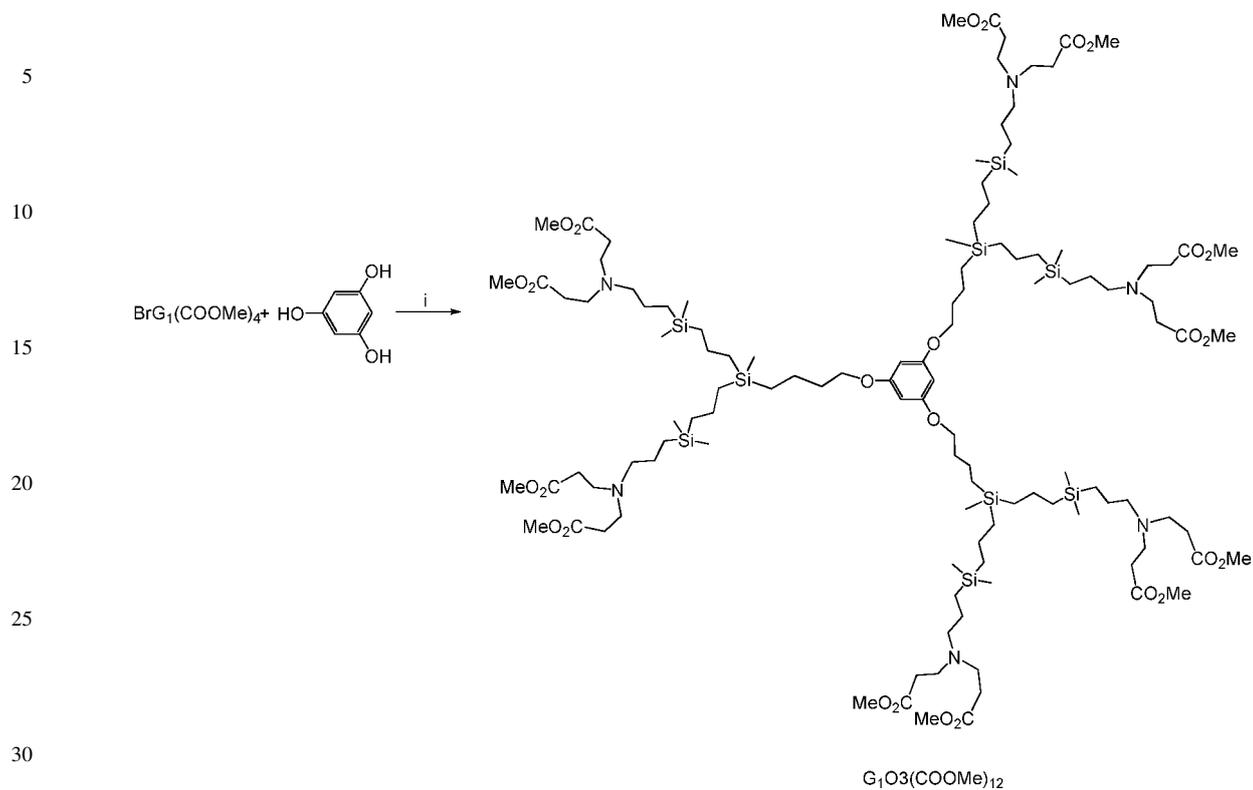
55

60

65

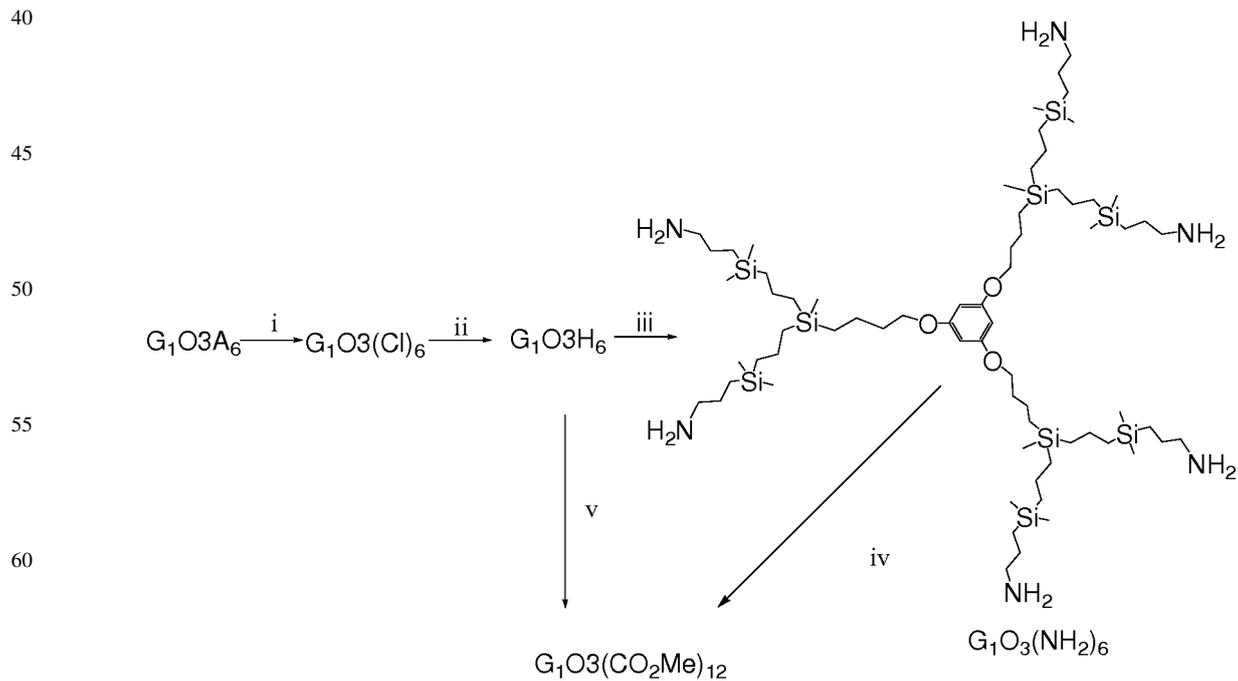
ES 2 365 685 A1

Esquema 7



donde: i) K_2CO_3 , 18C6(10%), Acetona, 80°C.

Esquema 8



Donde: i) $HSiMe_2Cl$, catalizador de Pt; ii) $LiAlH_4$; iii) $C_3H_5NH_2$, catalizador; iv) $C_2H_3CO_2Me$; v) $C_3H_5N(C_2H_4CO_2Me)_2$, cat.

ES 2 365 685 A1

Los dendrímeros 13-21, han sido caracterizados por análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno, resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , y espectrometría de masas, que se detallan a continuación:

5 Síntesis de $G_1O_3A_6$ (13)

Una ampolla de llave de teflón que contiene BrG_1A_2 (1.50 g, 5.74 mmol), 1,3,5-(HO) $_3\text{C}_6\text{H}_3$ (0.24 g, 1.91 mmol), K_2CO_3 (1.59 g, 11.48 mmol) y éter corona 18-C-6 (0.15 g, 0.57 mmol) en acetona (50 mL) se calienta a 80°C durante 56 h. A continuación se evaporan los volátiles y se realiza una extracción $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (NH_4Cl , 12%). La fase orgánica se seca con MgSO_4 (aprox. 2 h) y a continuación se añade SiO_2 y se agita durante 30 min. La disolución se filtra a través de carbono activo, se evapora el disolvente y se obtiene $G_1O_3A_6$ como un aceite amarillo pálido (1.01 g, 79%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.02 (s, 9 H, *MeSi*), 0.58 (m, 6 H, CH_2Si), 1.44 (m, 6 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.54 (d, J = 8.5 Hz, 12 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.76 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 3.89 (t, J = 6.4 Hz, 6 H, OCH_2), 4.84 (m, 12 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.78 (m, 6 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.04 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.9 (*MeSi*), 12.7 (SiCH_2), 20.1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.3 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 32.9 (OCH_2CH_2), 67.4 (OCH_2), 93.7 (C_6H_3 (CH)), 113.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 134.7 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 160.9 (*i*- C_6H_3); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 0.8 (*MeSi*). Anal. Calc. $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{O}_3\text{Si}_3$ (667.20 g/mol): C 70.21; H 9.97; Obt.: C 69.83; H 9.22.

20 Síntesis de $G_2O_3A_{12}$ (14)

Método A) Este compuesto se prepara a partir de BrG_2A_4 (1.50 g, 2.92 mmol), 1,3,5-(HO) $_3\text{C}_6\text{H}_3$ (0.12 g, 0.97 mmol), K_2CO_3 (0.81 g, 5.84 mmol) y éter corona 18-C-6 (0.077 g, 0.29 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de $G_1O_3A_6$, obteniéndose el derivado $G_2O_3A_{12}$, 14, como un aceite amarillento (0.98 g, 71%).

Método B) A partir de $\text{G}_2\text{O}_3(\text{SiCl}_2)_6$ (4.20 g, 3.09 mmol) y $\text{BrMg}(\text{C}_3\text{H}_5)$ (0.044 mol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1A_2 , se obtiene $G_2O_3A_{12}$ como un aceite amarillento (3.35 g, 76%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.08 (s, 9 H, *MeSi*), -0.04 (s, 18 H, *MeSi*), 0.57 (m, 30 H, SiCH_2), 1.30 (m, 12 H, CH_2), 1.41 (m, 6 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.52 (d, J = 7.9 Hz, 24 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.75 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 3.88 (t, J = 6.3 Hz, 6 H, OCH_2), 4.84 (m, 24 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.74 (m, 12 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.04 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.7 (*MeSi*), -5.1 (*MeSi*), 13.8 (SiCH_2), 17.9, 18.2 y 18.6 (CH_2), 20.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.5 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 33.3 (OCH_2CH_2), 67.6 (OCH_2), 93.7 (C_6H_3 (CH)), 113.1 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 134.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 160.9 (*i*- C_6H_3); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 0.1 (*MeSi*), 1.5 (*MeSi*). Anal. Calc. $\text{C}_{81}\text{H}_{150}\text{O}_3\text{Si}_9$ (1424.83 g/mol): C 68.28; H 10.61; Obt.: C 68.01; H 10.31.

Síntesis de $G_3O_3A_{24}$ (15)

Método A) Este compuesto se prepara a partir de BrG_3A_8 (1.50 g, 1.47 mmol), 1,3,5-(HO) $_3\text{C}_6\text{H}_3$ (0.061 g, 0.49 mmol), K_2CO_3 (0.41 g, 2.94 mmol) y éter corona 18-C-6 (0.039 g, 0.14 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de $G_1O_3A_6$, obteniéndose el derivado $G_3O_3A_{24}$, 15, como un aceite amarillento (0.92 g, 62%).

Método B) A partir de $\text{G}_3\text{O}_3(\text{SiCl}_2)_{12}$ (3.10 g, 1.10 mmol) y $\text{BrMg}(\text{C}_3\text{H}_5)$ (0.027 mol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1A_2 , se obtiene $G_3O_3A_{24}$ como un aceite amarillento (2.50 g, 77%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.10 (s, 18 H, *MeSi*), -0.07 (s, 9 H, *MeSi*), -0.04 (s, 36 H, *MeSi*), 0.55 (m, 78 H, SiCH_2), 1.31 (m, 42 H, CH_2), 1.52 (d, J = 7.9 Hz, 48 H, CH_2CHCH_2), 1.75 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 3.88 (t, J = 6.3 Hz, 6 H, OCH_2), 4.84 (m, 48 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.74 (m, 24 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.04 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.7 (*MeSi*), -5.0 (*MeSi*), 13.9 (CH_2Si), 17.9, 18.2, 18.5, 18.8, 18.9 (CH_2), 20.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 21.5 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 33.3 (OCH_2CH_2), 67.7 (OCH_2), 93.6 (C_6H_3 (CH)), 113.0 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 134.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 160.9 (*i*- C_6H_3); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ 0.1 (*MeSi*), 0.9 (*MeSi*), 1.7 (*MeSi*). Anal. Calc. $\text{C}_{165}\text{H}_{318}\text{O}_3\text{Si}_{21}$ (2940.08 g/mol): C 67.41; H 10.90; Obt.: C 66.56; H 10.87.

55 Síntesis de $G_1O_3H_6$ (16)

Este compuesto se puede preparar en un proceso en dos etapas a partir de $G_1O_3A_6$, 13. La primera etapa consiste en la hidrosililación de 13 (1.01 g, 1.51 mmol) con HSiMe_2Cl (1.46 g, 0.015 mol) y catalizador de Kardstedt (3% mol), obteniéndose el dendrímero con enlaces Si-Cl terminales $G_1O_3(\text{SiCl})_6$ como un aceite amarillo pálido (1.77 g, 95%). $G_1O_3(\text{SiCl})_6$ es sensible a la humedad y debe almacenarse bajo atmósfera inerte. La reacción de $G_1O_3(\text{SiCl})_6$ (1.77 g, 1.43 mmol) con LiAlH_4 (6.45 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG_1H_2 , da lugar al compuesto $G_1O_3H_6$, 16, como un aceite incoloro (1.00 g, 68%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ -0.08 (s, 9 H, *MeSi*), 0.04 (d, J = 4.2 Hz, 36 H, *Me}_2\text{SiH}*), 0.55 (m, 18 H, SiCH_2), 0.63 (m, 12 H, CH_2SiH), 1.25 (m, 18 H, CH_2), 1.77 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 3.82 (m, 6 H, *SiH*), 3.88 (t, J = 6.6 Hz, 6 H, OCH_2), 6.04 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ ^1H } (CDCl_3): δ -5.1 (*MeSi*), -4.4 (*Me}_2\text{SiH}*), 13.7 (SiCH_2), 18.0, 18.8 y 18.9 (CH_2), 20.5 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.2 (OCH_2CH_2), 67.6 (OCH_2), 93.8 (C_6H_3 (CH)), 161.0 (*i*- C_6H_3); ^{29}Si -RMN (CDCl_3): δ -14.0

ES 2 365 685 A1

(Me₂SiH), 1.9 (MeSi). Anal. Calc. C₅₁H₁₁₄O₃Si₉ (1028.22 g/mol): C 59.57; H 11.18; Obt.: C 59.89; H 11.53.

Síntesis de G₂O₃H₁₂ (17)

5

Este compuesto se puede preparar en un proceso en dos etapas a partir de G₂O₃A₁₂, 14. La primera etapa consiste en la hidrosililación de 14 (2.00 g, 1.40 mmol) con HSiMe₂Cl (2.71 g, 0.029 mol) y catalizador de Kardsted (3% mol), obteniéndose el dendrímero con enlaces Si-Cl terminales G₂O₃(SiCl)₁₂ como un aceite amarillo pálido (3.41 g, 95%). G₂O₃(SiCl)₁₂ es sensible a la humedad y debe almacenarse bajo atmósfera inerte. La reacción de G₂O₃(SiCl)₁₂ (1.45

10

g, 0.57 mmol) con LiAlH₄ (5.10 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG₁H₂, da lugar al compuesto G₂O₃H₁₂, 17, como un aceite incoloro (0.80 g, 66%).

¹H-RMN (CDCl₃): δ -0.10 (s, 18 H, MeSi), -0.08 (s, 9 H, MeSi), 0.03 (d, J = 4.2 Hz, 72 H, Me₂SiH), 0.55 (m, 54 H, SiCH₂), 0.63 (m, 24 H, CH₂SiH), 1.35 (m, 42 H, CH₂), 1.77 (m, 6 H, OCH₂CH₂), 3.82 (m, 12 H, SiH), 3.88 (t, J = 6.6 Hz, 6 H, OCH₂), 6.04 (s, 3 H, C₆H₃); ¹³C-RMN{¹H} (CDCl₃): δ -5.1 (MeSi), -5.0 (MeSi), -4.4 (Me₂SiH), 13.9 (SiCH₂), 18.2, 18.5, 18.8 y 19.0 (CH₂), 20.5 (OCH₂CH₂CH₂), 33.3 (OCH₂CH₂), 67.7 (OCH₂), 93.7 (C₆H₃ (CH)), 160.9 (i-C₆H₃); ²⁹Si-RMN (CDCl₃): δ -14.2 (Me₂SiH), 0.8 (MeSi), 1.9 (MeSi). Anal. Calc. C₁₀₅H₂₄₆O₃Si₂₁ (2146.87 g/mol): C 58.74; H 11.55; Obt.: C 57.89; H 11.53.

15

20

Síntesis de G₃O₃H₂₄ (18)

Este compuesto se puede preparar en un proceso en dos etapas a partir de G₃O₃A₂₄, 18. La primera etapa consiste en la hidrosililación de 15 (2.50 g, 0.85 mmol) con HSiMe₂Cl (3.28 g, 0.034 mol) y catalizador de Kardsted (3% mol), obteniéndose el dendrímero con enlaces Si-Cl terminales G₃O₃(SiCl)₂₄ como un aceite amarillo pálido (4.21 g, 95%). G₃O₃(SiCl)₂₄ es sensible a la humedad y debe almacenarse bajo atmósfera inerte. La reacción de G₃O₃(SiCl)₂₄ (3.00

25

g, 0.58 mmol) con LiAlH₄ (0.010 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de BrG₁H₂, da lugar al compuesto G₃O₃H₂₄, 18, como un aceite incoloro (1.64 g, 65%).

¹H-RMN (CDCl₃): δ -0.10 (s. a., 54 H, MeSi), 0.03 (d, J = 4.2 Hz, 144 H, Me₂SiH), 0.58 (m, 174 H, SiCH₂), 1.35 (m, 90 H, CH₂), 1.77 (m, 6 H, OCH₂CH₂), 3.82 (m, 30 H, SiH y OCH₂), 6.03 (s, 3 H, C₆H₃); ¹³C-RMN{¹H} (CDCl₃): δ -5.0 (MeSi), -4.3 (Me₂SiH), 13.9 (CH₂Si), 18.2, 18.5, 18.8, 18.9 (CH₂), 20.6 (OCH₂CH₂CH₂), 33.2 (OCH₂CH₂), 67.7 (OCH₂), 94.5 (C₆H₃ (CH)), 160.9 (i-C₆H₃); ²⁹Si-RMN (CDCl₃): δ -14.2 (Me₂SiH), 1.0, 1.2 (MeSi). Anal. Calc. C₂₁₃H₅₁₀O₃Si₄₅ (4384.17 g/mol): C 58.35; H 11.73; Obt.: C 58.85; H 10.97.

30

35

C. Funcionalización de la periferia de los dendrímeros obtenidos en el apartado anterior con grupos aniónicos de diferente naturaleza, como por ejemplo, carboxilato, sulfonato o fosfonato

Una vez sintetizados los dendrímeros descritos en el apartado anterior, la obtención de dendrímeros con grupos aniónicos en la superficie puede abordarse de formas diversas dependiendo en primer lugar de las funcionalidades presentes en el dendrímero de partida y en segundo lugar de la naturaleza de los grupos aniónicos que se deseen en el dendrímero final.

40

45

Preparación de dendrímeros aniónicos con grupos carboxilato terminales

Los dendrímeros con grupos éster terminales preparados por los métodos A, B y C descritos anteriormente se pueden transformar en los dendrímeros aniónicos con grupos carboxilato terminales 25-27 por tratamiento con NaOH en una mezcla de MeOH y agua (Esquema 9).

50

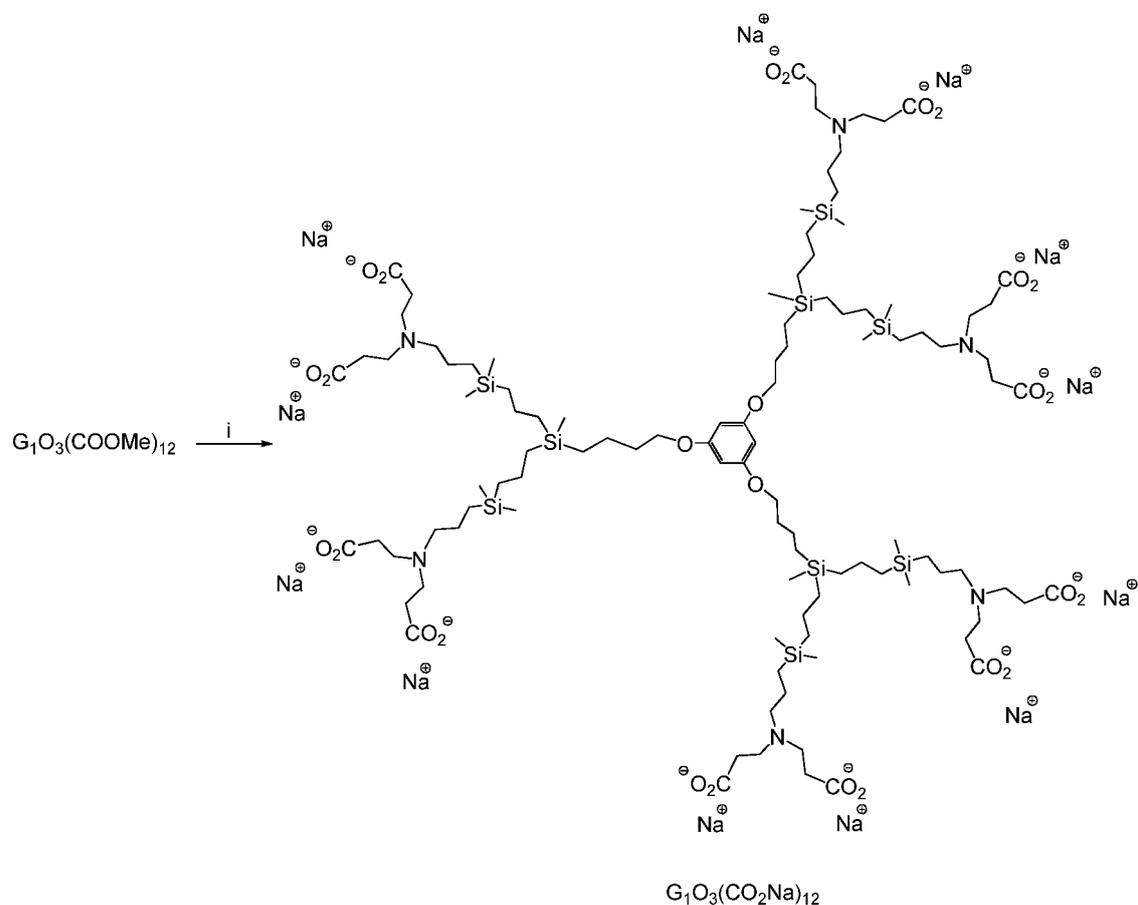
Siguiendo los pasos anteriores se obtiene el dendrímero de primera generación G₁O₃(COONa)₁₂ (25) que poseen 12 grupos aniónicos terminales, el dendrímero G₂O₃(COONa)₂₄ (26) con 24 grupos aniónicos y el dendrímero G₃O₃(COONa)₄₈ (27) que presenta 48 grupos carboxilato terminales. El esquema 9 describe la síntesis del dendrímero de primera generación.

55

60

65

Esquema 9



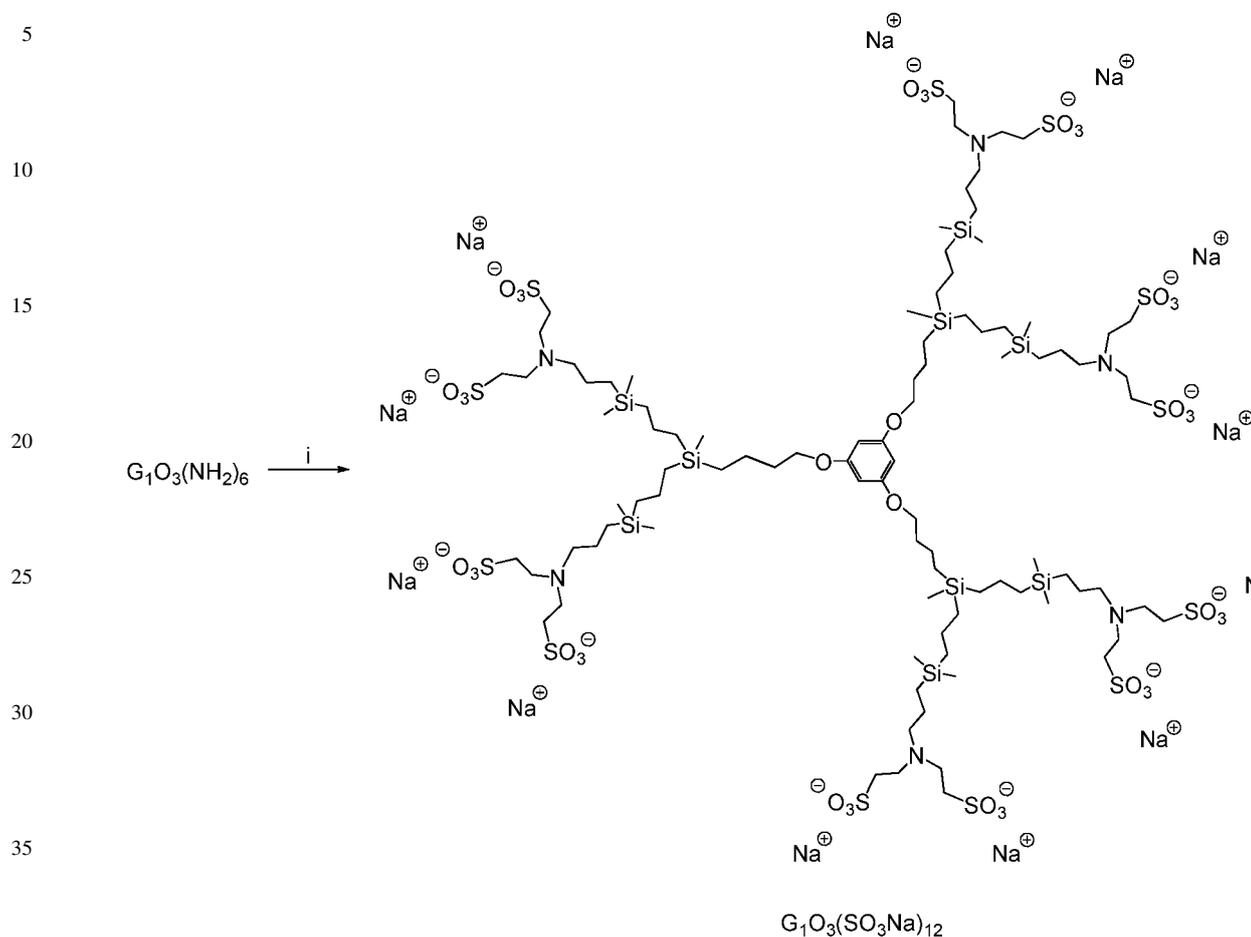
Donde: i) NaOH.

Preparación de dendrímeros aniónicos con grupos sulfonato terminales

La obtención de dendrímeros aniónicos con grupos sulfonato terminales se lleva a cabo fundamentalmente utilizando como productos de partida los dendrímeros que contienen grupos $-NH_2$ en su superficie, 22-24, descritos en el apartado anterior y a partir de ellos llevar a cabo una adición de Michael de vinil sulfonato de sodio para dar lugar a la síntesis de dendrímeros aniónicos con grupos sulfonato periféricos.

De esta forma se han preparado los dendrímeros aniónicos $G_1O_3(SO_3Na)_{12}$ (28), $G_2O_3(SO_3Na)_{24}$ (29) y $G_3O_3(SO_3Na)_{48}$ (30) que poseen 12, 24 y 48 grupos sulfonato terminales respectivamente. El esquema 10 describe la síntesis del dendrímero de primera generación.

Esquema 10



Donde: i) $C_2H_3SO_3Na$.

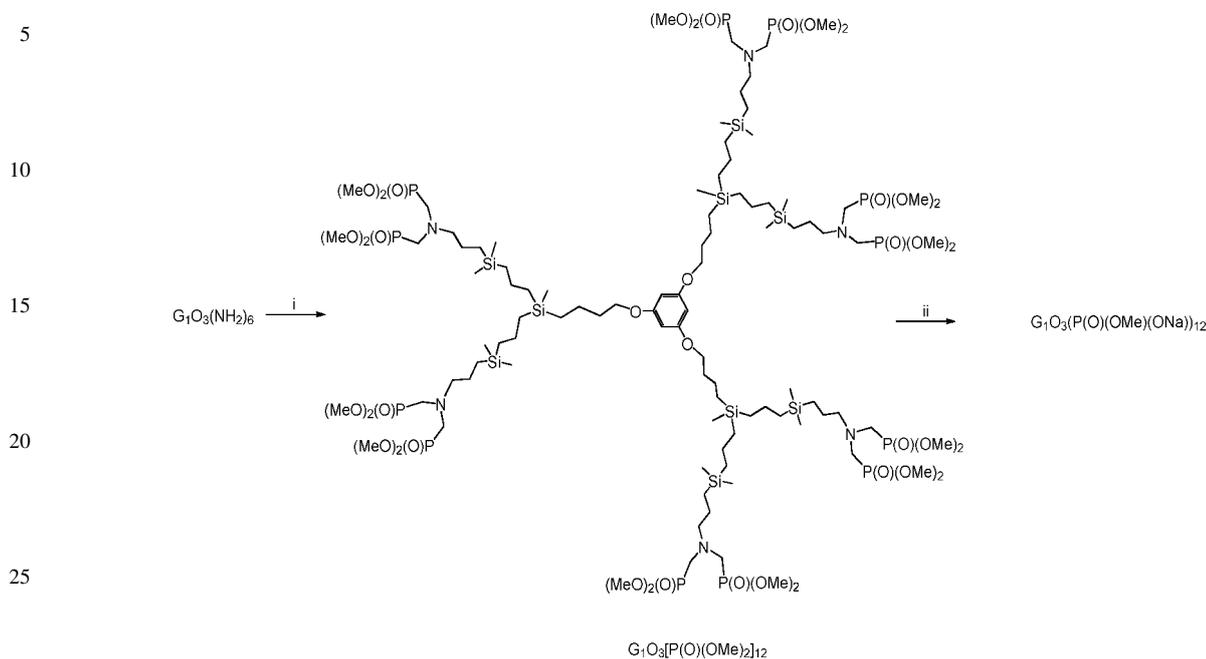
Preparación de dendrímeros aniónicos con grupos fosfonato terminales

La obtención de dendrímeros aniónicos con grupos fosfonato terminales se lleva a cabo también utilizando como productos de partida dendrímeros que contienen grupos $-NH_2$ en su superficie, 22-24, y a partir de ellos se lleva a cabo una reacción en dos pasos, primero 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 a dendrímeros con grupos terminales que presentan unidades $-PO(OMe)_2$. Por último, la reacción de los dendrímeros anteriores con NaOH transforma los grupos periféricos $-PO(OMe)_2$ en grupos aniónicos $-PO(ONa)_2$.

De esta forma hemos preparado los dendrímeros aniónicos $G_1O_3(PO(ONa)_2)_{12}$ (31), $G_2O_3(PO(ONa)_2)_{24}$ (32) y $G_3O_3(PO(ONa)_2)_{48}$ (33) que poseen 12, 24 y 48 grupos fosfonato terminales respectivamente. El esquema 11 describe la síntesis del dendrímero de primera generación.

ES 2 365 685 A1

Esquema 11



Donde: i) CH_2O , $HP(O)(OMe)_2$; ii) $NaOH$.

Los dendrímeros descritos, 22-33, 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, según se detalla a continuación:

Síntesis de $G_1O_3(NH_2)_6$ (22)

Una ampolla con llave de teflón que contiene $G_1O_3H_6$ (0.50 g, 0.49 mmol), alilamina, $C_3H_5NH_2$ (0.37 g, 6.42 mmol) y catalizador de Kardsted (3% mol) en THF (3 mL) se calienta a $120^\circ C$ durante 48 h. A continuación la disolución se lleva a sequedad, se añade CH_2Cl_2 (10 mL) y la disolución se filtra a través de carbono activo. Se evapora el disolvente y se obtiene $G_1O_3(NH_2)_6$, 22, como un aceite amarillo pálido (0.59 g, 89%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ -0.09 (s, 9 H, $MeSi$), -0.06 (s, 36 H, Me_2SiH), 0.48 (m, 18 H, $SiCH_2$), 0.54 (m, 36 H, $SiCH_2$), 1.29 (m, 18 H, CH_2), 1.40 (m, 24 H, CH_2), 1.74 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 2.63 (t, $J = 7.1$ Hz, 12 H, CH_2N), 3.87 (t, $J = 6.3$ Hz, 6 H, OCH_2), 6.04 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ 1H } ($CDCl_3$): δ -5.1 ($MeSi$), -3.3 (Me_2Si), 12.3 ($NCH_2CH_2CH_2$), 13.8 ($SiCH_2$), 18.4, 18.6 y 20.0 (CH_2), 20.5 ($OCH_2CH_2CH_2$), 33.2 (OCH_2CH_2), 45.6 (NCH_2), 67.6 (OCH_2), 93.7 (C_6H_3 (CH)), 160.9 ($i-C_6H_3$); ^{29}Si -RMN ($CDCl_3$): δ 1.8 ($MeSi$), 2.1 (Me_2Si). Anal. Calc. $C_{69}H_{156}N_6O_3Si_9$ (1370.78 g/mol): C 60.46, H 11.47, N 6.13; Obt.: C 61.11, H 11.26, N 5.86.

Síntesis de $G_2O_3(NH_2)_{12}$ (23)

El dendrímero de segunda generación con 12 grupos $-NH_2$ terminales, 23, se prepara por un procedimiento similar al descrito para el compuesto 22, partiendo de $G_2O_3H_{12}$ (0.50 g, 0.23 mmol), $C_3H_5NH_2$ (0.32 g, 5.59 mmol) y catalizador de Kardsted (3% mol). De esta forma se obtiene $G_2O_3(NH_2)_{12}$ como un aceite amarillento (0.47 g, 72%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ -0.11 (s, 18 H, $MeSi$), -0.09 (s, 9 H, $MeSi$), -0.07 (s, 72 H, Me_2SiH), 0.43 (m, 26 H, CH_2), 0.54 (m, 72 H, CH_2), 1.21 (s, 24 H, NH_2), 1.28 (m, 36 H, CH_2), 1.38 (m, 30 H), 1.74 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 2.63 (t, $J = 7.1$ Hz, 24 H, CH_2N), 3.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 6 H, OCH_2), 6.04 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ 1H } ($CDCl_3$): δ -4.9 ($MeSi$), -4.7 ($MeSi$), -3.3 (Me_2Si), 12.3 ($SiCH_2$), 13.8 ($SiCH_2$), 18.4, 18.6, 18.8, 20.0, 20.1 (CH_2), 20.6 ($OCH_2CH_2CH_2$), 28.3 (CH_2CH_2N), 33.3 (OCH_2CH_2), 45.7 (CH_2N), 67.6 (OCH_2), 93.7 (C_6H_3 (CH)), 160.9 ($i-C_6H_3$); ^{29}Si -RMN ($CDCl_3$): δ 0.9 ($MeSi$), 1.7 ($MeSi$), 1.9 (Me_2Si). Anal. Calc. $C_{141}H_{330}N_{12}O_3Si_{21}$ (2832.00 g/mol): C 59.80; H 11.75; N 5.94; Obt.: C 60.92; H 10.03; N 5.44.

ES 2 365 685 A1

Síntesis de $G_3O3(NH_2)_{24}$ (24)

El dendrímero de tercera generación con 24 grupos $-NH_2$ terminales, 24, se prepara por un procedimiento similar al descrito para el compuesto 22, partiendo de G_3O3H_{24} (1.00 g, 0.23 mmol), $C_3H_5NH_2$ (0.62 g, 0.011 mol) y catalizador de Kardsted (3% mol). De esta forma se obtiene $G_3O3(NH_2)_{24}$ como un aceite amarillento (0.48 g, 36%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ -0.11 (s.a., 54 H, *MeSi*), -0.07 (s, 144 H, *Me_2Si*), 0.52 (m, 222 H, *SiCH_2*), 1.21-1.50 (m, 186 H, NH_2 , CH_2), 1.74 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 2.63 (t, $J = 7.1$ Hz, 48 H, CH_2N), 3.85 (t, $J = 6.3$ Hz, 6 H, OCH_2), 6.04 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ 1H } ($CDCl_3$): δ -4.9 (*MeSi*), -3.3 (*Me_2Si*), 12.8 ($CH_2CH_2CH_2N$), 14.1 (*SiCH_2*), 17.9-20.6 (CH_2), 27.1 (CH_2CH_2N), 33.4 (OCH_2CH_2), 45.1 (CH_2N), 67.8 (OCH_2), 93.7 (C_6H_3 (*CH*)), 161.0 (*i-C_6H_3*). Anal. Calc. $C_{285}H_{678}N_{24}O_3Si_{45}$ (5754.44 g/mol): C 59.49; H 11.88; N 5.84; Obt.: C 58.50; H 11.67; N 5.34.

Síntesis de $G_1O3(COOMe)_{12}$ (19)

Método A) Este compuesto se prepara a partir de $BrG_1(CO_2Me)_4$ (0.55 g, 0.65 mmol), $1,3,5-(HO)_3C_6H_3$ (0.027 g, 0.21 mmol), K_2CO_3 (0.18 g, 1.30 mmol) y éter corona 18-C-6 (0.017 g, 0.06 mmol) siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de G_1O3A_6 , obteniéndose $G_1O3(CO_2Me)_{12}$ como un aceite amarillento (0.36 g, 68%).

Método B) A partir de G_1O3H_6 (0.20 g, 0.19 mmol) y $C_3H_5N(C_2H_4CO_2Me)_2$ (0.28 g, 1.18 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de $BrG_1(CO_2Me)_4$, se obtiene $G_1O3(CO_2Me)_{12}$ como un aceite amarillento después de lavar con hexano (2 x 10 mL) (0.42 g, 89%).

Método C) Una disolución de $G_1O3(NH_2)_6$ (0.25 g, 0.18 mmol) y acrilato de metilo $C_2H_3CO_2Me$ (0.28 g, 3.28 mmol) en CH_3OH (5 mL) se agita a temperatura ambiente durante 16 h. A continuación, la disolución se filtra y se evaporan los volátiles y el aceite restante se lava con hexano (2 x 10 mL) para obtener $G_1O3(CO_2Me)_{12}$, 19, como un aceite amarillento (0.39 g, 90%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ -0.09 (s, 9 H, *MeSi*), -0.07 (s, 36 H, *Me_2Si*), 0.40 (m, 12 H, *SiCH_2*), 0.53 (m, 30 H, *SiCH_2*), 1.27 (m, 12 H, CH_2), 1.36 (m, 18 H, CH_2), 1.75 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 2.39 (m, 12 H, CH_2N), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 24 H, CH_2N), 2.74 (t, $J = 7.3$ Hz, 24 H, CH_2CO), 3.64 (s, 36 H, *OMe*), 3.87 (t, $J = 6.6$ Hz, 6 H, OCH_2), 6.03 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ 1H } ($CDCl_3$): δ -5.1 (*MeSi*), -3.3 (*Me_2Si*), 12.8 (*SiCH_2*), 13.9 (*SiCH_2*), 18.4, 18.6 y 20.1 (CH_2), 20.5 ($OCH_2CH_2CH_2$), 21.5 (CH_2CH_2N), 32.5 (CH_2CO), 33.7 (OCH_2CH_2), 49.2 (CH_2N), 51.6 (*OMe*), 57.5 (CH_2N), 67.7 (OCH_2), 93.6 (C_6H_3 (*CH*)), 160.9 (*i-C_6H_3*), 173.1 (*CO*); ^{29}Si -RMN ($CDCl_3$): δ 1.6 (*MeSi*), 1.9 (*Me_2Si*). Anal. Calc. $C_{117}H_{228}N_6O_{27}Si_9$ (2403.86 g/mol): C 58.46, H 9.56, N 3.50; Obt.: C 58.09, H 9.13, N 3.02.

Síntesis de $G_2O3(COOMe)_{24}$ (20)

La síntesis del compuesto 20, se puede llevar a cabo por procedimientos similares a los descritos para el derivado 19. Por ejemplo, a partir de G_2O3H_{12} (0.35 g, 0.16 mmol) y $C_3H_5N(C_2H_4CO_2Me)_2$ (0.46 g, 2.00 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de $BrG_1(CO_2Me)_4$, se obtiene $G_2O3(CO_2Me)_{24}$ como un aceite amarillento (0.70 g, 88%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ -0.10 (s, 27 H, *MeSi*), -0.07 (s, 72 H, *Me_2Si*), 0.39 (m, 24 H, *SiCH_2*), 0.53 (m, 78 H, *SiCH_2*), 1.30 (m, 66 H, CH_2), 1.75 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 2.39 (m, 24 H, CH_2N), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 48 H, CH_2N), 2.74 (t, $J = 7.3$ Hz, 48 H, CH_2CO), 3.64 (s, 72 H, *OMe*), 3.87 (t, $J = 6.6$ Hz, 6 H, OCH_2), 6.03 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ 1H } ($CDCl_3$): δ -5.1 (*MeSi*), -3.3 (*Me_2Si*), 12.8 (*SiCH_2*), 13.9 (*SiCH_2*), 18.4, 18.8, 19.0 y 20.1, 20.5, 21.5 (CH_2), 32.5 (NCH_2), 33.7 (OCH_2CH_2), 49.2 (CH_2CO), 51.2 (*OMe*), 57.5 (CH_2N), 67.7 (OCH_2), 93.6 (C_6H_3 (*CH*)), 160.9 (*i-C_6H_3*), 173.1 (*CO*); ^{29}Si -RMN ($CDCl_3$): δ 0.9 (*MeSi*), 1.7 (*MeSi*), 1.9 (*Me_2Si*).

Síntesis de $G_3O3(COOMe)_{48}$ (21)

La síntesis del compuesto 21, se puede llevar a cabo por procedimientos similares a los descritos para el derivado 19. Por ejemplo, a partir de G_3O3H_{24} (0.32 g, 0.075 mmol) y $C_3H_5N(C_2H_4CO_2Me)_2$ (0.41 g, 1.80 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de $BrG_1(CO_2Me)_4$, se obtiene $G_3O3(CO_2Me)_{48}$ como un aceite amarillento (0.63 g, 88%).

1H -RMN ($CDCl_3$): δ -0.12 (s.a., 54 H, *MeSi*), -0.07 (s, 144 H, *Me_2Si*), 0.38 (m, 48 H, *SiCH_2*), 0.52 (m, 174 H, *SiCH_2*), 1.26 (m, 84 H, CH_2), 1.38 (m, 54 H, CH_2), 1.75 (m, 6 H, OCH_2CH_2), 2.45 (m, 144 H, CH_2N), 2.74 (s.a., 98 H, CH_2CO), 3.63 (s, 144 H, *OMe*), 3.87 (s.a., 6 H, OCH_2), 6.00 (s, 3 H, C_6H_3); ^{13}C -RMN{ 1H } ($CDCl_3$): δ -4.8 (*MeSi*), -3.3 (*Me_2Si*), 12.8 (*SiCH_2*), 14.1 (*SiCH_2*), 18.4-20.5 (CH_2), 32.3 (NCH_2), 33.6 (OCH_2CH_2), 49.2 (CH_2CO), 51.6 (*OMe*), 57.4 (CH_2N), 67.8 (OCH_2), 93.6 (C_6H_3 (*CH*)), 160.9 (*i-C_6H_3*), 172.8 (*CO*); ^{29}Si -RMN ($CDCl_3$): δ -0.9, 1.8 (*MeSi*), 1.9 (*Me_2Si*). Anal. Calc. $C_{477}H_{966}N_{24}O_{99}Si_{45}$ (9886.72 g/mol): C 57.95; H 9.85; N 3.40; Obt.: C 57.09; H 10.10; N 3.63.

ES 2 365 685 A1

Síntesis de $G_1O_3(COONa)_{12}$ (25)

Una disolución de NaOH (0.048 g, 1.19 mmol) en H_2O (1 mL) se añade a una disolución de $G_1O_3(COOMe)_{12}$ (0.20 g, 0.083 mmol) en MeOH (3 mL) y se agita la reacción durante 24 h. A continuación se evaporan los disolventes, se extrae con MeOH (5 mL) y se lleva a sequedad. El residuo se lava con Et_2O (2 x 10 mL) obteniéndose $G_1O_3(COONa)_{12}$, 25, como un sólido blanco (0.17 g, 82%).

1H -RMN (D_2O): δ -0.26 (s, 45 H, MeSi), 0.19 (m, 18 H, SiCH₂), 0.32 (m, 24 H, SiCH₂), 1.19 (m, 30 H, CH₂), 1.45 (m, 6 H, OCH₂CH₂), 2.07 (m, 36 H, CH₂N), 2.47 (m, 24 H, CH₂CO), 3.50 (s, 6 H, OCH₂), 5.70 (s, 3 H, C₆H₃); ^{13}C -RMN{ 1H } (D_2O): δ -4.8 (MeSi), -3.5 (Me₂Si), 12.8 (SiCH₂), 13.7 (SiCH₂), 18.4-20.2 (CH₂), 32.9 (OCH₂CH₂), 34.2 (CH₂N), 49.4 (CH₂CO), 57.0 (CH₂N), 67.1 (OCH₂), 93.7 (C₆H₃ (CH)), 160.5 (*i*-C₆H₃), 181.1 (CO); ^{29}Si -RMN (D_2O): δ 1.6 (MeSi).

Síntesis de $G_2O_3(COONa)_{24}$ (26)

A partir de $G_2O_3(COOMe)_{24}$ (0.35 g, 0.071 mmol) y NaOH (0.046 g, 1.16 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 25, se obtiene $G_2O_3(COONa)_{24}$, 26, como un sólido blanco (0.29 g, 82%).

1H -RMN (D_2O): δ -0.21 (s, 99 H, MeSi y Me₂Si), 0.22 (m, 30 H, SiCH₂), 0.38 (m, 72 H, SiCH₂), 1.17 (m, 66 H, CH₂), 1.58 (m, 6 H, OCH₂CH₂), 2.10 (m, 48 H, CH₂N), 2.19 (m, 24 H, CH₂N), 2.51 (m, 48 H, CH₂CO), 3.42 (s, 6 H, OCH₂), 5.64 (s, 3 H, C₆H₃); ^{13}C -RMN{ 1H } (D_2O): δ -4.5 (MeSi), -3.4 (Me₂Si), 13.0 (SiCH₂), 13.7 (SiCH₂), 18.4-20.3 (CH₂), 32.9 (OCH₂CH₂), 34.3 (NCH₂), 49.6 (CH₂CO), 57.2 (NCH₂), 67.2 (OCH₂), 93.8 (C₆H₃ (CH)), 168.4 (*i*-C₆H₃), 181.2 (CO); ^{29}Si -RMN (D_2O): δ 1.7 (MeSi y Me₂Si).

Síntesis de $G_3O_3(COONa)_{48}$ (27)

A partir de $G_3O_3(COOMe)_{48}$ (0.30 g, 0.030 mmol) y NaOH (0.069 g, 1.74 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 25, se obtiene $G_3O_3(COONa)_{48}$, 27, como un sólido blanco (0.24 g, 79%).

1H -RMN (D_2O): δ -0.21 (s. a., 207 H, MeSi y Me₂Si), 0.20-0.40 (m, 222 H, SiCH₂), 1.16 (m, 138 H, CH₂), 1.58 (m, 6 H, OCH₂CH₂), 2.09 (m, 144 H, CH₂N), 2.49 (m, 96 H, CH₂CO), 3.42 (s, 6 H, OCH₂), 5.64 (s, 3 H, C₆H₃); ^{13}C -RMN{ 1H } (D_2O): δ -4.5 (MeSi), -3.4 (Me₂Si), 12.9 (SiCH₂), 18.0-21.0 (CH₂), 34.2 (NCH₂), 49.4 (CH₂CO), 57.2 (NCH₂), 181.1 (CO), no se observan los átomos de Carbono OCH₂CH₂CH₂CH₂ ni C₆H₃.

Síntesis de $G_1O_3(SO_3Na)_{12}$ (28)

Una ampolla con llave de teflón que contiene $G_1O_3(NH_2)_6$ (0.25 g, 0.18 mmol) y $C_2H_3SO_3Na$ (0.28 g, 2.18 mmol) en una mezcla EtOH/ H_2O (5 mL/10 mL) se calienta a 120°C durante 72 h. A continuación, se evaporan los volátiles y el residuo se lava primero con MeOH (2 x 10 mL) y Et_2O (2 x 15 mL), obteniéndose $G_1O_3(SO_3Na)_{12}$, 28, como un sólido blanco (0.30 g, 57%).

1H -RMN (D_2O): δ -0.18 (s, 45 H, MeSi), 0.26 (m, 18 H, SiCH₂), 0.39 (m, 24 H, SiCH₂), 1.19 (m, 18 H, CH₂), 1.29 (m, 12 H, CH₂), 1.47 (m, 6 H, OCH₂CH₂), 2.26 (m, 12 H, CH₂N), 2.77 (m, 24 H, CH₂N), 2.86 (m, 24 H, CH₂S), 3.59 (s, 6 H, OCH₂), 5.78 (s, 3 H, C₆H₃); ^{13}C -RMN{ 1H } (D_2O): δ -4.8 (MeSi), -3.5 (Me₂Si), 12.7 (SiCH₂), 13.7 (SiCH₂), 18.4, 19.9 y 20.2 (CH₂), 32.7 (OCH₂CH₂), 47.1 (CH₂S), 47.8 (CH₂N), 57.1 (CH₂N), 67.2 (OCH₂), 93.7 (C₆H₃ (CH)), 160.6 (*i*-C₆H₃); ^{29}Si -RMN (D_2O): δ 1.9 (MeSi).

Síntesis de $G_2O_3(SO_3Na)_{24}$ (29)

A partir de $G_2O_3(NH_2)_{12}$ (0.20 g, 0.071 mmol) y $C_2H_3SO_3Na$ (0.13 g, 0.97 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 28, se obtiene $G_2O_3(SO_3Na)_{24}$, 29, como un sólido blanco (0.25 g, 60%).

1H -RMN (D_2O): δ -0.18 (s, 99 H, MeSi y Me₂Si), 0.26 (m, 30 H, SiCH₂), 0.41 (m, 72 H, SiCH₂), 1.25 (m, 66 H, CH₂), 1.60 (m, 6 H, OCH₂CH₂), 2.27 (m, 24 H, CH₂N), 2.75 (m, 48 H, CH₂N), 2.86 (m, 48 H, CH₂S), 3.45 (s, 6 H, OCH₂), 5.78 (s, 3 H, C₆H₃); ^{13}C -RMN{ 1H } (D_2O): δ -4.6 (MeSi), -3.4 (Me₂Si), 12.7 (SiCH₂), 13.7 (SiCH₂), 18.5-20.5 (CH₂), 33.0 (OCH₂CH₂), 47.0 (NCH₂), 47.9 (CH₂S), 57.2 (NCH₂), 66.8 (OCH₂), 93.6 (C₆H₃ (CH)), 160.6 (*i*-C₆H₃); ^{29}Si -RMN (D_2O): δ 1.9 (MeSi y Me₂Si).

Síntesis de $G_3O_3(SO_3Na)_{48}$ (30)

A partir de $G_3O_3(NH_2)_{24}$ (0.20 g, 0.035 mmol) y $C_2H_3SO_3Na$ (0.12 g, 0.92 mmol), siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 28, se obtiene $G_3O_3(SO_3Na)_{48}$, 30, como un sólido blanco (0.26 g, 63%).

ES 2 365 685 A1

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O): δ -0.13 (s. a., 207 H, MeSi y Me_2Si), 0.41 (s. a., 222 H, SiCH_2), 1.15-1.60 (s. a., 144 H, CH_2), 2.40 (s. a., 48 H, CH_2N), 2.90 (s. a., 192 H, CH_2N y CH_2S), no se observan las señales correspondientes a OCH_2 y C_6H_3 ; $^{13}\text{C-RMN}\{^1\text{H}\}$ (D_2O): δ -4.4 (MeSi), -3.3 (Me_2Si), 12.5 (SiCH_2), 18.0-21.0 (CH_2), 46.7 (NCH_2), 48.5 (CH_2S), 57.2 (NCH_2), no se observan los átomos de Carbono $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ni C_6H_3 .

5

Actividad biológica de los dendrímeros

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 y linfoides), en diferentes poblaciones fisiológicas (células mononucleares de sangre periférica, hematíes, macrófagos y células dendríticas) y en cultivos bacterianos.

15 Materiales y métodos

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 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).

25

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 $\frac{1}{2}$ 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 cultivo completo.

30

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.

35

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, y se incluyó β -mercaptoetanol (MERCK[®]) a 50 μM para eliminar las ribonucleasas liberadas durante la lisis celular. 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[®].

45

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 incluyó β -mercaptoetanol (MERCK[®]) a 50 μM para eliminar las ribonucleasas liberadas durante la lisis celular. 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[®].

55

2. Dendrímeros

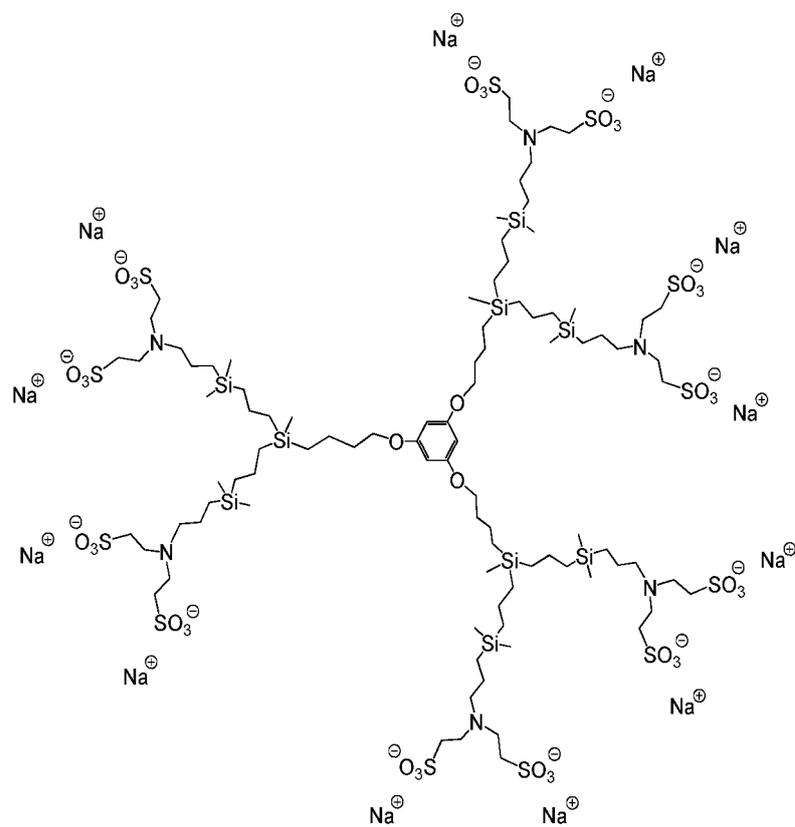
La síntesis de los dendrímeros carboxilano con terminaciones sulfonato (G1O3SF12, G2O3SF24 y G2O3SF48) fue la descrita en el apartado anterior.

60

Los dendrímeros G1O3SF12, G2O3SF24 y G2O3SF48 corresponden a $\text{G}_1\text{O}_3(\text{SO}_3\text{Na})_{12}$ (28), $\text{G}_2\text{O}_3(\text{SO}_3\text{Na})_{24}$ (29) y $\text{G}_3\text{O}_3(\text{SO}_3\text{Na})_{48}$ (30) que poseen 12, 24 y 48 grupos sulfonato terminales. 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.

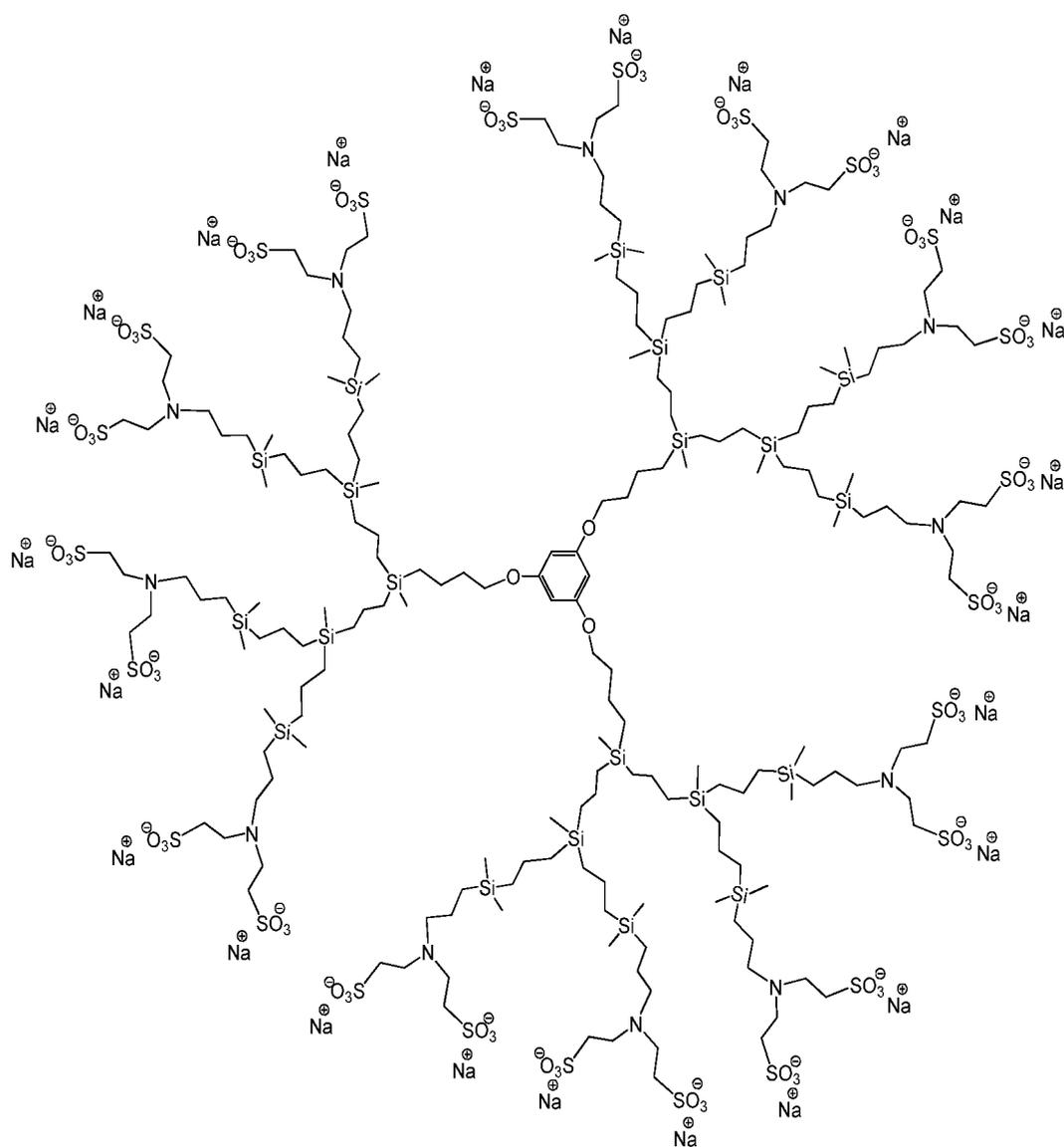
65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

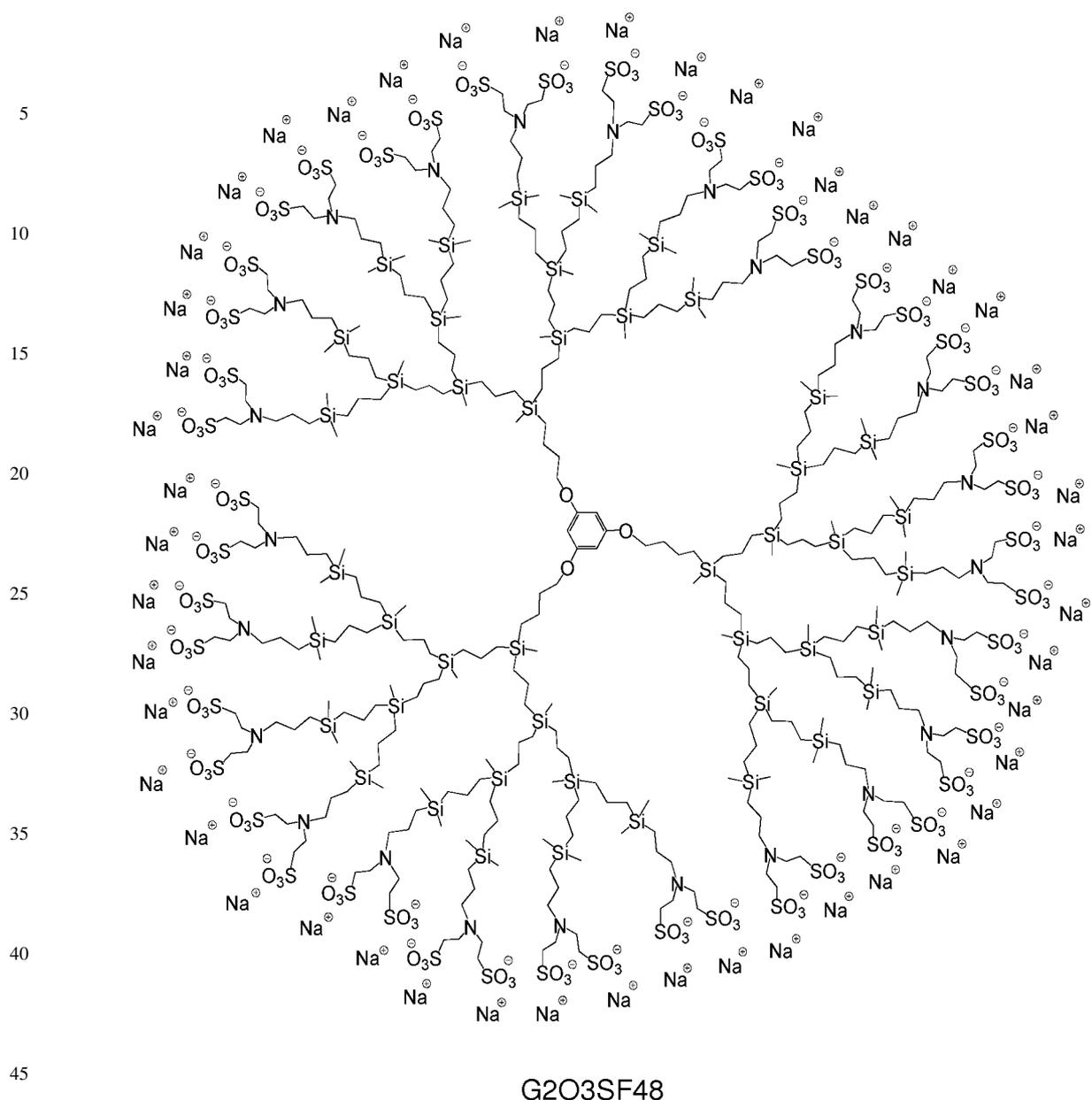


G103SF12

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



G2O3SF24



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.

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.

ES 2 365 685 A1

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 μ L de un medio de cultivo sin suero ni rojo fenol (Opti-MEM®). Además de los 200 μ L de Opti-MEM®, se añadieron 20 μ L 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 μ L 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 μ L de medio completo y se añadió el dendrímero en un volumen de 100 μ L, para obtener un volumen final en el pocillo de 200 μ L. Controles: 1. 200 μ L de medio completo sin células (background control); 2. 100 μ L de células + 100 μ L de medio completo; 3. 100 μ L de células + 100 μ L de tritón X-100 al 0,2%; 4. 100 μ L de células + 100 μ L 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 μ L de sobrenadante, con cuidado de no llevarse las células. Se añadió 100 μ L de mezcla de reacción preparada en el momento sobre los 100 μ L 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:

$$\text{Citotoxicidad(\%)} = (4 - 2)/(3 - 2) * 100$$

3.4 Ensayos de inhibición del VIH

3.4.1 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.

3.4.2. 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. INNOTEST™ HIV antigen mAB, Innogenetics®) y se establece la relación partículas infectivas por mL y μ g de virus por mL.

ES 2 365 685 A1

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 μm antes de la cuantificación.

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

Las CMSP se estimularon durante 48 horas con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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.

3.5. 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 (valores de resistencia de la monocapa $>300 \Omega \cdot \text{cm}^2$), 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, se recogió el sobrenadante de la cámara de la zona basolateral a las 24/48 horas. La concentración viral se cuantificó por ELISA.

3.6. Pre-tratamiento de CMSP

Se utilizaron CMSP estimuladas dispensadas en 2×10^5 células en 200 μL de medio completo en pocillos de placa p96 de fondo redondo. Para el experimento de pretratamiento, se trató con el dendrímero 1 hora antes de la infección a 50 ng de VIH-1_{NL4-3} y se infectó durante 3 horas en condiciones de cultivo. Tras este tiempo, se lavó dos veces con PBS y se incubó en condiciones de cultivo. La concentración viral a los 3 días se cuantificó por ELISA de p24.

3.7. Pre-tratamiento en CDi, CDm y macrófagos

Una vez diferenciadas las células, se lavaron con PBS dos veces y se dispensaron 2×10^5 CDi, 2×10^5 CDm y 10^5 macrófagos en 200 μL de medio completo en pocillos de p96 de fondo. El dendrímero se añadió una hora antes de la infección. Después de añadir las partículas virales (50 ng), se incubó en condiciones de cultivo y a las 3 horas, se retiró el sobrenadante y se lavó 4 veces con PBS. Se recogió sobrenadante a los 4 días. La concentración viral se cuantificó por ELISA.

3.8 Estudio en bacterias y hongos

3.8.1. *Staphylococcus aureus*. Cepas 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 (SigmaTM) durante toda la noche a 37°C antes de cada experimento.

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 utiliza 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 (Biowhittakermicroplate reader 2001, Innogenetics[®]. $\lambda=550 \text{ nm}$).

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 Biowhittakermicroplate reader 2001, Innogenetics[®]. $\lambda=450$ y referencia $\lambda=550 \text{ nm}$). El número de células, tratamiento con los dendrímeros y tiempo de exposición se describen en el experimento de biomasa.

ES 2 365 685 A1

3.8.2. *Candida albicans*. Cepa y condiciones de cultivo

Se utilizó el aislado clínico SC5314 (ATCC MYA-2876) para estudiar la capacidad de los dendrímeros como fungicidas. Las levaduras se crecieron en placas de YED agar (1% D-glucosa, 1% Difco extracto de levadura (BD Diagnostic Systems, USA) y 2% agar) durante toda la noche a 30° C antes de cada experimento.

Experimento de biomasa: El día del ensayo, una colonia aislada de levadura se creció en 15 mL de medio YED agar durante 5 h. Tras este tiempo, se contó el número de *C. albicans* y se dispensó 10⁵ candidas por punto (100 uL de medio YED agar en placa de 96 pocillos de fondo en U). Se añadieron diluciones seriadas de los dendrímeros evaluados hasta completar un volumen de 200 uL por punto. Se utilizó anfotericina B (Duchefa Biochemie) como control positivo de fungicida. La cantidad de biomasa formada 24 h después del tratamiento con el dendrímero, se cuantificó espectrofotométricamente con un lector de placas (Biowhittakermicroplate reader 2001, Innogenetics®. $\lambda=550$ nm).

Experimento de proliferación: Para evaluar la proliferación de *C. albicans* en presencia del dendrímero, se utilizó el kit de proliferación celular 3 h antes de cumplir las 24 h de tratamiento (Bromodeoxyuridine Cell Proliferation Assay, Chemicon International. Lectura en Biowhittakermicroplate reader 2001, Innogenetics®. $\lambda=450$ y referencia $\lambda=550$ nm), evaluándose de esta forma la incorporación de BrdU al ADN de nueva síntesis. El número de células, tratamiento con los dendrímeros y tiempo de exposición se describen en el experimento de biomasa.

Resultados

Evaluación de la citotoxicidad de los dendrímeros

Para realizar una completa caracterización de las tres generaciones del 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. Se realizó un estudio de los dendrímeros a distintas concentraciones, evaluándose la biocompatibilidad de las 3 generaciones mediante tinción con azul tripan. 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. Se obtuvo que a valores por debajo de 10 μ M, los dendrímeros no resultaban tóxicos ni en una línea celular linfoide (Fig. 2) ni en CMSP (Fig. 3).

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.

Se evaluaron las 3 generaciones de dendrímero con núcleo polifenólico, 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). Los resultados muestran que incluso a una concentración de 50 μ M, no existe daño de membrana significativo en una línea celular como son las MT-2.

Se realizó un estudio más detallado para evaluar el efecto de un dendrímero en el metabolismo de las CMSP. Se probó el dendrímero de segunda generación y se observó que la actividad mitocondrial no se veía reducida de forma notoria. Fig. 4).

Ante estos resultados, se determinó que el G2O3SF24 sería el elegido para poner a punto los ensayos de inhibición de la adherencia, internalización e infección del VIH a las células epiteliales y CMSP.

Ensayos de adhesión/internalización

El dendrímero que iba a ser expuesto sobre la monocapa de células epiteliales había demostrado no ser tóxico ni mitogénico 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 el G2O3SF24. 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. Se realizaron ensayos a diferentes tiempos y se estableció un pretratamiento de 1 h en todos los experimentos. El suramin, un polisulfonato de naftilurea, es una molécula con terminaciones sulfonato idénticas al G2O3SF24 pero con distinta estructura interna. Esta molécula fue elegida 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 *in vitro*.

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 de la Fig. 5, 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%, mientras que nuestro control positivo carece del efecto inhibitor. Por tanto, la estructura interna del dendrímero está implicada en la capacidad antiviral de la molécula.

La segunda generación de sulfonatos se evaluó por su posible efecto profiláctico y terapéutico en PBMCs, mostrando un 60% de inhibición en los ensayos de pre-tratamiento de las células con el dendrímero, lo que confirma la aplicación de este dendrímero en un sistema más fisiológico como es una línea primaria linfoide, Fig. 6.

Se está evaluando actualmente su acción en células dendríticas y macrófagos. Debido a que estas líneas celulares se infectan de forma menos notable que en los experimentos con linfocitos, la disminución de un 50 a 70% en las diferentes poblaciones celulares esta ligada a la disponibilidad de virus en contacto con las mismas. Fig. 7.

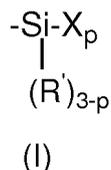
Ensayos de aplicación antibacteriana y antifúngica

También se ha determinado el efecto antibacteriano y antifúngico que tienen estos dendrímeros en presencia de bacterias. Para ello se ha elegido *staphylococcus aureus* y *candida albicans* como modelo de experimentación bacteriano y fúngico, respectivamente. En estos experimentos se observó que a la concentración utilizada de 10 μ M el dendrímero presenta un 40% de efecto bactericida y un efecto bacterioestático del 90% Fig. 8-9. No se observaron efectos fungicidas ni fungiestáticos a las concentraciones utilizadas, Fig. 10-11.

REIVINDICACIONES

1. Dendrímero carbosilano que comprende

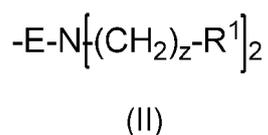
- 5 a) un núcleo polifenólico,
 b) al menos una generación, y
 10 c) una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula general (I):



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

p varía entre 1 y 3, y

25 X es el siguiente grupo de fórmula general (II):



30 donde: E es un grupo enlazante entre el silicio y el grupo amina,

35 z varía entre 1 y 4,

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

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

2. Dendrímero según la reivindicación 1, donde el núcleo es trisustituido.

3. Dendrímero según la reivindicación 1, donde el núcleo es hidroquinona.

45 4. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde p es 1.

5. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R' es metilo.

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

7. Dendrímero según la reivindicación 6 donde el grupo alquilo de E es un propilo.

55 8. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde R² es hidrógeno o metilo.

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

10. Dendrímero según la reivindicación 9, donde x es 4.

60 11. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde E es el grupo -(CH₂)_x-R³ y R³ es fenoxo.

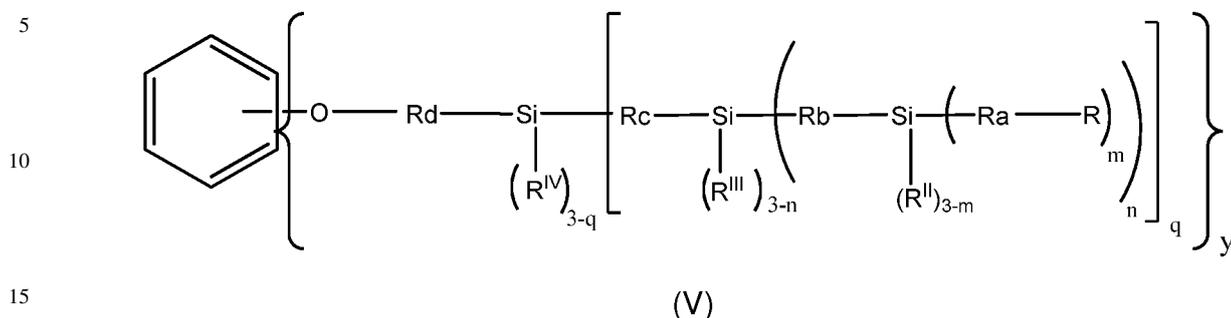
12. Dendrímero según la reivindicación 11, donde x es 1.

65 13. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde R¹ es el grupo -COOR².

14. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde R¹ es el grupo -SO₃R².

ES 2 365 685 A1

22. Dendrímtero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde dicho dendrímtero es al menos de tercera generación con la siguiente fórmula (V):



donde: R_a , R_b , R_c , R_d , R^{II} , R^{III} y R^{IV} , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_1 - C_6);

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

y tiene un valor de entre 2 y 6;

R es el grupo de fórmula general (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

23. Dendrímtero según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde R_a , R_b , R_c o R_d son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_2 - C_4).

24. Dendrímtero según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde R^{II} , R^{III} o R^{IV} son de forma independiente un grupo metilo.

25. Procedimiento de obtención de los dendrímteros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que comprende:

la adición de Michael de un dendrímtero que contiene un núcleo polifenólico y grupos $-NH_2$ terminales con un grupo que se selecciona de la lista que comprende acrilato de metilo, vinil sulfonato y dimetil fosfonato.

26. Procedimiento según la reivindicación 25, donde el dendrímtero que contiene un núcleo polifenólico y grupos $-NH_2$ se obtiene mediante:

- a) la síntesis de dendrones con un punto focal haloalquilo y funcionalizada por grupos alilo a partir de un haloalqueno;
- b) acoplamiento de los dendrones obtenidos en el paso (a) a un núcleo polifenólico; y
- c) la funcionalización del dendrímtero obtenido en (b) con grupos $-NH_2$ terminales.

27. Procedimiento de obtención de los dendrímteros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, que comprende:

la hidrosililación de un dendrímtero que contiene un núcleo polifenólico y grupos $-Si-H$ terminales con un grupo alilamina funcionalizadas con grupos carboxílicos, fosfónicos o sulfónicos.

28. Procedimiento según la reivindicación 27, donde el dendrímtero que contienen núcleos polifenólicos y grupos $-Si-H$ terminales se obtiene mediante:

- a) la síntesis de dendrones con un punto focal haloalquilo y funcionalizada por grupos $-Si-H$ a partir de un haloalqueno; y
- b) acoplamiento de los dendrones obtenidos en el paso (a) a un núcleo polifenólico; o
- a') la síntesis de dendrones con un punto focal haloalquilo y funcionalizada por grupos alilo a partir de un haloalqueno;

ES 2 365 685 A1

b') acoplamiento de los dendrones obtenidos en el paso (a') a un núcleo polifenólico; y

c') la funcionalización del dendrímero obtenido en (b') con grupos -Si-H terminales.

5

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 28, donde el haloalqueno es un bromoalqueno (C₁-C₆), más preferiblemente bromoalqueno (C₂-C₄).

10

30. Uso de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, para la elaboración de un medicamento.

31. Uso de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos.

15

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

33. Composición farmacéutica que comprende al menos un dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

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

35. Uso de los dendrímeros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, como vehículo de transporte de moléculas.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

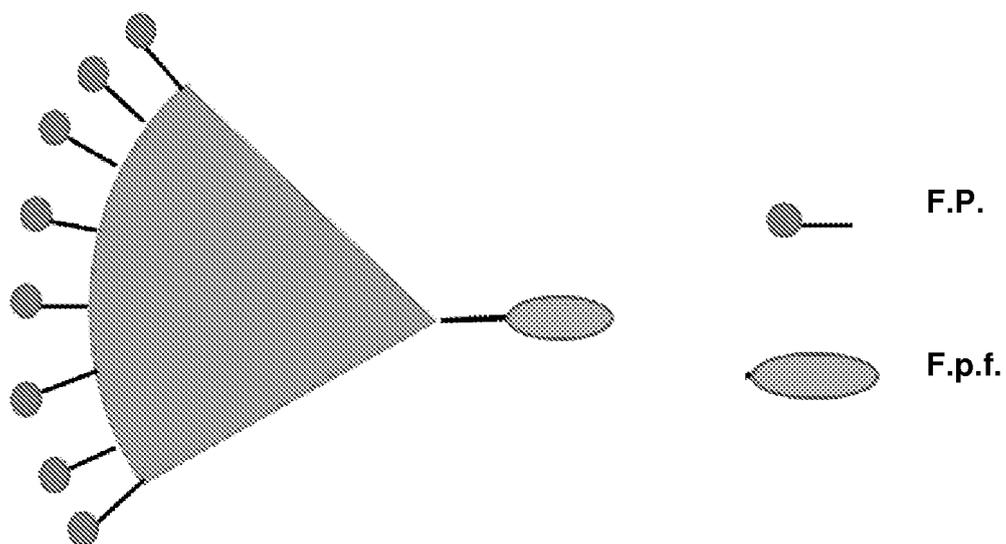


FIG. 1

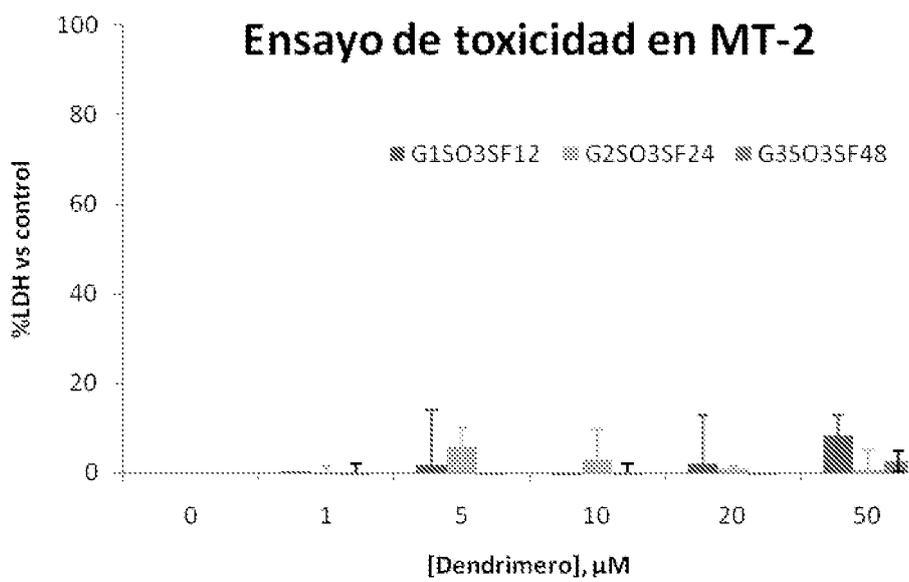


FIG. 2

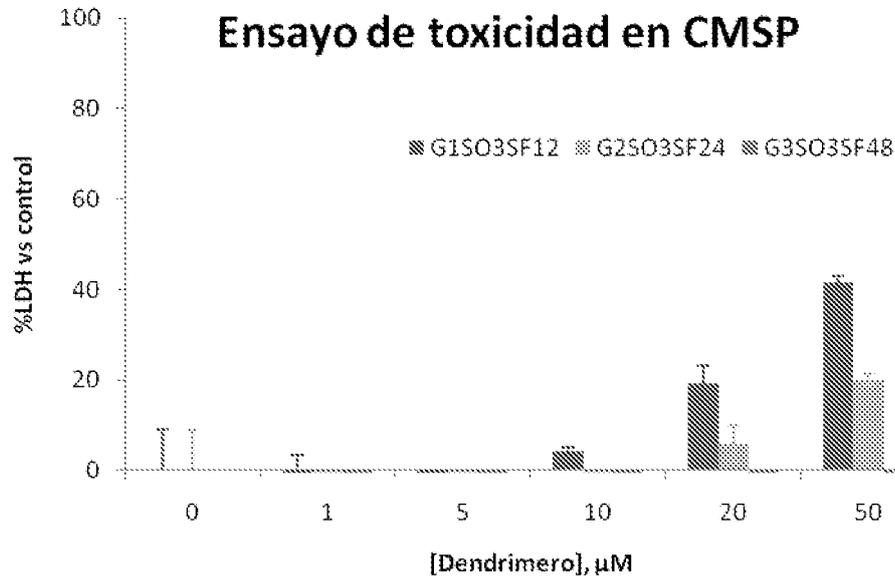


FIG. 3

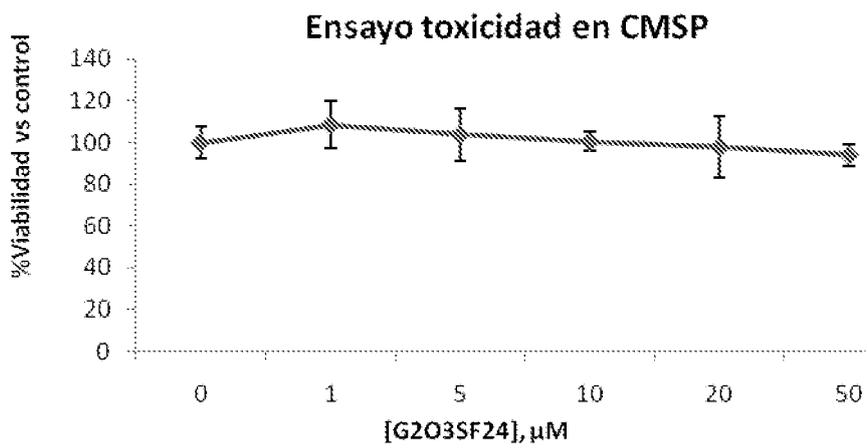


FIG. 4

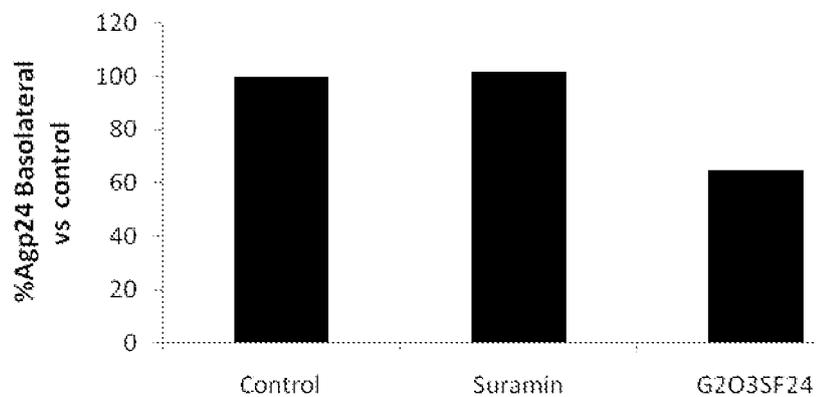


FIG. 5

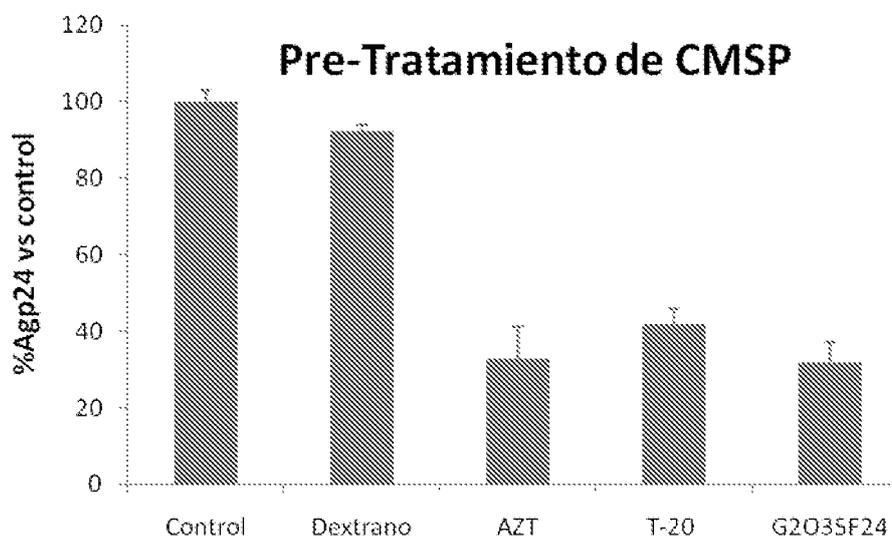


FIG. 6

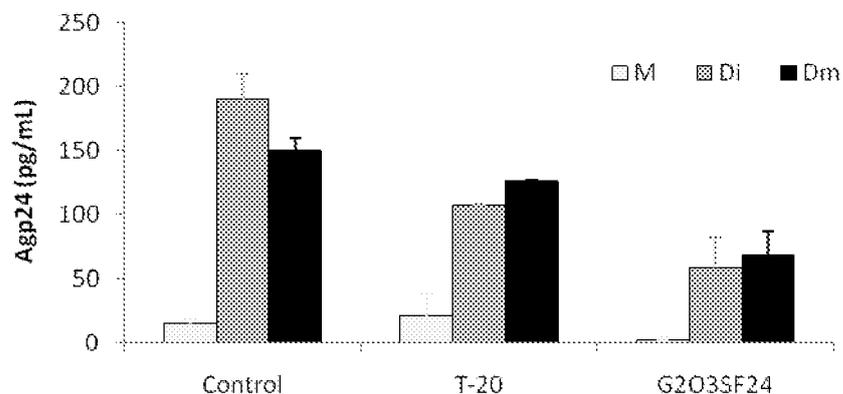


FIG. 7

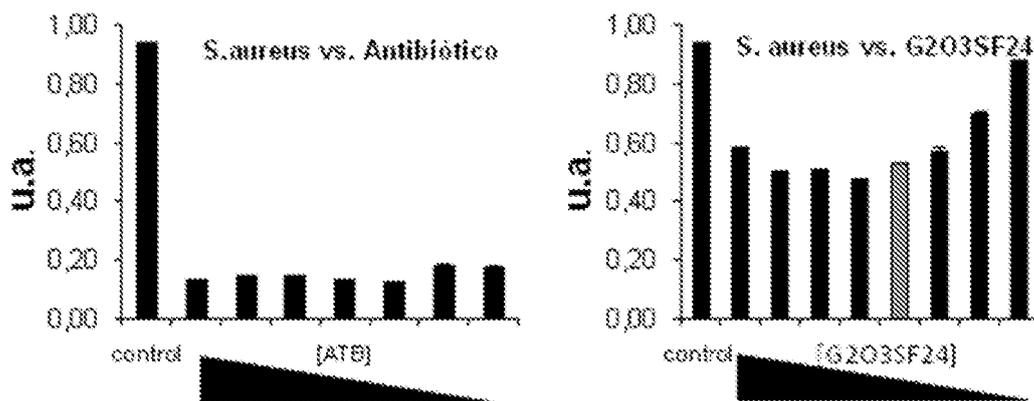


FIG. 8

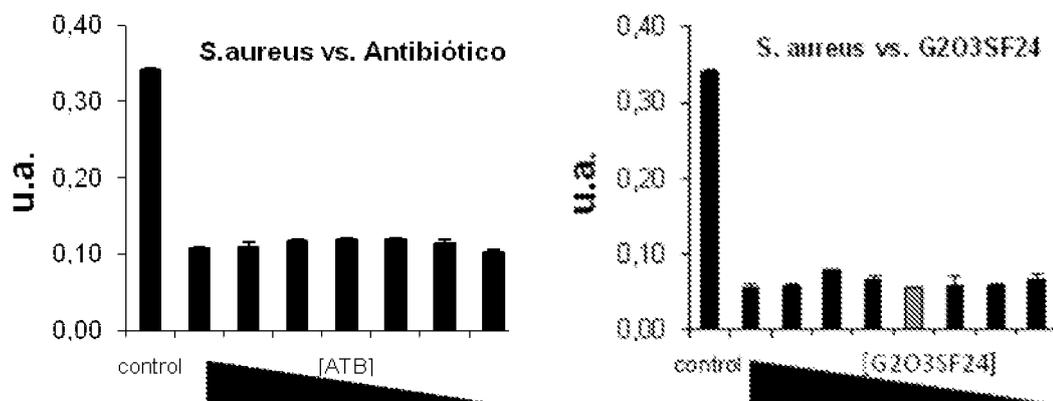


FIG. 9

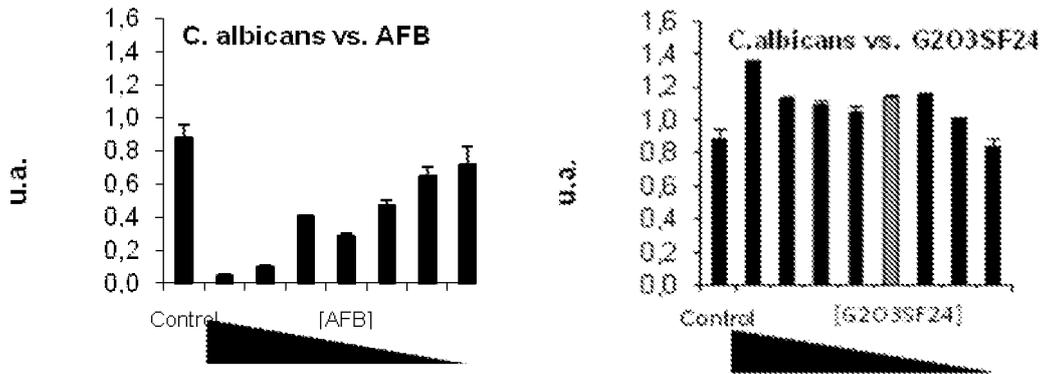


FIG. 10

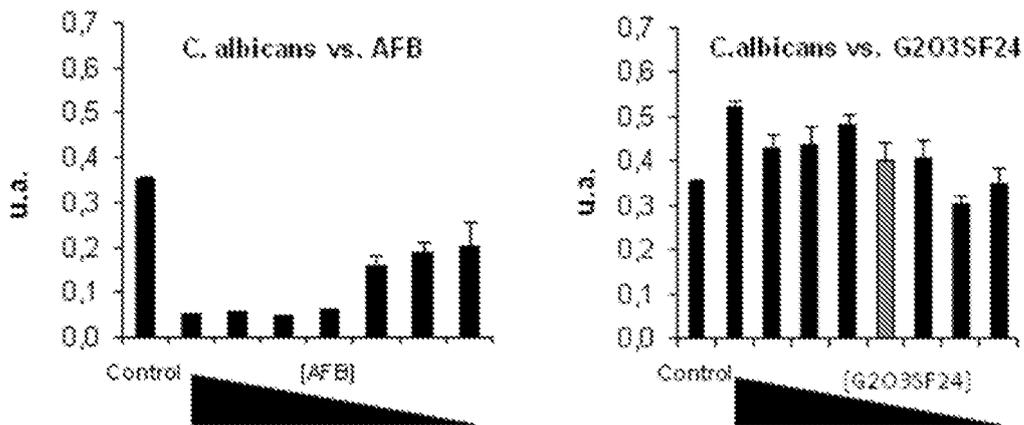


FIG. 11



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030450

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.03.2010

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	WO 2007010080 A2 (UNIVERSIDAD DE ALCALÁ) 25.01.2007, reivindicaciones; compuestos 7,23.	1-35
A	B RASINES et al., Dalton Transactions 2009, páginas 8704-8713. "Water-stable ammonium-terminated carbosilane dendrimers as efficient antibacterial agents", página 8708.	30-35

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
06.04.2011

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: 06.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-35	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-35	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	WO 2007010080 A2 (UNIVERSIDAD DE ALCALÁ)	25.01.2007

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 carbosilano formados por:

- un núcleo polifenólico
- al menos una generación y
- una capa externa que son unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula general (I) (ver reivindicación 1).

La reivindicaciones 20, 21 y 22 se refieren a los dendrímeros de primera, segunda y tercera generación de fórmulas (III) (ver reivindicación 20), (IV) (reivindicación 21) y (V) (reivindicación 22). También se reivindica el procedimiento de obtención de dichos dendrímeros (reivindicaciones 25-29) y su uso para la preparación de un medicamento o como vehículo de transporte de moléculas.

El documento D1 divulga dendrímeros carbosilano con grupos amino terminales (ver fórmula 7 en la figura 1a y 23 en la página 58), unidos a un Ph-1,3,5-trihidroxi con núcleo de Si. Los compuestos descritos en la solicitud están formados por un núcleo trihidroxifenil y átomos de Si en las ramificaciones y llevan grupos carboxilato, sulfonato o fosfonato en los extremos, como se puede ver por ejemplo en las fórmulas desarrolladas de las páginas 52,53 y 54 de la solicitud. Este tipo de dendrímeros no se han encontrado divulgados en el estado de la técnica, también el procedimiento de síntesis se considera nuevo e inventivo ya que los productos son nuevos y además se utiliza un procedimiento que consiste en el acoplamiento de dendrones tipo cuñas dendríticas sobre el núcleo polifenólico en lugar del procedimiento divergente de extensión de las ramificaciones.

Por consiguiente se considera que las reivindicaciones 1-35 de la solicitud cumplen los requerimientos de novedad y actividad inventiva establecidos en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.