



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 370 638**

② Número de solicitud: 201030322

⑤ Int. Cl.:

**C07C 237/10** (2006.01) **C07C 237/20** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01) **A61K 49/10** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01) **A61K 31/165** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01) **A61P 31/12** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **05.03.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2011**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**21.12.2011**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Castilla La Mancha**  
**Edificio José Prat**  
**Plaza de la Universidad, 2**  
**02071 Albacete, ES**

⑦ Inventor/es: **Ceña Callejo, Valentín;**  
**Sánchez Verdú, María del Prado;**  
**Merino Guijarro, Sonia;**  
**García Martínez, Joaquín Calixto;**  
**Rodríguez López, Julián;**  
**Vázquez Fernández-Pacheco, Ester;**  
**Herrero Chamorro, María Antonia;**  
**Campo Rodrigo, Ana;**  
**Rivilla de la Cruz, Iván;**  
**Pérez Martínez, Francisco Carlos y**  
**Guerra Navarro, Francisco Javier**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Dendrímeros como vehículos no virales para terapia génica.**

⑤ Resumen:

Dendrímeros como vehículos no virales para terapia génica.

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de fórmula general (I) y (II) para su uso en terapia génica como vehículos no virales y su uso para la elaboración de un medicamento. Además se describe el procedimiento de síntesis de dichos compuestos de fórmula general (I) y (III).

**DESCRIPCIÓN**

Dendrimeros como vehiculos no virales para terapia genica.

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos de fórmula general (I), y (II) para su uso en terapia genica como vehiculos no virales y su uso para la elaboracion de un medicamento. Además se describe el procedimiento de síntesis de dichos compuestos de fórmula general (I) y (II).

**Estado de la técnica anterior**

10 El uso de vectores no virales en terapia genica es especialmente relevante, ya que la FDA ha suspendido, *sine die*, los ensayos clinicos usando virus (adenovirus, adenoasociados, etc) debido a que generan reacciones inmunes que han causado la muerte de algunos pacientes que participaban en dichos ensayos. Los vectores viricos poseen varios inconvenientes, tales como, inseguridad en su manejo, toxicidad, provocacion de una respuesta inmune que disminuye su efectividad o falta de especificidad celular. Junto a ello, estos sistemas son rápidamente eliminados de la circulacion, limitando el proceso de transfeccion a organos de primer paso (pulmones, higado y bazo).

También hay que tener en cuenta que procesos de recombinacion pueden originar un virus replicante aunque el peligro es remoto. No obstante, los problemas que plantean los virus como vectores en terapia genica son serios y los ensayos clinicos de terapia genica en por ejemplo Estados Unidos, han sido interrumpidos recientemente por la FDA debido a la muerte de varios pacientes por fallo multiorganico. Este tipo de graves problemas han llevado a la búsqueda y desarrollo de alternativas al uso de los virus como vectores de material genico.

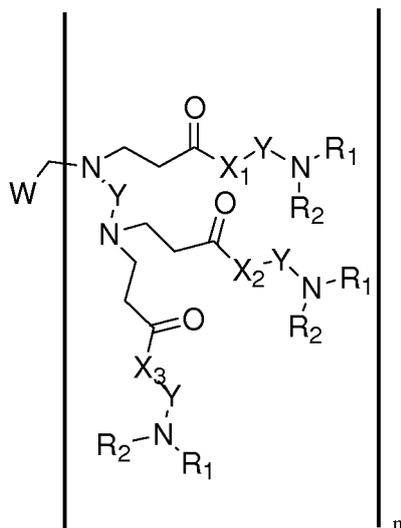
Los vectores no virales poseen una serie de ventajas con respecto a los analogos viricos: a) facilidad en la preparacion (incluso a escala multigramo) y modificacion, b) mayor flexibilidad con respecto al tamaño del ADN a transfectar, c) son generalmente seguros *in vivo* y d) no provocan una respuesta inmune especifica y por tanto pueden ser administrados repetidamente.

Dentro de los vectores no virales, los dendrimeros representan una de estas alternativas, ya que presentan un tamaño nanométrico, una estructura globular, una baja polidispersidad y una alta densidad funcional en la superficie con un pequeño volumen molecular.

**Descripción de la invención**

35 La presente invención se refiere a nuevos compuestos de fórmula general (I), y (II) para su uso en terapia genica como vehiculos no virales y su uso para la elaboracion de un medicamento o kits de transfeccion. Además se describe el procedimiento de síntesis de dichos compuestos de fórmula general (I) y (II).

Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



(I)

o una sal, prodroga o solvato del mismo;

donde:

W se selecciona del grupo formado por cualquier polímero o dendrímero derivado de polifenilenvinileno, polifenileneilideno o híbrido de ambos, cualquier compuesto orgánico conjugado que combine dobles enlaces, triples enlaces o una composición de ambos en su estructura, cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico conjugado que alterne en su estructura dobles enlaces, triples enlaces o una combinación de ambos con anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico no conjugado que contenga anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores o cualquier combinación de los mismos,

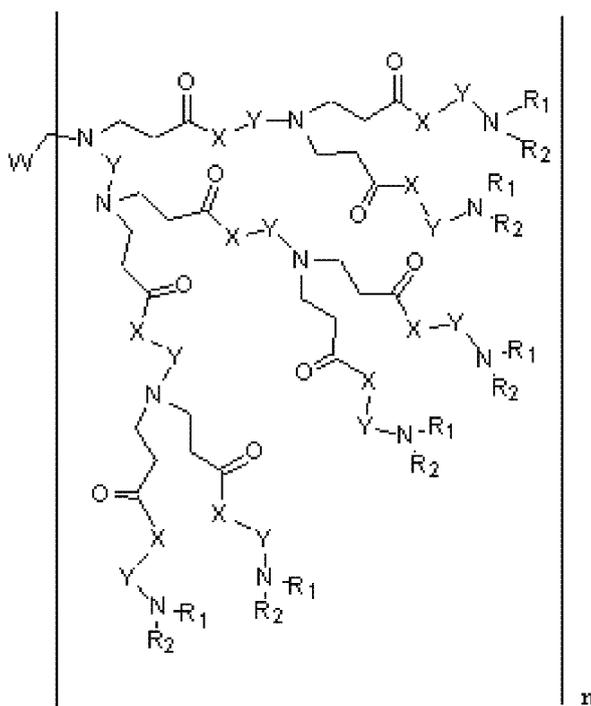
X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan entre cualquier heteroátomo,

Y se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>) o cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquenilo, arilo o heteroarilo,

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son iguales o diferentes unidos a un grupo amino primario, secundario o terciario y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>),

n representa el número de ramificaciones y es un número entero seleccionado entre 1 y 10.

Una realización preferida se refiere a compuesto de fórmula general (II):



o una sal, prodroga o solvato del mismo;

donde:

W se selecciona del grupo formado por cualquier polímero o dendrímero derivado de polifenilenvinileno, polifenileneilideno o híbrido de ambos, cualquier compuesto orgánico conjugado que combine dobles enlaces, triples enlaces o una composición de ambos en su estructura, cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico conjugado que alterne en su estructura dobles enlaces, triples enlaces o una combinación de ambos con anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico no conjugado que contenga anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores o cualquier combinación de los mismos.

## ES 2 370 638 A1

$X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son iguales o diferentes y se seleccionan entre cualquier heteroátomo,

Y se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado ( $C_2$ - $C_{12}$ ) o cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalquenilo, arilo o heteroarilo,

5

$R_1$  y  $R_2$  son iguales o diferentes unidos a un grupo amino primario, secundario o terciario y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado ( $C_1$ - $C_{12}$ ), cicloalquilo,

n representa el número de ramificaciones y es un número entero seleccionado entre 1 y 10.

10

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula general (I) ó (II) pueden estar en forma de sal y unidos electrostáticamente a trifluoroacetato, anión cloruro, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir cualquier fármaco, anticuerpo, sonda, (radiactiva o no) para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen (Resonancia Magnética Nuclear, Tomografía por emisión de fotón simple o Tomografía por emisión de positrones) o cualquier combinación de los mismos.

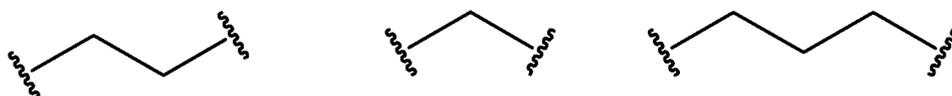
15

Según otra realización preferida  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son iguales o diferentes y se seleccionan entre nitrógeno u oxígeno.

En otra realización preferida, tanto para el compuesto de fórmula general (I), como para el de fórmula general (II), X se selecciona sin sentido limitativo entre:

20

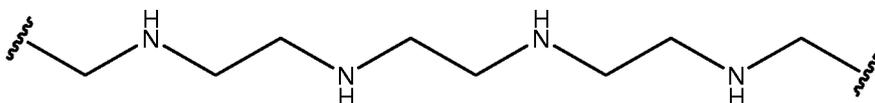
25



30



35



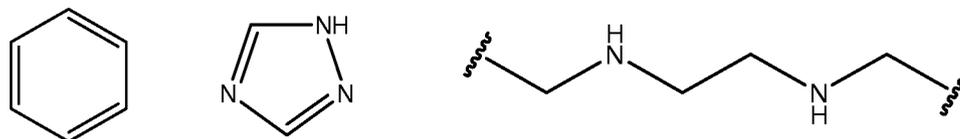
40

45

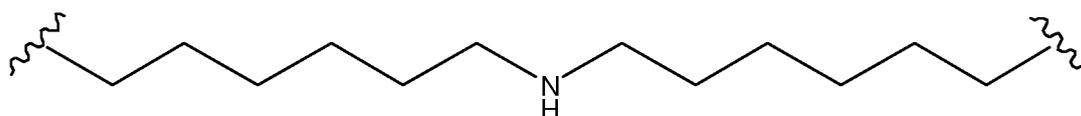


50

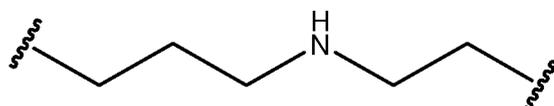
55



60

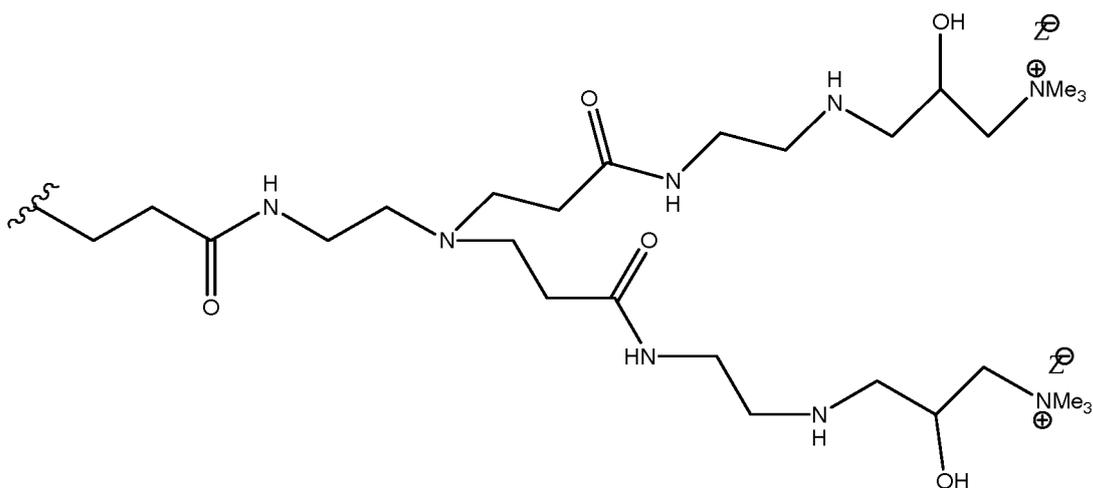
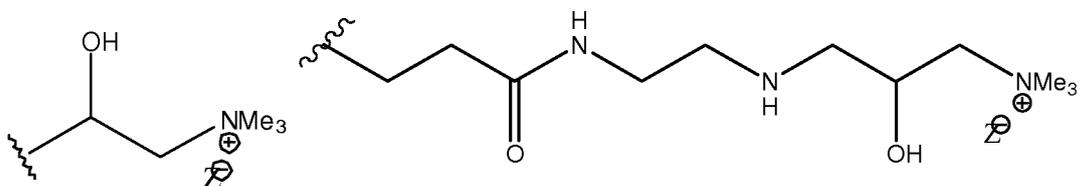
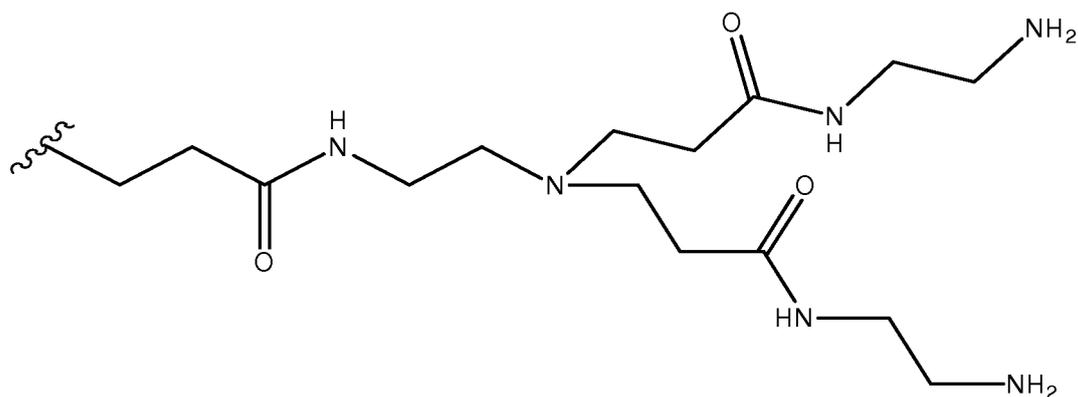


65

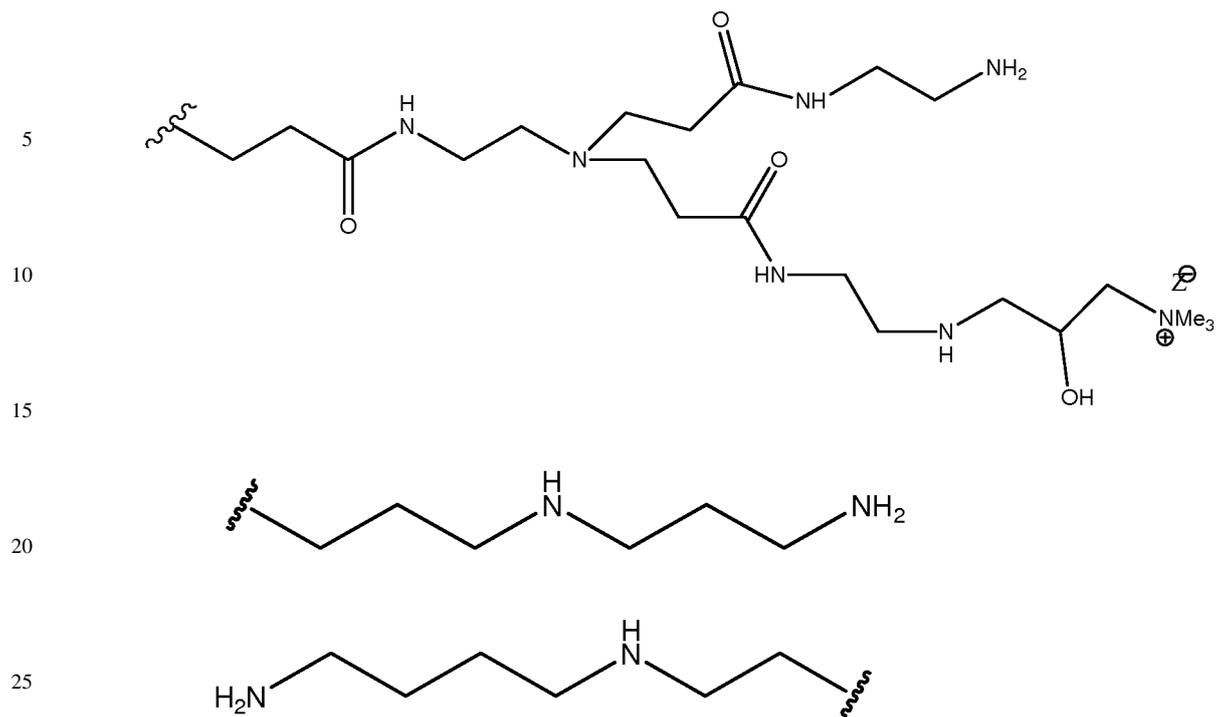


## ES 2 370 638 A1

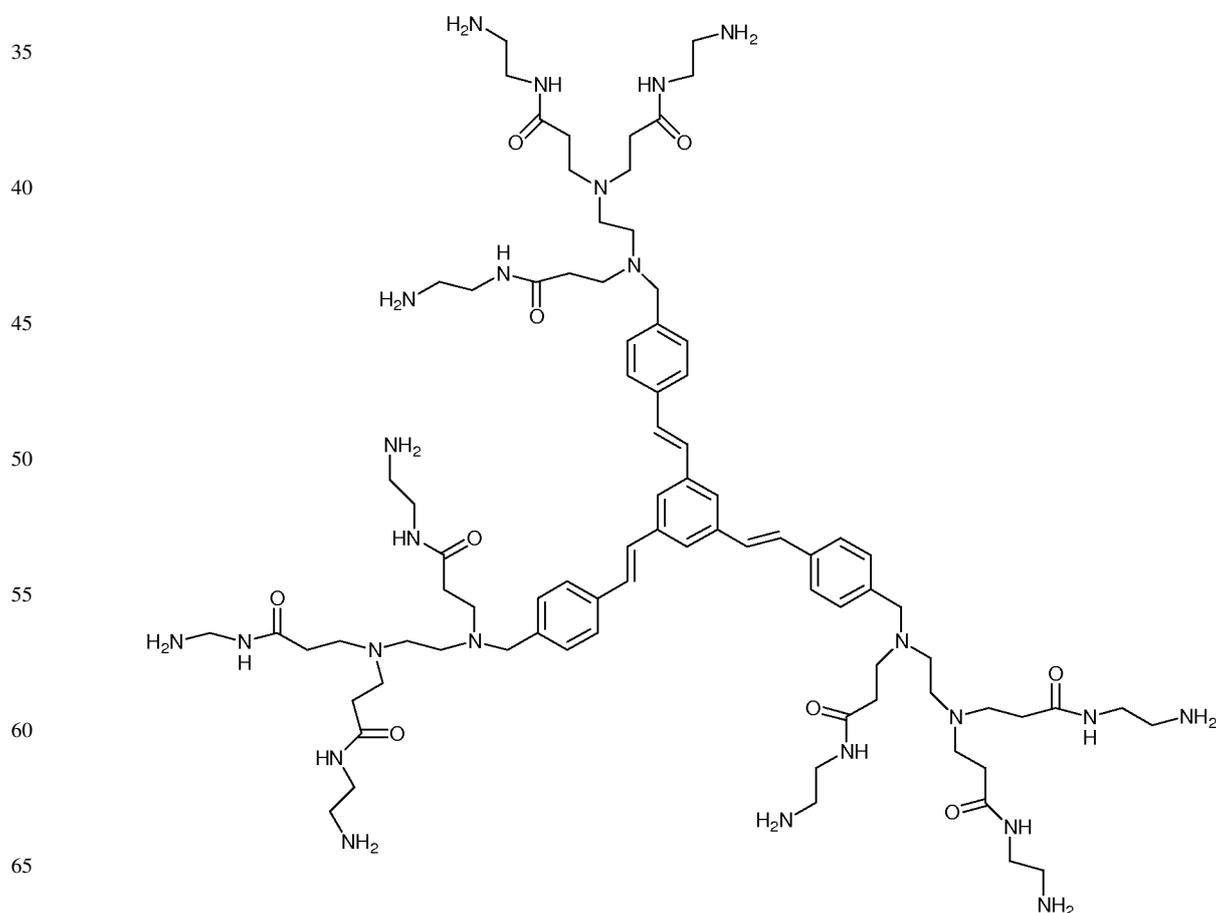
Según otra realización preferida, los radicales  $R_1$  a  $R_2$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, cualquier amina sustituida o no sustituida, aminoácidos básicos como por ejemplo la lisina o la arginina, derivados del colesterol a partir del cloroformiato de colesterol, ácido fólico, ácido láctico, dexametasona, azúcares como por ejemplo y sin sentido limitativo, la lactosa o la mañosa a partir de su derivado de tosilo, agentes lisosomotrópicos como por ejemplo la cloroquina, heterociclos nitrogenados como la uridina, la piperidina o la piperazina, cadenas hidrofílicas derivadas de poli-etilenglicol, cualquier diacrilato y las siguientes estructuras:



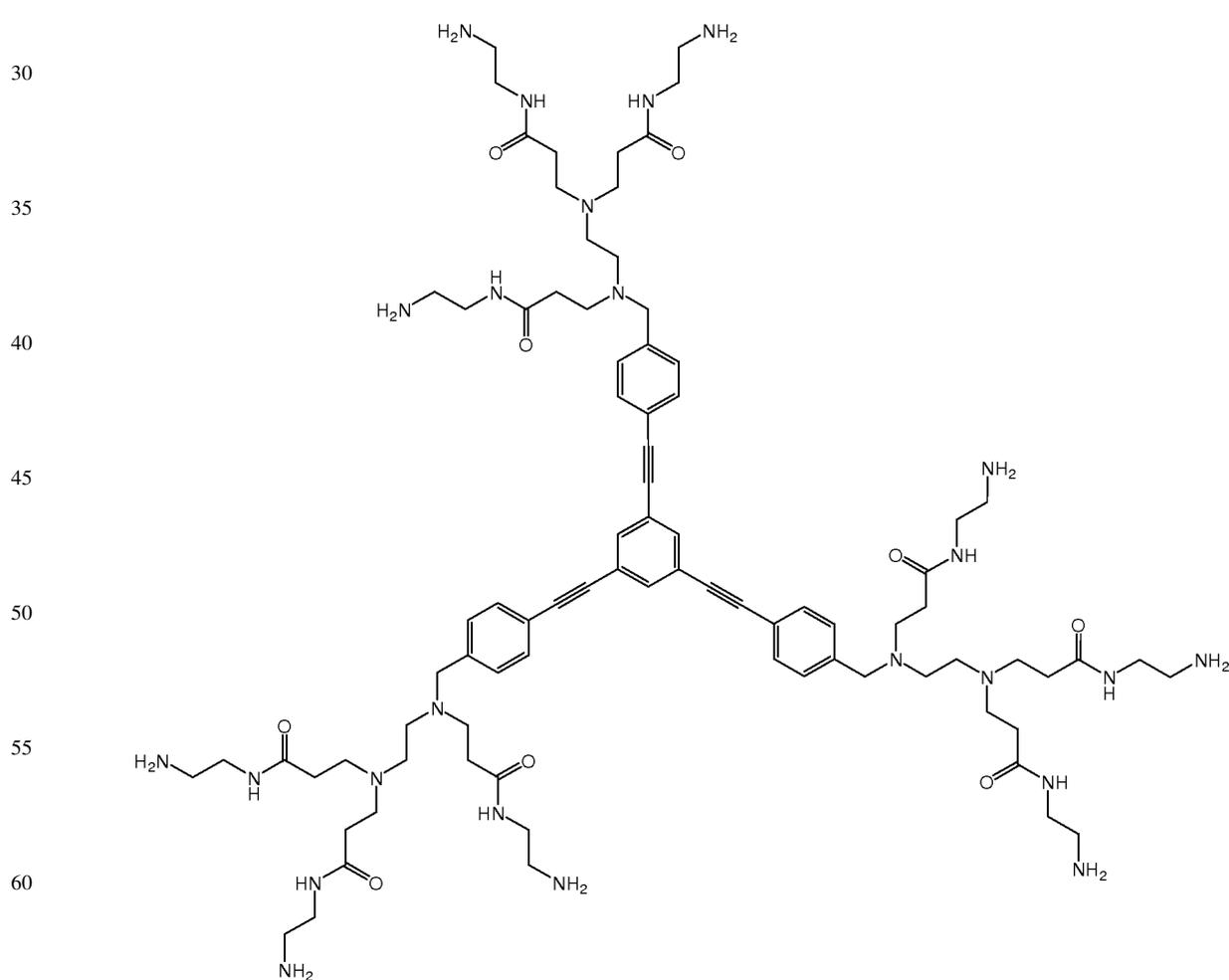
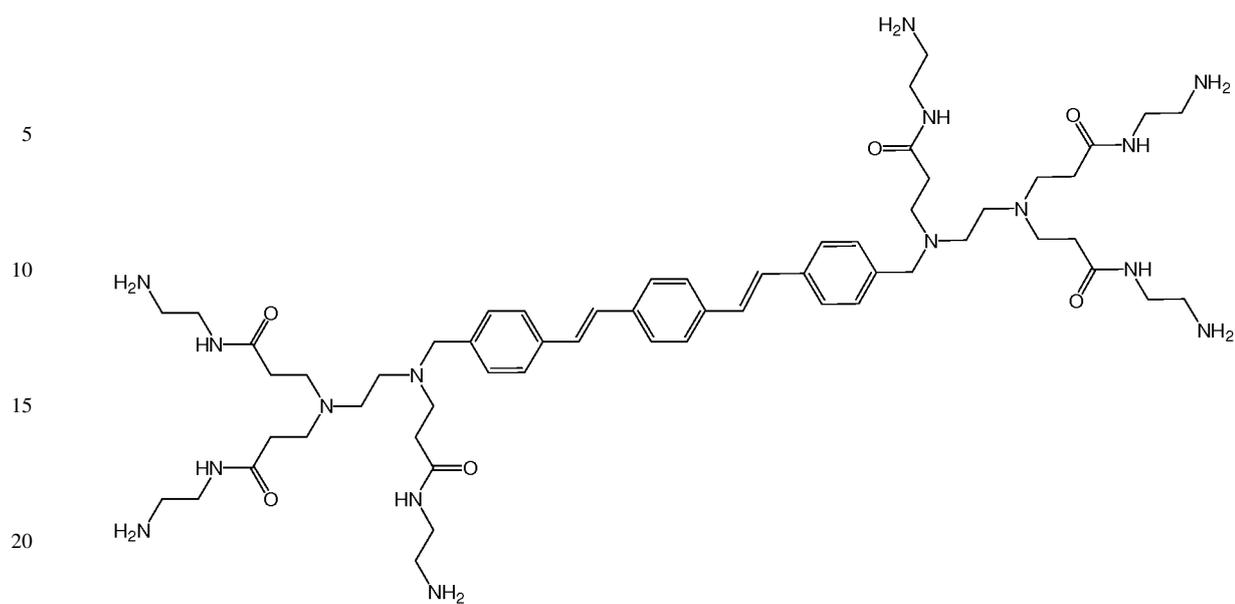
ES 2 370 638 A1

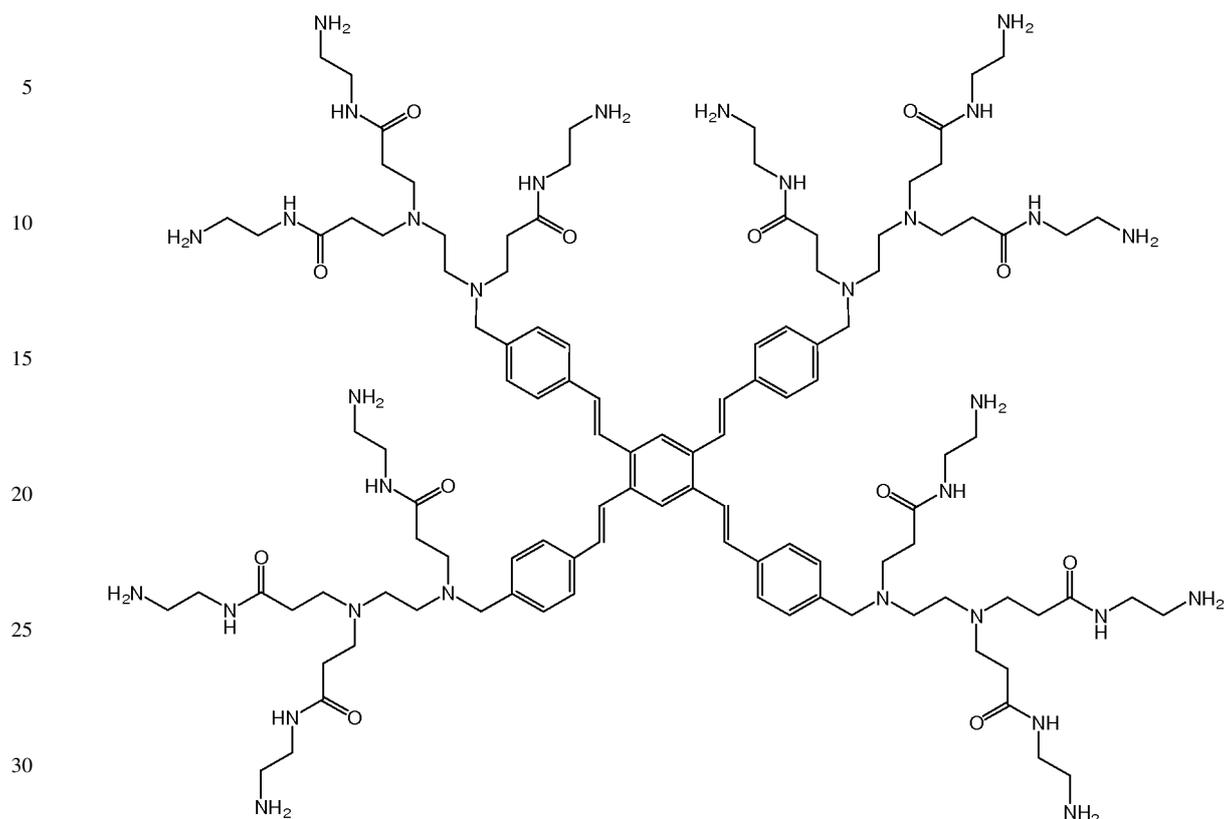


30 En una realización preferida, dichos compuestos de fórmula general (I) o (II) se seleccionan, pero sin limitarse, del grupo que comprende:



ES 2 370 638 A1





35 El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas, que tienen de 2 a 12 átomos de carbono. Por ejemplo, pero sin limitarse a, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo etc. Además el término alquilo también se refiere a cadenas alifáticas lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas de 2 a 12 átomos de carbono, que pueden estar sustituidas por grupos funcionales como por ejemplo el hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amina, amida o que puede contener en su estructura cualquier heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

45 El término “cicloalquilo” se refiere a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 8 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que sólo consiste en átomos de carbono e hidrógeno. Como por ejemplo, pero sin limitarse, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano o cicloheptano. Además el término cicloalquilo también se refiere a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 8 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que sólo consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que pueden estar sustituidas por grupos funcionales como por ejemplo el hidroxilo, carboxilo, carbonilo, amina, amida o que puede contener en su estructura cualquier heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno y azufre.

50 El término “sales, solvatos, prodroga farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualquier sal, éster, solvato farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro compuesto que, cuando se administra a un receptor es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto según se describe en el presente documento. Sin embargo, se apreciará que las sales farmacéuticamente no aceptables también están dentro del alcance de la invención ya que éstas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, prodrogas y derivados puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

60 Por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de compuestos previstos en el presente documento, se sintetizan mediante métodos químicos convencionales a partir de un compuesto original que contiene un resto básico ó ácido. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de los compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y *p*-toluenosulfonato. Ejemplos de sales de adición de bases incluyen sales inorgánicas tales

## ES 2 370 638 A1

como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales de bases orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, glucamina y sales de aminoácidos básicos.

5 Los derivados o prodrogas particularmente favoritos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando se administran tales compuestos a un paciente (por ejemplo, haciendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba mas fácilmente por la sangre), o que potencia la liberación del compuesto original en un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) con relación a la especie original.

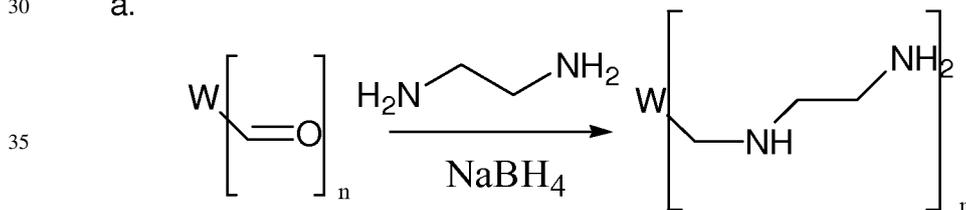
10 Cualquier compuesto que es un prodroga de un compuesto de fórmula (I) está dentro del alcance de la invención. El termino "prodroga" o "profármaco" se usa en su sentido más amplio y abarca aquellos derivados que se convierten en vivo en los compuestos de la invención. Tales derivados serán evidentes para aquellos expertos en la técnica, e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados de los compuestos presentes esteres, esteres de aminoácido, esteres de fosfato, esteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos, y amidas.

15 Los compuestos de fórmula (I) y (II) pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, el solvato es un hidrato.

20 Un segundo aspecto fundamental de la presente invención se refiere a un procedimiento para la elaboración de un compuesto de fórmula general (I) que comprende las siguientes etapas:

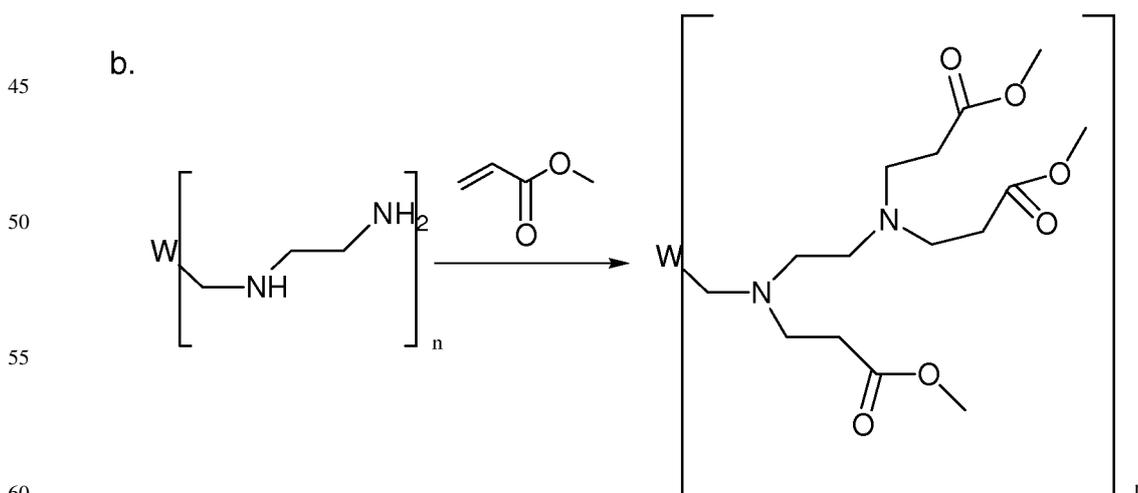
25

30 a.



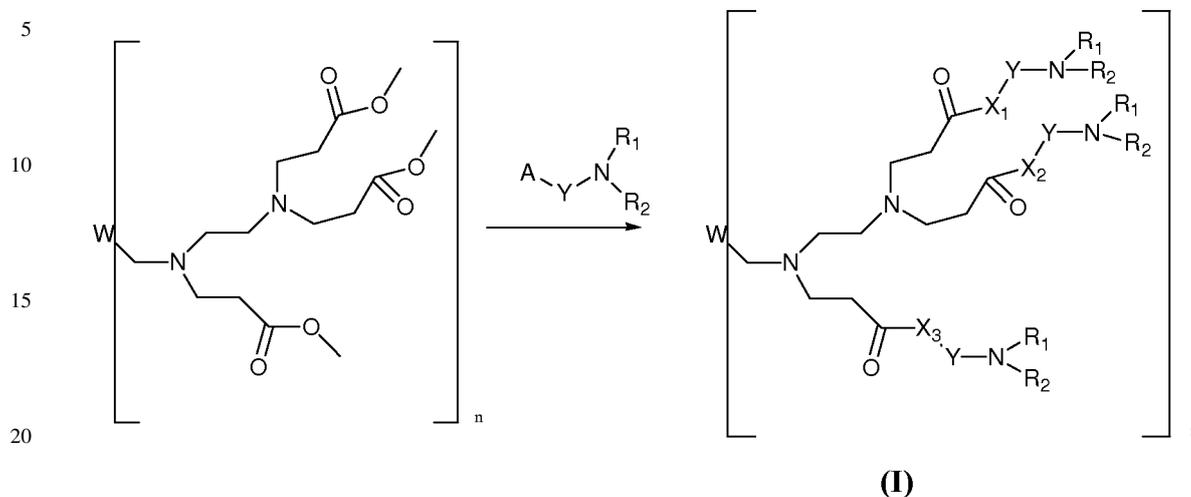
40

45 b.



65

C.



25 donde:

30 W se selecciona del grupo formado por cualquier polímero o dendrímero derivado de polifenilenvinileno, polifenileneilideno o híbrido de ambos, cualquier compuesto orgánico conjugado que combine dobles enlaces, triples enlaces o una combinación de ambos en su estructura, cualquier sustitución con grupos electrodoadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico conjugado que alterne en su estructura dobles enlaces, triples enlaces o una combinación de ambos con anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodoadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico no conjugado que contenga anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodoadores o electroattractores de las anteriores o cualquier combinación de los mismos.

40 A se selecciona entre  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ,

$X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son iguales o diferentes y se seleccionan entre cualquier heteroátomo,

45 Y se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado ( $C_2$ - $C_{12}$ ) o cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalqueno, arilo o heteroarilo,

$R_1$  y  $R_2$  son iguales o diferentes unidos a un grupo amino primario, secundario o terciario y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado ( $C_1$ - $C_{12}$ ), y

50 n representa el número de ramificaciones y es un número entero seleccionado entre 1 y 10.

Otro aspecto fundamental de la presente invención se refiere a un procedimiento para la elaboración de un compuesto de fórmula general (II) que comprende las mismas etapas para la elaboración del compuesto de fórmula general (I) partiendo de este último compuesto.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) ó (II) para la fabricación de un medicamento.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del medicamento mencionado anteriormente para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades del sistema nervioso como son las enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares, enfermedades que cursen con la aparición de tumores, enfermedades producidas por infecciones víricas.

65 Por tanto, los compuestos de la presente invención podrían ser utilizados para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende enfermedades del sistema nervioso como son las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Parkinson, demencia incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica), accidentes cerebrovasculares (incluyendo la patología derivada de la

trombosis y la hemorragia cerebral). También se incluye en este apartado el tratamiento de tumores (especialmente de próstata, de pulmón y de mama, sin que esta lista esté limitada y sea excluyente de otros tipos de patología tumoral). También se incluye en esta lista las infecciones víricas especialmente (aunque no excluyente) la causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) producida por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) ó (II) para la elaboración de un kit de transfección de siRNA en cultivos primarios de células nerviosas, glia, células tumorales y otras células primarias como los hepatocitos (sin ser éstas últimas excluyentes de otros cultivos primarios).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) en terapia génica como vector no viral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) para la elaboración de sondas, (radiactivas o no) para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen (Resonancia Magnética Nuclear, Tomografía por emisión de fotón simple o Tomografía por emisión de positrones).

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I) y (II), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales para proporcionar una terapia de combinación.

Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) ó (II) o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica útil para medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende enfermedades del sistema nervioso como son las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Parkinson, demencia incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica), accidentes cerebrovasculares (incluyendo la patología derivada de la trombosis y la hemorragia cerebral). También se incluye en este apartado el tratamiento de tumores (especialmente de próstata, de pulmón y de mama, sin que esta lista esté limitada y sea excluyente de otros tipos de patología tumoral). También se incluye en esta lista las infecciones víricas especialmente (aunque no excluyente) la causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) producida por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), o, en general, de enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los compuestos descritos en la presente invención, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto, en cantidad terapéuticamente efectiva, de fórmula (I) ó (II), o mezclas de los mismos, una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada.

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.

**Breve descripción de las figuras**

Fig. 1, se refiere al análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a compuesto de fórmula general (I). Los números en (A) corresponden a diferentes ratios N/P (aminas nitrogenadas en compuesto de fórmula general (I)/fosfatos en siRNA): (1) 1:0 (siRNA sólo), (2) 6:1, (3) 12:1, (4) 24:1, (5) 48:1, (6) 96:1, (7) 192:1 y (8) 384:1. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

Fig. 2 se refiere al estudio de la disociación de siRNA de los complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA por competencia con heparan sulfato. Los complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA con un ratio N/P de 12:1 se incubaron durante 1 hora a 37°C con concentraciones crecientes de heparan sulfato y la disociación de los complejos se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. A. Gel de agarosa mostrando el siRNA liberado por concentraciones crecientes de heparan sulfato. Los diferentes carriles corresponden a la incubación del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA con las siguientes concentraciones de heparan sulfato ( $\mu\text{g}$ )/compuesto de fórmula general (I) ( $\mu\text{g}$ ): (1) 0,78, (2) 1,52; (3) 3,04; (4) 6,08; (5) 12,48; (6) 24,32 y (7) 0:0 (siRNA sólo). El análisis densitométrico de los resultados del experimento de competitividad con heparan sulfato se muestran en (B).

Fig. 3 se refiere a la determinación de la estabilidad del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA en presencia de RNAsas. A. Efecto de diversos tratamientos sobre la estabilidad del siRNA. B. Densitograma de A. Las barras blancas representan la cantidad de siRNA en el pocillo de carga y las negras la cantidad liberada por heparan sulfato al final del experimento.

Fig. 4 describe el estudio de la toxicidad de compuesto de fórmula general (I) en células PC12 (A), neuronas granulares de cerebelo (B) y neuronas corticales (C). Las células se trataron con diferentes concentraciones de compuesto de fórmula general (I) (5 a 80  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas (barras blancas), 48 horas (barras grises) o 72 horas (barras negras). La viabilidad celular se evaluó cuantificando el porcentaje de LDH liberada al medio de cultivo. Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, n=12. \* p <0,05, comparados con el control.

Fig. 5 describe el estudio de la transfección y toxicidad de compuesto de fórmula general (I) en células PC12. Cuantificación de la transfección del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA fluorescente en células PC12 (A, C) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B, D) mediante su estudio por citometría de flujo. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I) y 100 nM de siRNA fluorescente. Los tratamientos duraron 24 horas (A, B) o 48 horas (C, D). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \* p <0,05, comparados con el control.

Fig. 6 describe el estudio de la transfección y toxicidad de compuesto de fórmula general (I) en células LnCaP. Cuantificación de la transfección del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA fluorescente en células LnCaP (A, C) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B, D) mediante su estudio por citometría de flujo. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I) y 100 nM de siRNA fluorescente. Se estudiaron los efectos tras tratamientos de 48 horas (A, B) o 72 horas (C, D). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \* p <0,05, comparados con el control.

Fig. 7 describe el estudio de la transfección y toxicidad de compuesto de fórmula general (I) en células granulares de cerebelo. Cuantificación de la transfección del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA fluorescente, tras 48 horas de tratamiento, en neuronas granulares de cerebelo (A) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B) mediante su estudio por citometría de flujo. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I) y 100 nM de siRNA fluorescente. Estudio microscópico de las neuronas granulares de cerebelo transfectadas con el complejo formado mediante 4  $\mu\text{M}$  compuesto de fórmula general (I) y 100 nM siRNA fluorescente (C). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \* p <0,05, comparados con el control.

Fig. 8 describe la transfección y toxicidad de compuesto de fórmula general (I) en neuronas corticales de rata. Cuantificación de la transfección del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA fluorescente en neuronas corticales de rata (A, C) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B, D) mediante su estudio por citometría de flujo. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I) y 100 nM de siRNA fluorescente. Se estudiaron los efectos tras tratamientos de 48 horas (A, B) o 72 horas (C, D). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \* p <0,05, comparados con el control.

Fig. 9 describe el estudio del efecto del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA contra GAPDH o SCRAMBLE (Control) en la expresión génica de GAPDH en células PC12 mediante real-time PCR. La cuantificación del RNAm de GAPDH y  $\beta$ -actina (control endógeno) se realizó en células transfectadas durante 48 horas (A) o 72 horas (B). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \* p <0,05, comparados con el control.

Fig. 10 describe el estudio de la transfección durante 48 horas del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA contra COFILINA 1 o SCRAMBLE (Control) en neuronas granulares de cerebelo de rata. A, mediante real-time PCR (A) se cuantificó el RNAm de COFILINA 1 y  $\beta$ -actina (control endógeno). B, análisis por Western blot de la expresión proteica de COFILINA 1 y GAPDH (control endógeno). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \*  $p < 0,05$ , comparados con el control.

Fig. 11 describe el estudio de la transfección durante 48 horas del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA contra COFILINA 1 o SCRAMBLE (Control) en neuronas corticales de rata. A, mediante real-time PCR (A) se cuantificó el RNAm de COFILINA 1 y  $\beta$ -actina (control endógeno). B, análisis por Western blot de la expresión proteica de COFILINA 1 y GAPDH (control endógeno). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \*  $p < 0,05$ , comparados con el control.

### Ejemplos de realización de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos no son limitativos. Tienen carácter informativo y en ningún caso limitante de las metodologías empleadas, las cuales pueden ser alteradas con el fin de alcanzar unos resultados similares.

En esta memoria descriptiva los símbolos y convenciones usadas en estos procedimientos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en el Sistema Internacional y la bibliografía científica contemporánea, por ejemplo, el Journal of Medicinal Chemistry. Salvo que se indique otra cosa, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, se pueden usar las siguientes abreviaturas en los ejemplos y a lo largo de toda la memoria descriptiva: g (gramos); mg (miligramos); Kg (kilogramos); mL (mililitros);  $\mu$ L (microlitros); mmol (milimoles); P.f. (punto de fusión); Hz (hertzio); MHz (megahertzio);  $\delta$  (desplazamiento químico); ppm (partes por millón); s (singlete); d (doblete); t (triplete); q (cuartete); c (quintuplete); m (multiplete); J (constante de acoplamiento); RMN (resonancia magnética nuclear); EM (espectrometría de masas); ES (electrospray);  $m/z$  (Relación masa/carga); Anal. (Análisis Elemental); Rto (Rendimiento); TEA (trietilamina);  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (diclorometano);  $\text{CDCl}_3$  (cloroformo deuterado); DMSO (dimetilsulfóxido); i.p. (administración parental). Todas las temperaturas se expresan en  $^{\circ}\text{C}$  (grados Celsius).

#### Ejemplo 1

##### PC12

Las células PC12 de rata (glándula adrenal; feocromocitoma) se cultivaron en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero de caballo inactivado con calor, 5% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin, en  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^{\circ}\text{C}$ , según el manual del banco de origen de la línea celular y publicaciones anteriores (*J Neurochem.* **2007.** 103:1396-1407).

##### SH5Y5Y

La línea celular SH-SY5Y procede de una neuroblastoma clonado artificialmente a partir de un grupo de células que expresaban un fenotipo característico (*Cancer Res.* **1978.** 38: 3751-3757). Esta línea celular es genéticamente femenina porque la línea original se estableció en 1970 a partir de una biopsia de metástasis ósea de un neuroblastoma que padecía una niña de 4 años. Las células poseen una anomalía en el cromosoma 1, donde se encuentra una trisomía 1q. Las células SH-SY5Y se conocen por ser dopamina beta-hidroxilasa activas, acetilcolinérgicas, glutaminérgicas y adenosinérgicas. La células se propagan por mitosis y por extender neuritas a las áreas periféricas. Se cultivaron en una combinación 1:1 de medio de cultivo DMEM y medio de cultivo HAM'S-F12, suplementado con 10% de FBS, 2 mM de glutamina, 0,5 mg/ml de neomicina, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin según el manual del banco de origen de la línea celular.

##### LnCaP

Las células LnCaP (ATCC CRL 1740) son una línea celular bien caracterizada de Carcinoma de Próstata humano. Se cultivaron en medio RPMI-1640 con FBS al 10%, 2 mM de glutamina, y antibióticos (penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), según el manual del banco de origen de la línea celular y publicaciones anteriores (*Life Sci.* **2009.** 85:421-430).

##### Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata

El cultivo de neuronas granulares del cerebelo se obtuvieron conforme a protocolos descritos previamente (*J Neurochem.* **2007.** 103: 1396-407; *Brain Res De y Brain Res.* **1991.** 63: 1-12), con pequeñas modificaciones. Brevemente, crías de 7 días de edad de la cepa Spragle-Dawley fueron decapitadas rápidamente y se extrajeron los cerebros cuidadosamente. Separamos el cerebelo asépticamente, quitamos las meninges y se cortó el cerebelo en trozos de unos 0,4 mm. A continuación, se expuso el tejido a tripsina y DNAsa en un medio de cultivo libre de calcio y magnesio y se sembraron en placas de cultivo pretratadas con poli-lisina. Las células se cultivaron en medio BME suplementado con 24,5 mM de potasio, 2 mM de glutamina, 10% de FBS y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de gentamicina. A las 24 horas, Ara-C (cytosine arabinoside) se añadió al medio para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  para reducir el crecimiento de

## ES 2 370 638 A1

astrocitos. Las células se utilizaron no antes de 7 días tras el cultivo, que es el tiempo que necesitan para terminar de diferenciarse.

### *Cultivos primarios de neuronas corticales de rata*

El cultivo primario de neuronas corticales se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente (*Eur J Neurosci.* **2001.**; *13*: 1469-78). Los lóbulos corticales frontolaterales se disecaron en fetos de 17 días de ratas hembra de la cepa Spragle-Dawley y se disociaron mecánicamente en HBSS. Los lóbulos corticales se trituraron pipeteando unas diez veces con una pipeta Pasteur. Después de centrifugar 5 minutos a 800×g, las células se resuspendieron en medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células se sembraron en placas de cultivo pretratadas con poli-lisina y se utilizaron no antes de 7 días tras el cultivo, que es el tiempo que necesitan para terminar de diferenciarse y que aparezcan receptores de glutamato.

### *Formación de los complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA*

Los complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA se formaron mezclando cantidades iguales de volumen de la solución que contenía compuesto de fórmula general (I)- y de la que contenía el siRNA (*Org Biomol Chem.* **2007.** *5*: 1886-1893; *Pharm Res.* **2009.** *26*: 1181-1191), e incubando la mezcla en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Ambas moléculas se disolvieron en agua DEPC (libre de RNAsas).

### *Experimentos de retardo en gel, exclusión con heparina y efecto protector del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA a la acción de RNAsas*

El retardo en gel de agarosa se utilizó para averiguar el ratio N/P (aminas nitrogenadas en compuesto de fórmula general (I)-/fosfatos en siRNA) adecuado para obtener la mayor efectividad de unión posible entre ambas moléculas (*Mol Biol Rep.* **2009.** *36*: 1083-1093; *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **2008.** *147B*: 769-777). Se testó la mezcla de distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I)- y de 250 ng de siRNA. La mezcla se corrió durante 15 minutos a 60 V en un gel de agarosa al 1,2% con 0,017% de bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron y las bandas se cuantificaron con un sistema de análisis de imagen apropiado (Quantity One).

Los experimentos de desplazamiento con heparina se realizaron para evaluar la fuerza de unión entre compuesto de fórmula general (I) y el siRNA. Los complejos se prepararon con un ratio N/P de 12:1, que se consideró óptima para asegurar un acoplamiento completo del siRNA con el compuesto de fórmula general (I). Luego, fueron incubados con 0,78; 1,52; 3,04; 6,08; 12,48 y 24,32 µg de heparan sulfato a 37°C durante 1 hora. Las soluciones se corrieron en un gel de agarosa en las mismas condiciones que el test de ratios compuesto de fórmula general (I)-siRNA antes descrito.

Para los experimentos de evaluación del efecto protector del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA, los complejos con un ratio N/P de 12:1 se incubaron, en vez de con distintas cantidades de heparan sulfato, con 0,25% de RNasa A durante 30 minutos a 37°C. A continuación, las muestras se incubaron con exceso de heparan sulfato para asegurar una liberación completa del siRNA del complejo. El porcentaje de siRNA intacto se analizó por electroforesis en geles de agarosa en las mismas condiciones que los experimentos anteriormente descritos.

Se realizaron un mínimo de 2 experimentos para cada una de las pruebas anteriormente descritas.

### *Estudios de Citotoxicidad*

Pruebas para evaluar la toxicidad del compuesto de fórmula general (I)- se realizaron en distintos tipos celulares, determinando la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (*Pharm Res.* **2009.** *26*: 1181-1191). Para ello, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y se expusieron a soluciones con diferentes concentraciones de compuesto de fórmula general (I)-(5-80 µM) para realizar curvas de toxicidad concentración-dependiente durante 24, 48 o 74 horas. Los efectos tóxicos se evaluaron midiendo la ruptura de la membrana celular y la consiguiente liberación de la LDH al sobrenadante a través del kit CytoTox96® (Promega). Las células se despegaron mecánicamente, se lavaron con PBS y fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. La absorbancia del lisado y del sobrenadante celular se midió utilizando un espectrofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

La toxicidad de los tratamientos con los complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA, utilizando distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I)- (1-8 µM) en combinación con 100 nM de siRNA, se estudió por citometría de flujo. Para ello, después de los tratamientos, las células se incubaron con yoduro de propidio 0,5 mg/ml al menos durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Seguidamente, las células se tripsinizaron y se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental, se calculó el porcentaje de células con la membrana citoplasmática dañada (yoduro de propidio positivas) (Weber N *et al.*, 2008; Perumal OP *et al.*, 2008).

*Estudio del porcentaje de translocación del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA al interior celular*

Después de 24-72 horas con las células en presencia de los complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA, utilizando 100 nM de siRNA fluorescente para realizarlos, se recogieron los medios condicionados y las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Las células totales - vivas y muertas - presentes en la suspensión resultante al juntar el tripsinizado celular y el medio condicionado se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental se calculó el porcentaje de células transfectadas con siRNA fluorescente (*J Control Release*. **2008**. 132: 55-64; *Biomaterials*. **2008**. 29:3469-76).

La translocación del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA también se estudió por microscopía confocal. Para esto, las células se sembraron en cubreobjetos y se trataron del mismo modo que las muestras anteriores. Las células tratadas con siRNA fluorescente, sólo o formando complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA, se visualizaron y fotografiaron en un microscopio confocal (Nikon Eclipse TE200) utilizando la longitud de onda adecuada para la excitación del fluoróforo con el que el siRNA está marcado (*Pharm Res*. **2009**. 26: 577-86). Los resultados sirvieron para determinar el porcentaje de células positivas para la transfección intracelular de siRNA.

*Estudio del silenciamiento génico por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real-time PCR)*

El ARN total celular se aisló mediante un método estándar con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (TriPure Isolation Reagent, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN). El ARN se transformó en cDNA y éste se utilizó para realizar la real-time PCR. Utilizamos la real-time PCR para estudiar el silenciamiento de distintos genes por medio de 100 nM de siRNA vehiculizado con distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I). El gen beta-actina se utilizó como gen de referencia para todos los experimentos de real-time PCR. La reacción se realizó utilizando procedimientos estándar para la StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

En cada experimento, se calculó la media del ciclo umbral [cycle threshold ( $C_T$ )] de los triplicados de cada uno de los genes estudiados y del gen utilizado como referencia, pudiendo así comparar la expresión génica tras los diferentes tratamientos (*Pharm Res*. **2009**. 26: 577-86.; *Cancer Res*. **2007**. 67: 8156-8163).

*Evaluación del grado de silenciamiento proteico por Western blot*

Los extractos celulares se obtuvieron por lisado en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%, deoxicolato sódico al 1% y SDS al 0,1% e inhibidores de proteasas (aprotinina 5  $\mu$ g/ml y PMSF 1 mM). Una vez lisadas las células se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. La concentración de proteína presente en el sobrenadante, se determinó por el método de Bradford (Pierce; Rockford, IL, EEUU), usando seroalbúmina bovina como estándar. Las muestras conteniendo 40  $\mu$ g de proteína total se aplicaron en cada pocillo de geles de poliacrilamida al 10-15% según la proteína a estudiar. Los geles se transfirieron por electroforesis a membranas de nitrocelulosa usando un "blotter" semi-seco. Las proteínas unidas a nitrocelulosa se visualizaron con Poinceau, seguidas de bloqueo con TTBS (50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1% Tween) con 5% de leche desnatada y, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche a 4°C. Tras lavados en TTBS, se aplicó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó por quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas se analizó por niveles de gris con un sistema de análisis de imagen apropiado (Quantity One) (*Pharm Res*. **2009**. 26: 1181-1191).

*Resultados**Experimentos de retardo en gel, exclusión con heparina y efecto protector del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA a la acción de RNAsas*

Se incuban, durante 30 minutos a temperatura ambiente, en un volumen final de 50  $\mu$ l en un tubo Eppendorf, 2,5  $\mu$ l de siRNA 40  $\mu$ M para dar una concentración final de 2  $\mu$ M conteniendo un total de  $6,02 \times 10^{11}$  cargas negativas junto con una concentración del dendrímero compuesto de fórmula general (I) suficiente para dar una relación nitrógeno del dendrímero/fosfato de siRNA (N/P) de 6:1 y se va incrementando la cantidad de dendrímero manteniendo fija la cantidad de siRNA hasta llegar a una relación P/N de 384:1 (figura 1). Tras la incubación, se someten las muestras a una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 15 minutos a 60 V, se incuba con bromuro de etidio y se visualiza el siRNA con luz ultravioleta. Como puede observarse en la figura 1, a una relación P/N de 12:1 (concentración de compuesto de fórmula general (I) de 22  $\mu$ M) todo el siRNA queda fijado por el dendrímero y no se desplaza en el gel.

*Ejemplo 2**Síntesis de un compuesto de fórmula general (I)*

En todas aquellas reacciones que requerían atmósfera inerte (argón) se emplearon técnicas estándar de Schlenk.

Para las reacciones en atmósfera inerte tanto el tetrahidrofurano (THF) como el diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), de grado CHROMASOLV® (Aldrich), fueron purificados previamente utilizando un sistema de purificación de disolventes

fabricado por Innovative Technology. La etilendiamina se secó a temperatura ambiente sobre hidruro cálcico durante 2 horas, se filtraron y se destilaron a presión reducida (30-40 mm de Hg), almacenándose sobre tamiz molecular (4 Å). El MeOH se secó sobre óxido de calcio, se filtró y se destiló almacenándose sobre tamiz molecular (4 Å). El resto de disolventes se utilizó sin purificación previa.

5

### 2.1. Esquema de síntesis

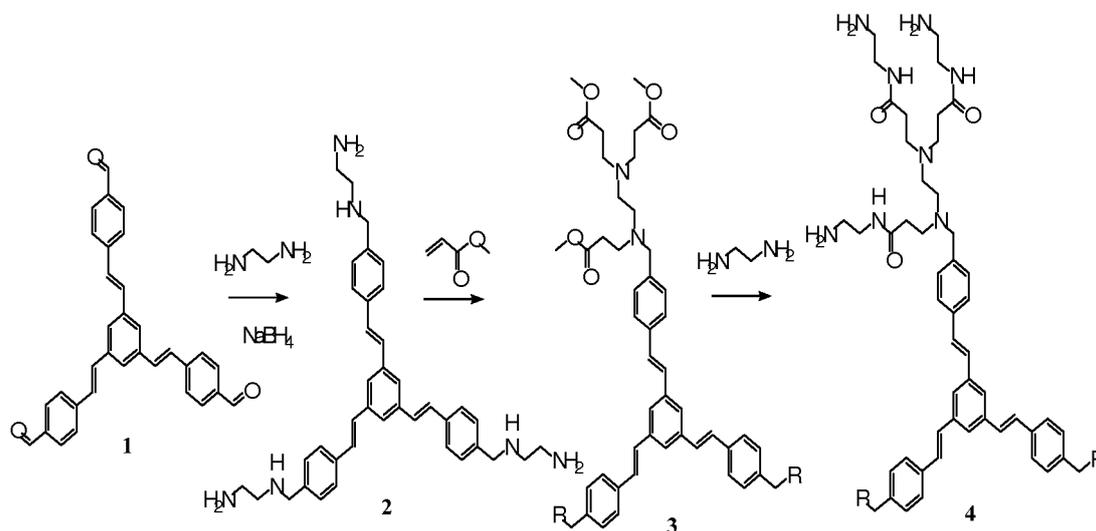
10

15

20

25

30



El compuesto 1 es preparado de acuerdo con *Synthesis, Characterization, and Optical Response of Dipolar and Non-Dipolar Poly(phenylenevinylene) Dendrimers*. J. J. Org. Chem. 2001, 66(17), 5664-5670.

35

### 2.2 Síntesis de Compuesto 2

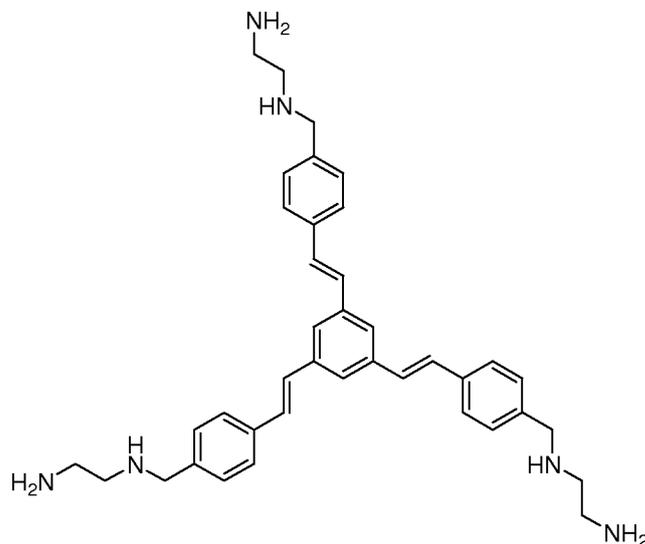
40

45

50

55

60



65

Sobre una disolución que contiene al trialdehído 1 (300 mg, 0.64 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (50 mL) con tamiz molecular seco, bajo argón, se adicionó gota a gota la etilendiamina (8.6 mL, 128 mmol). La reacción se agitó durante 30 minutos y se filtró el tamiz molecular. A la disolución se adicionó, bajo argón, en primer lugar el borohidruro sódico (145 mg, 3.84 mmol) y, a continuación 10 mL de MeOH anhidro. Se deja reaccionar durante dos horas. A continuación se elimina el disolvente a vacío y se realizan 3 ciclos de disolución-evaporación con una mezcla de tolueno/MeOH en relación 9:1 (10 mL) y una final con 10 mL de MeOH. Seguidamente el sólido blanco resultante es lavado y centrifugado con 3 fracciones de agua de 5 mL, y el sólido es disuelto en  $\text{CHCl}_3$  y secado

## ES 2 370 638 A1

con  $\text{MgSO}_4$  durante 2 horas. Tras filtrar y eliminar el disolvente a vacío el compuesto se purificó mediante lavado en caliente con THF obteniéndose 351 mg (0.58 mmol) (91%) del compuesto deseado como un sólido de color blanco.

5  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$ : 2.73 (t, 6H,  $J=6$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 2.83 (t, 6H,  $J=6$  Hz,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ), 3.79 (s, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 7.21 (A de  $\text{AB}_q$ , 3H,  $J=16.5$  Hz,  $3\times\text{CH}=\text{}$ ), 7.29 (B de  $\text{AB}_q$ , 3H,  $J=16.5$  Hz,  $3\times\text{CH}=\text{}$ ), 7.37 (A de  $\text{AB}_q$ , 6H,  $J=7.5$  Hz,  $6\times\text{ArH}$ ), 7.58 (B de  $\text{AB}_q$ , 6H,  $J=7.5$  Hz,  $6\times\text{ArH}$ ), 7.63 (s, 3H, ArH).

10  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$ : 140.27 (C), 139.62 (C), 137, 85 (C), 129.98 (CH), 129.92 (CH), 129.30 (CH), 127.78 (CH), 124.90 (CH), 53.82 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 50.59 ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ), 41.09 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ).

### 2.3. Síntesis de Compuesto 3

15

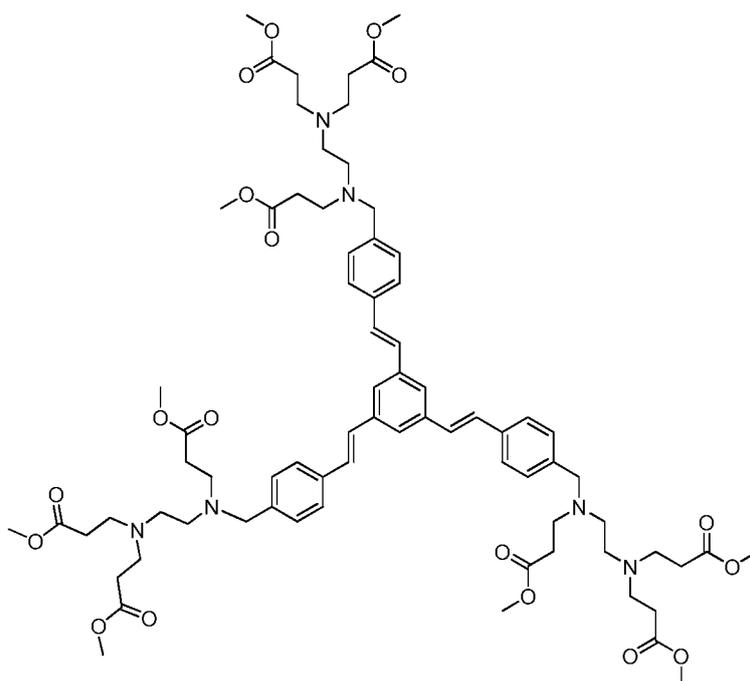
20

25

30

35

40



45

Una disolución del compuesto 2 (0.250 g, 0.416 mmol) en MeOH (20 mL) fue enfriada a  $0^\circ\text{C}$  en un baño de hielo. Una vez alcanzada esta temperatura se adicionó lentamente el acrilato de metilo (3.06 g, 35.53 mmol) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 días. A continuación se eliminó el disolvente y el exceso de acrilato de metilo a vacío, el compuesto se purificó mediante lavado en caliente con THF dando lugar a 0.324 g (57%) del producto buscado como un sólido de color blanco.

50

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 2.41 (t, 12H,  $J=7$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 2.49 (t, 6H,  $J=7$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 2.54 (s, 12H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ ), 2.74 (t, 12H,  $J=7$  Hz,  $-\text{N}-\text{CH}_2-$ ), 3.61 (s, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 3.65 (s, 18H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.67 (s, 9H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 7.14 (A de  $\text{AB}_q$ , 3H,  $J=16.5$  Hz,  $3\times\text{CH}=\text{}$ ), 7.20 (B de  $\text{AB}_q$ , 3H,  $J=16.5$  Hz,  $3\times\text{CH}=\text{}$ ), 7.31 (A de  $\text{AB}_q$ , 6H,  $J=8.5$  Hz,  $6\times\text{ArH}$ ), 7.50 (B de  $\text{AB}_q$ , 6H,  $J=8$  Hz,  $6\times\text{ArH}$ ), 7.55 (s, 3H,  $3\times\text{ArH}$ ).

55

$^{13}\text{C}$  RMN, DEPT y gHSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 173.01 ( $-\text{CO}-$ ), 172.94 ( $-\text{CO}-$ ), 139.16 (C), 138.08 (C), 135.65 (C), 129.05 ( $3\times\text{CH}=\text{}$ ,  $6\times\text{ArH}$ ), 127.88 ( $3\times\text{CH}=\text{}$ ), 126.42 ( $6\times\text{ArH}$ ), 123.72 ( $3\times\text{ArH}$ ), 58.69 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 52.12 ( $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ ), 51.93 ( $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$ ), 51.52 (CH<sub>3</sub>), 49.50 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 49.63 ( $-\text{N}-\text{CH}_2-$ ), 32.66 ( $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 32.52 ( $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ).

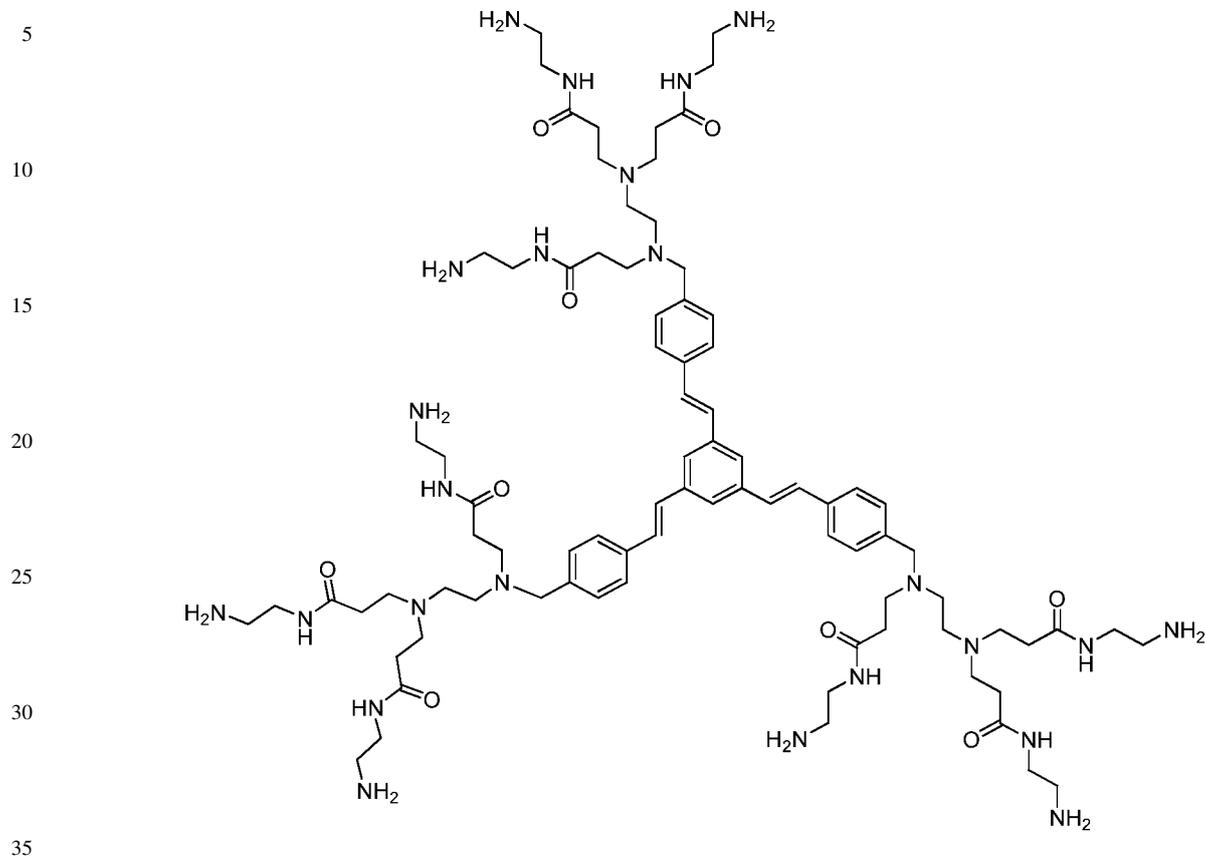
60

IR  $\nu$ :  $1734\text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CO}_2^-$ ).

MALDI-TOF m/e: 1375.43 (M+H)<sup>+</sup> y 1397.45 (M+Na)<sup>+</sup>.

65

## 2.4. Síntesis de Compuesto 4: (IR8)



Una disolución del compuesto 3 (324 mg, 0.236 mmol) en etilendiamina (10 mL) fue agitada 48 horas a temperatura ambiente. A continuación se eliminó el disolvente a vacío y se realizaron 3 ciclos de disolución-evaporación con una mezcla de tolueno/MeOH en relación 9:1 (10 mL) y una final con 10 mL de MeOH. El compuesto se purificó mediante lavado en caliente con THF y se obtuvieron 384 mg (85%) del compuesto 4 como un sólido blanco.

40

45

50

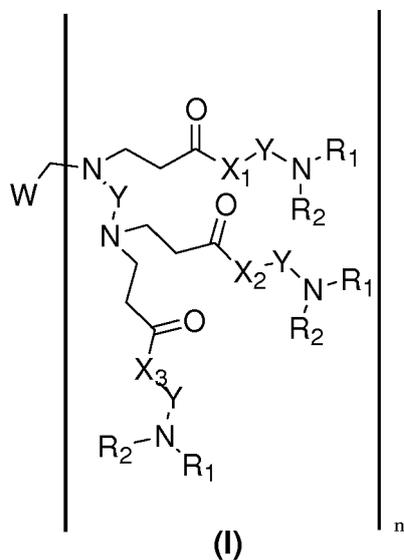
55

60

65

## REIVINDICACIONES

## 1. Compuesto de fórmula general (I)



30 o una sal, prodroga o solvato del mismo;

donde:

35 W se selecciona del grupo formado por cualquier polímero o dendrímero derivado de polifenilenvinileno, polifenil-  
 lenetilideno o híbrido de ambos, cualquier compuesto orgánico conjugado que combine dobles enlaces, triples enlaces  
 o una composición de ambos en su estructura, cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las  
 anteriores, cualquier compuesto orgánico conjugado que alterne en su estructura dobles enlaces, triples enlaces o una  
 40 combinación de ambos con anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piri-  
 dina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con  
 grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico no conjugado que contenga  
 anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas  
 aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodonadores o  
 electroattractores de las anteriores o cualquier combinación de los mismos;

45  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son iguales o diferentes y se seleccionan entre cualquier heteroátomo,

Y se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado ( $C_2$ - $C_{12}$ ) o cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalquenilo,  
 arilo o heteroarilo,

50  $R_1$  y  $R_2$  son iguales o diferentes unidos a un grupo amino primario, secundario o terciario y se seleccionan de entre  
 hidrógeno, alquilo saturado o insaturado ( $C_1$ - $C_{12}$ ), cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalquenilo, arilo o heteroarilo,

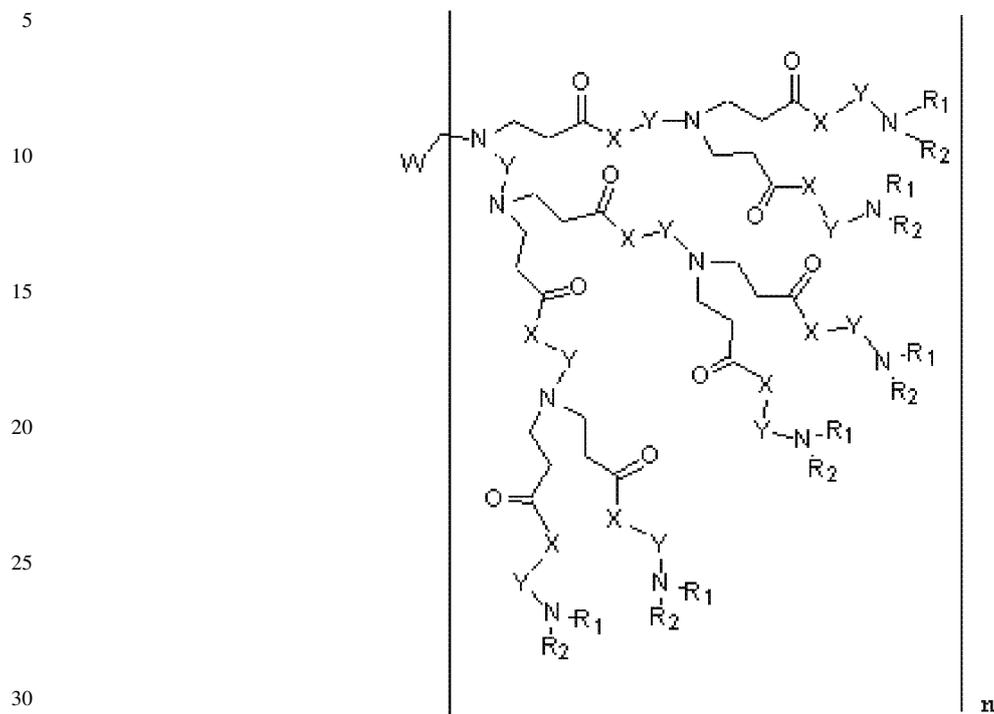
n representa el número de ramificaciones y es un número entero seleccionado entre 1 y 10.

55

60

65

2. Compuesto de fórmula general (II) según las reivindicaciones 1



(II)

35 o una sal, prodroga o solvato del mismo;

donde:

40 W se selecciona del grupo formado por cualquier polímero o dendrímero derivado de polifenilvinileno, polifenil-  
 lenetilideno o híbrido de ambos, cualquier compuesto orgánico conjugado que combine dobles enlaces, triples enlaces  
 o una composición de ambos en su estructura, cualquier sustitución con grupos electrodoadores o electroattractores de las  
 anteriores, cualquier compuesto orgánico conjugado que alterne en su estructura dobles enlaces, triples enlaces o una  
 45 combinación de ambos con anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piri-  
 dina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con  
 grupos electrodoadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico no conjugado que contenga  
 anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas  
 aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodoadores o  
 electroattractores de las anteriores o cualquier combinación de los mismos;

50  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son iguales o diferentes y se seleccionan entre cualquier heteroátomo,

55 Y se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado ( $C_2$ - $C_{12}$ ) o cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalquenoilo,  
 arilo o heteroarilo,

$R_1$  y  $R_2$  son iguales o diferentes unidos a un grupo amino primario, secundario o terciario y se seleccionan de entre  
 hidrógeno, alquilo saturado o insaturado ( $C_1$ - $C_{12}$ ), cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalquenoilo, arilo o heteroarilo,

60 n representa el número de ramificaciones y es un número entero seleccionado entre 1 y 10.

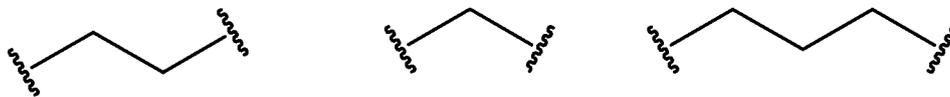
3. Compuesto de fórmula general (I) ó (II) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde pueden estar  
 en forma de sal y unidos electrostáticamente a trifluoroacetato, anión cloruro, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir,  
 cualquier fármaco, anticuerpo, sonda, para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen o cualquier  
 65 combinación de los mismos.

4. Compuesto de fórmula general (I) o (II) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son  
 iguales o diferentes y se seleccionan entre nitrógeno u oxígeno.

ES 2 370 638 A1

5. Compuesto de fórmula general (I) o (II) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde Y se selecciona entre:

5

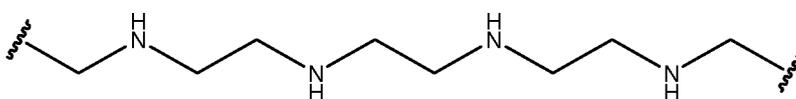


10



15

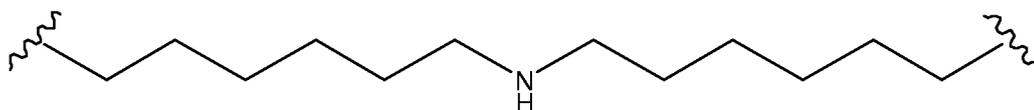
20



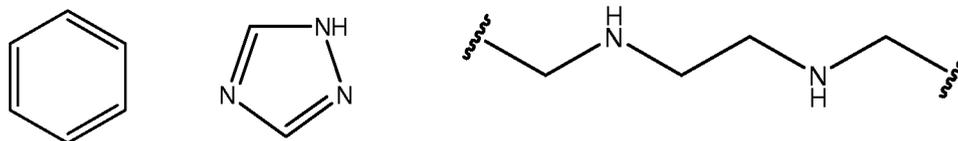
25



30

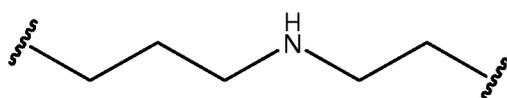


35



40

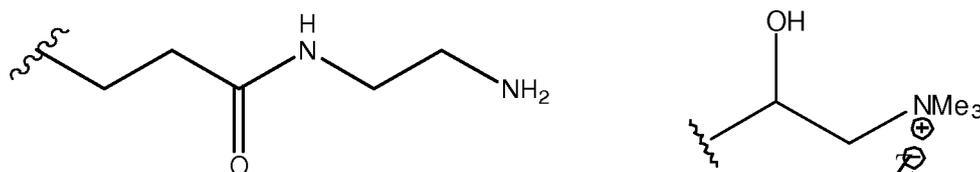
45



50

6. Compuesto de fórmula (I), ó (II) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, cualquier amina sustituida o no sustituida, aminoácidos básicos, derivados del colesterol, ácido fólico, ácido láctico, dexametasona, azúcares, agentes lisosomotrópicos, heterociclos nitrogenados, cadenas hidrofílicas derivadas de poli-etilenglicol, cualquier diacrilato, cualquier aminoácido básico y las siguientes estructuras:

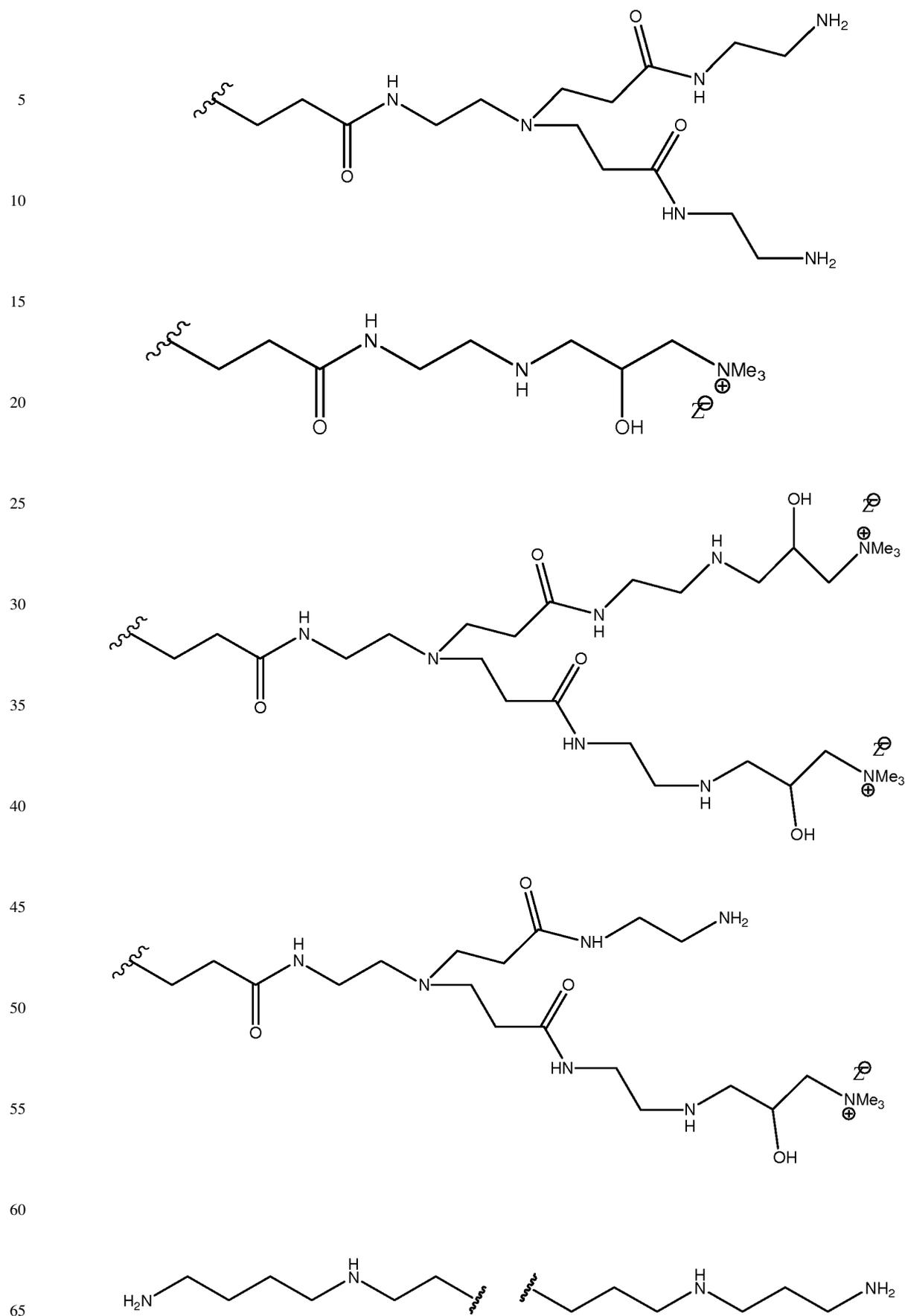
55



60

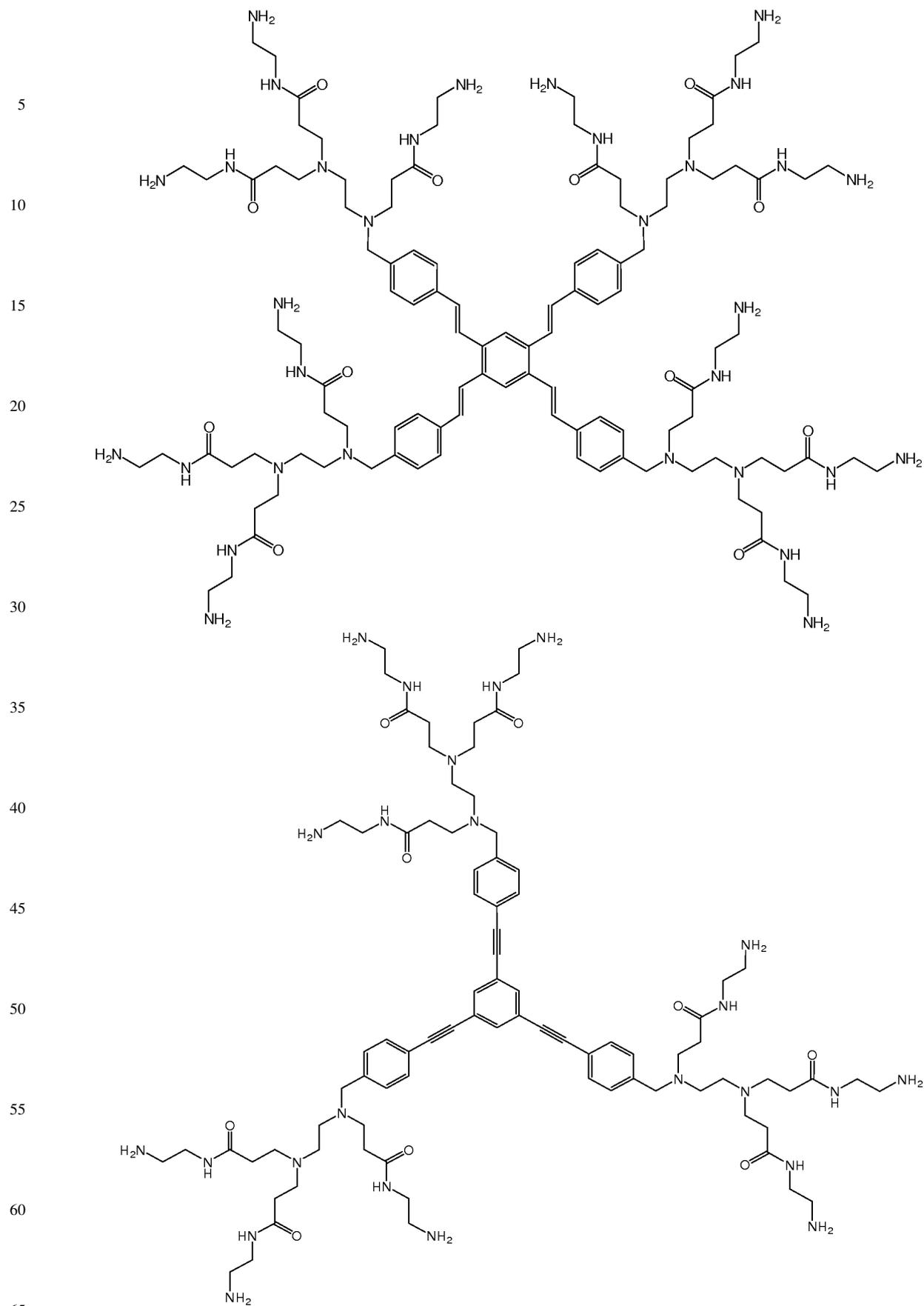
65

ES 2 370 638 A1





ES 2 370 638 A1



8. Composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 5 y 6 junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

ES 2 370 638 A1

9. Composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4 5 y 6, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

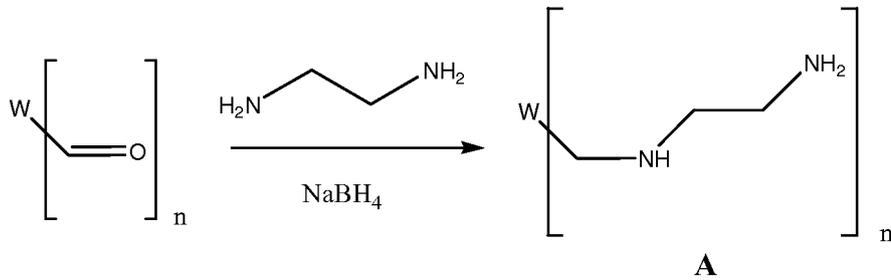
10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9 **caracterizada** porque comprende, además, uno o más principios activos.

11. Procedimiento de síntesis de los compuestos de fórmula general (I) **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

10

a.

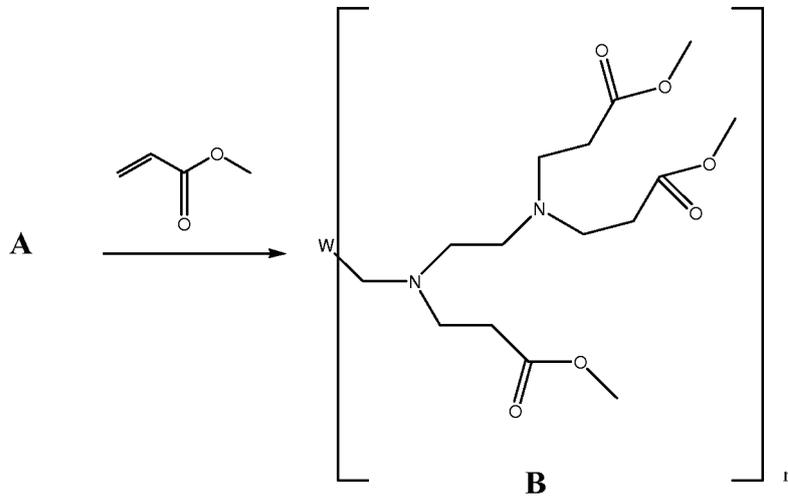
15



20

b.

25



30

35

40

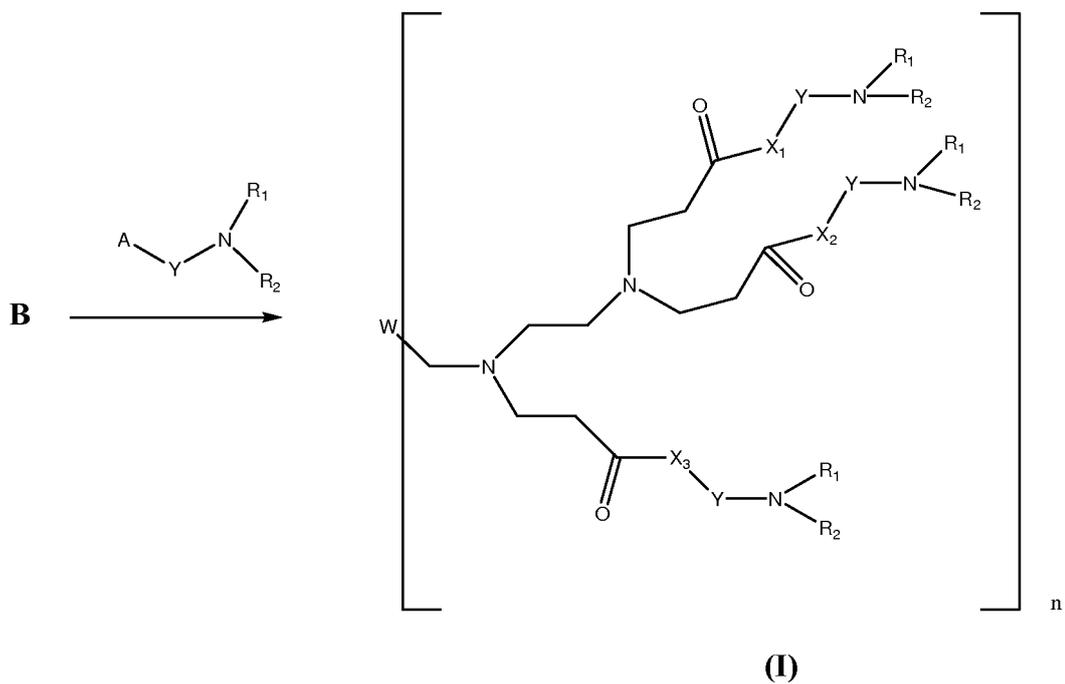
45

50

55

60

65



## ES 2 370 638 A1

donde:

5 W se selecciona del grupo formado por cualquier polímero o dendrímero derivado de polifenilenvinileno, polifenil-  
lenetilideno o híbrido de ambos, cualquier compuesto orgánico conjugado que combine dobles enlaces, triples enlaces  
o una composición de ambos en su estructura, cualquier sustitución con grupos electrodonadores o electroattractores de las  
anteriores, cualquier compuesto orgánico conjugado que alterne en su estructura dobles enlaces, triples enlaces o una  
combinación de ambos con anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piri-  
dina, bases heterocíclicas aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con  
10 grupos electrodonadores o electroattractores de las anteriores, cualquier compuesto orgánico no conjugado que contenga  
anillos aromáticos de fenilo, naftaleno, fenantreno, antraceno, pirrol, furano, tiofeno, piridina, bases heterocíclicas  
aromáticas como la citosina, uracilo, adenina, timina y guanina, o cualquier sustitución con grupos electrodonadores o  
electroattractores de las anteriores o cualquier combinación de los mismos;

15 A se selecciona entre  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$

$X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son iguales o diferentes y se seleccionan entre cualquier heteroátomo,

20 Y se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado ( $C_2$ - $C_{12}$ ) o cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalquenoilo,  
arilo o heteroarilo,

$R_1$  y  $R_2$  son iguales o diferentes unidos a un grupo amino primario, secundario o terciario y se seleccionan de entre  
hidrógeno, alquilo saturado o insaturado ( $C_1$ - $C_{12}$ ), cicloalquilo ( $C_3$ - $C_8$ ), cicloalquenoilo, arilo o heteroarilo, y

25 n representa el número de ramificaciones y es un número entero seleccionado entre 1 y 10.

12. Procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (II), donde se parte del compuesto de  
fórmula general (I) y se repiten todos los pasos a-c según la reivindicación 10.

30 13. Uso de un compuesto de fórmula general (I) ó (II) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la  
elaboración de un medicamento.

35 14. Uso del compuesto de fórmula (I) ó (II) según la reivindicación 13 para la elaboración de un medicamento  
para la prevención y/o tratamiento patologías como enfermedades del sistema nervioso, cualquier enfermedad que  
course con la aparición de tumores y las infecciones viriásicas, incluyendo las causadas por el virus del síndrome de  
inmunodeficiencia humano (SIDA).

40 15. Uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elabora-  
ción de un kit de transfección de siRNA en cultivos primarios de células nerviosas, glia, células tumorales y células  
primarias

16. Uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en terapia génica  
como vector no viral.

45 17. Uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración  
de sondas para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen.

50

55

60

65

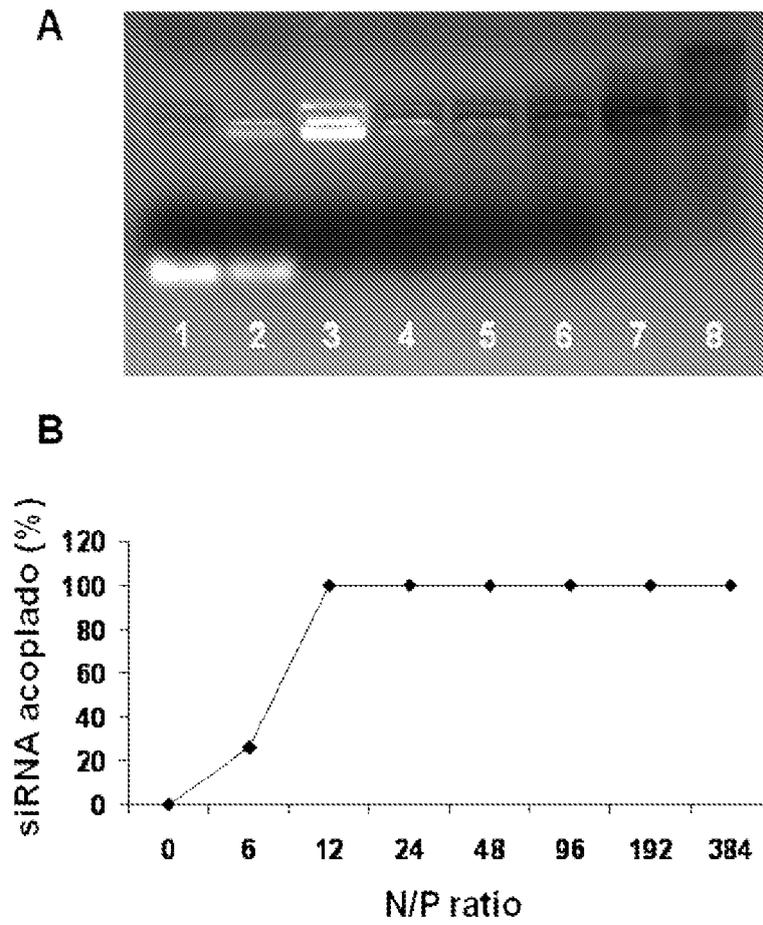


FIG. 1

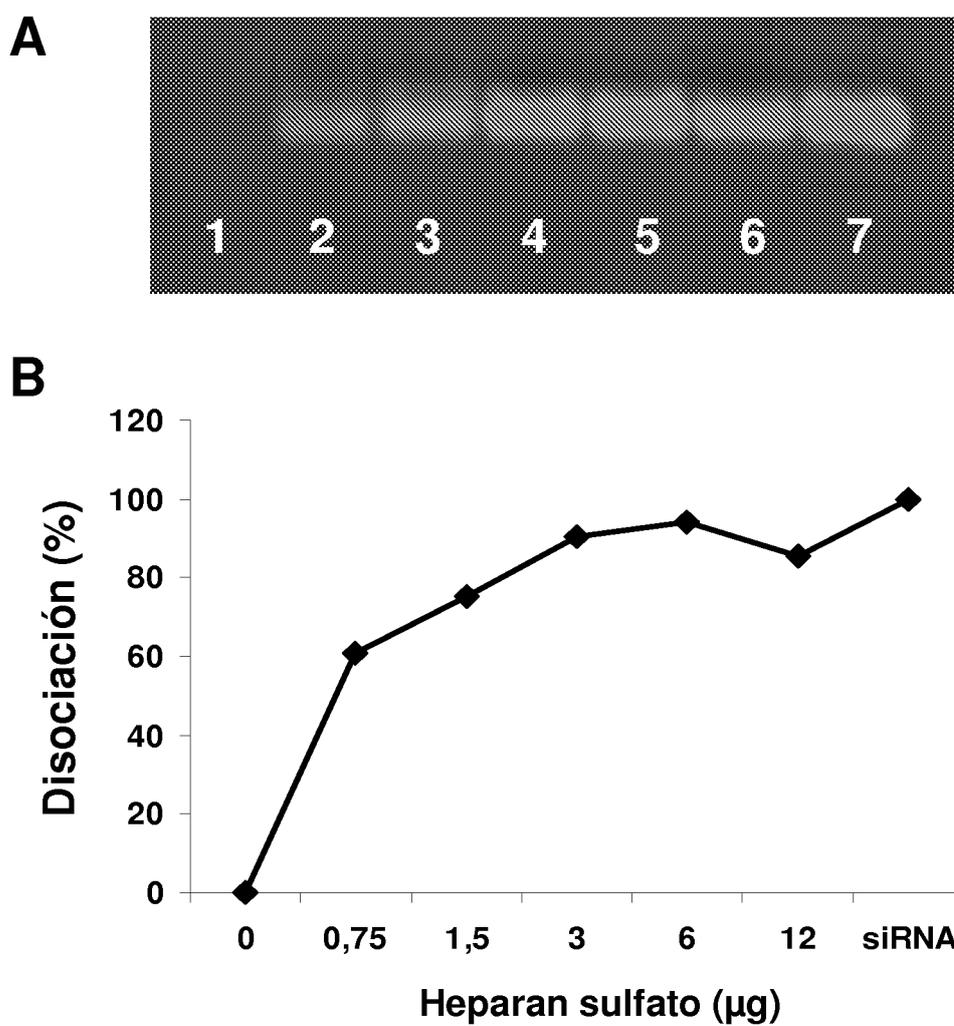


FIG. 2

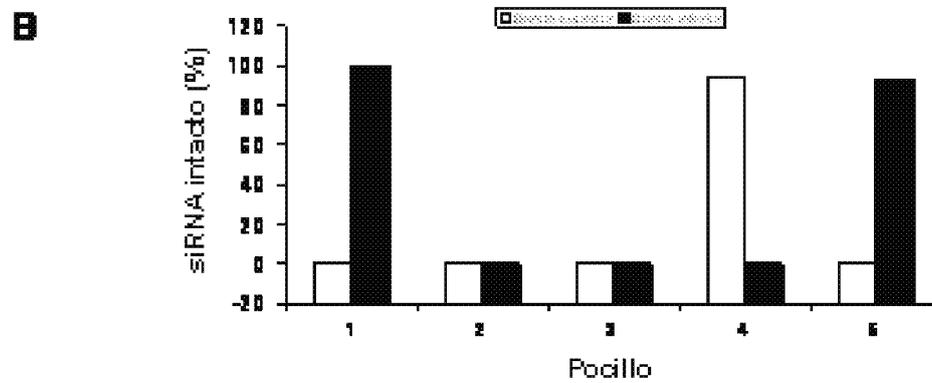
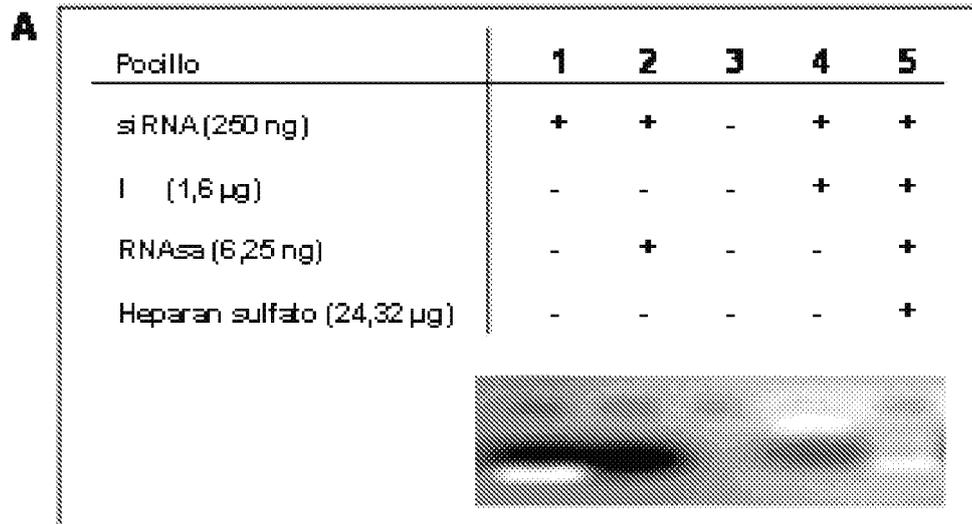


FIG. 3

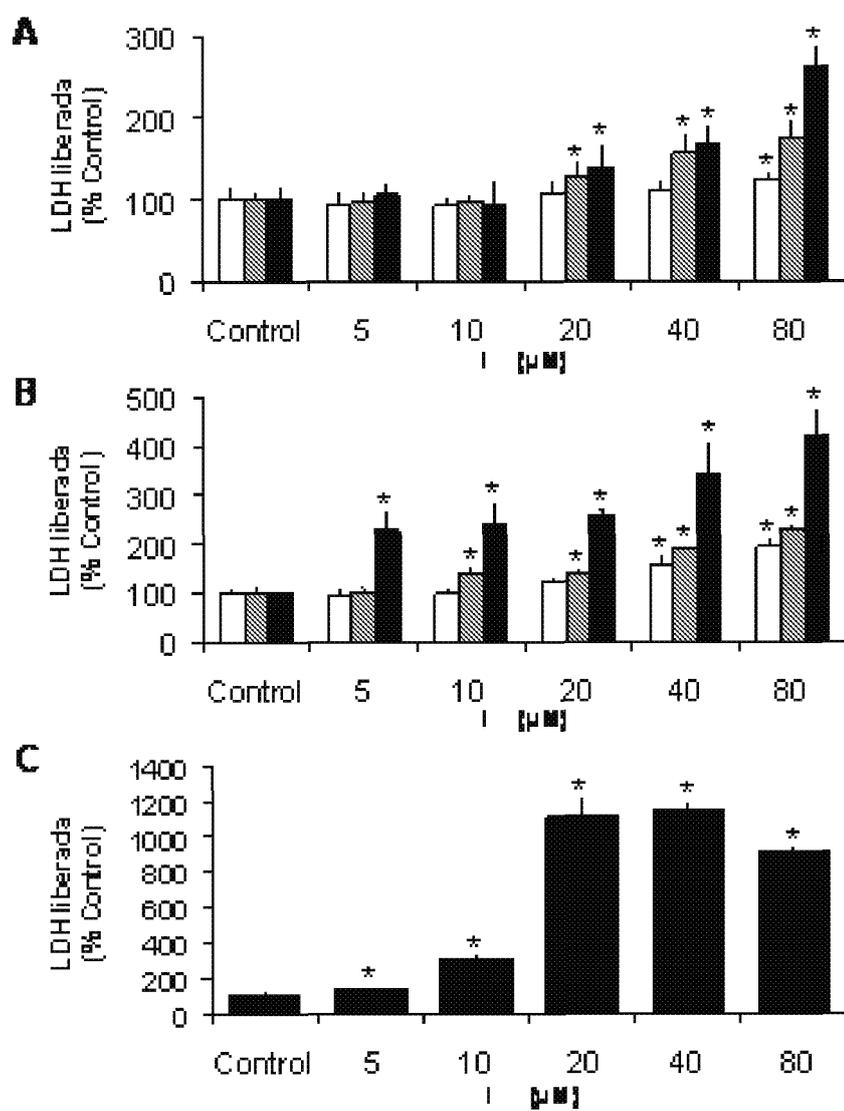


FIG. 4

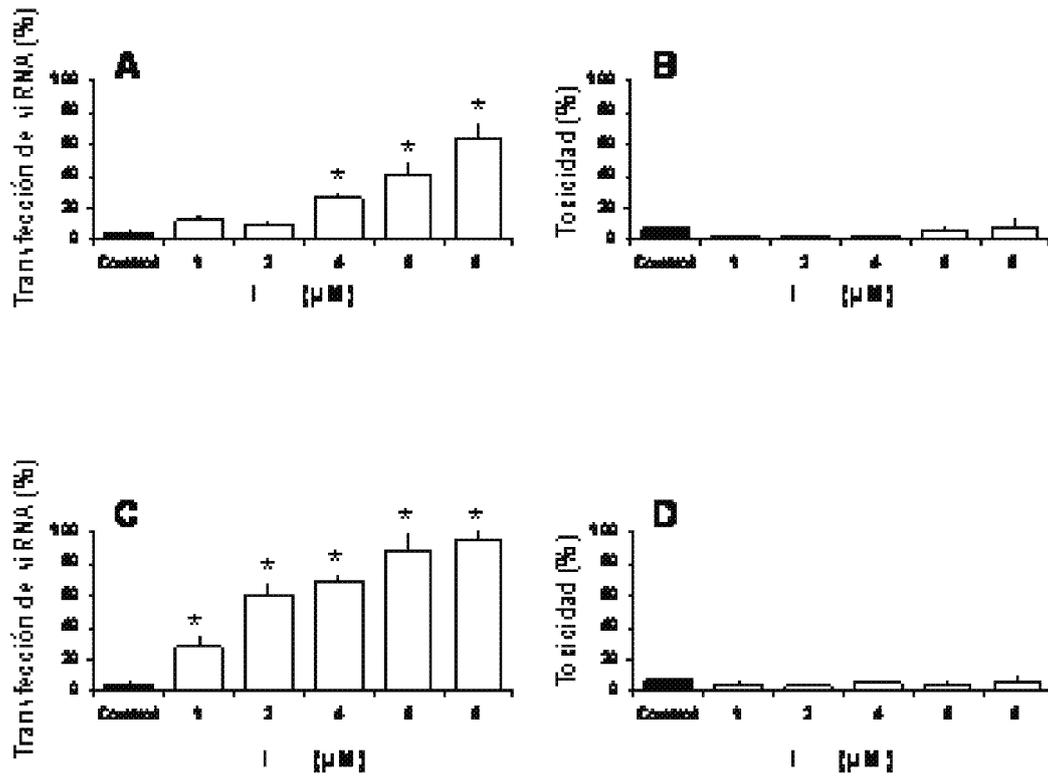


FIG. 5

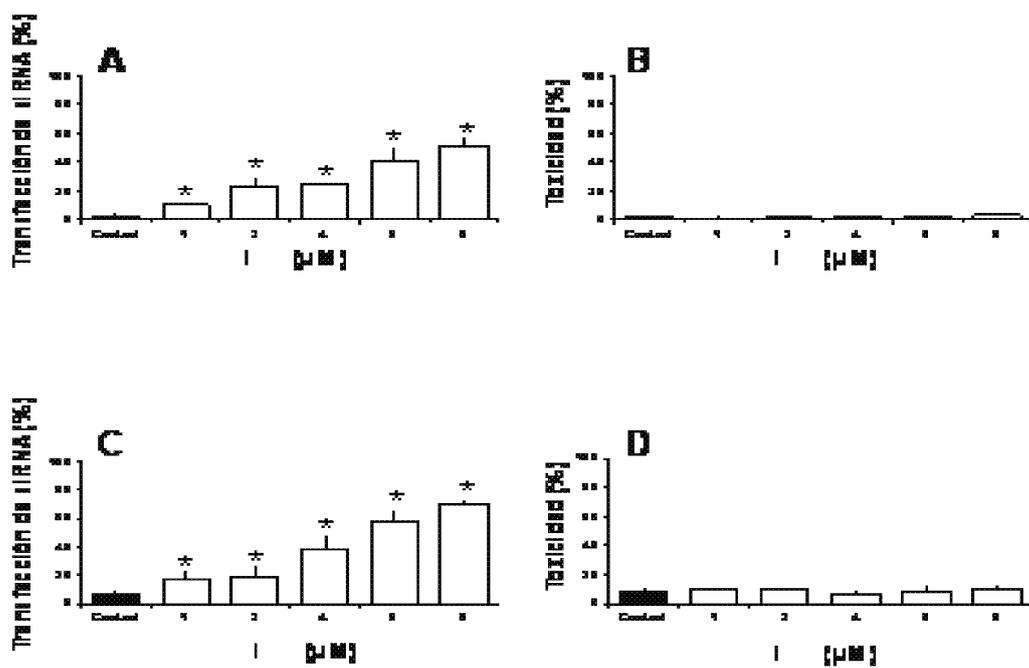


FIG. 6

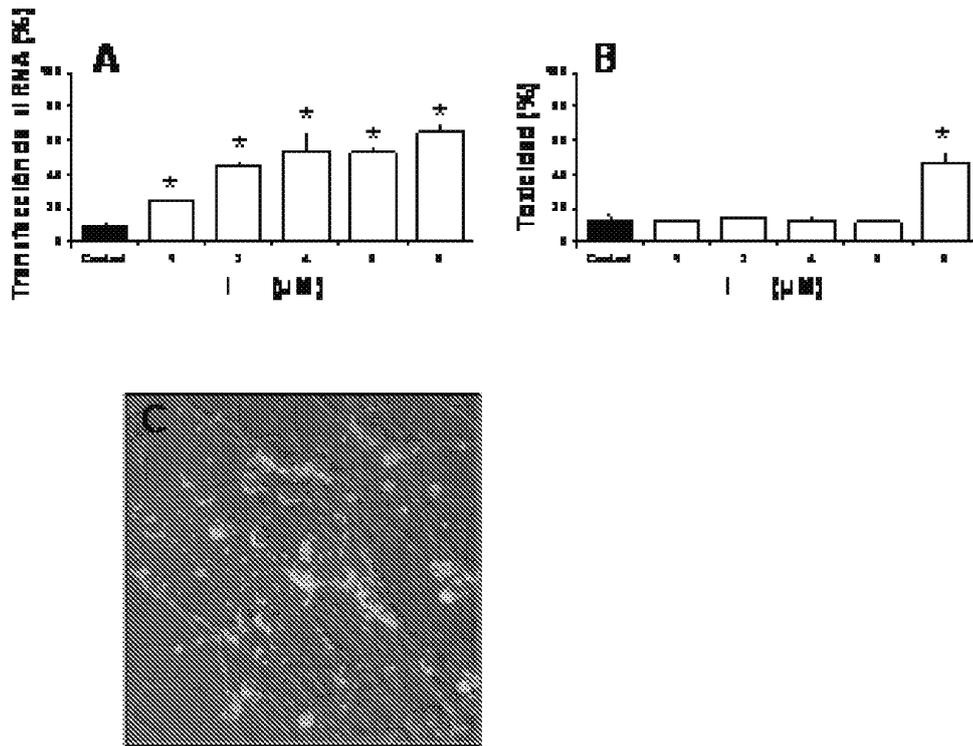


FIG. 7

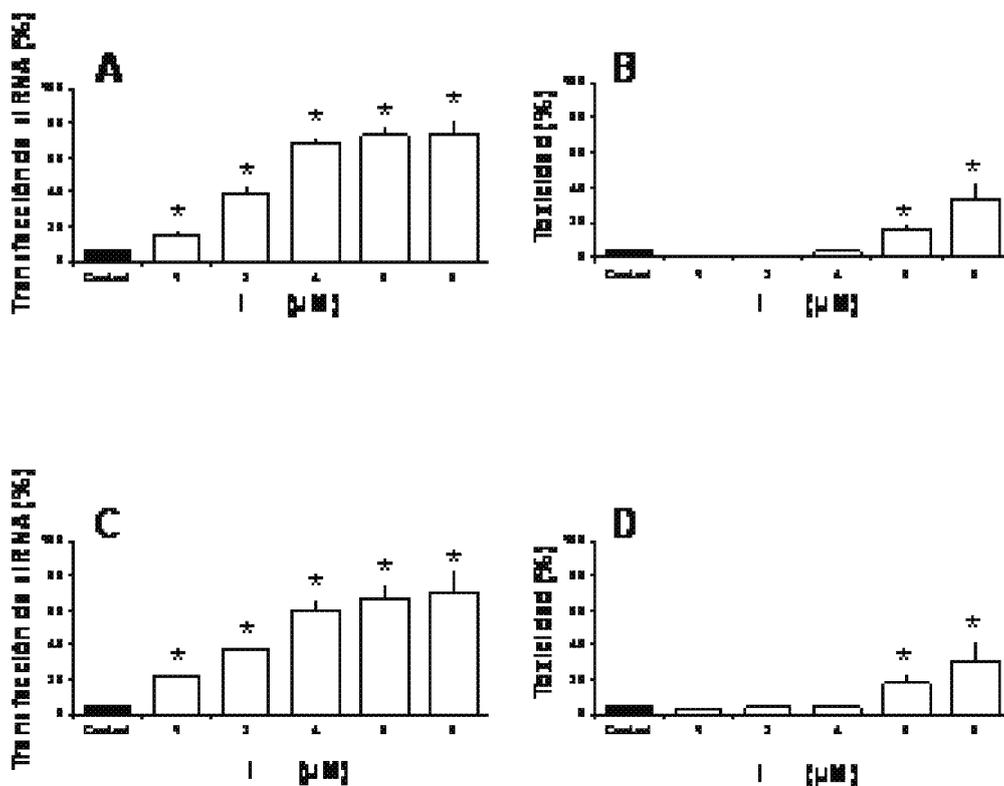


FIG. 8

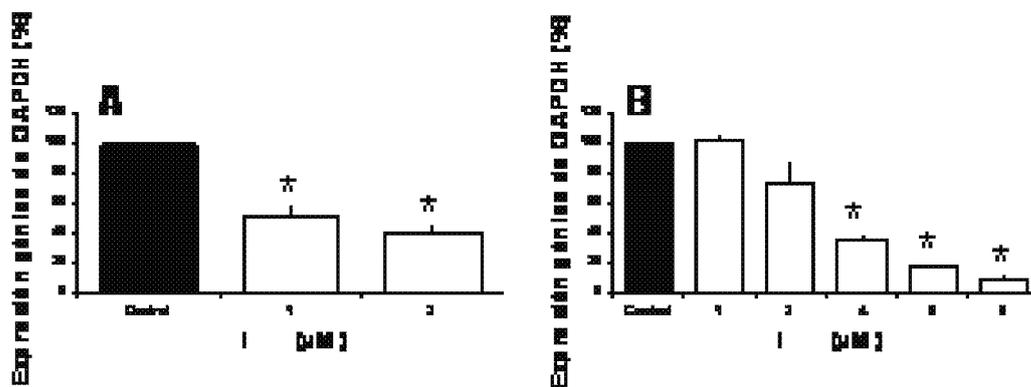


FIG. 9

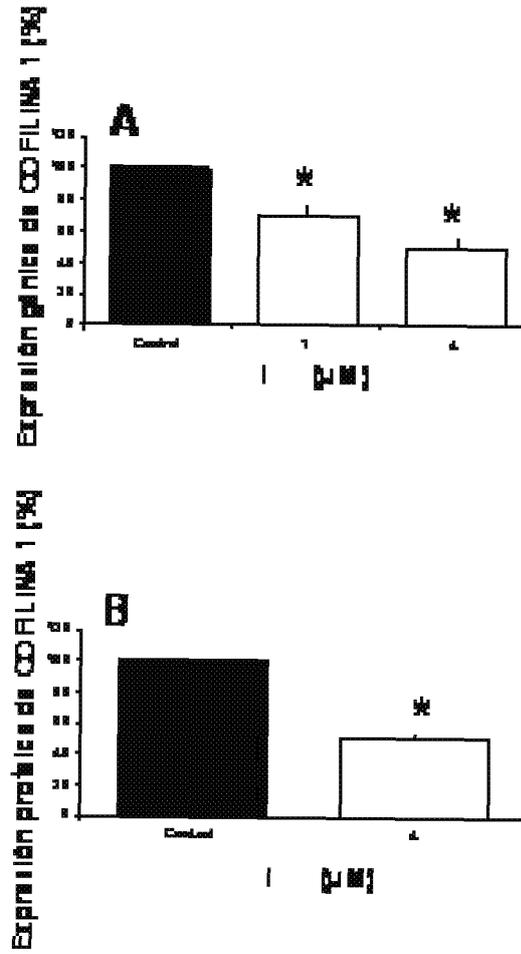


FIG. 10

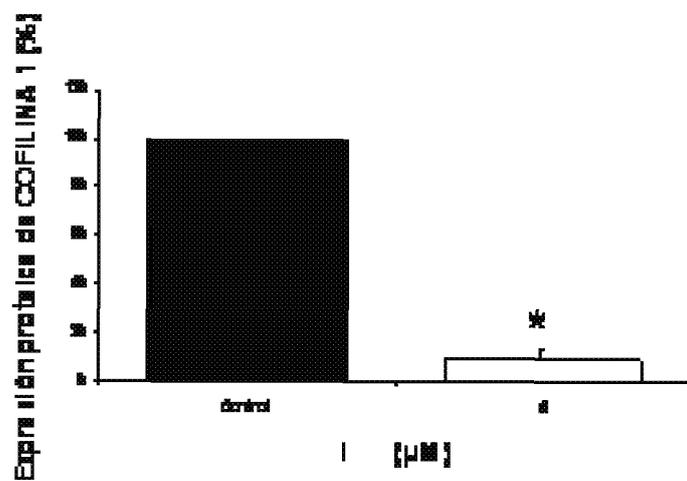
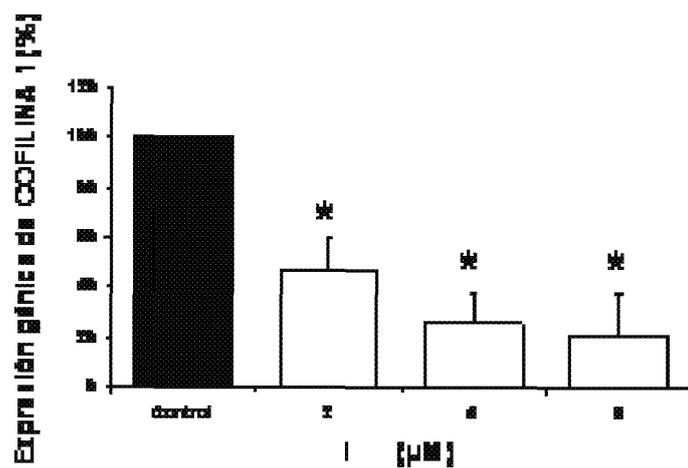


FIG. 11



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030322

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.03.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZHANG, X.-Q. et al. "In Vitro Gene Delivery Using Polyamidoamine Dendrimers with a Trimesyl Core". Biomacromolecules 2005, Volumen 6, páginas 341-350. [Disponible en línea el 01.12.2004]. Ver página 342, columna 1, párrafo 1; página 343, esquema 1.	1-6, 8-16
A	GUILLOT, M. et al. "Effects of structural modification on gene transfection and self-assembling properties of amphiphilic dendrimers". Organic & Biomolecular Chemistry 2006, Volumen 4, páginas 766-769. [Disponible en línea el 26.01.2006]. Ver página 1111, resumen; columna 1, párrafo 1; página 1117, figura 4; página 1112, columna 1, párrafo 3; página 1118, columna 2, párrafo 4.	1-17
A	GUILLOT-NIECKOWSKI, M. et al. "Dendritic vectors for gene transfection". New Journal of Chemistry 2006, Volumen 31, páginas 1111-1127. [Disponible en línea el 13.12.2006]. Ver página 1111, resumen; columna 1, párrafo 1; página 1124, figura 14; página 1112, columna 1, párrafo 3; página 1118, columna 2, párrafo 4.	1-17
A	GOYAL, P. et al. "Synthesis of poly(amidoamine) dendrimers containing deuterated atoms and triple bonds in the core": Polymer Preprints 2006, Volumen 47, Número 1, página 343. Ver página 343, figura 2, compuestos 9-11.	1-17
A	ZENG, F. & ZIMMERMAN, S.C. "Dendrimers in Supramolecular Chemistry: From Molecular Recognition to Self-Assembly". Chemical Reviews 1997, Volumen 97, Número 5, páginas 1681-1712. Ver página 1681, introducción; página 1686, figura 4.	1-17

#### 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  
31.10.2011

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07C237/10** (2006.01)

**C07C237/20** (2006.01)

**C12N15/63** (2006.01)

**A61K49/10** (2006.01)

**A61K48/00** (2006.01)

**A61K31/165** (2006.01)

**A61P35/00** (2006.01)

**A61P31/12** (2006.01)

**A61P31/18** (2006.01)

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

C07C, A61K, C12N, A61P

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, REGISTRY, CAPLUS, XPESP, NPL, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, PUBMED, CHEMSPIDER

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 7, 11, 12, 17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6, 8-10, 13-16	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 7, 17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6, 8-16	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZHANG, X.-Q. et al. Biomacromolecules 2005, Vol. 6, pp. 341-350.	01.12.2004

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

El objeto de la invención es un compuesto de fórmula general (I), con estructura de dendrímero que comprende un núcleo poliinsaturado; una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), un procedimiento de síntesis de los compuestos de fórmula (I); y el uso de (I) para la elaboración de un medicamento, para la elaboración de un kit de transfección de siRNA en cultivos celulares primarios y para la elaboración de sondas para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen.

**Novedad** (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga dendrímeros derivados de poli(amidoamina) con aplicación como agentes poliméricos para transfección génica, incluyendo vectores no virales, y por tanto, con actividad antitumoral (ver página 342, columna 1, párrafo 1). Entre los dendrímeros divulgados se encuentran los compuestos G2.0, G2.5 y G3.0 (ver página 343, esquema 1), cuyo núcleo central comprende un anillo bencénico, y que se incluyen en las fórmulas generales (I) y/o (II) de la invención (siendo  $W=1,3,5$ -tri(metilaminocarbonil)fenilo,  $n=3$ ,  $X=NH$ ,  $Y=-CH_2CH_2-$ ,  $R_1=R_2=H$ ).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-6, 8-10, 13-16** carece de novedad con respecto a lo divulgado en el documento D01.

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

Los dendrímeros derivados de poli(amidoamina) divulgados en D01 se preparan por medio de un procedimiento en varias etapas a partir de ácido 1,3,5-trimetoxicarbonilbenceno, mediante sucesivas reacciones con etilendiamina y acrilato de metilo. Este procedimiento se diferencia del de la invención en que este último utiliza como producto de partida un aldehído (en lugar de un ácido o éster carboxílico), cuyo tratamiento con etilendiamina en presencia de borohidruro sódico da lugar a la amina correspondiente (ver página 343, esquema 1).

La reacción de un aldehído con una amina primaria en medio reductor para la formación de aminas secundarias (a través de la imina correspondiente) es de sobra conocida en el estado de la técnica, por lo que el experto en la materia consideraría dicha alternativa sin el ejercicio de actividad inventiva.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **11 y 12** carece de actividad inventiva según lo divulgado en el documento D01.

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicación dependiente **7**, que se refiere a una serie de dendrímeros concretos con un núcleo de polifenilvinileno o polifeniletilideno, ni hacia la reivindicación independiente **17**, que se refiere al uso de los compuestos de la invención para la elaboración de sondas para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **7 y 17** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva exigidos por los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.