

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 245**

21 Número de solicitud: 201031204

51 Int. Cl.:

A61K 47/34 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01) **B82Y 5/00** (2011.01)

A61K 31/00 (2006.01) **A61K 49/00** (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)

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

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **02.08.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.02.2012

71 Solicitante/s:
Universidad Castilla La Mancha (Titular al 50%)
Edificio José Prat
Pza. de la Universidad, 2
02006 Albacete, ES
NANODRUGS, S.L. (Titular al 50%)

72 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;
Rubio Carrero, Noelia;
Pérez Martínez, Francisco y
Guerra Navarro, Francisco Javier

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Vectores no virales para terapia génica.**

57 Resumen:

Vectores no virales para terapia génica.

La presente invención se refiere a nuevos vectores no virales, que comprenden al menos un nanocuernito de carbono que comprende en su superficie dendrones y/o dendrímeros que a su vez están unidos con al menos una molécula biológicamente activa, para su uso en terapia génica y su uso para la elaboración de un medicamento. Además se describe el procedimiento de síntesis de dichos vectores no virales.

ES 2 374 245 A1

DESCRIPCIÓN

Vectores no virales para terapia génica.

5 **Estado de la técnica anterior**

El uso de vectores no virales en terapia génica es especialmente relevante, ya que la FDA ha suspendido, *sine die*, los ensayos clínicos 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 víricos poseen varios inconvenientes, tales como, inseguridad en su manejo, toxicidad, provocación de una respuesta inmune que disminuye su efectividad o falta de especificidad celular. Junto a ello, estos sistemas son rápidamente eliminados de la circulación, limitando el proceso de transfección a órganos de primer paso (pulmones, hígado y bazo).

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

Los vectores no virales poseen una serie de ventajas con respecto a los análogos víricos: a) facilidad en la preparación (incluso a escala multigramo) y modificación, b) mayor flexibilidad con respecto al tamaño del material genético a transfectar, c) son generalmente seguros *in vivo* y d) no provocan una respuesta inmune específica y por tanto pueden ser administrados repetidamente.

La introducción de nanocuernos acoplados a dendrímeros polares como vehículos para la transfección génica se basa en tres factores distintos: (i) la escasez de estudios donde se desarrolla el uso de nanocuernos como vehículos para transferencia génica; (ii) los dendrímeros de PAMAM (*Poly(amido amine)*), especialmente los de generaciones altas, han demostrado ser tóxicos debido fundamentalmente a procesos de hemólisis y el anclaje a los nanocuernos disminuye su toxicidad y (iii) los nanocuernos son inertes químicamente lo que les confiere una alta estabilidad.

Dentro de los vectores no virales, los dendrímeros 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.

35 **Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos vectores no virales para su uso en terapia génica que solventan todos los problemas que se plantean en las otras vías de actuación en terapia génica. Estas ventajas son las siguientes:

- a) Facilidad en la preparación y reproducibilidad del método sintético (incluso a escala multigramo).
- b) La ausencia de nanopartículas metálicas en la producción de los nanocuernos de carbono. Esto hace a los nanocuernos materiales más biocompatibles.
- c) Posibilidad de modificación de la superficie del nanocuernos pudiendo optimizar sus propiedades de acuerdo a la metodología sintética.
- d) Son generalmente seguros *in vivo* y poco tóxicos.
- e) No provocan una respuesta inmune específica y por tanto pueden ser administrados repetidamente.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a nuevos vectores no virales, donde dicho vector no viral comprende:

- i) al menos un nanocuernos de carbono que comprende en su superficie dendrones y/o dendrímeros; y
- ii) donde los dendrones y/o dendrímeros están unidos con al menos una molécula biológicamente activa.

En la presente invención, se entiende por nanocuernos de carbono a: nanomateriales consistentes en tubos de grafeno enrollados en una sola capa con un diámetro de entre 2-5 nm y una longitud entre 40-50 nm. Estos tubos terminan en una estructura cónica con un ángulo de 20°. Dicho ángulo se debe a la presencia de anillos de carbono pentagonales. Los nanocuernos de carbono usualmente se agregan entre sí constituyendo lo que se conoce por sus anglicismos como *dalias*, *buds* y *seeds*.

ES 2 374 245 A1

Según otra realización preferida, los nanocuernos de carbono tienen un radio inferior a 10 nm, preferiblemente inferior a 6 nm. Los nanocuernos son solo monocapa, no existiendo en la actualidad bi- o multicapas.

5 Según otra realización preferida, los nanocuernos de carbono tienen una longitud inferior a 50 nm, siendo el diámetro de las dalias de nanocuernos (asociación de nanocuernos) igual o menor de 150 nm.

10 Según otra realización preferida, los nanocuernos de carbono están cortados en las puntas y/o en su capa exterior, donde se entiende por nanocuernos cortados a aquellos cuya longitud es menor de la inicial ya que se tratan mediante el uso de medio ácido fuerte y calefacción originando grupos carboxílicos y un corte indiscriminado de los nanocuernos. El corte da lugar a que los nanocuernos se funcionalicen preferentemente en las puntas (es decir, los extremos) de los nanocuernos pero también en la capa exterior de los mismos.

15 Según otra realización preferida, las nanocuernos de carbono y los dendrímeros están enlazados químicamente mediante enlaces covalentes.

20 En la presente invención se entiende por dendrímero a una macromolécula tridimensional de construcción arborescente. Los dendrímeros forman parte de los polímeros, pero su diferencia radica en que la distribución de las moléculas que constituyen a los polímeros lineales es probabilística, en tanto que en el caso de los dendrímeros, se tiene una estructura química precisa, donde los enlaces químicos entre los átomos pueden ser descritos con exactitud. Las macromoléculas dendríméricas presentan una forma de crecimiento generacional, G0, G1, G2.

En la presente invención se entiende por dendrón una macromolécula con estructura dendrítica y cuyos posteriores acoplamientos a otros dendrones o núcleos constituirán el dendrímero en su totalidad.

25 Según otra realización preferida, el enlace covalente se ha formado mediante grupos amino, carboxilo y/o éster presentes en la superficie de los nanocuernos de carbono, preferiblemente mediante un enlace de tipo amida.

30 Según otra realización preferida, el enlace amida se lleva a cabo mediante grupos amino presentes en los dendrones y/o dendrímeros y grupos carboxilo presentes en la superficie de los nanocuernos de carbono.

Según otra realización preferida los dendrones y/o dendrímeros comprenden desde 0 a 8 generaciones, preferiblemente de 2 a 6 generaciones. Cuando el dendrímero es de generación 0 (G0) se denomina dendrón. En la presente invención se entiende por generación a las etapas del crecimiento de un dendrímero.

35 Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros tienen un peso molecular comprendido entre 300 y 100.000 g/mol, preferiblemente entre 1.000 y 10.000 g/mol.

40 Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros tienen un diámetro comprendido entre 5 a 140 Å, preferiblemente tienen un diámetro comprendido entre 10 y 70 Å.

Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros comprenden entre 2 y 1.024 grupos de superficie, preferiblemente entre 4 y 260 grupos de superficie.

45 En la presente invención se entiende por grupo de superficie a: grupos amino, grupos ácido carboxílico, grupos éster, grupos hidroxilo, grupos alquílicos, grupos amino cuaternizados u otras estructuras como pudieran ser aminoácidos o polietilenglicol.

50 Según otra realización preferida, los grupos de superficie de los dendrones y/o dendrímeros son grupos amino, preferiblemente aminas terciarias y/o primarias, y más preferiblemente estas aminas terciarias y/o primarias están protonadas a un pH inferior a 6.

Según otra realización preferida, la relación carga/masa de los dendrones y/o dendrímeros a pH inferior a 5 es de entre 0,1 a 10 mmoles de cargas positivas por gramo de dendrímero.

55 Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros son solubles en agua a pH inferiores a 6 tanto antes como después de la unión del dendrímero al nanocuernos de carbono.

60 Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros en sus formas neutras son solubles en metanol tanto antes como después de la unión del dendrímero al nanocuernos de carbono.

65

ES 2 374 245 A1

Según otra realización preferida, el núcleo de los dendrones o dendrímeros se selecciona entre

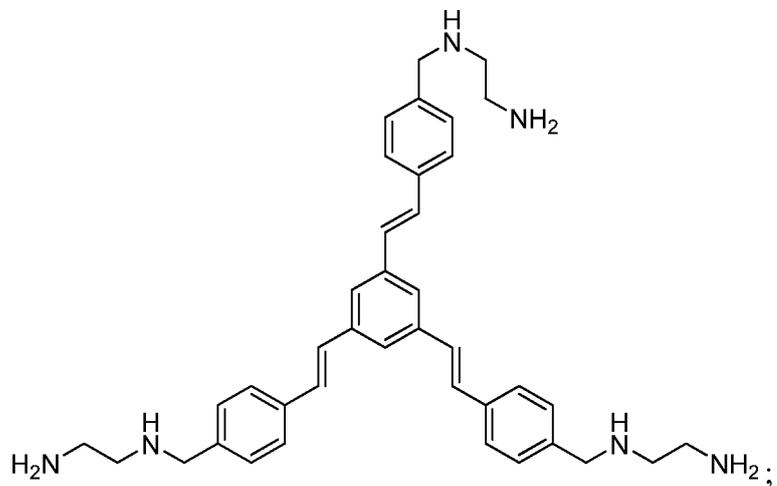
5

i)

10

15

20

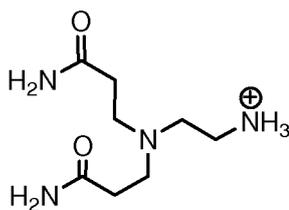


25

ii)

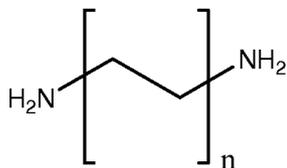
30

35



40

iii)

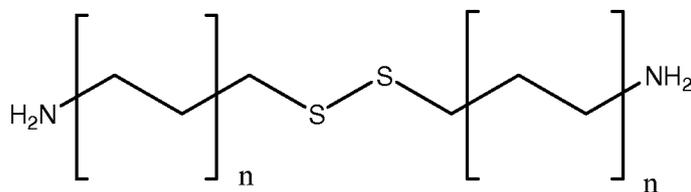


45

iv)

50

55



donde n es un número entero desde 1 a 4.

60

65

ES 2 374 245 A1

Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros se seleccionan entre:

5

10

15

20

25

30

35

40

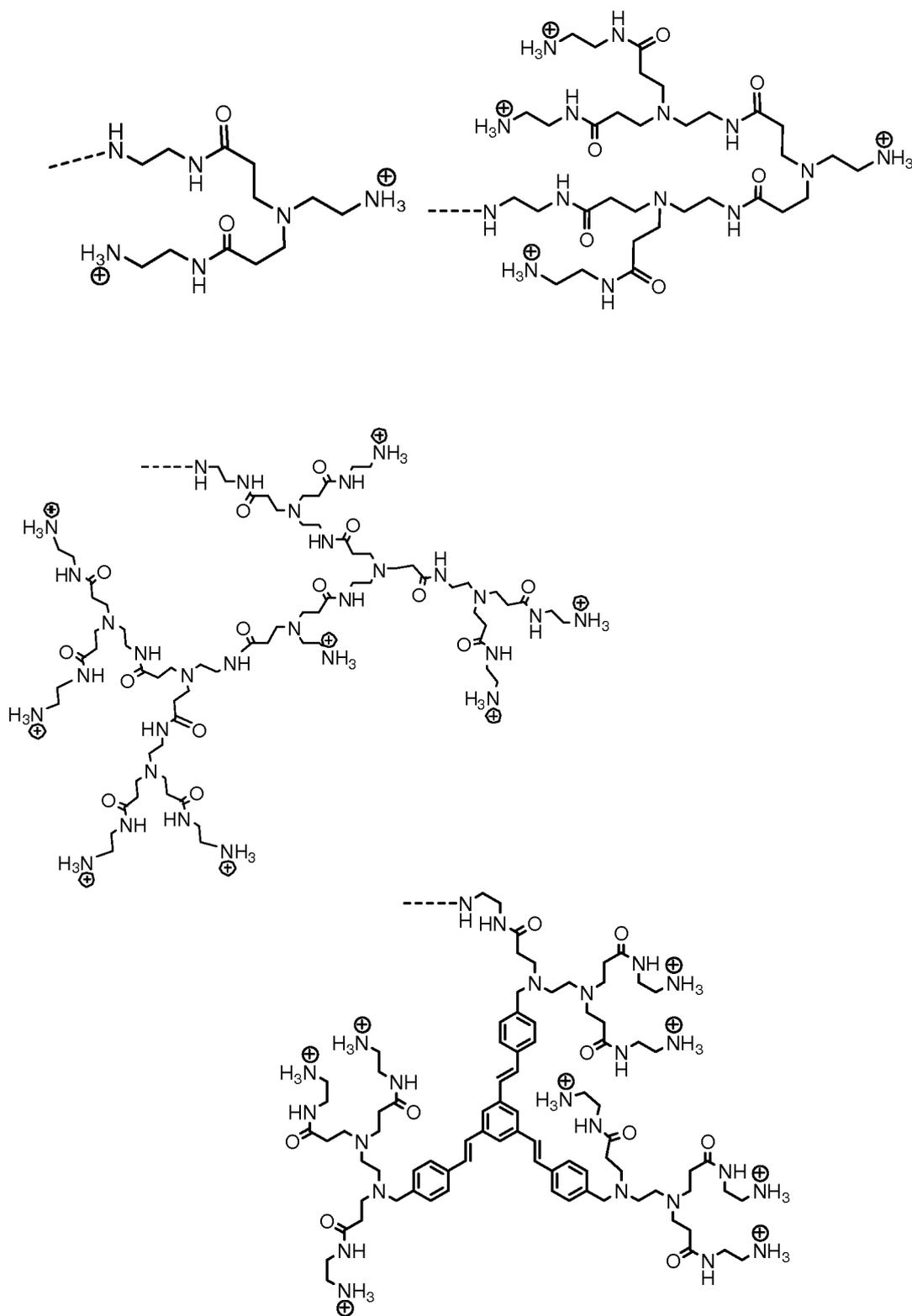
45

50

55

60

65



y/o los dendrímeros tipo PAMAM de cuarta o sexta generación.

ES 2 374 245 A1

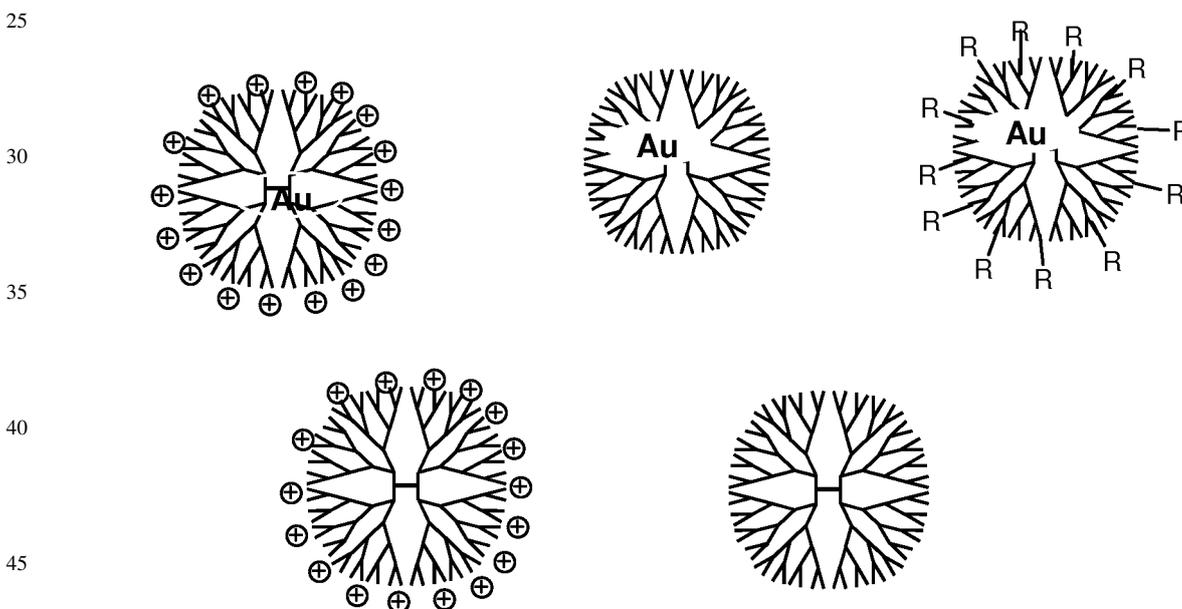
En la presente invención se entiende por dendrímero tipo PAMAM a aquellos dendrímeros que tienen un alto grado de uniformidad molecular, estrecha distribución del peso molecular, tamaño y características específicas de la forma, y una superficie terminal altamente funcionalizada. El proceso de fabricación es mediante una serie de pasos repetitivos a partir de un núcleo iniciador central. Cada paso representa un crecimiento posterior a la nueva "generación" de polímero con un diámetro molecular más grande, el doble del número grupos de superficie, y aproximadamente el doble del peso molecular de la generación precedente. Esto es común a cualquier dendrímero, no sólo a los de PAMAM. Los dendrímeros de PAMAM son dendrímeros de poliamidoamina comerciales (por Dendritech, Inc.) y que se sintetizan mediante una serie de pasos repetitivos siendo estos aminólisis y reacciones de adición de Michael, 1,4.

Según otra realización preferida, los dendrímeros tipo PAMAM de cuarta o sexta generación contienen partículas de oro. Las nanopartículas de oro no están unidas al dendrímero sino que se encuentran encapsuladas dentro del mismo mediante un efecto estérico, es decir, el dendrímero "enjaula" a la nanopartículas de oro. La presencia de la nanopartículas de oro da lugar a que el dendrímero adopte una conformación más rígida. Además la presencia de oro puede favorecer la aplicación de estos compuestos en resonancia de imagen o en tratamientos de hipertermia.

Según otra realización preferida los dendrímeros tipo PAMAM comprenden en su superficie grupos amino cuaternarios.

Según otra realización preferida, los dendrímeros tipos PAMAM tienen unidos a través de sus grupos amino cuaternarios un grupo: $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Según otra realización preferida, los dendrímeros tipo PAMAM de cuarta o sexta generación se seleccionan entre:



donde R es $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

Según otra realización preferida, la molécula biológicamente activa es una cadena de oligonucleótidos y/o una cadena de aminoácidos y/o una molécula farmacéuticamente activa.

En la presente invención se entiende por oligonucleótido a secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfo-diéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.

En la presente invención se entiende por cadena de aminoácidos a la unión de un número determinado de aminoácidos para la formación de una proteína con o sin actividad enzimática.

En la presente invención se entiende por molécula farmacéuticamente activa a cualquier fármaco en forma de sal farmacéuticamente aceptable para la prevención y/o tratamiento de cualquiera de las enfermedades a las que va dirigido el vector no viral descrito en la presente invención.

Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros están unidos con al menos una cadena de oligonucleótidos y/o de aminoácidos y/o molécula farmacéuticamente activa mediante interacciones electrostáticas y/o enlaces covalentes, preferiblemente amida y/o éster.

ES 2 374 245 A1

Según otra realización preferida la interacción electrostática y/o la unión covalente tiene lugar entre una de las posiciones terminales finales de las cadenas de oligonucleótidos y/o de aminoácidos y/o de la molécula farmacéuticamente activa y la superficie de los nanocuernos de carbono.

5 En la presente invención se entiende por interacción electrostática a la atracción o repulsión de cargas eléctricas, en concreto de los grupos amino de los dendrímeros y de los grupos carboxilo de las cadenas de oligonucleótidos y/o de aminoácidos y/o de las moléculas farmacéuticamente activas.

10 Según otra realización preferida, los dendrones y/o dendrímeros están unidos a ADN, ARN, ARN de silenciamiento, micro ARN, antagomir, anticuerpos, proteínas o cualquier combinación de los mismos.

En la presente invención se entiende por antagomir a una nueva clase de oligonucleótidos modificados químicamente que se utilizan para silenciar micro ARN endógeno.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los vectores no virales tal cual han sido descritos anteriormente para la elaboración de un medicamento en terapia génica.

20 En la presente invención se entiende por terapia génica la introducción de cualquier tipo de material genético (DNA, RNA, RNAi, siRNA) en el interior de una célula con el objetivo de reponer la función de un gen defectuoso o de eliminar una proteína de forma selectiva para poder interferir con una vía de señalización activada durante la génesis de una enfermedad.

25 Una realización preferida se refiere al uso de los vectores no virales descritos anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades del sistema nervioso, enfermedades neurodegenerativas y los accidentes cerebrovasculares.

Otra realización preferida se refiere al uso de los vectores no virales descritos anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección.

30 Según una realización preferida la infección es bacteriana o viral.

Según otra realización preferida la infección es causada por el virus del síndrome de inmunodeficiencia humano (SIDA).

35 Otra realización preferida se refiere al uso de los vectores no virales descritos anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer.

40 Otra realización preferida se refiere al uso de los vectores no virales descritos anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad crónica, preferiblemente la diabetes y la artritis reumatoide.

Otra realización preferida se refiere al uso de los vectores no virales descritos anteriormente para la preparación de compuestos utilizados para la realización de pruebas diagnósticas mediante imagen médica, en diversas patologías.

45 Otra realización preferida se refiere al uso de los vectores no virales descritos anteriormente para la preparación de un medio de contraste o sonda de imagen que comprenda dicho vector no viral y un compuesto de mareaje radiológico, que puede ser utilizado para la observación y diagnóstico mediante las técnicas radiológicas habitualmente utilizadas en clínica. Ejemplos no limitantes de dichos compuestos de mareaje son gadolinio o yodo, aunque puede ser cualquiera conocido por un experto en la materia.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector no viral tal y como se ha definido anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el vector no viral como se definió anteriormente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 Según una realización preferida, la composición farmacéutica además comprende al menos otro principio activo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica para la elaboración de un medicamento.

60 Una realización preferida se refiere al uso de la composición descrita anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades del sistema nervioso, enfermedades neurodegenerativas y los accidentes cerebrovasculares.

65 Otra realización preferida se refiere al uso de la composición descrita anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección.

Según una realización preferida la infección es bacteriana o viral.

ES 2 374 245 A1

Según otra realización preferida la infección es causada por el virus del síndrome de inmunodeficiencia humano (SIDA).

5 Otra realización preferida se refiere al uso de la composición descrita anteriormente para la preparación de un medicamento como anticancerígeno.

Otra realización preferida se refiere al uso de la composición descrita anteriormente para la preparación de un medicamento para una enfermedad crónica, preferiblemente la diabetes y la artritis reumatoide.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de transfección de ARN de silenciamiento que comprende cualquiera de los vectores no virales tal cual han sido definidos anteriormente.

15 Una realización preferida, se refiere al uso del kit de transfección de ARN de silenciamiento en cultivos primarios de células nerviosas, glía, células tumorales y células primarias.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de los vectores no virales tal cual se definieron anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

20 a. mezclar una disolución de dendrón o dendrímero con una disolución de una cadena de oligonucleótidos y/o de aminoácidos biológicamente activos; y

b. añadir la mezcla anterior a una disolución de nanocuernos previamente dispersados.

25 Según una realización preferida los nanocuernos están previamente cortados.

Según otra realización preferida los nanocuernos se dispersan en al menos una disolución de DMF (N,N-Dimetilformamida).

30 Según otra realización preferida, la disolución del dendrímero es añadida a una disolución acuosa de HAuCl_4 y posteriormente se reduce mediante NaBH_4 .

35 Según otra realización preferida, los nanocuernos de carbono han sido previamente funcionalizados mediante una cicloadición dipolar de iluros de azometino, mediante reacción radicalica de derivados de anilina o mediante oxidación directa de los nanocuernos para obtener en su superficie grupos carboxilo y anclar sobre ellos grupos amino, y/o éster.

40 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.

45 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 acetronitrilo. 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 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.

50 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.

65 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 esterés, esterés de aminoácido, esterés de fosfato, esterés de sulfonato de sales metálicas, carbamatos, y amidas.

Los compuestos de la presente invención 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.

5

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.

10

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 los compuestos de la presente invención o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15

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.

20

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.

25

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.

30

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.

35

Descripción de las figuras

40

Fig. 1.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a CNH31*. Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de CNH31 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de CNH31 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 5 μ g/ml, (3) 10 μ g/ml, (4) 20 μ g/ml, (5) 40 μ g/ml y (6) 60 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

45

Fig. 2.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a CNH40*. Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de CNH40 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de CNH40 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 10 μ g/ml, (3) 20 μ g/ml, (4) 40 μ g/ml, (5) 60 μ g/ml, (6) 80 μ g/ml y (7) 100 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

50

Fig. 3.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a CNH41*. Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de CNH41 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de CNH41 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 10 μ g/ml, (3) 20 μ g/ml, (4) 40 μ g/ml, (5) 60 μ g/ml, (6) 80 μ g/ml y (7) 100 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

55

60

Fig. 4.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a CNH43*. Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de CNH43 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de CNH43 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 10 μ g/ml, (3) 20 μ g/ml, (4) 40 μ g/ml, (5) 60 μ g/ml, (6) 80 μ g/ml y (7) 100 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

65

Fig. 5.- *Estudio de la toxicidad de CNH31 en neuronas corticales*. Las células se trataron con diferentes concentraciones de CNH31 (1 a 30 μ g/ml) durante 48 horas. La viabilidad celular se evaluó cuantificando el porcentaje de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada al medio de cultivo. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM (desviación estándar de la media), n=12. * p <0,05, comparados con el control.

Fig. 6.- *Cuantificación de la transfección del complejo CNH31-siRNA fluorescente en neuronas corticales (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 CNH31 y 100 nM de siRNA fluorescente. Los tratamientos duraron 48 horas. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. * $p < 0,05$, comparados con el control.

5 Fig. 7.- Estudio del efecto del complejo CNH31-siRNA contra COFILINA o SCRAMBLE (Control) en sobre la expresión génica de COFILINA en neuronas corticales mediante *real-time* PCR. La cuantificación del RNAm de COFILINA y β -actina (control endógeno) se realizó en células transfectadas durante 48 horas con CNH31. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. * $p < 0,05$, comparados con el control.

10

Ejemplos de realización de la invención

15 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.

20 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); μ l (microlitros); mmol (milimoles); P.f. (punto de fusión); Hz (hertzio); MHz (megahertzio); δ (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); CH_2Cl_2 (diclorometano); CDCl_3 (cloroformo deuterado); CD_3OD (metanol deuterado) DMSO (dimetilsulfóxido); i.p. (administración parenteral). Todas las temperaturas se expresan en $^\circ\text{C}$ (grados Celsius).

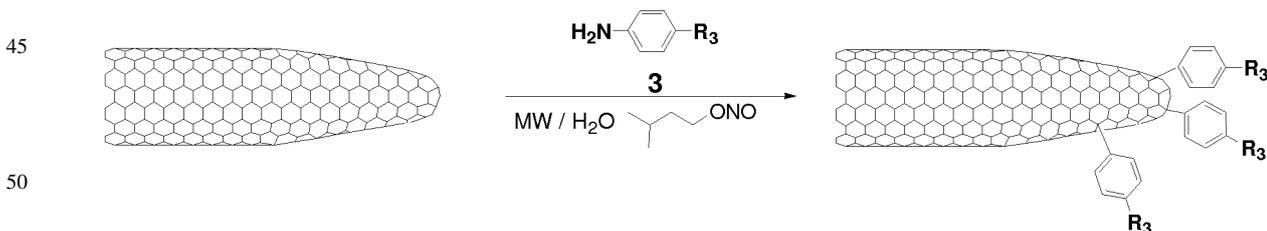
30

Ejemplo 1

Síntesis de los complejos nanocuernos-dendrimeros

35 Esquema de modificación de nanocuernos

40 Tour y colaboradores (Price, B.K.; Tour, J.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1289-1294. b) Pagona, G.; Karousis, N.; Tagmatarchis, N. *Carbon*, **2008**, *46*, 604) han descrito una ruta sintética para la funcionalización de nanotubos de carbono, en presencia de una anilina sustituida y un agente oxidante. Esta metodología se ha aplicado también a nanocuernos según el siguiente esquema general:

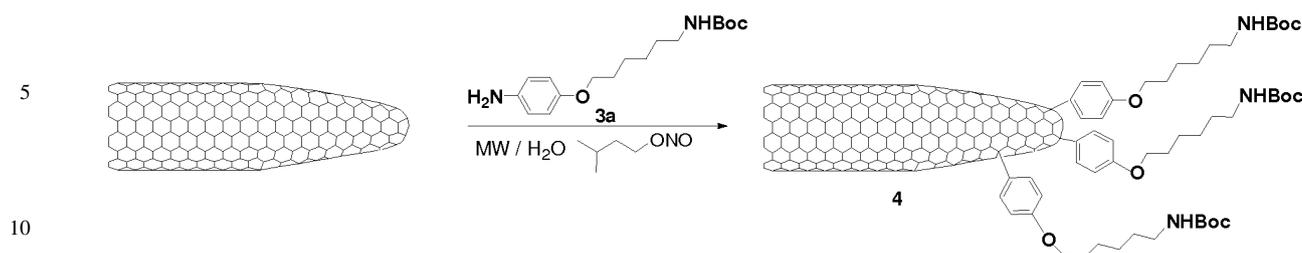


55 La funcionalidad en este caso, como se desprende del esquema anterior, depende de la modificación de la anilina empleada en dicha reacción.

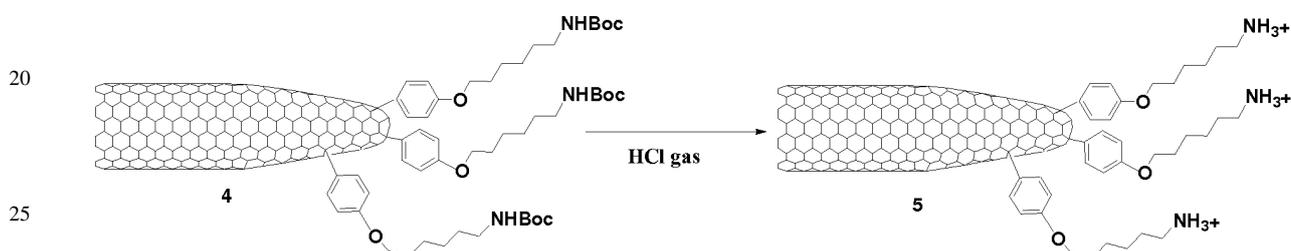
60 f-CNhs 4

Si siguiendo el esquema general anterior y el método descrito en la bibliografía (*J. Mat. Chem.*, 2009, *19*, 4407-4413) se obtienen 18 mg de f-CNhs 4 utilizando la anilina (3a).

65



15 La desprotección de f-CNHs 4 se llevó a cabo mediante el siguiente esquema:



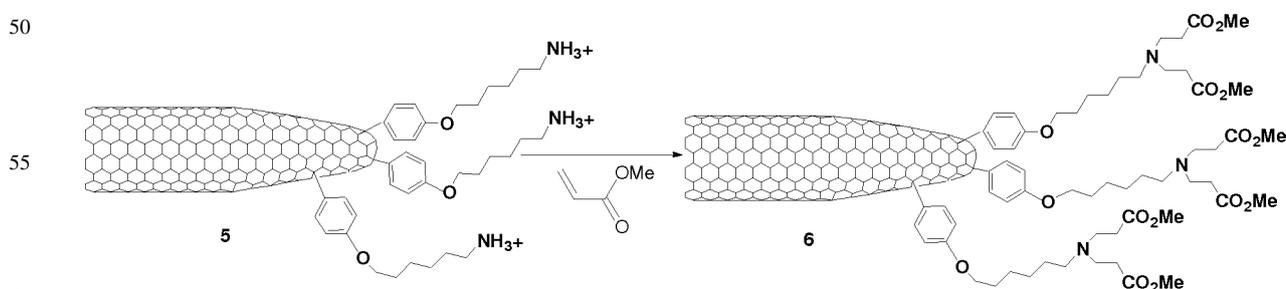
30 En un matraz de fondo redondo se sonicaron 15 mg del derivado f-CNHs 4 en 15 ml de metanol durante 10 minutos. Se burbujea la mezcla con ácido clorhídrico gas en la suspensión durante 3 minutos. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. El crudo de reacción se filtra en una membrana Millipore (PTFE (politetrafluoroetileno), 0,2 μm) y se lava con ciclos de sonicación y filtración usando diclorometano (100 ml) y metanol (100 ml). Por último, los nanocuernos funcionalizados se secan a vacío, obteniendo así 14 mg del derivado f-CNHs 5. El análisis termogravimétrico muestra un valor de 13% de pérdida de materia orgánica, el cual equivaldría a un grupo funcional cada 60 átomos de carbono de nanocuernos de carbono.

35

40 *f-CNHs 6*

En un matraz microondas se introducen 20 mg de f-CNHs 5 en 10 ml de metanol y se sonican durante 5 minutos. A la mezcla se le añade 1 ml de N-etildisopropilamina y se sónica durante 5 minutos y finalmente se añaden 2 ml de acrilato de metilo y se acopla el refrigerante. La mezcla se irradia durante 60 minutos a 70°C y una potencia de 10 W. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μm). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se obtienen 18 mg de f-CNHs 6. El análisis termogravimétrico muestra un valor de 19% de pérdida de materia orgánica, el cual equivaldría a un grupo funcional cada 99 átomos de carbono de f-CNHs 6.

45

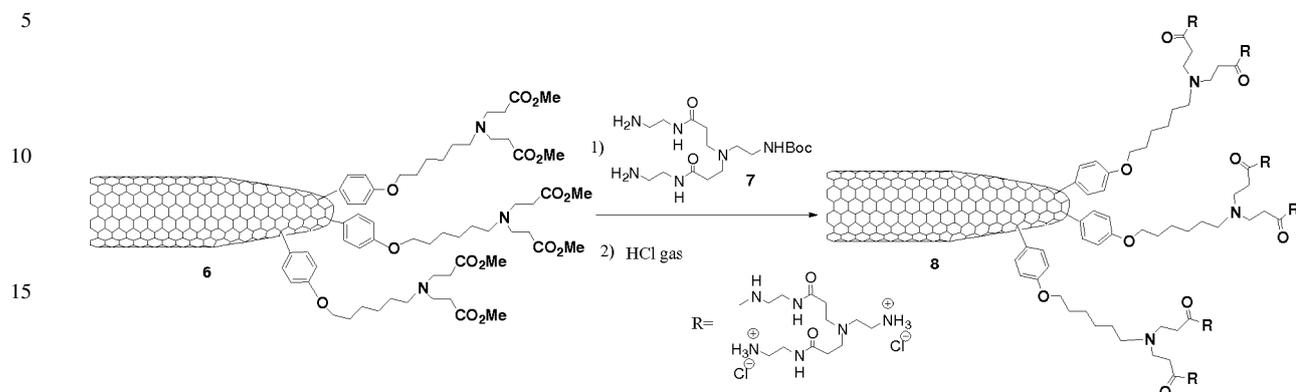


65 *f-CNHs 8*

20 mg de f-CNHs (6) se dispersan en 5 mL de DMF y se adiciona gota a gota una disolución del dendrón (7) en metanol. La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante un día. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μm). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y

ES 2 374 245 A1

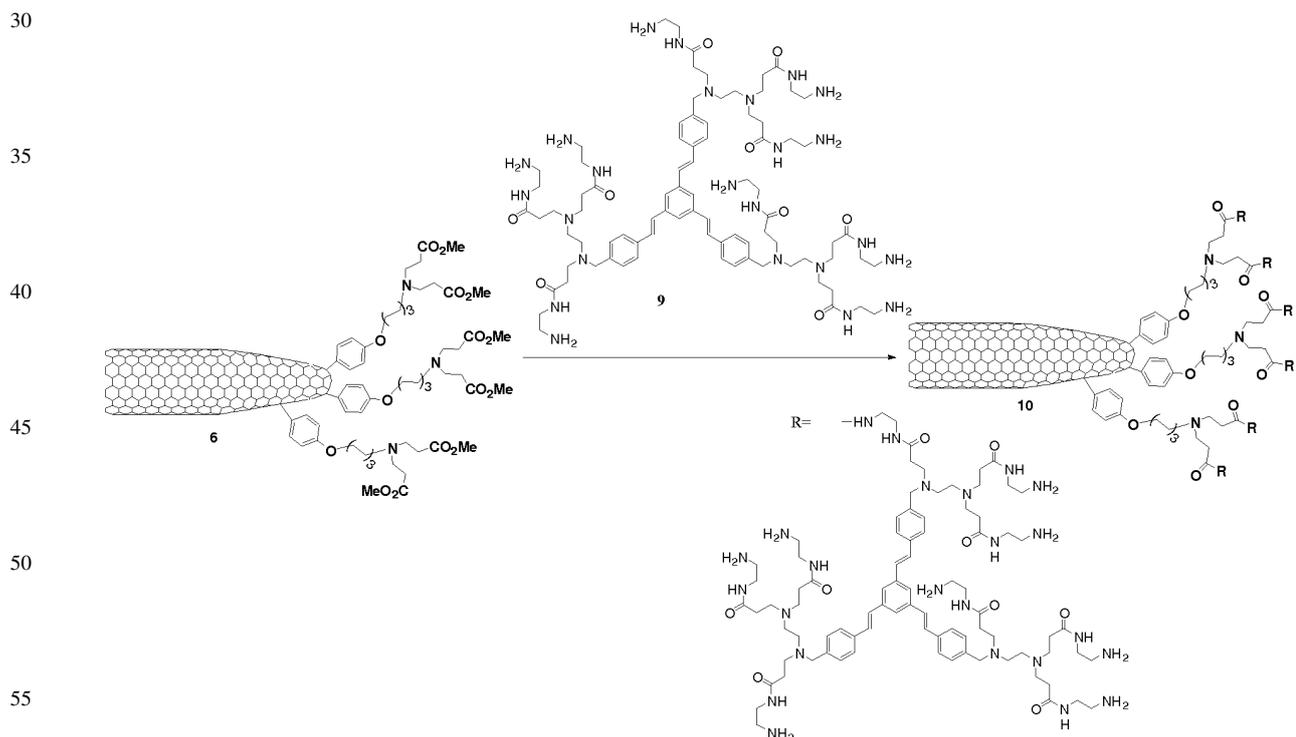
diclorometano hasta que el filtrado sea transparente. Se dispersa de nuevo en metanol y se borbotea ácido clorhídrico gas durante 3 minutos y de nuevo se repite el proceso de filtración y sonicación y finalmente se secan y se obtienen 20 mg de f-CNHs 8.



f-CNHs 10

25

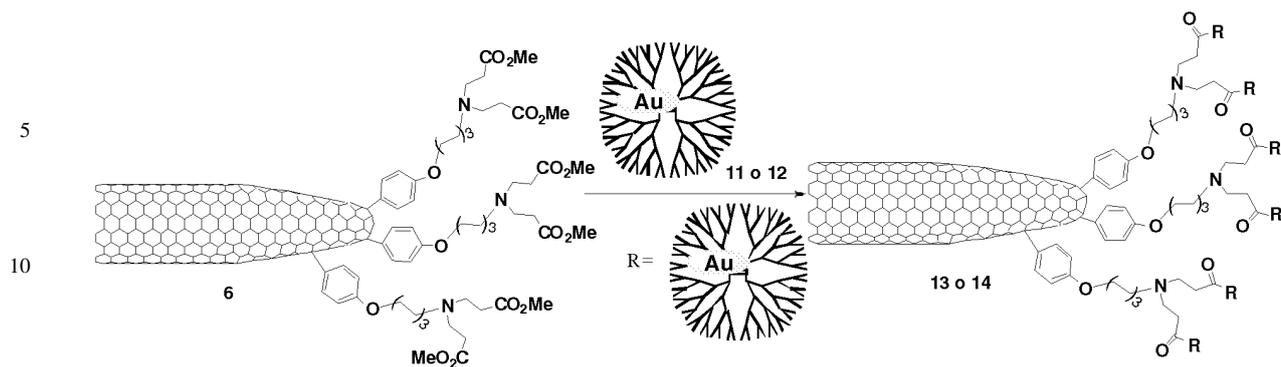
20 mg de f-CNHs 6 se dispersan en 5 ml de DMF y se adiciona gota a gota una disolución del derivado 9 (IR8) en metanol. La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante un día. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μm). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se obtienen 20 mg de f-CNHs 10.



f-CNHs 13-f-CNHs 14

65

20 mg de f-CNHs 6 se dispersan en 5 ml de DMF y se adiciona gota a gota una disolución acuosa 1,6 μM del dendrímero (11 ó 12) (2 x 25 ml, pH 7,5). La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante un día. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μm). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se obtienen 20 mg de f-CNHs 13 ó 14.



20

25

Síntesis del dendrímero G6-NH₂(Au200) (11). 50,0 ml (2x25 ml) de una disolución 1,6 μ M G6-NH₂(Au200) se prepara de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura (Kim, Y. G.; Oh, S. K; Crooks, R. M., *Preparation and Characterization of 1-2 nm Dendrimer-Encapsulated Gold Nanoparticles Having Very Narrow Size Distributions. Chem. Mater.* **2004**, *16*, 167-172). Brevemente, 0,8 ml de una disolución acuosa recién preparada de 10,0 mM HAuCl₄ se añade a una disolución acuosa 1,6 μ M (concentración final) de PAMAM G6-NH₂ (24,16 ml). El complejo dendrímero-ión metálico se agita durante 1 min. Tras este tiempo, se reduce rápidamente mediante una disolución acuosa recién preparada de NaBH₄ 1M (0,04 ml) disuelto en una disolución de hidróxido sódico 0,3 M. El vial se cierra. La reducción ocurre inmediatamente y va acompañada de un cambio de color de amarillo a rosado. Se agita durante 1 h antes de ser utilizado.

Estudios de alta resolución de microscopía electrónica revelan que las nanopartículas tienen un diámetro de $2,0 \pm 0,3$ nm.

30

35

Síntesis del dendrímero G4-NH₂(Au55) (12). 50,0 ml (2x25 ml) de una disolución 1,6 μ M G4-NH₂ (Au55) se prepara de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura (Kim, Y. G.; Oh, S. K; Crooks, R. M., *Preparation and Characterization of 1-2 nm Dendrimer-Encapsulated Gold Nanoparticles Having Very Narrow Size Distributions. Chem. Mater.* **2004**, *16*, 167-172). Brevemente, 0,22 ml de una disolución acuosa recién preparada de 10,0 mM HAuCl₄ se añade a una disolución acuosa 1,6 μ M (concentración final) de PAMAM G4-NH₂ (24,77 ml). El complejo dendrímero-ión metálico se agita durante 1 min. Tras este tiempo, se reduce rápidamente mediante una disolución acuosa recién preparada de NaBH₄ 1M (0,011 ml) disuelto en una disolución de hidróxido sódico 0,3 M. El vial se cierra. La reducción ocurre inmediatamente y va acompañada de un cambio de color de amarillo a rosado. Se agita durante 1 h antes de ser utilizado.

40

Estudios de alta resolución de microscopía electrónica revelan que las nanopartículas tienen un diámetro de $1,3 \pm 0,3$ nm.

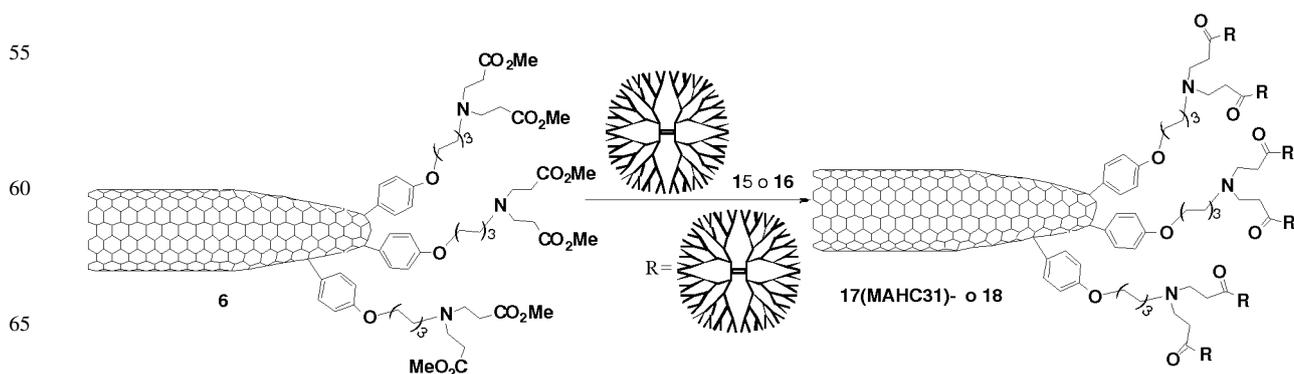
f-CNHs 17(MAHC31)-*f*-CNHs (18)

45

50

55

20 mg de *f*-CNHs 6 se dispersan en 5 ml de DMF y se adiciona gota a gota 2 equivalentes de grupo amina (con respecto al número de equivalentes de grupo funcional) de una disolución en metanol del dendrímero comercial PAMAM de cuarta o de sexta generación (15 ó 16, respectivamente). La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante un día. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μ m). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se obtienen 20 mg de *f*-CNHs 17 ó 18.



Ejemplo 2

Se ha investigado la capacidad de un nanocuerno de carbono unido a diferentes dendrímeros con aminas nitrogenadas en su periferia de interactuar y formar complejos con un RNA de interferencia corto (siRNA), y de vehicularlo al interior celular sin producir ningún tipo de citotoxicidad.

*Materiales y Métodos*10 *Cultivos celulares**Cultivos primarios de neuronas corticales de rata*

El cultivo primario de neuronas corticales se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente (V. Bruno, *et al.*, *Eur. J. Neurosci.*, 13:1469-1478 (2001)). 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 (*Hank's Buffered Salt Solution*). 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 polilisina 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 nanocuerno-siRNA

Los complejos nanocuerno-siRNA se formaron mezclando cantidades iguales de volumen de la solución que contenía el nanocuerno elegido y de la que contenía el siRNA (Chonco L, *et al.*, *Org Biomol Chem.* 2007 Jun 21; 5 (12):1886-93. Posadas I, *et al.*, *Pharm Res.* 2009 May; 26(5):1181-91), e incubando la mezcla en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Ambas moléculas se disolvieron en agua DEPC (Diethyl pirocarbonato) (libre de RNAsas).

Experimentos de retardo en gel del complejo nanocuerno-siRNA

El retardo en gel de agarosa se utilizó para averiguar la concentración adecuada para obtener la mayor efectividad de unión posible entre ambas moléculas (Hansen RK *J Neurochem.* 2007;103(4):1396-407 Peng LA *Brain Res Dev Brain Res.* 1991; 63(1-2):1-12). Se testó la mezcla de distintas concentraciones de nanocuerno y de 250 ng de siRNA. La mezcla se corrió durante 15 minutos a 60V 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 resultados se pueden observar en las figuras 1 a 4 para CNH31, CNH40, CNH41 y CNH43, respectivamente.

Estudios de Citotoxicidad

Las pruebas para evaluar la toxicidad del nanocuerno se realizaron en distintos tipos celulares, determinando la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Posadas I, López-Hernández B, Clemente MI, Jiménez JL, Ortega P, de la Mata J, Gómez R, Muñoz-Fernández MA, Ceña V *Highly efficient transfection of rat cortical neurons using carboxilane dendrimers unveils a neuroprotective role for HIF-1alpha in early chemical hypoxia-mediated neurotoxicity Pharm Res.* 2009 May; 26(5):1181-91). Para ello, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y se expusieron a soluciones con diferentes concentraciones de nanocuerno 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 (*Phosphate buffered saline*) y fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. La absorbancia del lisado y del sobrenadante celular se midió utilizando un espectofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

La toxicidad de los tratamientos con los complejos nanocuerno-siRNA, utilizando distintas concentraciones de nanocuerno (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, Ortega P, Clemente MI, Shcharbin D, Bryszewska M, de la Mata FJ, Gómez R, Muñoz-Fernández MA *Characterization of carboxilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. J Control Release.* 2008 Nov 24; 132(1):55-64. Perumal OP, Inapagolla R, Kannan S, Kannan RM *The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. Biomaterials.* 2008 Aug-Sep; 29(24-25):3469-76). Los resultados de la citotoxicidad para neuronas corticales se pueden observar en la figura 5.

Estudio del porcentaje de translocación del complejo nanocuerno-siRNA al interior celular

Después de 24-72 horas con las células en presencia de los complejos nanocuerno-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 (*Weber N, Ortega P, Clemente MI, Shcharbin D, Bryszewska M, de la Mata FJ, Gómez R, Muñoz-Fernández MA Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes, J Control Release. 2008 Nov 24; 132(1):55-64. Perumal OP, Inapagolla R, Kannan S, Kannan RM The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. Biomaterials. 2008 Aug-Sep; 29 (24-25):3469-76*).

La translocación del complejo nanocuerno-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 nanocuerno-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 (*Gras R, Almonacid L, Ortega P, Serramia MJ, Gómez R, de la Mata FJ, López-Fernández LA, Muñoz-Fernández MA. Changes in gene expression pattern of human primary macrophages induced by carbosilane dendrimer 2G-NN16. Pharm Res. 2009 Mar; 26(3):577-86*).

Los resultados sirvieron para determinar el porcentaje de células positivas para la transfección intracelular de siRNA. En la figura 6 se muestran los resultados para el complejo CNH31-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 IR8. 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. Los resultados se muestran en la figura 7.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un vector no viral, donde el vector no viral comprende:

- 5 i) al menos un nanocuernito de carbono que comprende en su superficie dendrones y/o dendrímeros; y
 ii) donde los dendrones y/o dendrímeros están unidos con al menos una molécula biológicamente activa;

10 para la elaboración de un medicamento para terapia génica.

2. El uso según la reivindicación anterior, donde el nanocuernito de carbono tiene un radio inferior a 10 nm, preferiblemente inferior a 6 nm.

15 3. El uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde el nanocuernito de carbono tiene una longitud inferior a 50 nm siendo el diámetro de las dalias de nanocuernitos igual o menor de 150 nm.

20 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el nanocuernito de carbono está cortado en las puntas y/o en su capa exterior.

5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el nanocuernito de carbono y los dendrones y/o dendrímeros están enlazados químicamente mediante enlaces covalentes.

25 6. El uso según la reivindicación anterior, donde el enlace covalente se ha formado mediante grupos amino, carboxilo y/o éster presentes en la superficie del nanocuernito de carbono.

7. El uso según la cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde el nanocuernito de carbono y los dendrones y/o dendrímeros están enlazados mediante un enlace de tipo amida.

30 8. El uso según la reivindicación anterior, donde el enlace amida se lleva a cabo mediante grupos amino presentes en los dendrones y/o dendrímeros y grupos carboxilo presentes en la superficie del nanocuernito de carbono.

35 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los dendrones y/o dendrímeros comprenden desde 0 a 8 generaciones.

10. El uso según la reivindicación anterior, donde los dendrones y/o dendrímeros comprenden de 2 a 6 generaciones.

40 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dendrón y/o dendrímero tiene un peso molecular comprendido entre 300 y 100.000 g/mol, preferiblemente entre 1.000 y 10.000 g/mol.

45 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dendrón y/o dendrímero tiene un diámetro comprendido entre 5 y 140 Å.

13. El uso según la reivindicación anterior, donde el dendrón y/o dendrímero tiene un diámetro comprendido entre 10 y 70 Å.

50 14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dendrón y/o dendrímero comprende entre 2 y 1.024 grupos de superficie.

15. El uso según la reivindicación anterior, donde el dendrón y/o dendrímero comprende de 4 a 260 grupos de superficie.

55 16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, donde los grupos de superficie son grupos amino, preferiblemente aminas terciarias y/o primarias, y más preferiblemente estas aminas terciarias y/o primarias están protonadas a un pH inferior a 6.

60 17. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la relación carga/masa de los dendrones y/o dendrímeros a pH inferior a 5 es de entre 0,1 a 10 mmoles de cargas positivas por gramo de dendrímero.

18. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los dendrones y/o dendrímeros son solubles en agua a pH inferiores a 6 tanto antes como después de la unión del dendrímero al nanocuernito de carbono.

65 19. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde los dendrones y/o dendrímeros en sus formas neutras son solubles en metanol tanto antes como después de la unión del dendrímero al nanocuernito de carbono.

ES 2 374 245 A1

20. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el núcleo de los dendrones o dendrímeros se selecciona entre:

5

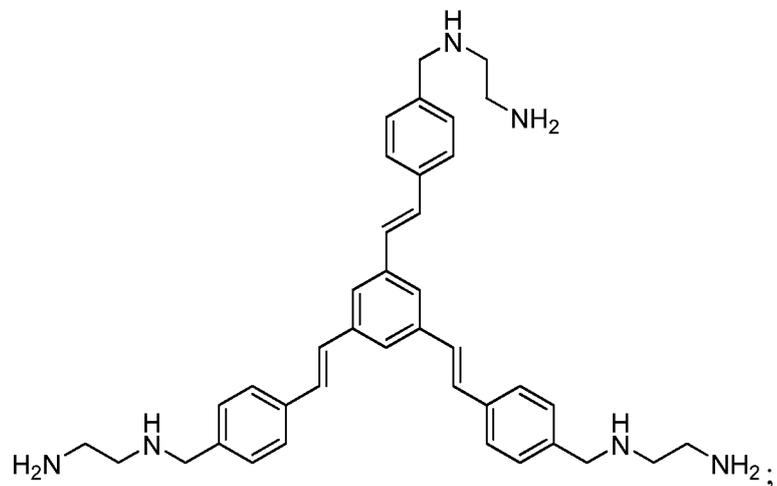
i)

10

15

20

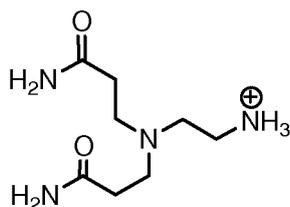
25



ii)

30

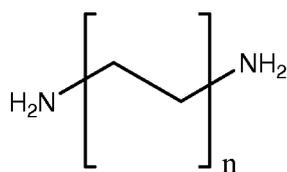
35



40

iii)

45

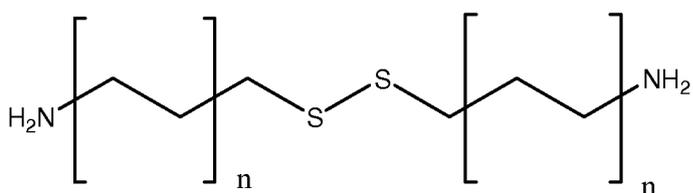


50

iv)

55

60

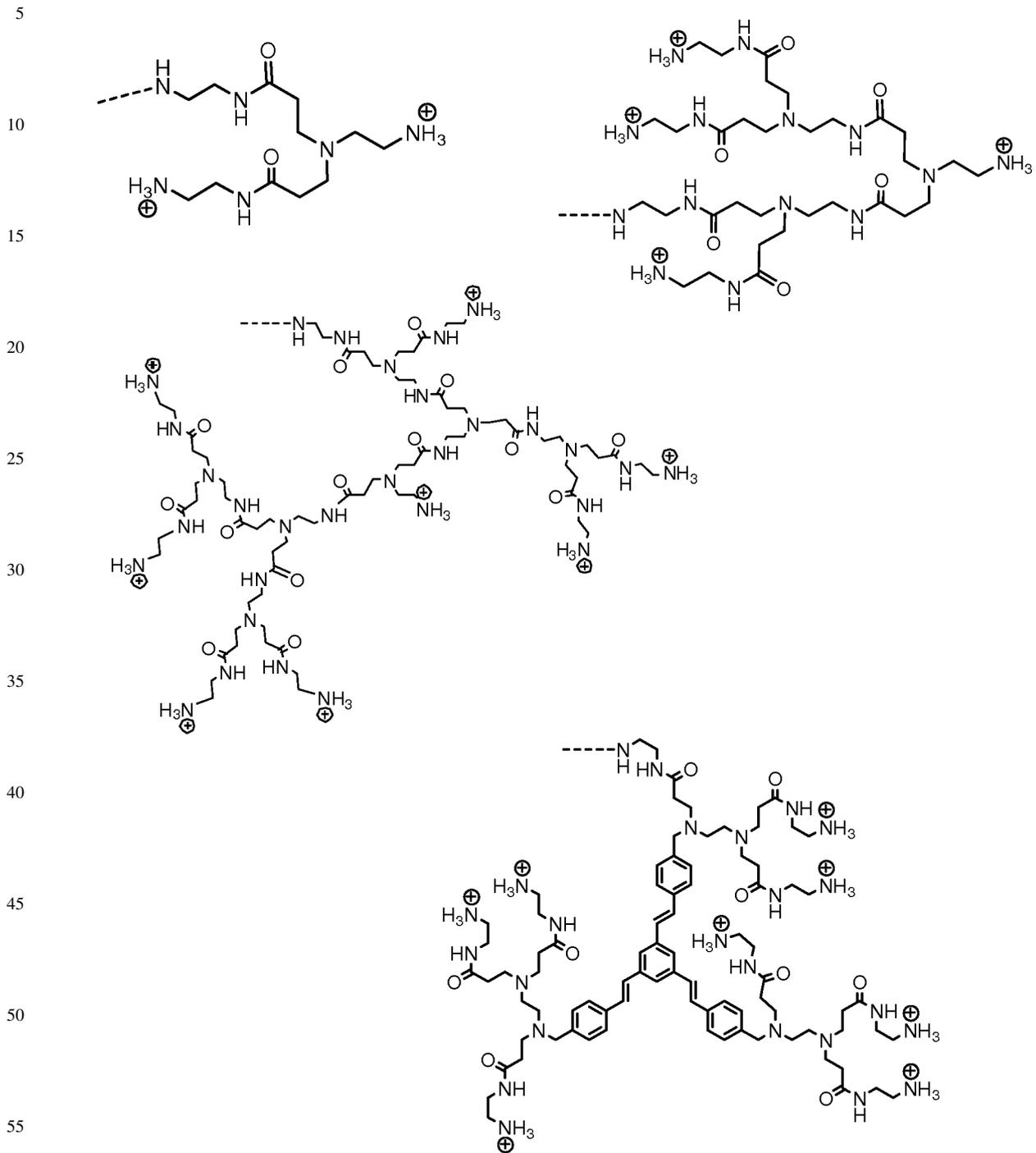


donde n es un número entero desde 1 a 4.

65

ES 2 374 245 A1

21. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde los dendrones y/o dendrímeros se seleccionan entre:



y/o los dendrímeros tipo PAMAM de cuarta o sexta generación.

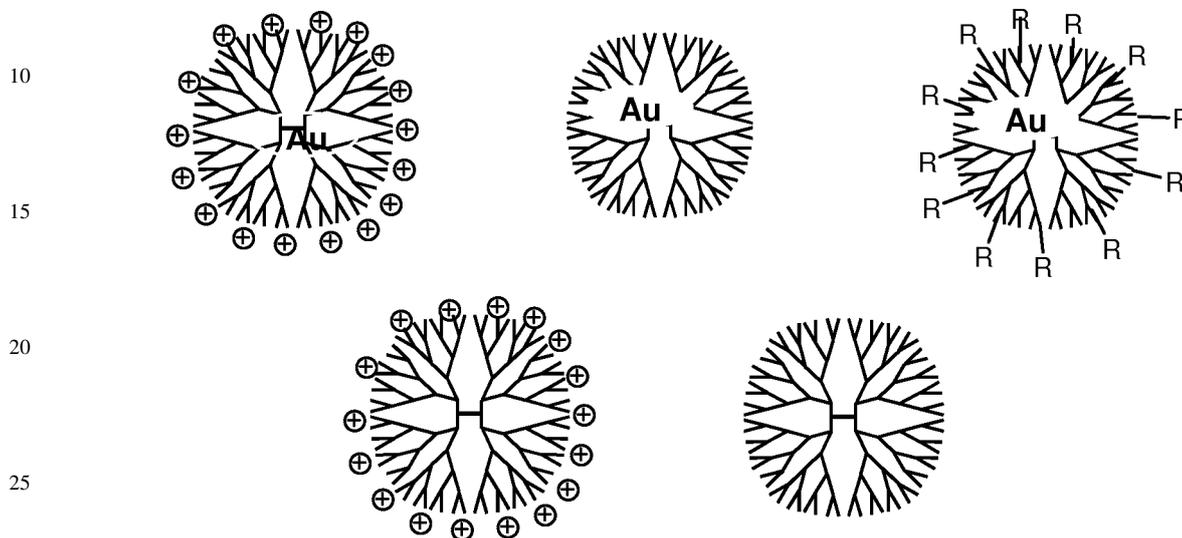
22. El uso según la reivindicación anterior, donde los dendrímeros tipo PAMAM de cuarta o sexta generación contienen partículas de oro.

23. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, donde los dendrímeros tipo PAMAM comprenden en su superficie grupos amino cuaternarios.

ES 2 374 245 A1

24. El uso según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, donde los dendrímeros tipo PAMAM tienen unido a través de sus grupos amino cuaternarios un grupo: $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

25. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, donde el dendrímero PAMAM de cuarta o sexta generación se selecciona entre:



donde R es $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$.

26. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula biológicamente activa es una cadena de oligonucleótidos y/o una cadena de aminoácidos y/o una molécula farmacéuticamente activa.

27. El uso según la reivindicación anterior, donde los dendrones y/o dendrímeros están unidos con al menos una cadena de oligonucleótidos y/o de aminoácidos y/o a la cadena farmacéuticamente activa mediante interacciones electrostáticas y/o enlaces covalentes, preferiblemente amida y/o éster.

28. El uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde la interacción electrostática y/o la unión covalente tiene lugar entre una de las posiciones terminales finales de las cadenas de oligonucleótidos y/o de aminoácidos y/o de la sustancia farmacéuticamente activa y la superficie de los nanocuernos de carbono.

29. El uso según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, donde los dendrímeros están unidos a ADN, ARN, ARN de silenciamiento, micro ARN, antagomir, anticuerpos, proteínas o cualquier combinación de los mismos.

30. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades del sistema nervioso, enfermedades neurodegenerativas y los accidentes cerebrovasculares.

31. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección.

32. El uso según la reivindicación anterior donde la infección es bacteriana o viral.

33. El uso según la reivindicación anterior donde la infección es causada por el virus del síndrome de inmunodeficiencia humano (SIDA).

34. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer.

35. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad crónica, preferiblemente la diabetes y la artritis reumatoide.

36. El uso de los vectores descritos en las reivindicaciones 1 a 29 para la preparación de un medio de contraste o sonda de imagen que comprende el vector no viral y una molécula de marcaje radiológico.

37. Vector no viral como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.

ES 2 374 245 A1

38. Composición farmacéutica que comprende el vector no viral como se define en la reivindicación 37 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 39. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que además comprende al menos otro principio activo.

40. Uso de la composición según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, para la elaboración de un medicamento.

10 41. Kit de transfección de ARN de silenciamiento que comprende el vector no viral según se define en la reivindicación 37.

15 42. Uso del kit de transfección de ARN de silenciamiento según la reivindicación anterior en cultivos primarios de células nerviosas, glía, células tumorales y células primarias.

43. Procedimiento para la síntesis del vector no viral según se define en la reivindicación 37, que comprende las siguientes etapas:

20 a. mezclar una disolución de dendrón o dendrímero con una disolución de una cadena de oligonucleótidos y/o de aminoácidos biológicamente activos; y

b. añadir la mezcla anterior a una disolución de nanocuernos previamente dispersados.

25 44. El procedimiento según la reivindicación anterior, donde los nanocuernos están previamente cortados.

45. El procedimiento según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde los nanocuernos se dispersan en al menos una disolución de DMF.

30 46. El procedimiento según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, donde a la disolución del dendrón y/o dendrímero es añadida una disolución acuosa de HAuCl_4 y posteriormente se reduce mediante NaBH_4 .

35 47. El procedimiento según cualquiera de las cuatro reivindicaciones anteriores, donde los nanocuernos de carbono han sido previamente funcionalizados mediante una cicloadición dipolar de iluros de azometino, mediante reacción radicalica de derivados de anilina o mediante oxidación directa de los nanocuernos para obtener en su superficie grupos carboxilo y anclar sobre ellos grupos amino, y/o éster.

40

45

50

55

60

65

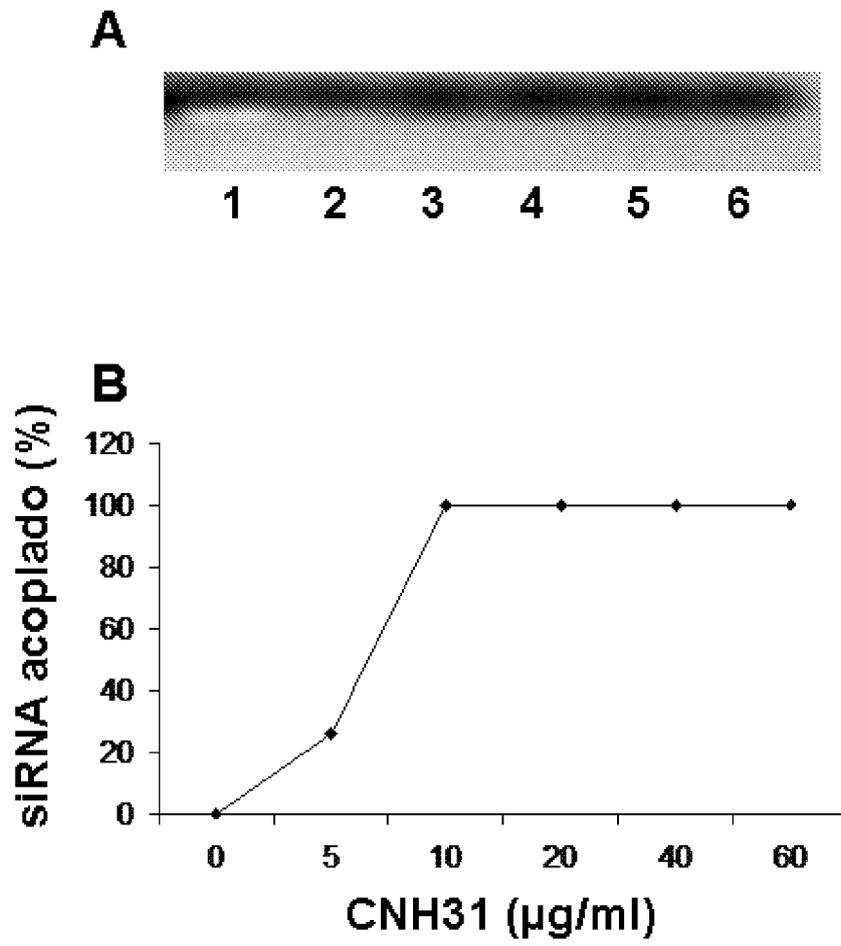


FIG. 1

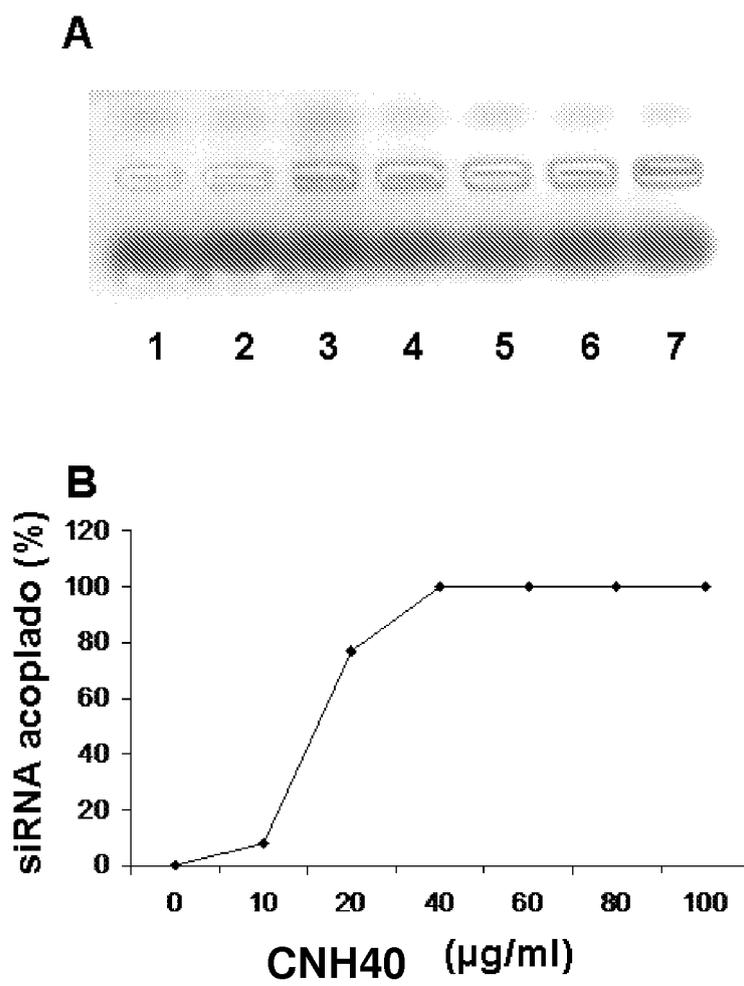


FIG. 2

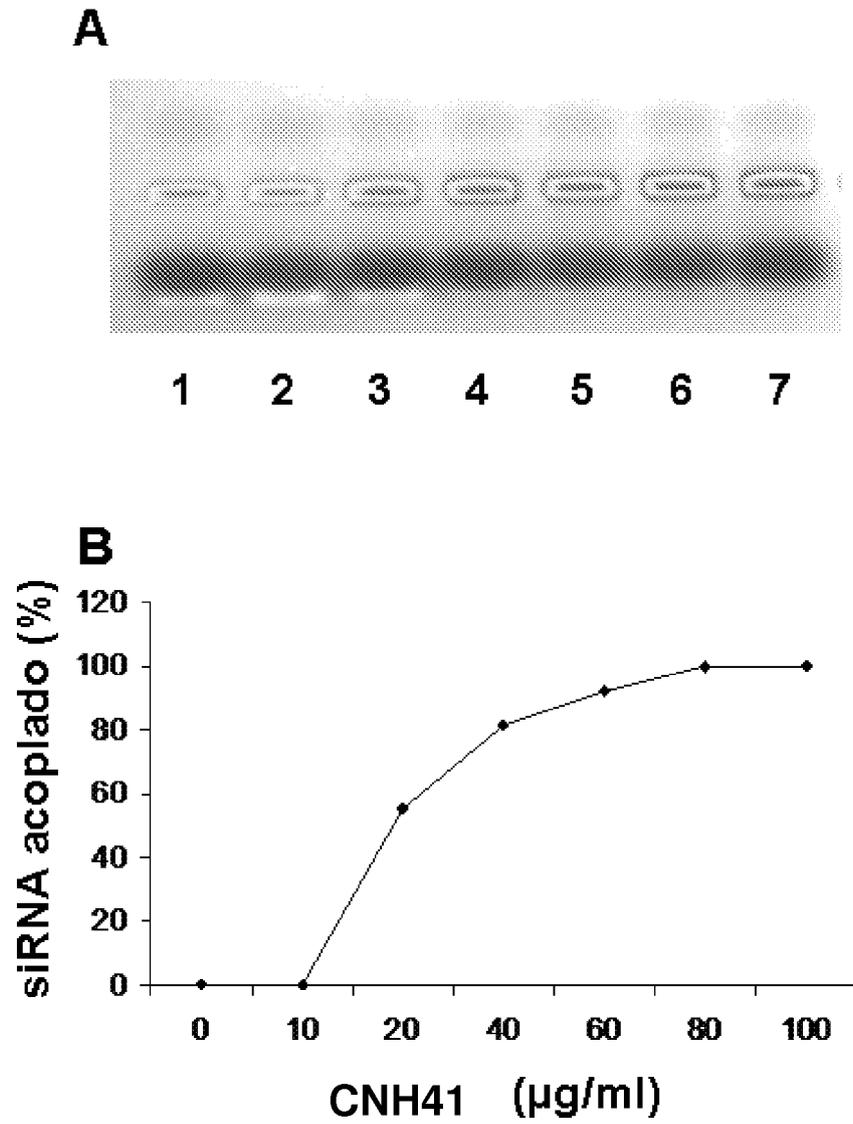
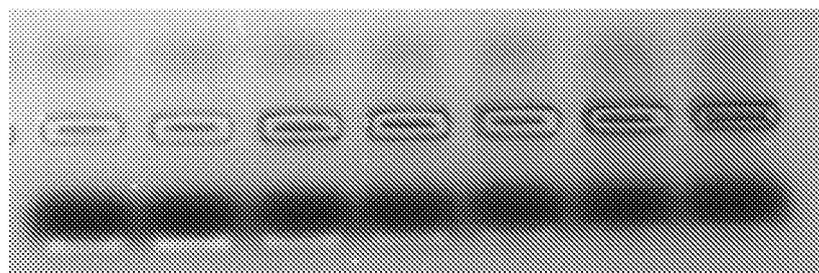


FIG. 3

A



1 2 3 4 5 6 7

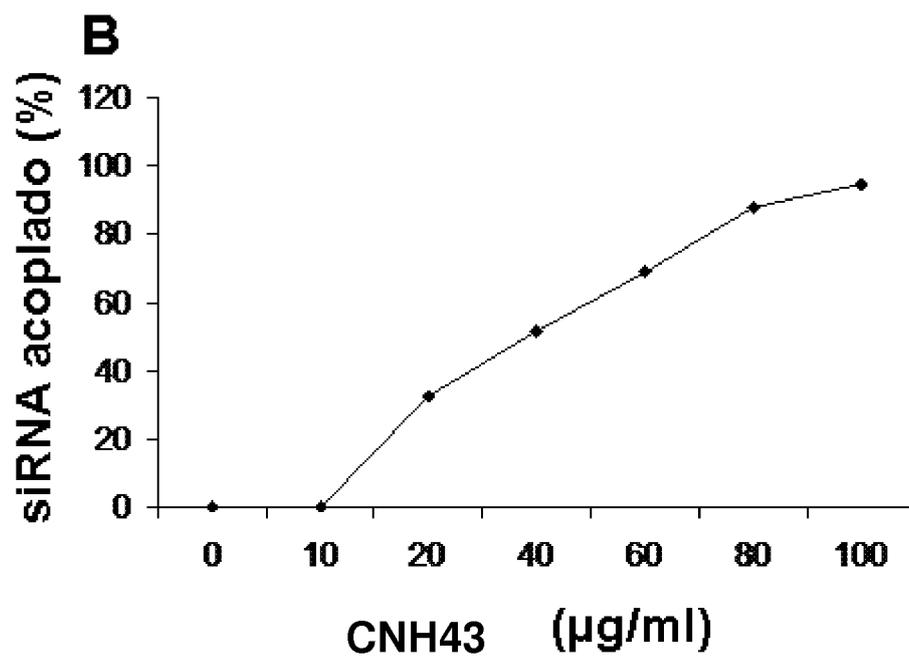


FIG. 4

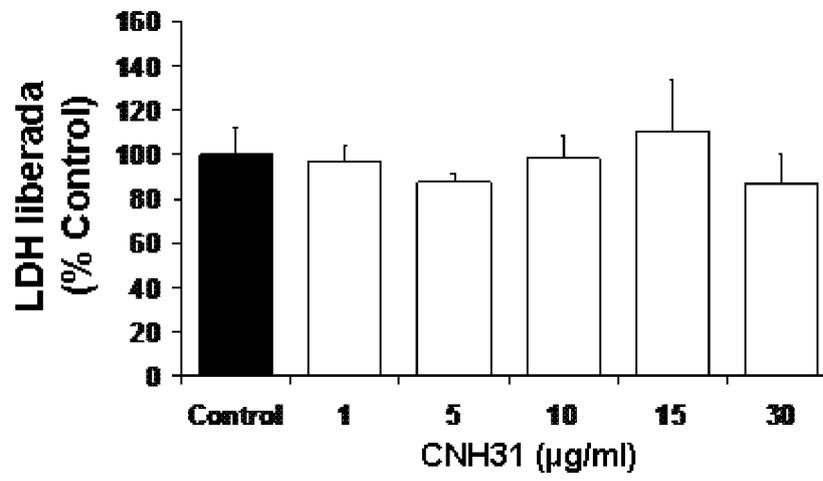


FIG. 5

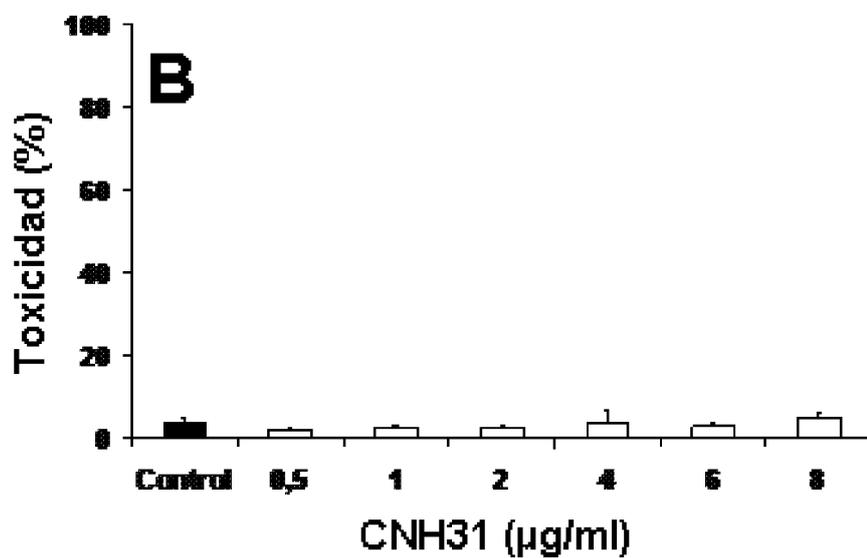
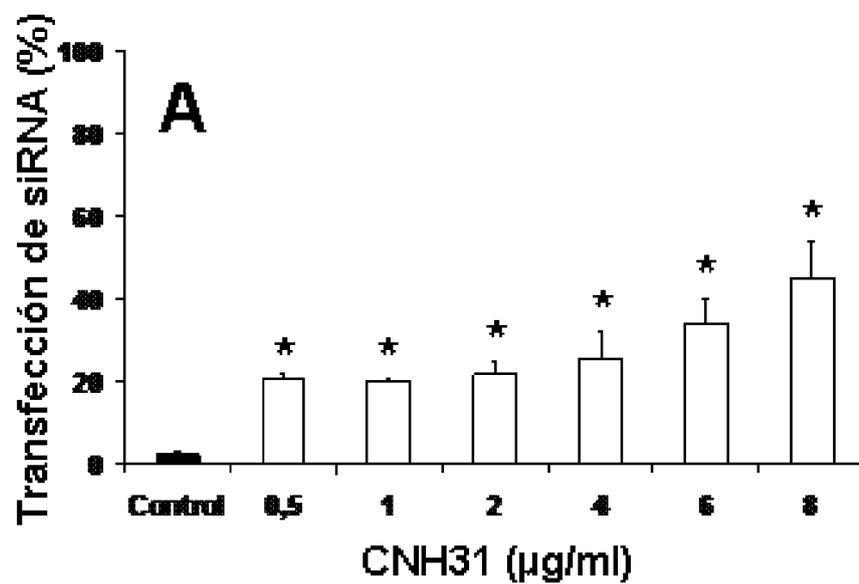


FIG. 6

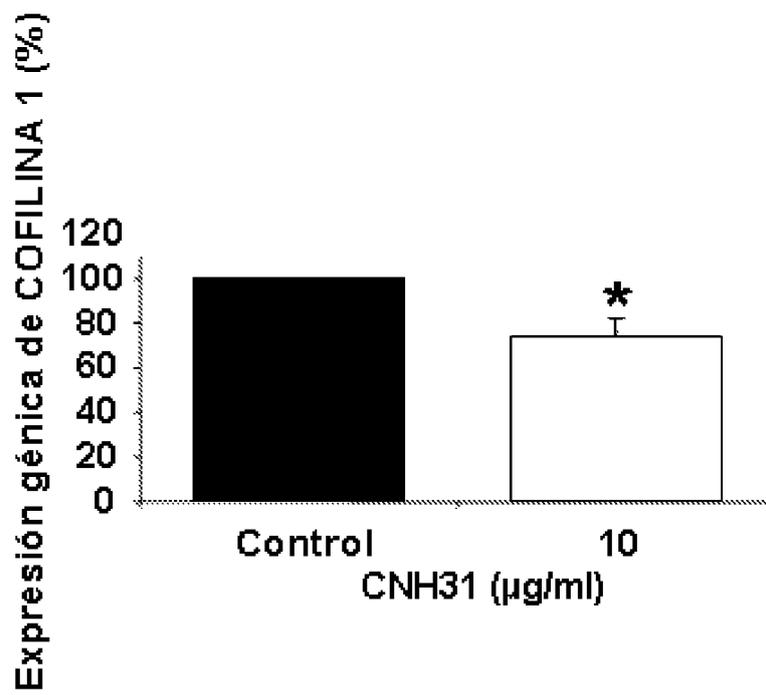


FIG. 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031204

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.08.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PAN et al. "Design of dendrimer modified carbonnanotubes for gene delivery". Chinese Journal of Cancer Research". 2007. Vol 19(1), páginas 1-6, todo el documento.	1-47
A	HERRERO et al. "Synthesis and characterization of a carbon nanotube-dendron series for efficient siRNA delivery". Journal of the American Chemical Society. 2009. Vol. 131, páginas 9843-9848, todo el documento.	1-47
A	HERRERO et al. "Gold dendrimer encapsulated nanoparticles as labeling agents for multiwalled carbon nanotubes". ACS Nano. 29.01.2010. Vol. 4(2), páginas 905-912, todo el documento.	1-47
A	FARAJI & WIPF. "Nanoparticles in cellular drug delivery". Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009. Vol. 17, páginas 2950-2962, todo el documento.	1-47
A	ROSEN & ELMAN. "Carbon nanotubes in drug delivery: focus on infectious diseases". Expert Opinion on Drug Delivery. 2009. Vol. 6(5), páginas 517-530, todo el documento.	1-47
A	TCHOUL et al. "Effect of mild nitric acid oxidation on dispersability, size, and structure of single-walled carbon nanotubes". Chemistry of Materials. 2007. Vol. 19, páginas 5765-5772, todo el documento.	1-47

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
22.09.2011

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K47/34 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

C12N15/87 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

A61K31/00 (2006.01)

A61K49/00 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

A61P31/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

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

A61K, C12N, B82Y, 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, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.09.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-47	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-47	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	PAN et al. Chinese Journal of Cancer Research. 2007. Vol 19(1), páginas 1-6.	2007
D02	HERRERO et al. Journal of the American Chemical Society. 2009. Vol. 131, páginas 9843-9848.	2009
D03	HERRERO et al. ACS Nano. 29.01.2010. Vol. 4(2), páginas 905-912.	29.01.2010
D04	FARAJI & WIPF. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009. Vol. 17, páginas 2950-2962.	2009
D05	ROSEN & ELMAN. Expert Opinion on Drug Delivery. 2009. Vol. 6(5), páginas 517-530.	2009
D06	TCHOUL et al. Chemistry of Materials. 2007. Vol. 19, páginas 5765-5772.	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 presente solicitud se refiere a vectores no virales obtenidos mediante la funcionalización de nanocuernos de carbono con dendrones y/o dendrímeros, y al uso de dichos vectores en terapia génica y en procedimientos de diagnóstico por imagen.

El documento D01 divulga vectores consistentes en nanotubos de carbono a cuya superficie se unen dendrímeros de tipo poliamidoamina (PAMAM), y al potencial uso de dichos vectores en terapia génica antitumoral y en técnicas de diagnóstico por imagen (ver todo el documento).

El documento D02 divulga vectores no virales útiles para la introducción de RNA pequeño de interferencia (siRNA) destinado al silenciamiento de genes de células tumorales. Dichos vectores se obtienen funcionalizando la superficie de nanotubos de carbono con dendrímeros de tipo PAMAM (ver todo el documento).

El documento D03 se refiere a la preparación de nanotubos de carbono que interactúan en su superficie con dendrímeros tipo PAMAM que contienen átomos de oro (ver todo el documento).

El documento D04 divulga una revisión de diferentes aproximaciones al uso de nanopartículas como transportadores de compuestos para el tratamiento de patologías que comprenden patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (ver todo el documento).

El documento D05 se refiere al uso de nanotubos de carbono funcionalizados como vectores útiles en terapia génica contra enfermedades infecciosas provocadas por agentes bacterianos o virales (ver todo el documento).

El documento D06 divulga los resultados de un estudio sobre el efecto producido en la estructura de los nanotubos de carbono por el tratamiento con ácido nítrico (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente solicitud es un vector no viral obtenido mediante la funcionalización de nanocuernos de carbono con dendrones y/o dendrímeros, y a su uso en terapia génica y en procedimientos de diagnóstico por imagen

1.1. Reivindicaciones 1-47.

El documento D01 se considera el más cercano en el estado de la técnica al objeto de la presente solicitud. Dicho documento anticipa el uso de vectores no virales para el transporte al interior celular de un oligonucleótido antisentido capaz de inhibir células tumorales de cáncer de mama de la línea MCF-7. Los vectores comprenden nanotubos de carbono unidos covalentemente a dendrímeros PAMAM de primera a cuarta generación que, de acuerdo con el conocimiento general de este tipo de polímeros, presentarían pesos moleculares aproximados en el rango de 1400-14000, diámetros entre 20 y 45 Å y entre 8 y 64 grupos de superficie, siendo además solubles en agua a pH inferior a 5 así como en metanol.

Por otra parte, el documento D02 también anticipa vectores no virales, obtenidos funcionalizando la superficie de nanotubos de carbono con dendrímeros de tipo PAMAM, útiles para la introducción de RNA pequeño de interferencia (siRNA) destinado al silenciamiento de genes de células tumorales.

La diferencia fundamental entre el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente solicitud y los documentos D01 y D02 consiste en que estos documentos no hacen ninguna referencia al uso de nanocuernos para construcción del vector no viral.

En base a lo expuesto en D01 y D02 y dado que el uso de nanocuernos, acoplados a dendrímeros polares, presenta una serie de ventajas sobre lo anticipado en el estado de la técnica, como ser moléculas que presentan una mayor estabilidad y biocompatibilidad, se considera que el objeto de las reivindicaciones de la presente solicitud no se encuentra en el estado de la técnica y tampoco derivaría del mismo de forma evidente para un experto en la materia.

En conclusión, las reivindicaciones 1-47 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986).

Aunque los documentos D03-D06 también se refieren al uso de nanopartículas para preparación de productos terapéuticos, ninguno de ellos hace referencia al uso de nanocuernos y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud.