

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 098**

51 Int. Cl.:
C12N 15/64 (2006.01)
C07K 5/068 (2006.01)
C07C 237/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05808260 .3**
96 Fecha de presentación: **17.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1828386**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Derivados de amidas y péptidos de dialquilenotriaminas y su uso como agentes de transfección**

30 Prioridad:
19.11.2004 GB 0425555

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2012

73 Titular/es:
**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
GLAXO WELLCOME HOUSE, BERKELEY
AVENUE
GREENFORD, MIDDLESEX UB6 0NN, GB**

72 Inventor/es:
**CASTRO, MARIANO JAVIER;
KITSON, CHRISTOPHER;
LADLOW, MARK y
PATEL, ALPESH**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 391 098 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de amidas y péptidos de dialquilenotriaminas y su uso como agentes de transfección.

Esta invención se refiere a compuestos tensioactivos basados en espermidina recientemente identificados, al uso de estos compuestos y a su producción. La invención se refiere también al uso de compuestos basados en espermidina para facilitar la transferencia de polinucleótidos en células o para facilitar la transferencia de compuestos terapéuticamente activos en células para el suministro de fármacos. Los compuestos con propiedades relacionadas con las propiedades de los compuestos de la invención se denominan a menudo tensioactivos Gemini.

Los tensioactivos son sustancias que afectan considerablemente a las propiedades de superficie de un líquido, incluso a bajas concentraciones, por ejemplo, los tensioactivos reducirán significativamente la tensión superficial cuando son disueltos en soluciones de agua o acuosas y reducirán la tensión interfacial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. Esta propiedad de las moléculas de tensioactivos ha sido ampliamente explotada en la industria, particularmente en las industrias de los detergentes y aceites. En los años 70 se informó de una nueva clase de molécula de tensioactivo, caracterizada por dos cadenas hidrófobas con cabezas polares que están colocadas mediante un puente hidrófobo (Demega, Y et al., *Kolloidn Zh.* 36, 649, 1974). Estas moléculas, que han sido denominadas "Gemini" (Menger, FM and Littau, CA, *J Am.Chem Soc* 113, 1451, 1991), tienen propiedades muy deseables sobre sus equivalentes monómeros. Por ejemplo, son altamente eficaces para reducir la tensión interfacial entre líquidos basados en aceite y agua y tienen una concentración micelar crítica muy baja (Menger, FM and Keiper, JS, *Angewandte. Chem Int Ed. Engl*, 2000, 39, 1906).

Los tensioactivos catiónicos han sido usados entre otras cosas para la transfección de polinucleótidos en células en cultivo y hay ejemplos de estos agentes disponibles en el comercio para científicos implicados en tecnologías genéticas (por ejemplo, el reactivo Tfx®-50 para la transfección de células eucarióticas disponibles en la empresa Promega Corp. WI, USA).

El suministro eficaz de DNA a células *in vivo*, para terapia génica o para terapia antisentido, ha sido un objetivo principal durante algunos años. Se ha concentrado una atención considerable en el uso de virus como vehículos de suministro, por ejemplo, adenovirus para células epiteliales en el tracto respiratorio dirigido a una terapia génica correctora para la fibrosis quística (CF). Sin embargo, a pesar de alguna evidencia de una transferencia génica satisfactoria en pacientes de CF, la vía del adenovirus continúa siendo problemática debido a los efectos secundarios inflamatorios y a la expresión transitoria limitada del gen transferido. Han sido investigados diversos métodos alternativos para el suministro de genes *in vivo*, que incluyen estudios que usan tensioactivos catiónicos. Gao, X et al. *Gene Ther.* 2, 710-722, 1995 demostraron el carácter factible de esta aproximación con un gen humano normal para un regulador de la conductancia transmembranas de CF (CFTR) en el epitelio respiratorio de ratones con CF usando lípidos catiónicos que portan aminas. Este grupo seguido con un ensayo de terapia génica de CF liposomal que, aunque solo fue parcialmente satisfactorio demostró el carácter potencial de esta aproximación para seres humanos (Caplen, NJ. et al, *Nature Medicine*, 1, 39-46, 1995). Más recientemente, otros grupos han investigado la capacidad potencial de otros lípidos catiónicos para el suministro génico, (Miller, A, [Λ]ngew. *Int Ed Engl*, 37, 1768-1785, 1998), por ejemplo, derivados de colesterol (Oudrhiri, N et al. *Proc Natl Acad Sci* 94, 1651-1656, 1997). Este estudio limitado demostró la capacidad de estos compuestos basados en colesterol para facilitar la transferencia de genes en células epiteliales tanto *in vivo* como *in vitro*, conduciendo así al apoyo de la validez de esta aproximación general.

El uso de vectores no virales (lípidos catiónicos) para la transfección de genes ha sido recientemente examinado, véase D. Niculescu-Duvaz, J. Heyes and C. J. Springer, *Curr. Med. Chem.*, 2003, 10, 1233.

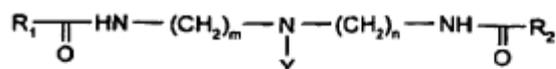
Estos estudios y otros, muestran que en este nuevo campo de investigación hay una nueva necesidad continuada de desarrollar nuevas moléculas de tensioactivos de baja toxicidad para facilitar la transferencia eficaz de polinucleótidos en células *in vitro* para la transfección en una experimentación basada en células y también *in vivo* para tratamientos de terapia génica y antisentido. Han sido preparados previamente tensioactivos Gemini basados en cisteína (documento WO 99/29712) o espermina (documento (WO 00/77032) o diamina (documento WO 00/76954). Otros ejemplos de tensioactivos Gemini se encuentran en los documentos WO 00/27795, WO 02/30957, WO 02/50100 y WO 03/82809. El uso de tensioactivos Gemini como vectores de polinucleótidos ha sido recientemente examinado (A. J. Kirby, P. Camilleri, J. B. F. N. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. Söderman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. Garcia Rodriguez, Philippe Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin and M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 1448, véase también R. Zana and J. Xia, *Gemini Surfactants*, Marcel Dekker, NY, 2004).

Una técnica recientemente desarrollada incluye el uso moléculas de RNA de cadena doble sintéticas corto de interferencia (si) para suprimir transitoriamente la función génica. Esta técnica de interferencia de DNA (RNAi) originalmente acuñada a partir de un trabajo en *C.elegans* (A. Fire, *Trends Genet.*, 1999, 15(9), 358) fue posteriormente desarrollada de forma que su uso se pudiera aplicar a células de mamíferos (S. M. Elbashir, J.

5 Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Nature, 2001, 411, 494). La capacidad de suministrar estas moléculas efectoras de siRNA al lugar correcto de la mayoría de la población celular es una etapa clave en la utilización eficaz de esta tecnología. Una vez que están correctamente colocadas, la cadena antisentido del Duplex de RNA se une a la región complementaria del (m) RNA mensajero de diana (que codifica la diana de interés), conduciendo a la hidrólisis del mRNA y su posterior degradación. Esta reducción transitoria en mRNA conduce a una reducción transitoria en la expresión génica diana. Son necesarios un suministro altamente eficaz y una correcta colocación para reducir la expresión génica diana hasta niveles tales que puede ser dilucidada la función de la diana.

La presente invención busca superar las dificultades exhibidas por los compuestos existentes.

La invención se refiere a compuestos que tienen la estructura general de fórmula (I):

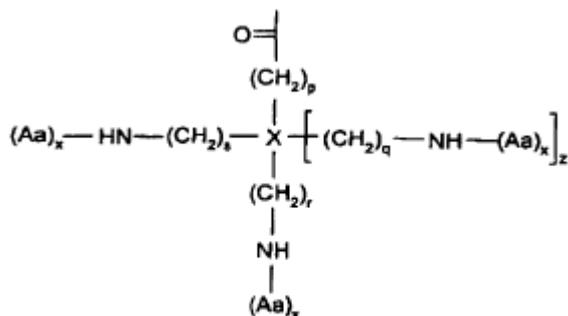


(I)

10

en la que Y es:

(Aa)_x o un grupo de fórmula (II)



(II)

en la cual

15 R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes, son una cadena de hidrocarburo saturado o insaturado, lineal o ramificado, de hasta 24 átomos de carbono;

m es 1 a 10;

n es 1 a 10;

20 (Aa)_x, que puede ser igual o diferente en cada aparición, es x aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en [H₂N(CH₂)₃]₂N(CH₂)CO₂H, (H₂NCH₂)₂CHCO₂H y enantiómeros L o D de Ser, Lys, Orn, Dab y Dap, conectados de una manera lineal o ramificada;

x que puede ser igual o diferente en cada aparición, es 1 a 6;

p es 0 a 6;

q es 1 a 6;

25 r es 1 a 6;

s es 1 a 6;

z es 0 ó 1;

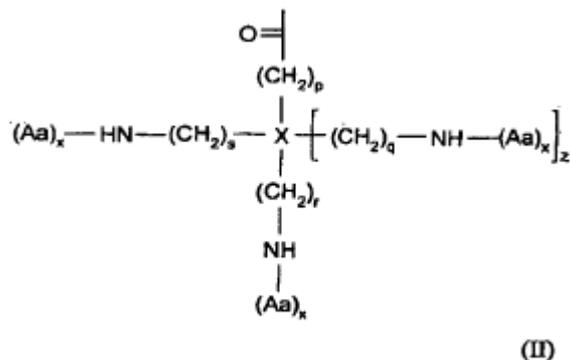
X es N, CH o C con la condición de que cuando X es N, z es 0 ó 1; cuando X es CH, z es 0 y cuando X es C, z es 1;

o una sal, preferentemente una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Preferentemente m es 3 a 6, lo más preferentemente 4; preferentemente n es 3 a 6, lo más preferentemente 3.

En una realización a) Y es $(Aa)_x$. En esta realización, R_1 y R_2 , por ejemplo, pueden ser iguales. Preferentemente x es 1 a 4, más preferentemente 1 ó 2, lo más preferentemente 1.

5 En otra realización b) Y es un grupo de fórmula (II)



en la cual

x, que puede ser igual o diferente en cada aparición, es 1 a 6;

p es 0 a 6;

10 q es 1 a 6;

r es 1 a 6;

s es 1 a 6;

z es 0 ó 1;

X es N, CH o C, con la condición de que cuando X es N, z es 0 ó 1; cuando X es CH, z es 0 y cuando X es C, z es 1.

15 En un ejemplo de realización (b) X puede ser, por ejemplo, N. En una de estas realizaciones z es 0 y r y s pueden ser, por ejemplo, iguales y R_1 y R_2 pueden ser, por ejemplo, iguales.

En una realización, X es N o C.

Preferentemente x es 1 a 4, más preferentemente 1 ó 2, lo más preferentemente 1. En una realización de (b) x es igual en cada aparición. En otra realización x es diferente en cada aparición.

20 Preferentemente p es 1.

Preferentemente q es 1 ó 3.

Preferentemente r es 1 ó 3.

Preferentemente s es 1 ó 3.

25 En una realización adicional preferida la cadena de hidrocarburo saturado o insaturado, lineal o ramificado de R_1 o R_2 de hasta 24 átomos de carbono tiene 10 o más átomos de carbono, por ejemplo 12 o más, por ejemplo 14 o más, por ejemplo 16 o más átomos de carbono. En una realización adicional preferida la cadena de hidrocarburo saturado insaturado, lineal o ramificado de R_1 o R_2 de hasta 24 átomos de carbono se selecciona entre:

$-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$

30 $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$
 $-(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$
 $-(\text{CH}_2)_{20}\text{CH}_3$
 $-(\text{CH}_2)_{20}\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ mezcla natural

5 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ mezcla natural

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ Cis

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ Cis

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ Trans

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ Trans

10 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_7(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ [$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$] $_3\text{CH}_3$

15 o $-(\text{CH}_2)_{22}\text{CH}_3$,

Lo más preferentemente, la cadena del hidrocarburo se selecciona entre $(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ mezcla natural, $(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ Cis y $(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ Trans.

En una realización, un compuesto de la invención es un compuesto tensioactivo denominado "Gemini". Es decir, que el compuesto es simétrico con al menos dos cadenas alifáticas.

20 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando una química sintética bien conocida por el experto en la técnica. La Figura 1 muestra un esquema general para la síntesis de un intermedio 6 para la síntesis de compuestos de la invención. La Figura 2 muestra un esquema general para la síntesis de un grupo 9 (Aa) preferido protegido para la síntesis de compuestos de la invención. La Figura 3 muestra un esquema general para la síntesis de un grupo 14 (Aa) preferido protegido para la síntesis de compuestos de la invención.

25 Como se muestra en el esquema general de la Figura 4, la reacción del intermedio 6 mediante la adición de grupos (Aa)_x bajo condiciones apropiadas seguido de desprotección produce moléculas con el modelo de sustitución según la realización a) de la invención.

30 La Figura 5 muestra un esquema general para la conversión de intermedio 6 en intermedio avanzado 18 para la síntesis de compuestos de la invención. Como se muestra en el esquema general de la Figura 6, el intermedio 18 puede ser usado para producir moléculas con el modelo de sustitución según la realización b) de la invención, mediante la adición de grupos (Aa)_x bajo condiciones apropiadas seguido de desprotección.

35 Diversas estrategias alternativas son bien conocidas por el experto en la técnica y se pueden concebir estrategias adecuadas para cualquier modelo de sustitución final deseado particular. Para modelos de sustitución asimétricos, puede ser necesaria la separación física de productos intermedios. Los métodos de separación adecuados, por ejemplo, los métodos cromatográficos, son bien conocidos por el experto en la técnica.

Pueden ser preparadas sales de moléculas de acuerdo con la invención mediante técnicas estándar, como se muestra, en los esquemas de las Figuras 4 y 6. En el esquema mostrado en las Figuras 4 y 6, la etapa de formación de la sal es también una etapa de desprotección.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para usar los compuestos tensioactivos basados en espermidina. Estos usos incluyen emplear los compuestos de la invención para facilitar la transfección de polinucleótidos en células en cultivo cuando es necesaria esta transferencia, por ejemplo, en estudios de expresión génica y experimentos de control antisentido, entre otros. Los protocolos para la preparación de estos polinucleótidos moléculas antisentido son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), Cohen, JS ed. Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1989)). Los polinucleótidos pueden ser mezclados con los compuestos añadidos a las células e incubados para permitir la absorción de polinucleótidos. Después de una incubación adicional, las células pueden ser ensayadas en cuanto a la disposición fenotípica proporcionada por el DNA transfectado o los niveles de mRNA expresados por dicho DNA pueden ser determinados mediante transferencia Northern o usando métodos de cuantificación basados en PCR, por ejemplo, el método Taqman® (Perkin Elmer, Connecticut, USA).

Los compuestos de la invención ofrecen una mejora significativa, normalmente entre 3 y 6 veces, en la eficacia de la absorción celular de DNA en células en cultivo, en comparación con compuestos de la técnica anterior. En el protocolo de transfección, el compuesto tensioactivo de espermidina puede ser usado en combinación con uno o más complementos para aumentar la eficacia de transfección. Estos complementos se pueden seleccionar, por ejemplo:

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

(ii) un reactivo complejante, por ejemplo, el reactivo PLUS disponible en el comercio (Life Technologies Inc. Maryland, USA) o péptidos, como polilisina o péptidos de poliornitina o péptidos que comprenden principalmente, pero no exclusivamente, aminoácidos básicos como lisina, ornitina y/o arginina (véase, por ejemplo, Henner, WD et al (1973) J.Virol. 12(4) pag. 741-747). La lista anterior no está previsto que sea exhaustiva y otros complementos que aumenten la eficacia de la transfección se considera que caen dentro del alcance de la invención.

Todavía, otro aspecto de la invención se refiere a métodos para efectuar el suministro de compuestos de fármacos no basados en nucleótidos en células *in vitro* usando los compuestos de la invención.

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

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

“Polinucleótido” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidisoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA sin modificar o RNA o DNA modificados. “polinucleótidos” incluye, sin limitación DNA de cadena única y doble, DNA que es una mezcla de regiones de cadena única y doble, RNA de cadena única y doble y RNA que es una mezcla de regiones de cadena única y doble, moléculas híbridas que comprenden DNA y RNA que pueden ser de cadena única, o más normalmente, de cadena doble o una mezcla de regiones de cadena única y doble. Además, “polinucleótido” se refiere a regiones de cadena triple que comprenden RNA o DNA o tanto RNA y DNA. El término polinucleótido incluye también DNA's O RNA's Que contienen una o más bases y DNA's O RNA's con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otros motivos. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales como inosina. Una diversidad de modificaciones han sido hechas para DNA y RNA; por tanto, “polinucleótido” abarca formas modificadas de manera química, enzimática o metabólica de polinucleótidos como los que se encuentran normalmente en la naturaleza, así como las formas químicas de DNA y RnA características de virus y células. “polinucleótido” abarca también polinucleótidos relativamente cortos, denominados a menudo oligonucleótidos.

“Transfección” se refiere a la introducción de polinucleótidos en células en cultivo usando métodos que incluyen la modificación de la membrana celular por medios químicos y físicos. Estos métodos se describen, por ejemplo, en et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spnng Harbor, N. Y. (1989). Los polinucleótidos pueden ser lineales o circulares, de cadena única o de cadena doble y pueden incluir elementos que controlen la replicación del polinucleótido o la expresión de genes homólogos o heterólogos que pueden comprender parte del polinucleótido.

Una sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable se puede formar mediante la reacción de un compuesto de fórmula (I) con un ácido inorgánico u orgánico adecuado (como ácido bromhídrico, clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, succínico, maleico, fórmico, acético, propiónico, fumárico, cítrico, tartárico, láctico, benzoico, salicílico, glutámico, aspártico, p-toluenosulfónico, trifluoroacético, bencenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, naftalenosulfónico como 2-naftalenosulfónico o hexanoico), opcionalmente en un disolvente adecuado como un disolvente orgánico, para proporcionar la sal que es habitualmente aislada, por ejemplo, por cristalización y filtración.

Una sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) puede comprender o

ser, por ejemplo, una sal de hidrobromuro, hidrocloreuro, sulfato, fosfato, succinato, maleato, formiato, acetato, propionato, fumarato, citrato, tartrato, lactato, benzoato, salicilato, glutamato, aspartato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, bencenosulfonato, metanosulfonato, etanosulfonato o naftalenosulfonato (por ejemplo, 2-naftalenosulfonato o hexanoato).

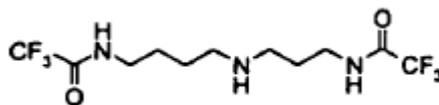
- 5 La invención incluye dentro de su alcance todas las posibles formas estequiométricas y no estequiométricas de las sales de los compuestos de fórmula (I) incluidos los hidratos y solvatos.

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

- 10 La invención se describirá seguidamente por medio de los siguientes ejemplos. Los ejemplos no deben ser tomados en modo alguno para limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

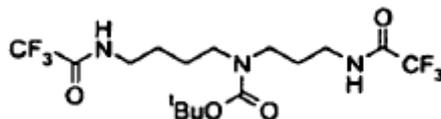
Descripción 1: trifluoroacetato N¹, N⁸-bis(trifluoroacetil)-espermidina (2).



- 15 A una solución de espermidina 1 (m = 4, m = 3; 9,70 g, 66,8 mmol) en CH₃Cl (150 ml) se añadió trifluoroacetato de etilo (39,8 ml, 330 mmol) y agua (2,8 ml, 18 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 18 h, seguidamente se dejó enfriar a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a vacío. El sólido residual se trituró CH₂Cl₂ (2 x 150 ml) para proporcionar la bis(trifluoroacetamida) 2 en forma de un sólido blanco (28,9 g).

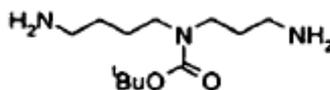
LC-MS (ESI): t_R = 1,10 min (m/z = 338,1 [M+H]⁺).

- 20 Descripción 2: N⁴-(terc-butoxicarbonil)-N¹,N⁸-bis(trifluoroacetil)-espermidina (3)



- 25 Se añadieron diisopropiltilamina (16,7 ml, 95,7 mmol) y una solución de bicarbonato de di-terc-butilo (14,63 g, 67,0 mmol) en THF (100 ml) a una solución de trifluoroacetato de N¹,N⁸-bis(trifluoroacetil) espermidina 2 (28,8 g, 63,8 mmol) en THF (280 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 18 h a t.a. (temperatura ambiente), el disolvente se evaporó a vacío y se añadió EtOAc (700 ml). La solución se lavó sucesivamente con NaHCO₃ al 5% (2 x 150 ml), salmuera (150 ml), KHSO₄ al 5% (2 x 150 ml) y salmuera (2 x 150 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó para proporcionar carbamato de Boc 3 en forma de un sólido blanco (28,0 g). LC-MS (ESI): t_R = 4,09 min (m/z = 438,3 [M+H]⁺).

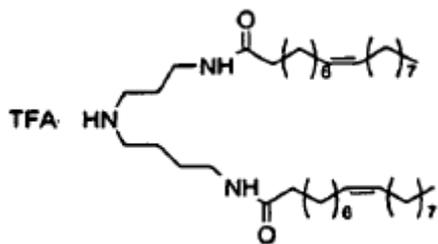
Descripción 3: N⁴-(terc-butoxicarbonil)-espermidina (4)



- 30 Se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio (280 ml x 0,5 M) a 10°C con agitación a una solución de N⁴-(terc-butoxicarbonil)-N¹,N⁸-bis(trifluoroacetil) espermidina (28,0 g, 64,0 mmol) en metanol (400 ml). El baño de enfriamiento se retiró y la mezcla se agitó durante 18 h cuando el metanol se evaporó a vacío. La suspensión acuosa resultante se extrajo con [9:1] de CHCl₃-MeOH (5 x 300 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron a vacío para dejar la amina 4 en forma de un aceite incoloro (15,5 g).

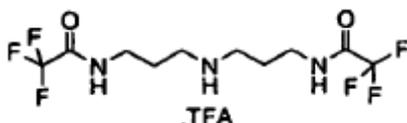
LC-MS (ESI): t_R = 0,56 min (m/z = 246,2 [M+H]⁺).

Descripción 4: trifluoroacetato de N¹,N⁸-dioleil-espermidina (6; R =oleino)



Una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido oleico (2,10 g, 5,40 mmol) disuelto en THF (90 ml) y una solución de carbonato de potasio (890 mg, 6,40 mmol) en agua (14 ml) se añadieron a una solución de N⁴-(terc-butiloxicarbonil)-espermidina 4 (632 mg, 2,58 mmol) en THF (90 ml). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 16 h y seguidamente se concentró a vacío. El residuo se disolvió en CHCl₃ (300 ml), se lavó con ácido cítrico acuoso al 5 % (50 ml) y salmuera (2 x 50 ml), seguidamente se secó (Na₂SO₄) y se concentró a vacío. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía rápida eluyendo con hexano-EtOAc [75:25] seguido de hexano-EtOAc [75:25] para proporcionar el carbamato de Boc 5 intermedio en forma de un aceite marrón. El aceite se disolvió en CH₂Cl₂ (6,0 ml), se enfrió a 0°C y se trató con ácido trifluoroacético (6,0 ml). La mezcla resultante se dejó calentar lentamente a t.a. y se agitó durante 1,5 h adicional. El disolvente se separó bajo presión reducida y el residuo se evaporó conjuntamente con dietil-éter para proporcionar la sal de trifluoroacetato 6 en forma de un sólido blanco (1,94 g). LC-MS (ESI): t_R = 19,3 min (m/z = 674,6564 [M+H]⁺, 100%); HRMS (ESI) m/z calculado: (C₅₄H₁₀₇N₈=4) 674,6564, encontrado 674,6564 [M+H]⁺.

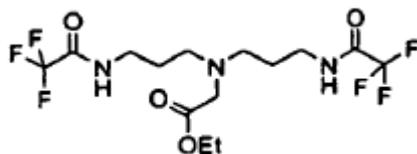
Descripción 5: trifluoroacetato de 2,2,2-trifluoro-N-{3-[3-(2,2,2-trifluoroacetilamino)-propilamino]propil}-acetamida (7)



Se añadió trifluoroacetato de etilo (27,0 g, 190 mmol) a una solución de N¹-(3-aminopropil)propano-1,3-diamina (m = 3, 5,00 g, 38,2 mmol) en [99:1] de acetonitrilo:agua (150 ml) y la mezcla se calentó a reflujo con agitación durante 3 h. Después de enfriar a t.a. se añadió (CH₂Cl₂) (50 ml) y el precipitado resultante se recogió y se lavó con CH₂Cl₂ (50 ml) para proporcionar la sal de trifluoroacetato 7 en forma de un polvo blanco (16,6 g).

LC-MS (ESI): t_R = 2,05 min (m/z = 323,0 [M+H]⁺).

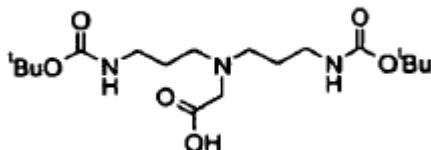
Descripción 6: éster etílico de ácido {bis-[3-(2,2,2-trifluoroacetilamino)]-amino}acético (8)



Se añadió bromoacetato de etilo (7,30, 43,7 mmol) a una solución de isopropiletilamina (15,0 g, 86,3 mmol) y la sal de trifluoroacetato 8 (15,0 g, 34,5 mmol) en acetonitrilo anhidro (150 ml). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 18 h y seguidamente se concentró a vacío. El residuo obtenido se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 60 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (NaSO₄) y se evaporaron a vacío para proporcionar el éster etílico 8 en forma de un aceite amarillo pálido (14,1 g).

LC-MS (ESI): t_R = 3,0 min (m/z = 410 [M+H]⁺).

Descripción 7: ácido bis-(3-terc-butoxicarbonilamino-propil)-amino]-acético (9)

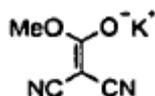


30

5 Una mezcla de éster etílico 8 (14,1 g, 34,5 mmol), hidróxido de sodio (6,0 g, 40,0 mmol) agua (35 ml) y etanol (175 ml) se agitó a t.a. durante 20 h. Se añadió anhídrido Boc (15,1 g, 68,8 mmol) y se continuó la agitación durante 3 h adicionales antes de que la mezcla se ajustara a pH neutro añadiendo ácido clorhídrico al 10%. Se añadió agua (100 ml) y la solución se extrajo con CH_2Cl_2 (4 x 50 ml). Los extractos orgánicos combinados (Na_2SO_4) y se concentraron a vacío para dejar el ácido carboxílico 9 en forma de un polvo blanco (3,5 g).

LC-MS (ESI): $t_R = 3,5$ min ($m/z = 390,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$).

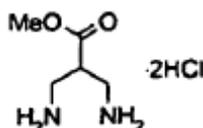
Descripción 8: sal de potasio de dicianoacetato de metilo (11)



10 Una solución de malonitrilo (4,00 g, 60,6 mmol) y cloroformiato de metilo (4,95 ml, 64,2 mmol) en THF (9,0 ml) se añadió durante 0,5 h a una solución en agitación de hidróxido de potasio (6,80 g, 121 mmol) en agua (6,0 ml) manteniendo la temperatura por debajo de 40°C. La mezcla se agitó a t.a. durante 2 h adicionales y el precipitado resultante se recogió por filtración y se lavó en primer lugar con agua fría (10 ml) y seguidamente etanol (10 ml) para proporcionar la sal de potasio 11 en forma de un sólido blanco (3,31 g).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O): δ_H 3,58 (s, 3H).

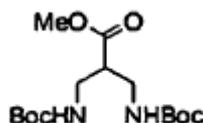
15 Descripción 9: bis-hidrocloruro de 3-amino-2-(aminometil)-propionato de metilo (2)



20 Una suspensión en agitación de 10% de paladio en carbono (2,0 g) en una solución de la sal de sodio de dicianoacetato de metilo (1,00 g, 6,20 mmol) en metanol (100 ml) que contenía ácido clorhídrico concentrado (32%, 2,0 ml) se hidrogenó a 5 bares y t.a. durante 24 h. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se trató con metanol (50 ml) y el cloruro de sodio precipitado se separó por filtración. La solución se concentró hasta un volumen bajo a vacío y seguidamente se añadió EtOAc para precipitar el bis-hidrocloruro 12 en forma de un sólido blanco apagado (1,20 g).

$^1\text{H-RMN}$ (d^6 DMSO): δ_H 8,40 (s ancho, 6H), 3,65 (s, 3H), 3,25 (m, 1H), 3,15 (m, 4H).

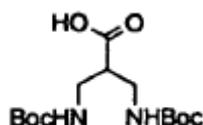
Descripción 10: éster metílico de ácido 3-(terc-butoxicarbonilamino)-2-(terc-butoxicarbonilamino-metil)propiónico



25 Se añadió anhídrido de Boc (0,62 g, 2,83 mmol) a una solución en agitación de isopropiletilamina (0,95 ml, 5,40 mmol) y el bis-hidrocloruro 12 (255 mg, 1,35 mmol) en DMF (8,0 ml). Después de agitar durante 18 h a t.a. los sólidos precipitados se separaron por filtración y el filtrado se evaporó a vacío. El aceite residual se disolvió en EtOAc (30 ml) seguidamente se lavó con agua (2 x 5 ml), se secó (Na_2SO_4) y se evaporó a vacío para proporcionar el carbamato de bis-Boc 13 en forma de un aceite incoloro viscoso (430 mg).

30 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): δ_H 5,20 (2 ancho, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,55 (m, 2H), 3,20 (m, 2H), 2,73 (m, 1H), 1,42 (2, 18H).

Descripción 11: ácido 3-(terc-butoxicarbonilamino)-2-(terc-butoxicarbonilamino-metil)propiónico (14)



Se añadió hidróxido de sodio 2M acuoso (2,48 ml, 4,96 mmol) a una solución en agitación del éster metílico 13 80,41 g, 1,24 mmol) en THF (7,5 ml) y la mezcla se agitó a t.a durante 24 h. Se añadió agua (15 ml) y la solución se acidificó con ácido cítrico acuoso al 5%. La mezcla se extrajo con CHCl_3 (3 x 25 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (30 ml) se secaron (Na_2SO_4) y se evaporaron a vacío para dejar el ácido 14 en forma de un aceite viscoso incoloro (280 mg).

$^1\text{H-RMN}$ (d^6 DMSO): δ_{H} 12,22 (s ancho, 1H), 6,70 (s ancho, 2H); 3,05 (m, 4H), 2,50 (m, 1H), 1,35 (s, 18H).

Descripción 12: $(\text{Boc})_1\text{Lys}(\text{tBuO})\text{SerOH}$.

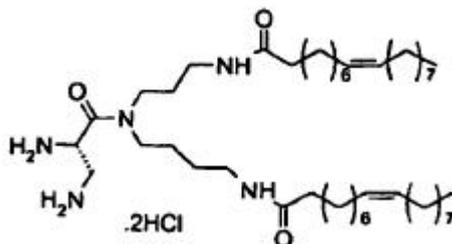
Una solución de bis-Boc-L-lisina-N-hidroxisuccinimida (2,54 g, 5,72 mmol) en THF (60,0 ml) se añadió a una mezcla en agitación de L-serina-terc-butil-éter (1,02 g, 6,30 mmol) y carbonato de potasio (1,03 g, 7,44 mmol) en agua (12,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y seguidamente se concentró a vacío. El residuo se diluyó con CHCl_3 (140 ml) y agua (140 ml) y se ajustó a pH 2 con ácido clorhídrico 1N. La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CHCl_3 (2 x 140 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y seguidamente se evaporaron a vacío para proporcionar el dipéptido en forma de una espuma blanca (2,84 g).

LC-MS (ESI): $t_{\text{R}} = 3,80$ min ($m/z = 490,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$).

Procedimiento general para preparar N^1, N^8 -dioleil- N^4 -(Aa)-espermidina (16)

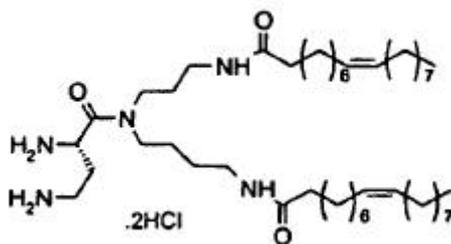
El aminoácido protegido en N-terminal ((Aa) $_x$ -(PG) $_y$: 1,1 eq.), HCTU (1,1 eq.), y diisopropiletilamina (3,2 eq.) se añadieron a una solución de trifluoroacetato de N^1, N^8 -dioleil-espermidina 6 en DMF (60 mM). La mezcla se agitó a t.a bajo N_2 durante 18 h cuando se añadió un volumen igual de EtOAc. La mezcla orgánica se lavó sucesivamente con solución acuosa al 5% de KHSO_4 (3 x), solución acuosa al 5% de K_2CO_3 (3 x) y salmuera (1 x) seguidamente se secó (Na_2SO_4) y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (10 mM) y se añadió un volumen igual de HCl 5,0 M en EtOAc. La reacción se agitó a t.a. durante 2 h y seguidamente se concentró a vacío y el residuo se trituró con dietil-éter para proporcionar un sólido blanco amorfo que se purificó mediante RP-HPLC dirigida a MS (C-18, 5 μm ; eluyente A: agua + ácido fórmico al 0,1%, eluyente B: MeCN:agua [95:5]+ ácido fórmico al 0,1%; caudal: 40 ml/min; detector (ESI-MS); método: 5-30% de B en A durante 15 minutos). La fracción que contenía el producto se evaporó y el residuo se disolvió en metanol y se trató con HCl 2,0 M en dietil-éter. Después de 10 minutos, el disolvente se separó a vacío y el residuo se liofilizó para proporcionar el hidrocloreto de tensioactivo 16 en forma de un sólido blanco.

Ejemplo 1: Aa = L-Dap.



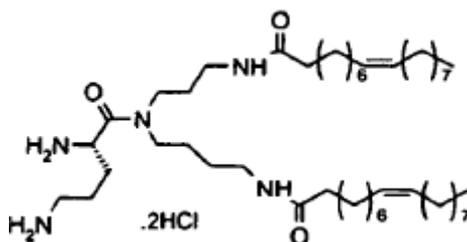
LC-MS (ESI): $t_{\text{R}} = 7,50$ min ($m/z = 674,6$ $[\text{M-Dap}]^+$ (100%), $760,7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (20%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($\text{C}_{46}\text{H}_{90}\text{N}_5\text{O}_3$) 760,7044, encontrado 760,7028 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 2: Aa = L-Dab.



LC-MS (ESI): $t_R = 6,70$ min ($m/z = 774,7$ $[M+H]^+$ (50%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{47}H_{92}N_5O_3$) 774,7200, encontrado 774,7197 $[M+H]^+$.

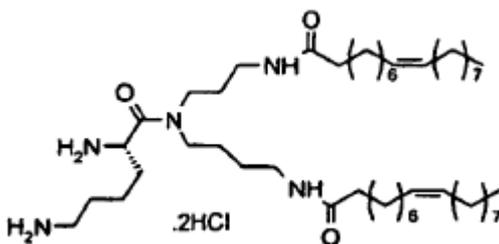
Ejemplo 3: Aa = L-Orn.



5

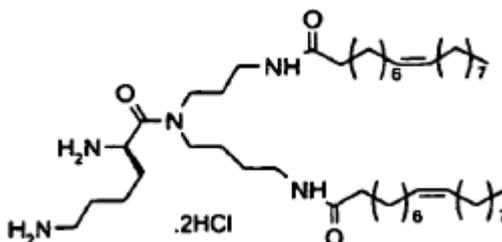
LC-MS (ESI): $t_R = 6,64$ min ($m/z = 788,7$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{48}H_{94}N_5O_3$) 788,7357, encontrado 788,7350 $[M+H]^+$.

Ejemplo 4: Aa = L-Lys.



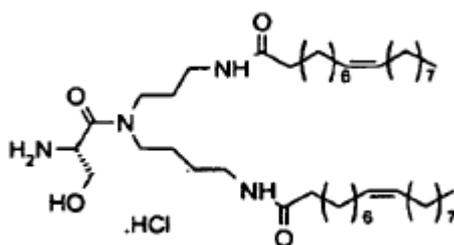
10 LC-MS (ESI): $t_R = 6,68$ min ($m/z = 802,8$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{49}H_{96}N_5O_3$) 802,7513, encontrado 802,7517 $[M+H]^+$.

Ejemplo 5: Aa = D-Lys.



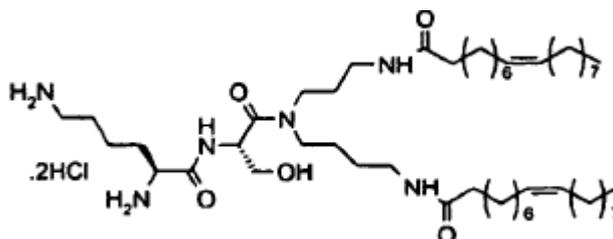
15 LC-MS (ESI): $t_R = 6,78$ min ($m/z = 802,8$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{49}H_{96}N_5O_3$) 802,7513, encontrado 802,7524 $[M+H]^+$.

Ejemplo 6: Aa = L-Ser.



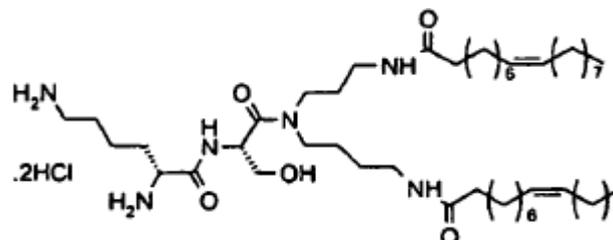
LC-MS (ESI): $t_R = 18,41$ min ($m/z = 761,7$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{46}H_{89}N_4O_4$) 761,6884, encontrado 761,6888 $[M+H]^+$.

Ejemplo 7: Aa = L-Ser-L-Lyx.



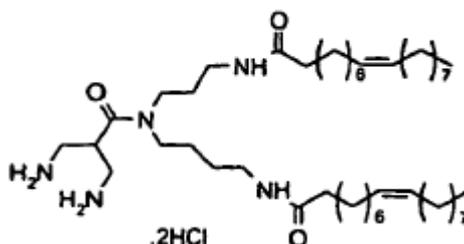
5 LC-MS (ESI): $t_R = 14,89$ min ($m/z = 889,8$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{52}H_{101}N_6O_5$) 889,7833, encontrado 889,7829 $[M+H]^+$.

Ejemplo 8: Aa = L-Ser-D-Lys.



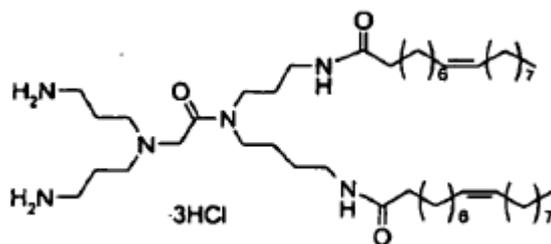
10 LC-MS (ESI): $t_R = 14,94$ min ($m/z = 889,8$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{52}H_{101}N_6O_5$) 889,7833, encontrado 889,7842 $[M+H]^+$.

Ejemplo 9: Aa = (14).



LC-MS (ESI): $t_R = 6,33$ mm ($m/z = 774,7$ $[M+H]^+$ (100%).

15 Ejemplo 10: Aa = (9).



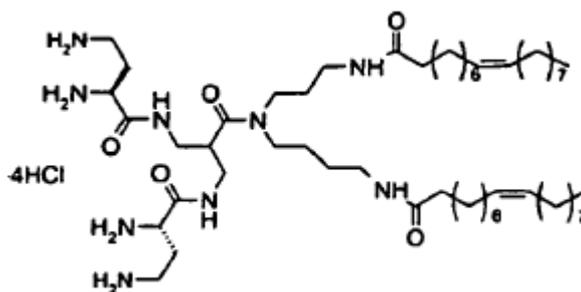
Una solución del ácido bis-Boc-carboxílico 9 (660 mg, 1,68 mmol) en CH_2Cl_2 (15 ml) que contenía TBTU (530 mg, 1,68 mmol) y diisopropiletilamina (1,5 ml, 8,40 mmol) se añadió a bis(trifluoroacetato) de N^1, N^8 -dioleil-espermidina 6 (1,00 g, 1,40 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 18 h, seguidamente se concentró a vacío y el residuo se recogió en CH_2Cl_2 (100 ml) y se lavó sucesivamente con solución acuosa al 5% de KHSO_4 (25 ml), solución acuosa al 5% de K_2SO_3 (2 x 25 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y se evaporó a vacío para dejar un aceite que se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyendo con una mezcla de CHCl_3 -MeOH [90:10] para proporcionar el bis-Boc-carbamato intermedio en forma de una goma incolora. La goma se disolvió en CH_2Cl_2 (25 ml) y se trató con HCl 5 M en EtOAc (10 ml). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 2 h cuando el sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con dietil-éter anhidro y se secó a vacío para proporcionar el ejemplo 10 en forma de un polvo blanco.

LC-MS (ESI): $t_R = 12,65$ min ($m/z = 845,8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calculado ($\text{C}_{51}\text{H}_{101}\text{N}_6\text{O}_3$) 845,7935 encontrado 845,7938 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Procedimiento general para preparar N^1, N^8 -dioleil- N^4 -[(14)-Aa]-espermidina (20)

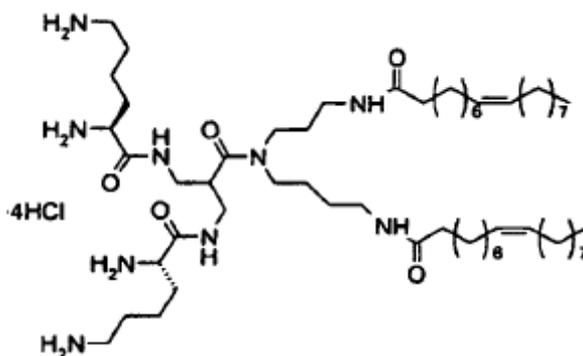
Se añadieron el ácido protegido en N-terminal (2,6 eq.), HCTU (2,6 eq.) y DIEA (7,5 eq.) a una solución del ejemplo 9 en DMF (80 mM). La mezcla se agitó a t.a. bajo N_2 durante 18 h y seguidamente se añadió un volumen igual de EtOAc. La mezcla orgánica se lavó sucesivamente con solución acuosa al 5% de KHSO_4 (3 x), solución acuosa al 5% de K_2SO_3 (3 x) y salmuera (1 x) seguidamente se secó (Na_2SO_4) y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en EtOAc (10 mM) y se añadió un volumen igual de HCl en EtOAc. La reacción se agitó a t.a. durante 2 h y seguidamente se concentró a vacío y el residuo se trituró con dietil-éter para proporcionar un sólido blanco amorfo que se purificó mediante RP-HPLC dirigida a MS preparativa (100-18, 5 μm ; eluyente A: agua + ácido fórmico al 0,1%, eluyente B: MnSN : agua [95:5] + ácido fórmico al 0,1%; caudal: 40 ml/min; detector (ESI-MS); método: 30-505 de B en A durante 15 min). La fracción que contenía el producto se evaporó y el residuo se disolvió en metanol y se trató con HCl 2,0 M en dietil-éter. Después de 10 min, el disolvente se separó a vacío y el residuo se liofilizó para proporcionar la sal de hidrocloreto 20 en forma de un sólido blanco.

Ejemplo 11: Aa = L-Dab.



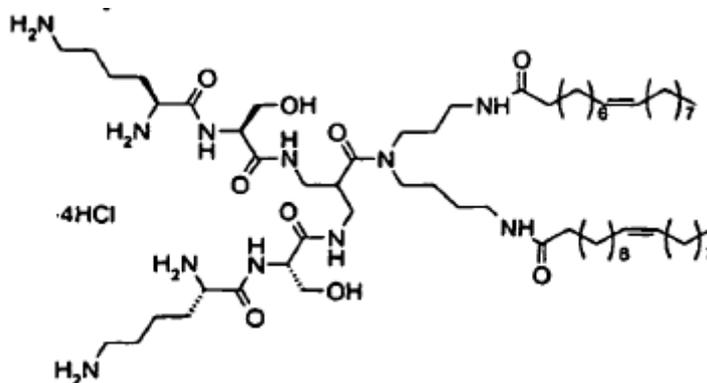
LC-MS (ESI): $t_R = 12,65$ min ($m/z = 974,8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($\text{C}_{55}\text{H}_{108}\text{N}_9\text{O}_5$) 974,8473, encontrado 974,8473 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo 12: Aa = L-Lys.



LC-MS (ESI): $t_R = 12,47$ min ($m/z = 1030,9$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{59}H_{116}N_9O_5$) 1030,9099, encontrado 1030,9108 $[M+H]^+$.

Ejemplo 13: Aa



5

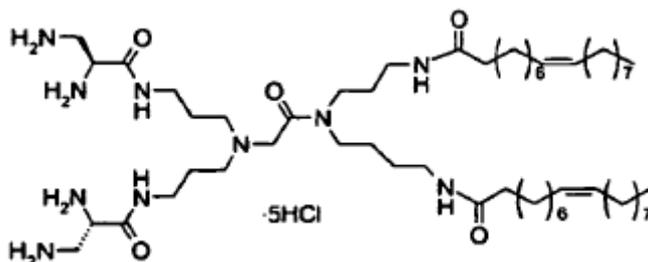
LC-MS (ESI): $t_R = 12,46$ min ($m/z = 603,0$ $[M+2H]^{2+}$ (100%), 1205,0 $[M+H]^+$ (85%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{65}H_{126}N_{11}O_9$) 1204,9740, encontrado 1204,9755 $[M+H]^+$.

Procedimiento general para preparar N^1,N^8 -dioleil- N^4 -[(9)-Aa]-espermidina (20)

El ejemplo 10 de hidrocloreto de amina (Aa = 9) (1,0 eq.) se añadió a t.a. a una solución en agitación del aminoácido protegido en N terminal ((Aa)_x(PG)_y; 2,2 eq.), hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (2,2 eq.) y diisopropiletilamina (6,0 eq.) en CH_2Cl_2 (aproximadamente 20 mM). Después de 18 h, la mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó sucesivamente con agua, solución acuosa al 5% de K_2CO_3 y salmuera. La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró a vacío para dejar un aceite que se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice) eluyendo con una mezcla de MeOH: $CHCl_3$ [97:3] que contenía 0,2% de trietilamina para proporcionar el carbamato intermedio 19 en forma de una goma incolora. La goma se disolvió en HCl 5M en EtOAc (5 mm) y la solución resultante se agitó a t.a. durante 2 h. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con dietil-éter anhidro y se secó a vacío para proporcionar la sal de hidrocloreto 20 en forma de un polvo blanco.

15

Ejemplo 14

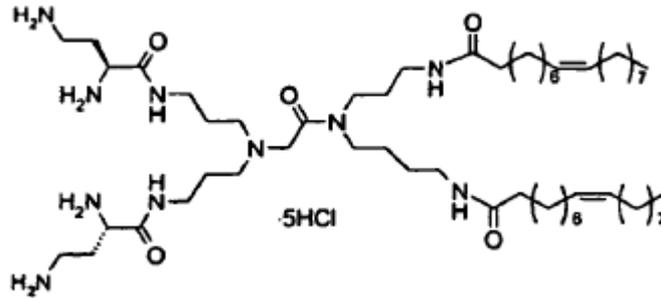


20

LC-MS (ESI): $t_R = 12,65$ min ($m/z = 1017,9$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{57}H_{113}N_{10}O_5$) 1017,8895,

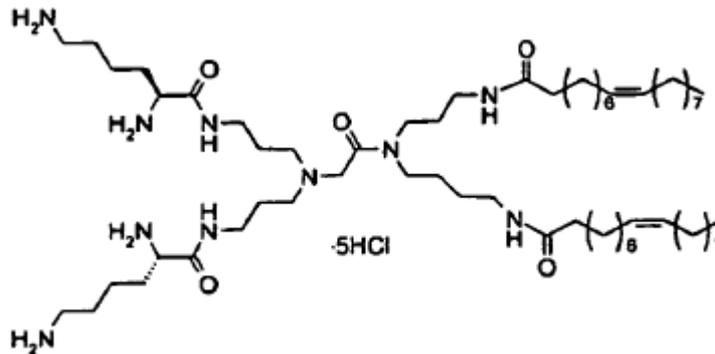
encontrado 1017,8915 $[M+H]^+$.

Ejemplo 15: Aa = L-Dab.



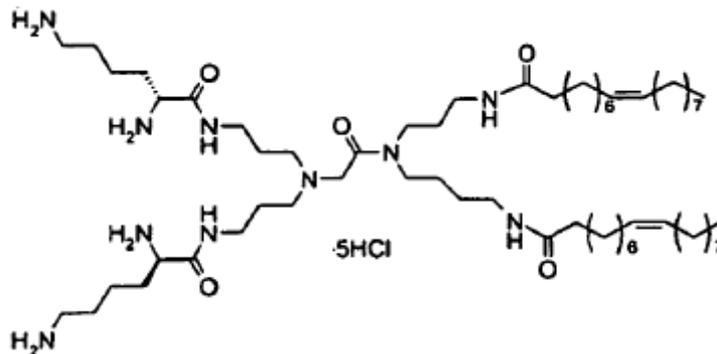
5 LC-MS (ESI): $t_R = 12,04$ min ($m/z = 1045,9$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{59}H_{117}N_{10}O_5$) 1045,9208, encontrado 1045,9229 $[M+H]^+$.

Ejemplo 16: Aa = L-Lys.



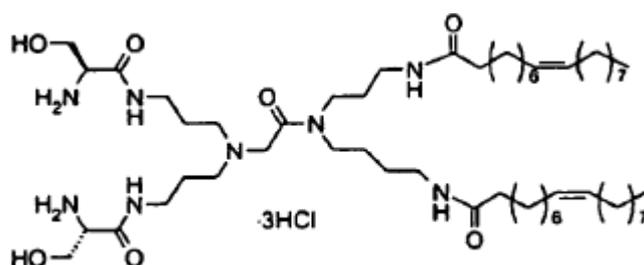
LC-MS (ESI): $t_R = 11,81$ min ($m/z = 1101,9$ $[M+H]^+$ (80%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{63}H_{125}N_{10}O_5$) 1101,9834, encontrado 1101,9818 $[M+H]^+$.

10 Ejemplo 17: Aa = D-Lys



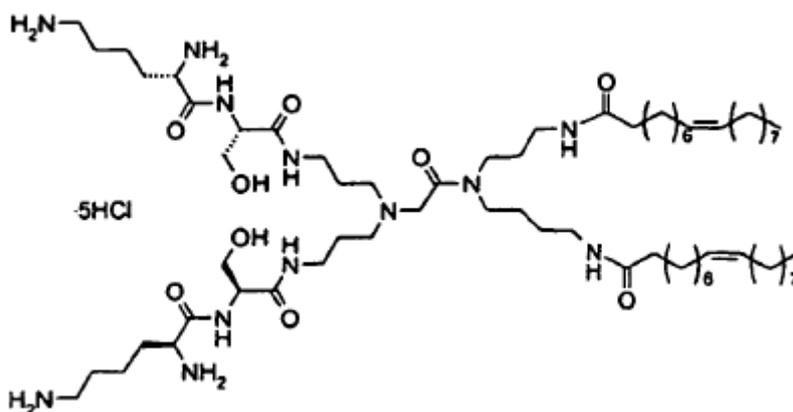
LC-MS (ESI): $t_R = 11,94$ min ($m/z = 1101,9$ $[M+H]^+$ (80%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{63}H_{125}N_{10}O_5$) 1101,9834, encontrado 1101,9835 $[M+H]^+$.

Ejemplo 18: Aa = L-Ser.



LC-MS (ESI): $t_R = 13,25$ min ($m/z = 1019,8$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{57}H_{111}N_8O_7$) 1019,8576, encontrado 1019,8560 $[M+H]^+$.

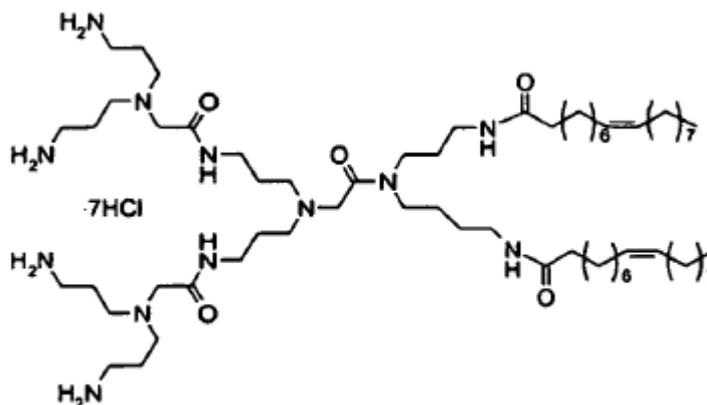
Ejemplo 19: Aa = L-Ser-L-Lys.



5

LC-MS (ESI): $t_R = 11,91$ min ($m/z = 1276,0$ $[M+H]^+$ (100%), HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{69}H_{135}N_{12}O_9$) 1276,0475, encontrado 1276,0447 $[M+H]^+$.

Ejemplo 20: Aa = (9).



10 LC-MS (ESI): $t_R = 11,66$ min ($m/z = 1188,0$ $[M+H]^+$ (100%)); HRMS (ESI) m/z calc. ($C_{67}H_{135}N_{12}O_5$) 1188,0678, encontrado 1188,0686 $[M+H]^+$.

Ejemplo 21. Transfección de plásmido recombinante que expresa GFB en células usando compuestos tensioactivos basados en espermidina

15 Se realizaron estudios de transfección usando las líneas celulares adherentes CHO-K1, células Caco-2, células HepG2 y células Ishikawa. El medio completo consistía en F12 (para CH-K1) EMEM (para Caco-2) y DMEM (para HepG2, Ishikawa) complementado con 10% v/v de suero bovino fetal y 1 X N-glutamina. Todos los medios y complementos se obtuvieron de la empresa Life Technologies.

Transfección génica *in vitro*

Se sembraron células en placas de 96 pocillos (Costar) tratadas con cultivo de tejidos 16-18 horas antes de la transfección a una densidad aproximada de 2×10^4 células/pocillo. Se preparó una solución de plásmido de 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en Optimem. El plásmido usado fue pCMV-eGFP obtenido de la empresa Clontech. El compuesto tensioactivo de espermidina se disolvió en Optimem en forma de un concentrado 10 x con el fin de conseguir una concentración final de 20, 10, 5 y 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la mezcla de reacción final. Se mezclaron 10 μl del compuesto tensioactivo de espermidina con 10 μl del plásmido para cada pocillo. El complejo se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El medio se retiró de las células en la placa y se lavaron una vez con 10 μl de PBS. Se añadió el complejo (20 μl) a cada pocillo y seguidamente se añadieron 80 μl de Optimem (exento de suero) o medio de crecimiento (suero) para preparar un volumen final de 100 μl . En el protocolo exento de suero, la placa se incubó seguidamente durante 6 horas a 37°C y seguidamente el medio se retiró y se añadió medio completo de nueva aportación a cada pocillo y la incubación se continuó durante 18 horas adicionales. En el protocolo con suero, la placa se incubó durante 24 h a 37°C.

Se realizaron ensayos de genes reporteros según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics). El medio se retiró de la placa y las células se lavaron una vez con 100 μl de PBS. Seguidamente se añadieron a cada pocillo 100 μl de tampón de lisis reportero (HEPES 50 mM, pH 7,5, EDTA 2mM, 0,05% de Triton x 100, DTT 2mM). La placa se colocó seguidamente a -80°C durante 15 minutos y posteriormente se permitió que se descongelara a temperatura ambiente. Seguidamente se midió la fluorescencia usando un lector de placas estándar (Tecan Ultra, Tecan) con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.

La Figura 7 muestra la expresión de GFP en células Caco-2 que han sido transfectadas por medio del compuesto de los ejemplos 5, 3, 8, 7 y 10.

La Figura 8 muestra la expresión de GFP en células HEPG2 que han sido transfectadas por medio del compuesto de los ejemplos 5, 3, 8, 7 y 18.

La Figura 9 muestra la transfección de GFP en células Ishikawa que han sido transfectadas por medio del compuesto de los ejemplos 5, 3, 8, 7, 14, 18 y 10.

La Figura 10 muestra la expresión de GFP en células CHO-K1 que han sido transfectadas por medio de los ejemplos 5, 3, 7 y 18.

Ejemplo 22. Transfección de siRNA en células usando compuestos tensioactivos basados en espermidina

Se realizaron estudios de fulminación usando las líneas de células adherentes Ishikawa y MCF7. El medio completo consistía en medio de DMEM complementado con 10% v/v de suero bovino fetal y 1 x L-glutamina. Todos los medios y complementos fueron obtenidos de la empresa Life Technologies.

Transfección de siRNA *in vitro*

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Costar) tratadas con cultivo de tejidos 16-18 horas antes de la transfección a una densidad aproximada de 2×10^4 células/pocillo. Se preparó una solución 1 μM de siRNA (JNK1 dirigidas a diana o testigo no dirigido a diana) adquirida de la empresa Dharmacon en Optimem. El lípido Gemini se disolvió en Optimem en forma de un concentrado 10 x con el fin de conseguir una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la mezcla de reacción final. Se usó el reactivo comercial lipofectamina 2000 a una concentración final de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siLentFect a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y X-tremeGene a 0.5 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$. Se mezcló una muestra de 10 μl del lípido Gemini (comercial) con 10 μl de siRNA para cada pocillo. El complejo se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El medio se retiró de las células en la placa y se lavaron una vez con 100 μl de PBS. Se añadió el complejo (20 μl) a cada pocillo y se añadieron 80 μl de medio de crecimiento para preparar un volumen final de 100 μl y la placa se incubó durante 24 h a 37°C. En este momento las células se lavaron una vez usando 100 μl de PBS y seguidamente fueron lisadas en 100 μl de tampón de lisis de RNA (Promega). Se llevó a cabo un ensayo de RT-PCR cuantitativo estándar (Taqman) para determinar la abundancia relativa de JNK1 en comparación con el gen de alojamiento GAPDH en células dirigidas a diana JNK1 siRNA y células no dirigidas a diana. El grado de fulminación se expresó como una relación de copias tratadas (JNK1) de JNK1 respecto a copias testigos (no dirigidas a diana) de JNK1.

La Figura 11 muestra la fulminación de JNK1 en células MCF-7 que han sido transfectadas por medio del compuesto de los ejemplos 10, 5 y 3.

La Figura 12 muestra la fulminación de JNK1 en células Ishikawa que han sido transfectadas por medio del compuesto de los Ejemplos 10, 5 y 3.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un esquema general para la síntesis del grupo protegido (Aa) 6 útil en la síntesis de molécula de la invención.

La Figura 2 muestra un esquema general para la síntesis de un grupo protegido (Aa) 9 útil en la síntesis de moléculas de la invención.

5 La Figura 3 muestra el esquema general para la síntesis de intermedio avanzado 14 útil en la síntesis de moléculas de la invención.

La Figura 4 muestra un esquema general para la síntesis de moléculas según una realización general de la invención.

10 La Figura 5 muestra un esquema general para la síntesis de moléculas según una realización general adicional de la invención.

La Figura 6 muestra un esquema general para la síntesis de moléculas según una realización general adicional de la invención.

15 La Figura 7 muestra la expresión de GFP en células Caco-2 que han sido transfectadas por medio del compuesto de los ejemplos 5, 3, 8, 7 y 10. Las concentraciones de los compuestos de los ejemplos se proporciona en µg/ml. LP2K indica lipofectamina 2000®.

La Figura 8 muestra la expresión de GFP en células HepG2 que han sido transfectadas por medio del compuesto de los Ejemplos 5, 3, 8, 7 y 18. Las concentraciones de los compuestos del Ejemplo se proporciona en µg/ml. LP2K indica lipofectamina 2000®.

20 La Figura 9 muestra la expresión de GFP en células Ishikawa que han sido transfectadas por medio de los compuestos de los ejemplos 5, 3, 8, 7, 14, 18 y 10. Las concentraciones de los compuesto de los ejemplos se proporcionan en µg/ml. LP2K indica lipofectamina 2000 ®.

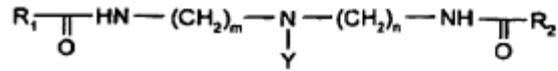
La Figura 10 muestra la expresión de GFP en células CHO-K1 que han sido transfectadas por medio del compuesto de los ejemplos 5, 3, 7 y 18. Las concentraciones de los compuestos de los ejemplos se proporciona en µg/ml. LP2K indica lipofectamina 2000®.

25 La Figura 11 muestra la fulminación de JNK1 en células MCF-7 que han sido transfectadas por medio del compuesto de los ejemplos 10, 5 y 3. L2K indica lipofectamina 2000®.

La Figura 12 muestra la fulminación de JNK1 en células Ishikawa que han sido transfectadas por medio de compuestos de los ejemplos 10, 5 y 3. L2K indica lipofectamina 2000®.

REIVINDICACIONES

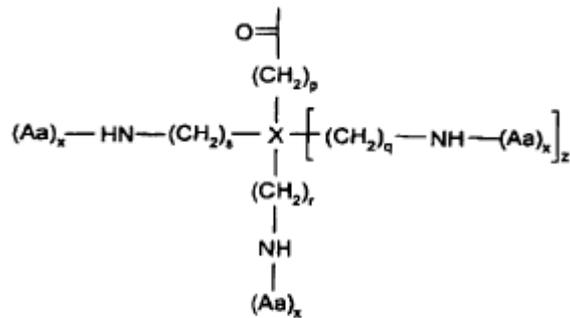
1. Un compuesto que tiene la estructura general de fórmula (I):



(I)

5 en la que Y es:

(Aa)_x o un grupo de fórmula (II)



(II)

en la cual

10 R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes, son una cadena de hidrocarburo saturado o insaturado, lineal o ramificado, de hasta 24 átomos de carbono;

m es 1 a 10;

n es 1 a 10;

15 (Aa)_x, que puede ser igual o diferente en cada aparición, es x aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en [H₂N(CH₂)₃]₂N(CH₂)CO₂H, (H₂NCH₂)₂CHCO₂H y enantiómeros L o D de Ser, Lys, Orn, Dab y Dap, conectados de una manera lineal o ramificada;

x que puede ser igual o diferente en cada aparición, es 1 a 6;

p es 0 a 6;

q es 1 a 6;

r es 1 a 6;

20 s es 1 a 6;

z es 0 ó 1;

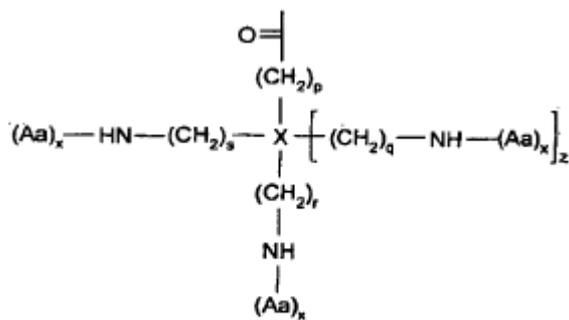
X es N, CH o C con la condición de que cuando X es N, z es 0 ó 1; cuando X es CH, z es 0 y cuando X es C, z es 1;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que m es 3 a 6.

25 3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que n es 3 a 6.

4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que x es 1.
5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Y es (Aa)_x
6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Y es un grupo de fórmula (II)



(II)

- 5 en la cual
 - x, que puede ser igual o diferente en cada aparición, es 1 a 6;
 - p es 0 a 6;
 - q es 1 a 6;
 - 10 r es 1 a 6;
 - s es 1 a 6;
 - z es 0 ó 1;
 - X es N, CH o C, con la condición de que cuando X es N, z es 0 ó 1; cuando X es CH, z es 0 y cuando X es C, z es 1.
7. Un compuesto según la reivindicación 6, en el que p es 1.
- 15 8. Un compuesto según la reivindicación 6 ó 7, en el que r es 1 ó 3.
9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que s es 1 ó 3.
10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que q es 1 ó 3.
11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, saturado o insaturado de R₁ o R₂ de hasta 24 átomos de carbono tiene 12 o más átomos de carbono.
- 20 12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cadena de hidrocarburo lineal o ramificado, saturado o insaturado de R₁ o R₂ de hasta 24 átomos de carbono se selecciona entre:
 - (CH₂)₁₀CH₃
 - (CH₂)₁₂CH₃
 - (CH₂)₁₄CH₃
 - 25 -(CH₂)₁₆CH₃
 - (CH₂)₁₈CH₃
 - (CH₂)₂₀CH₃
 - (CH₂)₂₀CH₃-(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃ mezcla natural

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ mezcla natural

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ Cis

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ Cis

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ Trans

5 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ Trans

$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_7(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}_3$

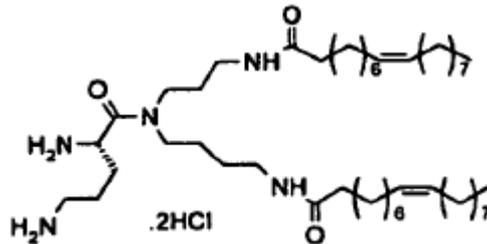
$-(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

$-(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

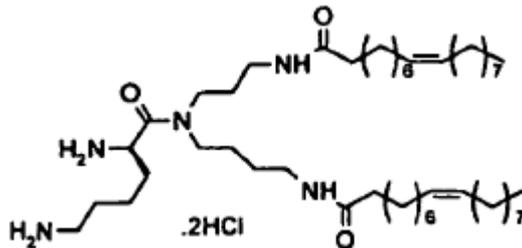
10 $-(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ - $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ [$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$] $_3\text{CH}_3$

o $-(\text{CH}_2)_{22}\text{CH}_3$,

13. El compuesto de fórmula:

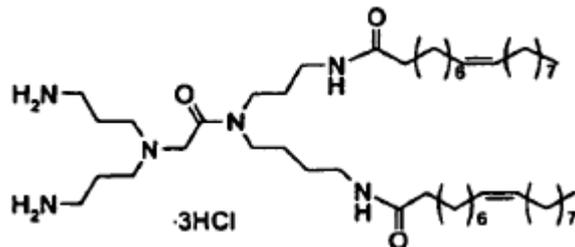


14. El compuesto de fórmula:

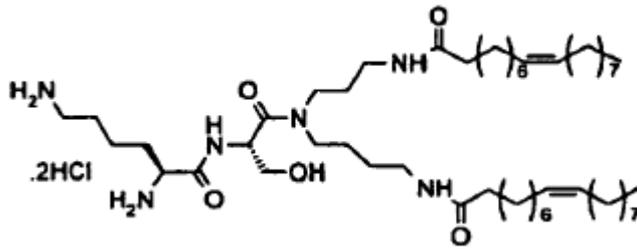


15

15. El compuesto de fórmula:

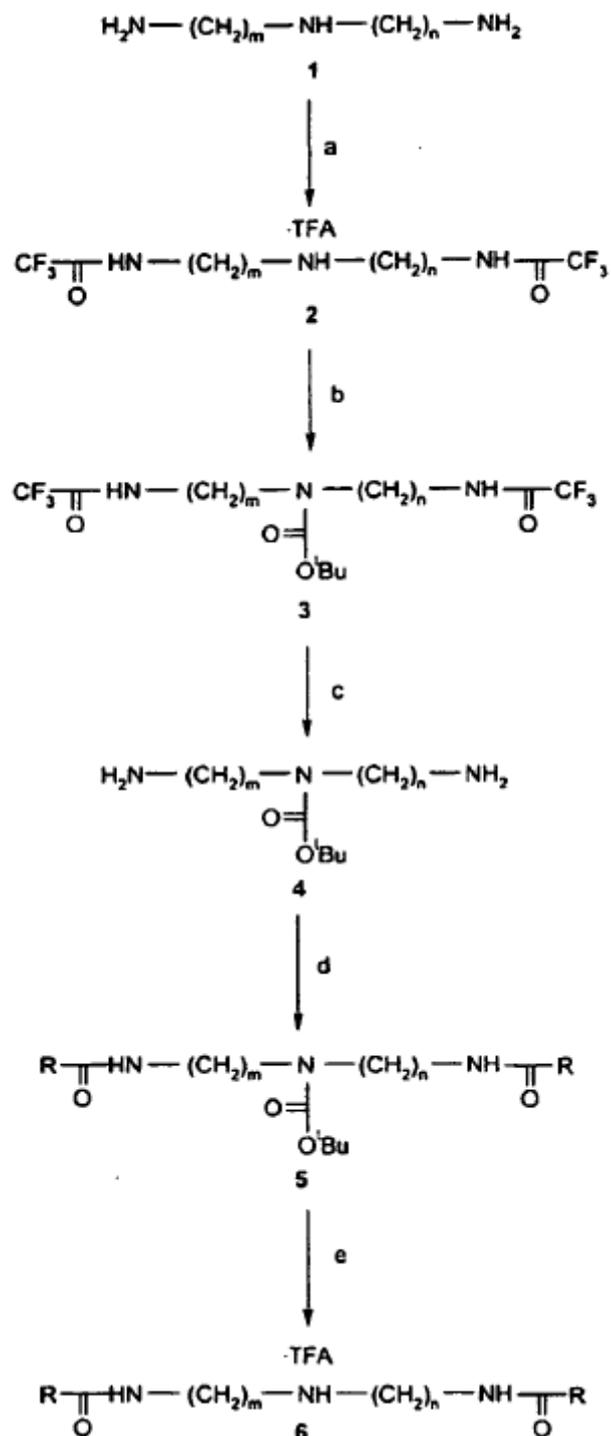


16. El compuesto de fórmula:



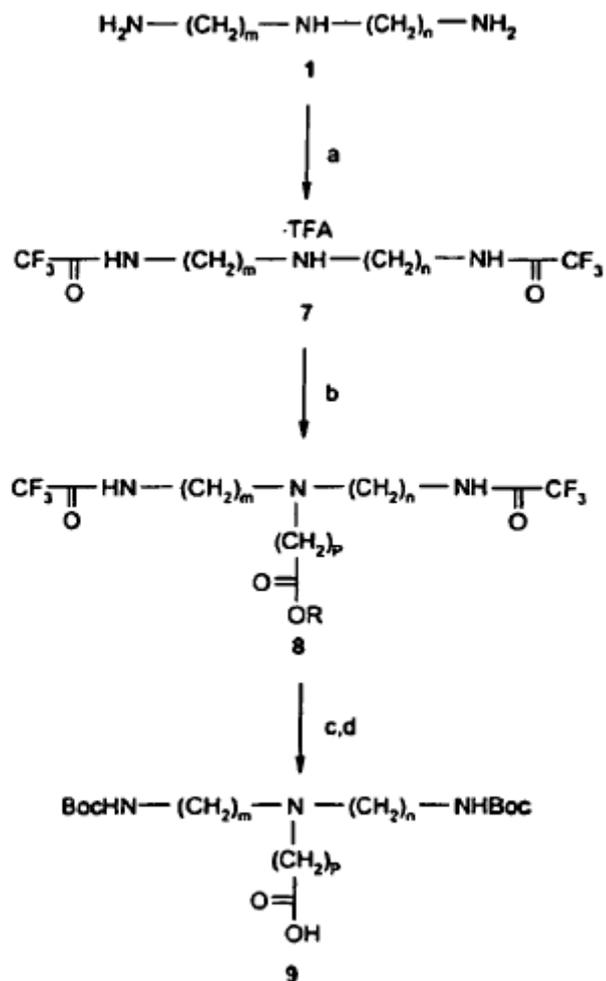
17. El uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para hacer posible la transfección de DNA o RNA o sus análogos en una célula eucariótica o procariótica *in vitro*.
18. El uso de un compuesto según la reivindicación 17, en el que el compuesto es usado en combinación con uno o más complementos seleccionados entre el grupo que consiste en:
- 5 (i) un portador neutro, o
- (ii) un reactivo complejante.
19. El uso de un compuesto según la reivindicación 18, en el que el portador neutro es dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE).
- 10 20. El uso según la reivindicación 18 ó 19, en el que el reactivo complejante es un péptido que comprende principalmente aminoácidos básicos.
21. El uso según la reivindicación 18 ó 19, en el que el reactivo complejante es un péptido que consiste en aminoácidos básicos.
22. El uso según la reivindicación 20 ó 21, en el que los aminoácidos básicos se seleccionan entre lisina y arginina.
- 15 23. El uso según la reivindicación 21, en el que el péptido es polilisina o poliornitina.
24. El uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para facilitar la adhesión de células en cultivo unas a otras o a una superficie sólida o semi-sólida.

Figura 1



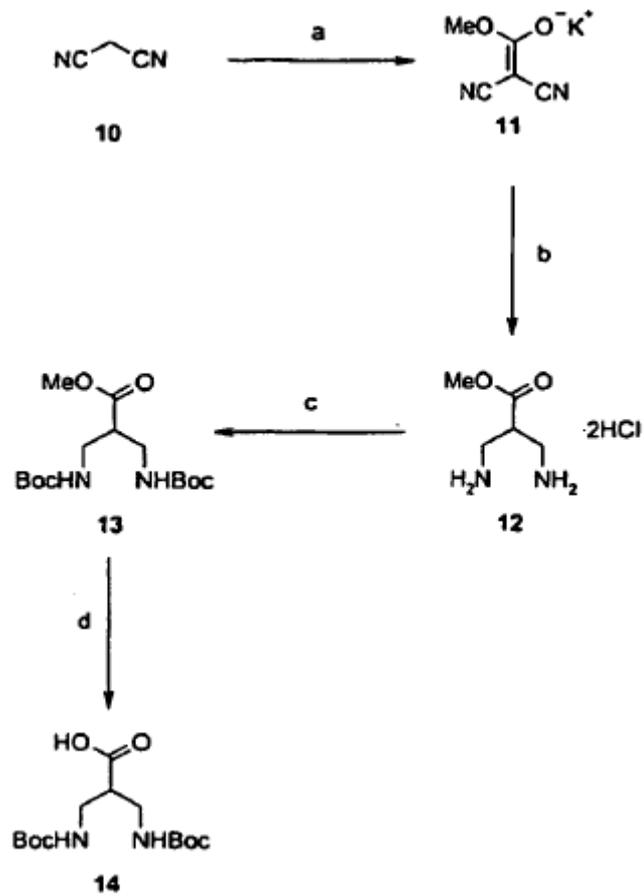
5 Reactivos y condiciones: a) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Et}$, H_2O , MeCN , reflujo; b) Boc_2O , $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$, THF , t.a.; c) $\text{NaOH-H}_2\text{O}$, MeOH , 10°C , t.a.; d) RCO_2NSuc , K_2CO_3 , THF , H_2O , t.a.; e) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, CHCl_2 , t.a.

Figura 2



5 Reactivos y condiciones: a) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Et}$, H_2O , MeCN , reflujo; b) $\text{Br}(\text{CH}_2)_p\text{CO}_2\text{R}$, $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$, MeCN , t.a.; c) $\text{NaOH-H}_2\text{O}$, MeOH , t.a.; d) Boc_2O ; H_2O , MeOH , t.a.

Figura 3



5 Reactivos y condiciones: a) MeOCOC₂H₅, NaOH-H₂O, THF, t.a.; b) 10% Pd/C, °HCl, MeOH, H₂, 5 bares; c) Boc₂O, ⁱPr₂NEt, DMF; d) KOH-H₂O 2 N, THF, t.a.

Figura 5

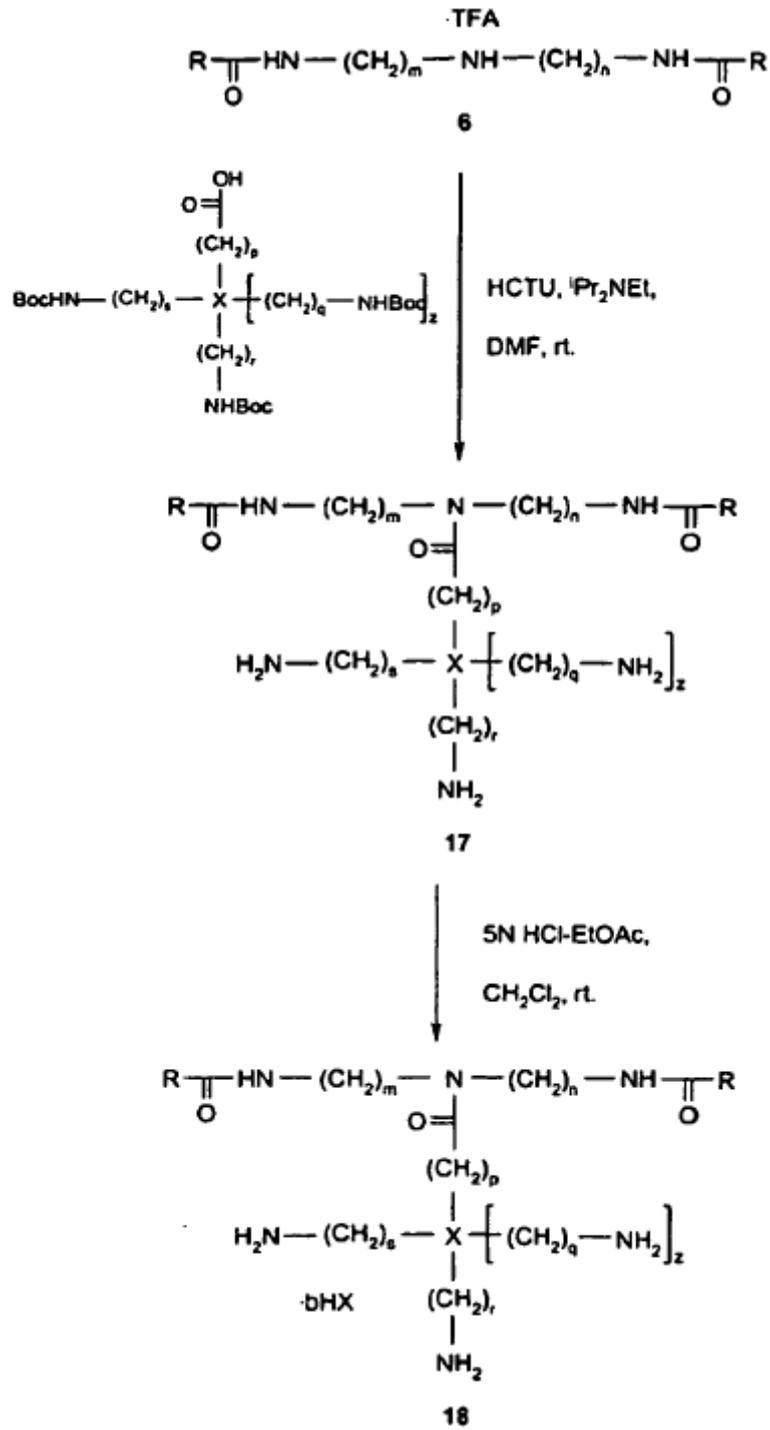


Figura 7

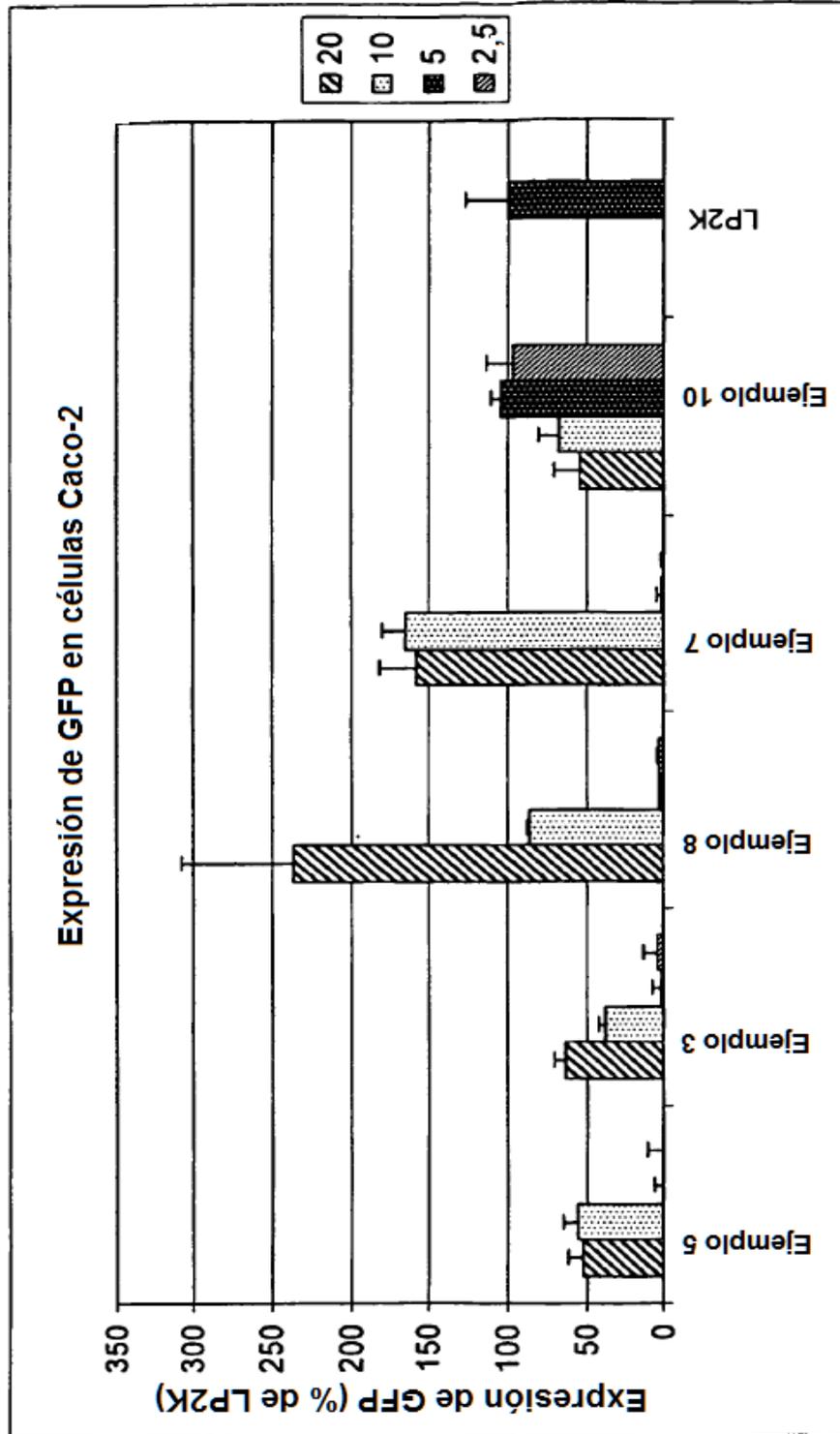


Figura 8

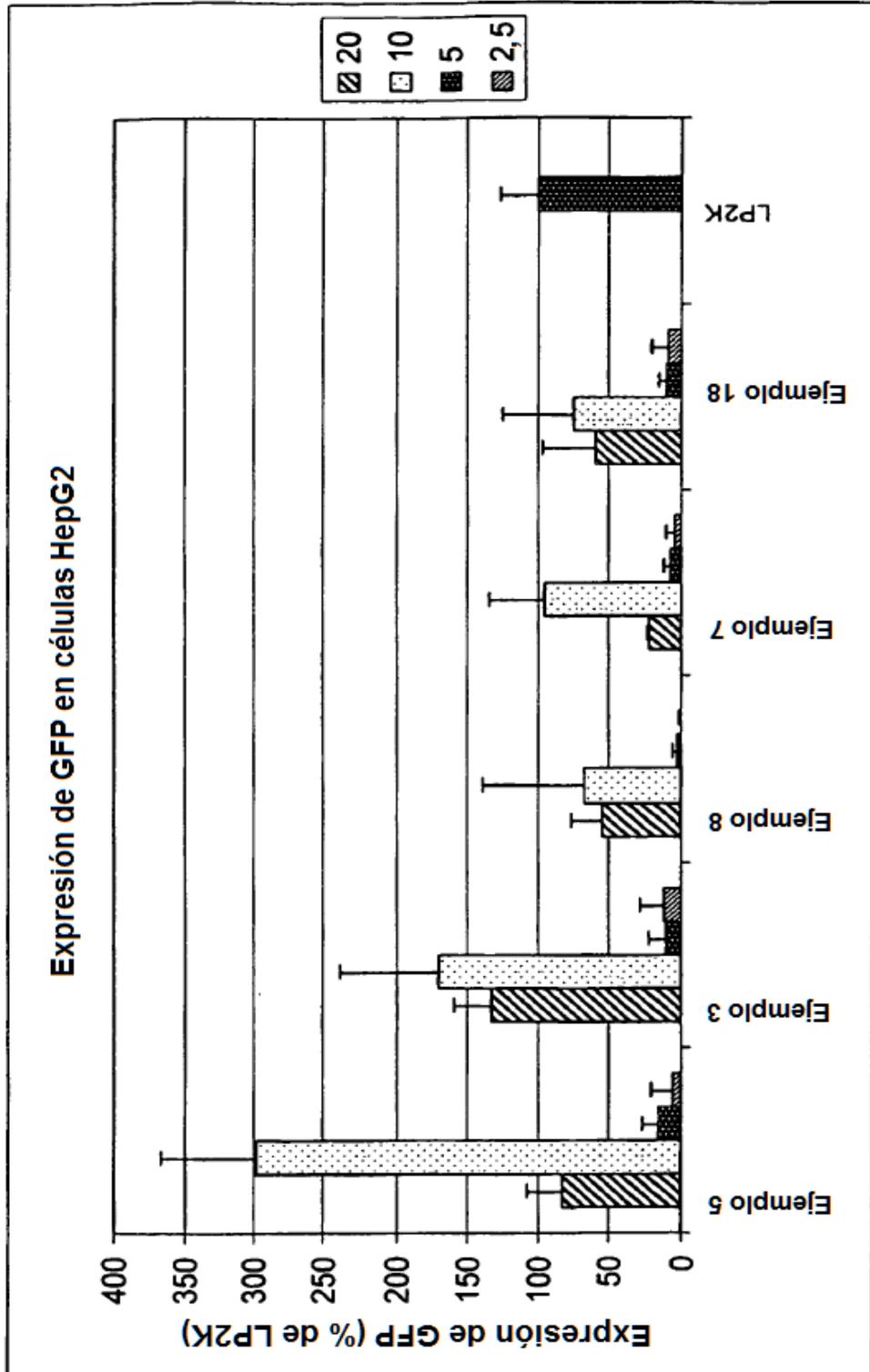


Figura 9

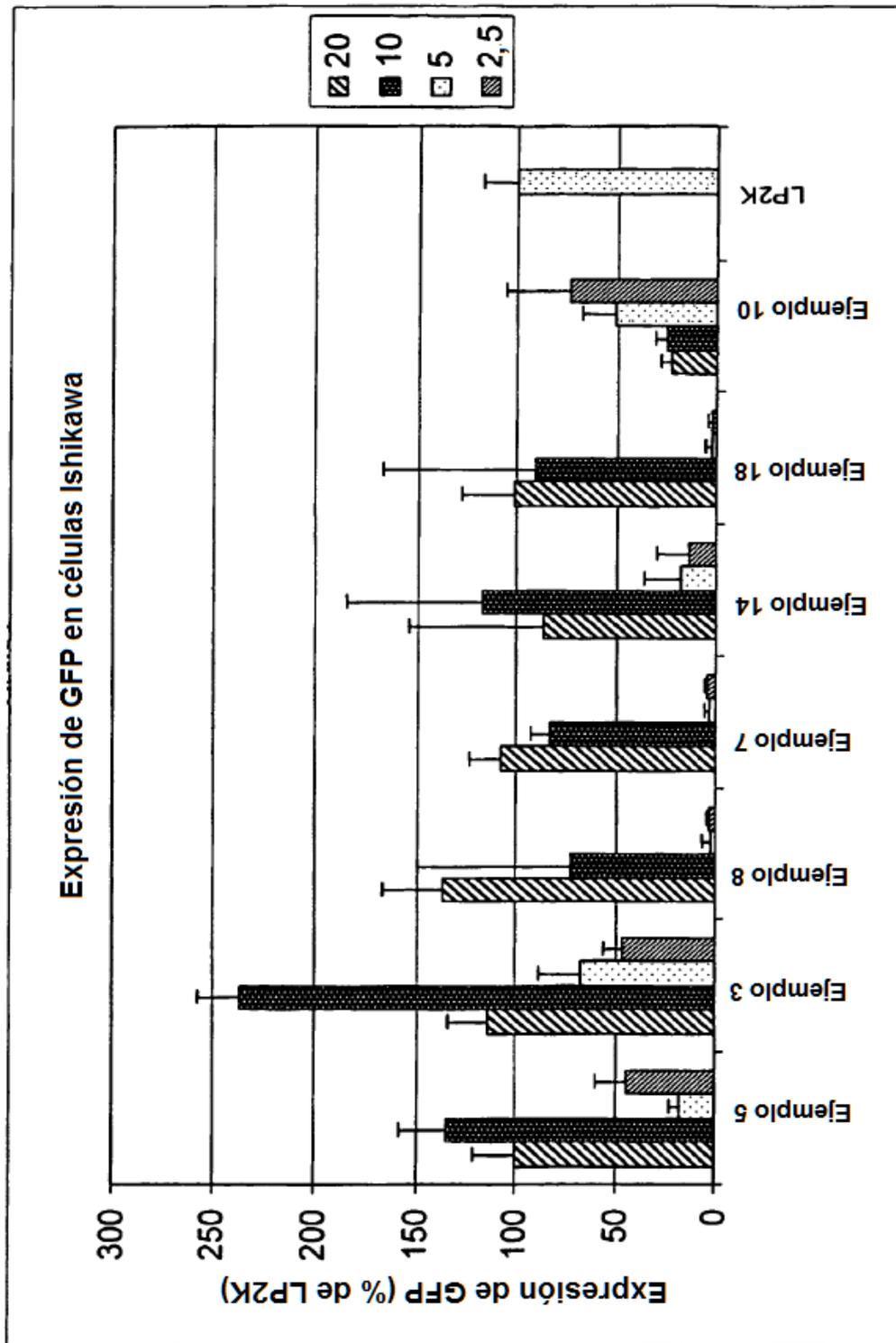


Figura 10

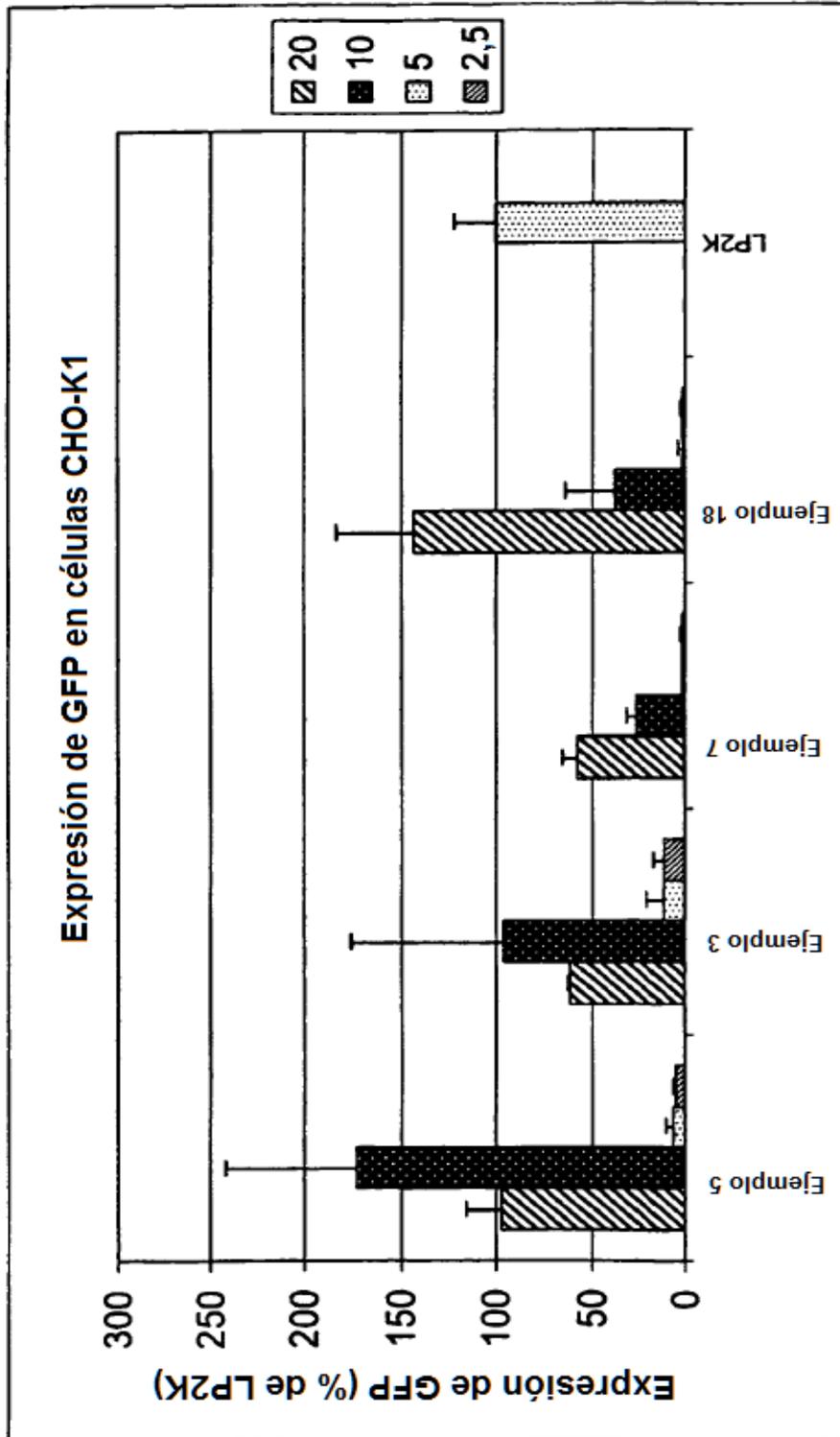


Figura 11

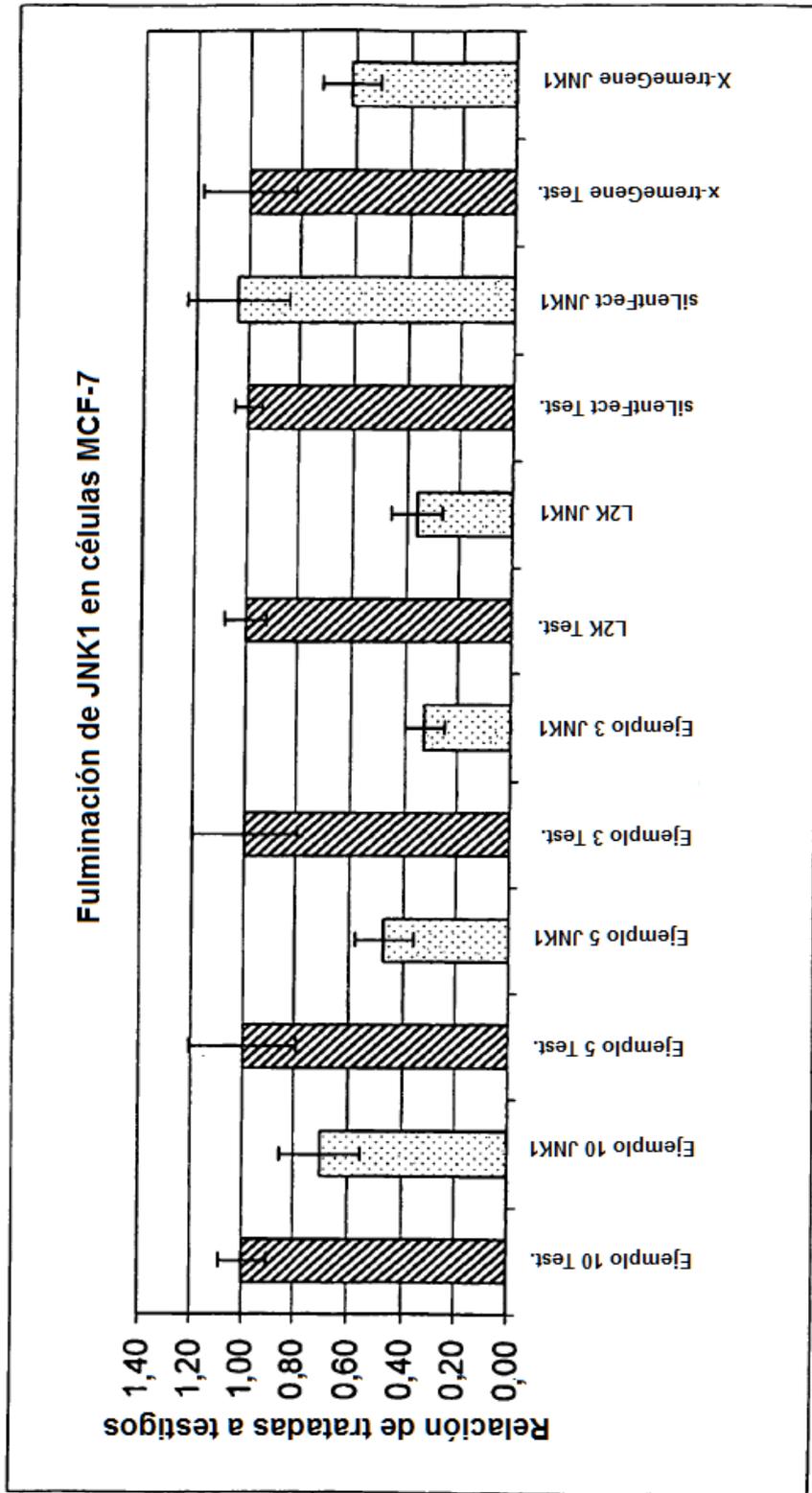


Figura 12

