

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 504**

21 Número de solicitud: 201530636

51 Int. Cl.:

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.05.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.11.2016

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (100.0%)
Ctra. de Valldemossa, km 7,5 Edif. Son Lledó
07120 Palma de Mallorca (Illes Balears) ES

72 Inventor/es:

COSTA TORRES, Antoni;
ROTGER PONS, Carmen;
FERNÁNDEZ DE MATTOS, Silvia y
DE VILLALONGA SMITH, Priam

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Oligoescuaramidas cíclicas como agentes de transfección**

57 Resumen:

Oligoescuaramidas cíclicas como agentes de transfección.

La presente invención se refiere al uso de oligoescuaramidas cíclicas formadas por dos unidades escuaramida como agentes de transfección para el transporte de material genético al interior celular.

ES 2 589 504 A1

Oligoescuaramidas cíclicas como agentes de transfección

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere al uso de oligoescuaramidas cíclicas formadas por dos unidades escuaramida como vectores o agentes de transfección para el transporte de material genético, como plásmidos u oligonucleótidos, al interior celular.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

La terapia génica constituye una alternativa emergente para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, Parkinson, Alzheimer, SIDA, etc. Sin embargo, su desarrollo y aplicación clínica se ven frenados ante la falta de vectores eficaces y seguros para el transporte del material genético al interior de las células diana. Un vector ideal debe ser capaz de compactar el DNA o siRNA en nanopartículas estables en suero, proteger al oligonucleótido de la degradación, facilitar la internalización celular y salida de los complejos de la vía endosomal, además de tener una baja toxicidad para las células transfectadas y el resto de tejidos.

15

20

Aunque en la actualidad los virus y retrovirus modificados son los agentes de transfección más utilizados en ensayos clínicos, su uso en terapia génica resulta una vía poco adecuada debido a la alta toxicidad inherente a estos sistemas y el riesgo de carcinogénesis asociado a la posible inserción de material genético de forma aleatoria. Por ello, se han desarrollado como alternativa vectores no virales con el objetivo de reducir los niveles de toxicidad e inmunogenicidad. Los vectores no virales pueden agruparse en cuatro categorías amplias: polímeros catiónicos solubles en agua, lípidos, dendrímeros y nanomateriales. Todos ellos tienen en común una remarcable complejidad estructural que en muchos casos dificulta la preparación a gran escala o encarece excesivamente el producto final. La efectividad de estos agentes es variable y algunos de ellos se comercializan como agentes de transfección de uso rutinario en laboratorios de investigación, pero en la mayoría de los casos no se ha solventado completamente el problema de la citotoxicidad.

25

30

35

Por tanto, sería conveniente desarrollar pequeñas moléculas orgánicas con capacidad para transfectar y que no sean tóxicas para el organismo huésped. Estas moléculas deberán formar policomplejos estables con ácidos nucleicos y ser capaces de

compactarlos y transportarlos al interior celular, solos o en combinación con otros agentes de transfección.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

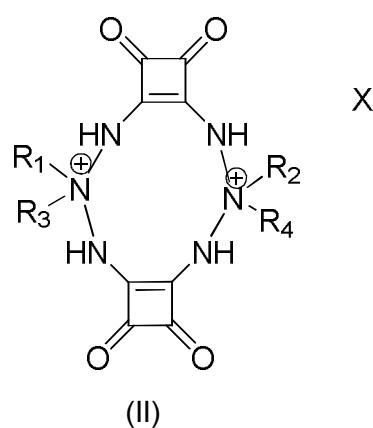
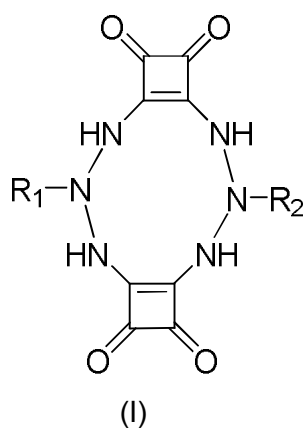
5

Los autores de la presente invención proporcionan oligoescuaramidas cíclicas de pequeño tamaño, es decir aquellas formadas por dos grupos escuaramida unidos entre sí mediante dos diaminas alifáticas que contienen nitrógenos terciarios, que presentan niveles de toxicidad despreciables y son capaces de formar complejos estables en medios acuosos con oxoaniones como los fosfatos. En los ejemplos se demuestra la capacidad de los compuestos oligoescuaramídicos cíclicos de la presente invención para formar policomplejos con plásmidos y oligonucleótidos y para actuar como agentes de transfección eficientes y poco tóxicos.

10

15

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) o (II) como agente de transfección no-viral.



20

donde:

R₁ y R₂, son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo arilo, aralquilo, heteroarilo y alquilo (C₁-C₁₀), opcionalmente sustituido por un grupo amino;

25

R₃ y R₄, son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo arilo, aralquilo, heteroarilo y alquilo (C₁-C₁₀), opcionalmente sustituido por un grupo amino; y

X es al menos un contraión y se puede seleccionar de entre dos aniones monovalentes (2X⁻), iguales o diferentes, y un anión divalente (X²⁻).

En una realización preferida de los compuestos de fórmula (I), R_1 y R_2 , son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo alquilo (C_1 - C_{10}), opcionalmente sustituido por un grupo amino, y arilo.

5

En una realización preferida de los compuestos de fórmula (II), R_1 y R_2 , son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo alquilo (C_1 - C_{10}), opcionalmente sustituido por un grupo amino, y arilo; y/o R_3 y R_4 , son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo alquilo (C_1 - C_{10}),
 10 opcionalmente sustituido por un grupo amino, y arilo. Más preferiblemente R_1 y R_2 , son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo alquilo (C_1 - C_{10}), opcionalmente sustituido por un grupo amino, y arilo; y R_3 y R_4 , son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo alquilo (C_1 - C_{10}), opcionalmente sustituido por un grupo amino, y arilo.

15

En una realización más preferida de los compuestos de fórmula (I) o (II), R_1 y/o R_2 son un grupo alquilo (C_1 - C_4), más preferiblemente R_1 y/o R_2 son un metilo.

20

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (II), R_1 y R_2 son un metilo.

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (II), R_1 o R_2 son un grupo alquilo (C_1 - C_4) sustituido con un grupo amino terminal, más preferiblemente R_1 o R_2 son $-(CH_2)_3-NHBoc$, más preferiblemente R_1 es metilo y R_2 es $-(CH_2)_3-NHBoc$.

25

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (II), R_1 o R_2 son arilo, más preferiblemente R_1 o R_2 son bencilo, aún más preferiblemente R_1 es metilo y R_2 es bencilo.

30

En otra realización preferida de los compuestos de fórmula (II), R_3 y/o R_4 son un grupo alquilo (C_1 - C_4), más preferiblemente R_3 y/o R_4 son un metilo, aún más preferiblemente R_3 y R_4 son metilo y en una realización aún más preferida R_1 y/o R_2 son un grupo alquilo (C_1 - C_4), más preferiblemente R_1 y/o R_2 son un metilo y aún más preferiblemente R_1 y R_2 son un metilo.

35

En una realización más preferida de los compuestos de fórmula (II), R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son un metilo.

El estado de oxidación del compuesto de fórmula (II) con los dos grupos amino cuaternarios es de +2, por tanto, cuando el contraión (X) es monovalente se precisan de dos aniones para compensar la carga positiva ($2X^-$), estos pueden ser iguales o diferentes, y cuando el contraión (X) es divalente se precisan de un anión para compensar la carga positiva (X^{2-}). En una realización preferida el contraión es monovalente y es cualquier anión biológica o farmacéuticamente aceptable conocido por un experto en la materia. Ejemplos de aniones biológica o farmacéuticamente aceptables pueden ser I^- , Cl^- , Br^- , F^- , $CF_3SO_3^-$, ClO_4^- , PF_6^- y BF_4^- , acetato, malato, fumarato, citrato u oxalato, entre otros conocidos por un experto en la materia. Preferiblemente el contraión se selecciona de un halógeno y aún más preferiblemente se selecciona de I^- y Cl^- . En una realización más preferida del compuesto de fórmula (II), X es $2I^-$ o $2Cl^-$.

El término “alquilo” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono y más preferiblemente se seleccionan entre metilo, etilo, *n*-propilo, y *n*-butilo. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por al menos un sustituyente amino, que a su vez puede opcionalmente sustituido, preferiblemente el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido por un grupo amino terminal, el grupo amino puede ser una amina primaria ($-NH_2$), secundaria ($-NHR'$) o terciaria ($-NR'R''$), donde R' y R'' se seleccionan independientemente de entre un grupo alquilo (C_1-C_{10}), un aralquilo como se ha definido en la invención, o de un grupo protector, preferiblemente R' y R'' se seleccionan independientemente de entre un grupo alquilo (C_1-C_4), bencilo o Boc (*t*-butiloxicarbonilo).

Por “grupo protector” se refiere a un grupo que bloquea un grupo funcional orgánico y que puede eliminarse en condiciones controladas. Los grupos protectores, sus reactividades relativas y las condiciones en la que permanecen inertes son conocidas por el experto en la materia. Se pueden seleccionar, sin limitarse, los grupos protectores de nitrógeno a carbamatos de fórmula $-(O=)C-O-R$, donde R es un grupo arilo, un aralquilo, o un alquilo (C_1-C_{10}), definidos en la invención, preferiblemente R es bencilo, $-C(CH_3)_3$ o $-CH_2CH_3$, y aún más preferiblemente el grupo protector es Boc; o

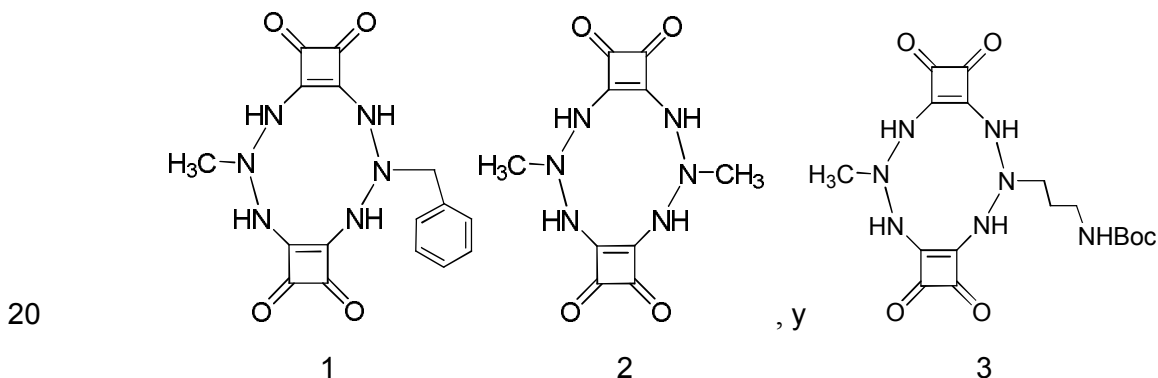
un sulfonato de fórmula $-(O=)S(=O)-R$, donde R es un grupo arilo, un aralquilo, o un alquilo (C_1-C_{10}), definidos en la invención, preferiblemente R es $-CH_3$ o tosilato.

5 Por “arilo” se refiere en la presente invención, a anillos aromáticos, sencillos o múltiples, que tienen entre 5 a 18 átomos de carbono en la parte del anillo, tales como pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo, fluorenilo o antracilo. Preferiblemente el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo.

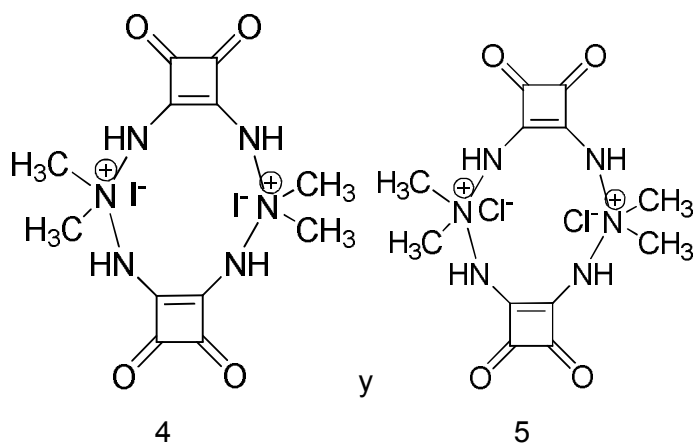
10 Por “heteroarilo” se refiere, en la presente invención, a anillos heterocíclicos aromáticos (mono- o bicíclicos) que tienen entre 5 y 10 miembros, entre ellos átomos de carbono y al menos entre 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre N, O y S. Preferiblemente el grupo heteroarilo tiene entre 5 y 6 miembros, por ejemplo piridina.

15 Por “aralquilo” se refiere a un grupo arilo unido a un grupo alquilo (C_1-C_4), por ejemplo pero sin limitarse bencilo y fenetilo, preferiblemente es bencilo.

En una realización preferida, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan de entre:



En otra realización preferida, los compuestos de fórmula (II) se seleccionan de entre:



5 Por “agente de transfección no-viral” se refiere, en la presente invención a todo vector que no tenga ningún componente vírico y que sea capaz de introducir una molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora y de mejorar la eficiencia de la transfección de los mismos.

10 Los agentes de transfección no viral presentan además otra serie de ventajas 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 como consecuencia, pueden ser administrados repetidamente.

15 Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un agente de transfección no-viral, a partir de ahora agente de transfección de la invención, que comprende al menos uno de los compuestos, de fórmula general (I) o (II), descritos anteriormente y al menos un ácido nucleico.

20 Un ácido nucleico o molécula de ácido nucleico comprende 2 o más bases de nucleótido unidas covalentemente, que puede ser de cadena sencilla o cadena doble, pudiendo incluir entre otras ADN, ARN, ARN de interferencia (silenciamiento), micro ARN, plásmidos de ADN, ADN viral, fragmentos de cromosomas, ácido nucleico señuelo, aptámeros o ribozimas.

25

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del agente de transfección no-viral de la invención, para la elaboración de un medicamento, preferiblemente utilizados en terapia génica.

En la presente invención se entiende por terapia génica la introducción de cualquier tipo de material genético (por ejemplo DNA, RNA, RNAi, siRNA, miRNA) en el interior de una célula con un objetivo curativo. Se puede emplear terapia génica para obtener el efecto terapéutico deseado a través de distintas estrategias, dependiendo de la enfermedad objetivo. Se puede emplear terapia génica para aportar un gen ausente en el receptor, o bien para complementar o sustituir el defecto en la función de un gen defectuoso introduciendo una copia normal de éste en las células. También es posible emplear terapia génica para obtener el efecto contrario, es decir, inhibir o bloquear el funcionamiento de genes cuya intervención contribuye al desarrollo de la enfermedad. Alternativamente, se puede emplear terapia génica no para sustituir o inactivar la función de un gen, sino para introducir la información que permita a la célula sintetizar una proteína con el efecto terapéutico deseado.

La terapia génica es útil para el tratamiento o la prevención de un gran número de enfermedades, conocidas por un experto en la materia, como por ejemplo pero sin limitarse a la deficiencia en adenosíndeaminasa (ADA), el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), infección por VIH, enfermedades neurodegenerativas o cáncer.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el agente de transfección no-viral de la invención, y opcionalmente al menos un aditivo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo.

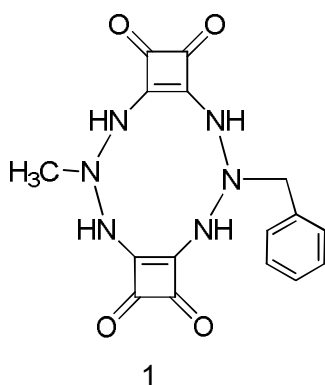
Por aditivo se entiende a cualquier sustancia farmacéuticamente aceptable y no activa conocidas por cualquier experto en la materia y se pueden incluir agentes aromatizantes, colorantes, antioxidantes o edulcorantes y similares, que pueden ser usados solos o en una combinación adecuada de los mismos. Ejemplos, no limitantes, son lactosa, dextrina, sacarosa, manitol, almidón de maíz, sorbitol, celulosa microcristalina y polivinilpirrolidona.

Los agentes de transfección no-viral de la presente invención se pueden utilizar también para la preparación de compuestos útiles para la realización de pruebas diagnósticas mediante imagen médica, en diversas patologías.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso del agente de transfección no-viral para la elaboración de sondas para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen.

- 5 La preparación de un medio de contraste o sonda de imagen puede comprender dicho agente de transfección no-viral y un compuesto de marcaje conocido por cualquier experto en la materia, y que podría ser, sin limitarse a compuesto de marcaje radiológico, fluorescente, entre otros, que puede ser utilizado para la observación y diagnóstico mediante las técnicas de detección habitualmente utilizadas
10 en clínica. Ejemplos no limitantes de dichos compuestos de marcaje son gadolinio o yodo, aunque puede ser cualquiera conocido por un experto en la materia.

Otro aspecto más de la invención se refiere al compuesto 1 de fórmula



15

1

- 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
20 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

FIG. 1 Representa imágenes de microscopía confocal de fluorescencia donde se observa la presencia de células fluorescentes como resultado de la transfección del plásmido pmax-GFP (pGFP) con los compuestos 1, 2, 3 y 5 y Lipofectamina2000®.

FIG. 2 Representa un *Western blot* obtenido a partir de extractos de células NIH3T3 y LN229 tratadas con Lipofectamina 2000® (lipo) y C2 como agentes de transfección y siRNAs específicos para silenciar la expresión de las proteínas RhoE y FOXO1, respectivamente.

5

FIG. 3 Muestra el tanto por ciento de viabilidad celular para células U87MG y LN 229 después de la transfección del plásmido pmaxGFP con el reactivo comercial Lipofectamina 2000® y el compuesto 2 (C2). La viabilidad celular se compara frente a células control solo tratadas con el plásmido.

10

FIG. 4 Muestra la dosis respuesta. Células COS7 y U87MG transfectadas con el pmaxGFP utilizando diferentes concentraciones del compuesto 2 (C2). La eficiencia de transfección se compara con los resultados obtenidos con el reactivo comercial lipofectamina 2000® según las indicaciones del comerciante (Life Technologies).

15

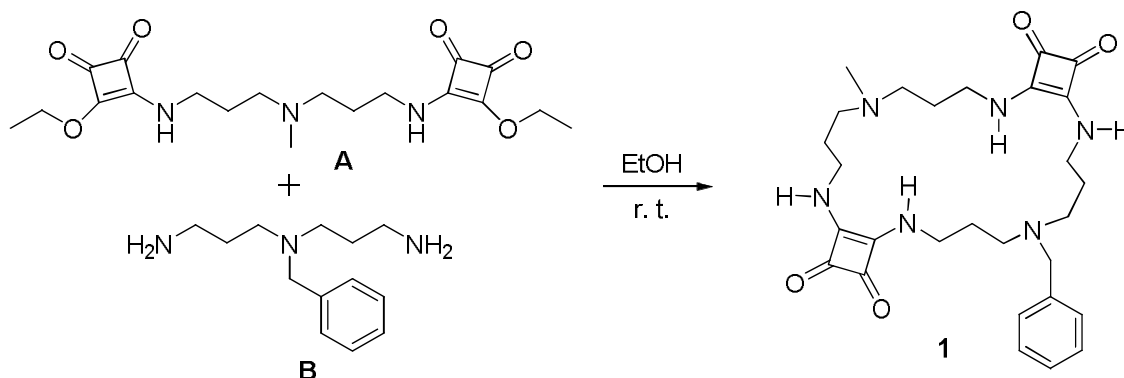
EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

20

Síntesis del compuesto 1

A continuación se muestra el esquema sintético del compuesto 1:



25

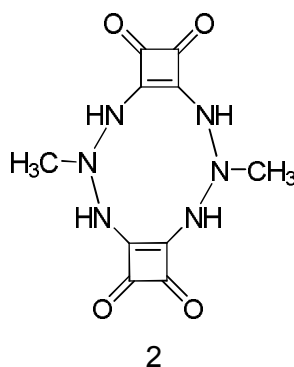
donde r.t. significa temperatura ambiente.

En un matraz de fondo redondo se disuelven 2,75 mmol de la diescuaramida diester(A) en 50 ml de etanol (EtOH). Mediante un embudo de adición, y en atmósfera

de argón, se añade gota a gota, muy lentamente, una disolución de 2,75 mmol de N-N'-Bis-(2-aminopropil)]-bencilamina(B), disuelta en 50 ml de etanol. Transcurrida la adición, dejamos en agitación durante 12 h. Pasado ese tiempo aparece un precipitado blanco, el cual se aísla mediante decantación. Se lava con etanol (3 x 10 ml) y se seca. Seguidamente se disuelve el producto con agua a pH 2, y se va añadiendo NaOH 0,1 N, gota a gota, hasta pH 10. El precipitado formado se centrifuga y se lava con agua (2 x 10 ml) y acetona (10 ml) obteniendo la oligoesquaramida cíclica 1. Rendimiento: 66,00%. P. f.: 216-218°C. RMN-1H (DMSO-d6) δ: 7,77 (bb, 4H, COCNHCH2); 7,54-7,44 (bb, 5H, Ar); 3,53 (bb, 8H, COCNHCH2CH2); 3,50 (bb, 2H, NCH2Ar); 3,21 (bb, 8H, CH2CH2N); 2,89 (s, 3H, NCH3); 2,07 (bb, 8H, COCNHCH2CH2CH2N) ppm. RMN-13C (DMSO-d6) δ: 27,24; 44,34; 52,85; 56,13; 60,26; 130,75; 131,89; 132,81; 133,53; 169,72; 179,84 ppm. EM (MALDI-TOF): m/z(%) calculada para C₂₈H₃₈N₆O₄/H⁺: 522,3027; encontrada: 523,3004.

El compuesto A (diéster N,N-bis((2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)aminopropil)metilamina) se preparó siguiendo la metodología descrita en Rotger, M. C., et al., *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2302-2308. El compuesto B ([N-N'-Bis-(2-aminopropil)]-bencilamina) se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito en Bergeron, R. J., et al., *Synthesis*, **1981**, 9, 732-733 y Bergeron, R. J., Garlich, J. R., *Synthesis*. **1984**, 9, 782-784.

Síntesis del compuesto 2 (C2)



El compuesto 2 (C2) se prepara según lo descrito en M. C. Rotger, et al. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2302-2308.

A una disolución del compuesto A (0,21 g, 0,53 mmol) en etanol (20 mL) se adiciona gota a gota una disolución de 3,3'-diamino-N-metildipropil)-metilamina (0,08 g, 0,53 mmol) en etanol (5 mL). La mezcla de reacción se deja agitando durante 7 horas a

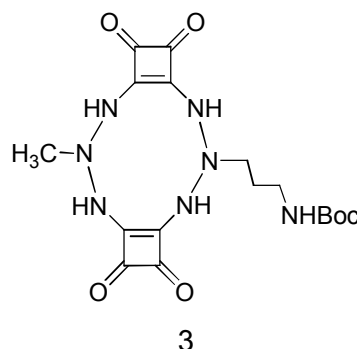
temperatura ambiente. Entonces el precipitado de color amarillo pálido se decanta mediante centrifugación y se lava con etanol (1 x 10 mL), acetona (2 x 10 mL), y seca para obtener el compuesto como un sólido de color amarillo pálido (0.19 g, 80% de rendimiento).

5

Mp > 320 °C con descomposición; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.0-7.2 (br s, 4H, NH), 3.60 (br s, 8H, CH₂), 2.43 (t, J = 7.1 Hz, 8H, CH₂), 2.22 (s, 6H, CH₃), 1.74 (t, J = 6.2 Hz, 8H, CH₂); ^{13}C NMR (300MHz, D₂O/DCI): δ = 184.3, 170.9, 56.3, 41.8, 27.9; IR (KB Br): 3172, 2956, 1797, 1638, 1574 cm^{-1} ; MS (FAB+, matrix NOBA) m/z (%): 447 (MH+, 50); análisis elemental calcd (%) de C₂₂H₃₄N₆O₄: C 59.17, H 7.67; 18,82; encontrado: C 57.81, H 7.57, N 18.22.

10

Síntesis del compuesto 3



15

La síntesis del compuesto 3 se describe en A. Sampedro, et al., *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1537–1546.

20

El diéster **A** (1,8 g, 4,58 mmol) se calienta en EtOH a 50°C hasta su completa disolución. Sobre esta se añade gota a gota una disolución de la triamina monoprottegida terc-butil (3-(bis(2-aminopropil)amino)propil)carbamato (1,32 g, 4,58 mmol) disuelta en EtOH (20 ml). La mezcla se agita durante 16 horas a temperatura ambiente y en atmósfera de argón. El precipitado formado se filtra y se lava con EtOH (4x10 ml) y dietileter (2x10 ml) obteniendo un sólido amarillo. Éste se lava con acetona a reflujo (3x20 ml) y se seca a vacío obteniendo un sólido amarillo pálido (1,82 g, 3,09 mmol). Rdto: 67%

25

30

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,37 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,47 (br, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1,64 (br, 8H, CH₂CH₂CH₂), 2,11 (s, 3H, NCH₃), 2,33 (br, 10H, NCH₂),

2,91 (br, 2H, CH_2NHBoc), 3,50 (br, 8H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{Sq})$), 6,75 (br, 1H, NHBoc), 7,40 (br, 4H, $\text{NH}(\text{Sq})$). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 26,7, 28,0, 28,2, 38,0, 41,7, 50,4, 54,2, 77,3, 155,6, 167,8, 182,3. HRMS (ESI) calc. para 612,3486 ($\text{M}+\text{Na}^+$; $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{NaO}_6^+$) encontrado: 612,3480.

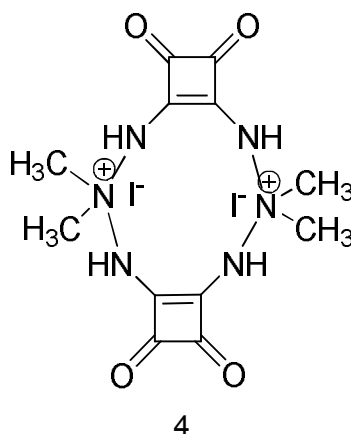
5

Síntesis de terc-butil (3-(bis(2-aminopropil)amino)propil)carbamato.

La síntesis del terc-butil (3-(bis(2-aminopropil)amino)propil)carbamato se realiza siguiendo los métodos descritos en A. Sampedro, et al., *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1537–1546.

10

Síntesis del compuesto 4

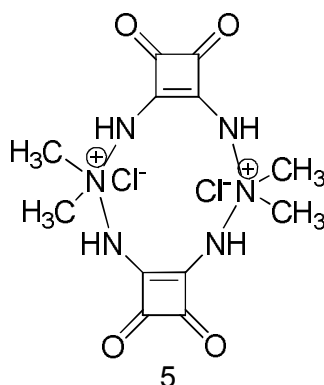


15

La síntesis del compuesto 4 se describe en Prohens, R., et al., *Chem. Commun.*, **2001**, 1456-1457, mediante la adición de 7,8 equivalentes (5,6 mmol) de yoduro de metilo a una suspensión de 2 (320 mg, 0,72 mmol) en DMF (70 mL). La disolución se mantiene a 70 °C durante 12 horas. Finalmente se obtienen un precipitado que se decanta por centrifugación, se lava con acetona (5 x 10 mL), obteniéndose 416 mg de 4 como un sólido amarillo. Rendimiento 80 %. Mp: descompone >250 °C, ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ = 3,71 (t, 8H, J = 5.7 HZ), 3,58 (m, 8H), 3,15 (s, 12H), 2,12 (s, 8H,) ppm. ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ = 27,1, 43,7, 53,9, 64,3, 171,3, 184,6. IR (KBr): 3453, 3179, 2949, 1797, 1653, 1581, cm^{-1} . Análisis elemental calculado para $\text{C}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{H}_{10} \text{I}_2$: C 39,47; H 5,52; N 11, 51 Experimental: C 39,20; H 5,56; N 11, 34

25

Síntesis del compuesto 5



La síntesis del compuesto 5 se describe en A. Sampedro, et al., *Bioconjugate Chem.*
 5 **2014**, 25, 1537–1546.

El compuesto 4 (204 mg, 0,28 mmol) se disuelve en H₂O (15 ml) y la solución se filtra para eliminar restos insolubles. Se añade una disolución acuosa de NH₄PF₆ (0,4 ml, 1,2M) obteniendo un precipitado amarillo que se filtra y lava con H₂O (5 ml). El
 10 precipitado se suspende en agua destilada (10 ml) y se añade una resina de intercambio iónico en su forma cloruro (Amberlite® IRA-400, 0,5 g). La mezcla se agita suavemente durante 24 horas, se filtra y la disolución acuosa se liofiliza para obtener el producto **5** como un sólido blanco (120 mg, 0,22 mmol). Rdto: 78%

15 ENSAYOS BIOLOGICOS

Evaluación de la capacidad de los compuestos 1 a 5 de la invención como agentes de transfección no-viral

Se evaluó la capacidad de actuar como agentes de transfección no-viral de los
 20 compuestos de la invención. Para ello se realizaron ensayos de transfección en cultivos celulares (U87MG) utilizando como modelo de ADN el plásmido pmax-GFP (Lonza) o el pGL3-control vector de Promega (p). El plásmido pmax-GFP una vez en el interior celular se transcribe y traduce dando lugar a la proteína denominada GFP (*Green Fluorescent Protein*) lo que permite cuantificar de forma directa la eficacia del
 25 proceso combinado de transporte y transcripción del ADN. Con fines comparativos y a modo de control se ha utilizado Lipofectamina2000® (Life Technologies) en ensayos paralelos a los realizados con los compuestos 1 a 5, utilizando 2 µL de reactivo Lipofectamina2000® (Life Technologies) y siguiendo las especificaciones del comerciante. La Lipofectamina se incubó con 1µg de plásmido (pmaxGFP, Lonza) en
 30 200 µL de medio Opti-MEM® (Life Technologies) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente la disolución se mezcla en un pocillo de una placa (12

pocillos) con una suspensión de 1 mL de cultivo celular a una concentración de 60.000 células/pocillo. La Lipofectamina 2000® es un reactivo comercial ampliamente utilizado para realizar este tipo de estudios, según las instrucciones del fabricante debe utilizarse a dosis de entre 2 y 5 µl de la disolución, encontrando que para esta aplicación la dosis más adecuada fue de 2µl de Lipofectamina 2000®. La eficacia de la transfección se determinó por microscopia confocal de fluorescencia tomando imágenes de los cultivos después de 48h del tratamiento con los vectores de transfección.

- 10 Se trataron células U87MG con una concentración 10 µM de cada compuesto 1 a 5 o con 2µl de Lipofectamina 2000® y 1 µg de pmax-GFP durante 48 h a 37 °C y bajo aire humificado que contiene 5% CO₂. Después del periodo de incubación se evalúa el grado de transfección mediante microscopia confocal y citometria de flujo para el pmaxGFP . Se observó que para los compuestos 1 a 5 se han obtenido niveles de transfección similares o superiores a los obtenidos utilizando la Lipofectamina2000® y como control se utilizó el plásmido pmax-GFP sin vector de transfección (Figura 1). En la figura 1 se muestran las imágenes con los compuestos 1 a 3 y 5, para el compuesto 4 se obtuvo un resultado similar al compuesto 5.
- 15
- 20 De entre los compuestos con mayor eficiencia de transfección se eligió el compuesto 2 (C2) para los siguientes ensayos como agente de transfección no-viral.

Optimización de la dosis-respuesta del método de transfección.

- 1µg de plásmido pmaxGFP se mezcló con diferentes cantidades de una disolución 10 mM del compuesto o agente de transfección no-viral 2 (C2) en 200µL de medio Opti-MEM® (Life Technologies) para obtener concentraciones finales de C2 en el medio de transfección, cuando el volumen total sea 1200 µL, comprendidas entre 5-30µM. Las mezclas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente para inducir la formación del complejo. Transcurrido dicho tiempo las distintas disoluciones se mezclan en diferentes pocillos de una placa (12 pocillos) con una suspensión de 1 mL de cultivo celular a una concentración aproximada de 60.000 células/pocillo. La eficacia de transfección se midió a partir de las imágenes tomadas por microscopia confocal de fluorescencia después de incubar los cultivos durante 48 (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany).
- 25
- 30

35

Se comprobó que la mejor relación dosis respuesta para la transfección se alcanza al tratar los cultivos celulares U87MG y COS7 a una concentración de 10 μ M de C2 y 1 μ g de plásmido pmaxGFP durante 48 h (Fig. 4). Esta dosis implica, una relación N/P (Nitrógeno/Fosfato) aproximadamente de 2, inferior a las establecidas en otros reactivos de transfección.

Método de transfección en cultivo celular

1 μ g de plásmido pmaxGFP (Lonza) o del pGL3-control vector, Promega (p) se mezcla con 1,2 μ l de una disolución 10 mM de cualquiera de los compuestos 1 a 5 de la invención, utilizados como agentes de transfección no-viral, en 200 μ L de medio Opti-MEM®-(Life Technologies). Se lleva a cabo el mismo protocolo que se describe en el ejemplo "Evaluación de la capacidad de los compuestos 1 a 5 de la invención como agentes de transfección no-viral", con la peculiaridad de que después del periodo de incubación se evalúa el grado de transfección mediante microscopia confocal y citometría de flujo para el pmaxGFP; y se mide los niveles de luminiscencia utilizando el kit (Promega, Madison, WI) para el pGL3-control vector, Promega (p).

Detección de la expresión de RhoE y FOXO1 en cultivos celulares transfectados con el correspondiente siRNA

Para evaluar la capacidad del agente de transfección no-viral C2 de la invención para transfectar siRNA, utilizamos a modo de modelo los siguientes: siRNA-RhoE (ratón) (Dharmacon) y siRNA-Fox01 (humano) (Dharmacon). En 500 μ l de medio Opti-MEM®, se mezclaron tanto 50nM siRNA con la cantidad necesaria del agente de transfección no-viral 2 (C2) para obtener una concentración final de 10 μ M de C2 o 50nM siRNA con 2 μ l Lipofectamina 2000®. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al final del periodo de incubación la mezcla de transfección se adicionó a un pocillo de una placa a la que se añadió el correspondiente cultivo celular en una concentración aproximada de 100.000 célula/pocillo. Para este procedimiento se utilizaron placas de 6 pocillos. Los cultivos se incubaron durante 48 horas. Como control (C) se utilizó el mismo número de células por pocillo incubadas durante 48 h solo con los siRNA, sin usar C2. Se lisaron con un tampón que contiene inhibidores de proteasas. El contenido proteínico se midió mediante el método de Bradford. El lisado celular se separa mediante electroforesis en gel de 10% SDS-poliacrilamida durante 90 minutos a 120V. Después las proteínas fueron transferidas a una membrana PDVF (Millipore, Billerica, MA) durante 2 horas a 60V. Las membranas se incubaron con un tampón de bloqueo que

contenía TBS (20mM Tris-HCL pH 7,5, 150mM NaCl), 0,02% Tween 20 y 5% leche
 desnatada deshidratada durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se
 incubaron con los siguientes anticuerpos: RhoE (Cell Signaling Technology, Beverly,
 MA, 1/1000), Foxo1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, 1/1000) y beta-tubulina
 5 (T0198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 1/4.000), a 4°C durante 12 h. Después las
 membranas se lavaron en TBS 0,02% Tween 20 y se incubaron con anticuerpos
 secundarios marcados con peroxidasa (Dako, Glostrup, Denmark, 1/2000) durante 1
 hora a temperatura ambiente. Finalmente la reacción de la peroxidasa se detectó
 mediante el sistema de detección quimioluminiscente (Millipore, Billerica, MA).

10

Se comprobó que el C2 transfecta de forma efectiva siRNAs (pequeños ARNs de
 interferencia) al observar el silenciamiento de la expresión de proteínas como FOXO1
 y RhoE (FIG. 2). En la figura se muestran los western blots obtenidos donde se
 aprecia la disminución en los niveles de expresión de las proteínas silenciadas. La
 15 efectividad del ensayo realizado con C2 resulta del mismo nivel o superior que los
 resultados obtenidos al utilizar Lipofectamina2000® como agente de transfección.

Viabilidad Celular

Se determinó la toxicidad del agente de transfección no-viral C2 de la invención en
 20 células transfectadas y se comprobó que es mucho menor que la que presenta la
 Lipofectamina2000®. La viabilidad celular se midió 48 h después del tratamiento con
 Lipofectamina2000® o con el compuesto C2 y pmax-GFP, utilizando las condiciones
 determinadas como óptimas para la transfección (1µg plásmido y 10 µM de C2 o 2 µL
 de Lipofectamina 2000®, siguiendo las indicaciones del fabricante para este reactivo)
 25 en dos líneas celulares de glioma humano: U87MG y LN229. Las cantidades
 especificadas de C2 y Lipofectamina 2000® se incubaron en 200µL de Opti-MEM®
 durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1µg del plásmido pmaxGFP (Lonza).
 Después se transfirieron a los respectivos pocillos (placa de 12 pocillos) a los que se
 añadió 1mL de una suspensión de cultivo celular a una concentración aproximada de
 30 60.000 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 48 h y finalizado este periodo
 se determinó la viabilidad celular. Para ello, las células se tripsinizaron e incubaron en
 25 µM de medio de cultivo con 25µM del reactivo CellTiter- Glo (Promega). La
 luminiscencia generada se midió utilizando un lector de placas Synergy Mx microplate
 reader (Biotek, Winooski, VT). Las lecturas se realizaron por triplicado. Los resultados
 35 se recogen en la Tabla 1 y FIG. 3.

Tabla 1. Porcentaje de células viables transfectadas

Línea Celular	Lipofectamina2000®	C2
U87MG	25%	85%
LN229	65%	90%

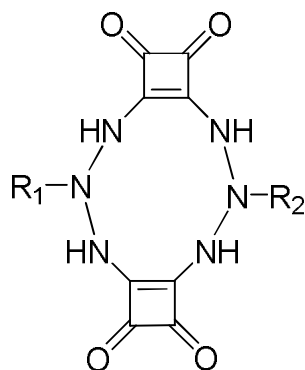
5 Además, se comprobó que C2 transfecta ácido nucleico, por ejemplo plásmidos o siRNA, en diferentes tipos de líneas celulares correspondientes a tejidos sólidos como son: U87MG, NIH3T3, LN229, COS7 y U2OS, así como células primarias de glioma humano.

10 Se obtuvieron también niveles de transfección muy adecuados con otros plásmidos, como por ejemplo, el pGL3 (*Luciferase reporter vector*) registrando niveles de transfección 10 veces más altos al utilizar C2 como agente de transfección no-viral que con la Lipofectamina2000®.

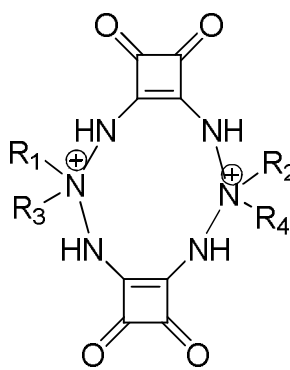
15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula general (I) o (II)



(I)



(II)

X

donde: R_1 y R_2 , son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo arilo, aralquilo, heteroarilo y alquilo (C_1-C_{10}), opcionalmente sustituido por un grupo amino,;

R_3 y R_4 , son iguales o diferentes y se seleccionan de la lista que comprende un grupo arilo, aralquilo, heteroarilo y alquilo (C_1-C_{10}), opcionalmente sustituido por un grupo amino; y

X es al menos un contraión,
como agente de transfección no-viral.

2. Uso según la reivindicación 1, donde R_1 y/o R_2 son un grupo alquilo (C_1-C_4) o arilo.

3. Uso según la reivindicación 2, donde R_1 y/o R_2 son un metilo,

4. Uso según la reivindicación 3, donde R_1 y R_2 son un metilo.

5. Uso según la reivindicación 2, donde R_1 o R_2 son un grupo alquilo (C_1-C_4) sustituido con un grupo amino terminal.

6. Uso según la reivindicación 5, donde R_1 o R_2 son $-(CH_2)_3-NHBoc$.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_1 o R_2 son un arilo.

8. Uso según la reivindicación 7, donde R_1 o R_2 son un bencilo.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_1 es metilo y R_2 es -
(CH₂)₃-NHBoc.

5 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R_1 es metilo y R_2 es un bencilo.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R_3 y/o R_4 son un grupo alquilo (C₁-C₄).

10 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R_3 y/o R_4 son un metilo.

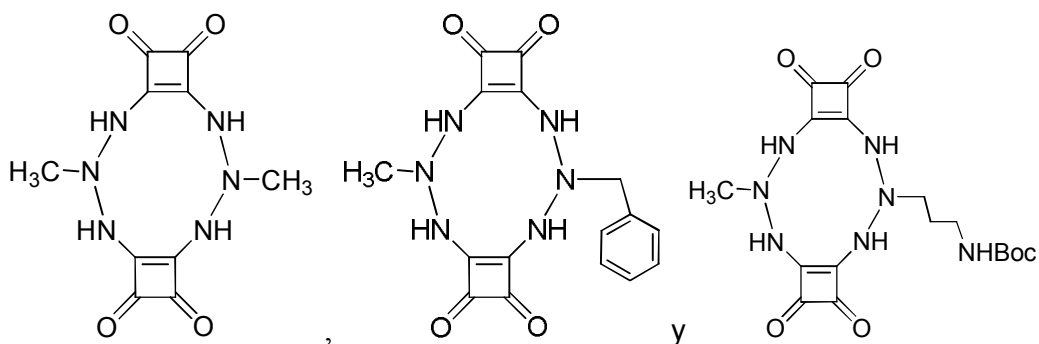
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R_3 y R_4 son metilo.

15 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el contraión se selecciona de entre dos aniones monovalentes, iguales o diferentes, o un anión divalente.

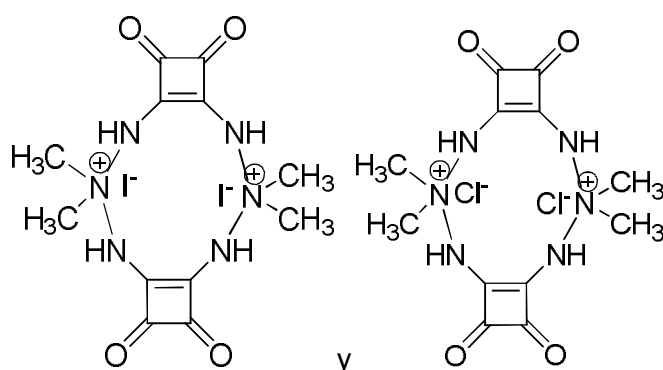
20 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el contraión se selecciona de un halógeno.

16. Uso según la reivindicación 15, donde el contraión X es 2I⁻ o 2Cl⁻.

25 17. Uso según la reivindicación 1 donde los compuestos de fórmula (I) se seleccionan de entre:



30 18. Uso según la reivindicación 1 donde los compuestos de fórmula (II) se seleccionan de entre:



19. Agente de transfección no-viral que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o (II), según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y al menos un ácido nucleico.

5

20. Agente de transfección según la reivindicación anterior, donde el ácido nucleico es de cadena sencilla o de cadena doble y preferiblemente se selecciona de entre ADN, ARN, ARN de interferencia (silenciamiento), micro ARN, plásmidos de ADN, ADN viral, fragmentos de cromosomas, ácido nucleico señuelo, aptámeros o ribozimas.

10

21. Composición farmacéutica que comprende al menos un agente de transfección no-viral según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20.

15

22. Uso del agente de transfección no-viral según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, para la elaboración de un medicamento.

23. Uso del agente de transfección no-viral según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, para la elaboración de un medicamento para terapia génica.

20

24. Uso del agente de transfección no-viral según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de deficiencia en adenosíndeaminasa (ADA), el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), infección por VIH, enfermedades neurodegenerativas o cáncer.

25

25. Uso del agente de transfección no viral según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, para la elaboración de sondas para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen.

30

26. Compuesto de fórmula:

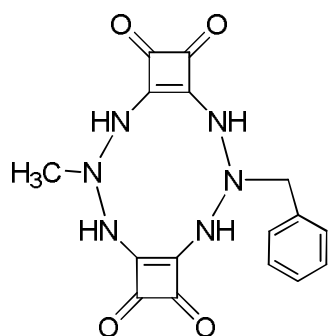


FIG. 1

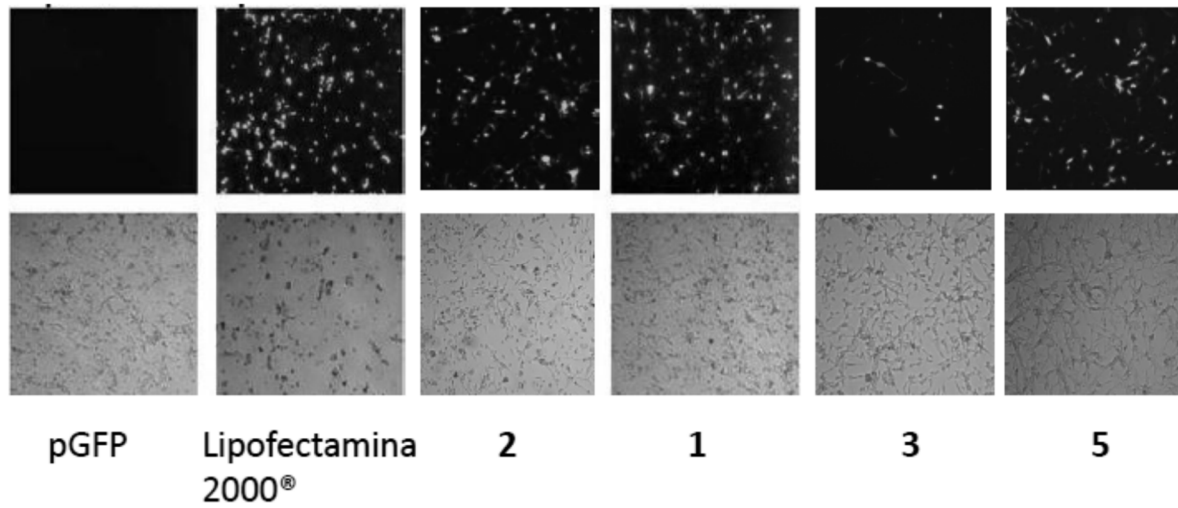


FIG. 2

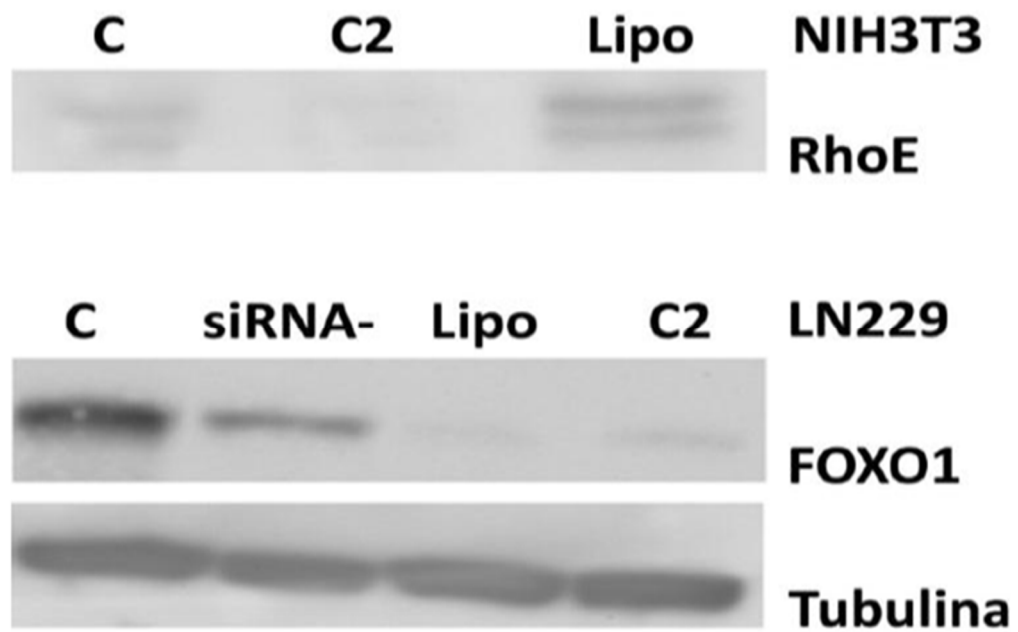


FIG. 3

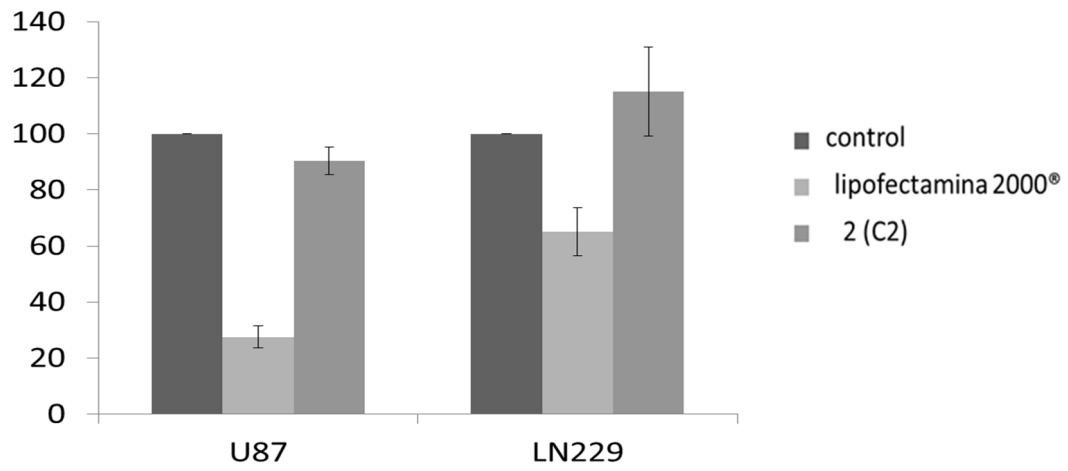
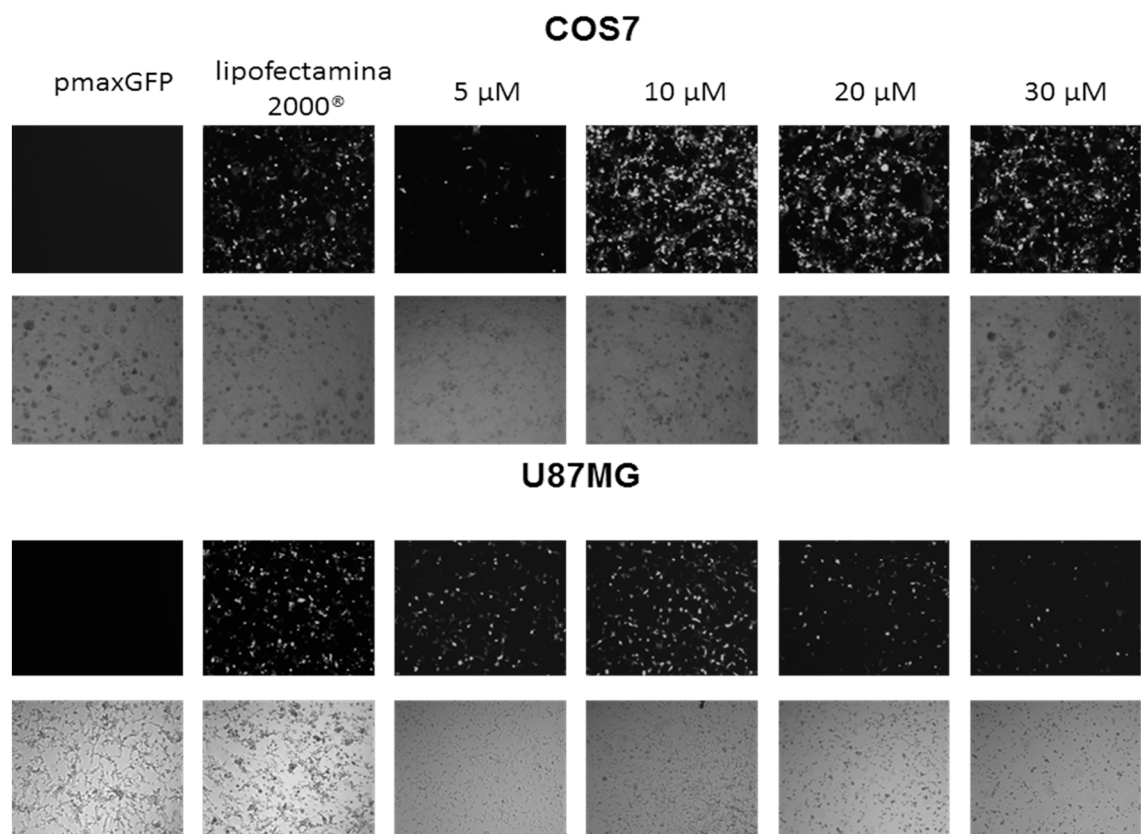


FIG. 4





- ②① N.º solicitud: 201530636
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.05.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/395** (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2340979 A1 (UNIV ILLES BALEARS) 11.06.2010, páginas 4-6, compuestos 1-11; reivindicaciones 9,19.	1-26
A	WO2011034051 A1 (SANTEN PHARM CO LTD) 24.03.2011 (resumen). Recuperado el 01.03.2016. Recuperado de WPI EPODOC Database, resumen & WO 2011034051 A1 (SANTEN PHARM CO LTD) 24.03.2011, páginas 48-63.	1-26
A	ES 2525079 A1 (UNIV ILLES BALEARS et al.) 17.12.2014, reivindicaciones 1,19.	1-26

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
02.03.2016

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

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

A61K, 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, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.03.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-26	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	ES 2340979 A1 (UNIV ILLES BALEARS)	11.06.2010
D02	WO2011034051 A1 (SANTEN PHARM CO LTD) 24.03.2011 (resumen). Recuperado el 01.03.2016. Recuperado de WPI EPODOC Database, resumen & WO 2011034051 A1 (SANTEN PHARM CO LTD) 24.03.2011, páginas 48-63.	24.03.2011
D03	ES 2525079 A1 (UNIV ILLES BALEARS et al.)	17.12.2014

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 al uso de compuestos con estructura de oligoescuaramidas cíclicas como agentes de transfección no-viral. Se utilizan en terapia génica para el tratamiento o la prevención de deficiencias en adenosindeaminasa (ADA), síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), infección de VIH, enfermedades neurodegenerativas o cáncer.

El documento D1 se refiere al uso de compuestos cicloescuaramídicos como agentes utilizados en el tratamiento de enfermedades asociadas con la inhibición de kinasas, tales como enfermedades tumorales, diabetes, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y replicación de virus HIV. Los compuestos recogidos en este documento (páginas 4-6) son compuestos macrocíclicos de base escuaramida que difieren estructuralmente de los compuestos que se reivindican en la presente solicitud.

El documento D2 se refiere a derivados de escuaramida cíclicos útiles para tratar desordenes tales como hipertensión, angina, arritmia, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, glaucoma, dolor inflamatorio y dolor neuropático. Dichos compuestos (ver estructuras de las páginas 48-63 del documento D2) difieren estructuralmente de los que se reivindican en la presente solicitud.

El documentos D3 se refiere a la síntesis y uso de compuestos de base escuaramida no cíclicos, para el tratamiento de enfermedades de origen parasitario como son la tripanosomiasis conocida como enfermedad de Chagas o la Leishmaniosis.

En consecuencia, ninguno de los documentos citados D1-D3 recoge ni contiene sugerencias que lleven al experto en la materia al uso de los compuestos de tipo oligoescuaramida, como se define en las reivindicaciones 1-25 como agentes de transfección no viral. Tampoco se divulga el compuesto de la reivindicación 26.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, las reivindicaciones 1-26 de la presente solicitud tienen novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.