



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 265 291**

② Número de solicitud: 200501810

⑤ Int. Cl.:
C08G 77/52 (2006.01)
C07F 7/18 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **22.07.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2007**

Fecha de la concesión: **30.11.2007**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2008**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

⑰ Titular/es: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es:
**Mata de la Mata, Francisco Javier de la;
Gómez Ramírez, Rafael;
Flores Serrano, Juan Carlos;
Jesús Alcañiz, Ernesto de;
Ortega López, Paula;
Muñoz Fernández, María Ángeles;
Bermejo Martín, Jesús Francisco;
Serramía Lobera, María Jesús;
Fernández Gómez-Chacón, Gerónimo y
Chonco Jiménez, Louis**

⑲ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

⑳ Título: **Nuevos dendrímeros carbosilanos, su preparación y sus usos.**

㉑ Resumen:

Nuevos dendrímeros carbosilanos, su preparación y sus usos. Los dendrímeros de la invención poseen en extremos de sus ramificaciones grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios. Entre sus posibles usos está la utilización como vehículos de transporte en la sangre de moléculas con carga aniónica como las moléculas de ácidos nucleicos, entre ellas los ODN y los ARNi, y otros fármacos aniónicos con los que tengan capacidad para interaccionar, protegiéndolos de la interacción con proteínas del plasma. En los casos en que la unión es perdurable, los dendrímeros de la invención pueden utilizarse para fijar moléculas amónicas a superficies. Sus usos incluyen también su administración como principios activos para la prevención o el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos con cuya estructura y/o ciclo vital interfieran, o para desencadenar una respuesta inmune frente a antígenos unidos a extremos de sus ramificaciones que posean grupos amino.

ES 2 265 291 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Nuevos dendrímeros carbosilanos, su preparación y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a las moléculas tridimensionales denominadas dendrímeros, concretamente a los de tipo carbosilano con restos terminales que contienen grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios, a los procedimientos para su preparación y a su uso. Entre los campos en los que es posible su uso destaca su utilización como vehículos de transporte para ácidos nucleicos y otras moléculas con actividad farmacológica con carga negativa, al permitir aumentar la vida media de dichos fármacos y su biodisponibilidad y disminuir la dosis necesaria para conseguir el efecto biológico deseado. La prevención o el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos con cuya estructura y/o ciclo vital interfieran es otra de las aplicaciones de los dendrímeros de la invención.

15 **Antecedentes**

Los dendrímeros han recibido gran atención en los últimos años debido a su posible utilización en aplicaciones tan variadas como catálisis a nanoescala, sensores químicos, micelas unimoleculares, imitación de la función de las enzimas, encapsulación de moléculas, reconocimiento molecular, agentes de diagnóstico y también como vehículos para el transporte de genes y fármacos. Revisiones excelentes que incluyen todas estas aplicaciones se encuentran publicadas en la bibliografía.^[1,31-38]

Una de las áreas en las que los dendrímeros han sido más estudiados es la Terapia Génica (introducción de material genético en una célula con finalidad terapéutica). Hasta ahora, los vectores para transporte de ácidos nucleicos más utilizados han sido los virales. Sin embargo, la utilización de vectores virales se ha asociado a la aparición de algunos problemas como efectos inmunológicos adversos, síndromes linfoproliferativos relacionados con la desregulación de oncogenes en el genoma humano^[2], etc. Para intentar resolver estos problemas se han desarrollado otros tipos de vehículos no virales como liposomas catiónicos, polímeros y también, como se ha dicho, dendrímeros. Cada uno de estos sistemas catiónicos forman complejos electrostáticos con los ácidos nucleicos que se denominan, respectivamente, lipoplejos, poliplejos o dendriplejos.

La utilización de liposomas como agentes de transfección se describió inicialmente en 1987.^[3] El método más utilizado para el reparto de genes ha sido la encapsulación en lípidos catiónicos, hasta el punto, de que algunos de estos derivados como CytofectinTM o LypofectinTM se encuentran disponibles comercialmente. Estos derivados, no obstante, también han mostrado efectos secundarios como reacciones inflamatorias del pulmón y problemas como la falta de transfección en presencia de suero.^[4]

En cuanto a los polímeros degradables convencionales, su uso como agentes de transporte presenta como principal inconveniente su inestabilidad termodinámica, que hace que las especies activas tengan una vida media muy corta *in vivo*.^[5]

La mayor ventaja de los dendrímeros sobre el resto de vehículos no virales, reside en una estructura uniforme y en la posibilidad de modificar de una manera versátil el esqueleto y superficie de los mismos, lo que permite una caracterización precisa del complejo (ácido nucleico/vector) y una investigación sistemática del proceso de transfección. La primera publicación que describió el uso de moléculas dendríticas como agentes de transfección apareció en 1993 describiendo el uso de los dendrímeros denominados PAMAM^[6] (poliamidoamina) y desde entonces una gran cantidad de estudios han sido realizados.^[7,39,40] La utilización de estos dendrímeros como agentes de transporte, se basa en el hecho de que a pH fisiológico algunos de los grupos terminales se protonan dando al dendrímero PAMAM una carga neta positiva, aunque también quedan presentes algunos grupos amina sin protonar. Con estos dendrímeros se han conseguido buenos resultados de transfección, especialmente con dendrímeros de sexta y séptima generación, sin embargo, la eficiencia de este proceso se puede aumentar en dos o tres órdenes de magnitud cuando se utilizan dendrímeros PAMAM activados mediante tratamiento térmico, como es el caso de SuperfectTM o PolyfectTM.

Otra clase de agentes potenciales de transfección son los dendrímeros que contienen átomos de fósforo,^[8] sintetizados por Majoral y colaboradores hasta la duodécima generación. En este caso, la superficie de los dendrímeros se ha funcionalizado con aminas terciarias protonadas o metiladas y se han ensayado como agentes de transfección del gen de la luciferasa de células 3T3. La eficiencia aumenta al aumentar la generación del dendrímero hasta alcanzar un valor constante entre las generaciones tres y cinco. Además cabe destacar que estos dendrímeros presentan una mejor eficiencia de la transfección en presencia de suero.

Finalmente, se han estudiado otras macromoléculas, como los dendrímeros poli(propilenoimina) (PPI)^[9] o poli(lisina)^[10,41] como sistemas para el transporte de ADN u oligodesoxinucleótidos (ODN). Por ejemplo, dendrímeros de bajas generaciones de PPI han mostrado una cierta capacidad para la transfección *in vitro* con baja toxicidad, aunque generaciones más altas no han podido utilizarse debido al aumento de su toxicidad.

Por su parte, los oligonucleótidos (ODN) son investigados en aplicaciones médicas en distintos campos. Así, por ejemplo, los ODN antisentido son secuencias cortas (15-30 bases de longitud), sintéticas de ADN o análogos que son complementarias (o antisentido) a una secuencia diana (una secuencia de ARN o la secuencia de ADN complementaria

a aquella desde la que ese ARN podría transcribirse); diseñadas para interferir con un hecho biológico, tal como la transcripción, la traducción o los fenómenos de corte y empalme^[11]. Estas moléculas están diseñadas para interactuar como secuencias complementarias de un ARNm diana, impidiendo la traducción a proteínas, mediante la degradación del ARNm por la actividad de la RNAsa o interfiriendo con la lectura por el ribosoma. Esto se denomina “terapia antisentido”. Los ODNs antisentido se han venido utilizando en múltiples campos desde 1978 (terapia antitumoral y enfermedades infecciosas sobre todo), hasta hoy cuando, tras un periodo de duda, los ODN antisentido han recuperado su papel como una potente herramienta en Biología Molecular, sobre todo a partir de la aprobación por la FDA americana de Formivirsen^[12], ODN antisentido indicado en la infección ocular por CMV en el contexto de infección por el VIH. Otro ODN antisentido, GEM231, se postula como una molécula con potencial aplicación contra diferentes neoplasias^[13]. Este abordaje se está investigando también por su posible utilización en marcajes isotópicos de tumores utilizando la Tomografía de Emisión de Positrones^[14]. Existe, además, un tipo de ODNs antisentido que se postula que podrían actuar a nivel del ADN celular: son los ODNs formadores de triple hélice, algunos de ellos diseñados para su aplicación dentro del campo del VIH^[15].

Otro campo totalmente distinto es el de la aplicación de ODN ricos en secuencias no metiladas CpG como inmunomoduladores. Estas secuencias conducen la respuesta inmune hacia un perfil Th1, caracterizado por una secreción aumentada de Interferón, Factor de necrosis tumoral, interleuquina-2, y otros factores que aumentarán la capacidad del sistema inmune para eliminar patógenos como virus y bacterias. Estos ODN interactúan con receptores de la superficie de los linfocitos como los de la familia Toll-like receptor. Están siendo investigados para potenciar la respuesta inmune en inmunodeficientes y en el contexto de enfermedades alérgicas, caracterizadas por un balance Th2, con el fin de llevar este perfil a Th1^[16].

Uno de los principales problemas de la terapia con ODN es la de conseguir unos niveles adecuados para lograr el efecto terapéutico. Es necesario administrar grandes cantidades de ODN para lograr el efecto biológico, debido a que éstos presentan gran afinidad a unirse a proteínas del plasma, tales como albúmina^[17]. La unión a proteínas del plasma y otras proteínas de la superficie celular se considera la responsable también de algunos de los efectos tóxicos de los ODN *in vivo* (activación de la cascada del complemento, hemólisis, trombocitopenia, etc)^[18]. Se cree por ello que la utilización de un vehículo transportador que previniera dicha unión a proteínas podría traducirse en la obtención de unos mayores niveles de ODN activo, prolongar además la vida media del mismo, y disminuir su toxicidad.

El problema de la interacción con proteínas y su unión a ellas se presenta también en muchas otras sustancias utilizadas como fármacos, pues las proteínas en general (y las plasmáticas en particular: albúmina, glucoproteínas, lipoproteínas) exhiben grupos funcionales potencialmente capaces de interactuar con sustancias presentes en el medio, incluyendo fármacos administrados. Esta unión es determinante para la distribución de dichos fármacos, toda vez que la fracción unida del fármaco, por no tener capacidad de ser transferida, no forma parte del equilibrio vascular-tisular (“reservorio”), no se metaboliza, no es excretada y no ejerce efecto (a menos que el mismo esté determinado por la unión mencionada).

La unión a las proteínas plasmáticas (UPP) es, con mucho, la más importante y determinante de la distribución de fármacos, ya que la unión a proteínas tisulares es, generalmente, muy reducida. Esto se debe, entre otras cosas, al hecho de que la concentración plasmática de proteínas es mucho mayor que la intersticial de los tejidos, cuyas proteínas, además, tienen muy poca movilidad y menor capacidad de ligar sustancias, propiedad esta última que es particularmente notable en el caso de la albúmina, proteína predominante en el plasma en condiciones normales y a la que se unen principalmente los fármacos ácidos (aunque también algunos básicos), mientras que a las glicoproteínas ácidas se unen aquellos alcalinos.

Fármacos Ácidos (Albúmina)	Fármacos Básicos (Albúmina-II glicoproteína ácida)
Aspirina	Clordiazepóxido
Furosemida	Diazepam
Penicilina	Lidocaína
Fenitoína	Quinina
Tolbutamida	Amitriptilina
Warfarina	

ES 2 265 291 B1

Como la estructura de la albúmina desde el punto de vista de la unión de fármacos es bastante compleja, se pueden definir en ella dos puntos o *locus* de unión principales:

Punto I (“de la Warfarina”):	Punto II (“del Diazepam”):
Clorotiacida	Benzodiazepinas
Furosemida	Ibuprofeno
Ácido Nalidíxico	Cloxacilina
Ácido Salicílico	Ácido Salicílico
Tolbutamida	Tolbutamida
Indometacina	Indometacina

Por tanto, el problema de la unión a proteínas del plasma no afecta solamente a los ODNs, sino también a casi todos los fármacos de uso común. Muchos de estos problemas podría obviarse también mediante el uso de un transportador. Parece claro que el vehículo a desarrollar para este fin ha de presentar una serie de características, tales como, ser:

- No tóxico
- No inmunogénico (salvo si se pretenden utilizar en vacunación)
- Biocompatible
- Tener grupos funcionales adecuados para permitir la fijación química.
- Limitada acumulación corporal
- Mantener la actividad del fármaco/ODN hasta llegar al sitio de acción

Además, parece obvio que el vehículo a desarrollar debería liberar a tiempo el ODN o el fármaco que transportara, para que éste pudiera llevar a cabo su actuación. En este aspecto, el desarrollo de vehículos que permitieran la liberación controlada del ODN o de determinados fármacos sería muy deseable, con el fin de lograr unos niveles mantenidos de sustancia activa en el organismo y la obtención del efecto de forma gradual. Por todas estas razones, la utilización de dendrímeros aparece como una posibilidad que cumple con los requerimientos deseados, al poder actuar como vehículos de las sustancias activas que las protegerían de la degradación por enzimas del plasma y de la interacción con otras proteínas a las que podrían unirse, incrementando sus niveles en sangre y permitiendo una actividad más elevada y/o prolongada. Los ODN en concreto, como muchos fármacos de interés, son moléculas aniónicas (con carga negativa), por lo que la utilización como vehículos de las mismas de dendrímeros con grupos que facilitan su interacción y, especialmente, de los que son de naturaleza catiónica a pH fisiológico supone una opción muy adecuada para garantizar la estabilidad del complejo durante su transporte. Por todo ello, la invención desarrolla nuevos dendrímeros, concretamente del tipo carbosilano, y proporciona su uso, entre otros, como vehículos transportadores, en la sangre y/o en otros fluidos corporales, de ODN y otras moléculas aniónicas de interés. Esto supone un campo nuevo pues, hasta el momento, no se ha publicado ningún estudio concerniente al uso de dendrímeros con estructura carbosilano solubles en agua como agentes de transporte, aunque sí se ha publicado un informe sobre la biocompatibilidad *in vitro* de dendrímeros carbosilano constituidos sobre poli(óxido de etileno).^[21] Además, únicamente tres estudios sintéticos de dendrímeros carbosilano catiónicos han sido publicados hasta la fecha.^[22-24], ninguno de ellos coincidentes con los que proporciona la invención.

Entre los fármacos para los que los dendrímeros pueden actuar como transportadores, un grupo interesante lo constituyen los fármacos citotóxicos destinados a las células tumorales^[73,74]. Cuando se busca este objetivo, los dendrímeros pueden direccionarse hacia las células tumorales funcionalizándolos con ácido fólico, que está sobreexpresado en las células tumorales, por lo que esos dendrímeros tendrían preferencia para su entrada por dichas células respecto a las células normales. Recientemente, dendrímeros PAMAM modificados con folato en su superficie han sido utilizados como transportadores de isótopos de boro en terapias de captura de neutrones en cáncer^[75]. Además, los dendrímeros PAMAM conjugados con cis-platino actúan como transportador macromolecular de platino, un fármaco antitumoral, que se libera del complejo dendrímero-platino de forma controlada, dando lugar a una mayor acumulación del mismo en tumores sólidos, con menor toxicidad que el cis-platino libre^[76]. Otra alternativa para la liberación controlada en el establecimiento de uniones covalentes entre el dendrímero y el fármaco mediante enlaces biodegradables a pH fisiológico, como se ha probado con dendrímeros con aminas primarias en superficie y modificados parcialmente con 1-bromoacetil-5-fluoro-uracilo para formar una unión amida lábil que se hidroliza *in vitro* a pH fisiológico, liberando de forma controlada 5-fluoro-uracilo, un potente antitumoral.

Otras sustancias de interés en cuyo transporte pueden ser de utilidad los dendrímeros son aquellas que se convierten en tóxicas tras ser irradiadas, debido a la formación *in situ* de pequeñas cantidades de oxígeno en estado singlete, el cual tiene efectos fisiológicos deletéreos^[69]. Se han publicado algunos artículos acerca de dendrímeros portadores de fármacos fotosensibles, por ejemplo, con ácido 5-aminolevulínico en la periferia, suponiendo estos dendrímeros agentes prometedores en el tratamiento de tumores de queratinocitos^[70]. Como candidatos para el tratamiento de tumores sólidos se han evaluado dendrímeros basados en poliariléter portando protoporfirina como fotosensibilizador^[71].

Un grupo adicional de fármacos para los que los dendrímeros podrían suponer interesantes transportadores lo constituyen algunos fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos, que presentan efectos secundarios tales como alteraciones gastrointestinales o nefrotoxicidad que podrían evitarse al ser suministrados por vía transdérmica, en lugar de por las vías clásicas oral o parenteral. Los datos que indican que la presencia de dendrímeros, unidos a los fármacos a administrar, induce alteraciones en la piel que aumentan su permeabilidad^[72], los convierten en buenos candidatos para ser utilizados en la administración transdérmica de fármacos.

La multivalencia de los grupos funcionales de superficie de los dendrímeros hace que la gran variedad de moléculas que pueden transportar abarque incluso dendrímeros con distintas funcionalidades: son los tectodendrímeros, que están siendo estudiados por su gran potencialidad en posibles aplicaciones biomédicas.

La potencialidad de los dendrímeros para el transporte de fármacos se basa no sólo en aprovechar las posibles interacciones con una superficie externa dendrímica multivalente, sino en que las cavidades de la estructura del dendrímero pueden ser utilizadas también para alojar las moléculas que se desee transportar. Un ejemplo de aprovechamiento de cavidades de estructuras dendrímicas es la llamada “caja dendrítica”^[68], en la que un dendrímero PPI es modificado en superficie con grupos fenilalanino, que protegen el almacén externo haciéndolo más denso. Durante el proceso de crecimiento del dendrímero, se encapsulan en su interior moléculas de diferente tamaño. El dendrímero puede portar distinto número de moléculas según el tamaño de éstas. Cuando el dendrímero se trata con ácido fórmico, el almacén externo se abre, permitiendo la liberación de las moléculas hospedadas en su interior.

Otro grupo de moléculas para las que los dendrímeros pueden suponer transportadores adecuados son las moléculas de bajo peso molecular (como los péptidos) contra los que se desea generar una respuesta inmune en un sujeto pero que, por su pequeño tamaño, son poco inmunogénicas o inducen una respuesta débil tras ser inyectadas al individuo que se desea tratar. Este problema puede solucionarse incrementando su peso molecular, bien mediante polimerización o mediante su acoplamiento a un transportador de alto peso molecular (tradicionalmente una proteína). Los dendrímeros que poseen una estructura muy definida y muchos grupos funcionales capaces de unir antígenos en su periferia representan una buena alternativa para la fabricación de vacunas que contengan inmunógenos muy definidos y altamente reproducibles. En esta línea, se han desarrollado los dendrímeros MAP (del inglés “multiple antigenic peptide”)^[57,58], que son construcciones asimétricas en forma de cuña formadas por sucesivas generaciones de residuos de lisina. Estos dendrímeros presentan un gran número de aminas primarias que pueden ser acopladas a antígenos de bajo peso molecular, con la intención de aumentar su inmunogenicidad, obviando la necesidad de utilizar proteínas transportadoras. Estructuras MAP que contenían péptidos de *Plasmodium falciparum* estimuladores de células T y B han sido utilizadas para producir respuestas inmunes contra este parásito^[59]. Además, se ha demostrado que las estructuras MAP son procesadas por las células presentadoras de antígenos de la misma forma que los antígenos derivados de patógenos intracelulares (como por ejemplo, virus), dando lugar a una potente respuesta inmune, incluyendo la producción de células T citotóxicas^[60]. Los dendrímeros de la invención, que presentan en extremos de sus ramificaciones restos que contienen grupos amino, pueden tener también utilidad en vacunación, bien porque se les acoplen antígenos de bajo peso molecular aprovechando aminas presentes en restos de extremos de sus ramificaciones, o bien porque dichos restos que contienen al menos un grupo amino constituyan ellos mismos antígenos de bajo peso molecular como pueden ser los de naturaleza peptídica.

Las estructuras MAP han sido utilizadas también para transportar antígenos no peptídicos como hidratos de carbono, haptenos, etc., en el contexto de vacunas. Los hidratos de carbono en particular son una clase de moléculas importantes en el reconocimiento biológico. Los glicodendrímeros, preparados mediante la unión manosa-isotiocianato, ácido siálico o lactosa a las aminas terminales de dendrímeros PAMAM o a dendrímeros de lisina, han sido utilizados como antígenos para vacunas^[64,65]. En glicodendrímeros con el antígeno T-asociado beta Gal 1-3 alfaGalNAc disacárido se ha ensayado también su capacidad de unión a la lectina (proteína de unión a hidratos de carbono) específica para la galactosa^[66], con la intención de utilizarlos en la detección de tumores que expresen receptores de antígenos T y para vehiculizar fármacos hacia los mismos. Los glicodendrímeros pueden utilizarse, además, para aumentar la afinidad por las lectinas que se unen al hidrato de carbono que lleven unido^[67], lo que puede tener interés para utilizar esos dendrímeros glicosilados como anti-adhesinas microbianas, antagonistas de toxinas, o bien como fármacos antiinflamatorios, antivirales y anticancerosos, pues las interacciones lectina-hidrato de carbono han sido descritas en numerosos casos en el sistema inmune (en los eventos que llevan a activación celular), en infecciones virales y bacterianas, en relación con el cáncer y el crecimiento celular, etc. En resumen, los dendrímeros glicosilados pueden mimetizar los glicoconjugados naturales e interactuar eficientemente con los receptores naturales de los hidratos de carbono, dando lugar a efectos característicos de la interacción con los mismos.

Además de la posibilidad de aprovechar sus propiedades para utilizarlos como transportadores, otro campo relacionado también con los ácidos nucleicos al que se le está prestando mucha atención en la actualidad es el de la fabricación de microchips que contengan conjuntos ordenados de secuencias de ADN o ARN. A la hora de fabricar

5 estos microchips, los dendrímeros están surgiendo como una de las alternativas para recubrir superficies de vidrio y aprovechar su capacidad de interacción con los ácidos nucleicos para fijar dichas moléculas a la superficie de los microchips^[63]. La perdurabilidad de la unión entre secuencias de nucleótidos y dendrímeros de la invención los hace adecuados para utilizar su capacidad de fijar ácidos nucleicos con el fin de servir de base para la fabricación de estos microchips de ADN o ARN.

10 Finalmente, existe también una necesidad de encontrar métodos alternativos para luchar contra distintos patógenos, interfiriendo en su ciclo vital, campo en el cual los dendrímeros están demostrando ser una interesante alternativa. Algunos dendrímeros previamente descritos han demostrado ser capaces de inhibir la infección causada por distintos virus, interfiriendo tanto con la entrada del virus en las células como en pasos posteriores de replicación viral. Ese es el caso por ejemplo del Herpes Simplex, cuya infección se ve inhibida *in vitro* por efecto de dendrímeros de polilisina modificados^[50,51]. También se ha conseguido inhibir la replicación del VIH, tanto a nivel de la entrada celular como en pasos posteriores, en este caso mediante la utilización de dendrímeros PAMAM modificados covalentemente, que demostraron ser capaces de interferir con la retrotranscriptasa y la integrasa del virus^[19,52]. Aprovechando estas propiedades, se han desarrollado geles vaginales para la prevención de enfermedades de transmisión sexual con formulaciones basadas en dendrímeros, como es el caso de VivaGelTM (Starpharma), cuyo ingrediente activo es un dendrímero de polilisina funcionalizado con restos naftalendisulfonato que parece ser efectivo en la prevención de la infección del VIH gracias a su capacidad de unirse a la glicoproteína gp120 de la superficie del virus. Aunque en el diseño de dendrímeros antivirales se tiene preferencia por aquellos que presentan en su superficie grupos que mimetizan los que se encuentran presentes en la superficie celular y que, por ello, son capaces de competir con las células por la unión al virus, se ha diseñado también un dendrímero con grupos amida de superficie que funciona como inhibidor del virus respiratorio sincitial, se cree que por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos periféricos del dendrímero con la proteína de fusión del virus, por lo que es de esperar que dendrímeros funcionalizados con otros grupos capaces de formar puentes de hidrógeno con proteínas virales implicadas en la interacción con la superficie celular sean capaces también de interferir con distintos virus, inhibiendo la infección provocada por ellos.

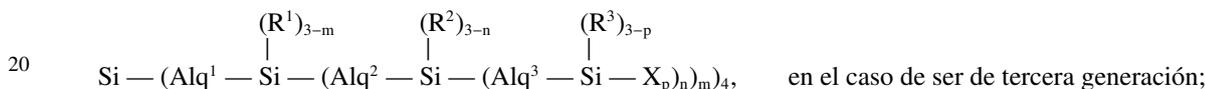
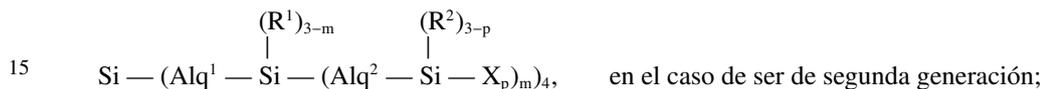
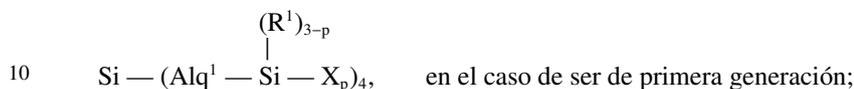
20 En otros casos, los dendrímeros han sido utilizados como antibacterianos o para desestructurar las membranas celulares de algunos hongos. Cuando se diseñan para esta finalidad, se tiene preferencia por los dendrímeros con grupos catiónicos en su superficie, tales como aminas o grupos tetraalquilamonio, que facilitan la adherencia de los dendrímeros a la membrana bacteriana, causando la lisis de la bacteria. Tal es el caso de los dendrímeros de poli(propilenimina) (PPI) con grupos alquilamonio terciarios en su superficie, que han demostrado una amplia actividad bactericida tanto contra bacterias Gram positivas como contra bacterias Gram negativas^[53,54]. Estos dendrímeros presentan una mayor capacidad bactericida que otros polímeros hiperramificados. Los dendrímeros de la invención, funcionalizados también con restos que contienen grupos amino, representan una opción para ser utilizados igualmente para desestructurar membranas celulares de bacterias u hongos.

25 También se ha comunicado que los dendrímeros presentan propiedades que les permiten actuar como desnaturizantes de proteínas. Ciertos tipos de dendrímeros actúan disminuyendo la constante dieléctrica y la viscosidad del agua y desordenando su estructura regular mediante la reorganización de las moléculas de agua en la superficie del dendrímero. Esto lleva a desfavorecer las interacciones hidrófobas, lo cual es muy desestabilizador para la mayoría de las estructuras terciarias de las proteínas, provocando su desnaturalización: es el llamado efecto “caotrópico” que presentan agentes desnaturizantes como al urea o el cloruro de guanidinio. Un campo muy interesante en el que se pretende aplicar esta capacidad desnaturizante de proteínas es el uso para disolver proteínas priónicas, tales como PrP^{Sc} ^[20]. Las proteínas priónicas son capaces de adoptar una estructura-conformación patógena que causa neuropatías mortales llamadas encefalopatías espongiiformes (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, mal de las “vacas locas”, *scrapie ovino*, etc.). Estas proteínas forman agregados que se localizan en los cerebros de los individuos afectados y son solubles sólo en disolventes que contienen tanto detergentes como agentes caotrópicos (típicamente cloruro de guanidinio 6M). Sin embargo, estos agregados pueden ser solubilizados por dendrímeros catiónicos como los de PPI y los PAMAM: los de mayor generación con mayor número de aminas en superficie son los más eficaces. Por ello, los nuevos dendrímeros de la invención, funcionalizados también con restos que contienen grupos amino, proporcionan nuevos compuestos que utilizar tanto para disolver agregados priónicos como en la terapia de otras enfermedades en cuyo desarrollo se produce también la formación de agregados proteicos patogénicos, como por ejemplo los agregados de proteína amiloide que aparecen en la enfermedad de Alzheimer^[55,56].

30 En resumen, los dendrímeros son polímeros sintéticos con buenas propiedades para su uso en aplicaciones biológicas: responden de forma predecible en solución, pueden ser modificados ampliamente para portar múltiples ligandos con actividad biológica, pueden atravesar barreras biológicas y son fabricados con pocos defectos estructurales. Por ello, se está estudiando su aplicación en distintas estrategias preventivas y terapéuticas entre las que se incluye su uso para el transporte de distintos fármacos, la transfección de moléculas oligonucleotídicas o polinucleotídicas, el diseño de vacunas, la administración como fármacos antibacterianos, antifúngicos, antivirales o incluso el alivio de los síntomas de enfermedades de distinta etiología en cuyo desarrollo está implicada la formación de agregados proteicos como puedan ser los originados por priones o los depósitos de proteína amiloide característicos de la enfermedad de Alzheimer. Los dendrímeros de la presente invención suponen interesantes alternativas para estas áreas de la Biomedicina.

Descripción general de la invención

La invención describe nuevos dendrímeros carbosilano ramificados con restos terminales en extremos de sus ramificaciones que contienen grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios que responde a una cualquiera de las fórmulas:



o a las fórmulas análogas correspondientes en el caso de generaciones superiores, en las que la fórmula correspondiente a cada generación i resultaría de sustituir X_p en la fórmula correspondiente a la generación anterior por un nuevo bloque del tipo:



pasando el grupo unido al mismo átomo de silicio que este bloque sustitutorio de estar representado por $(\text{R}^{i-1})_{3-p}$ a estar representado por $(\text{R}^{i-1})_{3-z}$,

fórmulas en las que:

$\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ representan restos alquileo de 2 a 4 carbonos que se eligen independientemente unos de otros según la longitud de las ramificaciones en cada generación;

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \dots, \text{R}^{i-1}, \text{R}^i$ representan restos que se eligen independientemente unos de otros entre metilo y fenilo;

X representa un resto que contiene al menos un grupo amino primario, secundario, terciario o cuaternario;

p es un número entero que varía entre 1 y 3;

m, n, \dots, z son números enteros que varían independientemente entre 1 y 3

En una realización preferida de la invención, los restos $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \dots, \text{R}^{i-1}, \text{R}^i$ son todos iguales y corresponden a restos metilo.

En otra realización preferida de la invención, los restos $\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ se seleccionan entre etileno y propileno. En otra realización más preferida de la invención, dichos restos son todos iguales y corresponden a restos propileno.

En otra de las realizaciones preferidas de la invención, los números enteros m, n, \dots, z son iguales entre sí y tienen el valor 2.

En la realización que más se prefiere de la invención, los restos $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \dots, \text{R}^{i-1}, \text{R}^i$ son todos iguales y corresponden a restos metilo; los restos $\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ son iguales entre sí y corresponden a restos propileno y los números enteros m, n, \dots, j son iguales entre sí y tienen el valor 2.

X representa cualquier resto que contenga una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. De entre ellos, se prefieren aquellos restos en los que X representa o bien $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_3)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}((\text{CH}_3)_2)_2)$, o $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, o bien un grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_e\text{NH}_2$ en el que "e" es un número entero que oscila entre 0 y 2, prefiriéndose en ese caso que tome el valor 1. También son realizaciones preferidas de la invención aquéllas en las que X representa las formas cuaternizadas de los restos anteriores $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$, $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_3)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)\text{I}^-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$ o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3\text{Cl}^-$.

ES 2 265 291 B1

5 Cuando X representa $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$, o $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, o bien sus formas cuaternizadas $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$, $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-)_2$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$, se prefiere especialmente que todas las ramificaciones posean restos terminales que contengan grupos amino y que el índice “p” tome los valores 1 ó 2, con lo que cada ramificación terminaría, respectivamente, en único resto terminal o en dos restos terminales. Cuando X representa $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ o su forma cuaternizada $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3\text{Cl}^-$, se prefiere especialmente que todas las ramificaciones posean restos terminales que contengan grupos amino y que “p” tome el valor 1, con lo que cada ramificación terminaría con un único resto amino.

10 También están incluidos dentro del alcance de la invención los casos en los que X represente un resto antigénico que contenga al menos un grupo amino. Un caso particular del anterior sería aquél en el que el resto antigénico es un péptido.

15 La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de dichos dendrímeros carbosilano, procedimiento que comprende las etapas de:

a) obtener un esqueleto de dendrímero carbosilano siguiendo los pasos de:

a1) obtener un dendrímero carbosilano básico de partida de fórmula:



25 donde a varía entre 0 y 2, según la longitud que se desee para las ramificaciones,

haciendo reaccionar SiCl_4 con $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_a\text{CH}=\text{CH}_2$;

a2) obtener un dendrímero carbosilano de primera generación precursor de un dendrímero de una generación superior haciendo reaccionar el dendrímero carbosilano básico de partida de a1) con $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-m}\text{Cl}_m$, de forma que se obtenga un dendrímero de fórmula:



35 donde

40 m varía entre 1 y 3 y equivale al número de ramificaciones que se pueden conseguir en la siguiente generación o el número de grupos funcionales terminales por los que pueden sustituirse los grupos Cl;

R^1 representa un resto metilo o fenilo;

45 a3) opcionalmente, obtener un dendrímero carbosilano de segunda generación precursor de un dendrímero de una generación superior sometiendo el derivado con enlaces terminales Si-Cl obtenido en la etapa a2) a la repetición de las etapas a1) y a2), es decir,

i) obteniendo nuevas ramificaciones haciendo reaccionar el derivado correspondiente con enlaces terminales Si-Cl con $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_b\text{CH}=\text{CH}_2$, donde “b” varía entre 0 y 2, según la longitud que se desee para esas ramificaciones, y puede ser igual o diferente al índice “a”;

50 ii) haciendo reaccionar el esqueleto de dendrímero carbosilano de la nueva generación obtenido en i) con $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$, donde “n” varía entre 1 y 3 y puede ser igual o diferente al índice “m” de la generación anterior y R^2 representa un resto metilo o fenilo;

55 a4) opcionalmente, obtener dendrímeros carbosilanos de sucesivas generaciones precursores de dendrímeros de generaciones superiores sometiendo el derivado con enlaces terminales Si-Cl correspondiente a la generación anterior a la que se busca a la repetición de la etapa a3) i) utilizando un reactivo $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_c\text{CH}=\text{CH}_2$ y la repetición de la etapa a3) ii) utilizando un reactivo $\text{HSi}(\text{R}^3)_{3-z}\text{Cl}_z$, reactivos en los que “c” varía entre 0 y 2 y “z” varía entre 1 y 3;

60 a5) obtener el esqueleto de dendrímero carbosilano final al que van a añadirse en la etapa b) restos que contienen al menos un grupo amino utilizando en la etapa a2), a3) o en la repetición i-1 de la etapa a4), según sea el dendrímero de primera, de segunda o de una generación i, respectivamente, un reactivo $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-p}\text{Cl}_p$, donde “p” varía entre 1 y 3 y R^1 representa un resto metilo o fenilo.

65 b) obtener un dendrímero carbosilano con restos terminales con grupos aminos primarios, secundarios o terciarios siguiendo una de las siguientes vías:

ES 2 265 291 B1

b1) provocar la alcoholisis de enlaces terminales Si-Cl de un dendrímero carbosilano obtenido en la etapa a5) haciéndolo reaccionar con una alcohol-amina primaria, secundaria o terciaria en presencia de un exceso de una base;

b2) obtener previamente un dendrímero carbosilano con enlaces terminales Si-H al que posteriormente se unen los restos que contienen al menos un grupo amino primario, secundario o terciario, haciéndolo pasar por las etapas de:

i) obtener un derivado con enlaces terminales Si-H de un dendrímero carbosilano precursor de una generación cualquiera haciendo reaccionar el correspondiente dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl con un reactivo capaz de ceder grupos hidruro, de manera que parte o la totalidad de los átomos de Cl queden sustituidos por átomos de H;

ii) hacer reaccionar el dendrímero carbosilano con enlaces Si-H, en presencia de un catalizador de hidrosililación, con un compuesto que contiene un grupo amino primario, secundario o terciario y que posee un doble enlace carbono-carbono en un extremo, de forma que el compuesto quede unido al dendrímero por el extremo en el que se encontraba el doble enlace;

c) opcionalmente, obtener un dendrímero carbosilano con restos terminales con grupos amino cuaternizados mediante la reacción de un dendrímero obtenido en la etapa b) con un reactivo A-Hal, en el que A representa hidrógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o arilo y Hal representa Cl, Br, I.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, los índices a, b, ..., k correspondientes a los reactivos $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_a\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_b\text{CH}=\text{CH}_2$, ..., $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_k\text{CH}=\text{CH}_2$ son iguales entre sí y tienen el valor 0, por lo que el reactivo utilizado es el derivado vinílico $\text{BrMg}-\text{CH}=\text{CH}_2$ y las ramificaciones tienen una longitud de 2 carbonos.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, los índices a, b, ..., k correspondientes a los reactivos $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_a\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_b\text{CH}=\text{CH}_2$, ..., $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_k\text{CH}=\text{CH}_2$ son iguales entre sí y tienen el valor 1, por lo que el reactivo utilizado es el derivado alílico $\text{BrMg}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ y las ramificaciones tienen una longitud de 3 carbonos.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, los restos R^1 , R^2 , ..., R^i son todos iguales y corresponden a restos metilo.

En otra realización preferida de la invención, los índices n, m, ..., j correspondientes a los reactivos de fórmula general $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$, se eligen preferiblemente entre 1 y 2. En una realización particular de la anterior, el número de ramificaciones formadas en cada generación es siempre la misma e igual a 2, para lo cual el reactivo $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$, cuando se utiliza para crear un precursor que dé lugar a un dendrímero de una nueva generación, sería en todos los casos $\text{HSi}(\text{R}^2)_2\text{Cl}$, preferiblemente, $\text{HSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$, lo que corresponde a un valor de "n" de 1.

En la realización que más se prefiere de la invención, los restos R^1 , R^2 , ..., R^i son todos iguales y corresponden a restos metilo, mientras que los índices a, b, ..., k correspondientes a los reactivos $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_a\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_b\text{CH}=\text{CH}_2$, ..., $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_k\text{CH}=\text{CH}_2$ son iguales entre sí y tienen el valor 1, por lo que las ramas de los dendrímeros carbosilanos tendrían una longitud de 3 carbonos, y las ramificaciones creadas en cada nueva generación serían 2, para lo cual se utilizaría siempre $\text{HSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ para crear un precursor de una nueva generación. En cambio, cuando el reactivo $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$ se utiliza para dar lugar a un dendrímero carbosilano con enlaces terminales Si-Cl a partir del cual obtener un dendrímero carbosilano de la invención con grupos amino en las ramificaciones, se prefiere que el valor de "n" se elija entre 1 y 2, pudiendo utilizarse, por tanto, $\text{HSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ como $\text{HSi}(\text{CH}_3)\text{Cl}_2$ según se desee que el número de grupos terminales presentes por rama sea 1 ó 2, respectivamente.

En una realización de la invención, la alcohol-amina utilizada para obtener los dendrímeros carbosilano de la invención a partir de los correspondientes derivados con enlaces terminales Si-Cl se elige entre N,N-dimetiletanolamina ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2-[(2-dimetilaminoetil)metil]amino etanol ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) o 3,5-bis(dimetilaminoetoxi)bencilalcohol ($\text{CH}_2\text{OH}-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$). En una realización preferida de la anterior, el dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl se trata con la correspondiente cantidad estequiométrica de la alcohol-amina elegida, en éter dietílico y en presencia de un exceso de trietilamina, de manera que cada uno de los enlaces Si-Cl pase a ser un enlace Si-O por el que queda unido el resto correspondiente a la alcohol-amina utilizada. En otra realización de la invención, el dendrímero carbosilano obtenido a partir de una cualquiera de las alcohol-aminas anteriores se cuaterniza posteriormente tratándolo con CH_3I en éter dietílico.

En otra realización de la invención, el compuesto que contiene un grupo amino primario, secundario o terciario, que posee un doble enlace carbono-carbono en un extremo y que se hace reaccionar con un dendrímero carbosilano con enlaces Si-H es una alquilenamina primaria de fórmula $\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_e-\text{NH}_2$, en la que el índice "e" varía entre 0 y 2. En una realización preferida de la anterior, la alquilenamina primaria es aquella en la que el índice "e" vale 1, es decir, la alilamina, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$. En otra realización de la invención, el dendrímero carbosilano con restos terminales $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ obtenido por reacción con la alilamina se cuaterniza por adición de HCl en éter dietílico.

En realizaciones preferidas del método de la invención, los dendrímeros carbosilano con enlaces Si-H en sus extremos con los que se hacen reaccionar compuestos que contienen al menos un grupo amino primario, secundario o terciario y que poseen un doble enlace carbono-carbono en un extremo se obtienen en la etapa b2) i) utilizando LiAlH₄ como el reactivo capaz de ceder grupos hidruro que permite convertir parte o la totalidad de los enlaces Si-Cl en enlaces Si-H, aunque queda incluida dentro del alcance del método de la invención la utilización de reactivos análogos entre los que se puede citar NaH o NaBH₄. En dichas realizaciones preferidas, la unión de compuestos que contienen al menos un grupo amino primario, secundario o terciario por el extremo en el que poseen un doble enlace carbono-carbono se lleva a cabo utilizando el catalizador de Karstedt^[28] para catalizar la reacción, aunque queda incluida dentro del alcance del método de la invención la utilización de otros catalizadores de hidrosililación que permitan llevar a cabo la unión deseada como puede ser el catalizador de Spiers^[61,62].

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen los dendrímeros carbosilano de la invención. En una realización de la invención, la composición contiene al menos un dendrímero carbosilano de la invención junto con al menos otra molécula, aniónica o polianiónica. En una realización particular de la anterior, la molécula polianiónica es un oligodesoxirribonucleótido (ODN) o una molécula de ADN de doble cadena. En otra realización particular de la anterior, la molécula polianiónica es una molécula de ARN, monocatenaria o bicatenaria, que preferiblemente contiene regiones complementarias asociadas entre sí que permiten que dicho ARN pueda ser utilizado como ARN de interferencia (ARNi). En otra realización más, la molécula aniónica es un fármaco con tendencia a asociarse con las proteínas del plasma o de las membranas de las células que estén en contacto con él o susceptible de ser degradada por cualquiera de estas proteínas.

En una realización distinta de las anteriores, el dendrímero carbosilano está presente en la invención como sustancia activa con capacidad de interferir en el ciclo vital de microorganismos patógenos. En una realización particular de ésta, el patógeno es un virus, que puede ser el VIH. En otra realización particular, el microorganismo patógeno es una bacteria u hongo cuya membrana o pared celular es susceptible de ser alterada por dicho dendrímero.

En otra realización adicional, el dendrímero carbosilano está presente en la invención como sustancia activa con capacidad de interferir en la formación o facilitar la disolución de agregados proteicos implicados en el desarrollo de procesos patológicos tales como las encefalopatías provocadas por priones o procesos degenerativos como la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización más, distinta de las anteriores, un dendrímero carbosilano de la invención presente en una composición farmacéutica lleva unido a él un péptido o un resto antigénico cualquiera y está destinado a desencadenar una respuesta inmune que prevenga o proteja al individuo al que se le suministre frente a una enfermedad provocada por un organismo en el que esté presente dicho péptido o resto antigénico.

Los dendrímeros de la invención y las composiciones que los contienen pueden administrarse por vías de administración comunes, la iontoforesis, la vía transdérmica, la inyección o la inhalación. También son adecuados para formar películas para el recubrimiento de estructuras protésicas o mallas STENT para que desde las mismas se produzca la liberación controlada de al menos un dendrímero de la invención o de al menos una sustancia presente en la misma composición que dicho dendrímero.

En otro aspecto de la invención, los dendrímeros carbosilanos se utilizan para la fijación de moléculas de carácter aniónico o polianiónico a superficies. En una realización de la invención, las moléculas serían secuencias de ácidos nucleicos y las superficies a las que se fijan, las bases utilizadas para los microchips a los que se fijan secuencias de nucleóticos.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere al uso de los dendrímeros carbosilano de la invención como vehículos transportadores de sustancias aniónicas en la sangre que protegen a dichas sustancias de su interacción con proteínas del plasma o de las membranas de las células que están en contacto con él y que son capaces de unirse a dichas sustancias aniónicas o de degradarlas.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere al uso de los dendrímeros carbosilano de la invención como fármacos para aminorar o eliminar los síntomas de una enfermedad causada por un microorganismos con cuyo ciclo vital el dendrímero de la invención es capaz de interferir.

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a las siguientes figuras y los ejemplos expuestos en la sección de la descripción detallada de la invención.

60 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estructura de varios dendrímeros carbosilano de la invención con los restos amino sin cuaternizar: los sintetizados en los ejemplos 7, 11, 2, 5 en la Figura 1a y los sintetizados en los ejemplos 13 y 14 en la Figura 1b.

La Figura 2 muestra la estructura de varios dendrímeros carbosilano de la invención con los restos amino cuaternizados, los sintetizados en los ejemplos 22, 26, 19 y 27 en la Figura 2a y los sintetizados en los ejemplos 28 y 29 en la Figura 2b.

ES 2 265 291 B1

La Figura 3 muestra los geles de electroforesis de formación de complejos entre un ODN y los dendrímeros IM8 (con GF en el gel a y con distintos ODN en el gel b), CINH4 (c), NN y Phe (d) e IM16 (gel e, que también contiene muestras de IM8).

5 La Figura 4 muestra geles de electroforesis de complejos formados entre un ODN y los dendrímeros Phe, CINH4 (gel A), NN (gel B) e IM8 e IM16 (gel C) a distintos valores de pH.

La Figura 5 muestra la evolución de complejos de dendrímeros de la invención y el ODN PPT al permanecer en disolución acuosa 0, 6 ó 24 horas.

10

La Figura 6 muestra un gel de electroforesis de muestras de complejos de dendrímeros y el ODN TAR en presencia de albúmina y SDS. La parte de la izquierda es una tinción de las proteínas con azul Paragón y la parte derecha una fotografía de la tinción de las muestras de ADN con bromuro de etidio.

15

La Figura 7 muestra la evolución de muestras de dendrímeros de la invención y un ODN al ser incubadas en presencia de medio completo durante 40 minutos (40 min), 4 horas (4H) y 17 horas (17 H).

La Figura 8 muestra un gel de electroforesis de muestras de dendrímeros y ODN en presencia de suero humano. La parte izquierda muestra un foto obtenida con luz ultravioleta de muestras con ADN y la parte derecha muestra una tinción de las proteínas de ese gel con azul Paragón.

20

La Figura 9a muestra la tinción con bromuro de etidio de geles de electroforesis correspondientes a mezclas de dendrímeros y ODN tras 0 horas (0H), 4 horas (4H) y 24 horas (24H).

25

La Figura 9b muestra la tinción de proteínas del gel correspondiente a 4 horas cuya tinción con bromuro de etidio se muestra en la Figura 9a.

La Figura 10 muestra un gel de electroforesis de muestras de complejos entre el plásmido Nf-kappaB-luc y el dendrímero IM8.

30

La Figura 11 muestra un gel de electroforesis de pruebas de formación de complejos entre un ARNi y un dendrímero (IM8) de la invención.

35

La Figura 12 muestra un gráfico con los resultados de actividad mitocondrial para concentraciones 1, 5, 10, 20 y 100 μ M tras la incubación de células con los dendrímeros IM8, IM16, CINH4, NN, Phe y SF, que tienen su correspondiente barra para cada concentración colocada en el puesto que ocupa en la enumeración anterior.

40

La Figura 13 muestra un gráfico con los resultados de liberación de hemoglobina tras la incubación de hematíes con los dendrímeros IM8, IM16, NN, Phe y S, a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 μ M. Cada barra corresponde a un dendrímero, colocadas en el orden correspondiente a la enumeración anterior y cada grupo de barras corresponde a un concentración, ordenadas en orden creciente.

45

La Figura 14 muestra un gráfico con los porcentajes de mortalidad de células incubadas con distintos dendriplejos y dendrímeros de la invención y teñidas con Azul Tripán.

50

La Figura 15 muestra los resultados de una prueba de citometría de flujo en la que se comparaban los porcentajes de células con tamaño y complejidad correspondientes a células en apoptosis-necrosis con células vivas. En el X se representa el tamaño y en el eje Y la complejidad, correspondiendo la nube de células oscuras a células en apoptosis-necrosis. La parte A corresponde a células CMSP tratadas con dendrímeros CBS y la parte B a células CMSP tratadas con dendrímeros tipo PAMAM.

55

La Figura 16 muestra la representación de los porcentajes de células vivas y en apoptosis obtenidos tras las pruebas de citometría de flujo obtenidos en células CMSP tratadas con dendrímeros CMS (A) o con un dendrímero tipo PAMAM (B).

60

La Figura 17 muestra las tinciones con el colorante vital DAPI de células incubadas con: 1: Control; 2: ODN+IM8; 3: ODN+IM16; 4: ODN+SF; 5: ODN; 6: IM8; 7: IM16; 8: SF.

65

La Figura 18 muestra fotos tomadas tras 72 horas de incubación de células con IM8-ODN, a 0, 30, 60, 90, 120 y 150 segundos.

La Figura 19 muestra un gráfico con los resultados obtenidos en el contador de centelleo en un ensayo linfoproliferativo estimulando las células con distintos dendrímeros CBS, con PHA y con un control (C).

70

La Figura 20 muestra la localización celular de un ODN con el que se transfectaron CMSP tras: A: 1 horas; B: 3 horas; C: 24 horas.

ES 2 265 291 B1

La Figura 21 muestra el análisis de la fluorescencia presente en una célula que ha sido transfectada con un ODN. En la Figura 21 A se muestran en ordenadas los valores de fluorescencia que se van obteniendo en cada punto a lo largo de una línea que representa un corte medio en XY, correspondiendo el gráfico superior a la fluorescencia azul, el intermedio a la verde y el inferior a la roja. En la Figura 21 B se muestra un análisis similar de la fluorescencia tomando una región de interés (ROI) dibujada alrededor del núcleo en el que se analizan la fluorescencia azul (gráfico superior) y la fluorescencia verde (gráfico inferior).

La Figura 22 muestra el patrón de fluorescencia obtenido tras la transfección con PPT o dendriplejos de la invención. 1: Control; 2: PPT; 3: PPT+IM8; 4: PPT+NN; 5: PPT+Phe; 6: PPT+IM16.

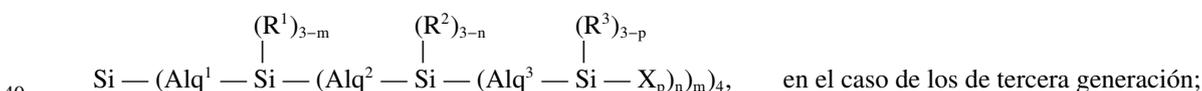
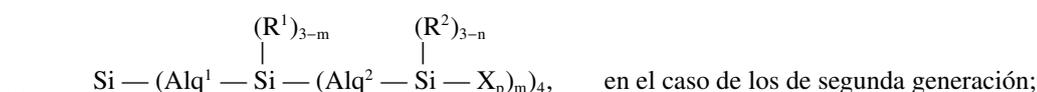
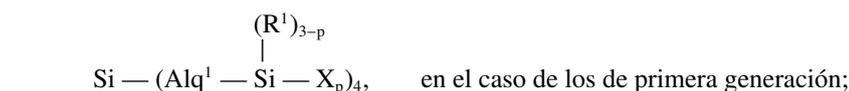
La Figura 23 muestra el patrón de fluorescencia obtenida tras la transfección con un dendriplejo de CIN4 y PPT.

La Figura 24 muestra el histograma de la fluorescencia en un plano medio en XY de una célula tratada con PPT+NN, en el que la gráfica superior muestra en ordenadas la intensidad de fluorescencia verde que se va encontrando a lo largo del plano, la gráfica intermedia es un análisis análogo correspondiente a la fluorescencia roja y la gráfica inferior muestra un análisis análogo correspondiente a la fluorescencia azul.

La Figura 25 muestra el gráfico obtenido calculando el número de copias de ADN del VIH en función del número de células con distintas concentraciones de dendrímero NN antes y después de la infección.

Descripción detallada de la invención

La invención describe nuevos dendrímeros carbosilano ramificados con grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios en los extremos de las ramificaciones que responden a las fórmulas:



y a las fórmulas análogas correspondientes en el caso de generaciones superiores, en las que la fórmula correspondiente a cada generación i resultaría de sustituir X_p en la fórmula correspondiente a la generación anterior por un nuevo bloque del tipo:



pasando el grupo unido al mismo átomo de silicio que este bloque sustitutorio de estar representado por $(\text{R}^{i-1})_{3-p}$ a estar representado por $(\text{R}^{i-1})_{3-z}$,

fórmulas en las que:

$\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ representan restos alqueno de 2 a 4 carbonos que se eligen independientemente unos de otros según la longitud de las ramificaciones en cada generación;

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \dots, \text{R}^{i-1}, \text{R}^i$ representan restos metilo o fenilo;

X representa un resto que contiene un grupo amino primario, secundario, terciario o cuaternario;

p es un número entero que varía entre 1 y 3;

m, n, \dots, z son números enteros que varían independientemente entre 1 y 3.

ES 2 265 291 B1

En la realización que más se prefiere de la invención, los restos $R^1, R^2, R^3, \dots, R^{i-1}, R^i$ son todos iguales y corresponden a restos metilo; los restos $Alq^1, Alq^2, Alq^3, \dots, Alq^i$ son iguales entre sí y corresponden a restos propileno y los números enteros m, n, \dots, j son iguales entre sí y tienen el valor 2. En esas condiciones, los dendrímeros que corresponden a esa realización de la invención también se pueden representar mediante la fórmula general $iG-(X_p)_m$, donde:

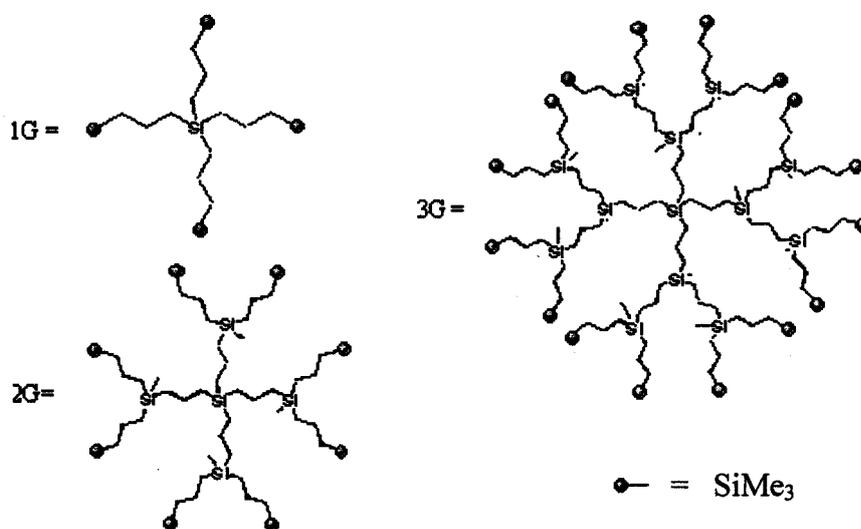
i: indica el número de la generación del dendrímero

X: indica la naturaleza de los grupos funcionales situados en la periferia del dendrímero

p: indica el número de grupos funcionales en cada rama

m: indica el número de grupos funcionales terminales en el dendrímero

G: representa el esqueleto carbosilano del dendrímero que, según la generación, correspondería a las fórmulas siguientes:



esqueletos en los que los extremos finales SiMe₃ (Me=CH₃) quedaría convertidos en SiMe₂X en la fórmula general del dendrímero en el caso de que “p” fuera igual a 1 y en SiMeX₂ en el caso de que “p” fuera igual a 2.

X representa cualquier resto que contenga una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria.

Tal como se utiliza en la invención, el término dendrímero se refiere a una macromolécula tridimensional de construcción arborescente.

El término “generación” se refiere al número de etapas iterativas que son necesarias para la preparación del dendrímero.

El término “dendrímero carbosilano” se refiere a una molécula dendrítica con un esqueleto carbosilano.

El término “hidrosililación” se refiere a la adición de enlaces Si-H a doble enlaces C=C.

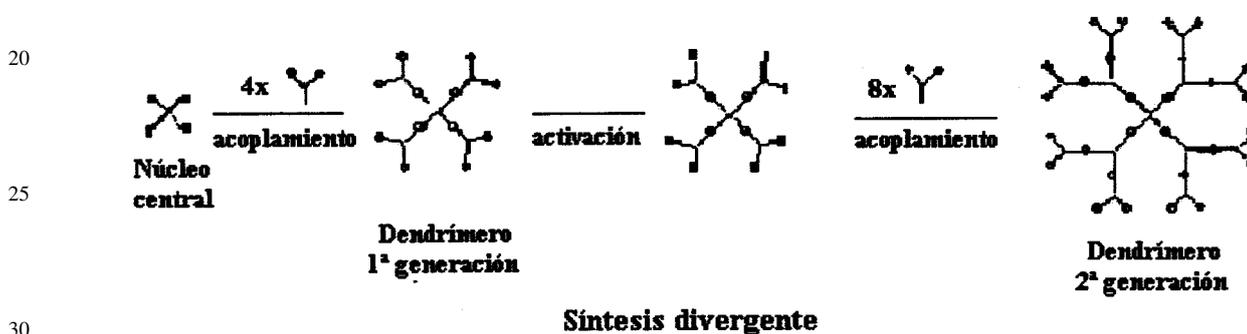
Tal como se utiliza en la invención, el término “resto antigénico” se refiere a un resto que está unido a una molécula y que es capaz de desencadenar una respuesta inmune en un individuo al que se le suministra la molécula que lleva unido ese resto.

Tal como se utiliza en la invención, el término “péptido” se refiere a una cadena lineal de dos o más aminoácidos que se van uniendo mediante la formación de un enlace tipo amido entre un grupo carboxilo de un aminoácido y un grupo amino del aminoácido contiguo.

Tal como se ha indicado previamente, la invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de los dendrímeros de la invención. Estos dendrímeros organosilano de generaciones diferentes se pueden preparar con rendimientos elevados usando reacciones bien conocidas, a través de procedimientos divergentes.^[25,42,43,44,45,46.] Estos

dendrimeros presentan una alta versatilidad que les confiere varias ventajas sobre otros derivados: i) es posible modificar la longitud de las ramas utilizando en el paso de metátesis derivados de Grignard vinílicos o alílicos; ii) es posible variar el número de ramificaciones de cada generación cambiando por ejemplo HSiCl_3 por $\text{HSiCH}_3\text{Cl}_2$; iii) es posible incorporar una gran variedad de grupos funcionales a la periferia del dendrimer. Además, los dendrimeros carbosilano presentan una gran inercia química, lo que es muy útil para el propósito adicional de esta invención de utilizarlos como vehículos para el transporte de moléculas amónicas (como los ODN y distintos fármacos aniónicos) en la sangre, su protección frente a la interacción con proteínas del plasma y su entrada en una célula para ejercer su acción.

Como se ha comentado, en una realización preferida de la invención las ramas de las distintas generaciones son todas iguales y son el resultado de la utilización del derivado alílico $\text{BrMg-CH}_2\text{-CH=CH}_2$, mientras que las ramificaciones obtenidas en cada generación son también las mismas en todos los casos e iguales a 2 por utilización de $\text{HSiCH}_3\text{Cl}_2$. En esas condiciones, el procedimiento de síntesis divergente utilizado para ir generando los distintos dendrimeros carbosilano precursores, podría esquematizarse, hasta la segunda generación, de la siguiente manera



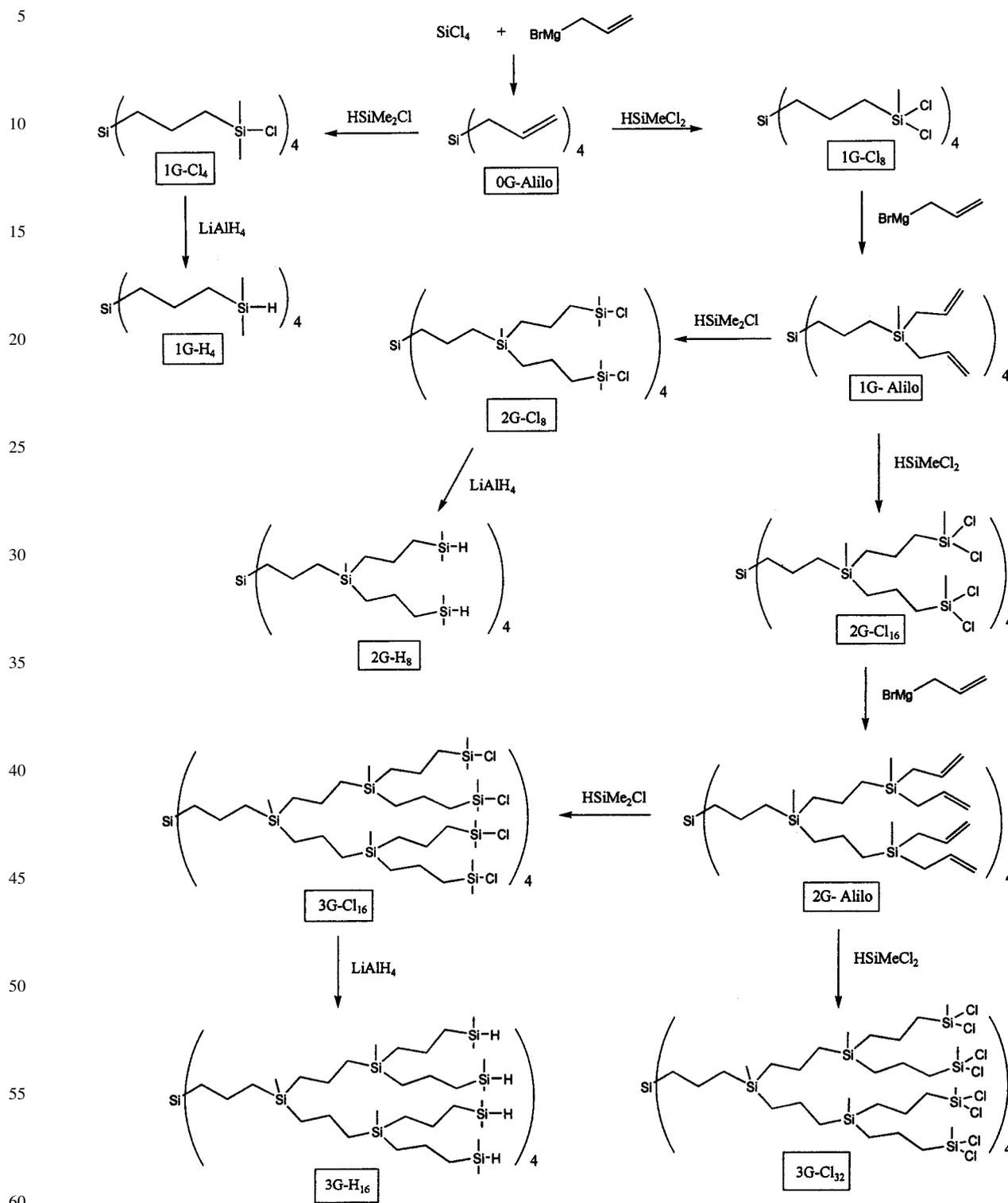
Una vez obtenido el esqueleto correspondiente al dendrimer precursor de la generación deseada, se procedería a obtener derivados con enlaces terminales Si-Cl o Si-H a partir de los cuales obtener los dendrimeros carbosilano con restos terminales que contienen grupos amino de la invención. El proceso detallado sería el siguiente:

Obtención de dendrimeros carbosilano con grupos amino terminales

El primer paso en la síntesis de estos derivados es la preparación de dendrimeros precursores que contienen enlaces terminales Si-Cl o Si-H. La síntesis de estos dendrimeros ha sido ya publicada^[25,42,43,44,45,46,] y se lleva a cabo con elevados rendimientos. En los ejemplos que se exponen más adelante en la presente memoria, se han crecido los dendrimeros hasta una tercera generación, pero la metodología para obtener dendrimeros de generaciones superiores es análoga, por lo que dichos dendrimeros de generaciones superiores y su procedimiento de preparación se incluyen igualmente en el alcance de la invención.

En el caso de la realización preferida de la invención, en la que las ramificaciones de cada generación son de igual tamaño y corresponden a cadenas de 3 carbonos y en la que se forman dos nuevas ramas en cada generación, dejando un metilo unido al átomo de Si en la cuarta valencia que quedaría por saturar, el esquema de reacciones que conduciría a la obtención de los distintos dendrimeros carbosilano precursores con enlaces terminales Si-Cl y Si-H vendría representado por el Esquema 1:

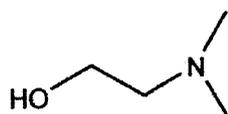
Esquema 1



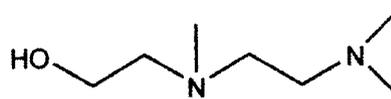
ES 2 265 291 B1

1. Ruta de la alcoholisis de enlaces Si-Cl

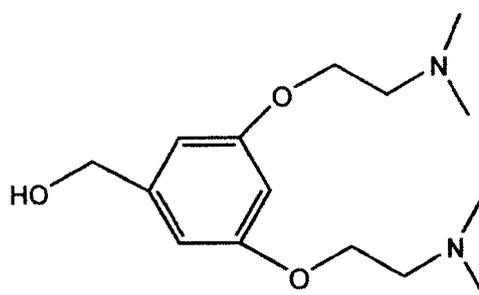
En este procedimiento se han empleado diferentes alcohol-aminas en presencia de una base como trietilamina añadida para retirar el cloruro de hidrógeno que se desprende en esta reacción. El término "alcohol-amina" se refiere a diferentes aminas que contienen una funcionalidad alcohólica, similares a los ejemplos que se describen mediante las siguientes fórmulas:



N,N-dimetiletanolamina



2-[(2-(dimetilaminoetil)metil]amino etanol

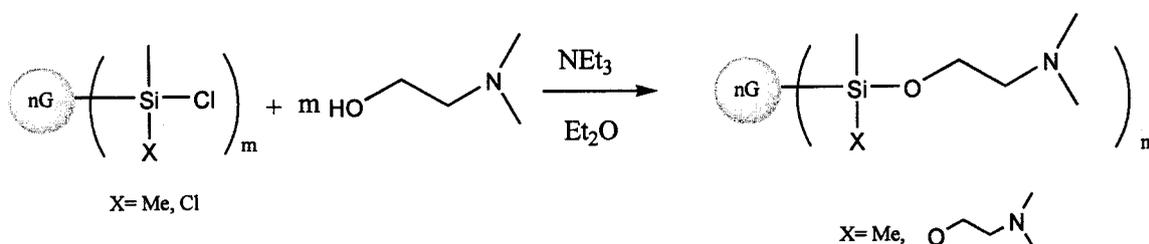


3,5-Bis(Dimetilaminoetoxi)bencilalcohol

En la presente invención, se prefiere la utilización de estas tres aminas, pero el procedimiento de la invención permite funcionalizar la periferia de un dendrímero con cualquier otra amina que tenga una funcionalidad alcohólica susceptible de llevar a cabo el proceso de alcoholisis que aquí se describe, la funcionalización con cualquiera de esas aminas y los dendrímeros carbosilano con funciones amino obtenidos se incluyen también en el alcance de la invención.

El tratamiento de los dendrímeros carbosilano que contienen enlaces terminales Si-Cl con la cantidad estequiométrica de N,N-dimetiletanolamina en éter dietílico y en presencia de un exceso de trietilamina conduce a la formación de los dendrímeros carbosilano con grupos amino terminales. De manera general, esta etapa se reproduce en el Esquema 2:

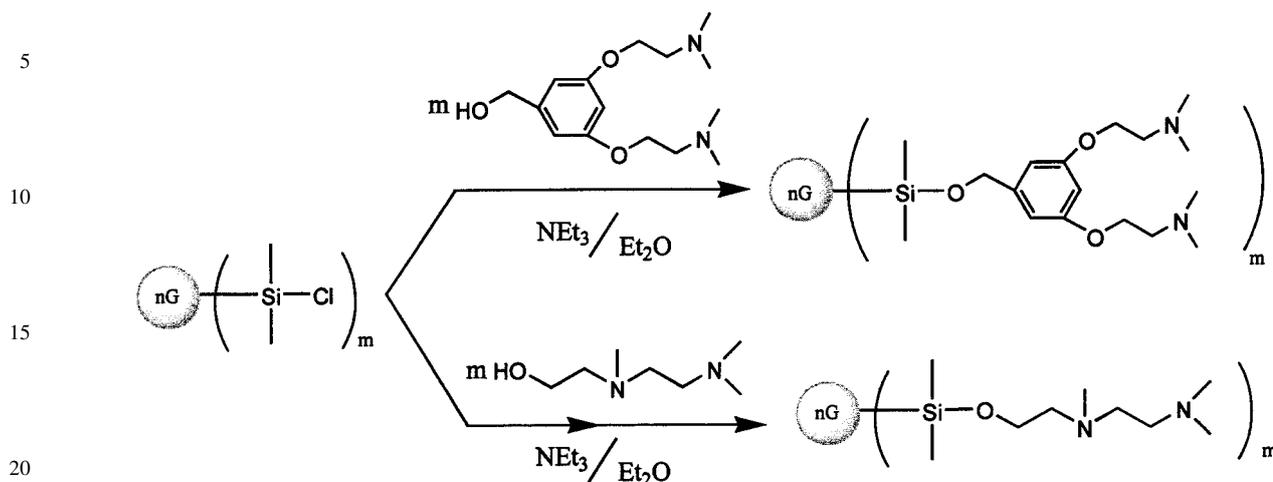
Esquema 2



La utilización de este esquema de reacción dio lugar a los compuestos 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₄] (1), 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₄ (2), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₈] (3), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₈ (4), 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₁₆] (5), 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₁₆ (6), cuyo proceso de síntesis se explica con mayor detalle en los ejemplos 1-6 que aparecen descritos posteriormente.

La sustitución de N,N-dimetiletanolamina por otros derivados alcohol amina 1 como 3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₃)CH₂OH ó Me₂NCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂OH conduce en una reacción similar a la descrita arriba a la preparación de los dendrímeros. Esta reacción se reproduce en el Esquema 3:

Esquema 3

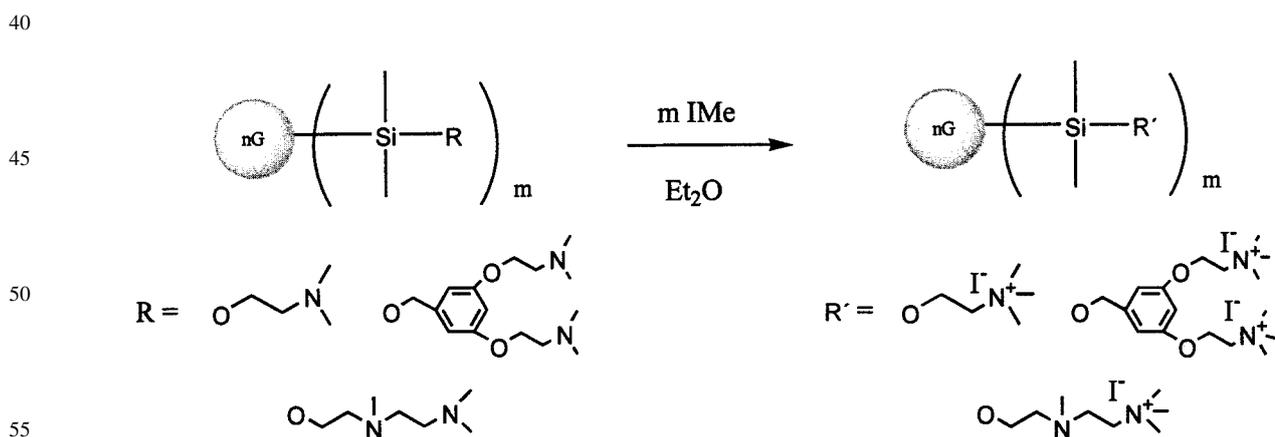


25 La utilización de este esquema de reacción dio lugar a los compuestos 1G-[Si(OCH₂-(C₆H₃)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₄] (7), 2G-[Si(OCH₂-(C₆H₃)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₈] (8), 3G-[Si(OCH₂-(C₆H₃)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₁₆] (9), 1G-[OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]₄ (10), 2G-[OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]₈ (11), 3G-[OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]₁₆ (12), cuyo proceso de síntesis se explica con mayor detalle en los ejemplos 1-6 que aparecen descritos posteriormente.

30 Cuaternización con MeI

35 Los intentos realizados para cuaternizar los grupos amino terminales de los dendrímeros 1-12 con la cantidad estequiométrica o un pequeño exceso de HCl no condujeron al resultado esperado, debido a la hidrólisis paulatina de los enlaces Si-O. Sin embargo, el tratamiento de estos dendrímeros con un exceso de MeI en éter dietílico produce de un modo cuantitativo la cuaternización de los grupos amino en unas pocas horas, causando la precipitación de las sales yodadas de los cationes amonio como sólidos higroscópicos de color blanco en altos rendimientos. Esta reacción se presenta en el Esquema 4:

Esquema 4



60 De esta manera se han aislado y caracterizado los dendrímeros que se relacionan a continuación 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₄] (16), 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₂]₄ (17), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₈] (18), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₂]₈ (19), 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₁₆] (20), 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₂]₁₆ (21), 1G-[Si(OCH₂-(C₆H₃)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₂)₄] (22), 2G-[Si(OCH₂-(C₆H₃)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₂)₈] (23), 3G-[Si(OCH₂-(C₆H₃)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₂)₁₆] (24), 1G-[Si(OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₄] (25), 2G-[Si(OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₈] (26), 3G-[Si(OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₁₆] (27).

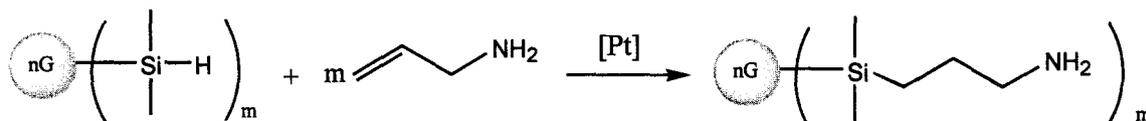
65 Su proceso de síntesis y de caracterización se detalla posteriormente en los Ejemplos 16 a 27 que aparecen descritos posteriormente. Los datos allí aportados muestran que para algunos de los dendrímeros de tercera generación, concretamente 21, 24 y 27, la cuaternización de los grupos dimetilamino no es completa: sólo en torno al 90% de los

grupos terminales de estos complejos han sido cuaternizados. Esto es así incluso en presencia de un exceso de MeI y dejando la reacción durante mayores períodos de tiempo.

2. Ruta de hidrosililación de enlaces terminales Si-H

El tratamiento de los dendrímeros carbosilano que contienen enlaces terminales Si-H con alilamina en presencia del catalizador de Karstedt^[28] conduce a la formación de los dendrímeros carbosilano con grupos amino terminales 1G-[CH₂CH₂CH₂NH₂]₄ (13), 2G-[CH₂CH₂CH₂NH₂]₈ (14), 3G-[CH₂CH₂CH₂NH₂]₁₆ (15) con rendimientos prácticamente cuantitativos. La reacción por la que se obtienen se muestra en el Esquema 5:

Esquema 5

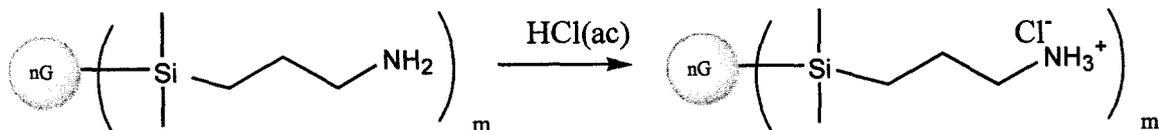


Estos dendrímeros son térmicamente estables y solubles en disolventes orgánicos. Su caracterización y pureza ha sido verificada por análisis elemental (H, C, N), espectroscopia de RMN (¹H, ¹³C y ²⁹Si) y espectrometría de masas (electrospray o MALDI-TOF MS). Su síntesis y caracterización se detallan en los Ejemplos 13 a 15 que aparecen descritos posteriormente.

Cuaternización con HCl

La cuaternización de los dendrímeros con grupos terminales -NH₂, 13-15, sí pudo ser realizada por adición de HCl (disolución 1M en Et₂O) en éter dietílico como disolvente (Esquema 6).

Esquema 6



Los derivados fónicos 1 G-[CH₂CH₂CH₂NH₃⁺Cl⁻]₄ (28), 2G-[CH₂CH₂CH₂NH₃⁺Cl⁻]₈ (29), 3G-[CH₂CH₂CH₂NH₃⁺Cl⁻]₁₆ (30) se obtuvieron siguiendo el mencionado Esquema 6 de reacción. Dichos compuestos precipitan como sólidos de color blanco y se purifican fácilmente por eliminación a vacío del disolvente y el exceso de HCl utilizado en la reacción.

Estos dendrímeros son térmicamente estables y solubles en DMSO, MeOH y H₂O. Su caracterización y pureza ha sido verificada, al igual que en los dendrímeros descritos anteriormente, por análisis elemental (H, C, N), espectroscopia de RMN (¹H, ¹³C y ²⁹Si) y espectrometría de masas (electrospray o MALDI-TOF MS).

Ejemplos de síntesis de dendrímeros carbosilano con grupos amino terminales

Debe entenderse que los ejemplos que se dan a continuación son sólo una ilustración del objetivo de esta invención y no suponen en modo alguno una limitación.

Los valores de las integrales de las señales en los espectros de RMN-¹H de los dendrímeros que se describen representan sólo la cuarta parte del número total de átomos de hidrógeno.

Ejemplos 1 a 12

Ejemplo 1

Síntesis de 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)]₄ (1)

A una disolución del dendrímero 1G-Cl₄ (0,85 g, 1,49 mmol) en éter (50 ml), se añadió un ligero exceso de NEt₃ (0,86 ml, 6,2 mmol) y N,N-dimetiletanolamina (0,6 ml, 5,97 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente, después se eliminó a vacío el exceso de NEt₃ y el disolvente dando lugar a un residuo que se extrajo con éter (30 ml). La suspensión resultante, se filtró con celite para eliminar la sal de

ES 2 265 291 B1

amonio $\text{NEt}_3 \cdot \text{HCl}$ generada en la reacción y el filtrado se llevó a sequedad dando lugar al compuesto 1 como un aceite amarillo pálido. (0,98 g, 84%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ 3,64 (2H, t, CH_2O), 2,40 (2H, t, CH_2N), 2,22 (6H, s, NMe_2), 1,31 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,60 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,53 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,067 (6H, s, OSiMe_2), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 61,5 (CH_2N), 60,8 (CH_2O), 46,1 (NMe_2), 21,3 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 18,1, 17,4 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), -1,7 (OSiMe_2). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 0,49 (G_0 -Si), 17,62 (G_1 -Si). Análisis elemental de $\text{C}_{36}\text{H}_{88}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}_5$: Calc.: C, 55,33; H, 11,35; N, 7,17. Obten.: C, 55,16; H, 11,22; N, 7,06.

10 Ejemplo 2

Síntesis de 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₄ (2)

El dendrímero de primera generación 2 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 1, partiendo de 1G-Cl₈ (0,54 g, 0,87 mmol), N,N-dimetiletanolamina dimetiletanolamina (0,7 ml, 6,94 mmol) y NEt_3 (1,0 ml, 7,2 mmol). De esta forma se obtuvo 2 como un aceite incoloro. (0,75 g, 80%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ 3,74 (4H, t, CH_2O), 2,43 (4H, t, CH_2N), 2,23 (12H, s, NMe_2), 1,31 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,63 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,52 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,09 (3H, s, OSiMe), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 61,4 (CH_2N), 60,7 (CH_2O), 46,2 (NMe_2), 18,7 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 17,7, 17,2 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), -4,4 (OSiMe). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 0,47 (G_0 -Si), -3,65 (G_1 -Si). Análisis elemental de $\text{C}_{48}\text{H}_{116}\text{N}_8\text{O}_8\text{Si}_5$: Calc.: C, 53,68; H, 10,89; N, 10,43. Obten.: C, 53,54; H, 11,33; N, 10,06. MALDI-TOFF-MS: m/z 1095,8 [M+H]⁺ (Calc, 1095,8).

25 Ejemplo 3

Síntesis de 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₈ (3)

El dendrímero de segunda generación 3 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 1, partiendo de 2G-Cl₈ (0,27 g, 0,18 mmol), N,N-dimetiletanolamina (0,15 ml, 1,47 mmol) y NEt_3 (0,25 ml, 1,79 mmol). De esta forma se obtuvo 3 como un aceite incoloro (0,31 g, 90%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ 3,64 (4H, t, CH_2O), 2,41 (4H, t, CH_2N), 2,23 (12H, s, NMe_2), 1,30 (6H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ solapados), 0,65 (4H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,53 (8H, m, resto de CH_2Si), 0,07 (12H, s, OSiMe_2), -0,09 (3H, s, SiMe). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 61,5 (CH_2N), 60,8 (CH_2O), 46,1 (NMe_2), 21,1 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 18,6-17,9 (resto de grupos $-\text{CH}_2-$), -1,9 (OSiMe_2), -4,9 (SiMe), $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 0,93 (G_1 -Si), 17,6 (G_2 -Si), G_0 -Si no se observa. Análisis elemental de $\text{C}_{88}\text{H}_{212}\text{N}_8\text{O}_8\text{Si}_{13}$. Calc.: C, 56,35; H, 11,39; N, 5,97. Obten.: C, 55,98; H, 11,20; N, 5,78.

40 Ejemplo 4

Síntesis de 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₈ (4)

El dendrímero de segunda generación 4 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 1, partiendo de 2G-Cl₁₆ (0,48 g, 0,30 mmol), N,N-dimetiletanolamina (0,48 ml, 4,77 mmol) y NEt_3 (0,7 ml, 5,02 mmol). De esta forma se obtuvo 3 como un aceite incoloro (0,66 g, 90%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ 3,75 (8H, t, CH_2O), 2,44 (8H, t, CH_2N), 2,24 (24H, s, NMe_2), 1,34 (6H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ solapados), 0,64 (4H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,51 (8H, m, resto de CH_2Si), 0,09 (6H, s, OSiMe), -0,10 (3H, s, SiMe). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 61,4 (CH_2N), 60,7 (CH_2O), 46,2 (NMe_2), 18,6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 17,7-17,0 (resto de grupos $-\text{CH}_2-$), -4,4 (OSiMe), -4,8 (SiMe). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 0,9 (G_1 -Si); -3,5 (G_2 -Si); G_0 -Si no se observa. Análisis elemental de $\text{C}_{112}\text{H}_{268}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{Si}_{13}$: Calc.: C, 54,67; H, 10,98; N, 9,11. Obten.: C, 54,20; H, 11,10,37; N, 9,59.

55 Ejemplo 5

Síntesis de 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₁₆ (5)

El dendrímero de tercera generación 5 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 1, partiendo de 3G-Cl₁₆ (0,20 g, 0,06 mmol), N,N-dimetiletanolamina (0,10 ml, 0,99 mmol) y NEt_3 (0,16 ml, 1,14 mmol). De esta forma se obtuvo 5 como un aceite amarillo pálido (0,18 g, 74%).

^1H -RMN (CDCl_3): δ 3,65 (8H, t, CH_2O), 2,42 (8H, t, CH_2N), 2,24 (24H, s, NMe_2), 1,23 (14H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ solapados), 0,64 (8H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0,53 (20H, m, resto de CH_2Si), 0,068 (24H, s, OSiMe_2), -0,10 (9H, s, SiMe). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 61,5 (CH_2N), 60,8 (CH_2O), 46,1 (NMe_2), 21,1 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 18,6-17,9 (resto de grupos $-\text{CH}_2-$), -1,82 (OSiMe_2), -4,8 (SiMe), $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 0,95 (G_2 -Si); 17,95 (G_3 -Si) G_0 -Si y G_1 -Si no se observan. Análisis elemental de $\text{C}_{198}\text{H}_{460}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{Si}_{29}$. Calc.: C, 56,74; H, 11,41; N, 5,51. Exp. %: C, 56,17; H, 11,28; N, 5,34.

ES 2 265 291 B1

Ejemplo 6

Síntesis de 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₁₆ (6)

5 El dendrímero de tercera generación 6 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 1, partiendo de 3G-Cl₃₂ (0,19 g, 0,05 mmol), N,N-dimetiletanolamina (0,17 ml, 1,68 mmol) y NEt₃ (0,24 ml, 1,79 mmol). De esta forma se obtuvo 6 como un aceite amarillo pálido (0,20 g, 72%).

10 ¹H-RMN (CDCl₃): δ 3,75 (16H, t, CH₂O), 2,44 (16H, t, CH₂N), 2,24 (48H, s, NMe₂), 1,32 (14H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si solapados), 0,66 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,53 (20H, m, resto de SiCH₂), 0,07 (12H, s, OSiMe), -0,10 (18H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 61,4 (CH₂N), 60,7 (CH₂O), 46,1 (NMe₂), 18,4-17,4 (resto de grupos -CH₂-), -4,7 (OSiMe₂), -5,2 (SiMe). Análisis elemental de C₂₄₀H₅₇₂N₃₂O₃₂Si₂₉. Calc.: C, 55,08; H, 11,02; N, 8,56. Obten.: C, 56,11; H, 11,89; N, 8,13.

15 Ejemplo 7

Síntesis de 1G-[Si(OCH₂-(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)]₄ (7)

20 A una disolución del dendrímero 1G-Cl₄ (0,11 g, 0,19 mmol) en éter (30 ml), se añadió un ligero exceso de NEt₃ (0,12 ml, 0,87 mmol) y 3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₅)-CH₂OH (0,22 g, 0,378 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente, después se eliminó a vacío el exceso de NEt₃ y el disolvente dando lugar a un residuo que se extrajo con éter (2 x 20 ml). La suspensión resultante, se filtró con celite para eliminar la sal de amonio NEt₃·HCl generada en la reacción y el filtrado se llevó a sequedad dando lugar al compuesto 7 como un aceite amarillo pálido (0,23 g, 80%).

25 ¹H-RMN (CDCl₃): δ 6,45 (2H, m, C₆H₅); 6,36 (1H, m, C₆H₅); 4,56 (2H, s, CH₂OSi); 3,99 (4H, t, CH₂O-C₆H₅); 2,66 (4H, t, CH₂N); 2,28 (12H, s, NMe₂); 1,33 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO); 0,68 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO); 0,55 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO); 0,08 (6H, s, SiMe₂). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 159,8 (C₆H₅, C_{ipso} unido a OCH₂CH₂NMe₂); 143,2 (C₆H₅, C_{ipso} unido a CH₂OSi); 104,9 y 100,2 (C₆H₅); 65,9 (CH₂O-C₆H₅); 64,6 (CH₂OSi); 30 58,2 (CH₂N); 45,8 (NMe₂), 21,2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); 17,9, 17,2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); -1,89 (SiMe₂). Análisis elemental de C₈₀H₁₄₈N₈O₁₂Si₅. Calc.: C, 61,81; H, 9,60; N, 7,21. Obten.: C, 62,10; H, 9,82; N, 7,3.

Ejemplo 8

35 Síntesis de 2G-[Si(OCH₂-(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)]₈ (8)

El dendrímero de segunda generación 8 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 7, partiendo de 2G-Cl₈ (0,27 g, 0,19 mmol); NEt₃ (0,22 mL, 1,62 mmol) y 3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₅)-CH₂OH (0,43 g, 1,52 mmol). De esta forma se obtuvo 8 como un aceite amarillo pálido (0,54 g; 82%).

40 ¹H-RMN(CDCl₃): δ 6,45 (4H, m, C₆H₅); 6,36 (2H, m, C₆H₅); 4,56 (4H, s, CH₂OSi); 3,99 (8H, t, CH₂O-C₆H₅); 2,67 (8H, t, CH₂N); 2,29 (24H, s, NMe₂); 1,33 (6H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,69 (4H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,55 (8H, m, CH₂ unidos a Si), 0,09 (12H, s, OSiMe₂), -0,09 (3H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN(CDCl₃): δ 159,0 (C₆H₅, C_{ipso} unido a OCH₂CH₂NMe₂); 143,3 (C₆H₅, C_{ipso} unido a CH₂OSi); 104,8 y 100,1 45 (C₆H₅); 65,9 (CH₂O-C₆H₅); 64,6 (CH₂OSi); 58,3 (CH₂NMe₂); 45,9 (NMe₂), 21,2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); 17,9, 17,2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO y señales solapadas de SiCH₂CH₂CH₂Si); -1,7 (OSiMe₂), -4,9 (SiMe). ²⁹Si{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 0,93 (G₁-Si), 18,7 (G₂-Si), G₀-Si no se observa. Análisis elemental de C₁₇₆H₃₃₂N₁₆O₂₄Si₁₃. Calc.: C, 61,78; H, 9,78; N, 6,55. Obten.: C, 62,51; H, 9,90; N, 6,75.

50 Ejemplo 9

Síntesis de 3G-[Si(OCH₂-(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)]₁₆ (9)

55 El dendrímero de tercera generación 9 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 7, partiendo de 3G-Cl₁₆ (0,072 g, 0,022 mmol); NEt₃ (0,060 ml, 0,43 mmol) y 3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₅)-CH₂OH (0,101 g, 0,358 mmol). De esta forma se obtuvo 9 como un aceite amarillo pálido (0,110 g; 69%).

60 ¹H-RMN(CDCl₃): δ 6,46 (8H, m, C₆H₅); 6,35 (4H, m, C₆H₅); 4,56 (8H, s, CH₂OSi); 3,97 (16H, t, CH₂O-C₆H₅); 2,67 (16H, t, CH₂N); 2,28 (48H, s, NMe₂); 1,33 (14H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,69 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,55 (18H, m, CH₂ unidos a Si), 0,09 (24H, s, OSiMe₂), -0,09 (9H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN(CDCl₃): δ 160,0 (C₆H₅, C_{ipso} unido a OCH₂CH₂NMe₂); 143,2 (C₆H₅, C_{ipso} unido a CH₂OSi); 104,3 y 100,8 65 (C₆H₅); 65,9 (CH₂O-C₆H₅); 64,6 (CH₂OSi); 58,3 (CH₂NMe₂); 45,8 (NMe₂), 21,1 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); 17,8, 17,2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO y señales solapadas de SiCH₂CH₂CH₂Si); -1,8 (OSiMe₂), -4,9 (SiMe). Análisis elemental de C₃₆₈H₇₀₀N₃₂O₄₈Si₂₉. Calc.: C, 61,76; H, 9,86; N, 6,26. Obten.: C, 62,43; H, 9,90; N, 6,80.

ES 2 265 291 B1

Ejemplo 10

Síntesis de 1G-[Si(O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂)]₄ (10)

5 A una disolución del dendrímero 1G-Cl₄ (0,31 g, 0,54 mmol) en éter (30 ml), se añadió un ligero exceso de NEt₃ (0,5 ml, 3,58 mmol) y 2-{{[2-dimetilamino]etil}metilamino}etanol (0,35 ml, 2,19 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante durante 12 h a temperatura ambiente, después se eliminó a vacío el exceso de NEt₃ y el disolvente dando lugar a un residuo que se extrajo con éter (2 x 20 mL). La suspensión resultante, se filtró con celite para eliminar la sal de amonio NEt₃·HCl generada en la reacción y el filtrado se llevó a sequedad dando lugar al compuesto 10 como un aceite incoloro (0,3 g, 57%).

¹H-RMN (CDCl₃): δ 3,64 (2H, t, CH₂O), 2,51 (4H, m, CH₂N(Me)), 2,35 (2H, t, CH₂N(Me)₂), 2,26 (3H, s, NMe), 2,19 (6H, s, NMe₂), 1,29 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,62 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,59 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,05 (6H, s, SiMe₂). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 60,8 (CH₂O), 59,9 y 56,2 (CH₂N(Me)CH₂), 57,5 (CH₂N(Me)₂), 45,9 (NMe₂), 43,3 (NMe), 21,2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17,8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17,2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), -2,0 (SiMe₂). ²⁹Si{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 0,49 (G₀-Si), 17,59 (G₁-Si). Análisis elemental de C₄₈H₁₁₆N₈O₄Si₅. Calc.: C, 57,09; H, 11,58; N, 11,10. Obten.: C, 57,60; H, 11,72; N, 11,20.

Ejemplo 11

Síntesis de 2G-[Si(O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂)]₈ (11)

10 El dendrímero de tercera generación 11 se preparó siguiendo un procedimiento, similar al descrito para 10, partiendo de 2G-Cl₈ (1,12 g, 0,77 mmol), NEt₃ (1 ml, 7,17 mmol) y 2-{{[2-dimetilamino]etil}metilamino}etanol (1 ml, 6,16 mmol). De esta forma se obtuvo 11 como un aceite amarillo pálido (1,3 g, 72%).

¹H-RMN (CDCl₃): δ 3,65 (4H, t, CH₂O), 2,51 (8H, m, CH₂N(Me)), 2,30 (4H, t, CH₂N(Me)₂), 2,26 (6H, s, NMe), 2,20 (12H, s, NMe₂), 1,31 (6H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,63 (4H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,59 (8H, m, SiCH₂), 0,06 (12H, s, SiMe₂), -0,10 (3H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 60,8 (CH₂O), 59,9 y 56,2 (CH₂N(Me)CH₂), 57,5 (CH₂N(Me)₂), 45,9 (NMe₂), 43,3 (NMe), 21,2 (CH₂SiO), 18,7-17,9 (SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), -1,79 (OSiMe₂), -4,8 (SiMe). ²⁹Si{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 0,38 (G₀-Si), 0,93 (G₁-Si), 17,58 (G₂-Si). Análisis elemental de C₁₁₂H₂₂₆N₁₆O₈Si₁₃. Calc.: C, 57,67; H, 11,58; N, 9,61. Obten.: C, 57,20; H, 11,40; N, 9,52

Ejemplo 12

Síntesis de 3G-[Si(O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂)]₁₆ (12)

35 El dendrímero de tercera generación 12 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 10, partiendo de 3G-Cl₁₆ (0,49 g, 0,152 mmol), NEt₃ (0,40 ml, 2,86 mmol) y 2-{{[2-Dimetilamino]etil}metilamino}etanol (0,39 ml, 2,43 mmol) De esta forma se obtuvo 12 como un aceite amarillo pálido (0,51 g, 67%).

¹H-RMN (CDCl₃): δ 3,65 (8H, t, CH₂O), 2,51 (16H, m, CH₂N(Me)), 2,36 (8H, t, -CH₂N(Me)₂), 2,26 (12H, s, NMe), 2,21 (24H, s, NMe₂), 1,30 (14H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,63 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,53 (18H, m, SiCH₂), 0,06 (24H, s, SiMe₂), -0,10 (9H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 60,8 (CH₂O), 60,0 y 56,2 (CH₂N(Me)CH₂), 57,4 (CH₂N(Me)₂), 45,9 (NMe₂), 43,3 (NMe), 21,1 (CH₂SiO), 18,7-17,8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), -1,9 (OSiMe₂), -4,8 (SiMe). ²⁹Si{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 0,93 (G₁-Si y G₂-Si), 17,58 (G₃-Si). Análisis elemental de C₂₄₀H₅₇₂N₃₂O₁₆Si₂₉. Calc.: C, 57,91; H, 11,58; N, 9,0 Obten.: C, 57,32; H, 11,38; N, 8,72.

50 Estos dendrímeros, se obtienen como productos aceitosos de color marrón claro en altos rendimientos. Todos ellos son solubles en disolventes orgánicos comunes e insolubles en agua.

55 Los datos espectroscópicos y analíticos de los derivados 1-12 son consistentes con las estructuras propuestas que se muestran en la Figura 1a. Así, las señales correspondientes al esqueleto carbosilano en los espectros de RMN-¹H de los dendrímeros anteriores presentan desplazamientos químicos casi idénticos para los núcleos análogos en las diferentes generaciones, aunque las señales se van haciendo más anchas y desestructuradas al ir aumentando la generación del dendrímero. Estas características se han atribuido a dos factores principalmente: la estructura tipo polímero de estos derivados, que confiere a los núcleos en las diferentes generaciones diferencias muy ligeras en su entorno químico y la restricción de la movilidad de los protones respectivos en las capas más externas al aumentar la generación.^[26]

60 Estos espectros muestran tres grupos de señales que se asignan a los grupos metileno. En las ramas SiCH₂CH₂CH₂Si, los grupos metileno centrales se observan a 1,30 ppm, mientras que los grupos metileno unidos directamente a los átomos de silicio se localizan a 0,61 y 0,51 ppm. Se asignó la señal centrada a 0,61 ppm a los grupos CH₂SiO-, mientras que la señal centrada a 0,51 ppm se atribuye al resto de grupos metileno, basándose en el aumento de la integral de esta última señal al ir aumentando la generación del dendrímero y en experimentos 1D ¹H-TOCSY y NOESY. En los espectros de RMN de ¹³C los grupos metileno de las ramas interiores SiCH₂CH₂CH₂Si presentan señales en el rango 21,3-17,4 ppm. La asignación completa de estas señales se hizo con la ayuda de experimentos HMQC. Finalmente los fragmentos -SiMe₂- y -SiMe- son fácilmente distinguibles en todos los

ES 2 265 291 B1

derivados y generaciones. Los espectros de RMN de ^{29}Si están igualmente de acuerdo con la formulación propuesta, si bien en estos espectros los átomos de silicio más internos solamente son observados en los dendrímeros de primera generación.

5 Respecto a la caracterización de los grupos terminales de estos dendrímeros, aquí se describe a modo de ejemplo la caracterización de estos grupos en los derivados 1-6. La caracterización en el resto de compuestos se ha hecho de una manera similar y los datos relativos a cada uno de ellos se encuentran reflejados en la parte experimental de este trabajo.

10 En los dendrímeros 1-6, para el fragmento externo $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$ se observa un triplete localizado a 3,64 (para los dendrímeros 1, 3 y 5) y 3,74 (para los dendrímeros 2, 4 y 6) que se asigna a los grupos $-\text{OCH}_2-$ y otro triplete centrado a 2,43 ppm en todos los casos correspondiente a los grupos $-\text{CH}_2\text{N}-$. El desplazamiento a campo bajo observado en la señal correspondiente a los grupos $-\text{OCH}_2-$ en los dendrímeros 2, 4 y 6 es consistente con la presencia de dos átomos de oxígeno unidos al átomo de silicio en estos derivados, aunque este efecto es imperceptible para los grupos $-\text{CH}_2\text{N}-$. Los grupos metilo unidos a nitrógeno aparecen en todos los casos a 2,23 y 46,1 ppm en RMN de ^1H y ^{13}C respectivamente.

La caracterización de estos compuestos se completó con espectrometría de masas (electrospray o MALDI-TOF MS) usando 1,8,9-trihidroxiantraceno (ditranol) como matriz. Sin embargo, los picos moleculares no pudieron ser observados para las segundas y terceras generaciones, hecho que también ha sido descrito para otros muchos dendrímeros de peso molecular elevado.^[27,46-49]

Ejemplos 13 a 15

25 Ejemplo 13

Síntesis de 1G-[Si(CH₂)₃NH₂]₄ (13)

30 A una disolución del dendrímero 1G-H₄ (0,54 g, 1,23 mmol) en la mínima cantidad de THF (1 ml) se le añadió alilamina (1,5 ml, 19,99 mmol) y dos gotas del catalizador de Karstedt (3-3,5% Pt). La mezcla de reacción se calentó a 120°C en una ampolla de vacío durante 4 h, la mezcla de reacción se llevó a sequedad para eliminar el disolvente y el exceso de alilamina, el residuo resultante se disolvió en CH_2Cl_2 y se filtró con celite y carbón activo. La disolución obtenida se llevó a sequedad por eliminación del disolvente a vacío, dando lugar al compuesto 13 como un aceite incoloro (0,90 g; 83%). La estructura de este dendrímero se representa en la Figura 1b.

35 ^1H -RMN (CDCl_3): δ 2,63 (2H, t, CH_2N), 1,34 (4H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1,13 (2H, s, NH_2), 0,54-0,44 (8H, m, CH_2 unidos a Si), -0,06 (6H, s, SiMe_2), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 45,7 (CH_2N), 28,3 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20,2, 18,6, 17,6, ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 12,4 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), -3,3 (SiMe_2). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 0,50 ($\text{G}_0\text{-Si}$), 1,96 ($\text{G}_1\text{-Si}$). Análisis elemental de $\text{C}_{32}\text{H}_{80}\text{N}_4\text{Si}_5$. Calc.: C, 58,14; H, 12,21; N, 8,48. Obten.: C, 57,63; H, 12,27; N, 8,78. Electrospray MS: m/z $z=1$ 661,25 uma $[\text{M}+\text{H}]^+$. (Calc. 661,52 uma).

Ejemplo 14

45 *Síntesis de 2G-[Si(CH₂)₃NH₂]₈ (14)*

El dendrímero de segunda generación 14 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 13, partiendo de 2G-H₈ (0,42 g, 0,36 mmol), alilamina (2 ml, 26,7 mmol), 1 ml de THF y dos gotas del catalizador de Karstedt. De esta forma se obtuvo 14 como un aceite incoloro (0,32 g, 55%). La estructura de este dendrímero se representa en la Figura 1b.

55 ^1H -RMN (CDCl_3): δ 2,63 (4H, t, CH_2N), 1,41-1,28 (6H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 0,54-0,44 (20H, m, CH_2 unidos a Si), -0,06 (12H, s, SiMe_2), -0,10 (3H, s, SiMe), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 45,7 (CH_2N), 28,4 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20,2, 18,6, 17,6, ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 12,5 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), -3,1 (SiMe_2), -4,8 (SiMe). $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ -RMN (CDCl_3): δ 0,92 ($\text{G}_1\text{-Si}$); 2,00 ($\text{G}_2\text{-Si}$). Análisis elemental de $\text{C}_{80}\text{H}_{196}\text{N}_8\text{Si}_{13}$. Calc.: C, 58,75; H, 12,08; N, 6,85. Obten.: C, 58,16; H, 11,95; N, 6,58. Electrospray MS: m/z $z=1$ no se observa, para $z=2$ ($m/z + 1$) 818,44 uma $[\text{M}+\text{H}]^+$. (Calc. $Z=2$ 818,8 uma).

Ejemplo 15

Síntesis de 3G-[Si(CH₂)₃NH₂]₁₆ (15)

65 El dendrímero de tercera generación 15 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 13, partiendo de 3G-H₁₆ (0,100 g, 0,037 mmol), alilamina (2 ml, 26,7 mmol), 1 ml de THF y dos gotas del catalizador de Karstedt. De esta forma se obtuvo 15 como un aceite incoloro (0,085 g, 64%).

ES 2 265 291 B1

¹H-RMN (CDCl₃): δ 2,63 (8H, t, CH₂N), 1,41-1,28 (22H, m, SiCH₂CH₂CH₂Si y SiCH₂CH₂CH₂N), 0,54-0,44 (36H, m, CH₂ unidos a Si), -0,06 (24H, s, SiMe₂), -0,10 (9H, s, SiMe), ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 45,7 (CH₂N), 28,4 (SiCH₂CH₂CH₂N), 20,2, 18,6, 17,6, (Si SiCH₂CH₂CH₂Si), 12,5 (SiCH₂CH₂CH₂N), -3,1 (SiMe₂), -4,8 (SiMe). ²⁹Si{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 0,92 (G1-Si y G2-Si); 2,00 (G3-Si). Análisis elemental de C₁₇₆H₄₂₈N₁₆Si₂₉. Calc.: C, 58,98; H, 12,04; N, 6,25. Obten.: C, 58,06; H, 11,84; N, 6,48.

Ejemplos 16 a 27

10 Ejemplo 16

Síntesis de 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)]₁₄ (16)

15 Sobre una disolución de 1 (0,12 g, 0,15 mmol) en éter (10 ml) se añadieron 0,4 ml de una disolución 2 M en éter de MeI (0,8 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación constante durante 48 h a temperatura ambiente, después, se llevó a sequedad para eliminar el exceso de MeI. El residuo resultante se lavó con Et₂O (2 x 5 ml) y se secó a vacío para obtener el compuesto 16 como un sólido de color blanco (0,20 g, 96%).

20 ¹H-RMN (DMSO): δ 3,94 (2H, m, CH₂O), 3,43 (2H, m, CH₂N), 3,09 (9H, s, NMe₃⁺), 1,29 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,66 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,56 (2H, m, CH₂Si), 0,11 (6H, s, OSiMe₂). ¹³C{¹H}-RMN (DMSO): δ 65,8 (CH₂N), 55,8 (CH₂O), 52,6 (NMe₃⁺), 19,7 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 16,9, 16,1 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), -2,6 (OSiMe₂). Análisis elemental de C₄₀H₁₀₀N₄O₄Si₅I₄. Calc.: C, 35,61; H, 7,47; N, 4,15. Obten.: C, 36,67; H, 7,65; N, 4,42.

25 Ejemplo 17

Síntesis de 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)]₄ (17)

30 El dendrímero de primera generación 17 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 2 (0,17 g, 0,16 mmol) y 0,80 ml de una disolución 2M en éter de MeI (1,6 mmol). De esta forma se obtuvo 17 como un sólido de color blanco (0,29 g, 86%).

35 ¹H-RMN(DMSO): δ 4,12 (4H, m, CH₂O), 3,54 (4H, m, CH₂N), 3,17 (18H, s, NMe₃⁺), 1,29 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,75 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,54 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,20 (3H, s, OSiMe). ¹³C{¹H}-RMN (DMSO): δ 65,8 (CH₂N), 56,0 (CH₂O), 52,7 (NMe₃⁺), 17,3 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 16,5, 15,9 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), -5,3 (OSiMe). Análisis elemental de C₅₆H₁₄₀N₈O₈Si₅I₈. Calc.: C, 30,44; H, 6,39; N, 5,07. Obten.: C, 31,47; H, 6,47; N, 5,19.

40 Ejemplo 18

Síntesis de 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)]₈ (18)

45 El dendrímero de segunda generación 18 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 3 (0,25 g, 0,13 mmol) y 0,6 ml de una disolución 2M en éter de MeI (1,2 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 18 como un sólido de color blanco (0,35 g, 87%).

50 ¹H-RMN(DMSO): δ 3,96 (4H, m, CH₂O), 3,45 (4H, m, CH₂N), 3,11 (18H, s, NMe₃⁺), 1,29 (6H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,65 (4H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,52 (8H, m, resto de SiCH₂), 0,11 (12H, s, OSiMe₂), -0,10 (3H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN(DMSO): δ 65,7 (CH₂N), 55,9 (CH₂O), 52,6 (NMe₃⁺), 19,7, 17,5, 16,9 y señales solapadas (resto de grupos -CH₂-), -2,5 (OSiMe₂), -5,3 (SiMe). Análisis elemental de C₉₆H₂₃₆N₈O₈Si₁₃I₈. Calc.: C, 38,29; H, 7,9; N, 3,72. Obten.: C, 38,87; H, 8,32; N, 3,79.

55 Ejemplo 19

Síntesis de 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)]₈ (19)

60 El dendrímero de segunda generación 19 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 4 (0,10 g, 0,04 mmol) y 0,5 ml de una disolución 2M en éter de MeI (1,0 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 19 como un sólido de color blanco (0,17 g, 87%).

65 ¹H-RMN (DMSO): δ (ppm) 4,13 (8H, m, CH₂O), 3,56 (8H, m, CH₂N), 3,19 (36H, s, NMe₃⁺), 1,28 (6H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,72 (4H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,55 (8H, m, resto de SiCH₂), 0,21 (6H, s, OSiMe), -0,08 (3H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN (DMSO): δ 65,7 (CH₂N), 56,0 (CH₂O), 52,7 (NMe₃⁺), 19,2, 17,2, 16,4 y señales solapadas (resto de grupos -CH₂-), -5,2 (OSiMe), -5,6 (SiMe). Análisis elemental de C₁₂₈H₃₁₆N₁₆O₁₆Si₁₃I₁₆. Calc.: C, 32,49; H, 6,73; N, 4,74. Obten.: C, 33,32; H, 7,03; N, 4,72.

ES 2 265 291 B1

Ejemplo 20

Síntesis de 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺Γ)]₁₆ (20)

5 El dendrímero de tercera generación 20 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 5 (0,12 g, 0,03 mmol) y 0,4 ml de una disolución 2 M en éter de MeI (0,8 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 20 como un sólido de color blanco (0,16 g, 83%).

10 ¹H-RMN (DMSO): δ 3,96 (8H, m, CH₂O), 3,47 (8H, m, CH₂N), 3,13 (36H, s, NMe₃⁺), 1,28 (14H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,65 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,52 (20H, m, resto de SiCH₂), 0,10 (24H, s, OSiMe₂), -0,08 (9H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN(DMSO): δ 65,8 (CH₂N), 55,9 (CH₂O), 52,6 (NMe₃⁺), 19,7, 17,2, 16,0 y señales solapadas (resto de grupos -CH₂-), -2,7 (OSiMe₂), -5,5 (SiMe). Análisis elemental de C₉₆H₂₃₆N₈O₈Si₁₃I₈. Calc.: C, 39,43; H, 8,08; N, 3,54. Obten.: C, 39,19; H, 8,19; N, 3,68.

15 Ejemplo 21

Identificación de 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺Γ)]₁₆ (21)

20 El dendrímero de tercera generación 21 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 6 (0,060 g, 0,012 mmol) y 0,2 ml de una disolución 2M en éter de MeI (0,4 mmol). El espectro de ¹H-RMN presenta señales anchas e indica que aproximadamente el 90% de los grupos amino terminales ha sido cuatemizado, por lo que el compuesto 21 no se aísla puro.

25 ¹H-RMN (DMSO): δ 4,16 (16H, m, OCH₂), 3,60 (16H, m, CH₂N), 3,22 (72H, s, NMe₃⁺I⁻), 1,27 (14H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,52 (26H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y resto de grupos -CH₂-), 0,07 (24H, s ancho, SiMe₂), la señal correspondiente a SiMe no se observa porque aparece solapada con la señal anterior.

Ejemplo 22

30 *Síntesis de 1G-[Si(OCH₂-(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₃⁺Γ)]₄ (22)*

El dendrímero de primera generación 22 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 7 (0,1 g, 0,06 mmol) y 0,35 ml de una disolución 2 M en éter de MeI (0,7 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 22 como un sólido de color blanco (0,14 g, 90%).

35 ¹H-RMN (DMSO): δ 6,55 (3H, m, C₆H₅); 4,58 (2H, s, CH₂OSi); 4,42 (4H, t, CH₂O-C₆H₅); 3,77 (4H, t, CH₂N); 3,18 (18H, s, NMe₃⁺); 1,35 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,70 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,57 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,08 (6H, s, SiMe₂). ¹³C{¹H}-RMN (DMSO): δ 157,8 (C₆H₅, C_{ipso} unido a OCH₂CH₂NMe₂); 143,2 (C₆H₅, C_{ipso} unido a CH₂OSi); 104,9 y 99,6 (C₆H₅); 63,5 (CH₂NMe₂); 63,0 (CH₂OSi); 61,3 (CH₂O-C₆H₅); 40 52,7 (+NMe₃), 19,9 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); 16,9, 16,1 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); -2,4 (SiMe₂). Análisis elemental de C₈₈H₁₇₂I₈N₈O₁₂Si₅. Calc.: C, 39,29; H, 6,44; N, 4,17. Obten.: C, 38,90; H, 6,24; N, 4,09.

Ejemplo 23

45 *Síntesis de 2G-[Si(OCH₂-(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₃⁺Γ)]₈ 23*

El dendrímero de segunda generación 23 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 8 (0,08 g, 0,023 mmol) y 0,20 ml de una disolución 2 M en éter de MeI (0,4 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 23 como un sólido de color blanco (0,11 g, 85%).

50 ¹H-RMN (DMSO): δ 6,58 (6H, m, C₆H₅); 4,58 (4H, s, CH₂OSi); 4,44 (8H, t, CH₂O-C₆H₅); 3,79 (8H, t, CH₂N); 3,20 (30H, s, NMe₃⁺); 1,33 (6H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,67 (4H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,54 (8H, m, CH₂ unidos a Si), 0,07 (12H, s, OSiMe₂), -0,07 (3H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN (DMSO): δ 157,9(C₆H₅, C_{ipso} unido a OCH₂CH₂NMe₂); 143,2 (C₆H₅, C_{ipso} unido a CH₂OSi); 105,2 y 99,6 (C₆H₅); 63,5 (CH₂NMe₂); 63,0 (CH₂OSi); 55 61,4 (CH₂O-C₆H₅); 52,7 (NMe₃⁺), 19,8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); 17,5, 16,8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO y señales solapadas de y SiCH₂CH₂CH₂Si); -2,4 (OSiMe₂); -5,5 (SiMe). Análisis elemental de C₁₉₂H₃₈₀I₁₆N₁₆O₂₄Si₁₃. Calc.: C, 40,51; H, 6,73; N, 3,94. Obten.: C, 41,20; H, 7,02; N, 4,10.

Ejemplo 24

60 *Síntesis de 3G-[Si(OCH₂-(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₃⁺Γ)]₁₆ (24)*

El dendrímero de tercera generación 24 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 9 (0,084 g, 0,012 mmol) y 0,25 ml de una disolución 2M en éter de MeI (0,5 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 24 como un sólido de color blanco (0,080 g, 72%).

65 ¹H-RMN (DMSO): δ 6,57 (12H, m, C₆H₅); 4,58 (8H, s, CH₂OSi); 4,44 (16H, t, CH₂O-C₆H₅); 3,78 (16H, t, CH₂N); 2,28 (72H, s, NMe₃⁺); 1,33 (14H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,69 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,55

ES 2 265 291 B1

(18H, m, CH₂ unidos a Si), 0,08 (24H, s, OSiMe₂), -0,08 (9H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN(CDCl₃): δ 158,0 (C₆H₃, C_{ipso} unido a OCH₂CH₂NMe₂); 143,2 (C₆H₃, C_{ipso} unido a CH₂OSi); 104,9 y 100,12 (C₆H₃); 63,4 (CH₂O-C₆H₃); 63 (CH₂OSi); 61,4; (CH₂NMe₂); 52,7 (NMe₃⁺), 19,9 (SiCH₂CH₂CH₂SiO); 17,5, 16,8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO y señales solapadas de SiCH₂CH₂CH₂Si); -2,3 (OSiMe₂), -5,5 (SiMe). Análisis elemental de C₃₈₄H₇₄₈I₁₆N₃₂O₄₈Si₂₉. Calc.: C, 48,92; H, 8; N, 4,75. Obten.: C, 47,60; H, 7,02; N, 4,35.

Ejemplo 25

Identificación de 1G-[-O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₃⁺I]₄ (25)

10

El dendrímero de primera generación 25 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 10 (0,043 g, 0,047 mmoles) y 0,094 ml de una disolución 2M en éter de MeI (0,188 mmoles). De esta forma se obtuvo el compuesto 25 como un sólido de color blanco. Este compuesto no se aísla puro, observándose mezclas debidas a un proceso de cuaternización no selectivo en el que pueden participar ambos átomos de nitrógeno, si bien, el compuesto 25 es el componente mayoritario de esta mezcla.

15

¹H-RMN (DMSO): δ 3,98 (2H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,60 (2H, t, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,42 (2H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,11 (9H, s, NMe₃⁺I⁻), 2,76 (2H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 2,21 (3H, s, NMe), 1,30 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,61 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,53 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,04 (6H, s, SiMe₂). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 64,8 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 61,0 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 59,5 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 58,3 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 52,2 (NMe₃⁺t), 41,3 (NMe), 20,0 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 16,9 y 16,1 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), -2,5 (SiMe₂).

25

Ejemplo 26

Identificación de 2G-[-O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₃⁺I]₈ (26)

30

El dendrímero de segunda generación 26 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 11 (0,19 g, 0,08 mmol) y 0,34 ml de una disolución 2M en éter de MeI (0,68 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 26 como un sólido de color amarillo pálido. Este compuesto no se aísla puro, observándose mezclas debidas a un proceso de cuaternización no selectivo en el que pueden participar ambos átomos de nitrógeno, si bien, el compuesto 26 es el componente mayoritario de esta mezcla.

35

¹H-RMN (DMSO): δ 4,02 (4H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,60 (4H, t, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,42 (4H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,11 (18H, s, NMe₃⁺I⁻), 2,76 (4H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 2,21 (6H, s, NMe), 1,30 (4H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,59 (4H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0,51 (8H, m, resto de grupos -CH₂-), 0,03 (12H, s, SiMe₂), -0,11 (3H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 64,9 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 61,0 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 59,6 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 58,3 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 52,3 (NMe₃⁺I⁻), 41,3 (NMe), 20,0-16,8 (grupos -CH₂- del esqueleto carbosilano), -2,5(SiMe₂), -5,5 (SiMe).

40

Ejemplo 27

Identificación de 3G-[Si(O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₃⁺I)]₁₆ 27

45

El dendrímero de tercera generación 27 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 16, partiendo de 20 (0,084 g, 0,017 mmol) y 0,13 ml de una disolución 2M en éter de MeI (0,27 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 26 como un sólido de color amarillo pálido. Este compuesto no se aísla puro, observándose mezclas debidas a un proceso de cuaternización no selectivo en el que pueden participar ambos átomos de nitrógeno, si bien, el compuesto 27 es el componente mayoritario de esta mezcla.

50

¹H-RMN (DMSO): δ 3,99 (8H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,60 (8H, t, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,44 (8H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 3,12 (36H, s, NMe₃⁺I⁻), 2,76 (8H, m, OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 2,22 (12H, s, NMe), 1,28 (14H, m, SiCH₂CH₂CH₂SiO y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0,51 (26H, m, SiCH₂CH₂CH₂Si O y resto de grupos -CH₂-), 0,03 (24H, s, SiMe₂), -0,11 (9H, s, SiMe). ¹³C{¹H}-RMN (CDCl₃): δ 64,9 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 61,0 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 59,6 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 58,3 (OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₃⁺I⁻), 52,3 (NMe₃⁺I⁻), 41,3 (NMe), 20,0-16,8 (grupos -CH₂- del esqueleto carbosilano), -2,5 (SiMe₂), -5,5 (SiMe).

60

En el caso de los dendrímeros de tercera generación 21, 24 y 27 la cuaternización de los grupos dimetilamino no es completa como demuestran los espectros de RMN de ¹H, a partir de los cuales se puede estimar de una forma aproximada que sólo en torno al 90% de los grupos dimetilamino terminales en estos complejos han sido cuaternizados, incluso en presencia de exceso de MeI y dejando la reacción durante mayores periodos de tiempo.

65

Todos estos derivados iónicos son insolubles en los disolventes orgánicos habituales, pero solubles en DMSO, MeOH y H₂O.

ES 2 265 291 B1

Los datos espectroscópicos y analíticos de los derivados 16-27 son consistentes con las estructuras propuestas que se muestran en la Figura 2a. Las señales que aparecen en los espectros de RMN de ^1H de estos derivados, realizados en DMSO como disolvente a temperatura ambiente, son más anchas que las de sus precursores en disolventes orgánicos comunes. Este hecho ha sido descrito previamente para otros dendrímeros carbosilano solubles en agua y se ha explicado como un efecto de ensanchamiento dipolar como consecuencia de la disminución de la movilidad en agua de estos dendrímeros predominantemente hidrofóbicos.^[29]

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los dendrímeros 16-27 presentan para el esqueleto carbosilano patrones de resonancia idénticos a los de sus precursores 1-12, aunque se observa un aumento en el ensanchamiento de las señales al aumentar la generación.

Al igual que en los dendrímeros con grupos amino terminales, para estos derivados, aquí se describe detalladamente la asignación de las señales de los grupos exteriores sólo para los derivados 16-21, habiéndose realizado la asignación en el resto de derivados de una forma similar.

Los grupos exteriores $\text{SiOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-$, dan lugar a dos multipletes anchos centrados en 3.94 (para los dendrímeros 16, 18 y 20) ó 4.12 (para los dendrímeros 17, 19 y 21) asignable a los protones metilénicos de los grupos $-\text{OCH}_2-$, y 3.45 (para los dendrímeros 16, 18 y 20) ó 3.56 (para los dendrímeros 17, 19 y 21) que se asignan a los protones del fragmento $-\text{CH}_2\text{N}-$. La cuaternización de los grupos amina produce un desplazamiento a campo bajo de 0.3-0.4 ppm en la señal de $-\text{OCH}_2-$, mientras que los protones metileno de los grupos $-\text{CH}_2\text{N}-$ se desplazan en 1 ppm aproximadamente. Los grupos metilo directamente unidos a nitrógeno dan señales en RMN de ^1H y ^{13}C centradas a 3.18 y 52.6 ppm respectivamente, lo que supone un desplazamiento a campo bajo respecto de las señales observadas en los dendrímeros terminados en grupos amina 1-6. Estas variaciones están de acuerdo con la presencia de una carga positiva sobre el átomo de nitrógeno en los dendrímeros terminados en grupos amonio 16-21.

Ejemplos 28 a 30

Ejemplo 28

Síntesis de $G_1[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+\text{Cl}^-]_4$ (28)

A una disolución del compuesto 13 (0,17 g, 0,26 mmol) en 40 ml de Et_2O se le añadieron 1,2 ml (1,2 mmol) de una disolución 1M de HCl en Et_2O . La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación constante durante 2h tras las cuales se observa la aparición de un precipitado de color blanco. El disolvente y el exceso de HCl es eliminado a vacío y de esta forma se obtuvo 28 como un sólido blanco con un rendimiento cuantitativo. La estructura de este dendrímero se representa en la Figura 2b.

^1H -RMN (D_2O): δ 2,74 (2H,t, CH_2N), 1,45 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,19 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0,38 (6H, t, CH_2Si), -0,19 (6H, s, SiMe_2). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (D_2O): δ 42,0 (CH_2N), 21,3 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 18,8, 18,0, 16,6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 11,2 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), -4,4 (SiMe_2). Análisis elemental de $\text{C}_{32}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{Cl}_4\text{Si}_5$. Calc.: C, 47,61; H, 10,49; N, 6,94. Obten.: C, 48,57; H, 10,46; N, 6,82.

Ejemplo 29

Síntesis de $2G-[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+\text{Cl}^-]_8$ (29)

El dendrímero de segunda generación 29 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 28, partiendo de 14 (0,09 g, 0,05 mmol) y 0,6 ml de una disolución 1 M en éter de HCl (0,06 mmol). De esta forma se obtuvo el compuesto 29 como un sólido de color amarillo pálido (0,06 g; 55%). La estructura de este dendrímero se representa en la Figura 2b.

^1H -RMN (D_2O): δ 2,74 (2H, t, CH_2N), 1,47 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,16 (4H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0,38 (16H, t, CH_2Si), -0,19 (6H, s, SiMe_2), -0,22 (3H, s, SiMe). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN (D_2O): δ 42,0 (CH_2N), 21,8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,5-17,0 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 12,01 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,23 (SiMe_2), -4,2 (SiMe_2). Análisis elemental de $\text{C}_{80}\text{H}_{204}\text{N}_8\text{C}_{18}\text{Si}_{13}$. Calc.: C, 49,86; H, 10,67; N, 5,81. Obten.: C, 49,79; H, 10,18; N, 5,76.

Ejemplo 30

Síntesis de $3G-[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+\text{Cl}^-]_{16}$ (30)

El dendrímero de tercera generación 30 se preparó siguiendo un procedimiento similar al descrito para 28, partiendo de 15 (0,060 g, 0,018 mmol), y 0,30 ml de una disolución 1M en éter de HCl (0,30 mmol). De esta forma se obtuvo 30 como un sólido de color amarillo pálido (0,054 g, 78%).

ES 2 265 291 B1

^1H -RMN (D_2O): δ 2,74 (8H, t, CH_2N), 1,45 (8H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,20 (14H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$) 0,39 (36H, m, CH_2 unidos a Si), -0,19 (24H, s, SiMe_2), -0,10 (9H, s, SiMe), ^{13}C { ^1H }-RMN (CDCl_3): δ 42,0 (CH_2N), 21,3 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 18,9, 17,9, 16,5, ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 11,3 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), -4,4 (SiMe_2), -4,8 (SiMe). Análisis elemental de $\text{C}_{176}\text{H}_{444}\text{N}_{16}\text{Si}_{29}$. Calc.: C, 55,44; H, 11,74; N, 5,88. Obten.: C, 56,16; H, 11,98; N, 6,01.

5

Estudios de biocompatibilidad de los nuevos dendrímeros, caracterización de la unión a polianiones y proteínas plasmáticas y comportamiento biológico de los dendruplejos

10 Como se ha señalado anteriormente, uno de los aspectos de la invención lo constituyen composiciones farmacéu-
ticas que contienen al menos un dendrímero de la invención, bien junto a otra(s) sustancia(s) de carácter amónico y de
interés farmacéutico a la(s) que acompaña como vehículo para facilitar su transporte en la corriente sanguínea hasta
las células dianas en las que ha(n) de ejercer su efecto, protegiéndola(s) de la interacción con proteínas del plasma a
las que podría quedar unido o que podrían afectar a su estabilidad, bien como sustancia activa con capacidad de
15 interaccionar con el ciclo vital de un microorganismo causante de una enfermedad cuyos efectos se pretenden prevenir,
reducir o eliminar mediante uno o más de un dendrímero de la invención. En una de las realizaciones preferidas de
ese aspecto de la invención, la(s) molécula(s) de carácter aniónico a la(s) que uno o más dendrímeros de la invención
sirven de vehículo de transporte es un oligodesoxinucleótido (ODN), preferiblemente un ODN antisentido, o bien
una molécula de ADN bicatenario de longitud superior o de un ARN de interferencia. También son aspectos de la
20 invención el uso de algún dendrímero de la invención o de composiciones que los contengan para prevenir o tratar
enfermedades, provocadas por agentes patógenos o por fallo de genes.

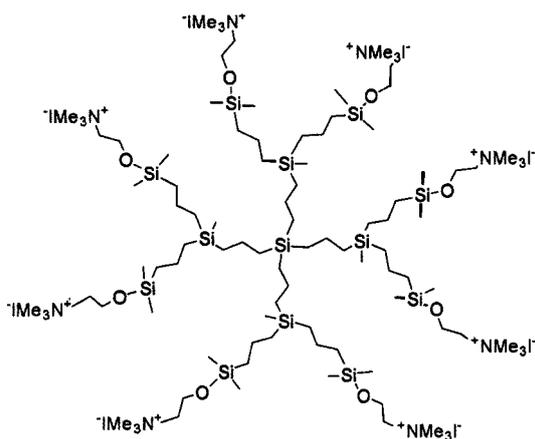
Por todo ello, se decidió ensayar la biocompatibilidad de los nuevos dendrímeros propuestos, caracterizar su unión
a polianiones y proteínas plasmáticas y analizar el comportamiento biológico de los complejos tipo dendruplejo for-
25 mados entre los dendrímeros de la invención y los polianiones elegidos. Los dendrímeros que se seleccionaron para
realizar estas pruebas fueron:

Dendrímeros

30

IM8:

35 $2\text{G}-[\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T})]_8$ (18)
Pm= 3011 g/mol
positivas



40

45

50

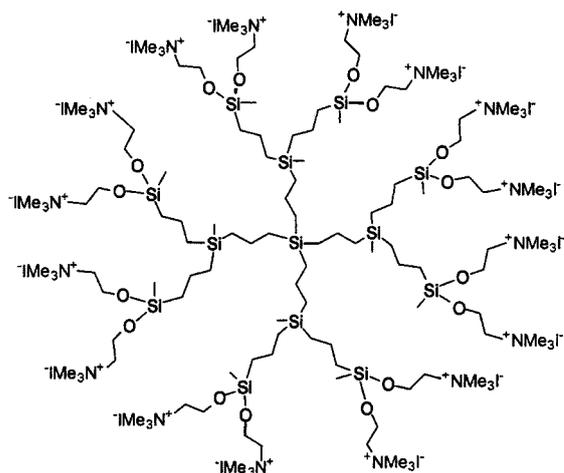
55

60

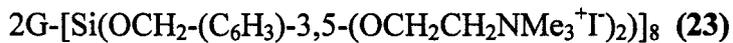
65

IM16:

35 $2\text{G}-[\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T})_2]_8$ (19)
Pm= 4731,59 g/mol
16 cargas positivas

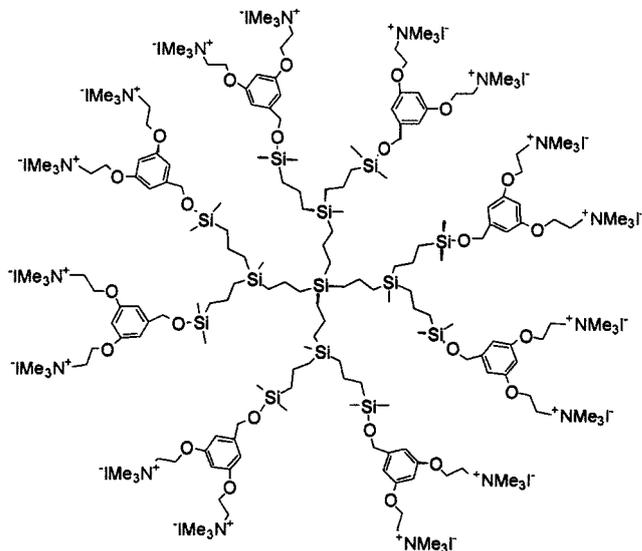


Phe:



Pm= 5692,80 g/mol

16 cargas positivas

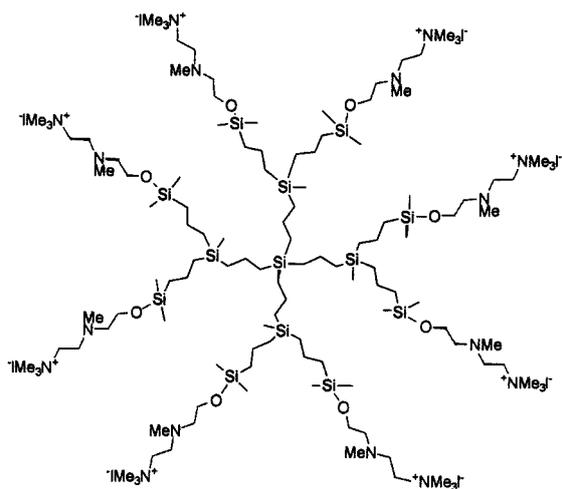


NN:



Pm= 3468,08 g/mol

positivas

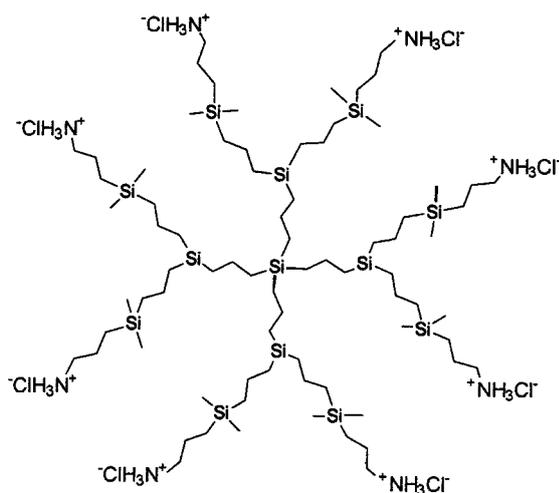


CINH4:

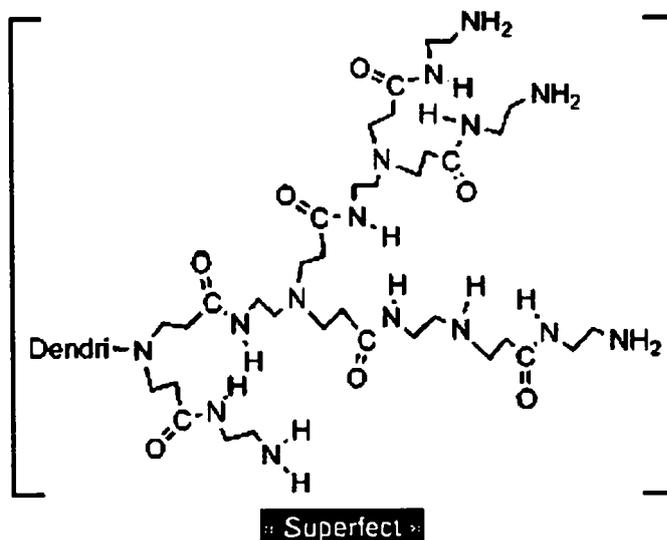


Pm 1927,6 g/mol

8 cargas
8 cargas positivas



SF (Superfect®) (dendrímtero PAMAM activado, Qiagen, Crawley, GB)
 140 grupos aminos terminales
 PM= 35,000



G4: (dendrímtero PAMAM de 4^a generación; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)
 140 grupos amino terminales
 PM= 14,215

Los dos últimos, Superfect y G4, son dendrímteros PAMAM comerciales que se utilizaron a título comparativo con respecto a los dendrímteros carboxilano de la invención.

Propiedades físico-químicas de los CBS: Solubilidad en agua

Todos los dendrímteros carboxilano de la invención son solubles en agua a la concentración utilizada para las disoluciones de partida (2 mg/ml) mediante una ligera agitación, sin ser necesario calentamiento.

Para realizar los experimentos, todos los CBS utilizados se resuspendieron a esa concentración de partida (2 µg/µl ≅ 2 mg/ml).

Ejemplo 31

Formación de complejos entre los CBS y ODN

ODN utilizados

Las secuencias oligonucleotídicas utilizadas eran secuencias antisentido (complementarias) dirigidas contra diferentes ARN del VIH. La longitud variaba desde 15 a 28 bases, siendo de naturaleza fosforotioato. Los ODN concretos utilizados y sus secuencias se muestran a continuación en la Tabla 1.

ES 2 265 291 B1

TABLA 1
ODN utilizados

Nombre	Secuencias antisentido 5'-3'	Número de bases	Pm gr/mol
A) GF (anti-gag)	CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT (SEQ ID NO: 1)	25	8112,5
B) RF (anti-Rev)	TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGCCA (SEQ ID NO: 2)	28	9086,0
C) PPT (antiARNm)	AATTTTCTTTTCCCCCT (SEQ ID NO: 3)	18	5841,0
D) PPT-TFO (Formador de triple hélice)	TTTTCTTTTGGGGGG (SEQ ID NO: 4)	15	4867,5
E) TAR (anti-TAR)	GCTCCCGGGCTCGACC (SEQ ID NO: 5)	16	5192,0

Varios de los ODN se utilizaron fluoresceinados en el extremo 5'. Esto se indica añadiendo la letra F a su notación. Así, "GF" hace referencia al ODN anti-gag fluoresceinado en el extremo 5', mientras que "RF" hace referencia al ODN anti-Rev fluoresceinado en el extremo 5'.

Todos los ODN utilizados se resuspendieron a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Visualización de los complejos en geles de agarosa

Se conocía el uso de geles de agarosa para el estudio de la formación de complejos entre los dendrímeros de tipo PAMAM y ADN plasmídico o en forma de ODN mediante el marcaje isotópico de los mismos. Basándose en este tipo de aproximaciones, se intentó desarrollar geles que permitieran estudiar esta propiedad sin la utilización a ser posible de isótopos radiactivos.

Se ensayaron diferentes concentraciones de agarosa para evidenciar la migración del ODN y de los dendrímeros, teniendo en cuenta el pequeño tamaño de los ODN utilizados. Finalmente, se optó por una concentración de agarosa del 3% en TAE 1x como la mejor. Se comparó la migración de los ODNs no fluoresceinados frente a la de los fluoresceinados, migrando los dos a la misma altura pero aumentando estos últimos la señal percibida de forma considerable. Utilizándolos, se evitó así el marcaje isotópico del ODN. Para la elaboración de estos geles se fabricó un doble pocillo, para permitir volúmenes de carga de 60 μl , de los que 50 μl eran volumen de mezcla de las muestras en RPMI y 10 μl tampón de carga con glicerol. Como marcador de tamaño se utilizó una escalera de 100 pares de bases (Gibco BRL®).

Formación de complejos

Para la formación de los complejos en todos los ensayos realizados, tanto sobre geles como sobre células se tomó como base la relación entre el número de cargas positivas y negativas en dicho complejo. Según han publicado diferentes autores en estudios con dendrímeros PAMAM, es necesario que el complejo formado presente un exceso de carga positiva para facilitar su unión a las glicoproteínas de la membrana celular, cargadas de forma negativa, iniciándose así el proceso de endocitosis. Así mismo, se añadía un exceso de carga positiva para asegurar la formación del complejo dendrímero-ADN. Por ello, los complejos entre los dendrímeros CBS y los diferentes ácidos nucleicos se formaron en exceso de número de cargas positivas (aportadas por el CBS) frente a negativas (aportadas por el ODN). No obstante, se probaron diferentes ratios de carga, haciendo los cálculos en base al número de cargas del dendrímero (fijas) y el número de cargas negativas del ODN (fijas también). El ratio 2/1 de cargas positivas/negativas se fijó como el suficiente en todos los dendrímeros para formar los complejos con una carga total resultante positiva, aunque en algunos experimentos se aportó un balance de igual número de cargas negativas que positivas o de exceso de cargas negativas.

Para el SF se utilizó el ratio de carga propuesto por el fabricante y para el G4 PAMAM se utilizó un exceso molar de 100 a 1 en favor del dendrímero tipo PAMAM, según lo propuesto por Sato *et al* (Clin Cancer Res 2001 Nov; 7 (11):3606-12).

En todos los ensayos se utilizó un volumen de formación de complejo de 60 μl , utilizando como soporte medio sin suero RPMI con rojo fenol.

ES 2 265 291 B1

Electroforesis de los complejos formados

Se realizaron ensayos de formación de complejos con los dendrímeros de la invención IM8, CINH₄, NN, Phe e IM16.

Los resultados de las electroforesis efectuadas con las muestras resultantes de la mezcla de distintos ODN y los diferentes dendrímeros se muestran en la Figura 3. Las muestras cargadas en los diferentes geles que aparecen en ellas son las siguientes:

IM8

- Figura 3a. Formación de complejos entre el IM8 y el ODN GF. Las muestras sometidas a electroforesis fueron las siguientes:

Calle 1: escalera de 100 pb

Calle 2: 4 μ l GF+ 4,52 μ l IM8+ 91,48 μ l RPMI (+/-)=2/1

Calle 3: 4 μ l GF+ 9,03 μ l IM8+ 86,97 μ l RPMI (+/-)=4/1

Calle 4: 4 μ l GF+ 45,2 μ l IM8+ 50,8 μ l RPMI (+/-)=20/1

Calle 5: 4 μ l GF+ 90,4 μ l IM8+ 5,6 μ l RPMI (+/-)=40/1

Calle 6: 4 μ l GF+ 96 RPMI

Calle 7: 4,52 μ l IM8+ 95,48 μ l RPMI

Calle 8: 9,03 μ l IM8+ 90,97 μ l RPMI

Calle 9: 45,2 μ l IM8+ 54,8 μ l RPMI

Calle 10: 90,4 μ l IM8+ 9,6 μ l RPMI

Los resultados de la electroforesis muestran que el IM8 es capaz de retener el ADN. Cuanta mayor relación de carga, más migra el complejo hacia el polo negativo, hasta llegar a un límite en el cual por más que se aumente la carga positiva (la cantidad de dendrímero) ya no migra más arriba (probablemente ya todas las moléculas de ADN están formando complejo con el CBS-IM8 o bien porque el tamaño del poro del gel no se lo permite).

- Figura 3b: Electroforesis de muestras con IM8 y ODNs de distintos tamaños (relación de carga 2/1). Las muestras sometidas a electroforesis fueron las siguientes:

Calle 1: escalera 100 bp

Calle 2: RF: 4,5 μ l+ 56 μ l RPMI

Calle 3: RF: 4,5 μ l + 5,3 μ l IM8+ 50 μ l RPMI

Calle 4: PPT 3 μ l + 57 μ l RPMI

Calle 5: PPT 3 μ l + 3,4 μ l IM8+ 54 μ l RPMI

Calle 6: PPT-TFO 2,5 μ l + 58 μ l RPMI

Calle 7: PPT-TFO 2,5 μ l + 2,8 μ l IM8+ 55 μ l RPMI

Calle 8: TAR 2,6 μ l + 57 μ l RPMI

Calle 9: TAR 2,6 μ l + 3 μ l IM8 + 55 μ l RPMI

- Los resultados de la electroforesis muestran que el IM8 fue capaz de retener la migración de todos los ODN. Esto supone un primer indicio de que la longitud de los ODNs no es determinante para la formación del complejo.

ES 2 265 291 B1

CINH4

- Figura 3c. Formación de complejos entre el CINH4 y el ODN RF. Las muestras sometidas a electroforesis fueron las siguientes:

5 Calle 1: Control de RPMI

Calle 2: RF 4,5 μ l + 3,3 μ l CINH4 + 52 μ l RPMI (+/-)= 2

10 Calle 3: RF 4,51 μ l + 55 μ l RPMI

Calle 4: RF 2,25 μ l + 3,3 μ l CINH4 + 55 μ l RPMI (+/-)= 4

Calle 5: RF 2,25 μ l + 58 μ l RPMI

15 Calle 6: RF 1,28 μ l + 3,3 μ l CINH4 + 56 μ l RPMI (+/-)= 7

Calle 7: RF 1,28 μ l + 58 μ l RPMI

20 Calle 8: 3,3 μ l CINH4 + 57 μ l RPMI

Calle 9: Escalera 100 pb

25 Según los resultados obtenidos, el CINH4 es capaz de retener el ADN también con todas las relaciones de carga evaluados.

NN y Phe

30 - Figura 3d. Formación de complejos entre el ODN RF y los dendrímeros NN o Phe. Las muestras sometidas a electroforesis fueron las siguientes:

Calle 1: 4,5 μ l RF + 6 μ l G2 NN + 50 μ l RPMI (+/-)= 2

35 Calle 2: 4,5 μ l RF + 21 μ l G2 NN + 35 μ l RPMI (+/-)= 7

Calle 3: 1,3 μ l RF + 6 μ l G2 NN + 53 μ l RPMI (+/-)= 7

40 Calle 4: 2,25 μ l RF + 3 μ l G2 NN + 55 μ l RPMI (+/-)= 2

Calle 5: 2,25 μ l RF + 10,5 μ l G2 NN + 48 μ l RPMI (+/-)= 7

Calle 6: 0,64 μ l RF + 3 μ l G2 NN + 56 μ l RPMI (+/-)= 7

45 Calle 7: 2,25 μ l RF + 57 μ l RPMI

Calle 8: 4,5 μ l RF + 5 μ l G2 Phe + 55 μ l RPMI (+/-)= 2

50 Calle 9: 4,5 μ l RF + 17,5 μ l G2 Phe + 38 μ l RPMI (+/-)= 7

Calle 10: 1,3 μ l RF + 5 μ l G2 Phe + 54 μ l RPMI (+/-)= 7

Calle 11: 2,25 μ l RF + 2,5 μ l G2 Phe + 55 μ l RPMI (+/-)= 2

55 Calle 12: 2,25 μ l RF + 8,75 μ l G2 Phe + 50 μ l RPMI (+/-)= 7

Calle 13: 0,64 μ l RF + 2,5 μ l G2 Phe + 57 μ l RPMI (+/-)= 7

60 Los resultados de esta electroforesis demuestran también que tanto el NN como el Phe son capaces de formar complejos también con los ODN.

IM16

65 - Figura 3e. Formación de complejos entre el ODN PPT, los dendrímeros IM8 e IM16 y el correspondiente monómero a partir del cual se formó el dendrímero.

ES 2 265 291 B1

Las muestras sometidas a electroforesis fueron las siguientes:

Calle 1: Escalera de 100 pb

5 Calle 2: PPT 2,57 μ l + 3 μ l IM8 + 54 μ l RPMI

Calle 3: PPT 2,57 μ l + 2,35 μ l IM 16 + 55 μ l RPMI

10 Calle 4: PPT 2,57 μ l + 1,8 μ l monómero + 55 μ l RPMI

Calle 5: PPT 2,57 μ l + 57 μ l RPMI

15 En la calle en la que se corrió la muestra que contenía el ODN y el dendrímero IM16, éste último fue también capaz de retener al ADN

Por tanto, los CBS ensayados de 2ª generación fueron capaces de retener la migración del ADN hacia el polo positivo, siendo esto un reflejo de la formación de un complejo electrostático entre los CBS y los ODN en todos los casos: la pequeña generación de los CBS ensayados no es obstáculo por tanto para retener el ADN. Los dendrímeros sin ADN, por su parte, emiten una señal débil, casi inapreciable.

Estudio de la integridad del dendrímero en el complejo formado

25 El proceso de síntesis de los CBS utilizados en este trabajo, empieza a partir de un núcleo inicial de estructura común, que se termina funcionalizando en la periferia mediante el uso de diferentes grupos funcionales, que son los que aportan la carga positiva al dendrímero y determinan las diferencias entre ellos, siendo el núcleo dendrimérico de naturaleza apolar. Dado que algunas de las uniones de los grupos funcionales utilizados al núcleo dendrimérico podrían ser inestables en disolución acuosa, se realizaron ensayos para determinar si la retención del ADN en los geles de agarosa y por tanto la formación de complejos entre los CBS y el ADN podría ser debida a la estructura dendrimérica total conservada o por contra, eran los grupos funcionales terminales desprendidos del resto del núcleo dendrimérico los responsables de la retención del ADN. Para ello, se realizaron geles en los cuales se compararon complejos formados entre los ODNs y los CBS íntegros y los formados supuestamente entre los ODNs y los grupos funcionales terminales con los cuales se había funcionalizado el esqueleto carbosilano, en este caso dimetiletanolamina cuaternizada. Como se ha comentado antes, esas moléculas cargadas positivamente, que se encuentran unidas al dendrímero como grupos funcionales terminales, son las que confieren al dendrímero su carga. Como control, se compararon las mezclas de ODN-dendrímeros, ODN-monómeros y ODN solos. El gel correspondiente se muestra en la Figura 3e, a la que ya se ha hecho referencia anteriormente, en la que las muestras comparadas y sometidas a electroforesis son las siguientes:

40 Calle 1: Escalera de 100 pb

Calle 2: Control con medio RPMI sin dendrímero ni oligonucleótido

45 Calle 3: PPT 2,57 μ l + 3 μ l IM8 + 54 μ l RPMI

Calle 4: PPT 2,57 μ l + 2,35 μ l IM 16 + 55 μ l RPMI

Calle 5: PPT 2,57 μ l + 1,8 μ l monómero + 55 μ l RPMI

50 Calle 6: PPT 2,57 μ l + 57 μ l RPMI

55 El resultado de este ensayo muestra claramente que es necesaria la estructura dendrimérica completa para retener el ADN, no siendo capaces los monómeros, a pesar de su carga positiva, de retener el ADN. Por tanto, a estas concentraciones, la estructura dendrimérica se mantendría íntegra.

Ejemplo 32

Estabilidad de los dendriplejos a distintos pH

60 Se realizaron estudios de estabilidad de los complejos a diferentes pHs, para determinar como afectarían los cambios de pH al complejo, dado que existen distintas localizaciones anatómicas, tisulares o celulares en las cuales el pH se acidifica o basicifica. Ejemplos son el ambiente ácido del estómago, el básico de las secreciones pancreáticas al intestino delgado, o a nivel celular, el compartimento endosoma-lisosoma, donde se cambia de un pH fisiológico (7,35-7,45) a un pH ácido en tomo a 4. Interesaba saber por tanto en qué rango de pH podría mantenerse el complejo del ADN con los distintos CBS utilizados. Se formaron los complejos siguiendo el procedimiento habitual y se les añadieron volúmenes en exceso de distintas soluciones a distintos pHs.

ES 2 265 291 B1

Por ello, para cada uno de los dendrímeros Phe, CINH_4 , NN, IM8 e IM16 se prepararon, según lo expuesto en el Ejemplo 31, 7 disoluciones de dendriplejos formados con PPT, en una relación de carga 2/1 y con los siguientes pHs: 2,8; 2,7; 4,7; 5,7; 6,4; 7,4; 8:

5 Los resultados obtenidos se muestran en los geles de electroforesis que aparecen en la Figura 4, en los que la altura de la banda de migración normal del ODN se muestra con flechas en la parte inferior de los geles. Las muestras se cargaron de izquierda a derecha siguiendo un orden de pH crecientes. En los pocillos señalados con una X, no se cargó muestra alguna.

10 De acuerdo con los resultados obtenidos, mientras que los complejos formados entre los dendrímeros CINH_4 y Phe y el ODN son estables a todos los pH ensayados, los complejos formados entre el NN y el ODN eran lábiles a pH ácido (menor que 5,7), como lo demuestra la aparición de señal en la zona de migración del ODN en los pocillos señalados con flechas en el gel correspondiente a la Figura 4b. En el caso de IM8 e IM16, ocurría algo similar: los complejos IM8-ODN se disocian a $\text{pH} < 4,7$; los formados con IM16 se disocian a $\text{pH} < 5,7$. A pH básicos, sin embargo, todos los complejos eran estables, al no aparecer señal en las calles correspondientes a pH 7,4 y pH 8.

15 Esto quiere decir, que en un ambiente ácido (estómago, endosoma-lisosoma) el complejo entre CBS NN, CBS IM8 y CBS IM16 con el ODN irá liberando este último progresivamente. Este hecho sería bueno para aquellas aplicaciones que requirieran de la liberación controlada del ODN pH-dependiente. También quiere decir, que si el dendrímero todavía estuviera en el interior de la célula unido al ODN, cuando ingresara en el compartimento endosoma-lisosoma se rompería. En cambio, en ambiente básico (jugos intestino delgado) se mantendría estable.

Ejemplo 33

25 *Estabilidad de los dendriplejos en disolución acuosa en función del tiempo*

Se prepararon distintas muestras en disolución acuosa de dendriplejos formados entre el ODN PPT y los dendrímeros IM8, IM16 y NN a una relación de carga 2/1 según lo expuesto en el Ejemplo 31 y se realizaron electroforesis transcurridos tiempos distintos desde la preparación de las muestras, concretamente 0 horas, 6 horas y 24 horas. Durante esos tiempos, los dendriplejos se mantuvieron en condiciones que remedan las fisiológicas: 37°C, en atmósfera a 5% de CO_2 . Los resultados se muestran en la Figura 5, en la que el gel de la Figura 5a corresponde a la muestra de 0 horas, el de la Figura 5b a las muestras transcurridas 6 horas y el de la Figura 5c a las muestras transcurridas 24 horas. En los tres casos, a, b y c, las muestras aparecen en las calles siguiendo este orden:

35 Calle 1: Escalera de 100 pb.

Calle 2: IM8 + PPT

40 Calle 3: IM16 + PPT

Calle 4: NN + PPT

Calle 5: PPT

45 Los geles muestran que hay una liberación gradual con el tiempo del ODN desde los dendriplejos formados con cualquiera de los tres dendrímeros considerados. Esto es un buen indicio para su uso en liberación retardada de polianiones.

Ejemplo 34

50 *Estabilidad de los dendriplejos en presencia de proteínas y detergentes*

La unión a proteínas plasmáticas es uno de los obstáculos con los que se enfrentan las terapias con ODNs. Dicha unión disminuye la biodisponibilidad del ODN, haciendo necesaria una mayor dosis para poder ejercer el efecto biológico que se desea. En este apartado, se pretende analizar la influencia de la presencia de proteínas en el medio sobre la estabilidad del complejo, y si éste podría de alguna forma proteger al ODN de la unión a proteínas del plasma. Estos estudios se realizaron con el CBS NN y analizando el comportamiento de los dendriplejos formados en presencia de albúmina de suero bovino (BSA) y del detergente aniónico PBS.

60 Se realizaron los cálculos necesarios para poner una relación de dendrímero/ODN de 2/1 y se prepararon las siguientes muestras, con el objeto de exponer los dendriplejos a la presencia de distintas concentraciones de albúmina sérica bovina, medio completo con suero de ternera fetal o medio humano completo AB. Las distintas mezclas obtenidas se testaron para migración del ADN y de proteína sobre un mismo gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio en su composición. Primero se tomaba fotografía del gel expuesto a luz ultravioleta y posteriormente se teñía con una solución de colorante azul Paragón al 0,5% (sal disódica de ácido 8-amino-7-(3-nitrofenilazo)-2-(fenazilo)-1-naftol-3,6-disulfónico, Beckman Coulter®) durante 20 minutos (colorante para evidenciar la presencia de proteínas) y se desteñía finalmente el gel con lavados con acético glacial al 10%, tomándose una fotografía con cámara digital posteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 6, en la que la parte a corresponde a la tinción con azul Paragón y

ES 2 265 291 B1

la parte b corresponde a la fotografía del gel tomada con luz ultravioleta. El orden en el que aparecen las muestras es el siguiente:

5 Calle 0: Escalera de 100 pb

Calle 1: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI

Calle 2: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI + 30 μ l PBS-BSA 2%

10 Calle 3: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI + 30 μ l PBS-BSA 5%

Calle 4: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI + 30 μ l PBS-BSA 10%

15 Calle 5: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI + 30 μ l SDS 0.5%

Calle 6: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI + 30 μ l SDS 1%

Calle 7: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI + 30 μ l SDS 2%

20 Calle 8: 2,60 μ l TAR + 3,47 μ l NN + 25 μ l RPMI + 30 μ l Medio Completo

Calle 9: 2,60 μ l TAR + 27 μ l RPMI + 30 121 PBS-BSA 10%

25 Calle 10: 2,60 μ l TAR + 27 μ l RPMI

Se observa, en primer lugar que en todos los pocillos (menos en los tratados con SDS) aparecen unas bandas oscuras a medio camino entre el ODN libre y el pocillo: son complejos del azul Paragon con el azul de bromofenol presente en el tampón de carga. Además, en todas las calles en las que está presente la albúmina aparece una mancha correspondiente a su tinción.

De acuerdo con los resultados que se muestran en los geles, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

35 a) El ODN forma complejos con la albúmina, a los que corresponde una banda en el gel teñido con bromuro de etidio que se ha marcado rodeándola.

b) Las concentraciones crecientes de albúmina no son capaces de disociar el complejo (2,3,4). Además, la albúmina no debe estar secuestrando ODN desde el complejo dendrímero-ADN porque, si no, migraría a la altura del círculo.

40 c) El complejo se disocia en la presencia de un detergente aniónico (SDS) a todas las concentraciones ensayadas.

Ejemplo 35

45 *Estabilidad del dendriplejo NN-ODN en presencia de suero*

Con la intención de ver la estabilidad de los dendriplejos en presencia de suero en función del tiempo, se realizó un ensayo en el que a las muestras se les añadía medio completo que contenía suero de ternera fetal (STF) al 10%. Se prepararon las siguientes muestras con TAR como ODN:

50 1. TAR 2,59 μ L + NN 3,47 μ L + 54 μ L RPMI (+/-)=2/1

2. TAR 2,59 μ L + NN 1,73 μ L + 55 μ L RPMI(+/-)=1/1

55 3. TAR 2,59 μ L + NN 0,86 μ L + 57 μ L RPMI(+/-)=0,5

4. TAR 2,59 μ L + 54 μ L RPMI

+100 μ L
MEDIO
COMPLETO

60

Tal como se ha señalado, a los 20' de su preparación a las muestras 1, 2 y 3 se les añadió 100 μ l de medio completo. De cada una de las muestras se tomaron alícuotas de 45 μ l pasados 40 minutos, 4 horas y 17 horas y se sometieron a la electroforesis en gel de agarosa. Las muestras se cargaron en el gel siguiendo el orden de su numeración de izquierda a derecha, habiendo situado previamente un marcador de escalera de 100 pb. En el último punto (17 horas), sólo se ensayó el complejo de relación 2/1 frente al ODN sin NN. Los resultados se muestran en la Figura 7, en la que aparece una fecha sobre cada uno de los pocillos correspondientes a muestras con TAR+NN en relación 2/1.

65

ES 2 265 291 B1

De los datos mencionados anteriormente, se pueden extraer las siguientes observaciones:

a) A los 40 min, se aprecia que solamente la relación 2/1 de carga es capaz de retener por completo el ODN, no siendo capaz la relación 1/1 ni por supuesto la 0,5/1.

b) A las 17 h el dendrímero NN libera al ODN que migra hacia el ánodo.

c) No hay interferencia de las proteínas del medio completo con la estabilidad del complejo. Por otra parte, el ODN liberado migra al mismo nivel que el ODN solo, lo que indica que el ODN no forma complejos con ninguna de las proteínas existentes en el medio (10% de suero de ternera fetal, Antibiótico y L-Glutamina).

En definitiva, en presencia de STF al 10%, el complejo y el ODN se comportan como si el medio utilizado para las mezclas contuviera solo RPMI, no forma complejos con las proteínas del plasma, y el NN libera al ODN a las 17 h.

A continuación se comprobó cómo se comportarán complejo y ODN en presencia de suero humano. Para ello se realizaron estudios con suero humano AB.

En primer lugar, se comprobó el comportamiento del ODN sin dendrímero en presencia de suero humano. Para ello se sometieron a electroforesis muestras con la siguiente composición:

Calle 0: Escalera de 100 pb

Calle 1: Control (Suero AB)

Calle 2. 2,6 μ L TAR + 17 μ L RPMI + 40 μ L Suero AB

Calle 3. 2,6 μ L TAR + 37 μ L RPMI + 20 μ L Suero AB

Calle 4. 2,6 μ L TAR + 47 μ L RPMI + 10 μ L Suero AB

Calle 5. 2,6 μ L TAR + 57 μ L RPMI

Los geles de electroforesis, obtenidos tras esperar 20 minutos para una buena interacción del ODN con las proteínas del suero antes de cargar las muestras en el gel, se muestran en la Figura 8. En ella, la parte a muestra la fotografía obtenida con luz UV de la aparición de bandas por tinción con bromuro de etidio y la parte b muestra el mismo gel tratado con azul Paragón[®]. La localización de las bandas correspondientes al ODN en la parte a, a la misma altura que las bandas de proteínas en la parte b demuestra la unión del ODN a las proteínas del suero humano.

En segundo lugar, se comprobó el efecto de la presencia de las proteínas del suero humano sobre el dendriplejo ODN-NN. Se pretendió comprobar si el dendrímero protegería al ODN de la unión a proteínas; para ello se incubaron dendriplejos, ODN y dendrímeros sin ADN con 3 concentraciones de suero humano AB: a los 20 minutos de realizarse las mezclas del ODN, el dendrímero y el RPMI sin suero se añadieron a las mezclas 100 μ L de RPMI bien puro, bien con un 5% de suero AB, un 10% o un 20%. Se realizaron electroforesis a las 0 horas, 4 horas y 24 horas de la mezcla de dendrímeros y ODN, cargando las muestras de la siguiente manera:

0 horas

...20' => 100 μ L RPMI

Calle 1. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI

PURO

Calle 2. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI

5%

Calle 3. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI

10%

Calle 4. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI

20%

Calle 5. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI

5%

Calle 6. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI

10%

Calle 7. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI

20%

Calle 8. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI

PURO

ES 2 265 291 B1

4 horas

...20' => 100 μ L RPMI

5	Calle 1. Control (60 μ L RPMI)	20%
	Calle 2. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI	PURO
10	Calle 3. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,251 μ L NN + 54 μ L RPMI	5%
	Calle 4. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI	10%
15	Calle 5. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI	20%
	Calle 6. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	5%
20	Calle 7. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	10%
	Calle 8. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	20%
25	Calle 9. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	PURO
	Calle 10. 3,25 μ L NN + 57 μ L RPMI	5%
30	Calle 11. 3,25 μ L NN + 57 μ L RPMI	10%
	Calle 12. 3,25 μ L NN + 57 μ L RPMI	20%

35 24 horas

...20' => 100 μ L RPMI

40	Calle 1. Control (60 μ L RPMI)	20%
	Calle 2. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI	PURO
45	Calle 3. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI	5%
	Calle 4. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI	10%
50	Calle 5. 2,43 μ L PPT-TFO + 3,25 μ L NN + 54 μ L RPMI	20%
	Calle 6. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	5%
55	Calle 7. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	10%
	Calle 8. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	20%
60	Calle 9. 2,43 μ L PPT-TFO + 57 μ L RPMI	PURO
	Calle 10. 3,25 μ L NN + 57 μ L RPMI	5%
65	Calle 11. 3,25 μ L NN + 57 μ L RPMI	10%
	Calle 12. 3,25 μ L NN + 57 μ L RPMI	20%

ES 2 265 291 B1

Los resultados de fotografiar los geles bajo luz ultravioleta se muestran en la Figura 9a. La Figura 9b, por su parte, muestra la tinción con azul Paragon del gel correspondiente a las muestras de 4 horas.

Los resultados muestran que el dendriplejo NN⁺PPT-TFO sin suero se comporta como habitualmente, libera el ODN a las 24 h. A las 0 y 4 h: el NN⁺PPT-TFO en presencia de suero da un patrón de electroforesis distinto al PPT-TFO en presencia de suero. Éste último da una señal alargada y difusa, mientras que el dendriplejo deja el ODN en el pocillo (excepto cuando el suero está al 20%, que se produce un ligero escape de ODN y se une a proteínas). Si se observan los geles de proteínas, (de los que se ha mostrado como ejemplo el correspondiente a las muestras de 4 horas, aunque los resultados eran similares en los geles de 0 y 24 horas), éstas corren hacia el polo positivo, (mancha que se separa del pocillo); pero es interesante observar en el gel de BE que las proteínas forman un complejo con el ODN cuando éste está solo, sin dendrímero. Las proteínas corren a la misma altura en todas las circunstancias del experimento, independientemente de la presencia del dendrímero (que no consigue retener a la proteína en el pocillo, no forma complejo con la proteína). La presencia de proteína no consigue retirar ODN del complejo ODN-dendrímero; a las 24 h, el complejo empieza a liberar ODN, pero éste no migra hasta abajo como el control de ODN sin suero, sino que inmediatamente es retenido en su migración por las proteínas, dando la misma señal alargada y difusa que el ODN sin NN con suero.

Parece, por tanto, que hay una ventana de entre 4 y 24 h en las cuales el dendrímero protegería al ODN de la unión a proteínas. Pasado este tiempo lo libera. Esto daría tiempo al ODN unido al dendrímero a pasar del espacio endovascular al extravascular, con la certeza de que más tarde el dendrímero liberaría el ODN de forma controlada en el tiempo, dándole oportunidad de ejercer su acción. La proteína mayoritaria del suero es la albúmina, la cual presenta 2 dominios negativos que le dan una carga total negativa, pero presenta también un dominio positivo, el cual se une al ODN. Los sitios hidrofóbicos del CBS probablemente no interaccionan con los sitios hidrofóbicos de la albúmina. Dicha interacción es necesaria para lograr una unión estable entre dendrímero y proteína, por eso no forman complejos; sin embargo la unión electrostática entre dendrímero y ODN protege al último de la unión con el sitio positivo de la albúmina.

Ejemplo 36

Capacidad de formar complejos con ADN de gran tamaño

Se realizaron pruebas preliminares con plásmidos con el CBS IM8, siendo éste capaz de formar complejos con el plásmido utilizado, el Nf-kappaB-luc. De manera similar a experimentos anteriores, se realizó una electroforesis con distintas muestras, colocando en el pocillo anterior a ellas un marcador tipo escalera que mide hasta 5000 pb. Las muestras fueron las siguientes:

Calle 1: 1 μ l p + 0,58 μ l IM8 (+/-)= 2/1 + 28 μ l RPMI

Calle 2. 1 μ l p + 1,74 μ l IM8 (+/-)= 6/1 + 28 μ l RPMI

Calle 3. 1 μ l p + 2,9 μ l IM8 (+/-)= 10/1 + 27 μ l RPMI

Calle 4. 1 μ l p + 29 μ l IM8 (+/-)= 100/1+ 0 μ l RPMI

Calle 5. 1 μ l p (0,43 μ g p)

Calle 6. 2 μ l p

donde p=plásmido.

La fotografía de la electroforesis se muestra en la Figura 10. En ella se demuestra que la relación de cargas A (+/-)= 6/1 ya consigue retener la migración del ADN.

Ejemplo 37

Capacidad de formar complejos con ARNip

También se realizaron ensayos preliminares para evaluar la capacidad de retención de ARN de interferencia pequeños (ARNip). Con este fin se utilizó el siguiente ARNip anti-CD4:

5'-GAUCAAGAGACUCCUCAGUdGdA-3' (SEQ ID NO: 6)

suministrado por Ambion, Inc. El gel empleado fue un gel mátrix, un gel elaborado con una mezcla de agarosa y acrilamida lineal al 25 o 50%, obtenido tras calentamiento y marcaje posterior de las muestras con Bromuro de Etidio. En este caso concretamente se utilizó un gel 50% mátrix, 0,7% agarosa y 50% TAE 2X.

ES 2 265 291 B1

Las muestras sometidas a electroforesis fueron las siguientes:

Calle 1: RPMI

5 Calle 2: $1\ \mu\text{l}$ ARNip + $1,58\ \mu\text{l}$ IM8 + $48\ \mu\text{l}$ RPMI (+/-)= 2

Calle 3: $1\ \mu\text{l}$ ARNip + $4,74\ \mu\text{l}$ IM8 + $44\ \mu\text{l}$ RPMI (+/-)= 6

10 Calle 4: $1\ \mu\text{l}$ ARNip + $49\ \mu\text{l}$ RPMI

La fotografía del gel de electroforesis, mostrada en la Figura 11, demuestra de nuevo que es positiva la formación de complejos.

15 *Pruebas de toxicidad*

La toxicidad de los distintos dendrímeros se estudió por 5 procedimientos diferentes pero complementarios, que aportaban datos sobre funcionalidad celular, permeabilidad de membrana y aspecto de las células.

20 Se utilizaron distintas técnicas con el fin de evaluar la viabilidad en diferentes aspectos: integridad de membrana (tinciones con azul tripán), apoptosis (marcajes con anexina-V-PE y DAPI), necrosis (marcajes con 7-AAD), reactivo MTT (evalúa la actividad mitocondrial), evaluación del tamaño y complejidad de las células por citometría de flujo, microscopía *in vivo* para evaluar movilidad celular. Estas técnicas fueron aplicadas para el estudio de la toxicidad de
25 ODN, dendrímeros y dendriplejos en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Adicionalmente, se evaluó la toxicidad de los dendrímeros sobre hematíes mediante un ensayo de hemólisis.

30 Ejemplo 38

Pruebas sobre CMSP

Dendrímeros ensayados

35 Se evaluó la toxicidad de los dendrímeros IM8, IM16, CINH4, NN, Phe y los controles comerciales SF (Superfect) y G4. De cada uno de ellos se tomaron distintas cantidades de manera que las concentraciones finales con las que se incubaran las células fueran de $1\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $20\ \mu\text{M}$ y $100\ \mu\text{M}$.

40 *Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)*

La sangre procedió de donantes adultos o de cordón umbilical de neonatos sanos. Dicha sangre se diluyó 1/2 con PBS y se procedió a su centrifugación en gradiente de Ficoll. Tras dicha centrifugación se recuperó el halo de CMSP y se procedió a dos ciclos de lavado-centrifugación posteriores. Las CMSP resultantes se resuspendieron en medio de
45 cultivo completo con un 10% de STF, antibióticos y glutamina.

Incubación con las células

50 A un volumen de $60\ \mu\text{l}$ de RPMI con el correspondiente dendrímero ensayado se le añadieron $100\ \mu\text{l}$ de medio completo al 10% de suero de ternera fetal, antibióticos y glutamina. Los $160\ \mu\text{l}$ se añadían entonces a las células sembradas en $340\ \mu\text{l}$, completando un volumen final de $500\ \mu\text{l}$. Las células se incubaron de esta manera durante 48 horas y posteriormente se procedió a valorar el efecto de la incubación con los dendrímeros mediante su examen visual y mediante la valoración de la actividad mitocondrial.

55

Resultados del examen visual

Las observaciones obtenidas del examen visual se muestran a continuación en la Tabla 2.

60

65

ES 2 265 291 B1

TABLA 2

Resultados del examen visual de CMSP incubadas con dendrímeros

	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M	100 μ M	
5						
10	IM8	O.K	O.K	Disminución birrefringencia Aumento de mortalidad	Disminución número de células	Muy pocas células vivas
15	IM16	O.K	O.K	Agregados celulares +	Agregados celulares ++	Agregados celulares +++
20	CINH4	O.K	Agregados +	Muchos restos de membrana	Pocas células con aspecto de muertas	Grandes grumos celulares marrones.
25	NN	O.K	O.K	Mucho mejor aspecto que los anteriores CBS a esta concentración	Disminuye el número de células, pero mejor aspecto que los anteriores CBS a esta concentración	Muy pocas células, pero mejor aspecto que los anteriores CBS a esta concentración
30	Phe	O.K	O.K	O.K	Pocas células	Células aisladas.
	SF	Agregados ++	Agregados +++++	No se ensayó	No se ensayó	No se ensayó
35	G4	O.K	Agregados +	Agregados ++	Agregados +++. Mucha mortalidad	Grandes agregados oscuros.

40 De la observación visual se desprende que los dendrímeros menos tóxicos para los linfocitos fueron el CBS NN y el Phe, siendo los más tóxicos los dos dendrímeros PAMAM ensayados.

Actividad mitocondrial: MTT

45 Se realizó una curva de actividad mitocondrial dependiente de la concentración de dendrímero a las 48 horas. Esta técnica se utilizó para evidenciar efectos deletéreos intracelulares sobre el interior de las células. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células viables para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolio en cristales insolubles de formazán. Tras 48 horas de incubación de las CMSP con diferentes concentraciones de dendrímeros en placa de 96 pocillos (100.000/pocillo), el sobrenadante que contenía dendrímero se retiró y fue sustituido por 200 μ l de un medio de cultivo sin suero ni rojo fenol (Optimem). Para evitar la pérdida de células en este paso ni posteriormente de cristales de formazán, se había realizado una modificación del protocolo, sembrándose las CMSP en fibronectina total de plasma humano (Sigma[®]) a una concentración de 5-10 μ gr/ml, con lo que durante la incubación de 48 horas se fijaron al fondo del pocillo. Además de los 200 μ l de Optimem se añadieron 20 μ l de MTT filtrado para conseguir su esterilidad (Azul de Tiazolil, Sigma[®]) en PBS pH 7.4 a una concentración de 5 mg/ml para conseguir una concentración final en pocillo de 0.5 mg MTT/ml. Después de 4 horas de incubación a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂, se procedió a la centrifugación de la placa a 2000 rpm y a la posterior retirada del sobrenadante con el exceso MTT que no había reaccionado. Los cristales de formazán fueron observados al microscopio de contraste de fase y disueltos posteriormente con 200 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). La placa se agitó a 700 rpm en un agitador-calentador Eppendorf[®] para asegurar la correcta disolución de dichos cristales. La concentración de formazán ([A]) fue determinada por espectrofotometría utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm con una referencia de 690 nm. El espectrofotómetro fue calibrado a cero utilizando Optimem sin células. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar), basada en la actividad mitocondrial, fue calculada en base a esta fórmula: $[A]_{\text{test}}/[A]_{\text{control}} \times 100$. Cada concentración de dendrímero fue ensayada por triplicado, siguiendo las directivas de la ATCC. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 3.

ES 2 265 291 B1

TABLA 3

Viabilidad celular tras la incubación con dendrímeros según el MTT

	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M	100 μ M
IM8	98	60	18	12	10
IM16	94	99	63	37	11
CINH4	65,5	47	40	16	14
NN	87	68	66	32	9
Phe	83	77	71	54	14
SF	11	11			

De los ensayos con MTT se desprende que las células que mostraron mayor viabilidad mitocondrial tras ser tratadas con concentraciones crecientes de CBS o SF fueron las tratadas con CBS IM16, CBS NN y CBS Phe. Sin embargo, si se toman los datos en conjunto de estos ensayos con los de la observación visual, se deduce que mientras que IM16 inducía la formación de agregados celulares, NN y Phe no lo hacen, resultando ser estos últimos los más biocompatibles para linfocitos.

Ejemplo 39

Pruebas sobre hematíes

Se realizó examen visual para detectar la presencia/ausencia de hemaglutinación y cuantificación de la liberación de hemoglobina (ensayo de hemólisis) mediante espectrofotometría. De los dendrímeros del Ejemplo 38 anterior se excluyó el CINH4, por haber resultado el más tóxico para linfocitos, y se compararon los resultados con los obtenidos para un dendrímero tipo PAMAM de generación 4.

Los hematíes se obtuvieron tras ser separados de las CMSP mediante el mismo gradiente de Ficoll citado en el Ejemplo anterior. Los mismos se diluyeron en PBS hasta poder visualizarlos de forma individualizada. Las células se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se sembraron en placa de 24 pocillos (300.000/pocillo). Como control positivo se usaron células tratadas con Tritón X-100 al 0,2%. Control negativo: PBS (blanco). Los hematíes fueron incubados con distintas concentraciones de dendrímero. Se evaluó la presencia de hemaglutinación, número de células y liberación de hemoglobina a la hora mediante la recogida de 100 μ l de sobrenadante y medición de absorbancias por espectrofotometría utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 550 nm y 690 nm como referencia.

Examen visual

Las observaciones resultantes del examen visual se muestran a continuación en la Tabla 4.

TABLA 4

Examen visual de hematíes incubados con dendrímeros

	1 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
IM8	O.K	Ag +	Ag +	No células
IM16	O.K	Ag ++	Ag ++ pero más células que con IM8	No células
NN	O.K	O.K	Ag +/-	No células
Phe	Ag +	Ag +++	Ag +++	Hay células pero muy aglutinadas
G4	Ag +	Ag ++	Células fusiformes	Hay células pero son fusiformes

Ag=aglutinación

ES 2 265 291 B1

Cuantificación de la liberación de hemoglobina tras 1 hora

100% de hemólisis en el control de Tritón X-100 (las células tratadas con Tritón estaban todas muertas y rotas).
7% de hemólisis en el control negativo de células no tratadas. Cada pocillo se expresa como el porcentaje respecto a
5 la D.O (densidad óptica) del Tritón X-100, que se considera el 100%; además a ese porcentaje se le resta el 7% del control. De esa manera se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación en la Tabla 5:

TABLA 5

Porcentaje de liberación de hemoglobina tras la incubación con dendrímeros

	IM8	IM16	NN	Phe	G4
15 1 μ M	34,8	11,000	6,6	8,000	8,4
5 μ M	28	22,000	15	12,000	0
20 10 μ M	79	55,000	75	31,000	0
20 20 μ M	84	82,000	83	53,000	0

25 A 5 μ M el NN y el Phe sobrepasan sólo ligeramente el 10% de toxicidad, que es lo que se consideró como punto de corte para eritro-toxicidad. Lo que ocurre es que el Phe induce hemaglutinación y el NN no. Como dato curioso, el IM16 induce menos hemólisis y deja mayor número de células en el pocillo que el IM8, (concuera con lo observado para MTT en linfocitos), pero induce aglutinación. Todos inducen hemaglutinación excepto el NN. El PAMAM G4 induce aglutinación y cambios conformacionales en los hematíes, pero no hemólisis.

El orden de hemaglutinación de mayor a menor es:

G4>Phe>IM16>IM8>NN

35 En conjunto, el pocillo en el que mejor aspecto tenían las células presentando además hemólisis casi despreciable fue el del dendrímero NN. Si se toman los resultados de toxicidad sobre linfocitos y hematíes juntos, el dendrímero que demostró mejores perfiles de biocompatibilidad fue el NN.

40 Ejemplo 40

Toxicidad de los complejos ODN + dendrímero en comparación con el dendrímero solo

45 La toxicidad de otros dendrímeros como los PAMAM se modifica (disminuye) cuando forman complejos con ADN. Los siguientes experimentos pretenden conocer qué ocurre con los dendrímeros CBS en cuanto a toxicidad cuando se unen a los ODN.

50 El tiempo de evaluación esta vez fue de 72 horas. Las toxicidad se evaluó sobre CMSP, obtenidas de la forma descrita en el Ejemplo 38.

En todos los casos se utilizó una relación de cargas: (+/-)=2/1

Las concentraciones de los dendrímeros usadas en estos experimentos para lograr la dosis 2/1 de carga (+/-) fueron:

55 IM8: 2,96 μ g = 3,93 μ M

IM16: 2,35 μ g = 1,99 μ M

60 CINH4: 1,92 μ g = 3,98 μ M

Phe: 2,8 μ g = 1,96 μ M

NN: 3,42 μ g = 3,94 μ M

65 SF: 0,68 μ M

G4: 100 μ M

ES 2 265 291 B1

El ODN utilizado fue el PPT, de la siguiente manera:

[ODN PPT] en el complejo con los CBS: 2,57 (0,88 μM)

5 [ODN PPT] en el complejo con SF: 0,34 μM

[ODN PPT] en el complejo con G4: 1 μM

Formación de complejos

10

En todos los ensayos se utilizó un volumen de formación de complejo de 60 μl , utilizando como soporte medio sin suero RPMI con rojo fenol. Se añadieron las cantidades correspondientes de ODN o dendrímero para alcanzar la relación de carga (+/-)=2, siendo la carga positiva aportada por el dendrímero y la negativa por el ODN. Los cálculos de realizaron en base al número de cargas del dendrímero (fijas) y el número de cargas negativas del ODN (fijas igualmente).

15

Una vez añadido el ODN y el CBS en el RPMI se esperaba un tiempo de 20 minutos para asegurar la formación de los complejos.

20

En el caso del SF, los complejos se formaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Incubación con las células

25

Transcurrido el tiempo necesario para asegurar la formación de complejos, a los 60 μl de RPMI con el ODN y el dendrímero se les añadía 100 μl de medio completo al 10% de STF, antibióticos y glutamina. Los 160 μl se añadían entonces a las células sembradas en 340 μl , completando un volumen final de 500 μl . Las células se incubaban bien con dichos complejos, bien con una mezcla de igual volumen que contenía el ODN sin CBS, bien con una mezcla que contenía dendrímero solo, o con una mezcla que contenía solamente RPMI + medio completo que se usaba como control negativo. Las células y/o el sobrenadante se recogían después para su análisis en citometría de flujo, microscopía confocal o extracción de ADN celular.

30

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

35

Después de las incubaciones con las mezclas conteniendo ODNs fluoresceinados, dendrímeros, dendrímeros o RPMI, las células eran tratadas para la posterior adquisición de imágenes en el microscopio de fluorescencia convencional o confocal. Las células se pegaron a portas de cristal con pocillos de 30 mm de diámetro mediante Poli-L-lisina, (PLL) (Sigma®). Para ello, los portas se preincubaron con 30 μl de PLL durante 2 horas en incubador a 37°C y 5% de CO₂. Tras esta incubación, el exceso de PLL se lavaba con PBS. Las células procedentes de cada tratamiento que iban a ser pegadas en la PLL se lavaban 2 veces con PBS y se marcaban durante 1 minuto con azul tripán (Sigma®) al 0,8% para evidenciar posteriormente las células viables. Se volvían a lavar 2 veces con PBS. En ese momento se añadían las células al pocillo (100.000/pocillo), disponiéndose sobre la PLL durante 1 hora en incubador a 37°C y 5% de CO₂. Después de esta hora, se lavaba el exceso de volumen con PBS y se trataban las células con paraformaldehído (PFA) al 3% preparado recientemente (dentro de las 2 semanas de su uso) durante 10 minutos. Tras estos 10 minutos, se lavó el exceso de PFA con PBS y se procedió al marcaje de las células con anticuerpos marcados con fluorocromos y DAPI. Se teñía en primer lugar la membrana celular y luego el núcleo. Se realizó una titulación previa de los anticuerpos utilizados para determinar las mejores concentraciones de uso para nuestros ensayos. Se utilizó en primer lugar un anticuerpo primario anti-CD45 IgG1, κ de ratón anti-humano (BD®); se añadían 30 μl de anticuerpo a cada pocillo, a una dilución de 1 $\mu\text{g/ml}$; se incubaba 30 minutos y posteriormente se lavaba el exceso con PBS. Después se utilizaba un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón anti IgG-IgM (cadenas pesadas y ligeras) conjugado en Texas-Red (Jackson ImmunoResearch®), 30 $\mu\text{l/pocillo}$ a una dilución 1/130 de la madre (concentración de la madre 1,4 mg/ml). Se incubaba con las células durante otros 30 minutos y se lavaba posteriormente con PBS. Finalmente, se tiñieron los núcleos celulares mediante el uso de DAPI (Vysys®) 10 $\mu\text{l/pocillo}$ durante 10 minutos, lavándose posteriormente 2 veces con PBS. Las incubaciones con anticuerpos y DAPI se realizaban a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluían el mismo día de uso para evitar su degradación con el paso del tiempo y se centrifugaban a 12000 rpm previamente a su uso para disminuir la presencia de agregados. La dilución de cada anticuerpo se realizaba en medio de bloqueo para disminuir el marcaje inespecífico (PBS con Albúmina sérica bovina al 1%). Finalmente, se procedía al montaje de la preparación mediante el uso de un medio especial para fluorescencia (DAKO Cytomation Fluorescent Mounting Medium®) con antifading (destinado a proteger la muestra frente al deterioro causado por los láseres). Se procedía entonces a la observación y captura de imágenes mediante un microscopio confocal Leica TCS SP2 utilizando distintas líneas de excitación: 405, 488 y 514 nm y utilizando el objetivo para microscopía de contraste diferencial óptica del confocal. Tras la captura de imágenes se procedía a su análisis utilizando el software de Leica®.

60

65

Microscopía Confocal in vivo. Con el fin de examinar la viabilidad celular tras los diferentes tratamientos con ODNs, dendrímeros y dendrímeros a los que se sometían las CMSP, y de estudiar fenómenos tales como la captación de ODN fluoresceinado por parte de las mismas o evaluar el movimiento de las células transfectadas, se utilizaron técnicas de microscopía confocal *in vivo*. Para ello, se sembraban cristales de 2,5 cms con fibronectina total de plasma humano (Sigma®) a una concentración de uso de 5-10 $\mu\text{g/ml}$ incubándose con la fibronectina durante 1 hora a 37°C. Tras lavar

ES 2 265 291 B1

el exceso de fibronectina en el cristal con PBS, se sembraban las CMSP lavadas previamente con PBS y se incubaban a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂ durante 30 minutos. El exceso de células no pegadas se eliminaba mediante lavados con PBS. Todo el trabajo con el cristal se realizaba disponiendo éste sobre una superficie no adherente (papel metálico esterilizado) en una placa Petri estéril y en cabina de flujo laminar. Finalmente, se procedía a la inclusión del cristal en la cámara para microscopía *in vivo* del confocal, en la cual las células permanecían a 37°C con atmósfera al 5%. Antes de comenzar cualquier experimento *in vivo*, se dejaba a las células recuperarse de la manipulación durante 30 minutos en la cámara. Tras este periodo, se procedía al tratamiento de las células de distinta manera:

1. Adición del ODN fluoresceinado o los dendriplejos con ODN fluoresceinado y evaluación de la internalización de las células de los mismos.
2. Evaluación de la capacidad de movimiento de las células tras distintos desafíos con dendrímeros, dendriplejos u ODNs.

Para ello, se realizaron tomas secuenciales en el tiempo (cada 30", 1' ó 2') de las células eligiendo un corte en el plano medio de las mismas, que incluyera el núcleo. Tras la adquisición, se procedía al montaje de las imágenes para la obtención de imágenes del proceso.

Tinciones con Azul Tripán

Esta técnica evalúa la permeabilidad de la membrana celular al azul tripán (más conocido por su denominación en inglés Tripan Blue, abreviado TB). Las células vivas excluyen esta tinción.

Para realizarla, se preparó una solución con azul tripán (Sigma) al 0,8% y se trató el pellet celular obtenido tras centrifugación durante 1 minuto, procediéndose a centrifugación-lavado posteriormente de las células con PBS 2 veces. Las células se observaron bajo microscopía óptica y se contaron las células positivas para la presencia de azul tripán (células azules, muertas) en relación con el porcentaje de células negativas (células vivas). Para ello se eligió un campo amplio con al menos 100 células. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 6.

30 TABLA 6
Porcentaje de células teñidas con azul tripán

	TB+ (%)		TB+ (%)
Control	12,2	PPT	11,9
PPT+IM8	11,5	IM8	17,1
PPT+IM16	14,9	IM 16	18,5
PPT+CINH4	15,8	CINH4	15,7
PPT+Phe	10,7	Phe	11,3
PPT+NN	13,6	NN	10,6
PPT+SF	72	SF	100
PPT+G4	80,5	G4	100

n= 100 células por contaje

Los mayores porcentajes de mortalidad correspondían a los PAMAM tanto formando complejo con los ODN como solos. Los CBS no mostraron un porcentaje aumentado de células positivas para TB respecto al control de células sin tratar, no apreciándose apenas diferencias cuando las células eran tratadas con CBS-ODN o con CBS sólo.

Ensayo de citometría de flujo

Se compararon los porcentajes de células con tamaño y complejidad correspondientes a células en apoptosis-necrosis con las células vivas. Para ello, se realizó una evaluación del tamaño (FW) y de la complejidad (SD) por citometría de flujo. Para ello, se dibujó una región alrededor de las células con FW y SD correspondiente a células en apoptosis-necrosis y otra alrededor de las células con FW y SD correspondiente a células vivas. Se compararon los porcentajes de células presentes en cada puerta. Los gráficos obtenidos se muestran en la Figura 15, en la que en el eje X está representado el tamaño (FW) y en el eje Y la complejidad (SD).

ES 2 265 291 B1

En la parte A se muestra una población celular tipo CMSP tratada con los dendrímeros CBS y en la parte B una población tratada con un dendrímero tipo PAMAM. La nube de células oscuras corresponde a células en apoptosis necrosis. En gris se representan las células vivas. Se obtuvieron los porcentajes numéricos correspondientes a cada uno de los tipos de células, obteniéndose los valores que se muestran en la Tabla 7.

5

TABLA 7

Porcentajes de células vivas y en apoptosis-necrosis

	Células vivas (%)	Apoptosis-necrosis (%)		Células vivas (%)	Apoptosis-necrosis (%)
Control	69	27	PPT	71	23
PPT+IM8	71	24	IM8	59	36
PPT+IM16	72	22	IM16	67	28
PPT+CINH4	78	17	CINH4	71	26
PPT+Phe	72	22	Phe	61	33
PPT+NN	73	21	NN	70	24
PPT+SF	24	70	SF	12	82
PPT+G4	4	84	G4	4	85

30

Estos resultados se representan gráficamente la Figura 14, donde se representa en negro el porcentaje de células muertas y en gris el de vivas. La primera barra (C), corresponde al control.

35

Los mayores porcentajes de mortalidad correspondían a los PAMAM tanto formando complejo con los ODN como solos. Por otra parte, los dendrímeros CBS no mostraron un porcentaje mayor de apoptosis-necrosis respecto al control de células sin tratar, no apreciándose de nuevo apenas diferencias cuando las células eran tratadas con CBS-ODN o con CBS sólo.

40

Tinciones con DAPI

Como test adicional para comprobar la viabilidad celular, se utilizó la tinción con el colorante vital DAPI (Vysys®), utilizando 10 µl por pocillo durante 10 minutos y lavando posteriormente 2 veces con PBS. Los núcleos celulares en apoptosis o necrosis muestran un tamaño nuclear reducido, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear.

45

La Figura 17 muestra los resultados obtenidos con las siguientes muestras: 1: Control; 2: ODN+IM8; 3: ODN+IM16; 4: ODN+SF; 5: ODN; 6: IM8; 7: IM16; 8: SF.

50

Las células tratadas bien con los complejos CBS-ODN, bien con CBS solamente, mostraron núcleos redondos con cromatina distribuida de forma homogénea, con aspecto similar al del control de células no tratadas. Los pocillos tratados con SF (4 y 8) mostraron una depleción celular marcada, haciendo difícil el análisis

Videos

55

La evidencia más clara de que una célula está viva es que se mueve. Las células vivas muestran protusiones celulares transitorias moviéndose sobre una superficie de cristal sembrada con fibronectina. Las células tratadas con CBS mostraron un patrón de movimiento similar a las células control no tratadas.

60

Como ejemplo, en la Figura 18 se muestra una secuencia de fotos tomadas a las 72 horas de incubación de las células con CBS IM8-ODN. Se resaltan con flechas algunos detalles de movimiento.

65

Capacidad antigénica

Es muy importante, cuando se quiere conocer el perfil de biocompatibilidad de una nueva molécula, el saber si la misma puede constituir un estímulo antigénico inespecífico. Esto sería un inconveniente, por cuanto las células del

ES 2 265 291 B1

Sistema Inmune podrían reconocer a dicha molécula como un elemento extraño contra el cual se desencadenaría una respuesta que muy probablemente resultaría deletérea para el organismo. Por ello, se realizó un estudio de proliferación linfocitaria en presencia de los distintos CBS, con el fin de comparar la capacidad de estimulación linfocitaria que tendrán los mismos en comparación con un estímulo potente clásico como es la Fitohemaglutinina (PHA).

5 Ejemplo 41

Ensayo proliferativo

10 Para evaluar la capacidad antigénica de los dendrímeros CBS, se realizó un ensayo linfoproliferativo. El experimento se preparó por triplicado en placa de 96 pocillos de fondo plano (100.000 células por pocillo en 200 μ l de medio completo AB humano con antibióticos, glutamina y 10% de suero AB). El experimento contaba con un pocillo control negativo de proliferación (células sin tratar), un pocillo tratado con una dosis de uso habitual (2 μ M) de cada dendrímero a ensayar, otro con una dosis mayor rayando en la citotoxicidad (5 μ M) y otro control positivo de proliferación tratado con 1 μ g/mL de fitohemaglutinina. Tras 5 días de incubación a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂ se procedió a la retirada de 100 μ l de sobrenadante, añadiéndose luego 100 μ L de un medio con un intercalante isotópico de ADN, Timidina Trittiada (preparada con medio AB al 10% y Timidina 1/100). La placa se filtró entonces utilizando un Harvester pasando su contenido a un filtro, el cual se dejó secar toda la noche (aprox. 16 horas). Tras este periodo, se procedió a la fusión por calor de una lámina de Metilex[®] conteniendo medio de centelleo, y se procedió a su lectura en gammacámara para evaluación del número de cuentas (a más cuentas, más proliferación). Los resultados, que se muestran a continuación en la Tabla 8, se expresan como cuentas de timidina tritiada por minuto (cpm). Cada resultado de cada concentración se hizo por triplicado, siendo el valor que aparece en la tabla la media de los 3. La PHA y el control se ensayaron 12 veces.

25

TABLA 8

Lectura del número de cuentas en un ensayo linfoproliferativo

Estímulo antigénico	Medida del contador de centelleo	
Dendrímeros IM8 IM16 NN Phe	<u>2 μM</u> 144 cpm 175 cpm 145 cpm 146 cpm	<u>5 μM</u> 149 cpm 141 cpm 160 cpm 170 cpm
Control	146 cpm	
PHA	10267 cpm	

45 En la Figura 19 puede observarse una representación gráfica de estos datos. Como se puede extraer de este ensayo, los dendrímeros CBS no constituyeron un estímulo antigénico para las CMSP, a ninguna de las concentraciones ensayadas.

50 *Ensayos de transfección*

Se evaluó la capacidad del ODN para atravesar las membranas plasmática y nuclear de las CMSP y se comparó dicha capacidad con la que presentaba dicho ODN formando complejo con los distintos CBS. Se compararon los dendrímeros de la invención con los de tipo PAMAM, utilizando microscopía confocal.

55 Ejemplo 42

Ensayos de transfección

Obtención de células CMSP e incubación con las muestras

Se utilizó el mismo procedimiento explicado en ejemplos anteriores.

Tratamiento previo de las células

65 Dos días antes del tratamiento con los ODN o, con los dendrímeros, las CMSP fueron estimuladas con fitohemaglutinina a dosis entre 1-2 μ g/ml y con interleuquina-2 (IL-2) a dosis de 100 UI/ml, siendo la concentración celular entre 3 y 5 millones/ml. En el día del tratamiento, las células fueron resuspendidas a una concentración de entre 300.000-

ES 2 265 291 B1

500.000 células por cada 340 μ l. Sin embargo, y dado que el volumen final tras los respectivos tratamientos posteriores fue de 500 μ l, se añadió IL-2 para mantener la activación celular durante el transcurso del experimento a una dosis de 50 UI/ml calculadas en base a los 500 μ l que constituirían el volumen final.

5 *Microscopía confocal*

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente en otros Ejemplos.

Resultados obtenidos con los ODN

10

Se realizaron pruebas con cada uno de los ODN de las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5. Los ODN mostraron, por contra de lo publicado previamente, una sorprendente capacidad para atravesar la membrana plasmática, así como, la nuclear. Este proceso es dependiente del tiempo. Así, a las 3 horas, el ODN se encontraba en el citoplasma celular, y a las 24 horas en el núcleo. Un ejemplo de ello puede observarse en la Figura 20, donde se pueden observar fotografías tomadas tras 1, 3 o 24 horas desde el comienzo de la transfección con el ODN RF.

15

El patrón de fluorescencia era difuso, sin formación de agregados.

20

La localización nuclear queda aún más clara cuando se realiza un corte en XY de una célula seleccionada en un corte medio y se analiza la fluorescencia presente. Una prueba de este tipo puede observarse en la Figura 21. Cuando se analiza la fluorescencia presente a lo largo de una línea en un plano intermedio (Figura 21 A), la fluorescencia azul representada en la gráfica superior (núcleo) y la fluorescencia verde representada en la gráfica intermedia (ODN) colocalizan por dentro de la señal roja representada en la gráfica inferior (membrana). Cuando se realiza un análisis similar pero tomando una región de interés (ROI) (Figura 21 B) dibujada alrededor del núcleo a lo largo de varias secciones en el eje Z, se ve como el verde (gráfica inferior) colocaliza con el azul (gráfica superior) y está presente más allá en el citoplasma hasta llegar a la membrana.

25

Los resultados fueron los mismos independientemente de la longitud de los ODN probados (de 15 a 28 bases).

30 *Resultados obtenidos con dendriplejos ODN+CBS*

Se realizaron pruebas de transfección utilizando el ODN PPT para formar dendriplejos con distintos dendrímeros de la invención. Concretamente, se utilizaron para transfectar las siguientes muestras: 1: Control; 2: PPT; 3: PPT+IM8; 4: PPT+NN; 5: PPT+Phe; PPT+IM16.

35

Los resultados obtenidos tras 48 horas se muestran en la Figura 22.

40

Todos los dendrímeros menos el CINH4 conseguían un patrón similar al del ODN sin CBS, es decir, difuso, nuclear y citoplasmático. Alguno de los complejos consiguieron unos resultados superiores en unidades arbitrarias de fluorescencia que el ODN sin CBS (los que llevaban el NN y el Phe) en algunos de los experimentos realizados, pero esto no se repitió con significación estadística en diferentes experimentos con repeticiones de hasta 7 series comparativas entre complejos y ODN solo. La muestra de PPT con CINH4, en cambio, dio lugar al patrón de fluorescencia en agregados que se muestra en la Figura 23.

45

Para demostrar que efectivamente se trata de un patrón de fluorescencia citoplasmático y nuclear, se realizaron histogramas de una sola célula en un plano medio en XY, de forma similar a lo realizado con el ODN sin CBS. En la Figura 23 se muestra, como ejemplo, uno de los análisis sobre una célula tratada con el PPT+NN:

50

A partir de estos datos, se puede concluir que los dendrímeros CBS, a excepción del CINH4, no interfieren de forma alguna con la distribución del ODN en la célula.

Inhibición de virus u otros agentes biológicos por parte de los dendrímeros

55

Por la biocompatibilidad demostrada en los experimentos anteriores, los dendrímeros de la invención serían adecuados para la elaboración de composiciones de medicamentos (parenterales u orales) o dispositivos de interferencia (geles vaginales, antisépticos) para la prevención y/o el tratamiento de agentes biológicos tales como el virus VIH u otros virus como el de la hepatitis C o de otros agentes biológicos tales como priones. Con ese objetivo, se diseñaron ensayos de inhibición del virus VIH en los que se estudiaba esta capacidad.

60 Ejemplo 43

Ensayos de inhibición del VIH

Preparación de virus

65

Se utilizaron células MT-2 (linfocitos T humanos inmortalizados con virus linfocitotrópico humano tipo I). 20 x 10⁶ MT-2 se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 suplementado con 10% STF y se transfirieron a tubos cónicos de 25 ml a una concentración de 2 x 10⁶ células/ml en medio RPMI con 10% de STF. Posteriormente se añadió la cepa

ES 2 265 291 B1

de virus VIHNL4.3 a una concentración de 1 partícula por célula (1 MOI). Se cultivaron las MT-2 y el virus durante al menos 2 horas a 37°C, agitando el cultivo cada 15-30 minutos. Finalmente, se lavaron los cultivos (células-virus) dos veces para retirar el virus que no se hubiera integrado en el genoma celular. Las células se transfirieron y se cultivaron en botellas de 25 cm² en el mismo medio de cultivo.

5 Cada 72-96 horas se recogió la mitad del sobrenadante con cuidado de no recoger también células. Se añaden 40 x 10⁶ MT-2 a la misma concentración en medio RPMI con 10% STF. El sobrenadante se alicuoteó y se almacenó en nitrógeno líquido, y posteriormente se tituló.

10 *Titulación de virus*

El aislado viral VIHNL4.3, cepa viral de laboratorio establecida, se tituló en la línea celular MT-2. Se cultivaron 2 x 10⁴ células MT-2 con medio completo en placas de 96 pocillos y se añadieron 40 µl de la preparación viral a distintas concentraciones para lo que se realizan las correspondientes diluciones. Todas ellas se pusieron por octuplicado y se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ durante una semana. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de titulación por visualización del efecto citopático y formación de sincitios. El título se calculó aplicando la fórmula de Spearman-Kärber ^[30], que sirve para cuantificar el número de partículas de virus por ml de medio en un cultivo en el cual se han sembrado por octuplicado diluciones seriadas del concentrado de virus a titular.

20 *Infección in vitro de linfocitos T*

Las CMSP se estimularon durante 48 horas con 2 µg/ml de PHA y 100 UI de IL-2, para provocar una activación policlonal; a las 24 horas se lavaron las células con PBS. La concentración deseada de células se incubó con el número de partículas de VIHNL4.3 por célula calculado en medio RPMI con 10% STF durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Tras este tiempo se recogieron las células del cultivo y se lavaron tres veces para eliminar el virus adherido a la superficie celular, se depositaron de nuevo en placa de 24 pocillos en medio RPMI con 10% STF y 50 UI/ml de IL2 y se tratan con los diferentes dendrímeros. Los cultivos se incubaron a 37°C y se mantuvieron en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

30 *Inhibición del VIH mediante CBS*

Se sembraron 400.000 CMSP/pocillo de placa de 24 y se trataron con 1, 3 y 5 µM de NN, en un caso antes de infectarlas y en otro después de infectarlas a una multiplicidad de infección de 0,4 MOI. Se recogieron células a las 24 hs para extracción de ADN y posterior cuantificación de copias de virus por célula (siguiendo el método para detección y cuantificación de ADN de VIH en células infectadas registrado con el n° de patente 2401986 de la Oficina Nacional de Patentes).

Para eliminar la influencia de la posible toxicidad del dendrímero sobre el número de células y la cantidad de copias virales, se ajustó el número de copias de virus al porcentaje de células vivas para poder hacer comparaciones entre distintas concentraciones de dendrímeros. No obstante, los dendrímeros no indujeron una mortalidad significativa a las concentraciones utilizadas (cuantificado por FW y SD en citometría de flujo).

Se hizo por tanto el siguiente ajuste: n° de copias ADN VIH/10⁶ de células por % células vivas, obteniéndose la siguiente gráfica que se muestra en la Figura 25, en la que los prefijos pre o post hacen referencia a la administración de 1, 3 ó 5 µM de NN antes o después de la infección y la barra marcada como "C" corresponde al control.

Los resultados obtenidos indican que el dendrímero ejerce un claro impedimento en la infección de las CMSP por VIH, tanto aplicado previamente a la infección como después. Por tanto, debe actuar tanto sobre los pasos preintegración como los postintegración.

50 *Conclusiones de los experimentos*

- Los dendrímeros CBS ensayados presentan una buena biocompatibilidad para las CMSP a las dosis utilizadas para vehicular ODN.

- Cuando se toman en conjunto los datos de toxicidad sobre linfocitos y hematíes, el dendrímero que resulta tener un mejor perfil de biocompatibilidad es el CBS-NN.

- Los CBS NN, IM8 e IM16 liberan el ODN a lo largo del tiempo, habiendo liberado prácticamente el 100% del ODN las 24 horas. Estos dendrímeros liberan también el ODN a pHs ácidos (<5).

- Los ODN ensayados muestran una capacidad elevada de entrada en la célula por sí mismos, atravesando tanto la membrana plasmática como la nuclear en casi el 100% de las células vivas a las 17 horas de haberse añadido al cultivo celular, en presencia de un 10% de STF.

- Todos los dendriplejos CBS-ODN ensayados (a excepción del CINH4) no interfieren con la internalización del ODN y su distribución citoplasmática y nuclear.

ES 2 265 291 B1

- El CBS NN protege al ODN de la unión a proteínas del plasma, no interfiriendo esta protección con la posterior liberación paulatina del ODN a lo largo del tiempo en medio acuoso en presencia de dichas proteínas. Por esta razón y las anteriores, los dendrímeros de la invención parecen adecuados para su utilización en terapias antisentido para la inhibición de síntesis de proteínas cuyo nivel convenga en general disminuir, por estar implicadas en algún trastorno, ser de tipo tumoral, viral o estar implicadas de cualquier otra forma en distintas enfermedades humanas o animales.

- El dendrímero NN muestra una buena capacidad de impedir la infección de linfocitos por el virus VIH lo que, junto con la buena biocompatibilidad demostrada, indica que pueda utilizarse para la prevención y/o el tratamiento de trastornos producidos por agentes biológicos tales como el mismo VIH u otros virus como el de la hepatitis C, incluso otros agentes biológicos tales como los priones.

- Los CBS Phe y CINH4 muestran una buena capacidad para fijar de forma eficiente y perdurable los ácidos nucleicos, por lo que pueden ser adecuados para la generación de microchips de ARN o ADN u otros dispositivos que requieran la fijación a una superficie de ácidos nucleicos ya que, además, por la forma de fijación del ADN (electrostática con los grupos fosfato del ADN), los CBS aquí descritos dejan la secuencia nucleotídica expuesta a la interacción con secuencias complementarias de otros ácidos nucleicos.

4. Bibliografía

1. M. Fischer, F. Vögtle, *Angew. Chem.* 1999, *111*, 934-955; *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, *38*, 884-905 y referencias incluidas en ella.

2. Hacein-Bey-Abina S. *et al. N Engl J Med.* 2003 Jan 16;348(3):255

3. P. L. Felgner, t. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, *84*, 7413-7417.

4. G McLachlan, B. J. Stevenson, D. J. Davidson, D. J. Porteous. *Gene Ther.* 2000 Mar;7(5):384-92.

5. T. V. Chirila, P. E. Rakoczy, K. L. Garret, X. Lou, I. J. Constable, *Biomaterials* 2002, *23*, 321-342.

6. J. Haensler, F. C. Szoka Jr., *Bioconjugate Chem.* 1993, *4*, 372-379.

7. A. U. Bielinska, C. Chen, J. Johnson, J. R. Baker jr., *Bioconjugate Chem.* 1999, *10*, 843-850.

8. C. Loup, M. A. Zanta, A. M. Caminade, J. P. Majoral, B. Meunier, *Chem Eur. J.* 1999, *5*, 3644-3650.

9. B. H. Zinselmeyer, S. P. Mackay, A. G. Schatzlein, I. F. Uchegbu, *Pharm. Res.* 2002, *19*, 960-967.

10. T. Nidome, M. Wakamatsu, A. Wada, T. Hirayama, H. Aoyagi, *J. Pep. Sci.* 2000, 271-279.

11. R. Hogrefe. Antisense and Nucleic Acid Drug Development, *9*, 351-357 1999. Updated 2002.

12. DA Jabs *et al. Am J Ophthalmol.* 2002 Apr;133(4):552-6.

13. S. Agrawal *et al. Int J Oncol.* 2002 Jul;21(1):65-72.

14. N. Sato *et al. Clin Cancer Res* 2001 Nov;7(11):3606-12

15. C. Giovannangeli, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Jan. Vol. 94, pp. 79-84.

16. D.M. Klinman DM. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Jun;4(6):937-46.

17. B. Tavitian. *Gut.* 2003; *52* (Suppl IV):iv40-iv47.

18. P. Fiset, and A.S. Gounni. Reviews in Biology and Biotechnology Vol.1, No 2, May 2001. pp. 27-33. Antisense ODN nucleotides: problems with use and solutions.

19. M Witvrouw *et al. Mol Pharmacol.* 2000 *58*:1100-1108.

20. S. Supattapone, H. B. Nguyen, F. E. Cohen, S.B. Prusiner and M. R. Scott. PNAS. 1999. Dec. 7. Vol. 96, Issue 25, 14529-14534.

21. N. Malik, R. Wiwattanapatapee, K. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, R. Duncan, *J. Control., Rel.* 2000, *65*, 133-148.

22. S. W. Krska, D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, *120*, 3604-3612.

ES 2 265 291 B1

23. B. **Luhmann**, H. **Lang**, K. **Bruning**, *Phosph. Sulf Silic. Relat. Element.* 2001, 168, 481-484.
24. A. W. **Kleij**, R. van de **Coevering**, R. J. M. **Klein Gebbink**, A. M. **Noordman**, A. L. **Spek**, G. van **Koten**, *Chem. Eur. J.* 2001, 7, 181-192.
- 5 25. A. W. van der **Made**, P. W. N.M. van **Leeuwen**, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 1400-1401.
26. K. **Lorenz**, R. **Mülhaupt**, H. **Frey**, U. **Rapp**, F. J. **Mayer-Posner**, *Macromolecules* 1995, 28, 6657-6661.
- 10 27. C. **Kim**, I. **Jung**, *J. Organomet. Chem.* 1999, 588, 9-19.
28. **Karstedt**, B. D. U.S. Patent 1973, 3, 775, 452.
29. S. W. **Krska**, D. **Seyferth**, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 3604-3612.
- 15 30. **Hamilton**, M.A., R.C. **Russo**, y R.V. **Thurston**, *Environ. Sci. Technol.* 1977, 11(7): 714-719; Correction 1978, 12(4):417.
31. *Dendrimers and other dendritic polymers*. Eds. J. M. Fréchet, D. A. Tomalia. Wiley Series in Polymer Science
20 2001. J. Wiley & Sons, Ltd.
32. *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*. Ed. G.R. **Newkome**, C.N. **Moorefield**, F. **Vögtle**, Wiley-VCH, 2001.
- 25 33. G. E. **Ossterom**, J. N. H. **Reek**, P. C. J. **Kamer**, P. W. N. M. van **Leeuwen**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 1828-1849.
34. D. **Astruc**, F. **Chardac**, *Chem. Rev.* 2001, 101, 2991-3023.
- 30 35. S. M. **Grayson**, J. M. J. **Fréchet**, *Chem. Rev.* 2001, 101, 3819-3867.
36. S. E. **Stiriba**, H. **Frey**, R. **Haag**, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1329-1334.
37. F. **Aulenta**, W. **Hayes**, S. **Rannard**, *Eur. Polym. J.* 2003, 39, 1741-1771.
- 35 38. U. **Boas**, P. M. H. **Heegaard**, *Chem. Soc. Rev.*, 2003, 33, 43-63.
39. J. **Dennig**, E. **Duncan**, *Rev. Mol. Biotech.* 2002, 90, 339-347.
- 40 40. J. **Dennig**, *Top. Curr. Chem.* 2003, 228, 227-236.
41. M. **Ohraki**, T. **Okuda**, A. **Wada**, T. **Hirayama**, T. **Nidome**, H. **Aoyagi**, *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 510-517.
- 45 42. A. W. van der **Made**, P. W. N. M. van **Leeuwen**. J. C. **de Wilde**, R. A. C. **Brandes**, *Adv. Mater.* 1993, 5, 466-468.
43. J. **Roovers**, P.M. **Toporowski**, L.L. **Zhou**, *Polym. Prep. (J Am. Chem Soc., Div. Polym. Chem.)*, 1992, 33, 182.
- 50 44. L. L. **Zhou**, J. **Roovers**, *Macromolecules* 1993, 26, 963-968.
45. D. **Seyferth**, D. Y. **Son**, A. L. **Rheingold**, R. L. **Ostrander**, *Organometallics* 1994, 13, 2682-2690.
46. I. **Cuadrado**, M. **Morán**, J. **Losada**, C. M. **Casado**, C. **Pascual**, B. **Alonso**, F. **Lobete**, en *Advances in Dendritic Macromolecules*; Eds.; G.R. Newkomone, JAI Press Inc: Greenwich CT, 1999, Vol. 3, pp 151-191.
- 55 47. M. **Veith**, R. **Elsässer**, R. P. **Krüger**, *Organometallics* 1999, 18, 656-661.
48. C. **Kim**, I. **Jung**, *J. Organomet. Chem.* 2000, 599, 208-215.
- 60 49. S. **Arévalo**, E. de **Jesús**, F. J. de la **Mata**, J: C. **Flores**, R. **Gómez**, *Organometallics* 2001, 20, 2583-2592
50. N. **Bourne**, et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000, 44(9), 2471-2474.
- 65 51. Y. **Gong**, et al., *Antiviral Res.* 2002, 55(2), 319-329.
52. M. **Witvrouw**, et al., *Med Chem.* 2000, 43(5), 778-783.

ES 2 265 291 B1

53. C.Z. **Chen**, y S.L. **Cooper**, *Biomaterials*, 2002, *23*, 3359-3368.

54. C.Z. **Chen**, N.C. **Beck-Tan**, P. **Dhurjati**, T.K. van **Dyk**, R.A. **LaRossa**, S.L. **Cooper**, *Biomacromolecules*, 2000, *1*(3), 473-480.

55. D.J. **Selkoe**, *Science*, 1997, *275*(5300), 630-631.

56. J. **Hardy** y DJ **Selkoe**, *Science*, 2002, *297*, 353-356.

57. K. **Sadler**, y J.P. **Tam**, *J biotechnol*, 2002, *90*(3-4), 195-229.

58. J.C. **Spetzler**, y J.P. **Tam**, *Pept Res*, 1996, *9*(6), 290-296.

59. C.A. **Moreno**, et al., *Vaccine*, 1999, *18*(1-2): 89-99.

60. S. **Ota**, et al., *Cancer Res*, 2002, *62*(5), 1471-1476.

61. R.A. **Benkeser**, J. **Kang**, *J. Organomet. Chem.*, 1980, *185*, C9.

62. J.L. **Speier**, J.A. **Webster**, G.H. **Barnes**, *J Amer. Chem. Soc.* 1957, *79*, 974.

63. V. Le **Berre**, E. **Trévisiol**, A. **Dagkessamanskaia**, S. **Sokol**, A.M. **Caminade**, J.P. **Majoral**, B. **Meunier** y J. **François**, *Nucl. Acids Res.*, 2003, *31*, e88.

64. P. **Veprek** y J. **Jezek**, *J Pept Sci*, 1999, *5*(5), 203-220.

65. S. **Andre**, et al., *Chembiochem*, 2001, *2*(11), 822-830.

66. R. **Roy**, M.G. **Baek**, K. **Rittenhouse-Olson**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, *123*, 1809-1816.

67. R. **Roy**, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1996, *6*, 692-702.

68. J.F.G.A. **Jansen**, E.W. **Meijer**, E.M.M. de **Brabander-van den Berg**, *Macromol. Symp.*, 1996, *102*, 27-33.

69. T.P. **Devasagayam** y J.P. **Kamat**, *Indian J Exp Biol*, 2002, *40*(6), 680-692.

70. S.H. **Battah**, et al., *Bioconjug Chem*, 2001, *12*(6), 980-988.

71. N. **Nishiyama**, et al., *Bioconjug Chem*, 2003, *14*(1), 58-66.

72. A.S. **Chauhan**, S. **Sridevi**, K.B. **Chalasanani**., A.K. **Jain**., S.K. **Jain**, N.K. **Jain**, P.V. **Diwan**, *J. Control. Rel.*, 2003, *90*, 335-343.

73. K. **Kono**, M. **Liu** y J.M. **Frechet**, *Bioconjug Chem*, 1999, *10*(6), 1115-1121.

74. A. **Quintana**, et al., *Pharm Res*, 2002, *19*(9), 1310-1316.

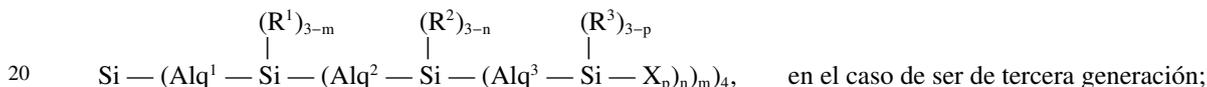
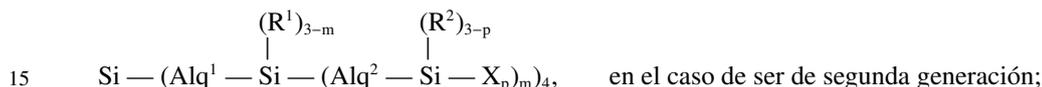
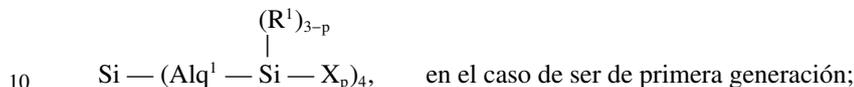
75. S. **Shukla**, et al., *Bioconjugate Chem*, 2003, *14*, 158-167.

76. N. **Malik**, E.G. **Evagorou** y R. **Duncan**, *Anticancer Drugs*, 1999, *57*, 249-257.

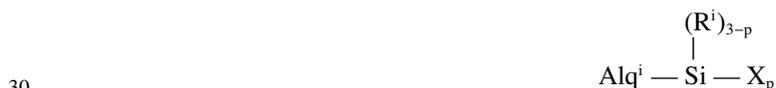
ES 2 265 291 B1

REIVINDICACIONES

1. Un dendrímero carbosilano ramificado con restos terminales en extremos de sus ramificaciones que contienen grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios que responde a una cualquiera de las fórmulas:



o a las fórmulas análogas correspondientes en el caso de generaciones superiores, en las que la fórmula correspondiente a cada generación i resultaría de sustituir X_p en la fórmula correspondiente a la generación anterior por un nuevo bloque del tipo:



pasando el grupo unido al mismo átomo de silicio que este bloque sustitutorio de estar representado por $(\text{R}^{i-1})_{3-p}$ a estar representado por $(\text{R}^{i-1})_{3-z}$,

fórmulas en las que:

$\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ representan restos alquileo de 2 a 4 carbonos que se eligen independientemente unos de otros según la longitud de las ramificaciones en cada generación;

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \dots, \text{R}^{i-1}, \text{R}^i$ representan restos que se eligen independientemente unos de otros entre metilo y fenilo;

X representa un resto que contiene al menos un grupo amino primario, secundario, terciario o cuaternario;

p es un número entero que varía entre 1 y 3;

m, n, \dots, z son números enteros que varían independientemente entre 1 y 3.

2. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 1, en el que los restos $\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ se seleccionan independientemente entre etileno y propileno.

3. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 2, en el que los restos $\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ son todos iguales y corresponden a restos propileno.

4. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 1, en el que los números enteros m, n, \dots, z son iguales entre sí y tienen el valor 2.

5. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 1, en la que los restos $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \dots, \text{R}^{i-1}, \text{R}^i$ son todos iguales y corresponden a restos metilo.

6. Un dendrímero carbosilano según las reivindicaciones 1 a 5, en el que los restos $\text{Alq}^1, \text{Alq}^2, \text{Alq}^3, \dots, \text{Alq}^i$ son iguales entre sí y corresponden a restos propileno; los números enteros m, n, \dots, j son iguales entre sí y tienen el valor 2 y los restos $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \dots, \text{R}^{i-1}, \text{R}^i$ son todos iguales y corresponden a restos metilo.

7. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 6, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino se encuentra unido al dendrímero mediante un grupo -O- que se ha formado a partir del grupo -OH de una alcohol-amina.

ES 2 265 291 B1

8. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 7, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino se elige entre los restos $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$ y $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

5 9. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 8, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino es el resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

10. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 9, en el que el índice "p" toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

10

11. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 10 que es de primera, segunda o tercera generación.

12. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 9, en el que el índice "p" toma el valor 2 y cada ramificación termina con dos restos $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

15

13. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 12, que es de primera, de segunda o de tercera generación.

14. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 8, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino es el resto $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)$.

20

15. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 14, en el que el índice "p" toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$.

16. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 15, que es de primera, segunda o tercera generación.

25

17. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 14, en el que el índice "p" toma el valor 2 y cada ramificación termina con dos restos $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$.

18. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 17, que es de primera, segunda o tercera generación.

30

19. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 8, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino es el resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

20. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 19, en el que el índice "p" toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

35

21. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 20, que es de primera, de segunda o de tercera generación.

22. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 19, en el que el índice "p" toma el valor 2 y cada ramificación termina con dos restos $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

40

23. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 22, que es de primera, de segunda o de tercera generación.

24. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 6, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino se encuentra unido al dendrímero mediante un grupo $-\text{CH}_2-$ que se ha formado a partir de un carbono terminal que se encontraba formando parte de un doble enlace carbono-carbono en un compuesto que contiene al menos un grupo amino con el que se hace reaccionar el dendrímero para obtener restos terminales de ramificaciones.

45

25. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 24, en el que el resto terminal de las ramificaciones corresponde a la fórmula $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_e-\text{NH}_2$, donde "e" es un número entero que oscila entre 0 y 2.

50

26. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 25, en el que "e" toma el valor 1, correspondiendo el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino a la fórmula $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$.

55

27. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 26, en el que el índice "p" toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$.

28. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 27, en el que el dendrímero carbosilano es de primera, de segunda o de tercera generación.

60

29. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 6, en el que parte o la totalidad de los grupos amino presentes en los restos terminales de las ramificaciones están cuaternizados.

30. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 29, en el que el resto Y terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino cuaternizado se elige entre los restos $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$, $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-)_2$ y $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.

65

ES 2 265 291 B1

31. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 30, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino cuaternizado es el resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.
32. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 31, en el que el índice “p” toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.
33. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 32, que es de primera, de segunda o de tercera generación.
34. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 31, en el que el índice “p” toma el valor 2 y cada ramificación termina con dos restos $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.
35. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 34, que es de primera, de segunda o de tercera generación.
36. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 30, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino cuaternizado es el resto $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-)_2$.
37. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 36, en el que el índice “p” toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-)_2$.
38. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 37, que es de primera, de segunda o de tercera generación.
39. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 36, en el que el índice “p” toma el valor 2 y cada ramificación termina con dos restos $-\text{OCH}_2-(\text{C}_6\text{H}_5)-3,5-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-)_2$.
40. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 39, que es de primera, de segunda o de tercera generación.
41. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 30, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino cuaternizado es el resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.
42. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 41, en el que el índice “p” toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.
43. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 42, que es de primera, de segunda o de tercera generación.
44. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 41, en el que el índice “p” toma el valor 2 y cada ramificación termina con dos restos $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$.
45. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 44, que es de primera, de segunda o de tercera generación.
46. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 29, en el que el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino cuaternizado se corresponde con la fórmula $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_e-\text{N}^+\text{H}_3\text{Cl}^-$ donde “e” es un número entero que oscila entre 0 y 2.
47. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 46, en el que “e” toma el valor 1, correspondiendo el resto terminal de las ramificaciones que contiene al menos un grupo amino cuaternizado a la fórmula $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3\text{Cl}^-$.
48. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 47, en el que el índice “p” toma el valor 1 y cada ramificación termina con un único resto $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3\text{Cl}^-$.
49. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 48, en el que el dendrímero carbosilano es de primera, de segunda o de tercera generación.
50. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 6, en el que el resto terminal que contiene al menos un grupo amino forma parte de un resto antigénico.
51. Un dendrímero carbosilano según la reivindicación 50, en el que el resto amino forma parte de un péptido.
52. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano, que comprende las etapas de:
- a) obtener un esqueleto de dendrímero carbosilano siguiendo los pasos de:
- a1) obtener un dendrímero carbosilano básico de partida de fórmula:



donde a varía entre 0 y 2, según la longitud que se desee para las ramificaciones,

ES 2 265 291 B1

haciendo reaccionar SiCl_4 con $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_a\text{CH}=\text{CH}_2$;

- a2) obtener un dendrímero carbosilano de primera generación precursor de un dendrímero de una generación superior haciendo reaccionar el dendrímero carbosilano básico de partida de a1) con $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-m}\text{Cl}_m$, de forma que se obtenga un dendrímero de fórmula:



donde

m varía entre 1 y 3 y equivale al número de ramificaciones que se pueden conseguir en la siguiente generación o el número de grupos funcionales terminales por los que pueden sustituirse los grupos Cl;

R^1 representa un resto metilo o fenilo;

- a3) opcionalmente, obtener un dendrímero carbosilano de segunda generación precursor de un dendrímero de una generación superior sometiendo el derivado con enlaces terminales Si-Cl obtenido en la etapa a2) a la repetición de las etapas a1) y a2), es decir,

i) obteniendo nuevas ramificaciones haciendo reaccionar el derivado correspondiente con enlaces terminales Si-Cl con $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_b\text{CH}=\text{CH}_2$, donde "b" varía entre 0 y 2, según la longitud que se desee para esas ramificaciones, y puede ser igual o diferente al índice "a";

ii) haciendo reaccionar el esqueleto de dendrímero carbosilano de la nueva generación obtenido en i) con $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$, donde "n" varía entre 1 y 3 y puede ser igual o diferente al índice "m" de la generación anterior y R^2 representa un resto metilo o fenilo;

- a4) opcionalmente, obtener dendrímeros carbosilanos de sucesivas generaciones precursores de dendrímeros de generaciones superiores sometiendo el derivado con enlaces terminales Si-Cl correspondiente a la generación anterior a la que se busca a la repetición de la etapa a3) i) utilizando un reactivo $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_c\text{CH}=\text{CH}_2$ y la repetición de la etapa a3) ii) utilizando un reactivo $\text{HSi}(\text{R}^3)_{3-z}\text{Cl}_z$, reactivos en los que "c" varía entre 0 y 2 y "z" varía entre 1 y 3;

- a5) obtener el esqueleto de dendrímero carbosilano final al que van a añadirse en la etapa b) restos que contienen al menos un grupo amino utilizando en la etapa a2), a3) o en la repetición i-1 de la etapa a4), según sea el dendrímero de primera, de segunda o de una generación i, respectivamente, un reactivo $\text{HSi}(\text{R}^i)_{3-p}\text{Cl}_p$, donde "p" varía entre 1 y 3 y R^i representa un resto metilo o fenilo.

b) obtener un dendrímero carbosilano con restos terminales con grupos aminos primarios, secundarios o terciarios siguiendo una de las siguientes vías:

b1) provocar la alcoholisis de enlaces terminales Si-Cl de un dendrímero carbosilano obtenido en la etapa a5) haciéndolo reaccionar con una alcohol-amina primaria, secundaria o terciaria en presencia de un exceso de una base;

b2) obtener previamente un dendrímero carbosilano con enlaces terminales Si-H al que posteriormente se unen los restos que contienen al menos un grupo amino primario, secundario o terciario, haciéndolo pasar por las etapas de:

i) obtener un derivado con enlaces terminales Si-H de un dendrímero carbosilano de una generación cualquiera haciendo reaccionar el correspondiente dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl con un reactivo capaz de ceder grupos hidruro, de manera que parte o la totalidad de los átomos de Cl queden sustituidos por átomos de H;

ii) hacer reaccionar el dendrímero carbosilano con enlaces Si-H, en presencia de un catalizador de hidrosililación, con un compuesto que contiene un grupo amino primario, secundario o terciario y que posee un doble enlace carbono-carbono en un extremo, de forma que el compuesto quede unido al dendrímero por el extremo en el que se encontraba el doble enlace;

c) opcionalmente, obtener un dendrímero carbosilano con restos terminales con grupos amino cuaternizados mediante la reacción de un dendrímero obtenido en la etapa b) con un reactivo A-Hal, en el que A representa hidrógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o arilo y Hal representa Cl, Br, I.

53. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 52, en el que el índice "a" del reactivo de partida es igual a 1, siendo por tanto $\text{BrMgCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$.

ES 2 265 291 B1

54. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 52, en el que el índice “b” del reactivo $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_b\text{CH}=\text{CH}_2$ utilizado para obtener nuevas ramificaciones en la etapa a3) i) opcional y los distintos índices “c” de los reactivos $\text{BrMg}(\text{CH}_2)_c\text{CH}=\text{CH}_2$ utilizados para obtener nuevas ramificaciones en cada una de las repeticiones opcionales de la etapa a4) son todos ellos iguales a 1, siendo por tanto el reactivo $\text{BrMgCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$.

55. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según las reivindicaciones 53 y 54, en el que el reactivo $\text{BrMgCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ se utiliza tanto en la etapa a) de partida como en todas las ocasiones en las que se obtienen nuevas ramificaciones mediante la etapa a3) i) opcional o mediante las repeticiones opcionales de la etapa a4).

56. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 52 a 55, en el que tanto el resto R^1 del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-m}\text{Cl}_m$ de la etapa a2) como el resto R^2 del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$ utilizados para obtener derivados con enlaces terminales Si-Cl en la etapa opcional a3) ii) como los sucesivos restos R^i de los reactivos $\text{HSi}(\text{R}^i)_{3-z}\text{Cl}_z$ de las repeticiones opcionales de la etapa a4) son todos iguales entre sí y corresponden a restos metilo.

57. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 52 a 56, en el que tanto el índice “m” del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-m}\text{Cl}_m$ de la etapa a2) como el índice “n” del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$ de la etapa opcional a3) ii) como los índices “z” de los reactivos $\text{HSi}(\text{R}^i)_{3-z}\text{Cl}_z$ de las repeticiones opcionales de la etapa a4) son todos ellos iguales entre sí e iguales a 2, utilizándose en todos los casos el reactivo $\text{HSi}(\text{R}^1)_1\text{Cl}_2$.

58. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según las reivindicaciones 56 y 57, en el que:

- tanto el resto R^1 del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-m}\text{Cl}_m$ de la etapa a2) como el resto R^2 del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$ utilizado para obtener derivados con enlaces terminales Si-Cl en la etapa opcional a3) ii) como los sucesivos restos R^i de los reactivos $\text{HSi}(\text{R}^i)_{3-z}\text{Cl}_z$ utilizados en las repeticiones opcionales de la etapa a4) son todos iguales entre sí y corresponden a restos metilo;
- tanto el índice “m” del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-m}\text{Cl}_m$ de la etapa a2) como el índice “n” del reactivo $\text{HSi}(\text{R}^2)_{3-n}\text{Cl}_n$ de la etapa opcional a3) ii) como los índices “z” de los reactivos $\text{HSi}(\text{R}^i)_{3-z}\text{Cl}_z$ de las repeticiones opcionales de la etapa a4) son todos ellos iguales entre sí e iguales a 2;

por lo que en todos los pasos en los que se obtienen enlaces Si-Cl terminales destinados a permitir la obtención de derivados de generaciones superiores mediante la sustitución de cada uno de los restos Cl por una nueva rama, es el reactivo $\text{HSiCH}_3\text{Cl}_2$ el que se utiliza.

59. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según las reivindicaciones 55 y 58, en el que:

- el reactivo $\text{BrMgCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ se utiliza tanto en la etapa a1) de partida como en todas las ocasiones en las que se obtienen nuevas ramificaciones mediante la etapa a3) i) opcional o mediante las repeticiones opcionales de la etapa a4);
- en todos los pasos en los que se obtienen enlaces Si-Cl terminales destinados a permitir la obtención de derivados de generaciones superiores mediante la sustitución de cada uno de los restos Cl por una nueva rama, es el reactivo $\text{HSiCH}_3\text{Cl}_2$ el que se utiliza.

60. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 59, en el que el reactivo $\text{HSi}(\text{R}^1)_{3-p}\text{Cl}_p$ que se utiliza para obtener enlaces Si-Cl terminales en el esqueleto final de dendrímero carbosilano al que van a añadirse restos con grupos amino en la etapa b) es $\text{HSi}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$.

61. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 60, en el que al esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales se le unen restos que contienen al menos un grupo amino en la etapa b) siguiendo la vía b1) de reacción con una alcohol-amina.

62. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 61, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales se trata en la etapa b1) con una alcohol-amina elegida entre N,N-dietiletanolamina ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2-[(2-(dimetilaminoetil)metil]amino etanol ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) o 3,5-bis(dimetilaminoetoxi)bencilalcohol ($\text{CH}_2\text{OH}-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$).

63. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 62, en el que se utilizan cantidades preferentemente estequiométricas de la alcohol-amina elegida con respecto al número de enlaces Si-Cl terminales presentes en el esqueleto final de dendrímero carbosilano obtenido en la etapa a).

64. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 62 ó 63, en el que se realiza la etapa opcional c) de cuaternización de grupos amino del dendrímero carbosilano obtenido en la etapa b1) tratándolo con un exceso de CH_3I .

ES 2 265 291 B1

65. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 62 a 64, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b1) con una alcohol-amina se ha obtenido haciendo coincidir la etapa a2) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de primera generación.

66. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 62 a 64, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b1) con una alcohol-amina se ha obtenido haciendo coincidir la etapa a3) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de segunda generación.

67. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 62 a 64, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b1) con una alcohol-amina se ha obtenido haciendo coincidir la primera ejecución de la etapa a4) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de tercera generación.

68. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 59, en el que el reactivo $\text{HSi}(\text{R}^i)_{3-p}\text{Cl}_p$ que se utiliza para obtener enlaces Si-Cl terminales en el esqueleto final de dendrímero carbosilano al que van a añadirse restos con grupos amino en la etapa b) es $\text{HSiCH}_3\text{Cl}_2$.

69. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 68, en el que al esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales se le unen restos que contienen al menos un grupo amino en la etapa b) siguiendo la vía b1) de reacción con una alcohol-amina.

70. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 69, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales se trata en la etapa b1) con una alcohol-amina elegida entre N,N-dietiletanolamina ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2-[(2-(dimetilaminoetil)metil]amino etanol ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) o 3,5-bis(dimetilaminoetoxi)bencilalcohol ($\text{CH}_2\text{OH}-(\text{C}_6\text{H}_4)-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2)_2$).

71. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 70, en el que se utilizan cantidades preferentemente estequiométricas de la alcohol-amina elegida con respecto al número de enlaces Si-Cl terminales presentes en el esqueleto final de dendrímero carbosilano obtenido en la etapa a).

72. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 70 ó 71, en el que se realiza la etapa opcional c) de cuaternización de grupos amino del dendrímero carbosilano obtenido en la etapa b1) tratándolo con un exceso de CH_3I .

73. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 70 a 72, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b1) con una alcohol-amina se ha obtenido haciendo coincidir la etapa a2) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de primera generación.

74. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 70 a 72, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b1) con una alcohol-amina se ha obtenido haciendo coincidir la etapa a3) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de segunda generación.

75. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 70 a 72, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b1) con una alcohol-amina se ha obtenido haciendo coincidir la primera ejecución de la etapa a4) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de tercera generación.

76. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 60 ó 68, en el que al esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales se le unen restos que contienen al menos un grupo amino en la etapa b) siguiendo la vía b2) de reacción con un compuesto que posee un doble enlace carbono-carbono en un extremo y que contiene al menos un grupo amino.

77. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 76, en el que el reactivo capaz de ceder grupos hidruro para convertir parte o la totalidad de los enlaces Si-Cl en enlaces Si-H es LiAlH_4 y el catalizador de hidrosililación utilizado para unir al dendrímero carbosilano con enlaces Si-H un compuesto que contiene un grupo amino primario, secundario o terciario por un extremo en el que dicho compuesto posee un doble enlace carbono-carbono es el catalizador de Karstedt.

78. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 77, en el que el compuesto que posee un doble enlace carbono-carbono en un extremo es una alquilenamina primaria de fórmula $\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_e-\text{NH}_2$, en la que el índice "e" varía entre 0 y 2.

ES 2 265 291 B1

79. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 78, en el que el índice “e” de la fórmula $\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_e-\text{NH}_2$ tiene el valor 1, siendo la alquilamina utilizada en la etapa b2) la alilamina, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$.
- 5 80. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según la reivindicación 79, en el que se utilizan cantidades preferentemente estequiométricas de alilamina con respecto al número de enlaces Si-H presentes en el esqueleto de dendrímero carbosilano.
- 10 81. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 79 u 80, en el que se realiza la etapa opcional c) de cuaternización de grupos amino del dendrímero carbosilano obtenido en la etapa b2) tratándolo con HCl.
- 15 82. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 79 a 81, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b2) i) con LiAlH_4 se ha obtenido haciendo coincidir la etapa a2) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de primera generación.
- 20 83. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 79 a 81, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b2) i) con LiAlH_4 se ha obtenido haciendo coincidir la etapa a3) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de segunda generación.
- 25 84. Un procedimiento de preparación de dendrímeros carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 79 a 81, en el que el esqueleto final de dendrímero carbosilano con enlaces Si-Cl terminales tratado en la etapa b2) i) con LiAlH_4 se ha obtenido haciendo coincidir la primera ejecución de la etapa a4) con la etapa a5) de finalización de la obtención del esqueleto del dendrímero carbosilano, obteniéndose en la etapa b) un dendrímero carbosilano de tercera generación.
- 30 85. Una composición que contiene al menos un dendrímero carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51.
- 35 86. Una composición según la reivindicación 85, que contiene además al menos un molécula de carácter aniónico o polianiónico.
- 40 87. Una composición según la reivindicación 86, en la que la molécula de carácter polianiónico es una secuencia de un ácido nucleico o un derivado suyo.
- 45 88. Una composición según la reivindicación 87, en la que la secuencia de ácido nucleico o derivado suyo es un ADN antisentido.
- 50 89. Una composición según la reivindicación 88, en la que al menos uno de los dendrímeros carbosilano presentes tiene la finalidad de actuar como vehículo transportador del ADN antisentido o de un derivado del mismo para que disminuyan las posibilidades de interacción del ADN antisentido con proteínas del plasma o con las superficies celulares.
- 55 90. Una composición según la reivindicación 89, en la que al menos uno de los dendrímeros carbosilano presentes tiene la finalidad de facilitar la liberación controlada de al menos un ADN antisentido presente en ella o de un derivado del mismo.
- 60 91. Una composición según la reivindicación 90, en la que al menos uno de los dendrímeros carbosilano presentes es un dendrímero elegido entre NN, IM8 y/o IM16.
- 65 92. Una composición según cualquiera de las reivindicación 88 a 91, en la que el ADN antisentido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
93. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 88 a 91, en la que el ADN antisentido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.
94. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 88 a 91, en la que el ADN antisentido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3.
95. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 88 a 91, en la que el ADN antisentido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4.
96. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 88 a 91, en la que el ADN antisentido tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5.

ES 2 265 291 B1

97. Una composición según la reivindicación 87, en la que la secuencia de ácido nucleico o derivado suyo es una secuencia de ADN bicatenario.

5 98. Una composición según la reivindicación 97, en la que la secuencia de ácido nucleico o derivado suyo es un plásmido o ADN derivado de un virus.

99. Una composición según la reivindicación 86, en la que la molécula de carácter polianiónico es un ARN de interferencia o un derivado del mismo.

10 100. Una composición según la reivindicación 99, en la que la molécula del ARN de interferencia contiene la secuencia de SEQ ID NO: 6.

15 101. Una composición según la reivindicación 86, en la que la molécula de carácter aniónico es un fármaco con carga negativa a pH fisiológico.

102. Una composición según la reivindicación 101, en la que el fármaco con carga negativa es el ácido acetilsalicílico, la indometacina, la furosemida, la penicilina, la fenitoína, la tolbutamida, la warfarina, el ácido nalidíxico o la clorotiacida.

20 103. Una composición según la reivindicación 85, en la que al menos uno de los dendrímeros carbosilano presente tiene la finalidad de actuar como sustancia activa destinada a la prevención y/o al tratamiento de enfermedades causadas por virus o por priones en cuyo ciclo vital es capaz de interferir.

25 104. Una composición según la reivindicación 103, en la que la enfermedad que se intenta prevenir o tratar está causada por el virus VIH.

105. Una composición según la reivindicación 104, en la que está presente al menos el dendrímero NN.

30 106. Una composición según la reivindicación 85, en la que al menos uno de los dendrímeros carbosilano presentes tiene la finalidad de actuar como sustancia activa destinada a la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por bacterias o por hongos cuyas membranas o paredes celulares sean susceptibles de ser alteradas por dicho dendrímero.

35 107. Una composición según la reivindicación 85, en la que al menos uno de los dendrímeros carbosilano presentes tiene la finalidad de actuar como sustancia activa destinada a interferir con la formación de o facilitar la disolución de agregados proteicos tales como los que aparecen en la enfermedad de Alzheimer o en las encefalopatías provocadas por priones.

40 108. Una composición que contiene al menos un dendrímero carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 50 y 51, destinado a desencadenar una respuesta inmune que prevenga o proteja frente a una enfermedad provocada por un organismo que contenga el péptido o resto antigénico unido al dendrímero.

45 109. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 86 a 108, destinada a ser administrada mediante iontoforesis, por vía transdérmica o por inhalación.

110. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 86 a 108, destinada a ser inyectada.

50 111. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 86 a 108, destinada a formar con ella una película para recubrimiento de estructuras protésicas o mallas STENT para la liberación controlada desde las mismas de al menos un dendrímero carbosilano presente en la composición o de al menos otra sustancia presente en la composición.

55 112. Una composición que contiene al menos un dendrímero carbosilano según la reivindicación 85, destinada a ser utilizada en la fijación de moléculas de ácidos nucleicos a superficies tales como las bases de los microchips de secuencias de nucleótidos.

113. Una composición según la reivindicación 112, en la que el dendrímero es Phe y/o CINH₄.

60 114. Uso de un dendrímero carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 85 a 96 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad producida por un virus o por una alteración en un gen cuyos síntomas pueden paliarse o eliminarse mediante la utilización de un ADN antisentido.

65 115. Uso según la reivindicación 114, en el que la enfermedad que se intenta prevenir o tratar está producida por el virus VIH.

116. Uso de un dendrímero carbosilano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 85 ó 97 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el

ES 2 265 291 B1

tratamiento de un trastorno o enfermedad cuyos síntomas pueden paliarse o eliminarse mediante la introducción de un ADN bicatenario en una célula.

5 117. Uso según la reivindicación 116, en el que el ADN bicatenario es capaz de expresar al menos una proteína en la célula a la que va dirigido.

10 118. Uso de un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51 o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 85, 99 ó 100 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno o enfermedad producida por un virus o por una alteración en un gen, cuyos síntomas pueden paliarse o eliminarse mediante la utilización de uno o más ARN de interferencia.

15 119. Uso de un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 85, 101 ó 102 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno o enfermedad cuyos síntomas pueden paliarse o eliminarse mediante la administración de un fármaco que tiene carga negativa a pH fisiológico.

20 120. Uso de un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 85, 103, 104 ó 105 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno o enfermedad producido por un virus o prión con cuyo ciclo vital es capaz de interferir el dendrímero.

25 121. Uso de un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 85 ó 106 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno o enfermedad producido por una bacteria o por un hongo cuya membrana o pared celular es susceptible de ser alterada por el dendrímero.

30 122. Uso de un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 85 ó 107 en la fabricación de un medicamento destinado a interferir con la formación de o facilitar la disolución de agregados proteicos tales como los que aparecen en la enfermedad de Alzheimer o en las encefalopatías provocadas por priones.

35 123. Uso de un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 50 ó 51 o de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 85 ó 108 en la fabricación de un medicamento destinado a desencadenar una respuesta inmune que prevenga o proteja frente a una enfermedad provocada por un organismo que contenga el péptido o resto antigénico presente en el dendrímero.

40

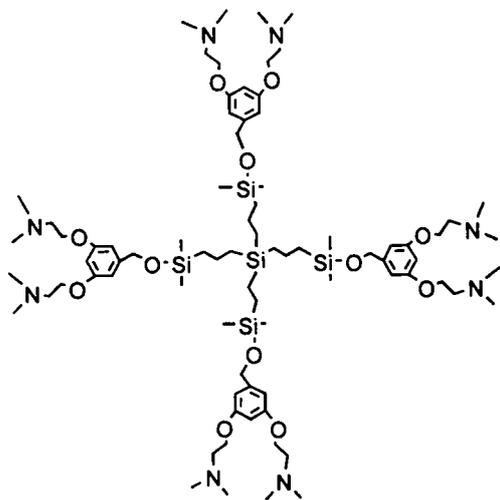
45

50

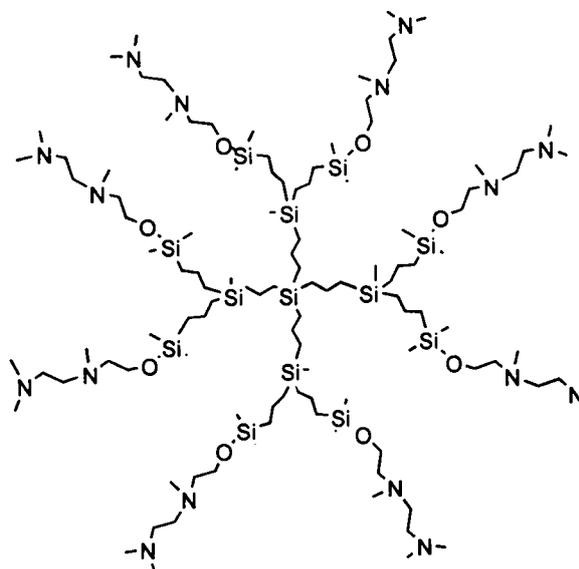
55

60

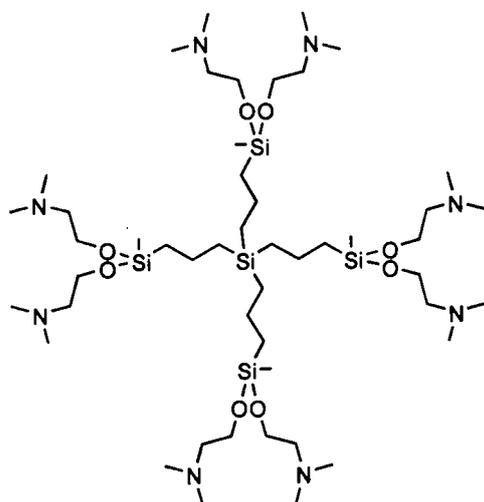
65



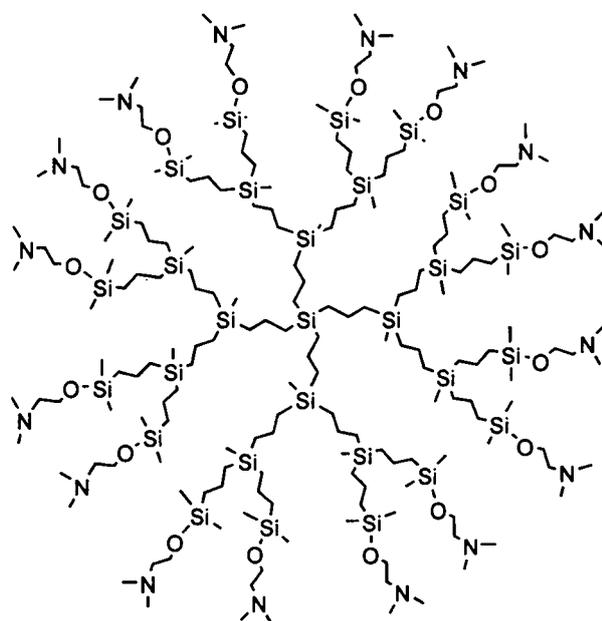
1G-[3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₃)CH₂O] (7)



2G-[OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]₈ (11)



1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₄ (2)



3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₁₆ (5)

Fig. 1a

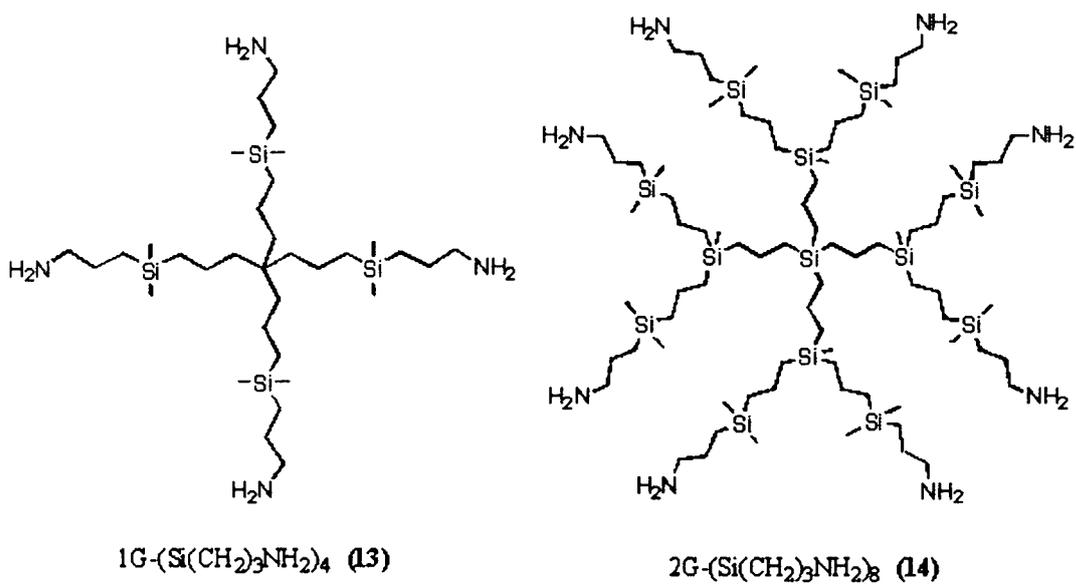


Fig. 1b

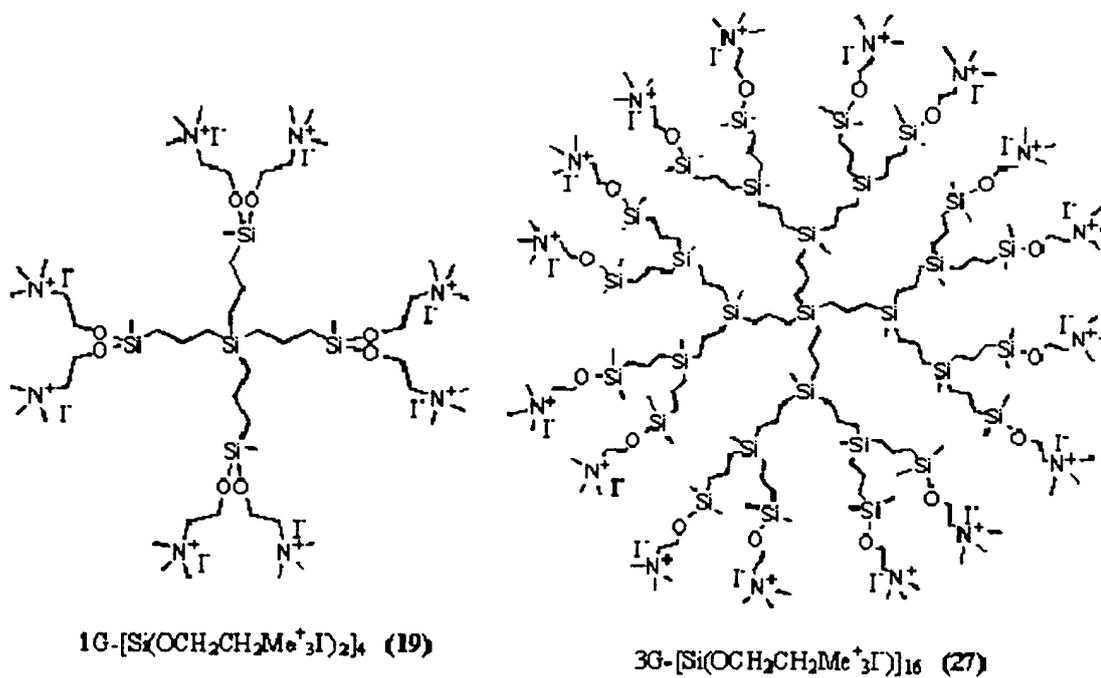
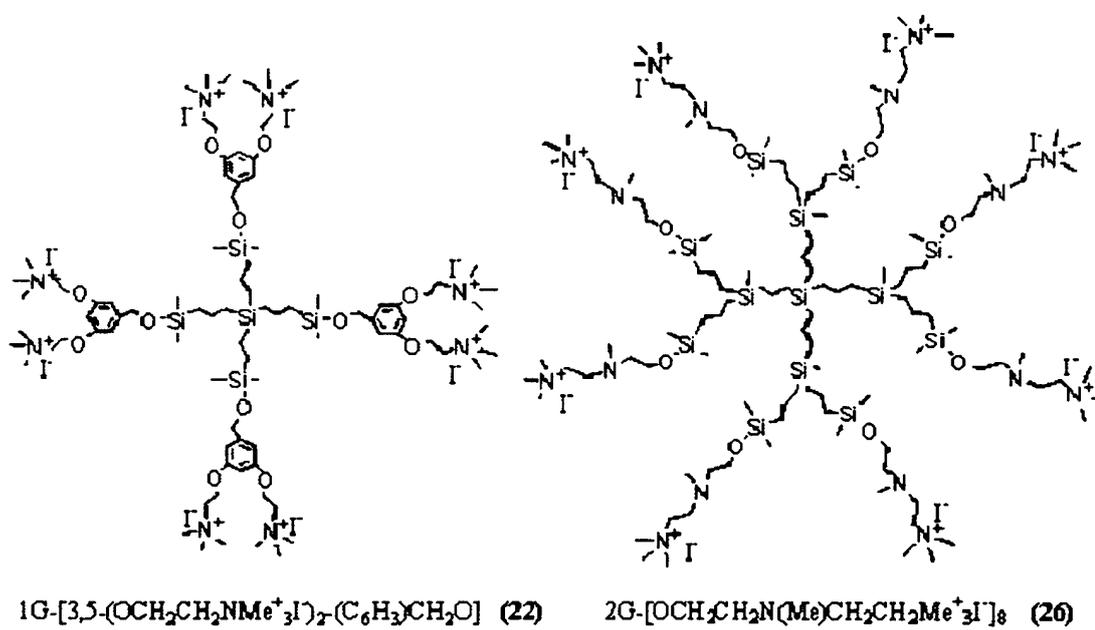


Fig. 2a

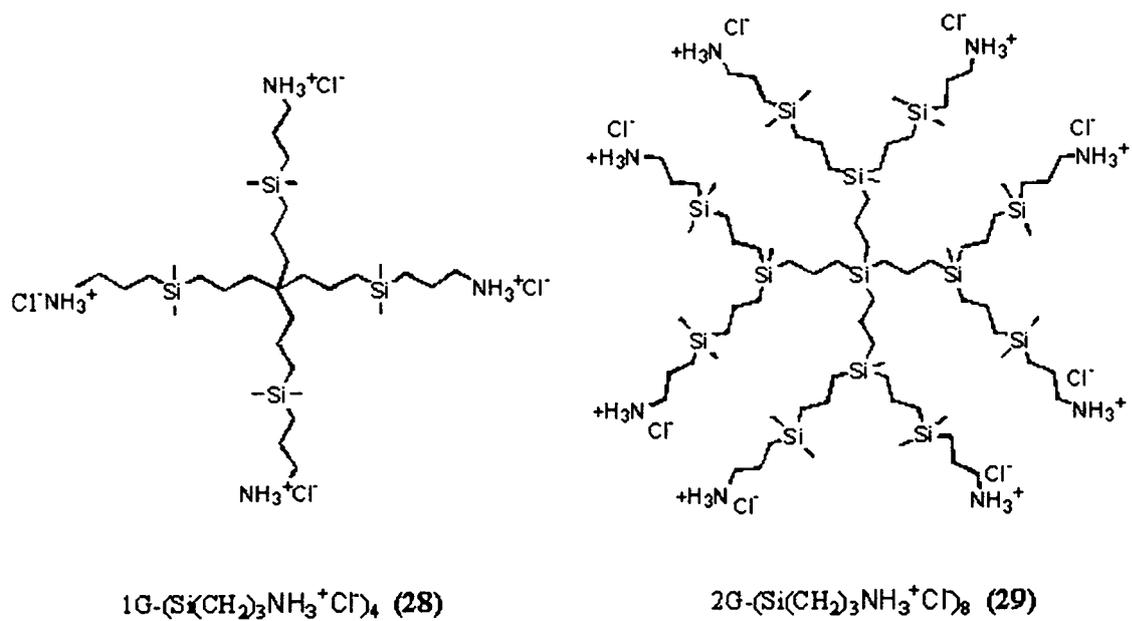


Fig. 2b

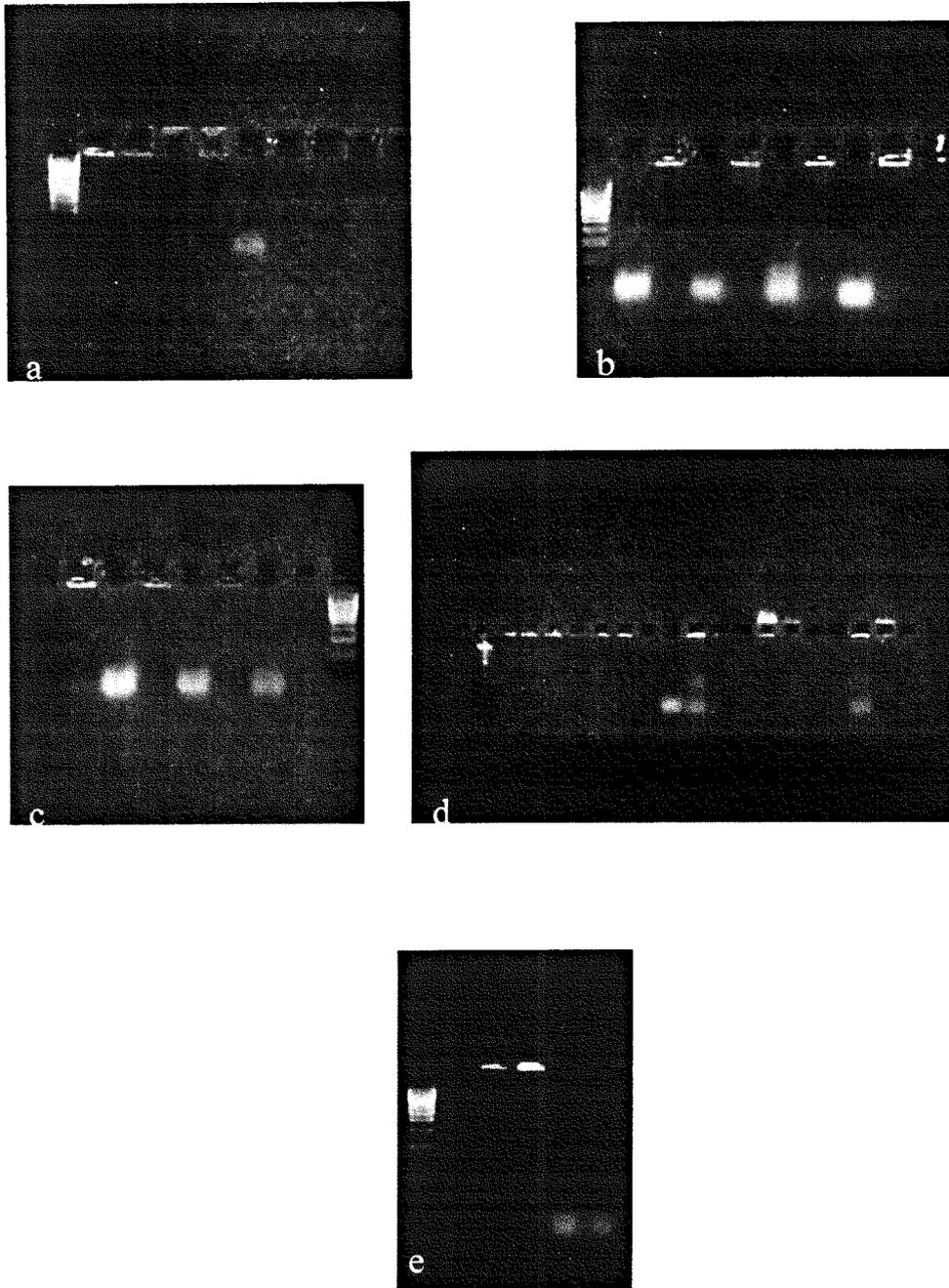


Fig. 3

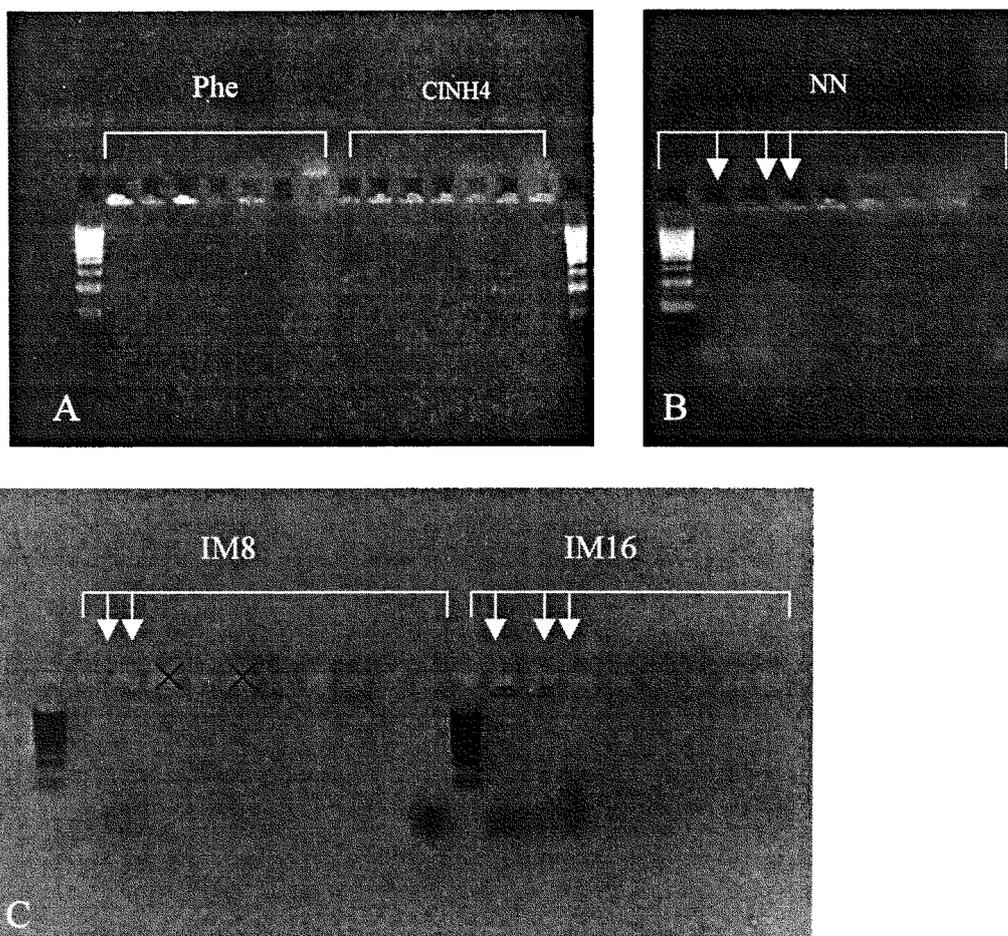


Fig. 4

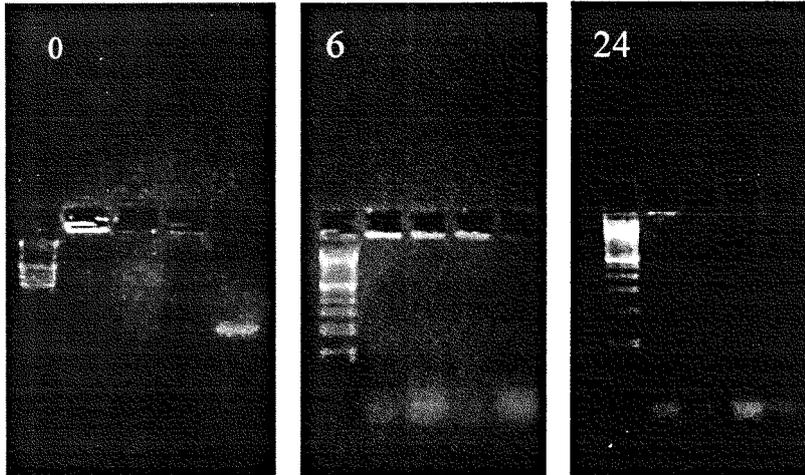


Fig. 5

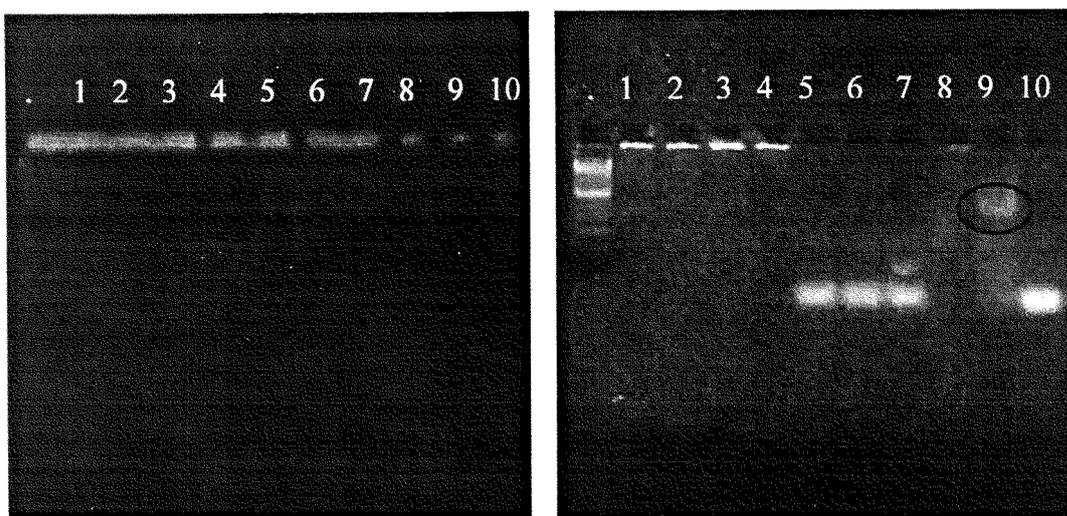


Fig. 6

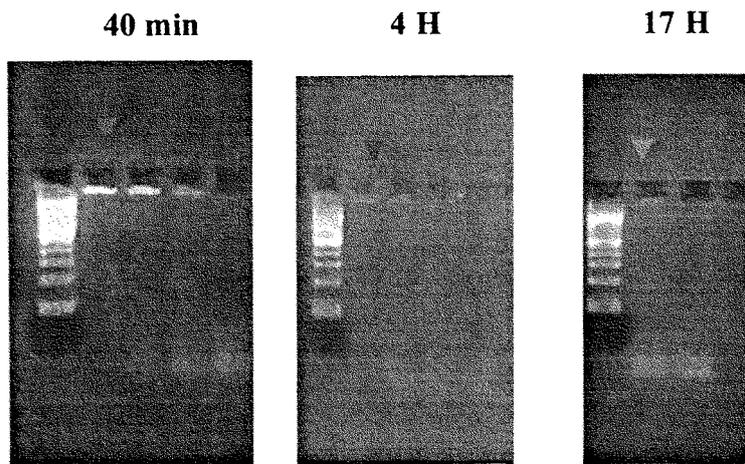


Fig. 7

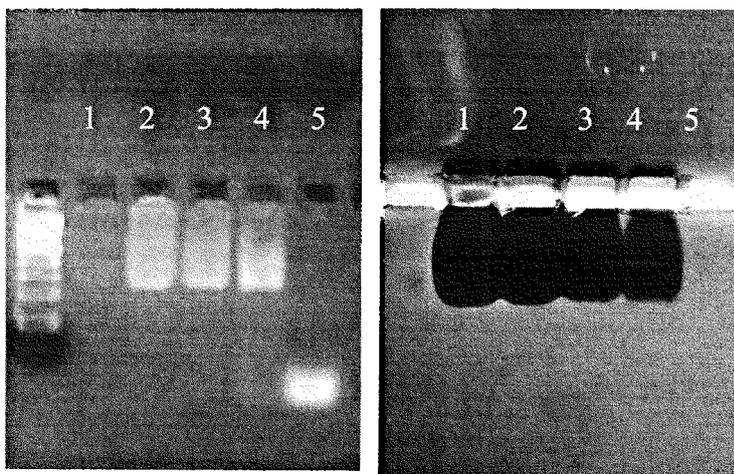


Fig. 8

ES 2 265 291 B1

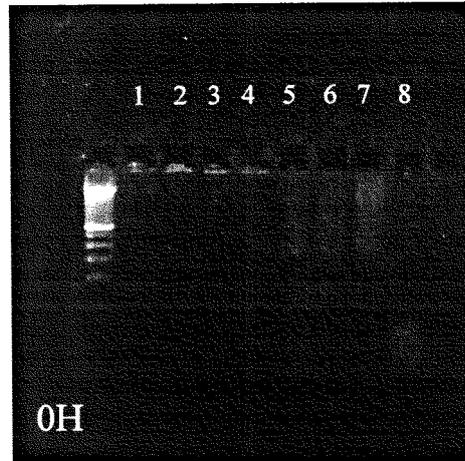


Fig. 9a

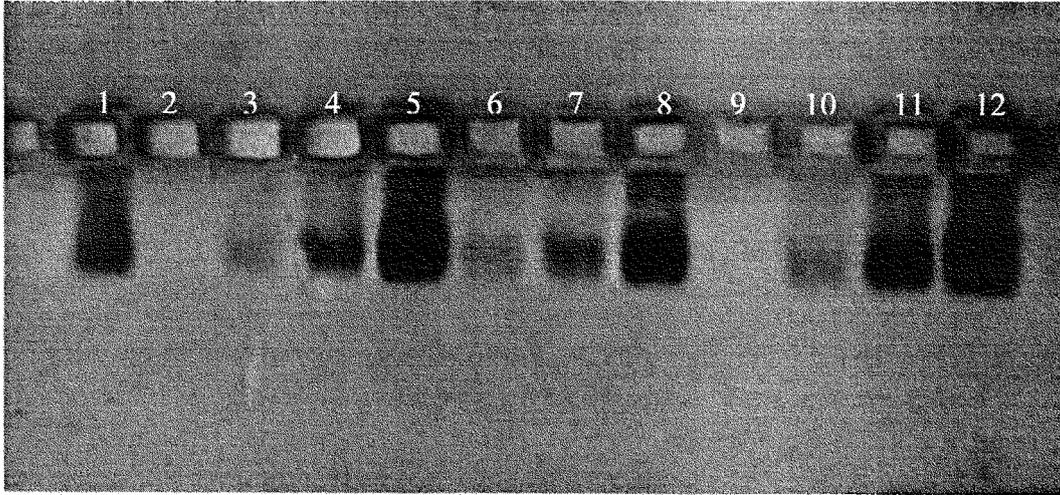


Fig. 9b

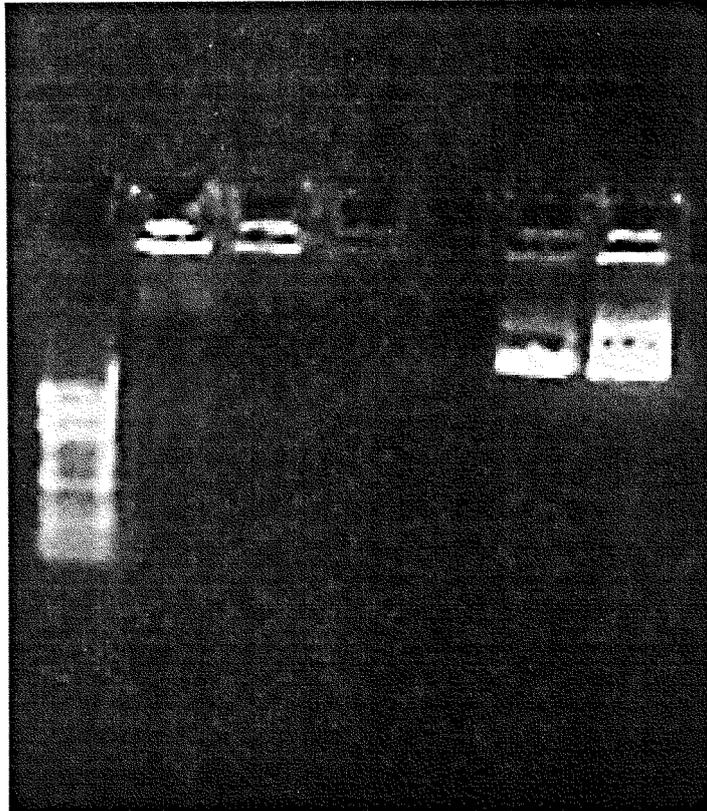


Fig. 10



Fig. 11

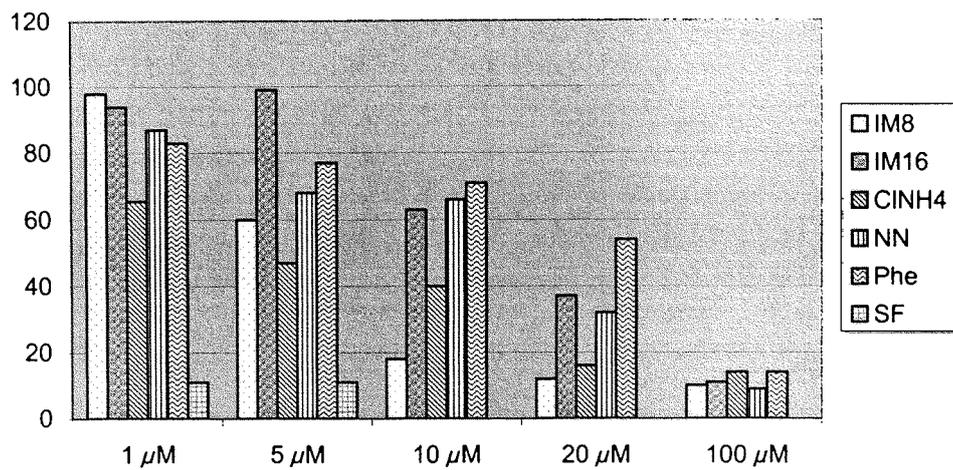


Fig. 12

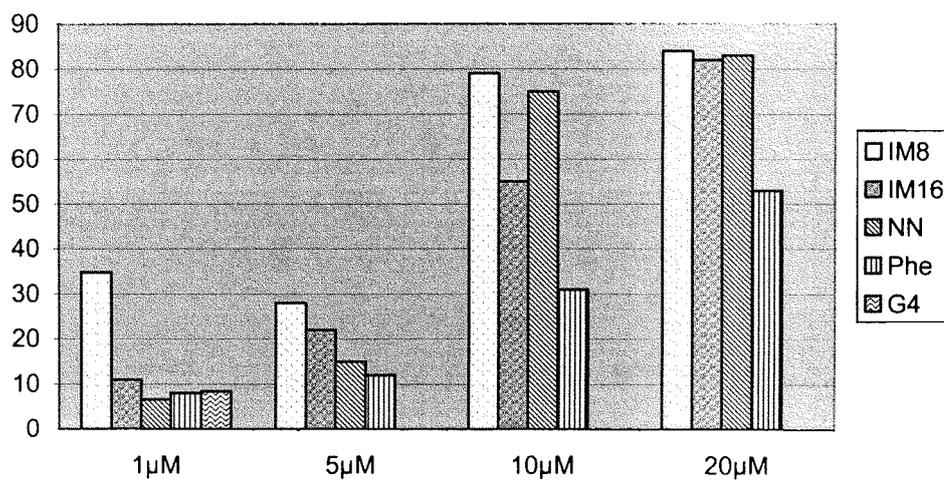


Fig. 13

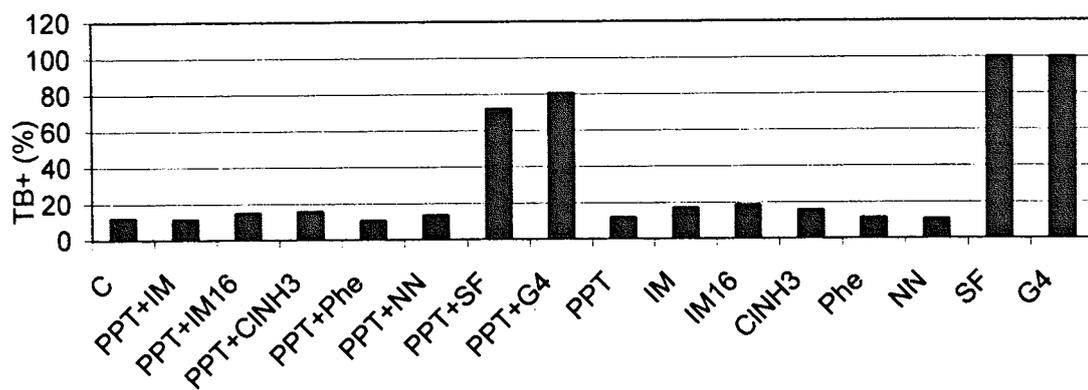


Fig. 14

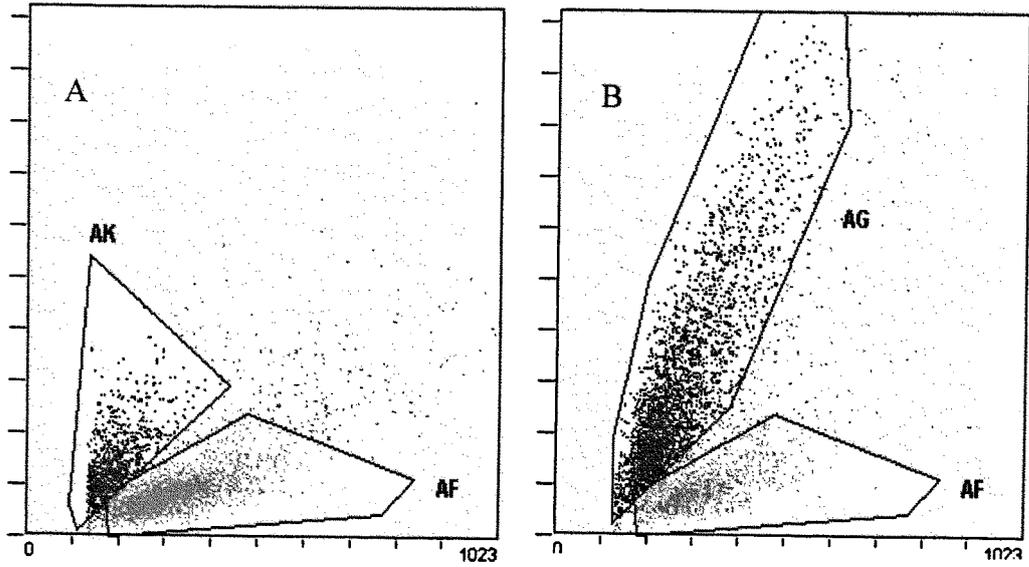


Fig. 15

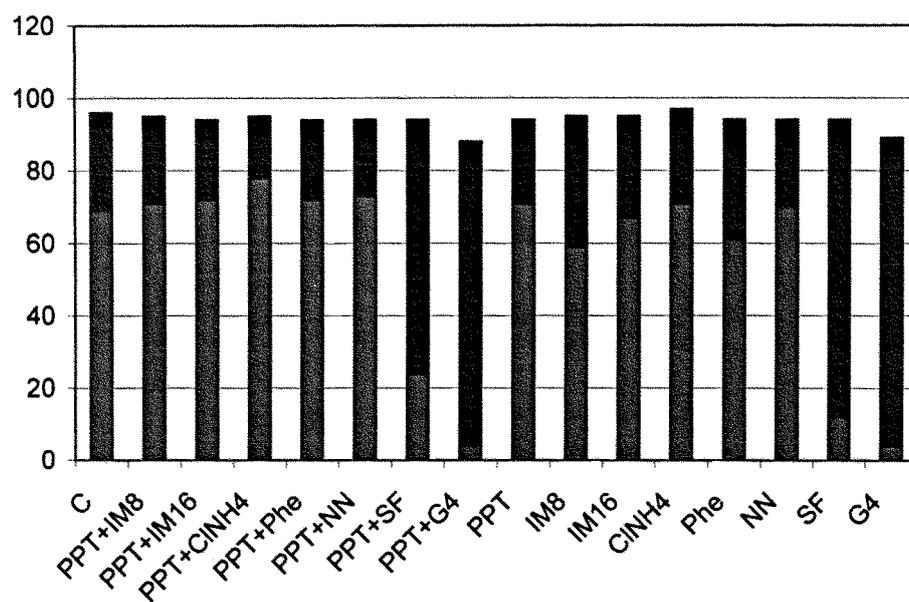


Fig. 16

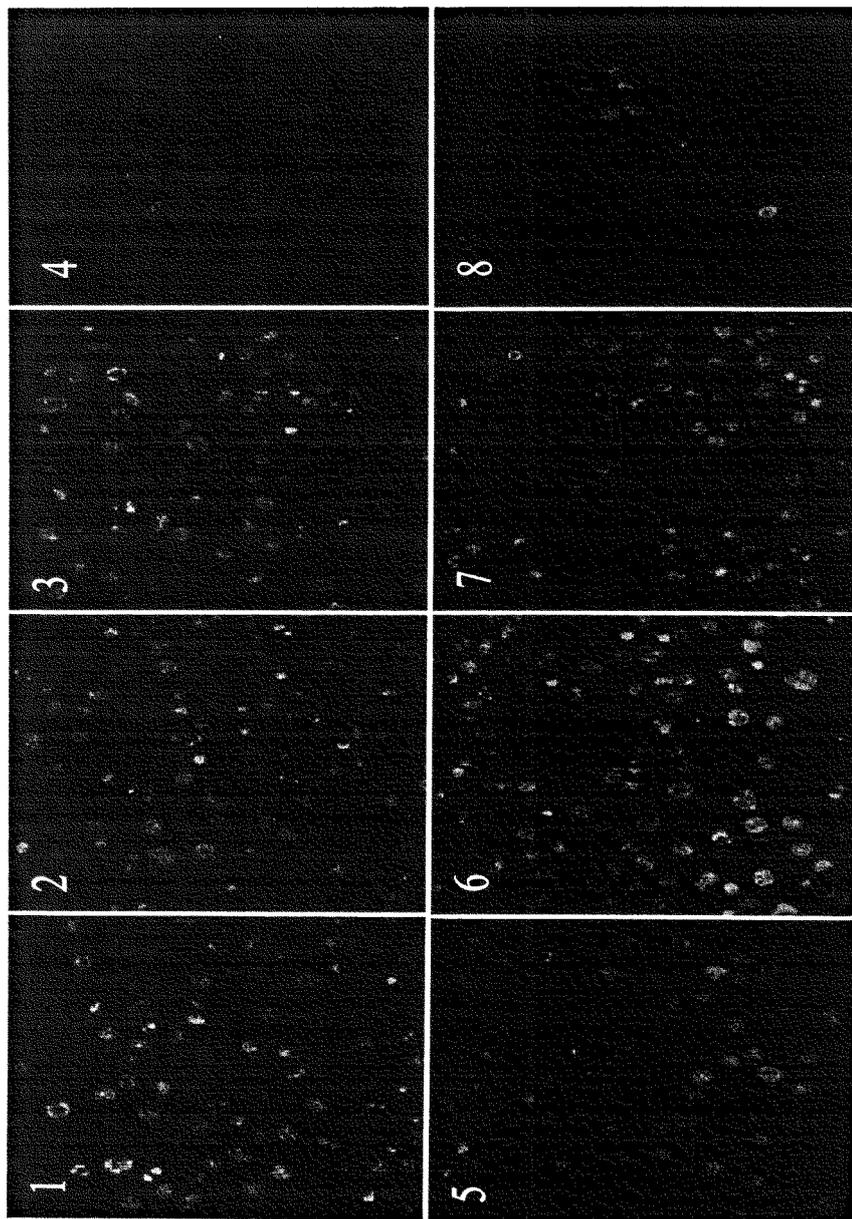


Fig. 17

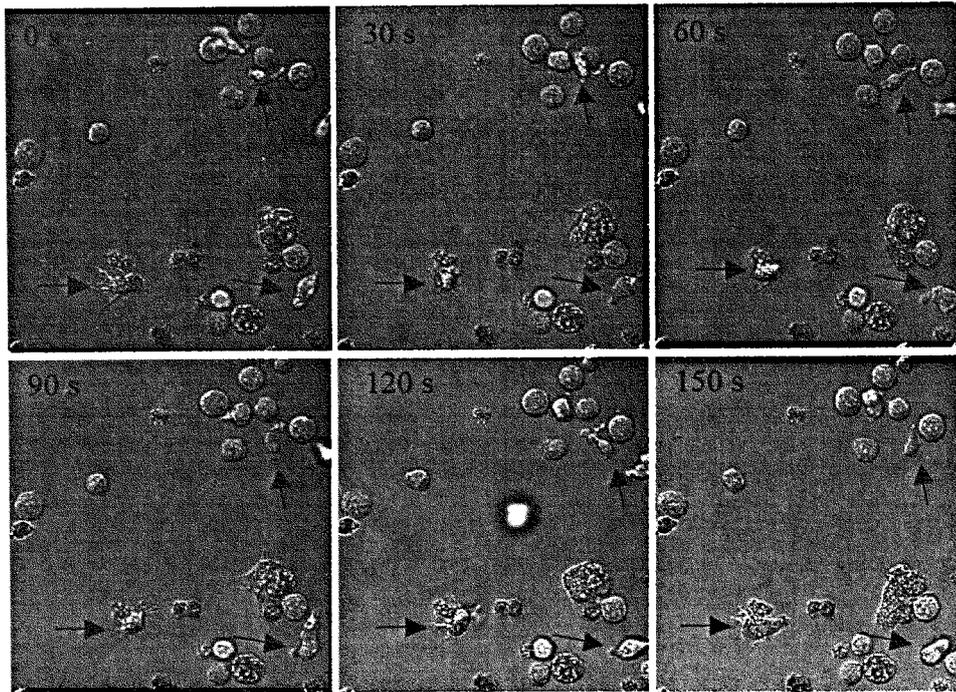


Fig. 18

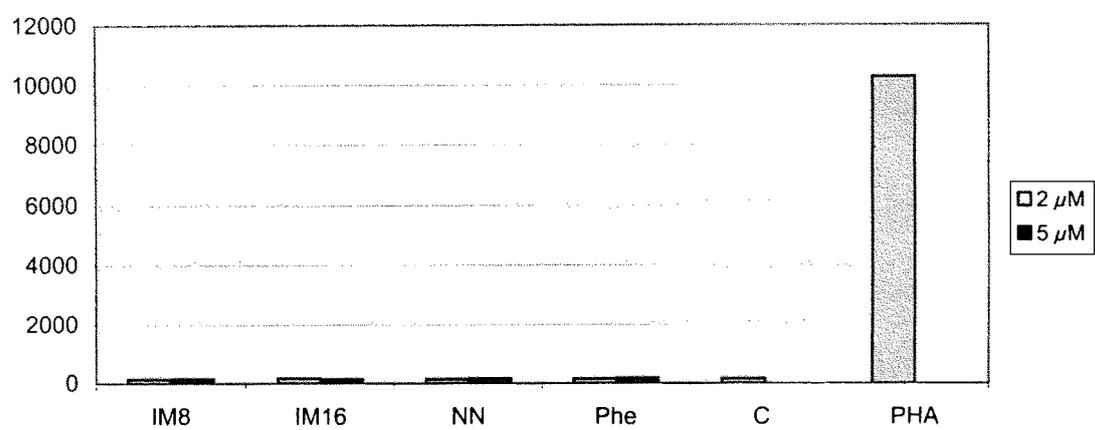


Fig. 19

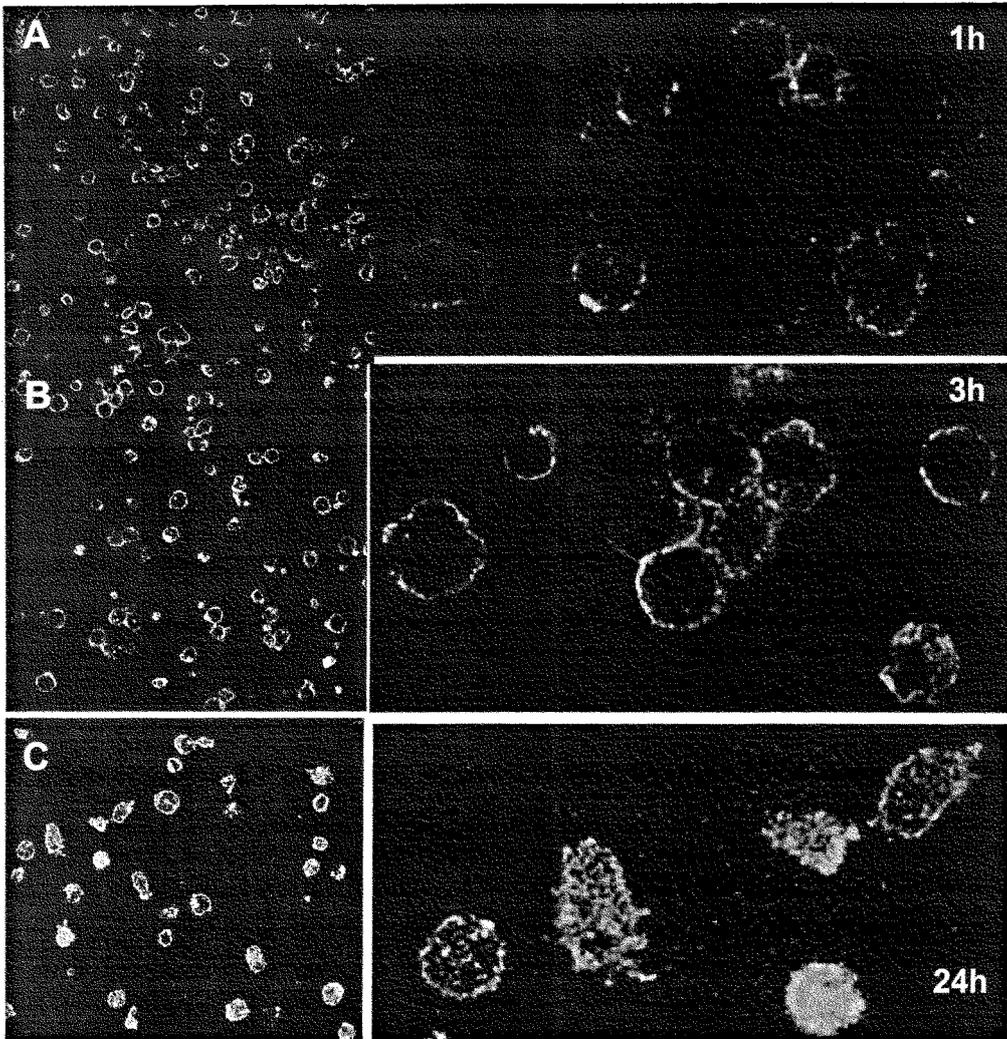


Fig. 20

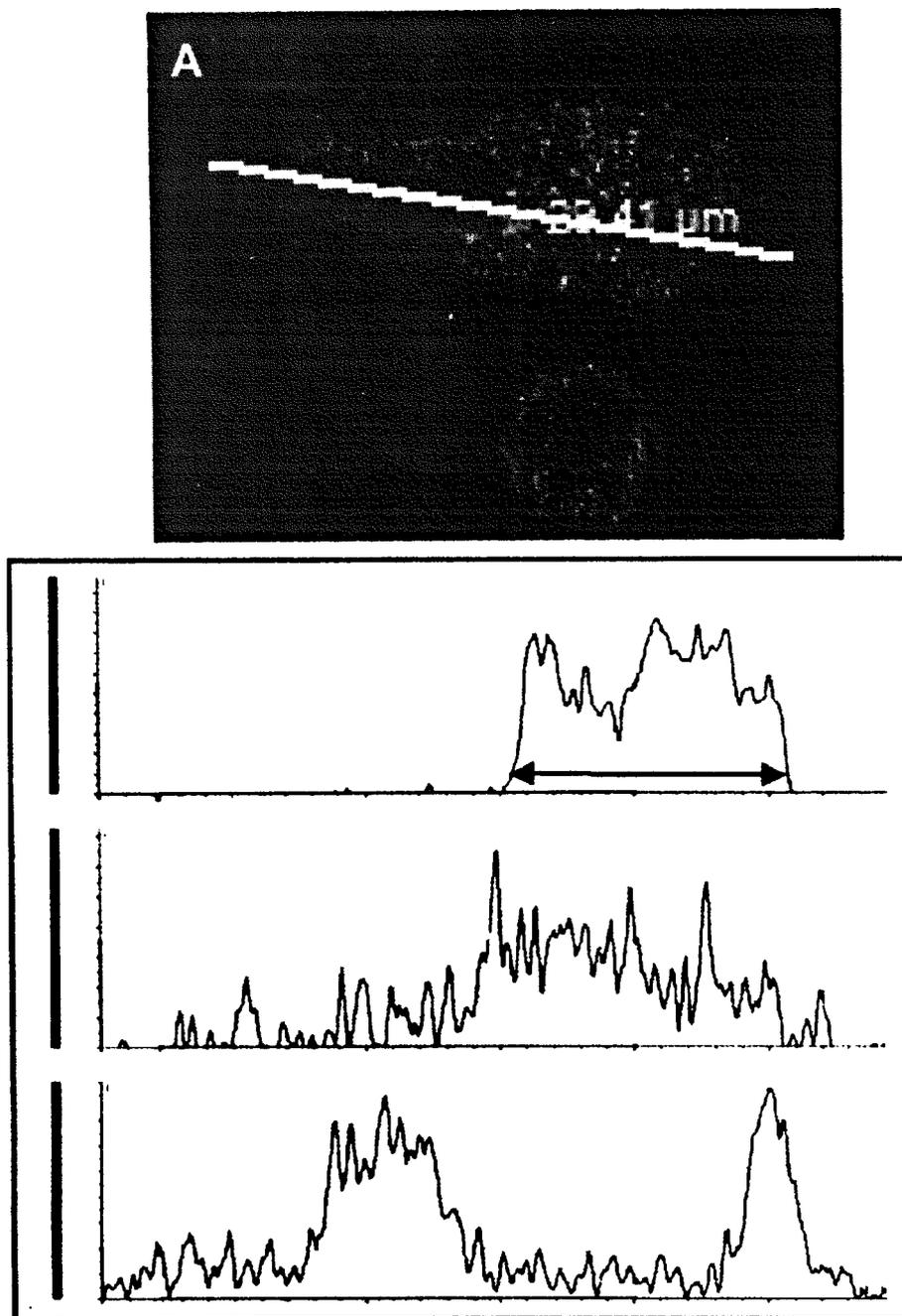


Fig. 21 A

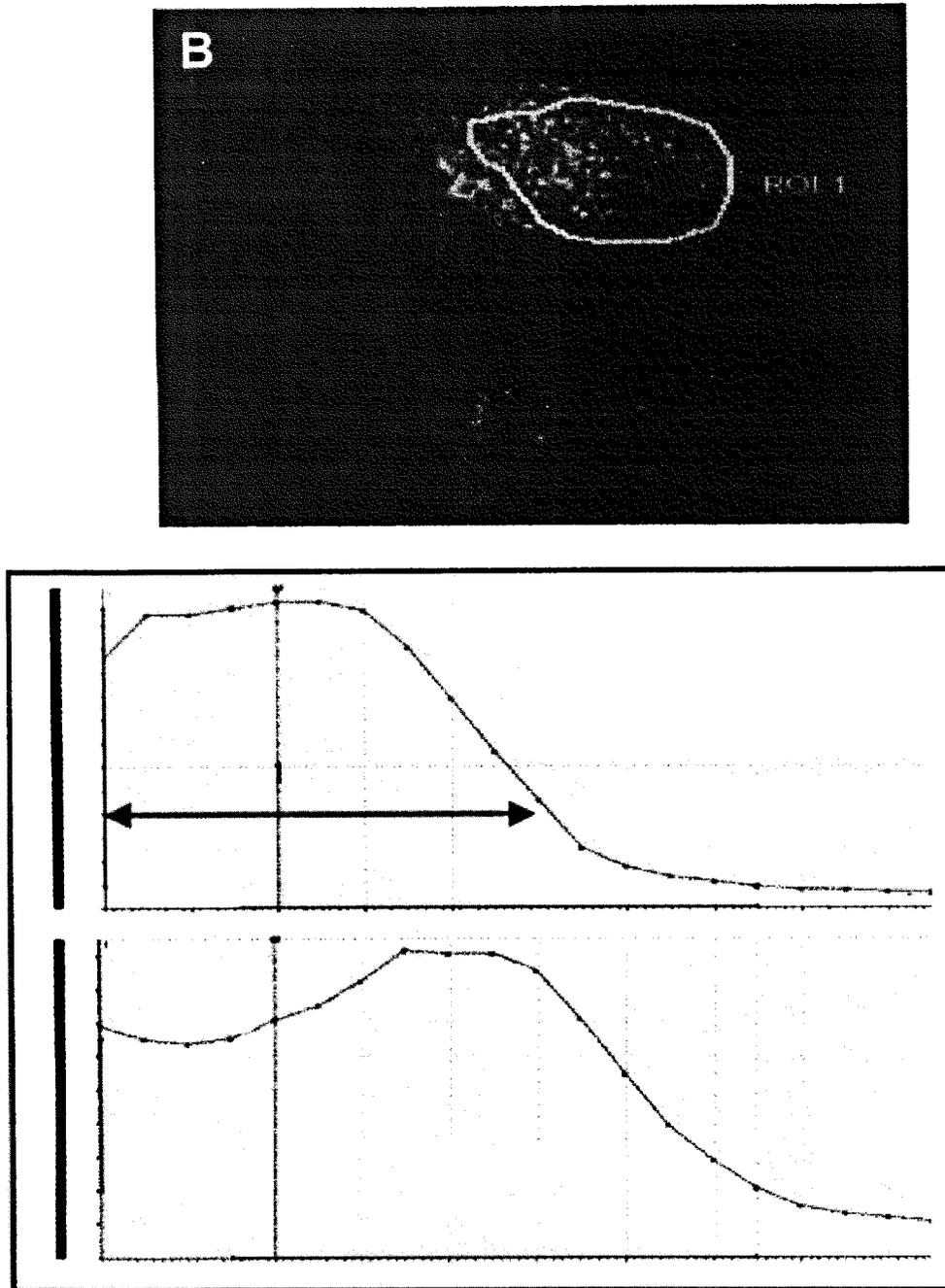


Fig. 21 B

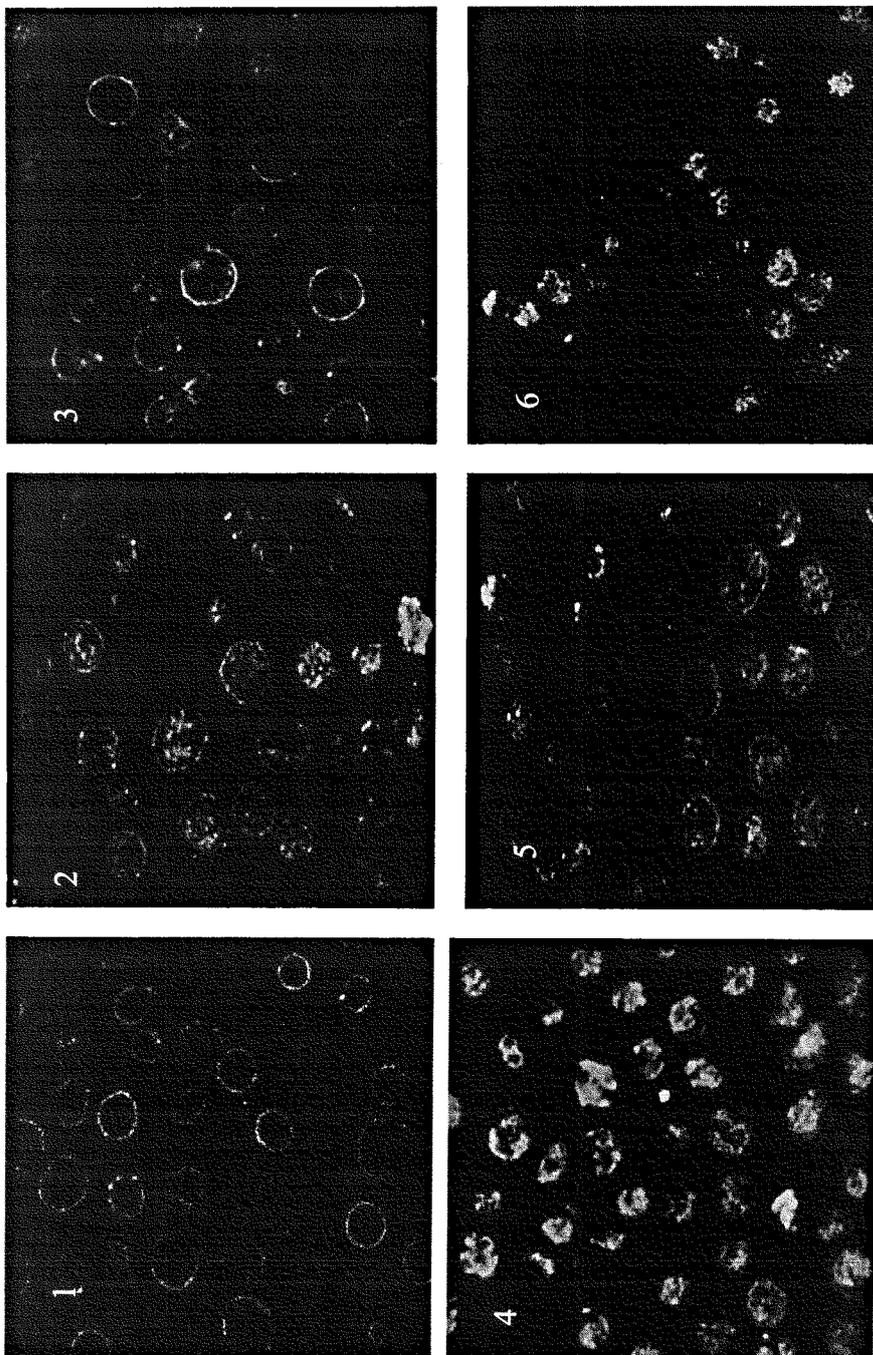


Fig. 22

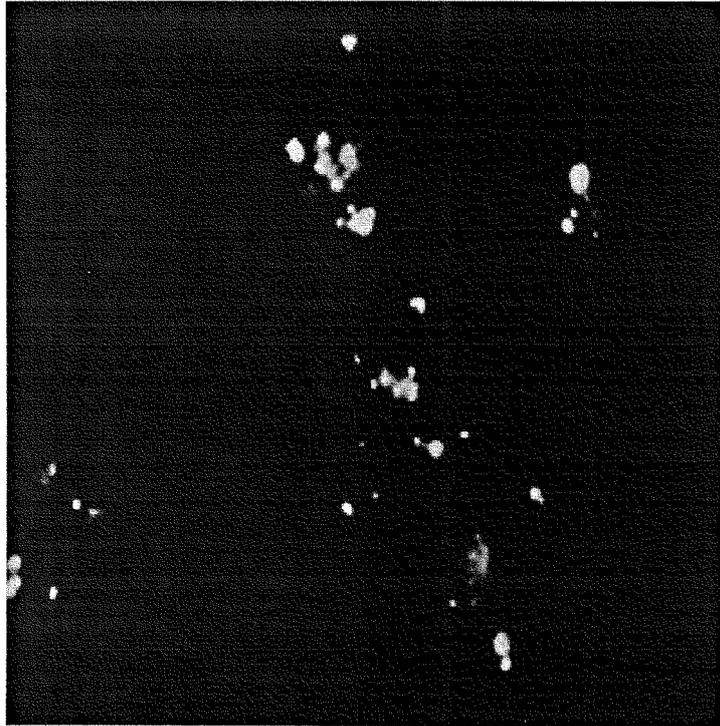


Fig. 23

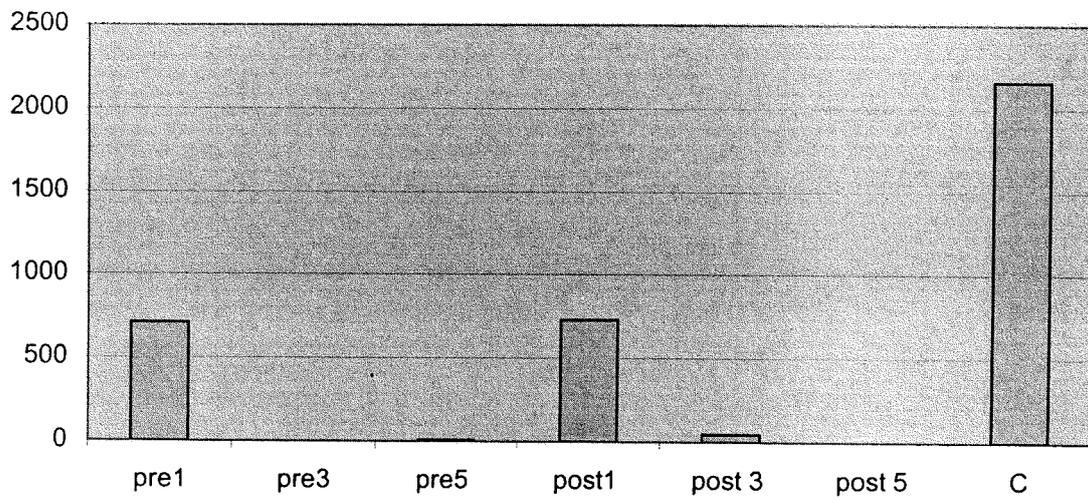


Fig. 25

ES 2 265 291 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
- 5 <120> NUEVOS DENDRÍMEROS CARBOSILANOS, SU PREPARACIÓN Y SUS USOS
- <130> P-100240
- <160> 6
- 10 <210> 1
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <221> Oligodesoxinucleótido antisentido
- <223> GF
- 20 <220>
- <223> Anti-gag
- <220>
- <223> Enlaces fosforotioato de unión entre nucleótidos
- 25 <220>
- <223> fluoresceína en 5'
- <400>
- 30
- ctctcgcacc catctctctc ettct
- <210> 2
- 35 <211> 28
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <221> Oligodesoxinucleótido antisentido
- <223> RF
- <220>
- 45 <223> Anti-Rev
- <220>
- <223> Enlaces fosforotioato de unión entre nucleótidos
- <220>
- 50 <223> Fluoresceína en 5'
- <400>
- 55
- tcgtcgtgt ctccgcttct tctcgcca
- <210> 3
- <211> 18
- 60 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 65 <221> Oligodesoxinucleótido antisentido
- <223> PPT
- <220>

ES 2 265 291 B1

<223> Anti-ARNm

<220>

<223> Enlaces fosforotioato de unión entre nucleótidos

5

<400>

aattttcttt tccccct

10

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Oligodesoxinucleótido antisentido

20

<223> PPT-TFO

<220>

<223> Formador de hélice triple

<220>

25

<223> Enlaces fosforotioato de unión entre nucleótidos

<400>

30

tttcttttg ggggg

<210> 5

<211> 16

35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Oligodesoxinucleótido antisentido

40

<223> TAR

<220>

<223> Anti-TAR

45

<220>

<223> Enlaces fosforotioato de unión entre nucleótidos

<400>

50

gctcccgggc tcgacc

<210> 6

55

<211> 21

<212> ARN/ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<221> ARN interferencia

<220>

<221> AND

65

<222> 20-21

<223> Desoxirribonucleótidos

<223> ARNip anti-CD4

ES 2 265 291 B1

<400>

gaucaagaga cuccucagug a

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 265 291

② N° de solicitud: 200501810

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.07.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 03033027 A2 (UNIVERSITY OF STRATHCLYDE y THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW) 24.04.2003, reivindicaciones 1-17.	1-84
A	LUHMANN B. et al. "Water soluble carbosiloxane dendrimers". Phosphorus, sulfur and silicon and the related elements, 2001, páginas 481-484. Recuperado de CAS/STN [en línea], número de acceso 135:318553 (15.11.2001), resumen.	1,52
A	VAN HEERBEECK R. et al. "Divergent synthesis of carbosilane wedges as dendritic building blocks: a new strategy towards core functionalized carbosilane dendrimers". Tetrahedron Letters, 1999, Vol. 40, páginas 7127-7130. Recuperado de CAS/STN [en línea], número de acceso 131:337471 (10.12.1999), resumen.	1,52
A	BEERENS H. et al. "Low-generation carbosilane dendrimers as core for star polymers using a Ru-ROMP catalyst". Journal of Molecular Catalysis A, 2000, Vol. 151, páginas 279-282. Recuperado de CAS/STN [en línea], número de acceso 132:265537 (05.05.2000), resumen.	1-52
A	US 6184313 B1 (ROOVERS, J.; COMANITA, B.) 06.02.2001, columna 1; columna 5, líneas 29-36.	86-102, 109-119
A	US 2004009500 A1 (BENTERS, R.; NIEMEYER, C.M.; WOHRLE, D.) 15.01.2004, párrafos 2-43.	112,113
A	EP 1302475 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) 16.04.2003, página 1; página 2, párrafo 12; ejemplos 3,4.	103-106, 109,110, 120,121

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

23.11.2006

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 265 291

② Nº de solicitud: 200501810

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.07.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	AULENTA, F.; HAYES, W.; RANNARD, S. "Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices". European Polymer Journal. Septiembre 2003, Vol. 39, Nº 9, páginas 1741-1771. ISSN 0014-3057.	50,86-111, 114-119, 123

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

23.11.2006

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

2/3

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G 77/52 (2006.01)

C07F 7/18 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)