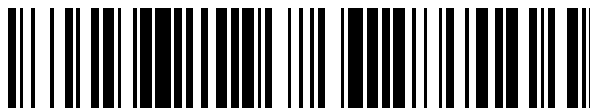


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 655**

21 Número de solicitud: 201030325

51 Int. Cl.:  
**C07C 307/00** (2006.01) **A61P 31/18** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 49/10** (2006.01)  
**A61K 31/16** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **05.03.2010**

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

Fecha de la concesión: **05.11.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.11.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA  
EDIFICIO JOSE PRAT, PZA. DE LA  
UNIVERSIDAD, 2  
02071 ALBACETE, ES**

72 Inventor/es:  
**CEÑA CALLEJO, Valentín;  
SÁNCHEZ VERDU, María Del Prado;  
MERINO GUIJARRO, Sonia;  
GARCIA MARTINEZ, Joquin Calixto;  
RODRIGUEZ LOPEZ, Julian;  
VÁZQUEZ FERNÁNDEZ-PACHECO, Ester;  
HERRERO CHAMORRO, Maria Antonia;  
CAMPO RODRIGO, Ana;  
RUBIO CARRERO, Noelia;  
PEREZ MARTINEZ, Fco. Carlos y  
GUERRA NAVARRO, Fco. Javier**

74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **DENDRIMEROS COMO VEHICULOS NO VIRALES PARA TERAPIA GENICA**

57 Resumen:

Dendrímeros como vehículos no virales para terapia génica.

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

ES 2 370 655 B1

## DESCRIPCIÓN

Dendrimeros como vehículos no virales para terapia génica.

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

## 10 Estado de la técnica anterior

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

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

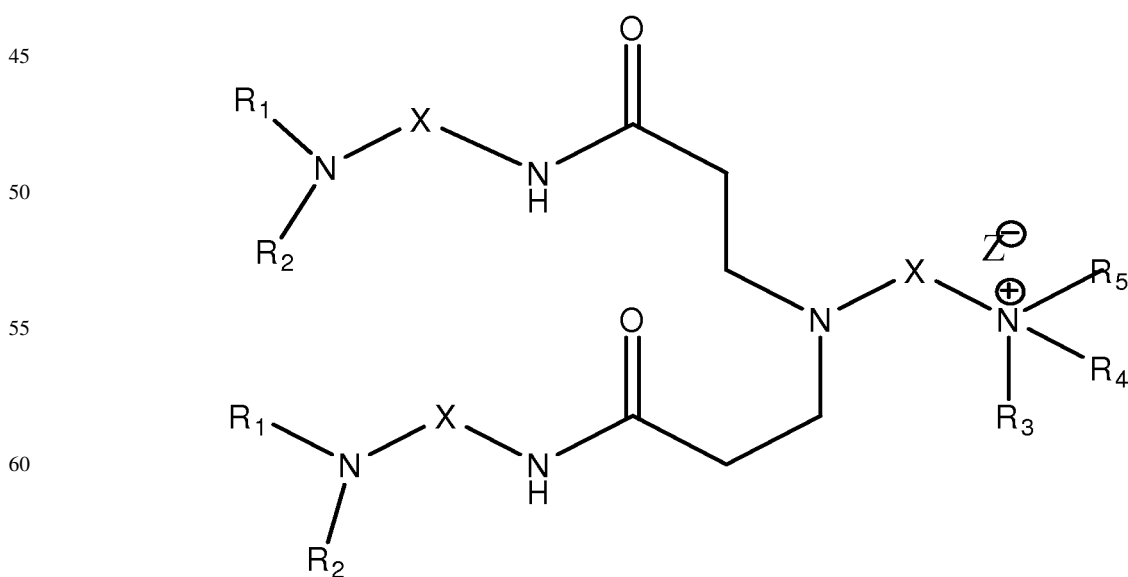
25 Los vectores no virales poseen una serie de ventajas con respecto a los análogos víricos: a) facilidad en la preparación (incluso a escala multigramo) y modificación, b) mayor flexibilidad con respecto al tamaño del material genético a transfectar, c) son generalmente seguros *in vivo* y d) no provocan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

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

## 35 Descripción de la invención

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

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



(I)

o una sal, prodroga o solvato del mismo;

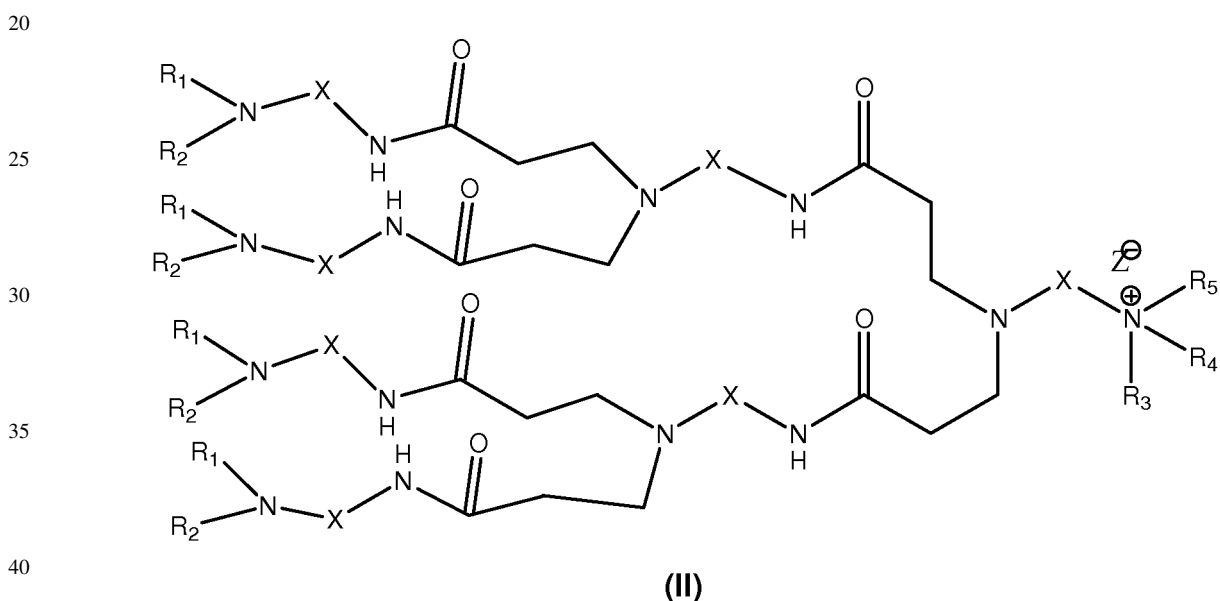
donde:

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

10 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalqueno, arilo o heteroarilo,

15 Z se selecciona entre cualquier anión cloruro, trifluoroacetato, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir, fármaco, anticuerpo, sonda, (radiactiva o no) para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen (Resonancia Magnética Nuclear, Tomografía por emisión de fotón simple o Tomografía por emisión de positrones) o cualquier combinación de los mismos.

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



45 o una sal, prodroga o solvato del mismo;

donde:

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

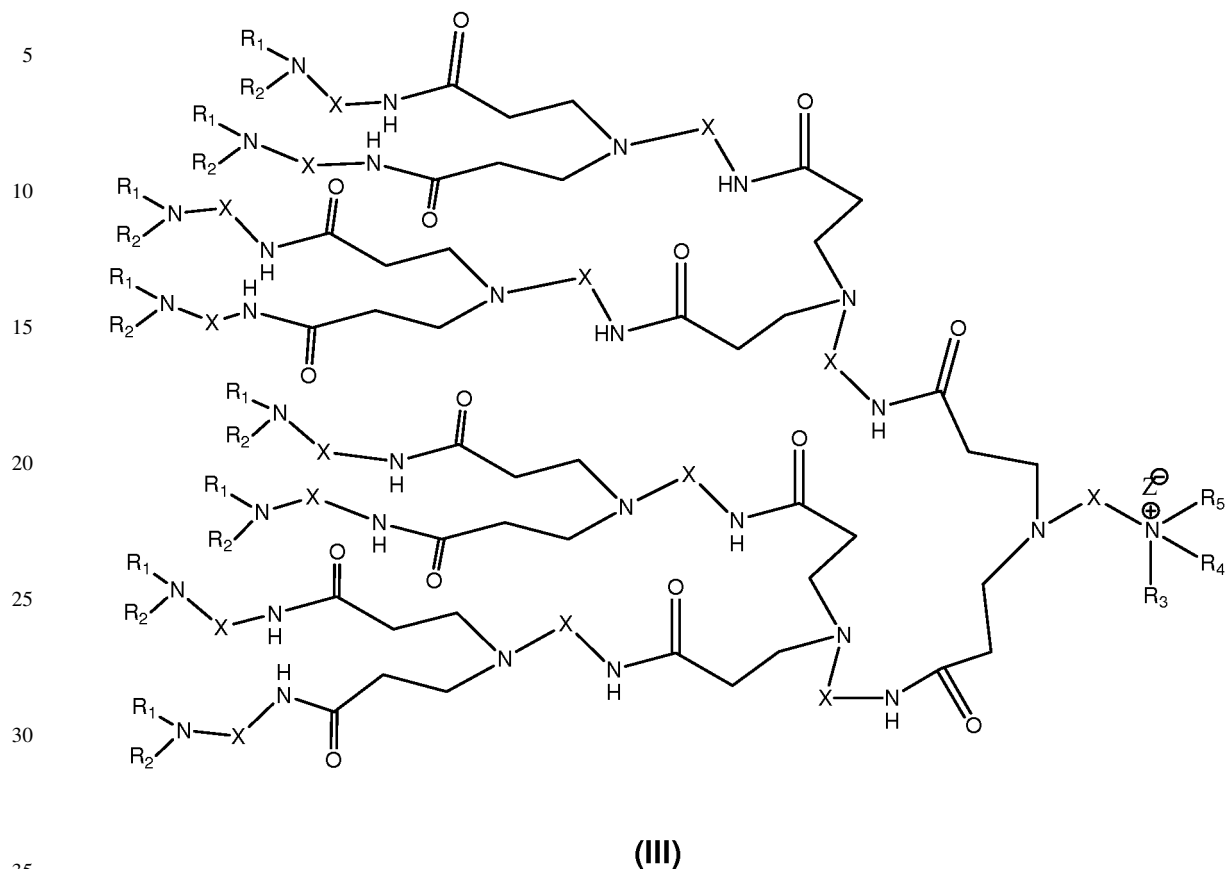
55 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalqueno, arilo o heteroarilo,

60 Z se selecciona entre cualquier anión cloruro, trifluoroacetato, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir, fármaco, anticuerpo, sonda, (radiactiva o no) para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen (Resonancia Magnética Nuclear, Tomografía por emisión de fotón simple o Tomografía por emisión de positrones) o cualquier combinación de los mismos.

60

65

Según otra realización preferida, se refiere a un compuesto de fórmula general (III):



o una sal, prodroga o solvato del mismo;

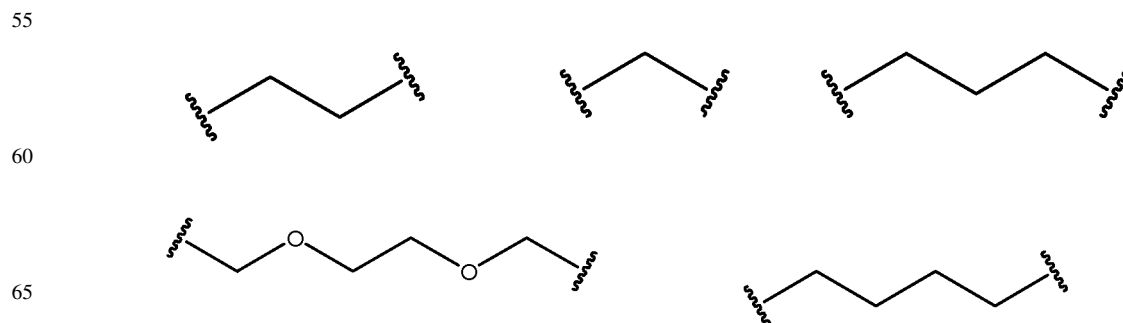
donde:

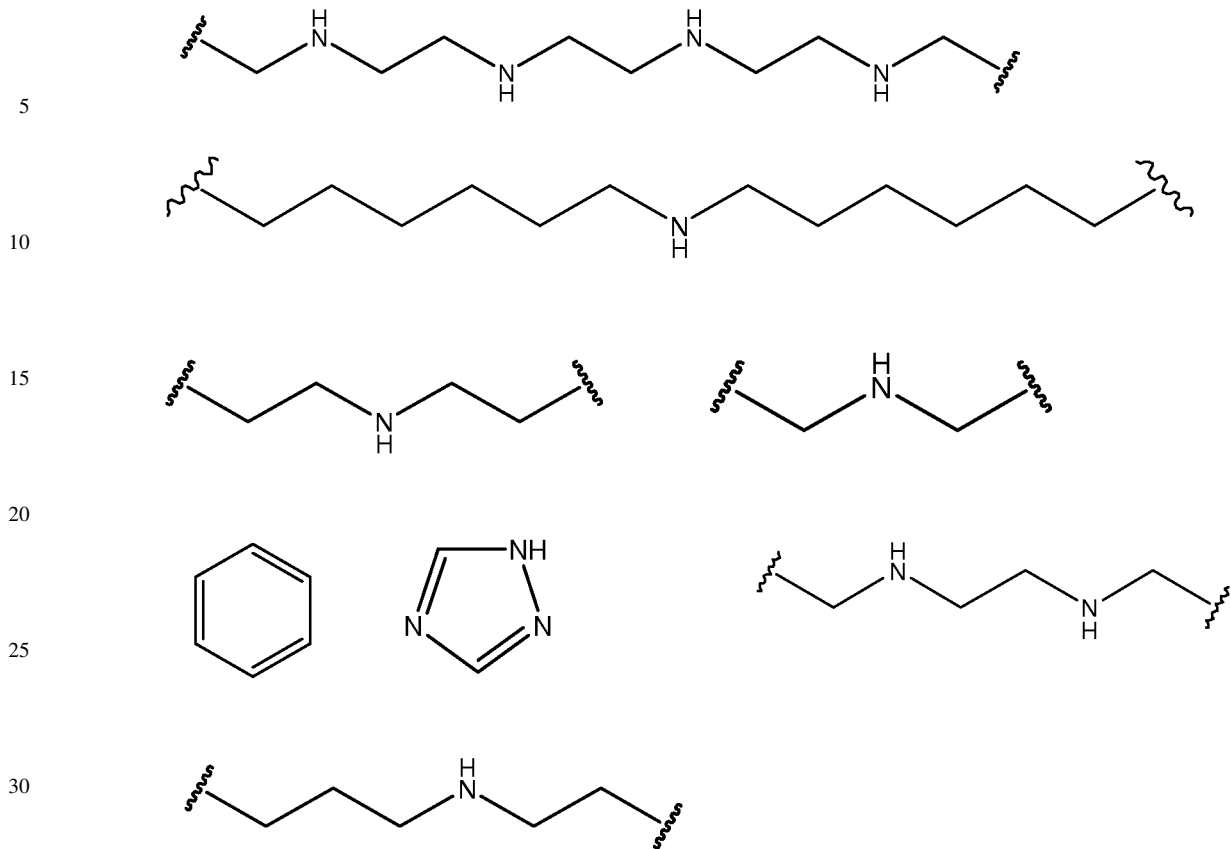
X se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>) o cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) o cicloalquenilo, arilo o heteroarilo,

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquenilo, arilo o heteroarilo,

Z se selecciona entre cualquier anión cloruro, trifluoroacetato, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir o cualquier combinación de los mismos.

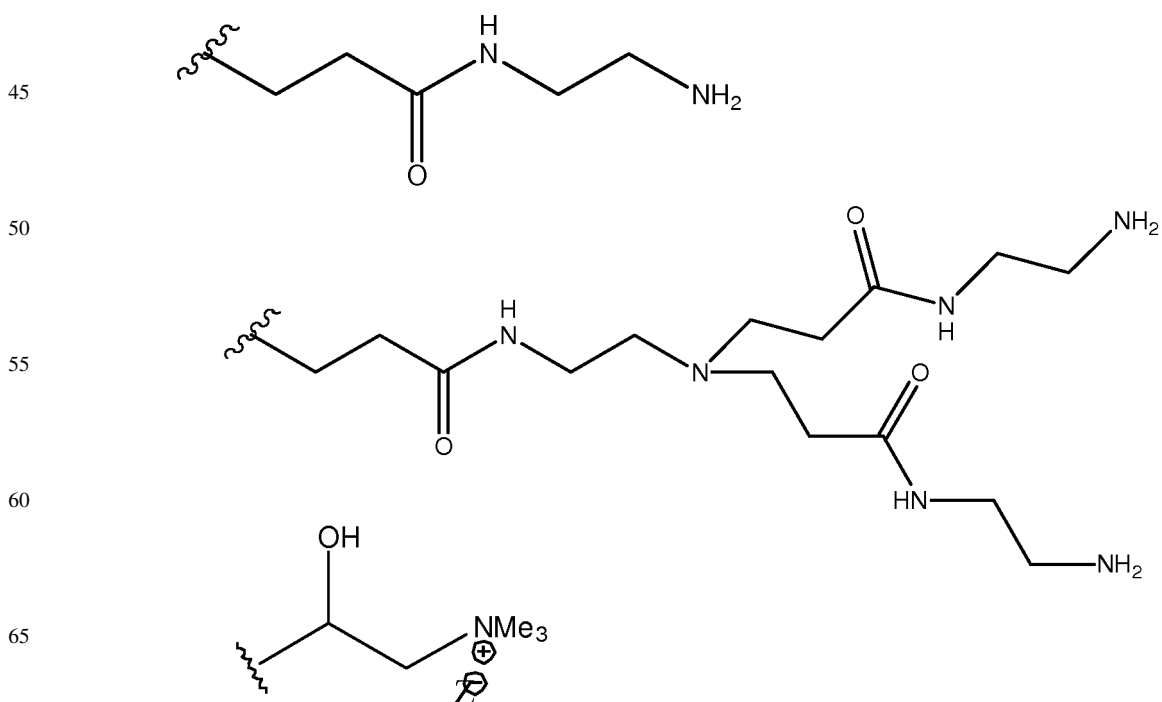
En otra realización preferida, tanto para el compuesto de fórmula general (I), como para el de fórmula general (II) o (III), X se selecciona sin sentido limitativo entre:

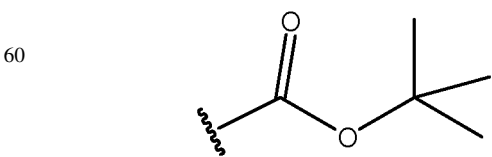
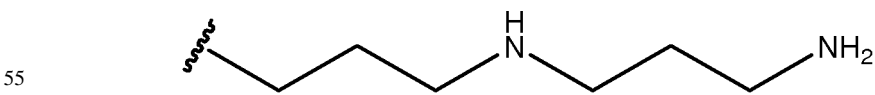
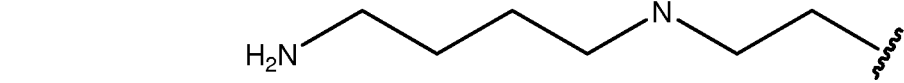
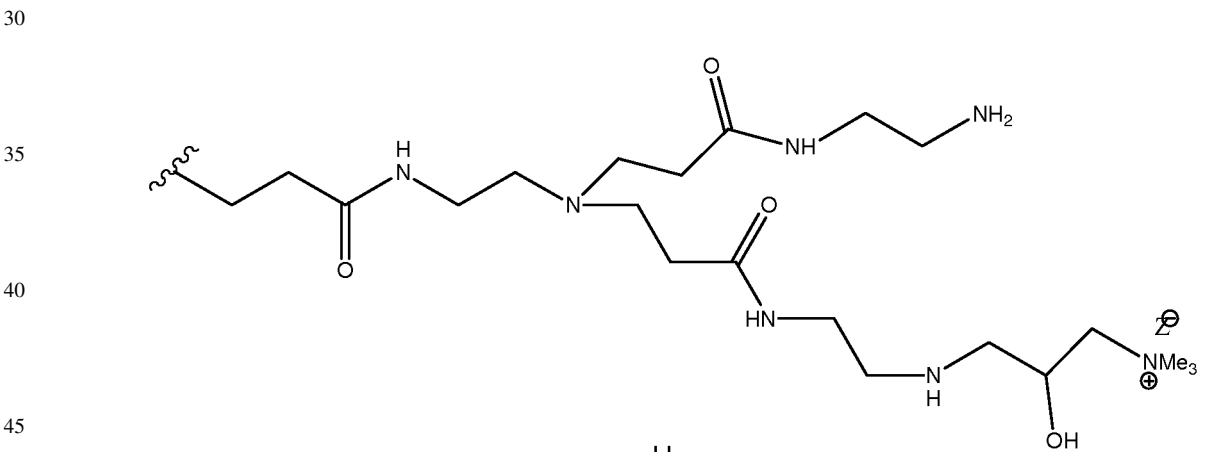
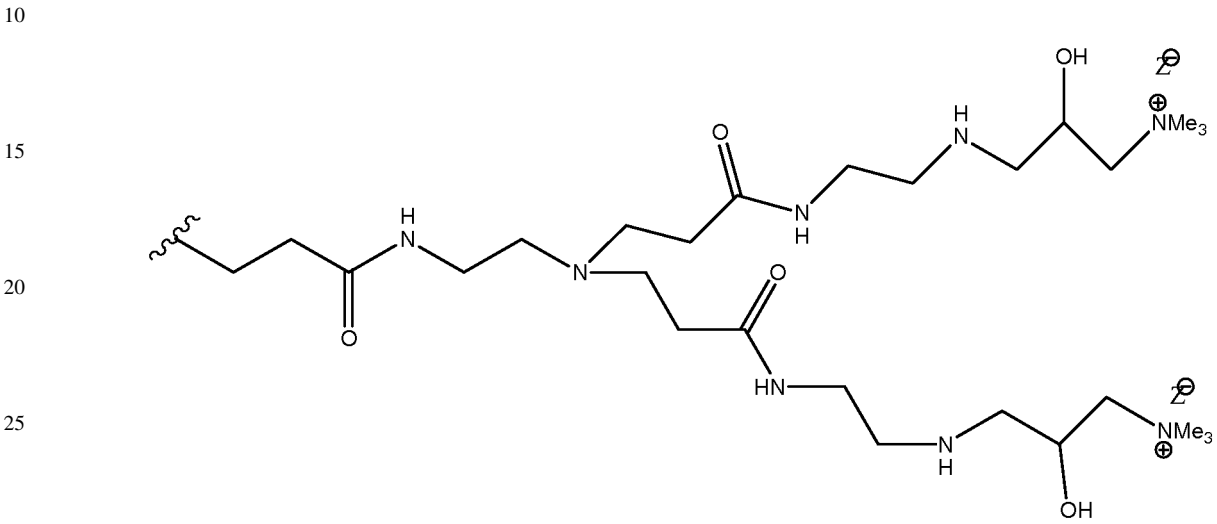
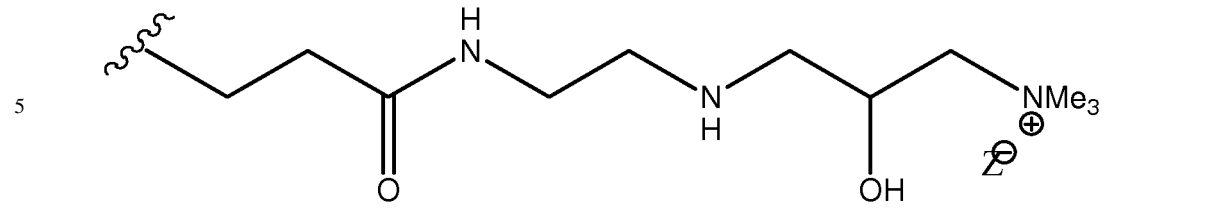




35 Según otra realización preferida, los radicales  $R_1$  a  $R_5$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, cualquier amina sustituida o no sustituida, aminoácidos básicos como por ejemplo la lisina o la arginina, derivados del colesterol a partir de cloroforniato de colesterol, ácido láctico, ácido fólico, dexametasona, azúcares como por ejemplo y sin sentido limitativo, la lactosa o la mañosa a partir de su derivado de tosilo, agentes lisosomotrónicos como por ejemplo la cloroquina, heterociclos nitrogenados como la uridina, la piperidina o la piperazina, cadenas hidrofílicas derivadas de poli-etilenglicol, cualquier diacrilato, cualquier aminoácido básico y las siguientes estructuras:

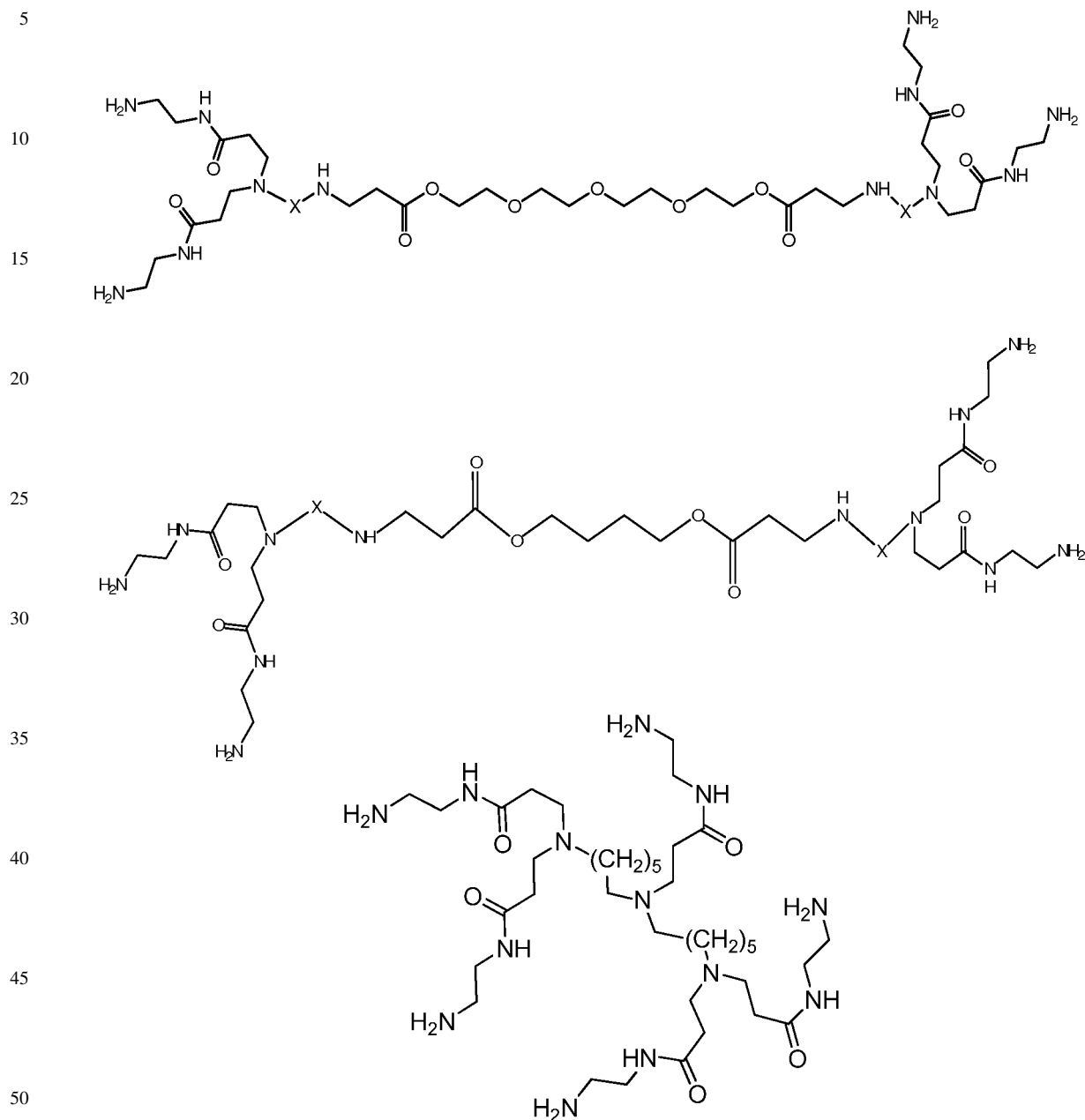
40





65

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



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

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

65

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

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

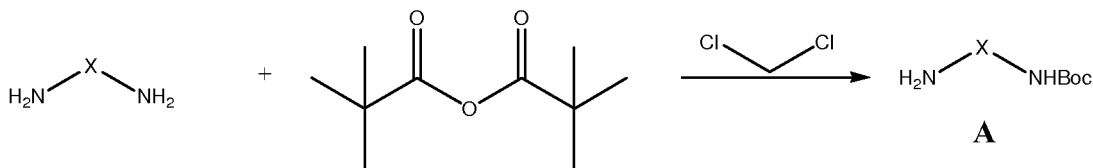
Los derivados o prodrogas particularmente favoritos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando se administran tales compuestos a un paciente (por ejemplo, haciendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba mas fácilmente por la sangre), o que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

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

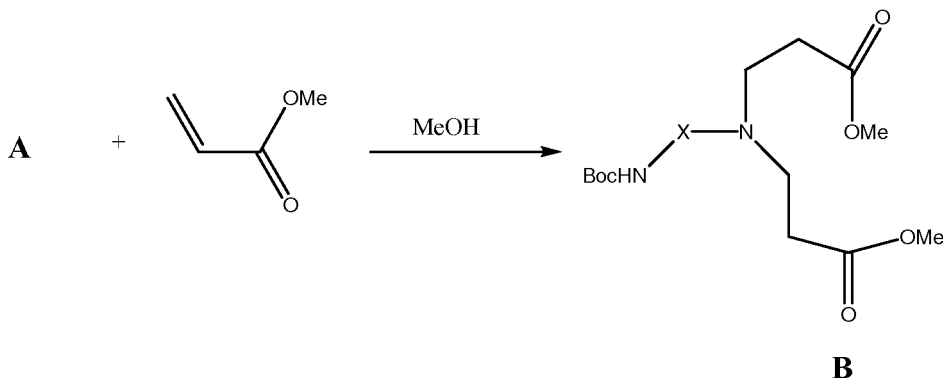
Los compuestos de fórmula (I), (II) y (III) pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas están dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica. Los solvatos adecuados son solvatos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

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

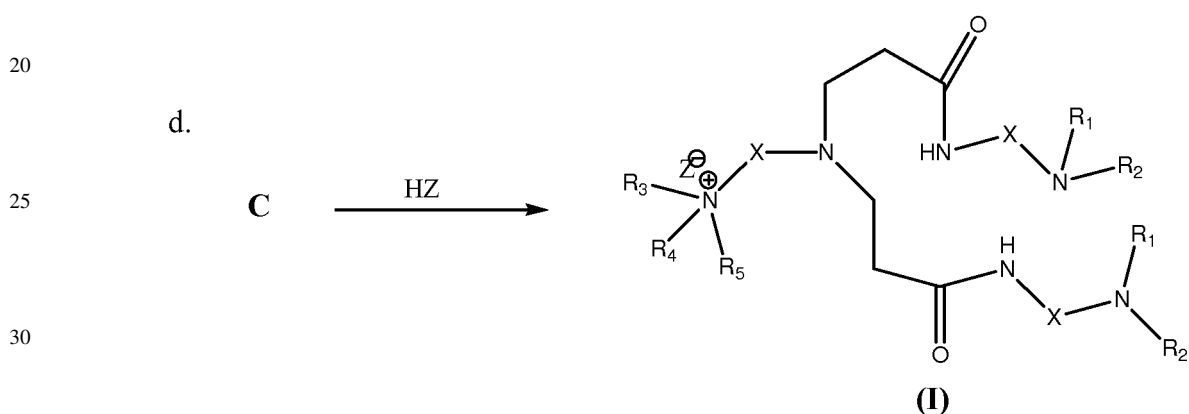
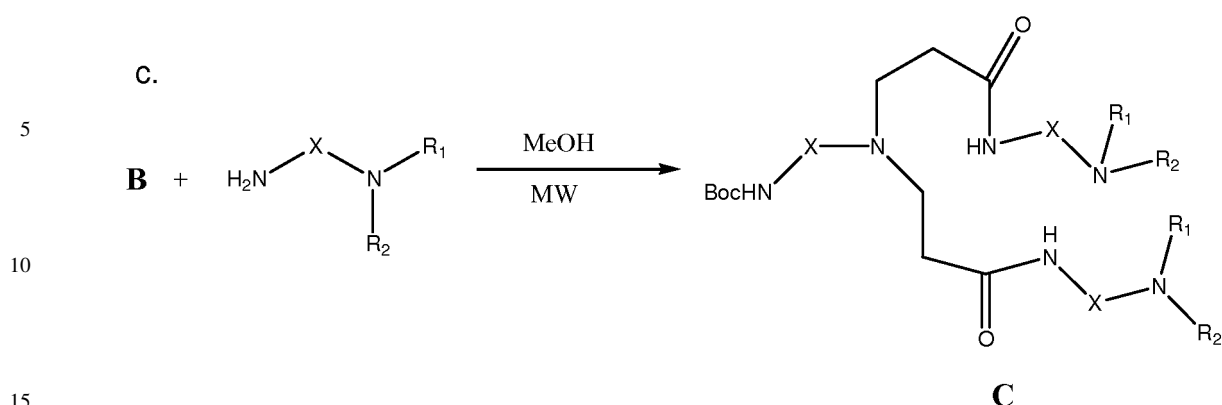
a.



b.







35 Los valores de  $R_1$ - $R_5$ , X y Z como se han descrito anteriormente.

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

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

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

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del medicamento mencionado anteriormente para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, accidentes cerebrovasculares y enfermedades que cursan con procesos tumorales.

60 Por tanto, los compuestos de la presente invención podrían ser utilizados para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que se seleccionan de la lista que comprende: enfermedades del sistema nervioso como son las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Parkinson, demencia incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica), accidentes cerebrovasculares (incluyendo la patología derivada de la trombosis y la hemorragia cerebral). También se incluye en este apartado el tratamiento de tumores (especialmente de próstata, de pulmón y de mama, sin que esta lista este limitada y sea excluyente de otros tipos de patología tumoral).

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) para la elaboración de un kit de transfección de siRNA en cultivos primarios.

Preferentemente los cultivos primarios se seleccionan del grupo formado por: células nerviosas, glia, células tumorales y otras células primarias como los hepatocitos.

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

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

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

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

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

20 Otra realización preferida de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica útil para el tratamiento de patologías como enfermedades del sistema nervioso como son las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Parkinson, demencia incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica), accidentes cerebrovasculares (incluyendo la patología derivada de la trombosis y la hemorragia cerebral). También se incluye en este apartado el tratamiento de tumores (especialmente de próstata, de pulmón y de mama, sin que esta lista este limitada y sea excluyente de otros tipos de patología tumoral) o, en general, de enfermedades susceptibles de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los compuestos descritos en la presente invención, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto, en cantidad terapéuticamente efectiva, de fórmula (I), (II) o (III), o mezclas de los mismos, una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

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

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

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

45 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

50

### Breve descripción de las figuras

55 Fig. 1, se refiere al análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento al compuesto de fórmula general (I). Los números en (A) corresponden a diferentes ratios N/P (aminas nitrogenadas en compuesto de fórmula general (I)/fosfatos en siRNA): (1) 1:0 (siRNA sólo), (2) 100:1, (3) 200:1, (4) 400:1, (5) 800:1, (6) 1600:1 y (7) 3200:1. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

60 Fig. 2 se refiere al estudio de la toxicidad del compuesto de fórmula general (I) en neuronas corticales. Las células se trataron con diferentes concentraciones del compuesto de fórmula general (I) (75 a 2400  $\mu$ M) durante 48. La viabilidad celular se evaluó cuantificando el porcentaje de LDH liberada al medio de cultivo. Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, n=12. \* p <0,05, comparados con el control.

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

Fig. 4 describe el curso temporal de la cuantificación de la transfección del complejo compuesto de fórmula general (I)-siRNA fluorescente en neuronas corticales de rata (A, C) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B, D) mediante su estudio por citometría de flujo. Los complejos se formaron con distintas concentraciones del compuesto de fórmula general (I) y 100 nM de siRNA fluorescente. Se estudiaron los efectos tras tratamientos de 48 horas (A, B) o 72 horas (C, D). Los datos se expresan como media (% control)  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \*  $p < 0,05$ , comparados con el control.

Fig. 5 describe el efecto del dendriplejo del compuesto de fórmula general (I)-siRNA sobre niveles de mRNA y proteína en neuronas granulares de rata. Estudio de la transfección, durante 48 horas, de neuronas granulares de rata, con el dendriplejo del compuesto de fórmula general (I) (300  $\mu$ M)-siRNA (100 nM) contra Cofilina 1. La efectividad de la transfección fue determinada mediante real-time PCR (A) y Western blot (B). Mediante real-time PCR (A) se cuantificó el RNAm de COFILINA 1 y  $\beta$ -actina (control endógeno) y mediante Western blot (B) se analizó la expresión proteica de COFILINA 1 y GAPDH (control endógeno). Los datos se expresan como el porcentaje de inhibición de los niveles de cofilina 1 frente a los niveles en neuronas no tratadas. Los datos representan media  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \*  $p < 0,05$ , comparados con el control.

Fig. 6 describe el efecto del dendriplejo del compuesto de fórmula general (I)-siRNA sobre niveles de mRNA y proteína en neuronas corticales de rata. Estudio de la transfección, durante 48 horas, de neuronas corticales de rata, con el dendriplejo del compuesto de fórmula general (I) (150  $\mu$ M)-siRNA (100 nM) contra Cofilina 1. La efectividad de la transfección fue determinada mediante real-time PCR (A) y Western blot (B). Mediante real-time PCR (A) se cuantificó el RNAm de COFILINA 1 y  $\beta$ -actina (control endógeno) y mediante Western blot (B) se analizó la expresión proteica de COFILINA 1 y GAPDH (control endógeno). Los datos se expresan como el porcentaje de inhibición de los niveles de cofilina 1 frente a los niveles en neuronas no tratadas. Los datos representan media  $\pm$  SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. \*  $p < 0,05$ , comparados con el control.

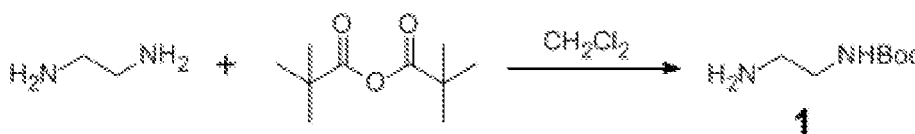
### Ejemplos de realización de la invención

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

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

#### Ejemplo 1

##### 1.1. Síntesis de 2-aminoetilcarbamato de *terc*-butilo (1)



En un matraz de 500 mL se prepara una disolución de etilendiamina (26.97 g, 0.449 mol) (previamente destilada sobre óxido de calcio e hidróxido potásico) en 200 mL de diclorometano. Nota: Se ha llevado a cabo con el producto sin destilar con idénticos resultados.

La disolución se enfría en baño de hielo a  $0^\circ\text{C}$ . Sobre esta disolución, se añade gota a gota una disolución previa de carbonato de di-*terc*-butilo (8.82 g, 0.040 mol) en 50 mL de diclorometano. La adición transcurre durante 2-3 h.

Tras la adición, se retira el baño de hielo y se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente bajo fuerte agitación (tiempo aprox. 12 h). Tras este tiempo se elimina el disolvente a presión reducida formándose un aceite amarillento.

Al crudo de reacción se le añaden 100 mL de agua destilada, para precipitar el compuesto disustituido y se filtra.

Posteriormente, la fase acuosa se extrae varias veces con acetato de etilo (4 x 25 mL), añadiendo a la fase acuosa una disolución saturada de NaCl para facilitar la extracción. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico y se filtra. Se elimina el disolvente en rotavapor a presión reducida formándose un aceite amarillento.

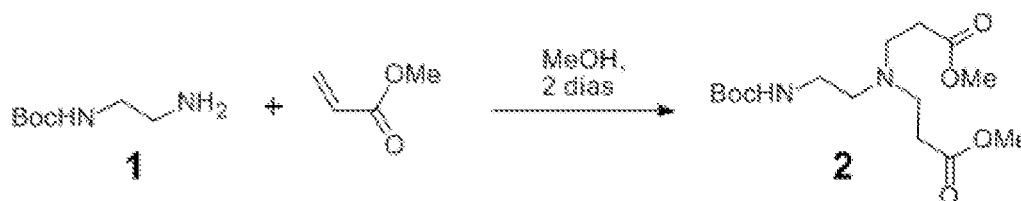
5 El producto se termina de purificar mediante cromatografía en columna. (Fase estacionaria: gel de sílice; fase móvil: gradiente de disolvente que va desde AcOEt:MeOH 9:1 a AcOEt:MeOH 1:1). Tras la columna, el producto está puro mediante 1H-RMN. Rendimiento: 4.25 g, 66%. Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos en la literatura (*J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10042-10055).

10 Nota: Este producto es comercial, pero su síntesis sale más económica. En la literatura está descrita su síntesis con un rendimiento cuantitativo (*Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 2675-2686).

### 1.2. Síntesis de 3,3'-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilazadienil)dipropanoato de dimetilo

15

20



25

En un matraz de 500 mL, previamente enfriado a 0°C con un baño de hielo, se prepara una disolución de 2-aminoetilcarbamato de *tert*-butilo (1) (5.18 g, 32.3 mmol) en 250 mL de metanol. Sobre esta disolución se añade gota a gota una disolución previa de acrilato de metilo (8.34 g, 96.9 mmol) en 80 mL de metanol.

30

Tras la adición, la mezcla se deja agitar a temperatura ambiente durante 2 días. Nota: Variaciones en el tiempo entre 2 y 6 días no dan lugar a cambios en el proceso. Este proceso se puede acelerar calentando a reflujo de metanol (66°C) durante 2-3 horas.

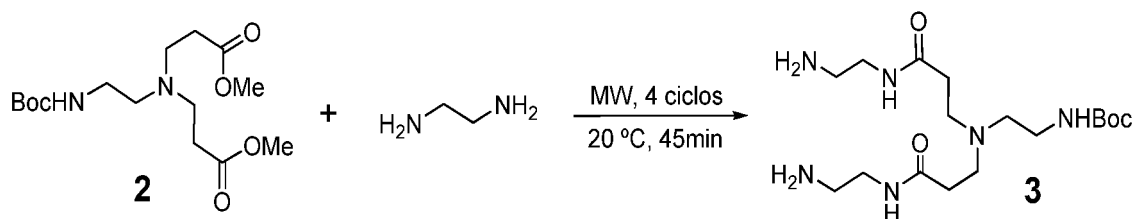
35 Tras este tiempo, el disolvente se elimina en rotavapor a presión reducida formándose un aceite ligeramente amarillo. El matraz se acopla a la línea de vacío durante varias horas, eliminando así los restos de acrilato de metilo. Rendimiento: 8.84g, 95%. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura (*Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 3-5).

40

### 1.3. Síntesis de 2-(bis(3-(2-aminoetilamino)-3-oxopropil)amino)etilcarbamato de *tert*-butilo (3) bajo irradiación microondas

45

50



55 En un matraz de microondas se mezclan el ester 2 (0.60 g, 2.08 mmol) disuelto en 3 mL de metanol y la etilendiamina (1.33 g, 20.8 mmol). Se le acopla un refrigerante de reflujo y se introduce en el reactor microondas CEM DISCOVER S-Class al cual se le acopla un dispositivo Cool-mate cuya misión es evitar que la temperatura aumente con motivo de la radiación y así mantener la misma constante. Se irradia a una potencia de 40 W controlando la temperatura a 20°C.

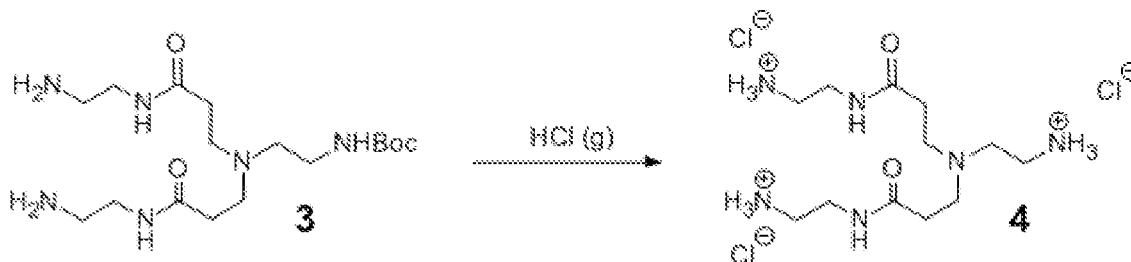
60

El progreso de la reacción se realiza mediante 1H-RMN observando la desaparición progresiva de la señal de -OMe a 3.67 ppm en CD<sub>3</sub>OD. Tras cuatro ciclos de 45 min., en los que se alternan intervalos de 10 min de no radiación para no dañar el reactor microondas, la reacción se da por concluida.

65 Tras este tiempo, el disolvente se elimina en rotavapor a presión reducida, sin calentar el baño más de 40°C. El exceso de etilendiamina es eliminado mediante el uso de una mezcla azeotrópica de tolueno:metanol (9:1) (3 veces) en el rotavapor y finalizando con metanol. El matraz se acopla a la línea de vacío para eliminar restos de disolventes.

Una mayor purificación del producto se realiza disolviéndolo en la mínima cantidad de diclorometano y precipitándolo en éter dietílico (3 veces) Se centrifuga durante 5 min a 6500 rpm. y se obtiene un aceite ligeramente amarillento. Rendimiento: 0.44 g, 54%. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura (*Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 3-5).

#### 1.4. Síntesis del triclorhidrato derivado de 3,3'-(2-aminoetilazadienil)bis(N-(2-aminoetil)propanamida) (4)



En un matraz de 50 mL se disuelve la amina 3 (0.69 g, 1.78 mmol) en 30 mL de metanol. Una vez disuelto, se introduce el matraz en baño de hielo y se le burbujea cloruro de hidrógeno, HCl(g) (2 veces x 3 minutos) dejando un intervalo de 5 min sin borbotear HCl(g) para evitar sobrecalentamiento. Tras ese tiempo, y aún bajo atmósfera de HCl(g), el matraz se cierra con un septum y se deja agitando toda la noche. Se observa la aparición de un precipitado blanco.

Tras este tiempo (aprox. 12 h) el disolvente se elimina en rotavapor a presión reducida, sin calentar el baño más de 40°C. Se obtiene un sólido amarillento. Rendimiento: 0.656 g, 93%. <sup>1</sup>H-RMN (499.772 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 2.92 (t ancho, 2H), 3.12 (t ancho, 2H), 3.35 (s ancho, 8H), 3.52 (t ancho, 4H), 3.59 (t ancho, 4H).

#### Ejemplo 2

##### Cultivos de líneas celulares

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

El cultivo de neuronas granulares del cerebelo se obtuvieron conforme a protocolos descritos previamente (*J Neurochem.* **2007**; *103*:1396-407), con pequeñas modificaciones. Brevemente, crías de 7 días de edad de la cepa Spragle-Dawley fueron decapitadas rápidamente y se extrajeron los cerebros cuidadosamente. Separamos el cerebelo asépticamente, quitamos las meninges y se cortó el cerebelo en trozos de unos 0,4 mm. A continuación, se expuso el tejido a tripsina y DNAsa en un medio de cultivo libre de calcio y magnesio y se sembraron en placas de cultivo pretratadas con poli-lisina. Las células se cultivaron en medio BME suplementado con 24,5 mM de potasio, 2 mM de glutamina, 10% de FBS y 50 µg/mL de gentamicina. A las 24 horas, Ara-C (cytosine arabinoside) se añadió al medio para obtener una concentración final de 10 µM para reducir el crecimiento de astrocitos. Las células se utilizaron no antes de 7 días tras el cultivo, que es el tiempo que necesitan para terminar de diferenciarse.

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

El cultivo primario de neuronas corticales se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente (*Eur. J. Neurosci.* **2001**. *13*:1469-1478). Los lóbulos corticales frontolaterales se disecaron en fetos de 17 días de ratas hembra de la cepa Spragle-Dawley y se disociaron mecánicamente en HBSS. Los lóbulos corticales se trituraron pipeteando unas diez veces con una pipeta Pasteur. Después de centrifugar 5 minutos a 800 ×g, las células se resuspendieron en medio de cultivo Neuobasal suplementado con B27, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células se sembraron en placas de cultivo pretratadas con poli-lisina y se utilizaron no antes de 7 días tras el cultivo, que es el tiempo que necesitan para terminar de diferenciarse.

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

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

*Experimentos de retardo en gel*

El retardo en gel de agarosa se utilizó para averiguar el ratio N/P (aminas nitrogenadas en compuesto de fórmula general (I)/fosfatos en siRNA) adecuado para obtener la mayor efectividad de unión posible entre ambas moléculas (*Brain Res Dev Brain Res.* **1991.** 63:1-12.; *Neuropsychiatr Genet.* **2008.** 147: 769-777). Se testó la mezcla de distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I) y de 250 ng de siRNA. La mezcla se corrió durante 15 minutos a 60 V en un gel de agarosa al 1,2% con 0,017% de bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron y las bandas se cuantificaron con un sistema de análisis de imagen apropiado (Quantity One). Se realizaron un mínimo de 2 experimentos para cada una de las pruebas anteriormente descritas.

*Estudios de Citotoxicidad*

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

La toxicidad de los tratamientos con los complejos compuestos de fórmula general (I)-siRNA, utilizando distintas concentraciones de compuesto de fórmula general (I) (75-2400  $\mu\text{M}$ ) en combinación con 100 nM de siRNA, se estudió por citometría de flujo. Para ello, después de los tratamientos, las células se incubaron con yoduro de propidio 0,5 mg/mL al menos durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Seguidamente, las células se tripsinizaron y se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental, se calculó el porcentaje de células con la membrana citoplasmática dañada (yoduro de propidio positivas) (*J Control Release.* **2008.** 132:55-64; *Biomaterials.* **2008.** 29:3469-76).

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

Después de 48-72 horas con las células en presencia de los complejos compuesto de fórmula general (I)-siRNA, utilizando 100 nM de siRNA fluorescente para realizarlos, se recogieron los medios condicionados y las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Las células totales - vivas y muertas - presentes en la suspensión resultante al juntar el tripsinizado celular y el medio condicionado se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental se calculó el porcentaje de células transfectadas con siRNA fluorescente (*J Control Release.* **2008.** 132:55-64; *Biomaterials.* **2008.** 29:3469-76).

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

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

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

En cada experimento, se calculó la media del ciclo umbral [cycle threshold ( $C_T$ )] de los triplicados de cada uno de los genes estudiados y del gen utilizado como referencia, pudiendo así comparar la expresión génica tras los diferentes tratamientos (*Pharm. Res.* **2009.** 26: 577-86; *Cancer Res.* **2007.** 67: 8156-63).

*Evaluación del grado de silenciamiento proteico por Western blot*

Los extractos celulares se obtuvieron por lisado en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 1%, deoxicolato sódico al 1% y SDS al 0,1% e inhibidores de proteasas (aprotinina 5  $\mu$ g/mL y PMSF 1 mM). Una vez lisadas las células se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. La concentración de proteína presente en el sobrenadante, se determinó por el método de Bradford (Pierce; Rockford, IL, EEUU), usando seroalbúmina bovina como estándar. Las muestras conteniendo 40  $\mu$ g de proteína total se aplicaron en cada pocillo de geles de poliacrilamida al 10-15% según la proteína a estudiar. Los geles se transfirieron por electroforesis a membranas de nitrocelulosa usando un "blotter" semi-seco. Las proteínas unidas a nitrocelulosa se visualizaron con Poinceau, seguidas de bloqueo con TTBS (50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1% Tween) con 5% de leche desnatada y, posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche a 4°C. Tras lavados en TTBS, se aplicó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó por quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas se analizó por niveles de gris con un sistema de análisis de imagen apropiado (Quantity One) (*Pharm. Res.* **2009**. 26: 577-86; *Cancer Res.* **2007**. 67: 8156-63).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I)

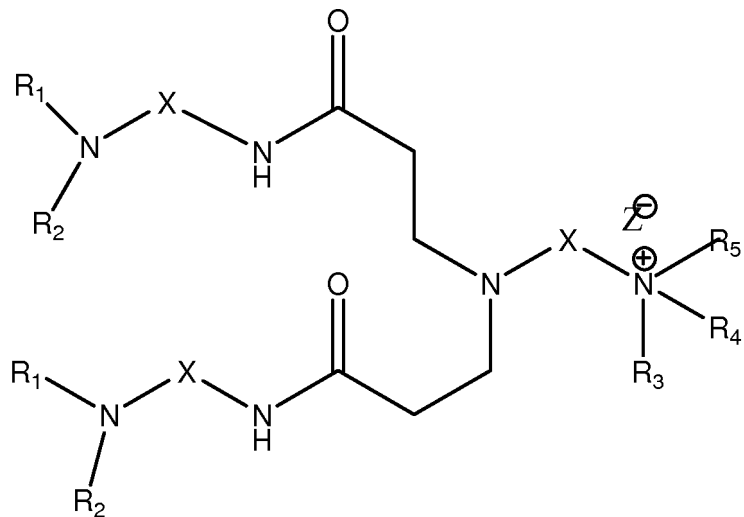
5

10

15

20

25



(I)

30

o una sal, prodroga o solvato del mismo;

donde:

35

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

40

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquenilo, arilo o heteroarilo,

45

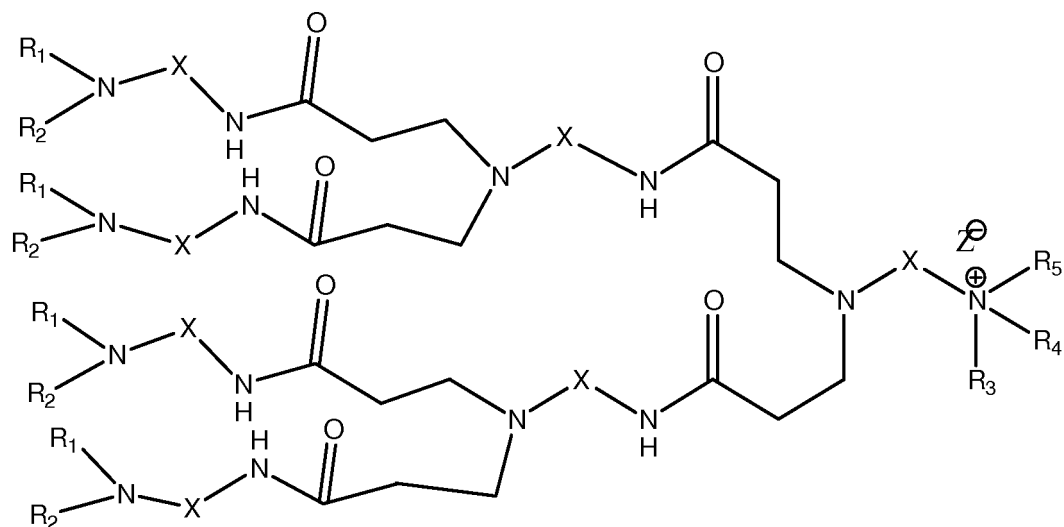
2. Compuesto de fórmula general (II) según las reivindicaciones 1

50

55

60

65



(II)



una sal, prodroga o solvato del mismo;

donde:

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

10 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalqueno, arilo o heteroarilo,

15 Z se selecciona entre cualquier anión cloruro, trifluoroacetato, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir, cualquier fármaco, anticuerpo, sonda, para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen o cualquier combinación de los mismos

15

3. Compuesto de fórmula general (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2

20

25

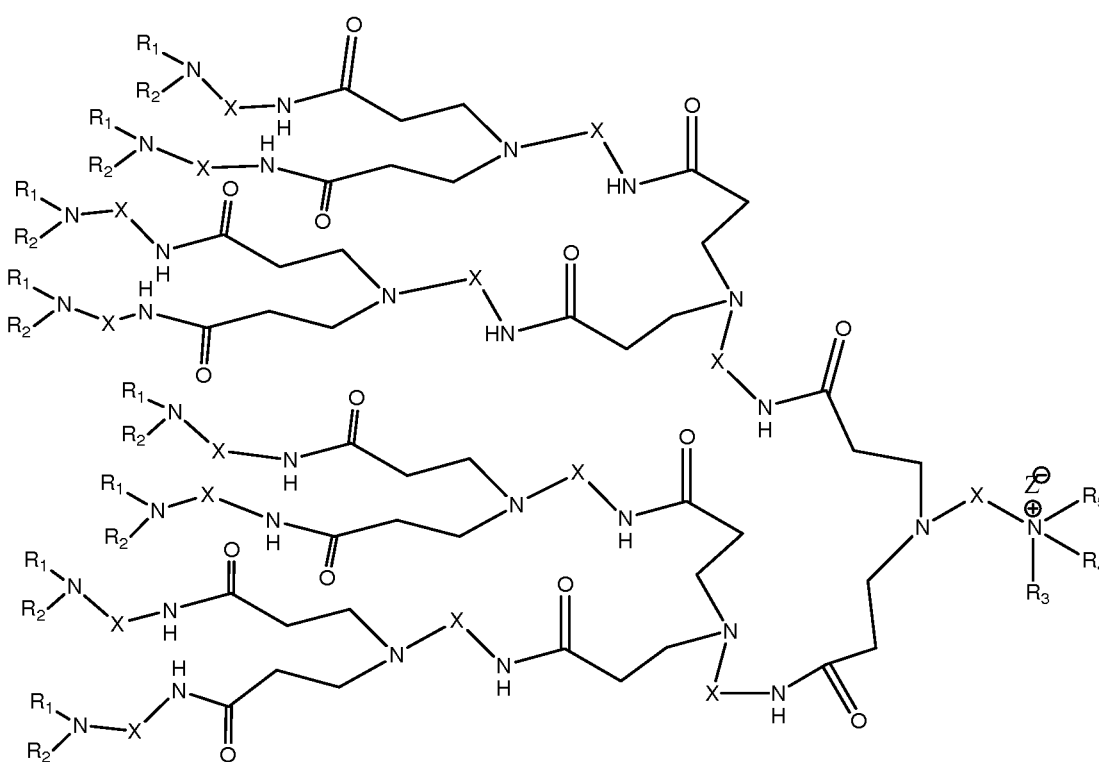
30

35

40

45

50



(III)

55

o una sal, prodroga o solvato del mismo;

55

donde:

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

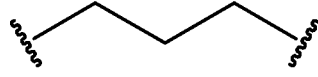
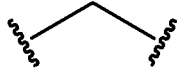
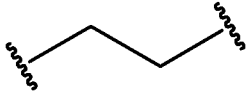
60 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalqueno, arilo o heteroarilo,

65 Z se selecciona entre cualquier anión cloruro, trifluoroacetato, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir, cualquier fármaco, anticuerpo, sonda para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen o cualquier combinación de los mismos

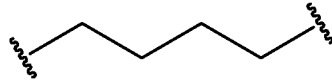
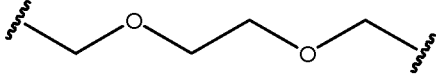
65

4. Compuesto de fórmula general (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicación 1 a 3, donde X se seleccionan entre:

5

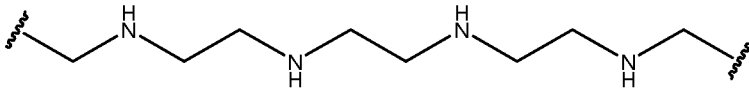


10



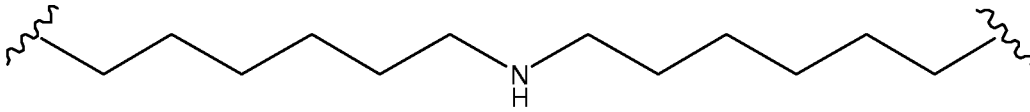
15

20



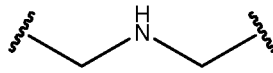
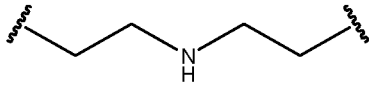
25

30

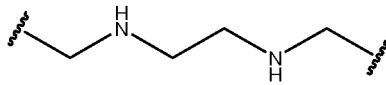
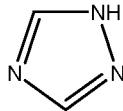
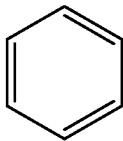


35

40

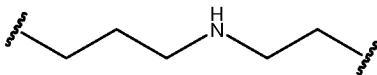


45



50

55

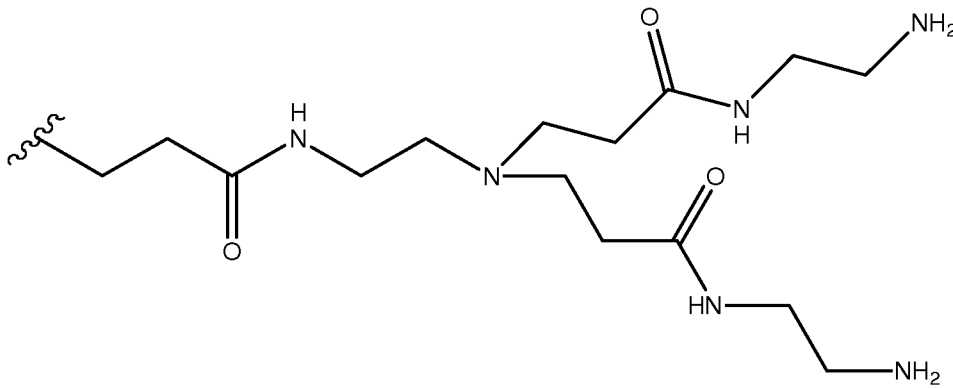


60

65

5. Compuesto de fórmula (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde  $R_1$  a  $R_5$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H, cualquier amina sustituida o no sustituida, aminoácidos básicos, derivados del colesterol, ácido fólico, ácido láctico, dexametasona, azúcares, agentes lisosomtrópicos, heterociclos nitrogenados, cadenas hidrofílicas derivadas de poli-etilenglicol, cualquier diacrilato, cualquier aminoácido básico y las siguientes estructuras:

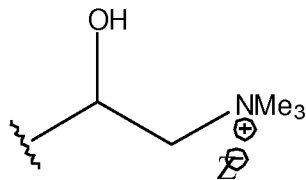
10



15

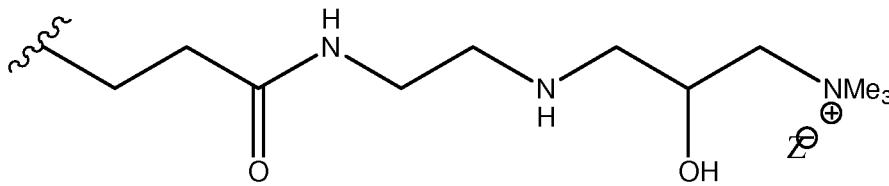
20

25



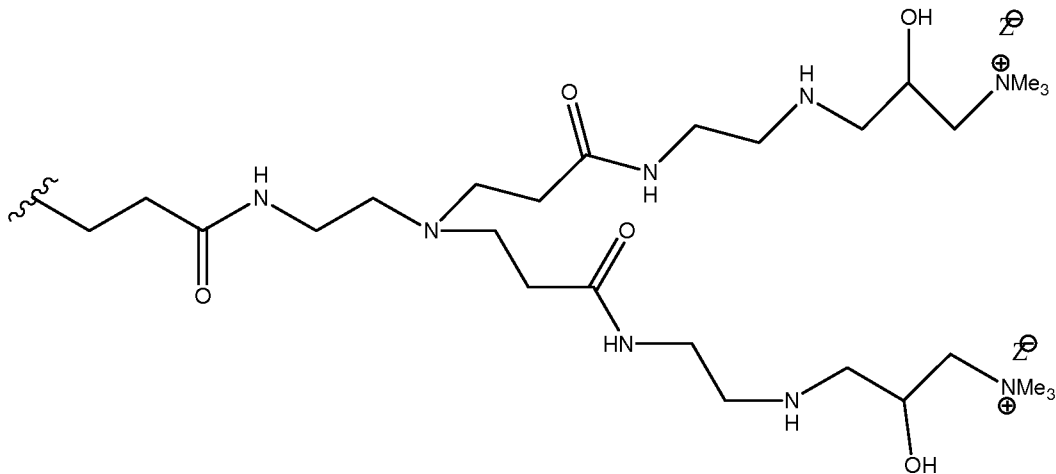
30

35



40

45



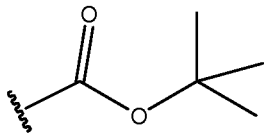
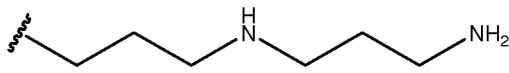
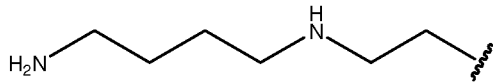
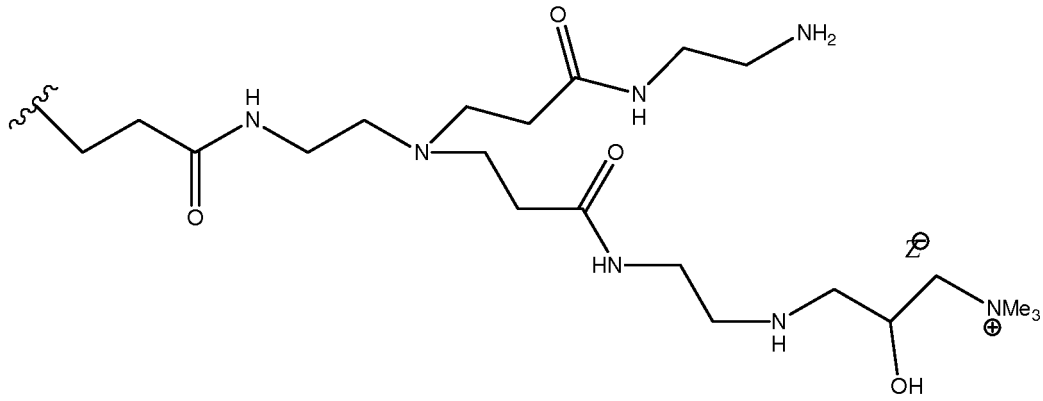
50

55

60

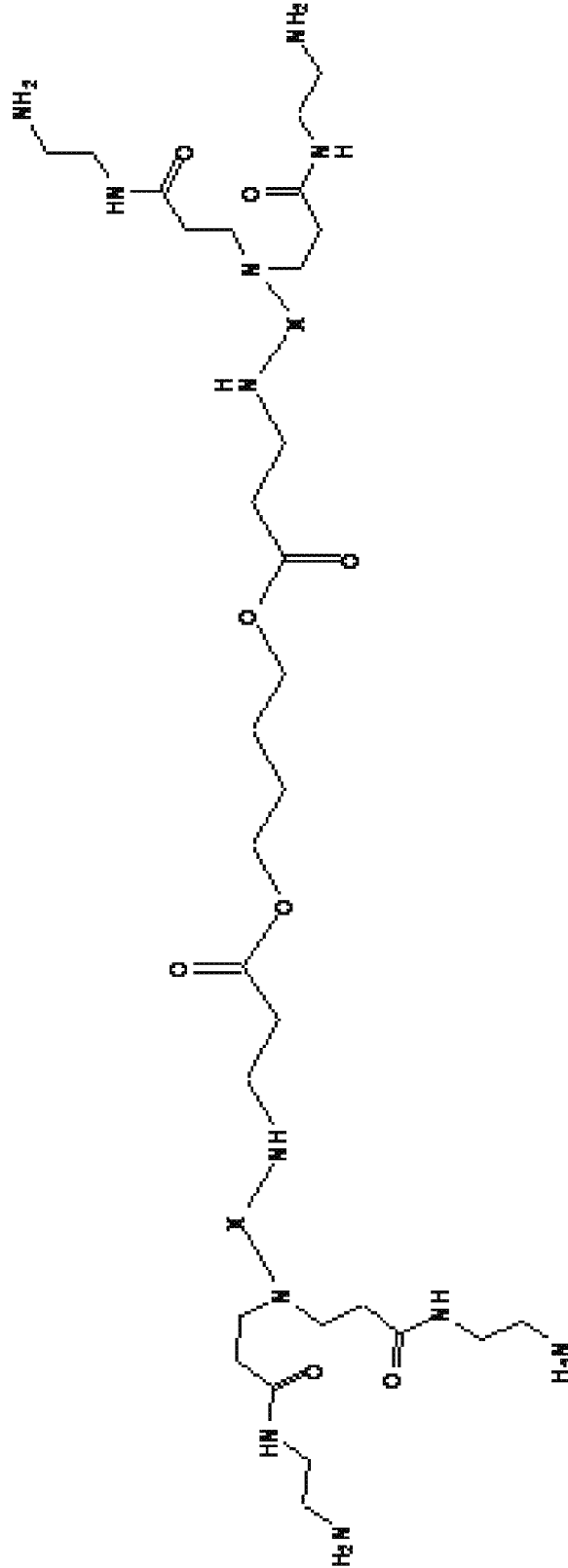
65

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

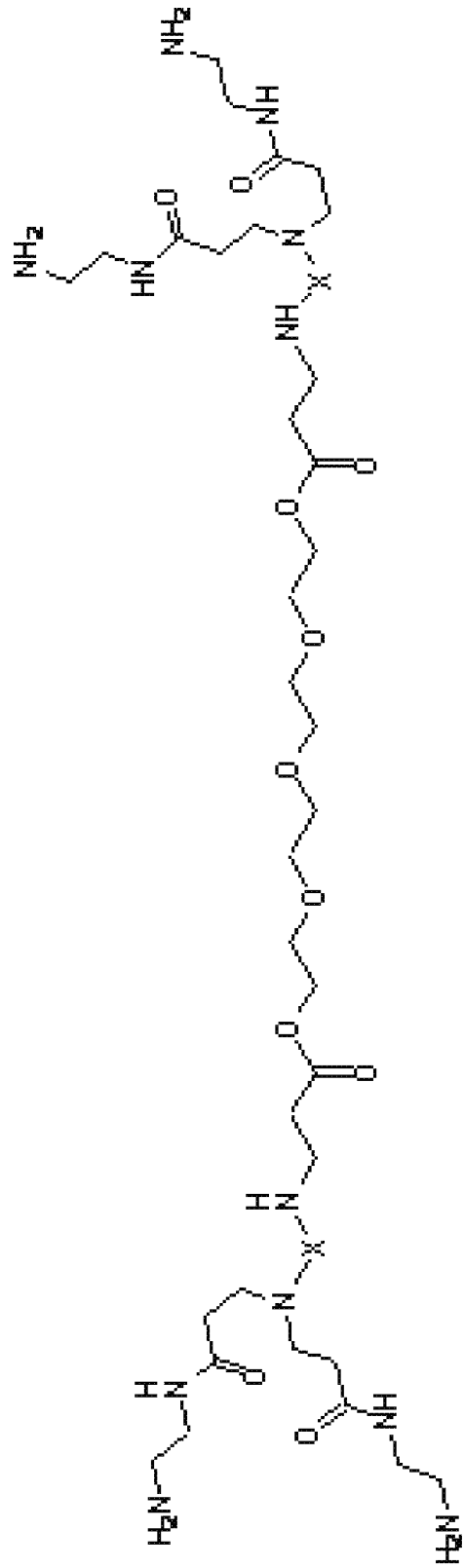


6. Compuesto de fórmula general (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 seleccionado de la lista que comprende:

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



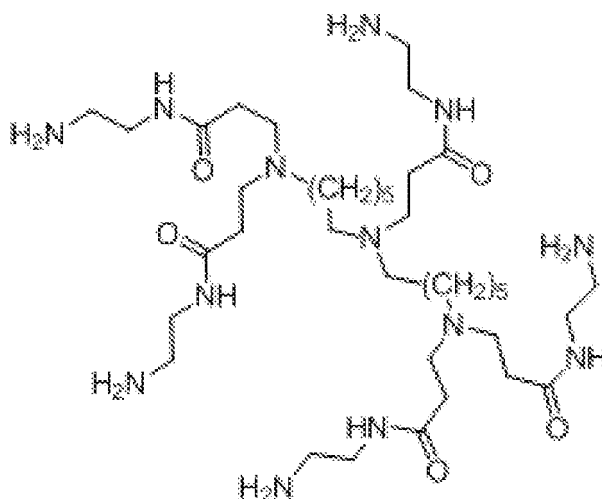
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



5

10

15



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

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

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

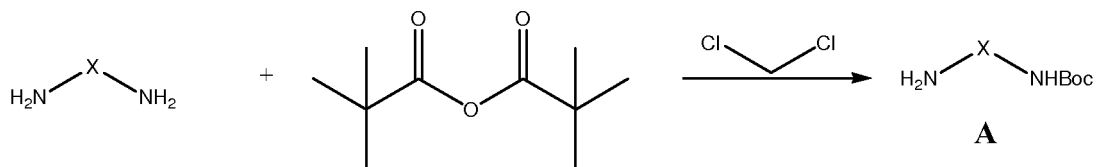
30 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 o 9 **caracterizada** porque comprende, además, uno o más principios activos.

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

35

a.

40

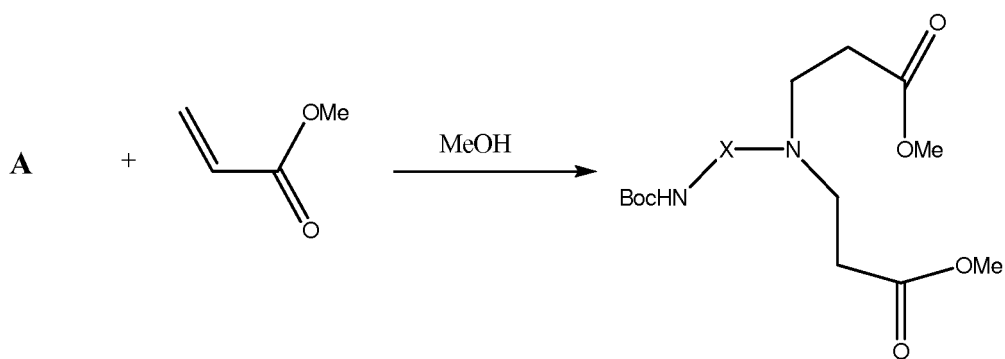


45

50

b.

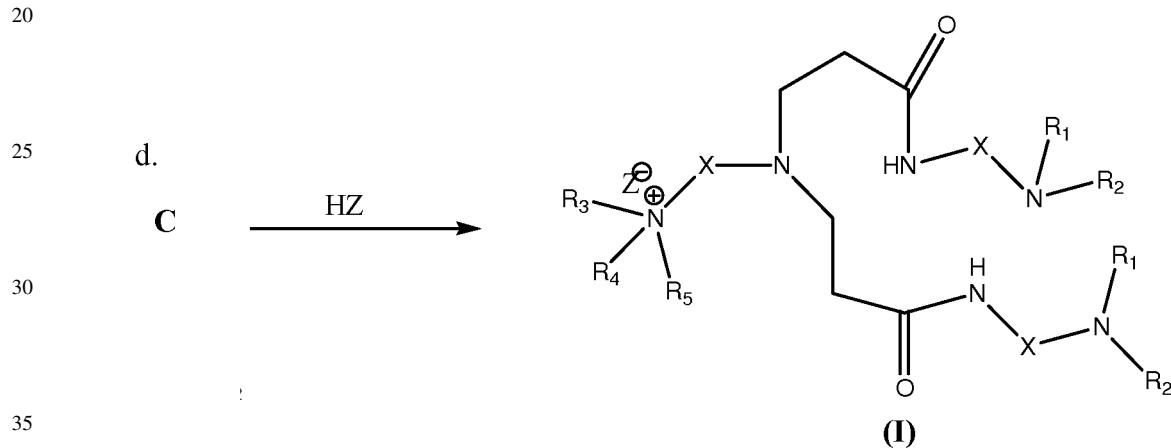
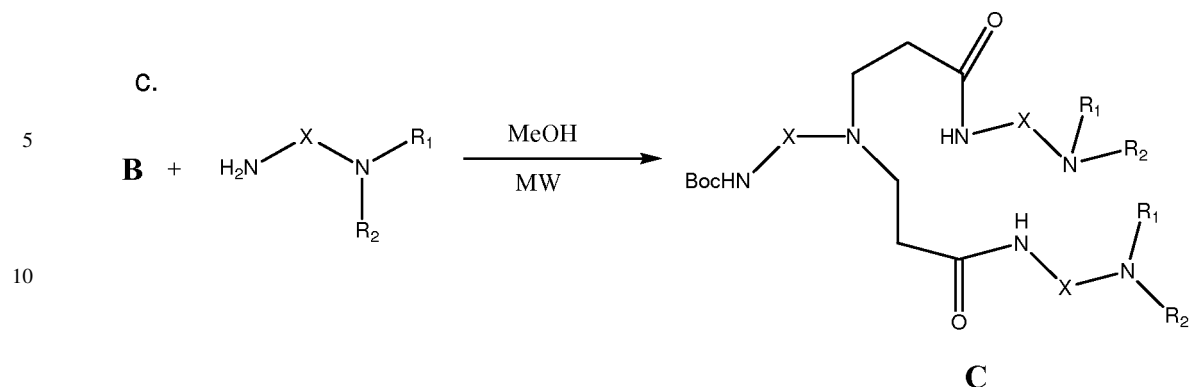
55



60

65

**B**



12. Procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (II), donde se parte del compuesto de fórmula general (I) y se repiten todos los pasos a-d según la reivindicación 11.

13. Procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (III), donde se parte del compuesto de fórmula general (II) y se repiten todos los pasos a-d según la reivindicación 11.

14. Procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula general (I), (II) y (III) donde X se selecciona de entre un grupo alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>) o cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquenilo, arilo o heteroarilo, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan de entre hidrógeno, alquilo saturado o insaturado (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>), cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), cicloalquenilo, arilo o heteroarilo y Z se selecciona entre cualquier anión cloruro, trifluoroacetato, DNA, RNA, siRNA, miRNA, antagomir cualquier fármaco, anticuerpo, sonda, para el diagnóstico de enfermedades mediante técnicas de imagen o cualquier combinación de los mismos.

15. Uso de un compuesto de fórmula general (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración de un medicamento.

16. Uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) según la reivindicación 15 para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de patologías como enfermedades del sistema nervioso, como son las enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares y cualquier enfermedad que pueda cursar con la aparición de tumores.

17. Uso del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un kit de transfección de siRNA en cultivos primarios de células nerviosas, glia, células tumorales y cualquier tipo de células primarias.

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

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



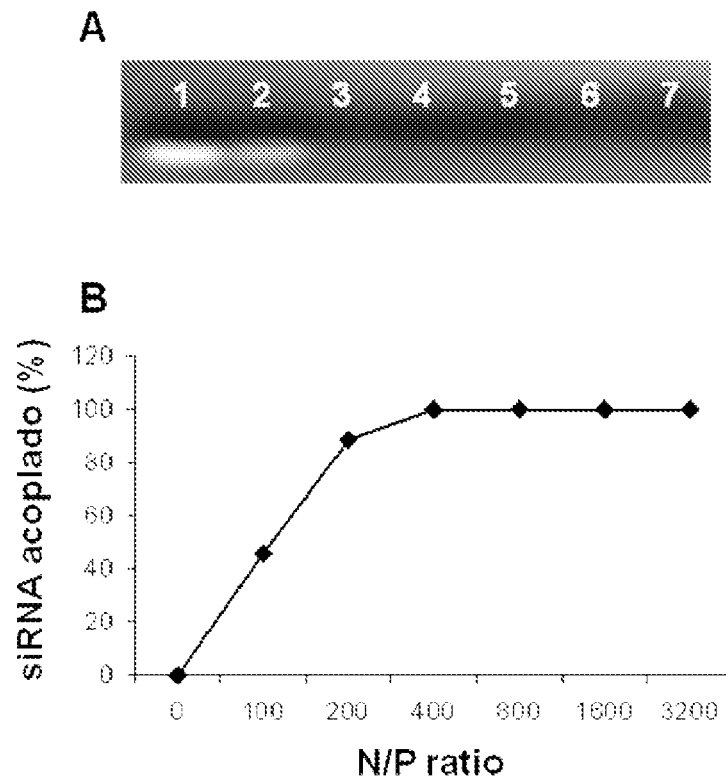


FIG. 1

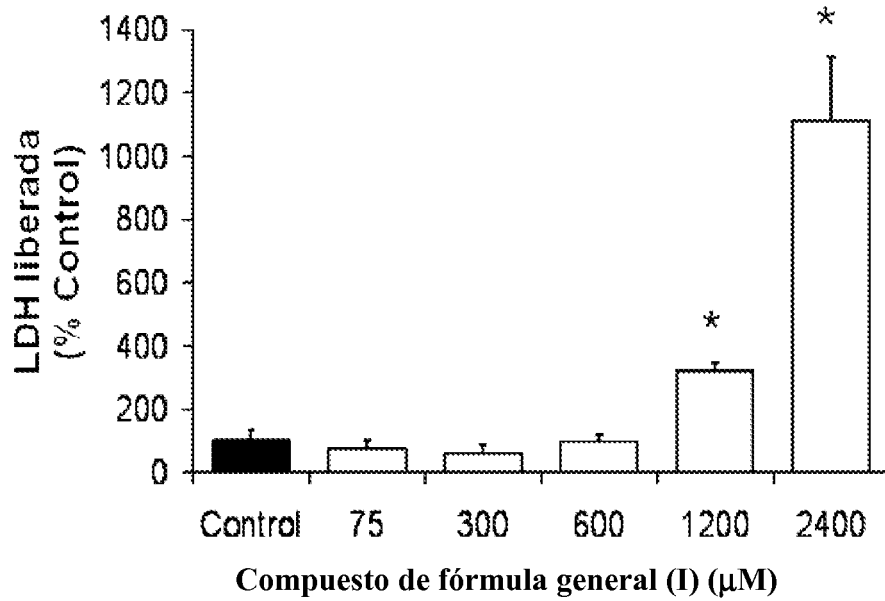


FIG. 2

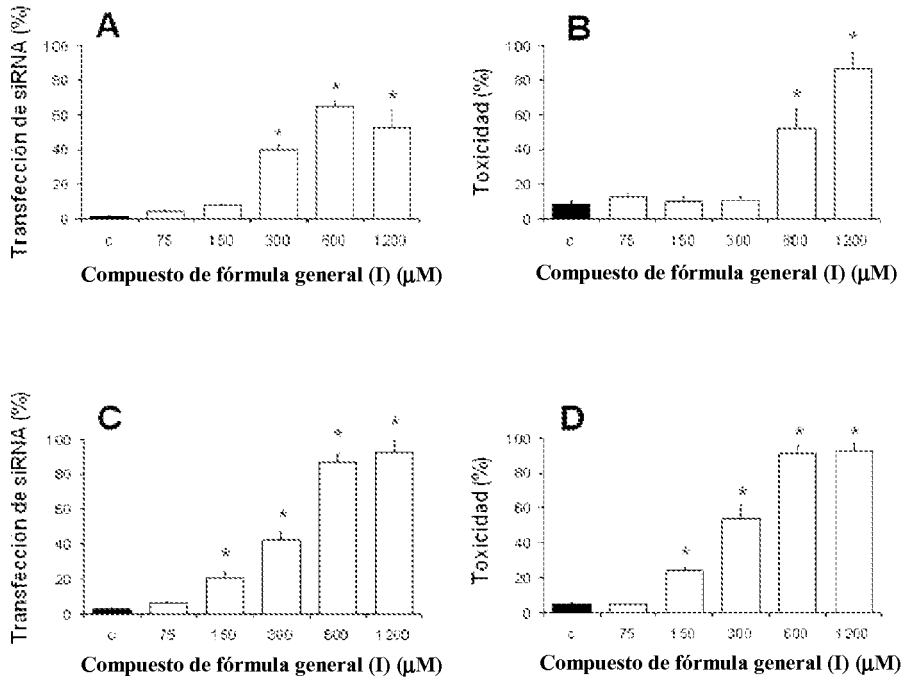


FIG. 3

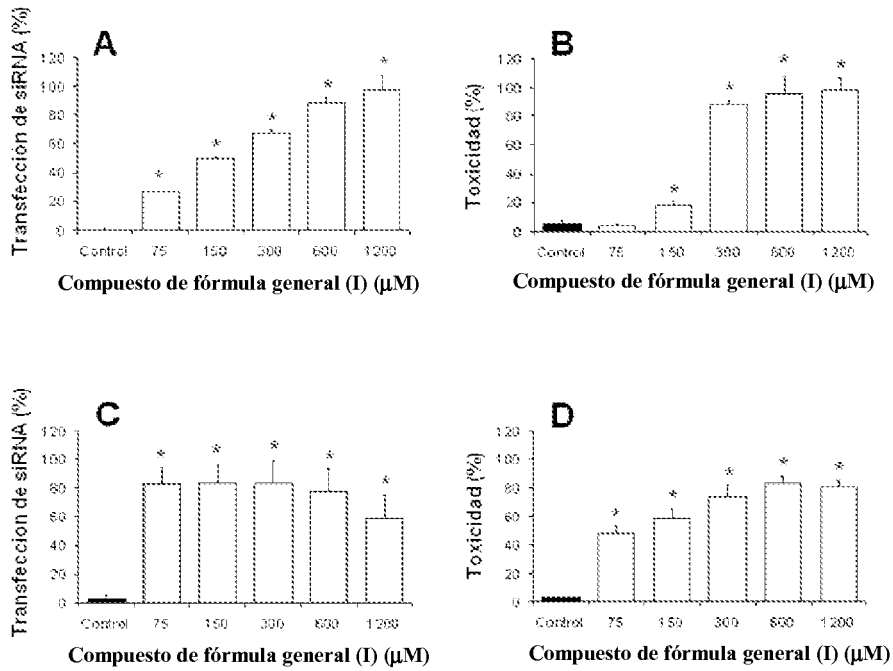


FIG. 4

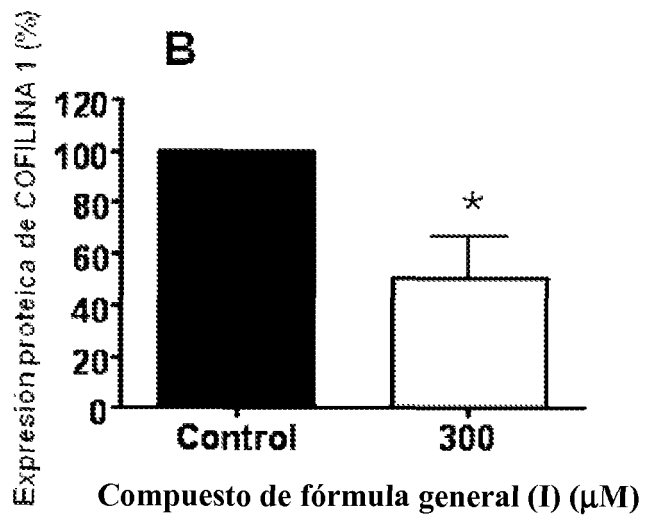
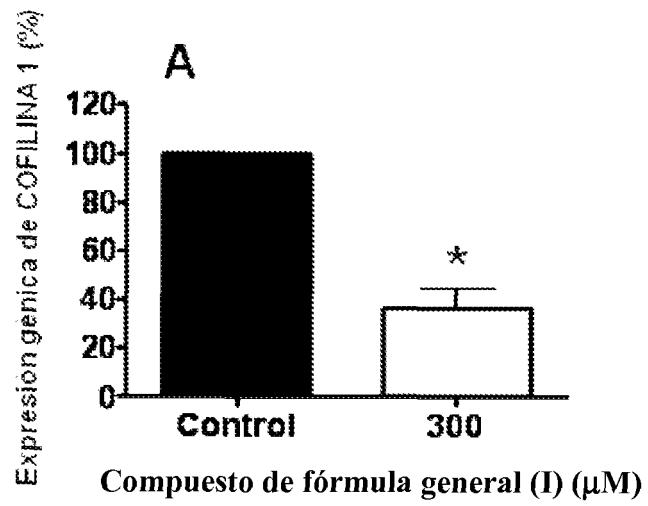
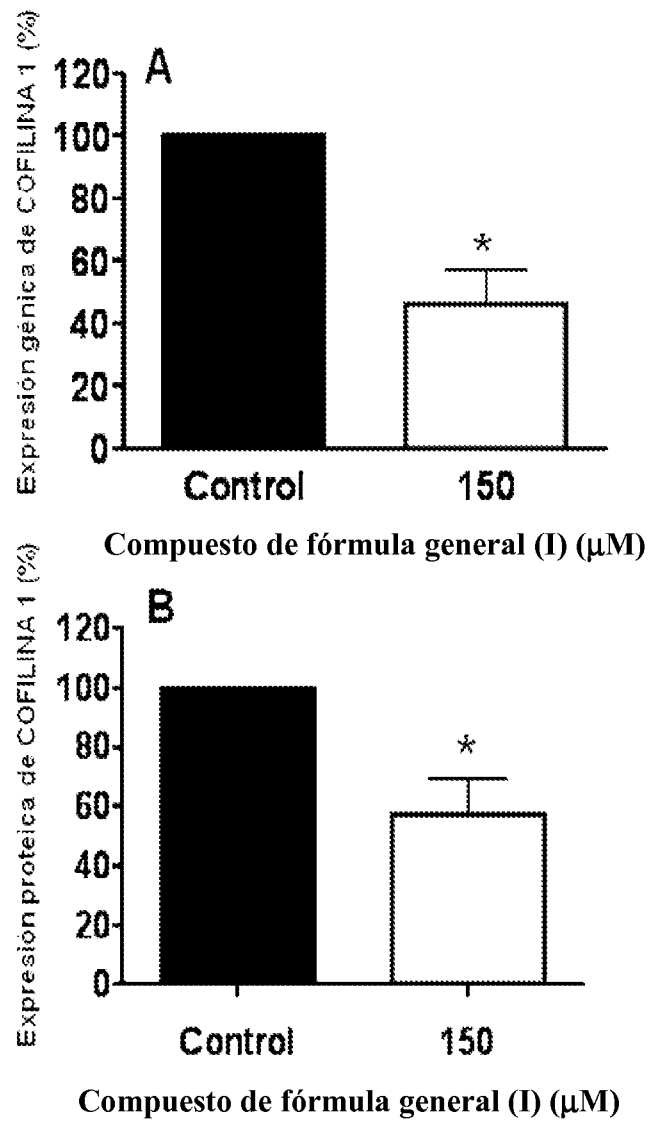


FIG. 5





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030325

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.03.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GAO, M. et al. "Butylamide-terminated poly(amidoamine) dendritic gelators". Tetrahedron Letters 2008, Volumen 49, páginas 6182-6187. [Disponible en línea el 08.08.2008]. Ver página 6183, esquema 1.	1-5, 11-14
X	GUILLOT-NIECKOWSKI, M. et al. "Dendritic vectors for gene transfection". New Journal of Chemistry 2006, Volumen 31, páginas 1111-1127. [Disponible en línea el 13.12.2006]. Ver página 1111, resumen; columna 1, párrafo 1; página 1112, columna 1, párrafo 3; página 1114, esquema 1; página 1117, figura 4 y esquema 3; página 1118, columna 2, párrafo 4.	1-5, 7-19
X	GIRI, J. et al. "Partitioning of Poly(amidoamine) Dendrimers between <i>n</i> -Octanol and Water". Environmental Science & Technology 2009, Volumen 233, páginas 5123-5129. [Disponible en línea el 29.05.2009]. Ver página 5123, resumen; columna 2, párrafo 2; página 5124, figura 1.	1-5, 7-10, 15-19
X	NEWKOME, G.R. & SHREINER, C.D. "Poly(amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1→2 branching motifs: An overview of the divergent procedures". Polymer 2008, Volumen 49, páginas 1-173. [Disponible en línea el 24.10.2007]. Ver página 1, resumen; página 4, esquema 4; Página 23, esquema 17.	1-5, 7-15, 19
X	LIM, Y.-B. et al. "The inhibition of prions through blocking prion conversion by permanently charged branched polyamines of low cytotoxicity". Biomaterials 2010, Volumen 31, página 2025-2033. [Disponible en línea el 17.12.2009]. Ver página 2027, Figura 1, compuestos PAMAM G4.0 y qPAMAM G4.0.	1-5, 7-10, 15, 16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
31.10.2011

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/6



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030325

22 Fecha de presentación de la solicitud: 05.03.2010

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LEE, J.H. et al. "Polyplexes Assembled with Internally Quaternized PAMAM-OH Dendrimer and Plasmid DNA Have a Neutral Gene Delivery Poltency". Bioconjugate Chemistry 2003, Volumen 14, páginas 1214-1221. [Disponible en línea el 11.04.2003]. Ver página 1214, resumen e introducción; página 1216, esquema 1.	1-5, 7-10, 15-18
X	PATIL, M.L. et al. "Internally Cationic Polyamidoamine PAMAM-OH Dendrimers for siRNA Delivery: Effect of the Degree of Quaternization and Cancer Targeting". Biomacromolecules 2009, Volumen 10, Número 2, páginas 258-266. [Disponible en línea el 09.02.2010]. Ver página 1, resumen e introducción; página 14, figura 1.	1-5, 7-10, 15-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
31.10.2011

Examinador  
G. Esteban García

Página  
2/6

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07C307/00** (2006.01)  
**C12N15/63** (2006.01)  
**A61K48/00** (2006.01)  
**A61K49/10** (2006.01)  
**A61K31/16** (2006.01)  
**A61P35/00** (2006.01)  
**A61P31/12** (2006.01)  
**A61P31/18** (2006.01)

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

C07C, C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, XPESP, NPL, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, PUBMED, CHEMSPIDER

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-5, 7-19	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-5, 7-19	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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



**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GAO, M. et al. Tetrahedron Letters 2008, Vol. 49, pp. 6182-6187.	08.08.2008
D02	GUILLLOT-NIECKOWSKI, M. et al. New Journal of Chemistry 2006, Vol. 31, pp. 1111-1127.	13.12.2006
D03	GIRI, J. et al. Environmental Science & Technology 2009, Vol. 233, pp. 5123-5129.	29.05.2009
D04	NEWKOME, G.R. & SHREINER, C.D. Polymer 2008, Vol. 49, páginas 1-173.	24.10.2007

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

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

El documento D01 divulga dendrímeros derivados de poli(amidoamina) que comprenden grupos terminales butilamida, entre los que se encuentran los compuestos **B-1**, **C-1**, **D-1** y **E-1**, que responden a la fórmula general (I) de la invención (ver página 6183, esquema 1), siendo  $X=CH_2-CH_2-$ , y estando los radicales  $R_1-R_5$  seleccionados entre H, CO-But,  $CO_2^tBu$  y  $CO-(CH_2)_2-COOH$  ( $R_1=R_2=R_3=H$  y  $R_4=CO_2^tBu$  en **B-1**;  $R_1=R_3=H$ ,  $R_2=CO-But$  y  $R_4=CO_2^tBu$  en **C-1**;  $R_1=R_3=R_4=R_5=H$ ,  $R_2=CO-But$ ,  $Z=CF_3COO^-$  en **D-1**;  $R_1=R_3=H$  y  $R_2=CO-(CH_2)_2-COOH$  en **E-1**).

El compuesto **D-1** se sintetiza a partir del compuesto **A-1** (compuesto B de la invención), mediante un procedimiento en varias etapas que incluye la reacción de **A-1** con etiléndiamina (etapa **c** del procedimiento de la invención) y un tratamiento final con ácido trifluoroacético para obtener la correspondiente sal (etapa **d** del procedimiento de la invención).

El documento divulga igualmente los compuestos **C-2** y **E-2**, derivados de los primeros con mayor grado de ramificación, que se incluyen en la fórmula general (II) de la invención y **C-3**, derivados de éstos últimos, que responden a la fórmula general (III) de la invención (ver esquema 1).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-5**, **11-14** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga compuestos con estructuras dendríticas diversas, así como su uso como vectores de transfección génica en terapia de enfermedades, como el cáncer (ver página 1111, resumen; columna 1, párrafo 1). Entre los compuestos divulgados se encuentran los dendrímeros derivados de poli(amidoamina) (PAMAM) de fórmula **14**, que contienen restos lipídicos (ver página 1117, figura 4; en la fórmula de la invención  $X=-CH_2-CH_2-$ ,  $R_1=R_2=H$ ,  $R_3=R_4=-(CH_2)_{11}CH_3$ ), de fórmula **15** (ver página 1117, esquema 3;  $X=-CH_2-CH_2-$ ,  $R_1=R_2=(CH_2)_2OH$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son cadenas de poli(amidoamina) en el compuesto de la invención) y su forma cuaternizada **16** ( $R_5=Me$ ,  $Z=Cl^-$ ), resultante del tratamiento de **15** con yoduro de metilo, que se engloban en la fórmula general (III) de la invención.

Estas estructuras catiónicas, en combinación con ácidos nucleicos, tienen aplicación como vectores no virales (ver página 1112, columna 1, párrafo 3). Además, la presencia de grupos amino en su superficie confiere a los derivados de poli(amidoamina) (PAMAM) eficacia en la transfección de siRNA a las células (ver página 1118, columna 2, párrafo 4).

Los dendrímeros ramificados de PAMAM se preparan a partir de aminas de fórmula 1 (equivalentes al compuesto A de la invención), por reacción con acrilato de metilo (etapa **b** del procedimiento de la invención), y posterior tratamiento con etiléndiamina (etapa **c** del procedimiento de la invención) (ver página 1114, esquema 1).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-5**, **7-19** carece de novedad a la luz de lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) con aplicaciones biomédicas variadas, que incluyen la terapia génica, la liberación de fármacos y la Resonancia Magnética de Imagen (RMI) (ver página 5123, resumen; columna 2, párrafo 2; página 5124, figura 1). Los dendrímeros divulgados tienen estructuras diferentemente ramificadas (G1 y G2), núcleos de triamina variados (X en la fórmula general de la invención: etiléndiamina, diaminobutano, diaminohexano, cistamina, diaminodecano) y diferentes grupos terminales, que incluyen el grupo  $\text{NH}_2$ , aminas cuaternizadas, grupos protectores, como benciloxycarbonilo (BOC), *L*-aminoácidos libres y protegidos, ácido diaminopropiónico, cloruro de dansilo, amidoetanol, ácido succínico, amidoetiletanolamino, etc.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-5**, **7-10**, **15-19** no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D03.

El documento D04 divulga diversos dendrímeros derivados de poli(amidoamina), entre los que se encuentran los compuestos que comprenden restos de etiléndiamina, en los que los grupos amina están libres (ver, por ejemplo, página 4, esquema 4) y aquellos que comprenden grupos terminales *iso*-butilamida, entre los que se encuentran los compuestos **b**, **c** y **d**, que responden a la fórmula general (II) de la invención (ver página 23, esquema 17), siendo  $\text{X}=\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ , y un procedimiento para su síntesis que se inicia con la reacción del compuesto **a** (compuesto **A** de la invención), con acrilato de metilo, seguida del tratamiento con etiléndiamina (etapas **b** y **c** del procedimiento de la invención), y la repetición de estas etapas, que da lugar a los productos con mayor nivel de ramificación. Estos dendrímeros tienen aplicaciones biomédicas como sistemas de liberación de fármacos y agentes de Resonancia Magnética de Imagen (ver página 1, resumen).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-5**, **7-15**, **19** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D04.

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicación dependiente **6**, que se refiere a una serie de dendrímeros concretos con estructura de poli(amidoamina).

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicación **6** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.