

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 243**

21 Número de solicitud: 201031203

51 Int. Cl.:

A61K 47/34	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
C12N 15/87	(2006.01)	A61P 31/00	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)	A61P 35/00	(2006.01)
C01B 31/02	(2006.01)		
A61K 31/00	(2006.01)		
A61K 49/00	(2006.01)		

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:
02.08.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:
15.02.2012

Fecha de la concesión:
12.12.2012

45 Fecha de anuncio de la concesión:
26.12.2012

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.12.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD CASTILLA-LA MANCHA (50.0%)
PLAZA DE LA UNIVERSIDAD, 2
02071 ALBACETE, (Albacete), ES y
NANODRUGS, S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:
**CEÑA CALLEJO, Valentín;
SANCHEZ VERDU, Maria Del Prado;
MERINO GUIJARRO, Sonia;
GARCÍA MARTÍNEZ, Joaquín Calixto;
RODRIGUEZ LOPEZ, Julian;
VÁZQUEZ FERNÁNDEZ-PACHECO, Ester;
HERRERO CHAMORRO, Maria Antonia;
CAMPO RODRIGO, Ana;
RUBIO CARRERO, Noelia;
PÉREZ MARTÍNEZ, Francisco y
GUERRA NAVARRO, Francisco Javier**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **VECTORES NO VIRALES PARA TERAPIA GÉNICA.**

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

ES 2 374 243 B1

DESCRIPCIÓN

Vectores no virales para terapia génica.

5 Estado de la técnica anterior

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

También hay que tener en cuenta que procesos de recombinación pueden originar un virus replicante aunque el peligro es remoto. No obstante, los problemas que plantean los virus como vectores en terapia génica son serios y los ensayos clínicos de terapia génica en, por ejemplo, Estados Unidos, han sido interrumpidos recientemente por la FDA (Food and Drug Administration) 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 genético.

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

La introducción de nanotubos acoplados a dendrímeros polares como vehículos para la transfección génica se basa en tres factores distintos: (i) el distinto mecanismo que estos aductos poseen para atravesar la membrana celular si lo comparamos con macromoléculas orgánicas como pueden ser los dendrímeros (*Podesta, J. E.; Al-Jamal, K. T.; Herrero, M. A.; Tian, B.; Ali-Boucetta, H.; Hegde, V.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K., Antitumor Activity and Prolonged Survival by Carbon-Nanotube-Mediated Therapeutic siRNA Silencing in a Human Lung Xenograft Model Small* **2009**, *5*, 1176-1185); (ii) los dendrímeros de PAMAM (Poli(amido amina)), especialmente los de generaciones altas, han demostrado ser tóxicos debido fundamentalmente a procesos de hemólisis y (iii) los nanotubos son inertes químicamente lo que les confiere una alta estabilidad.

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

40 Descripción de la invención

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

- 45 a) Facilidad en la preparación y reproducibilidad del método sintético (incluso a escala multigramo).
- b) Posibilidad de modificación de la superficie del nanotubo pudiendo optimizar sus propiedades de acuerdo a la metodología sintética.
- 50 c) Distinto mecanismo que estos aductos poseen para atravesar la membrana celular si lo comparamos con macromoléculas orgánicas como pueden ser los dendrímeros.
- d) Son generalmente seguros *in vivo* y poco tóxicos.
- 55 e) No provocan una respuesta inmune específica y por tanto pueden ser administrados repetidamente.

Por lo tanto la presente invención se refiere al uso de un vector no viral, donde dicho vector no viral comprende:

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

En la presente invención, se entiende por nanoestructura de carbono a: estructuras de carbono que poseen al menos en una de sus dimensiones medidas en el orden del nanómetro (10^{-9} m) y que exhiben algún tipo de propiedad única electromagnética, óptica o estructural que es directamente una consecuencia de su tamaño nanométrico.

Según una realización preferida, las nanoestructuras de carbono son nanotubos de carbono.

En la presente invención se entiende por nanotubo de carbono a nanoestructuras que están constituidas por redes hexagonales de carbono curvadas y cerradas, formando tubos de carbono nanométricos. Son sistemas ligeros, huecos y porosos que tienen alta resistencia mecánica, y por tanto, interesantes para el reforzamiento estructural de materiales y formación de composites de bajo peso, alta resistencia a la tracción y enorme elasticidad.

Según otra realización preferida, los nanotubos de carbono son de tipo mono (solo un tubo), bi (dos tubos metidos uno dentro del otro) o multicapas (varios tubos metidos uno dentro de otro).

Según otra realización preferida, los nanotubos de carbono tienen un diámetro que dependerá del número de capas:

- a) Los nanotubos monocapa están comprendidos entre 0,6 y 3 nm.
- b) Los nanotubos de doble capa son dos láminas las que se pliegan en torno a un eje con espacios de 0,3-0,4 nm entre las capas por lo que su diámetro puede estar entre 1 y 4 nm.
- c) Los nanotubos multicapas constan de numerosas capas y en cuanto a su diámetro no existe un máximo, actualmente es común llegar hasta unos 80 nm.

Según otra realización preferida, los nanotubos de carbono tienen una longitud inferior a 10^5 nm.

Según otra realización preferida, los nanotubos de carbono están cortados en las puntas y/o en su capa exterior.

Se entiende por nanotubos cortados a aquellos cuya longitud es menor de la inicial ya que se tratan mediante el uso de medio ácido fuerte y calefacción originando grupos carboxílicos y un corte indiscriminado de los nanotubos. El corte da lugar a que los nanotubos se funcionalicen preferentemente en las puntas (es decir, los extremos) de los nanotubos pero también en la capa exterior de los nanotubos. (Liu J.; Rinzler A. G.; Dai H.; Hafner J. H.; Bradley R. K.; Boul P. J.; Lu A.; Iverson T.; Shelimov K.; Huffman C. B.; Rodríguez-Macias F.; Shon Y-S; Lee T. R.; Colbert D. T.; Smalley R. E. *Science* **1998**, 280, 1253-1256; Ziegler K J; Gu Z; Peng H; Flor E L; Hauge R H; Smalley R E J. *Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1541).

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

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

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

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

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

Según otra realización preferida los dendrímeros comprenden desde 0 a 8 generaciones, preferiblemente de 2 a 6 generaciones. Cuando el dendrímero es de generación 0 (G0) se le denomina dendrón.

En la presente invención se entiende por generación a las etapas del crecimiento de un dendrímero.

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

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

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

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

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

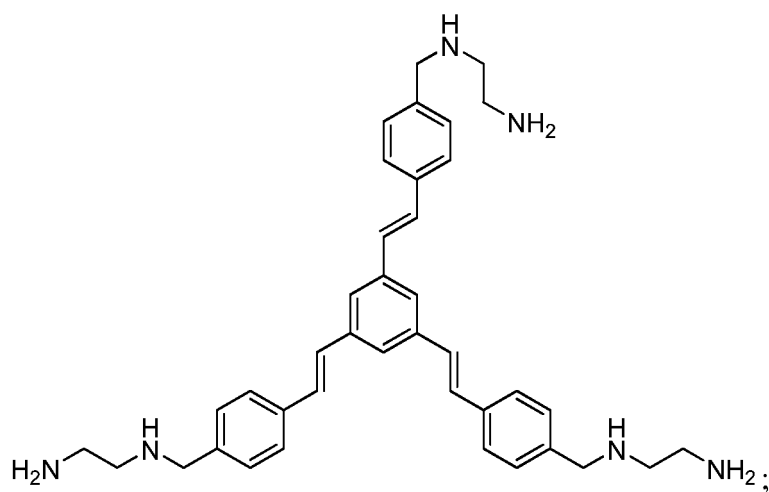
5 Según otra realización preferida, la relación carga/masa de los dendrímeros a pH inferior a 5 es de entre 0,1 a 10 mmoles de cargas positivas por gramo de dendrímero.

10 Según otra realización preferida, los dendrímeros son solubles en agua a pH inferiores a 6 tanto antes como después de la unión del dendrímeros a la nanoestructura de carbono.

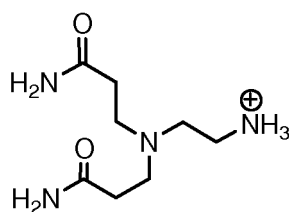
15 Según otra realización preferida, los dendrímeros en sus formas neutras son solubles en metanol tanto antes como después de la unión del dendrímeros a la nanoestructura de carbono.

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

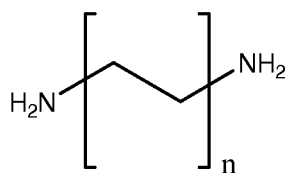
i)



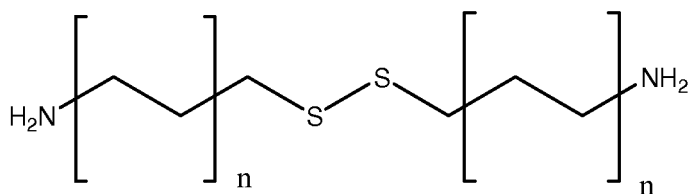
ii)



iii)

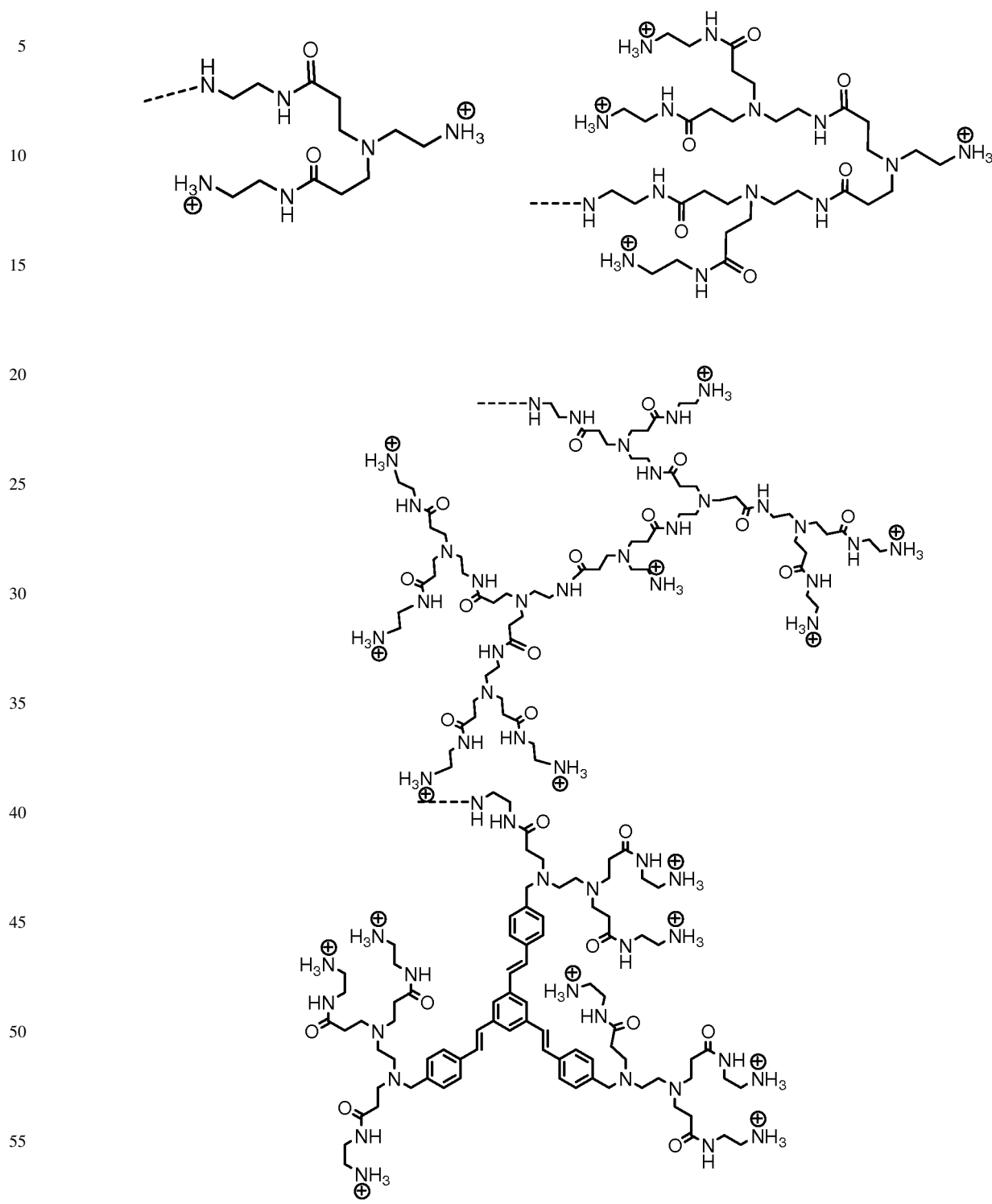


iv)



donde n es un número entero desde 1 a 4.

Según otra realización preferida, los dendrímeros se seleccionan entre:



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

65 En la presente invención se entiende por dendrímtero tipo *PAMAM* a aquellos dendrímeros que tienen un alto grado de uniformidad molecular, estrecha distribución del peso molecular, tamaño y características específicas de la forma, y una superficie terminal altamente funcionalizada. El proceso de fabricación es mediante una serie de pasos repetitivos a partir de un núcleo iniciador central. Cada paso representa un crecimiento posterior de la nueva "generación" de

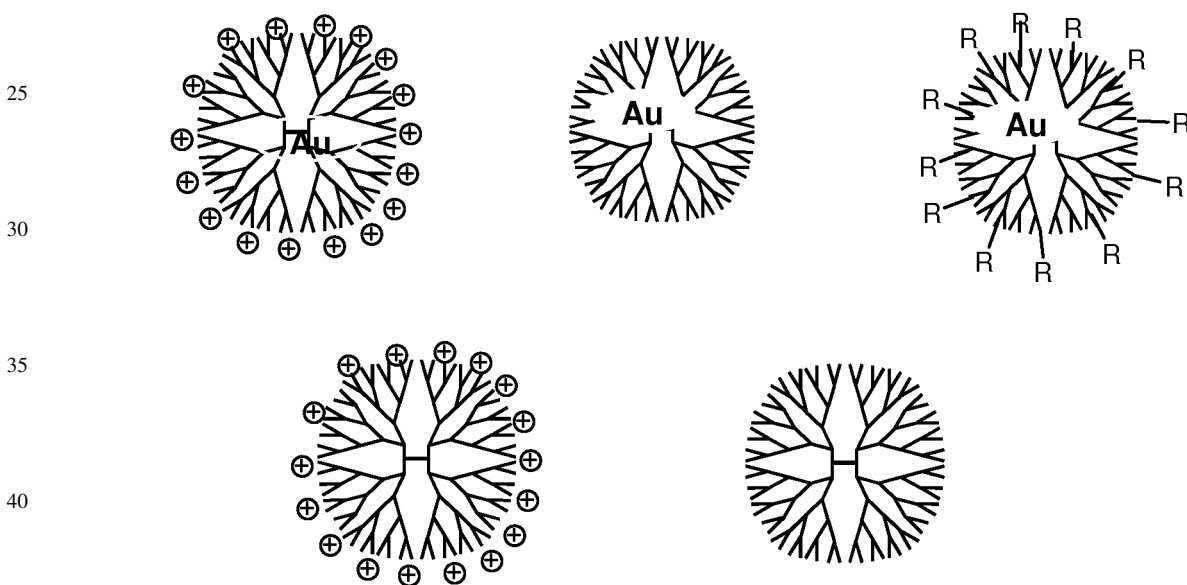
polímero con un diámetro molecular más grande, el doble del número grupos de superficie, y aproximadamente el doble del peso molecular de la generación precedente. Esto es común a cualquier dendrímeros, no sólo a los de *PAMAM*. Los dendrímeros de *PAMAM* son dendrímeros de polidoamidoamina comerciales (por Dendritech, Inc.) y que se sintetizan mediante una serie de pasos repetitivos siendo estos aminolisis y reacciones de adición de Michael, 1,4.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector no viral como se ha descrito anteriormente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de transfección de ARN de silenciamiento que comprende el vector no viral tal cual ha sido definido anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de transfección de ARN de silenciamiento en cultivos primarios de células nerviosas, glía, células tumorales y células primarias.

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

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

15 b. añadir la mezcla anterior a una disolución de nanoestructuras previamente dispersadas.

Según una realización preferida las nanoestructuras están previamente cortadas.

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

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

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

35 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.

40 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 acetónitrilo. Ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Ejemplos de sales de adición de bases incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales de bases orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, glucamina y sales de aminoácidos básicos.

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

60 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 ésteres, ésteres de aminoácido, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos, y amidas.

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

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.

5 Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende los compuestos de la presente invención o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30

Breve descripción de las figuras

35 Fig. 1.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC17.* Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC17 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC17 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 0,5 μ g/ml, (3) 1 μ g/ml, (4) 5 μ g/ml, (5) 10 μ g/ml, (6) 20 μ g/ml y (7) 40 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

40 Fig. 2.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC23.* Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC23 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC23 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 5 μ g/ml, (3) 10 μ g/ml, (4) 30 μ g/ml, (5) 40 μ g/ml y (6) 50 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

45 Fig. 3.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC24.* Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC24 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC24 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 5 μ g/ml, (3) 10 μ g/ml, (4) 20 μ g/ml, (5) 40 μ g/ml y (6) 60 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

50

55 Fig. 4.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC28.* Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC28 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC28 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 1 μ g/ml, (3) 2 μ g/ml, (4) 5 μ g/ml, (5) 10 μ g/ml, (6) 15 μ g/ml, (7) 20 μ g/ml y (8) 25 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

60 Fig. 5.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC29.* Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC29 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC29 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 1 μ g/ml, (3) 2 μ g/ml, (4) 5 μ g/ml, (5) 10 μ g/ml, (6) 15 μ g/ml, (7) 20 μ g/ml y (8) 25 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

65 Fig. 6.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC32.* Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC32 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC32 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 2 μ g/ml, (3) 10 μ g/ml, (4) 20 μ g/ml, (5) 30 μ g/ml y (6) 50 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

Fig. 7.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC33*. Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC33 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC33 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 2 μ g/ml, (3) 20 μ g/ml, (4) 40 μ g/ml y (5) 50 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

Fig. 8.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a MAHC34*. Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de MAHC34 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de MAHC34 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 2 μ g/ml, (3) 20 μ g/ml, (4) 40 μ g/ml y (5) 50 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

Fig. 9.- *Análisis de retardo electroforético de siRNA por el acoplamiento a CNH35*. Los números en (A) corresponden a diferentes volúmenes de CNH35 1 mg/ml incubadas con 25 μ l de siRNA 1,6 μ M y llevadas a un volumen final de 50 μ l con H₂O libre de RNAsas. Para 100 nM de siRNA corresponde una concentración de CNH31 de: (1) 0 μ g/ml (siRNA sólo), (2) 0,5 μ g/ml, (3) 1 μ g/ml, (4) 2 μ g/ml, (5) 3 μ g/ml y (6) 4 μ g/ml. El análisis densitométrico de los resultados del experimento de retardo en gel se muestran en (B).

Fig. 10.- *Estudio de la toxicidad de MAHC17 en neuronas corticales*. Las células se trataron con diferentes concentraciones de MAHC17 (1 a 30 μ g/ml) durante 48 horas. La viabilidad celular se evaluó cuantificando el porcentaje de LDH liberada al medio de cultivo. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM (desviación estándar de la media), n=12. * p <0,05, comparados con el control.

Fig. 11.- *Estudio de la toxicidad de MAHC28 en neuronas corticales*. Las células se trataron con diferentes concentraciones de MAHC28 (1 a 30 μ g/ml) durante 48 horas. 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.

Fig. 12.- *Estudio de la toxicidad de CNH35 en neuronas corticales*. Las células se trataron con diferentes concentraciones de CNH35 (1 a 30 μ g/ml) durante 48 horas. La viabilidad celular se evaluó cuantificando el porcentaje de LDH (lactato deshidrogenasa) liberada al medio de cultivo. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM, n=12. * p <0,05, comparados con el control.

Fig. 13.- *Cuantificación de la transfección del complejo MAHC28-SiRNA fluorescente en neuronas corticales (A) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B) mediante su estudio por citometría de flujo*. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de MAHC28 y 100 nM de siRNA fluorescente. Los tratamientos duraron 48 horas. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. * p <0,05, comparados con el control.

Fig. 14.- *Cuantificación de la transfección del complejo MAHC29-SiRNA fluorescente en neuronas corticales (A) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B) mediante su estudio por citometría de flujo*. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de MAHC29 y 100 nM de siRNA fluorescente. Los tratamientos duraron 48 horas. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. * p <0,05, comparados con el control.

Fig. 15.- *Cuantificación de la transfección del complejo CNH35-SiRNA fluorescente en neuronas corticales (A) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B) mediante su estudio por citometría de flujo*. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de CNH35 y 100 nM de siRNA fluorescente. Los tratamientos duraron 48 horas. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. * p <0,05, comparados con el control.

Fig. 16.- *Cuantificación de la transfección del complejo CNH35-SiRNA fluorescente en neuronas granulares de cerebelo de rata (A) y de la toxicidad producida por el complejo (porcentaje de células marcadas con yoduro de propidio) en este mismo tipo celular (B) mediante su estudio por citometría de flujo*. Los complejos se formaron con distintas concentraciones de CNH35 y 100 nM de siRNA fluorescente. Los tratamientos duraron 48 horas. Los datos se expresan como media (% control) \pm SEM, de un mínimo de 3 experimentos diferentes. * p <0,05, comparados con el control.

Figura 17.- *Estudio del efecto del complejo CNH35-SiRNA o Control contra p42MAPK sobre la expresión génica de p42MAPK en neuronas corticales mediante real-time PCR*. La cuantificación del RNAm de p42MAPK se realizó en células transfectadas durante 48 horas con CNH35. Los datos se expresan como media (% control) \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); μ l (microlitros); mmol (milimoles); P.f. (punto de fusión); Hz (hertzio); MHz (megahertzio); δ (desplazamiento químico); ppm (partes por millón); s (singlete); d (doblete); t (triplete); q (cuartete); c (quintuplete); m (multiplete); J (constante de acoplamiento); RMN (resonancia magnética nuclear); EM (espectrometría de masas); ES (electrospray); m/z (Relación masa/carga); Anal. (Análisis Elemental); Rto (Rendimiento); TEA (trietilamina); CH_2Cl_2 (diclorometano); CDCl_3 (cloroformo deuterado); CD_3OD (metanol deuterado) DMSO (dimetilsulfóxido); i.p. (administración parenteral). Todas las temperaturas se expresan en $^\circ\text{C}$ (grados Celsius).

Ejemplo 1

15

Síntesis de los complejos nanotubos-dendrimeros

Compuesto 3 (MAHC34)

20 mg de nanotubos cortados 1 (Liu J.; Rinzler A. G. et al. *Science* 1998, 280, 1253-1256; Ziegler K J; et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 1541) se dispersan en 10 ml de DMF (dimetil formamida) y seguidamente se adicionan 20 mg de EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y 20 mg de HOBT (1-hidroxibenzotriazol) y se agita durante 30 minutos.

25 Posteriormente se añade una disolución del compuesto 2 (precursor de FJGC 57, 42 mg, 0,1 mmol) en 5 ml de metanol. La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE (Politetrafluoroetileno), $0,2 \mu\text{m}$). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, agua y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente, finalmente se secan y se obtienen 20 mg del compuesto 3.

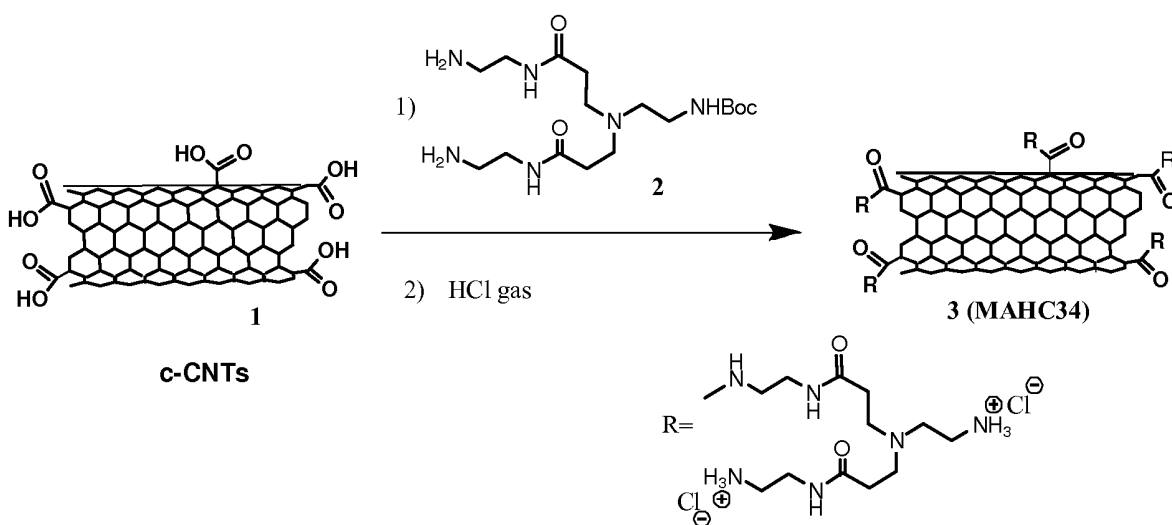
30

35

40

45

50



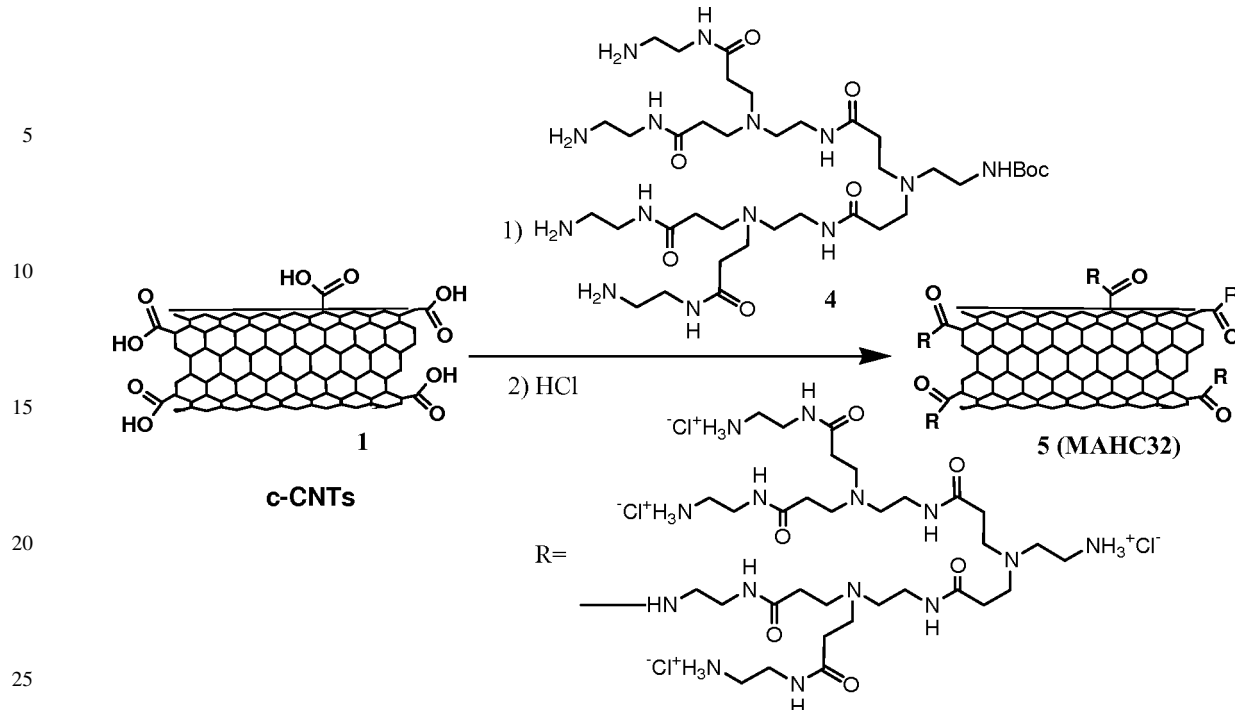
55

Compuesto 5 (MAHC32)

20 mg de nanotubos cortados 1 se dispersan en 10 ml de DMF y seguidamente se adicionan 20 mg de EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y 20 mg de HOBT (1-hidroxibenzotriazol) y se agita durante 30 minutos.

60 Posteriormente se añade una disolución del compuesto 4 (70 mg, 0,1 mmol) en 5 ml de metanol. La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, $0,2 \mu\text{m}$). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, agua y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente, finalmente se secan y se obtienen 18 mg del compuesto 5.

65



30 **Compuesto 7 (MAHC33)**

35 20 mg de nanotubos cortados 1 se dispersan en 10 ml de DMF y seguidamente se adicionan 20 mg de EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y 20 mg de HOBt (1-hidroxibenzotriazol) y se agita durante 30 minutos.

40 Posteriormente se añade una disolución del compuesto 6 (140 mg, 0,1 mmol) en 5 ml de metanol. La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μ m). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, agua y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente, finalmente se secan y se obtienen 19 mg del compuesto 7.

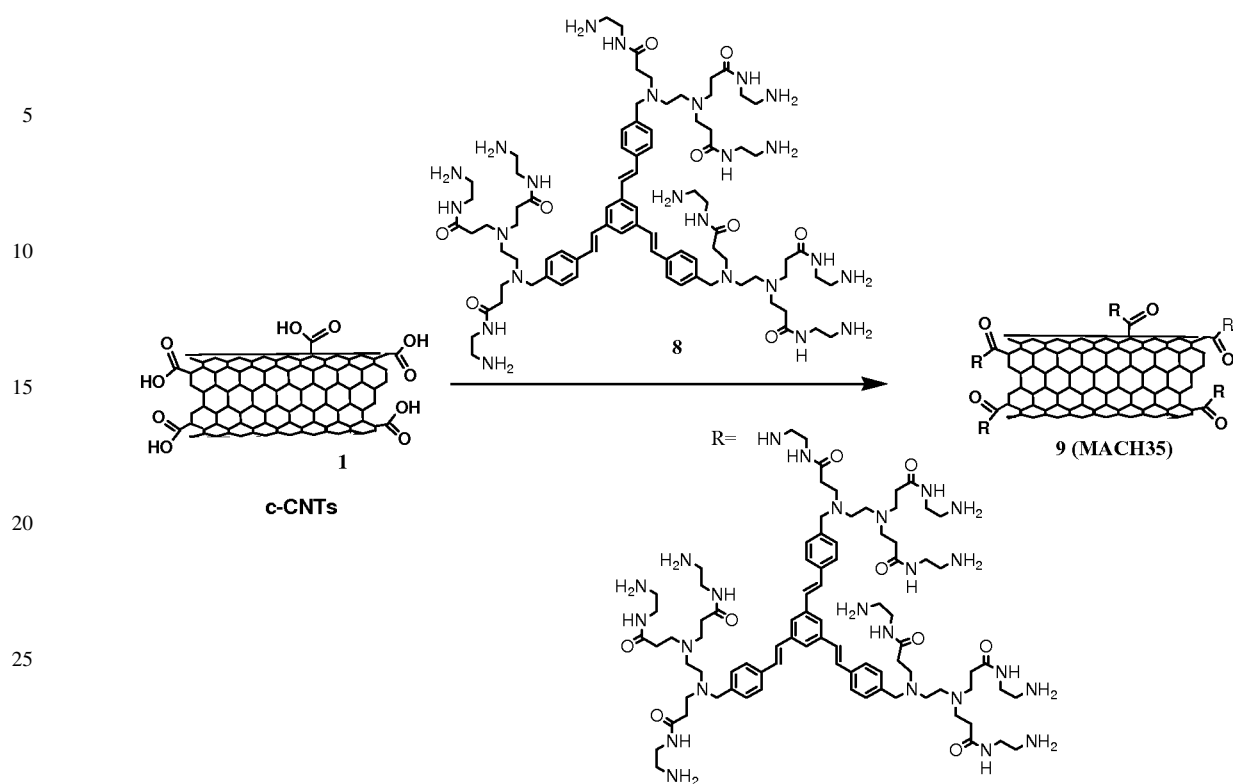
45 (Esquema pasa a página siguiente)

50

55

60

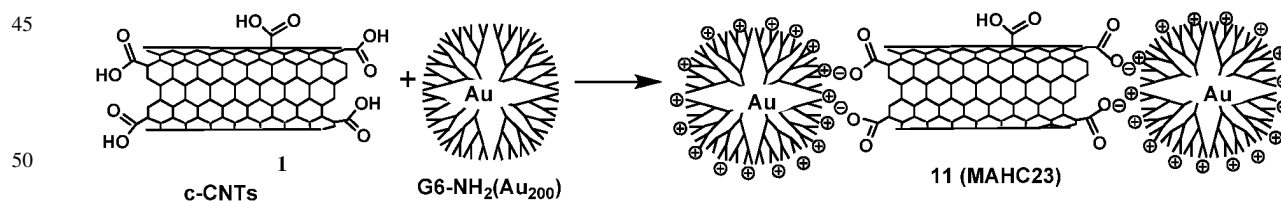
65



Compuesto 11 (MAHC23)

35 20 mg de nanotubos cortados 1 se dispersan en 5 ml de DMF y se adiciona gota a gota una disolución acuosa 1,6 μM del dendrímtero (10) (2 x 25 ml, pH 7,5). La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μm). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se

40 obtienen 20 mg del compuesto 11.

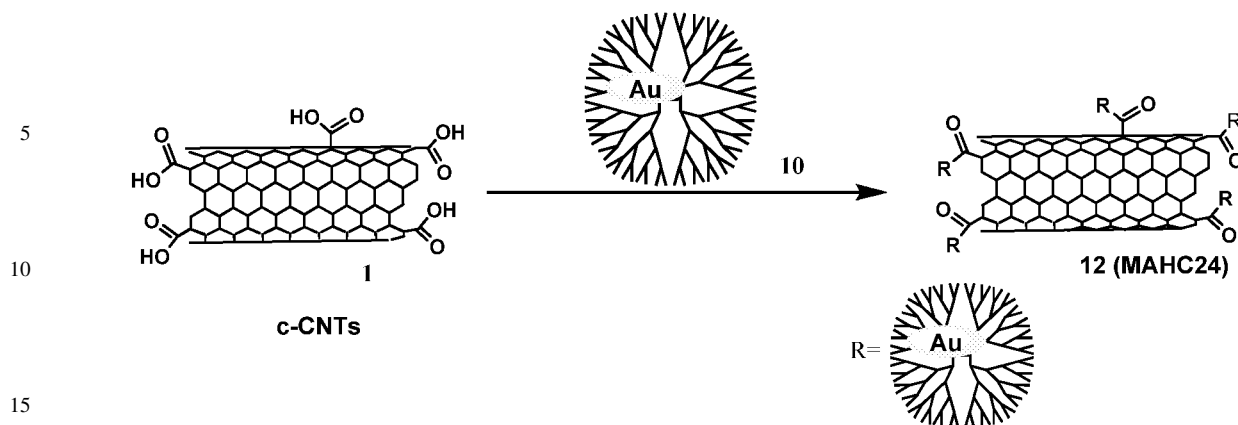


Compuesto 12 (MAHC24)

55 20 mg de nanotubos cortados 1 se dispersan en 5 ml de DMF y seguidamente se adiciona 20 mg de EDC y 20 mg de HOBT y se agita durante 30 minutos. Posteriormente se añade gota a gota una disolución acuosa 1,6 μM del dendrímtero (10) (2 x 25 ml, pH 7,5). La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μm). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se

60 obtienen 19 mg del compuesto 12.

65



20

25

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

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

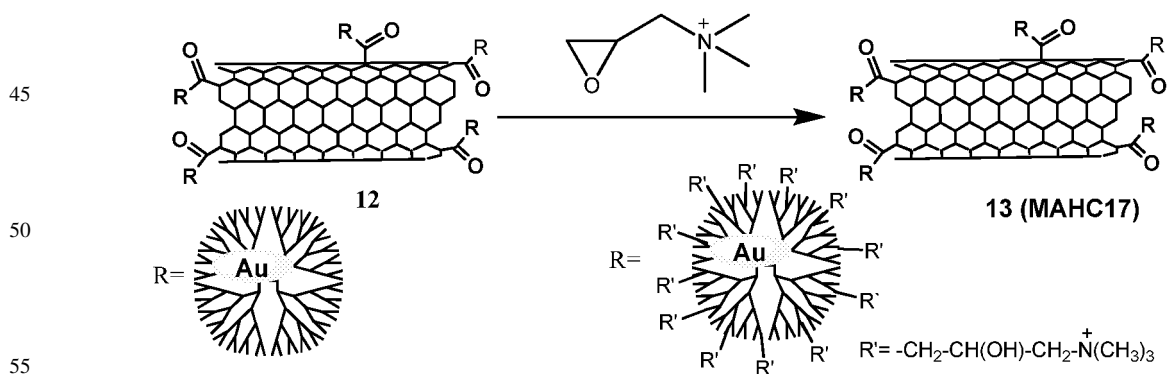
30

Compuesto 13 (MAHC17)

35

40

10 mg de nanotubo cortado 12 se dispersan en 10 ml de MeOH (metanol) y se adiciona el epóxido a la mezcla (1,4 μ mol, 0,2 mg). La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μ m). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se obtienen 9 mg del compuesto 13 (MAHC17).

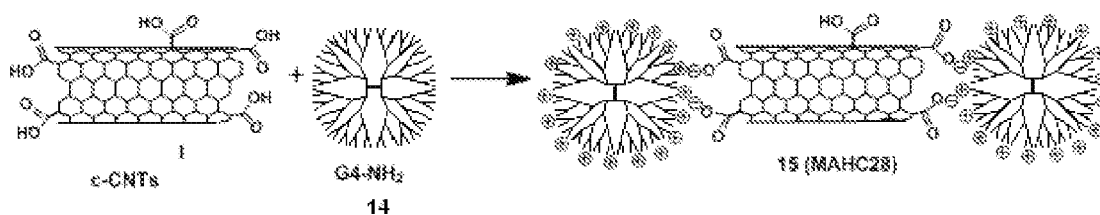


60

Compuesto 15 (MAHC28)

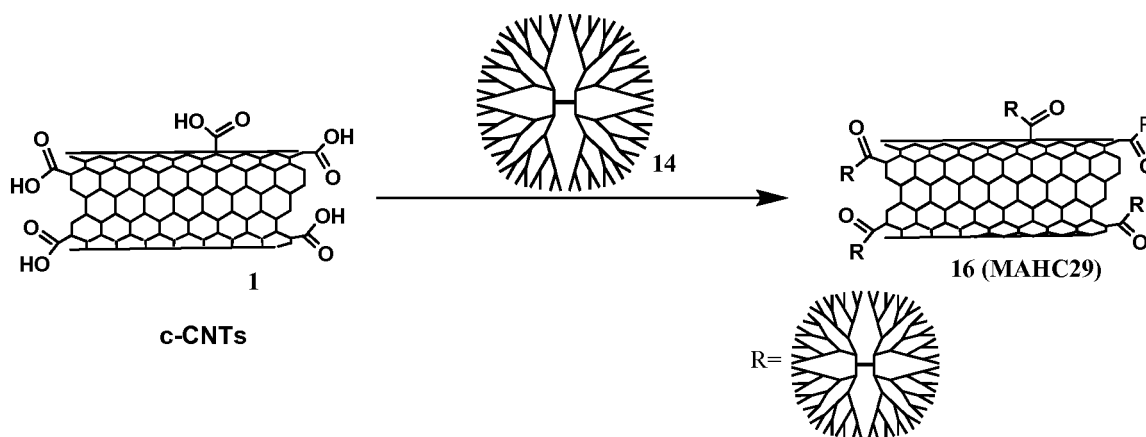
65

20 mg de nanotubos cortados 1 se dispersan en 5 ml de DMF y se adiciona gota a gota una disolución acuosa del dendrímero comercial en metanol, PAMAM de cuarta generación (14) (0,09 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μ m). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se obtienen 20 mg del compuesto 15.



Compuesto 16 (MAHC29)

20 mg de nanotubos de carbono 1 se dispersan en 5 ml de DMF y seguidamente se adiciona 20 mg de EDC y 20 mg de HOBt y se agita durante 30 minutos. Posteriormente se adiciona gota a gota una disolución acuosa del dendrímero comercial en metanol, PAMAM de cuarta generación (14) (0,09 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 40°C durante 24 horas. Tras enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el crudo de reacción se filtra empleando un sistema Millipore de membrana (PTFE, 0,2 μ m). El sólido negro que se recoge tras la filtración, se lava empleando ciclos en los que se combina sonicación y filtración con metanol, acetona y diclorometano hasta que el filtrado sea transparente y finalmente se secan y se obtienen 17 mg del compuesto 16.



Ejemplo 2

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

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata

El cultivo de neuronas granulares del cerebelo se obtuvieron conforme a protocolos descritos previamente (*Hansen RK J Neurochem. 2007; 103(4):1396-407 Peng LA Brain Res Dev Brain Res. 1991; 63(1-2):1-12*), 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 (medio basal "eagle"), suplementado con 24,5 mM de potasio, 2 mM de glutamina, 10% de FBS (suero fetal bovino) y 50 μ g/ml de gentamicina. A las 24 horas, Ara-C (arabinosido de citosina) se añadió al medio para obtener una concentración final de 10 μ M 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 (V. Bruno *et al.*, *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 (“Hank’s Buffered Salt Solution”). Los lóbulos corticales se trituraron pipeteando unas diez veces con una pipeta Pasteur. Después de centrifugar 5 minutos a 800 ×g, las células se resuspendieron en medio de cultivo Neurobasal suplementado con suero 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 y que aparezcan receptores de glutamato.

Formación de los complejos nanotubo-siRNA

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

Experimentos de retardo en gel del complejo nanotubo-siRNA

El retardo en gel de agarosa se utilizó para averiguar la concentración adecuada para obtener la mayor efectividad de unión posible entre ambas moléculas (Haberland A *Mol Biol Rep.* 2009; 36:1083-93; Zou K *et al Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147B(6):769-77). Se testó la mezcla de distintas concentraciones de nanotubo 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*). Los resultados se pueden observar en las figuras 1 a 9 para MAHC 17, MAHC23, MAHC24, MAHC28, MAHC29, MAHC32, MAHC33 y MAHC34 y CNH35 respectivamente.

Estudios de Citotoxicidad

Pruebas para evaluar la toxicidad del nanotubo se realizaron en distintos tipos celulares, determinando la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Posadas I, *et al.*, *Pharm Res.* 2009 May; 26(5):1181). Para ello, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y se expusieron a soluciones con diferentes concentraciones de nanotubo para realizar curvas de toxicidad concentración-dependiente durante 24, 48 o 74 horas. Los efectos tóxicos se evaluaron midiendo la ruptura de la membrana celular y la consiguiente liberación de la LDH al sobrenadante a través del kit CytoTox96® (Promega). Las células se despegaron mecánicamente, se lavaron con PBS (*Phosphate buffered saline*) y fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. La absorbancia del lisado y del sobrenadante celular se midió utilizando un espectofotómetro de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

La toxicidad de los tratamientos con los complejos nanotubo-siRNA, utilizando distintas concentraciones de nanotubo (1-8 µM) en combinación con 100 nM de siRNA, se estudió por citometría de flujo. Para ello, después de los tratamientos, las células se incubaron con yoduro de propidio 0,5 mg/ml al menos durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Seguidamente, las células se tripsinizaron y se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental, se calculó el porcentaje de células con la membrana citoplasmática dañada (yoduro de propidio positivas) (Weber J *Control Release.* 2008 Nov 24; 132(1):55-64. Perumal *Biomaterials.* 2008 Aug-Sep; 29(24-25):3469-76). Los resultados de la citotoxicidad para neuronas corticales se pueden observar en la figura 10 para MAHC17 y en la figura 11 para MAHC28.

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

Después de 24-72 horas con las células en presencia de los complejos nanotubo-siRNA, utilizando 100 nM de siRNA fluorescente para realizarlos, se recogieron los medios condicionados y las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Las células totales -vivas y muertas- presentes en la suspensión resultante al juntar el tripsinizado celular y el medio condicionado se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU). A partir de la evaluación de 10.000 células por condición experimental se calculó el porcentaje de células transfectadas con siRNA fluorescente (Weber J *Control Release.* 2008 Nov 24; 132(1):55-64. Perumal *Biomaterials.* 2008 Aug-Sep; 29(24-25):3469-76).

La translocación del complejo nanotubo-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 nanotubo-siRNA, se visualizaron y fotografiaron en un microscopio confocal (Nikon Eclipse TE200) utilizando la longitud de onda adecuada para la excitación del fluoróforo con el que el siRNA está marcado (Gras R *Pharm Res.* 2009 Mar; 26(3):577-86). Los resultados sirvieron para determinar el

porcentaje de células positivas para la transfección intracelular de siRNA, y se muestran en las figuras 13 a 15 para los complejos MAHC28-SiRNA, MAHC29-SiRNA y CNH35-SiRNA en neuronas corticales y en la figura 16 para CNH35-siRNA en neuronas granulares de cerebelo.

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

10 El ARN total celular se aisló mediante un método estándar con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (*TriPure Isolation Reagent*, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN). El ARN se transformó en cDNA y éste se utilizó para realizar la real-time PCR. Utilizamos la real-time PCR para estudiar el silenciamiento de distintos genes por medio de 100 nM de siRNA vehiculizado con distintas concentraciones de IR8. El gen beta-actina se utilizó como gen de referencia para todos los experimentos de real-time PCR. La reacción se realizó utilizando procedimientos estándar para la “*StepOnePlus Real-Time PCR System*” (Applied Biosystems). En cada experimento, se calculó la media del ciclo umbral [cycle threshold (C_T)] de los triplicados de cada uno de los genes estudiados y del gen utilizado como referencia, pudiendo así comparar la expresión génica tras los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en la figura 17.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

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

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

10 para la elaboración de un medicamento para terapia génica.

2. El uso según la reivindicación anterior, donde la nanoestructura de carbono es un nanotubo de carbono.

15 3. El uso según la reivindicación anterior, donde el nanotubo de carbono es de tipo mono, bi o multicapas.

4. El uso según la reivindicación anterior, donde el nanotubo de carbono tiene un diámetro de entre 0,6 y 3 nm cuando es monocapa, de entre 1 y 4 nm en los bicapa y de hasta 80 nm si son multicapa.

20 5. El uso según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores, donde el nanotubo de carbono tiene una longitud inferior a 105 nm.

6. El uso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, donde el nanotubo de carbono está cortado en las puntas y/o en su capa exterior.

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

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

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

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

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

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

45 13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dendrón y/o dendrímero tiene un peso molecular comprendido entre 300 y 100000 g/mol, preferiblemente entre 1000 y 10000 g/mol.

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

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

55 16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dendrón y/o dendrímero comprende entre 2 y 1024 grupos funcionales de superficie.

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

60 18. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde los grupos de superficie son grupos amino, preferiblemente aminas terciarias y/o primarias, y más preferiblemente estas aminas terciarias y/o primarias están protonadas a un pH inferior a 6.

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

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

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

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

i)

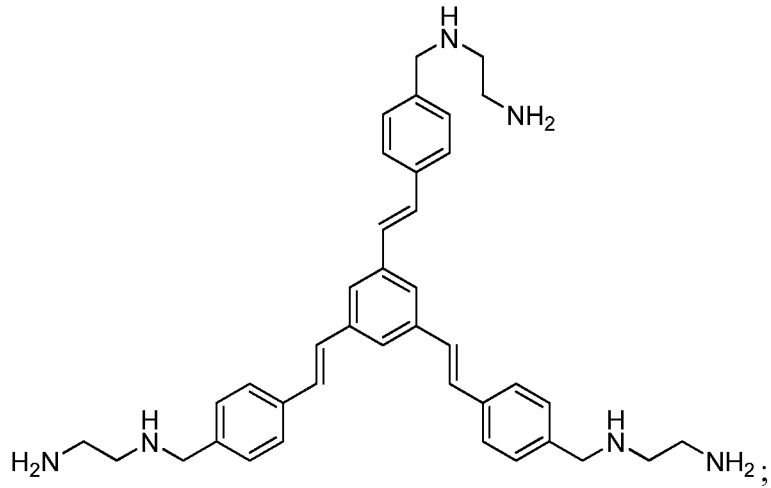
10

15

20

25

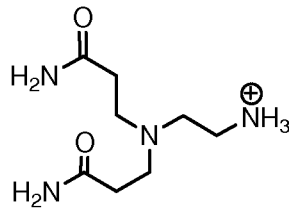
30



ii)

35

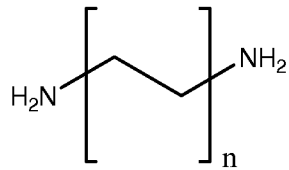
40



iii)

45

50

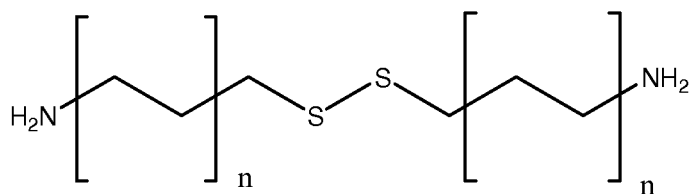


iv)

55

60

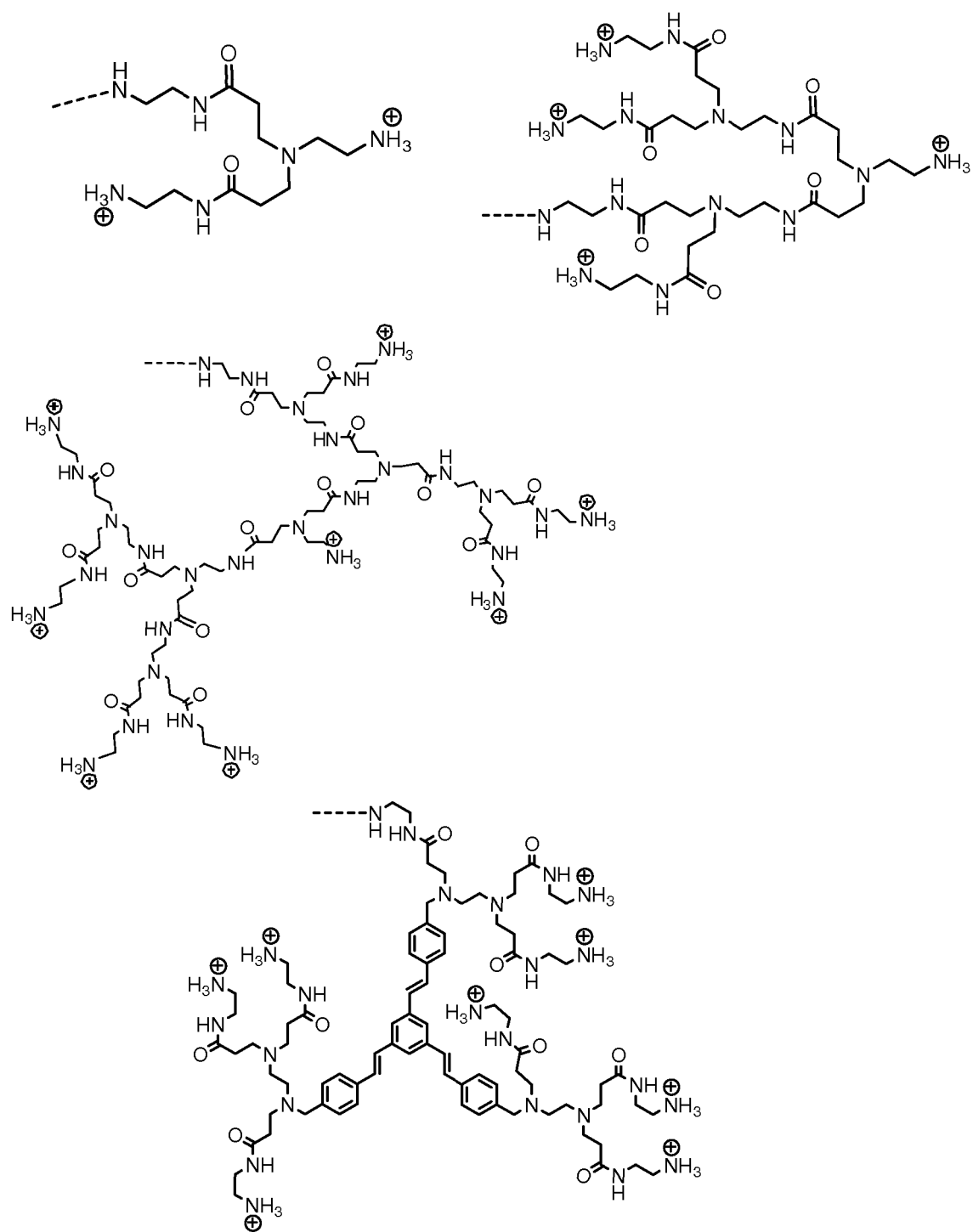
65



donde n es un número entero desde 1 a 4.

23. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, donde los dendrones y/o dendrímeros se seleccionan entre:

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



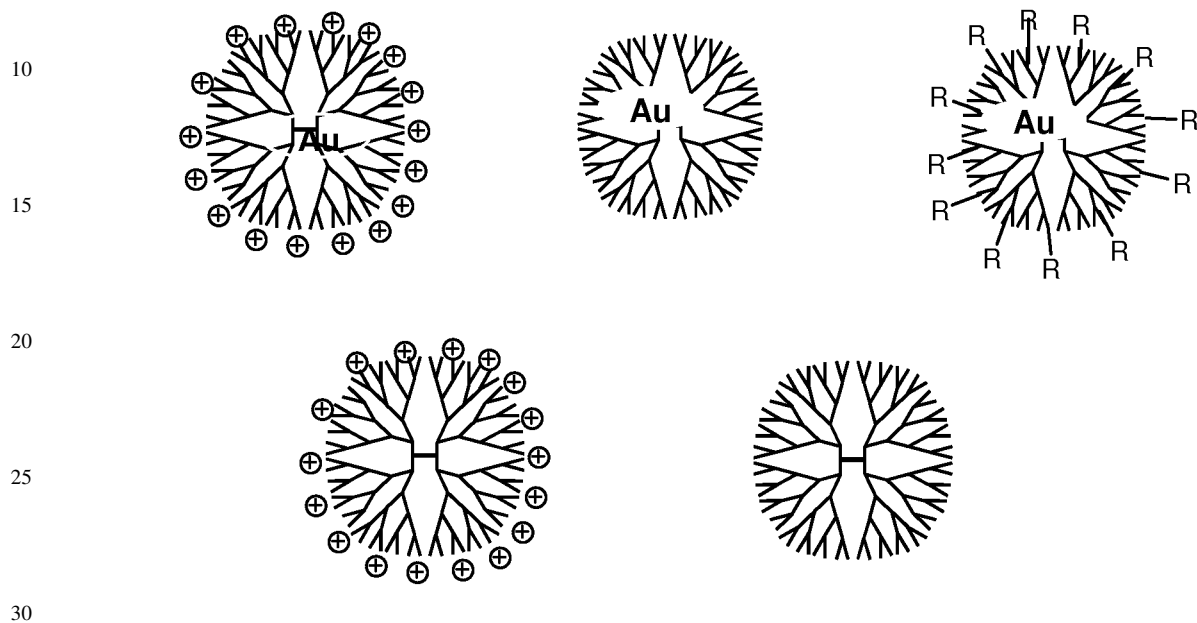
y/o los dendrímeros tipo PAMAM de cuarta o sexta generación.

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

25. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24, donde los dendrímeros tipo PAMAM comprenden en su superficie grupos amino cuaternarios.

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

27. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, donde el dendrímero PAMAM de cuarta o sexta generación se selecciona entre:



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

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

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

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

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

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

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

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

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

36. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

37. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad crónica, preferiblemente la diabetes y la artritis reumatoide.

38. El uso de los vectores descritos en las reivindicaciones 1 a 31, para la preparación de un medio de contraste o sonda de imagen que comprenda el vector no viral y una molécula de mareaje radiológico.

39. Vector no viral como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.

40. Composición farmacéutica que comprende el vector no viral según la reivindicación 39 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

41. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior, donde además comprende al menos otro principio activo.

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

43. Kit de transfección de ARN de silenciamiento que comprende el vector no viral según la reivindicación 39.

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

45. Procedimiento para la síntesis de los vectores no virales según la reivindicación 39, que comprende las siguientes etapas:

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

b. añadir la mezcla anterior a una disolución de nanoestructuras previamente dispersadas.

46. El procedimiento según la reivindicación anterior, donde las nanoestructuras están previamente cortadas.

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

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

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

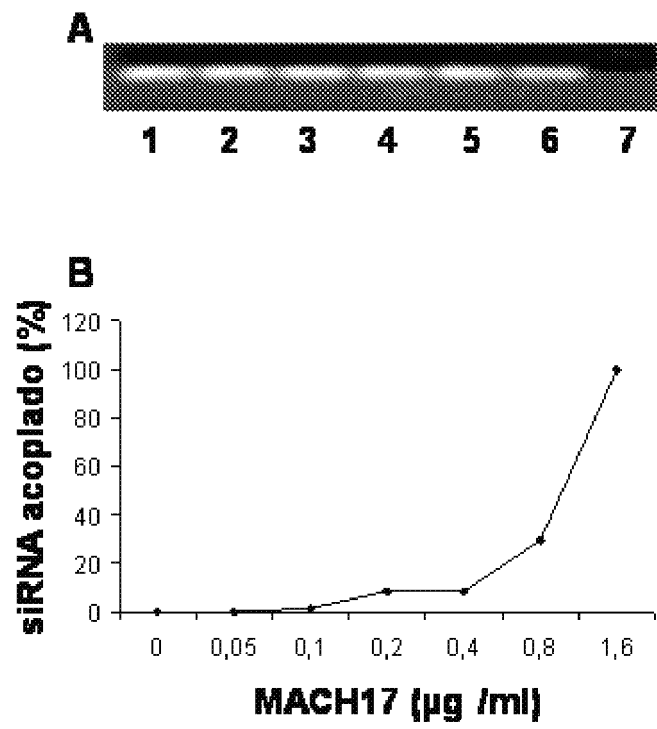


FIG. 1

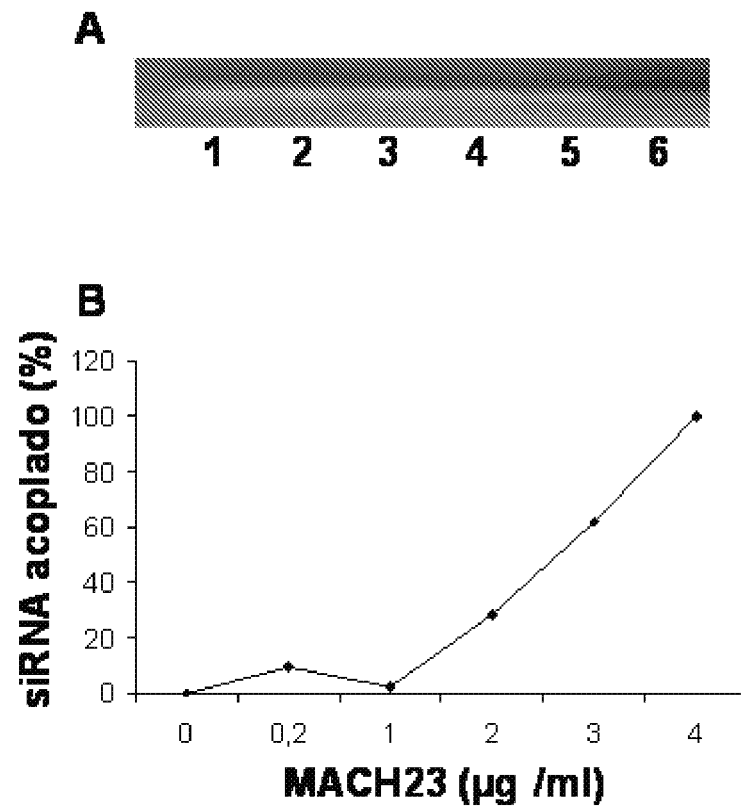


FIG. 2

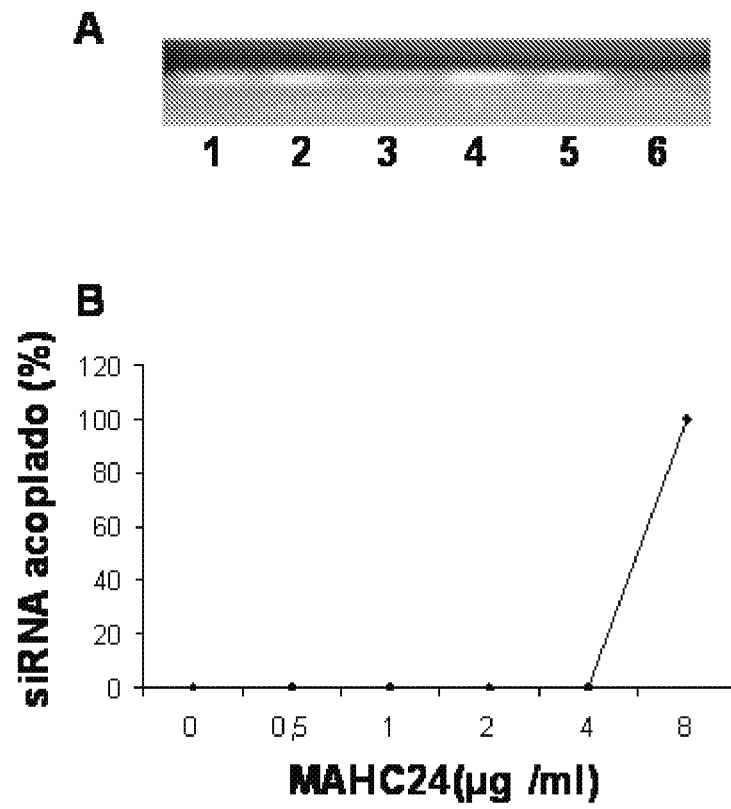


FIG. 3

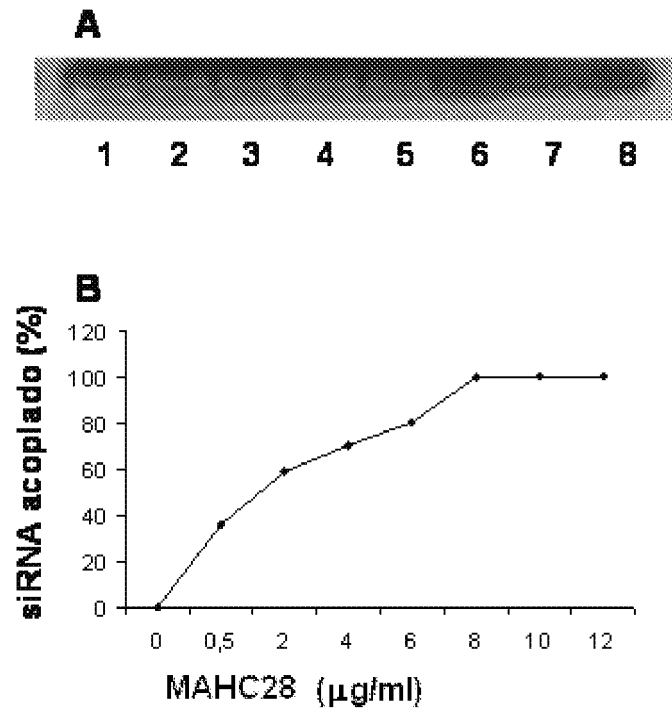


FIG. 4

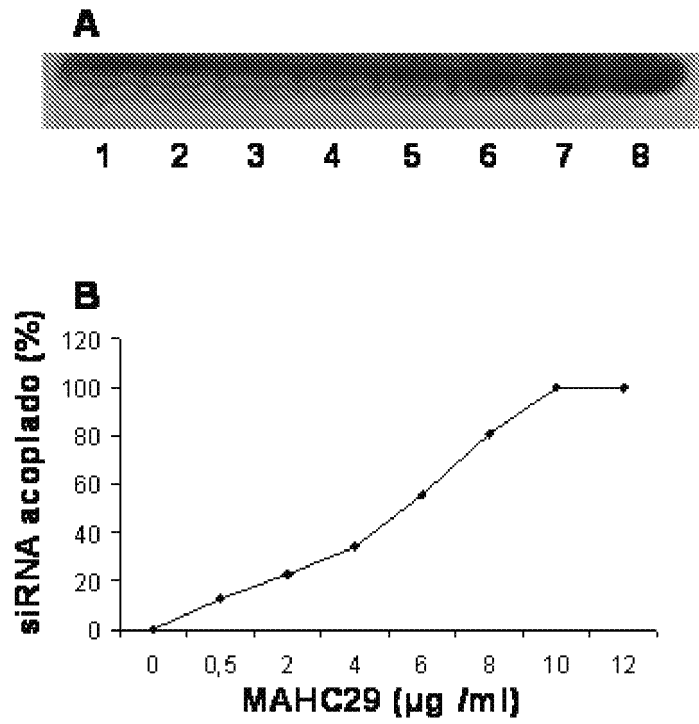


FIG. 5

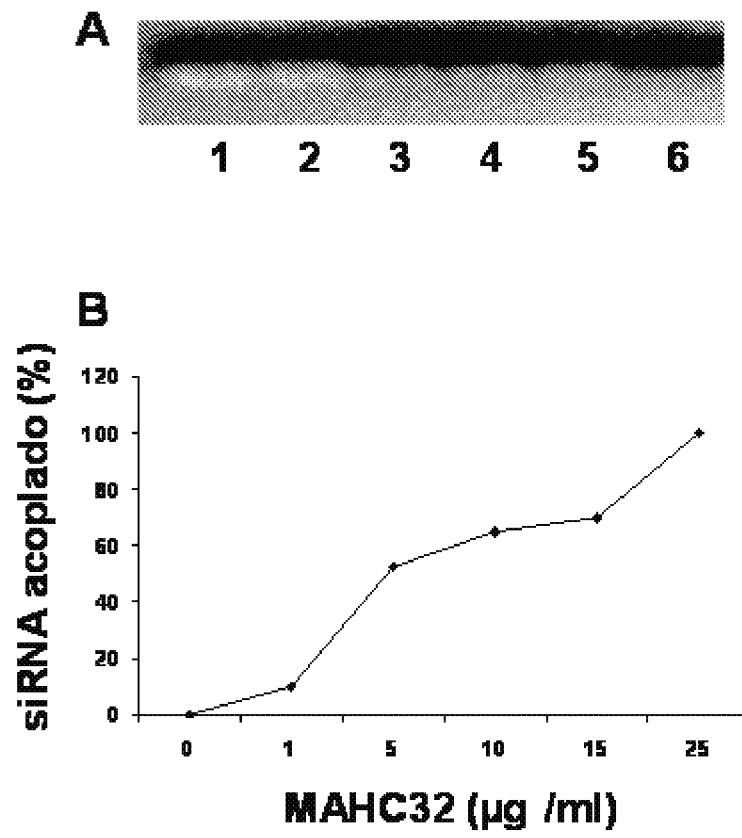


FIG. 6

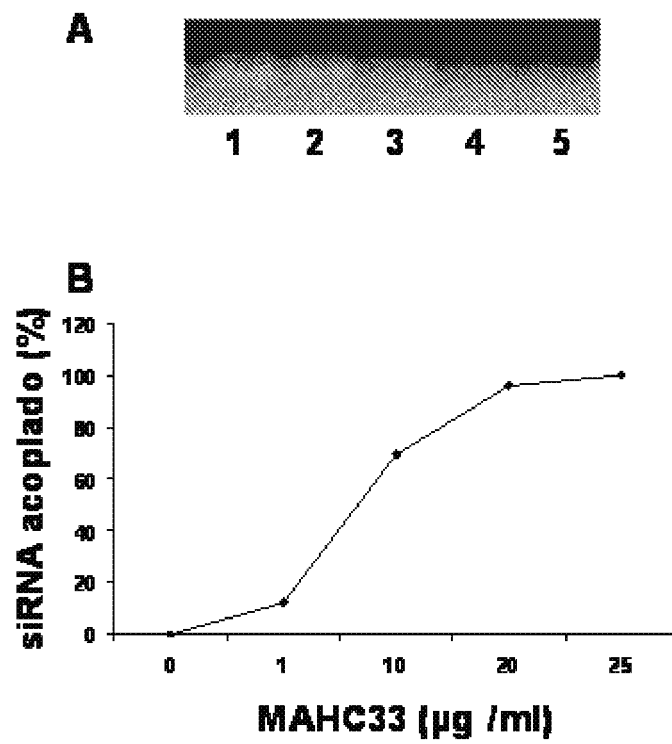


FIG. 7

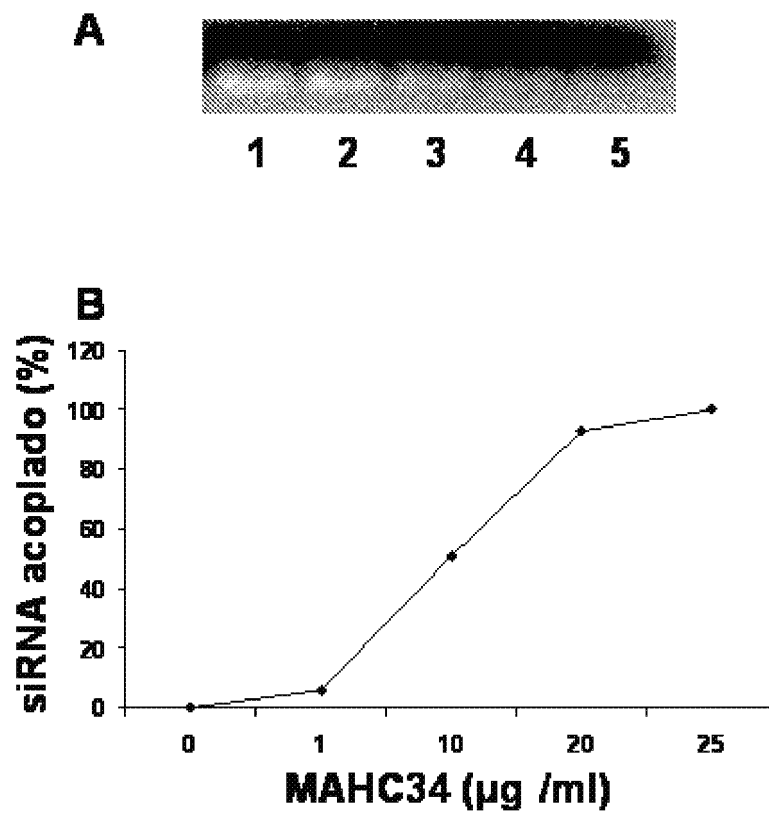


FIG. 8

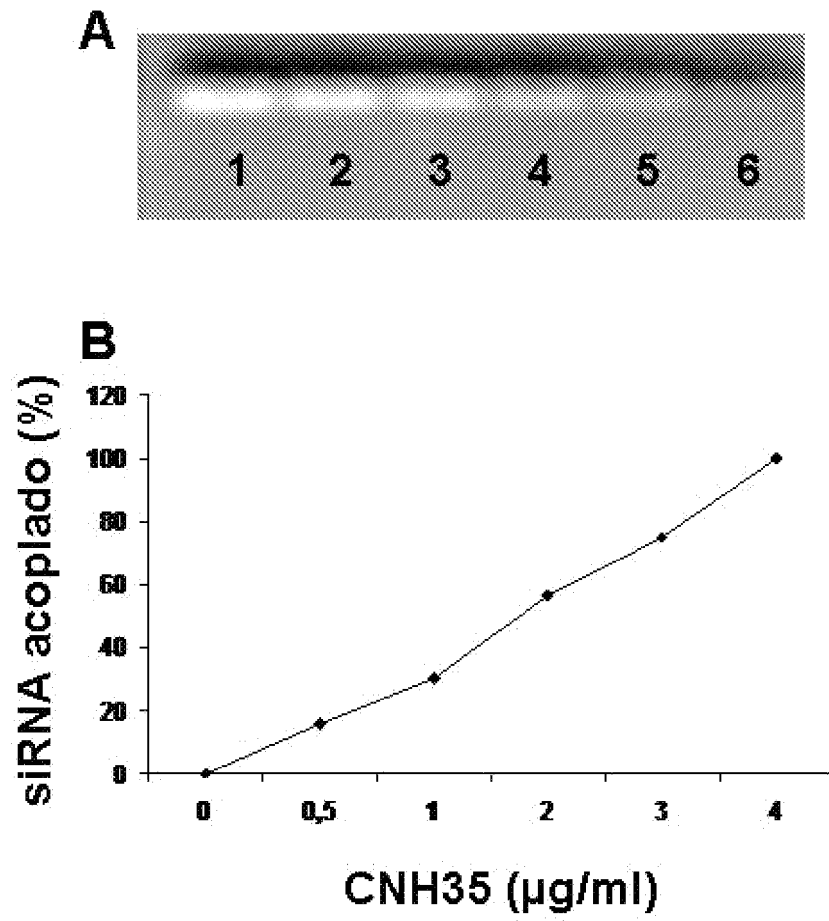


FIG. 9

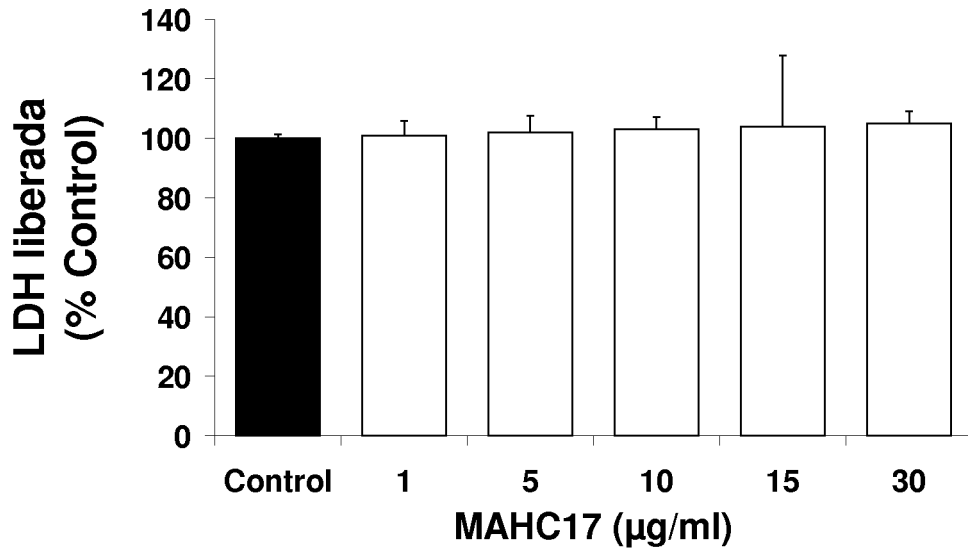


FIG. 10

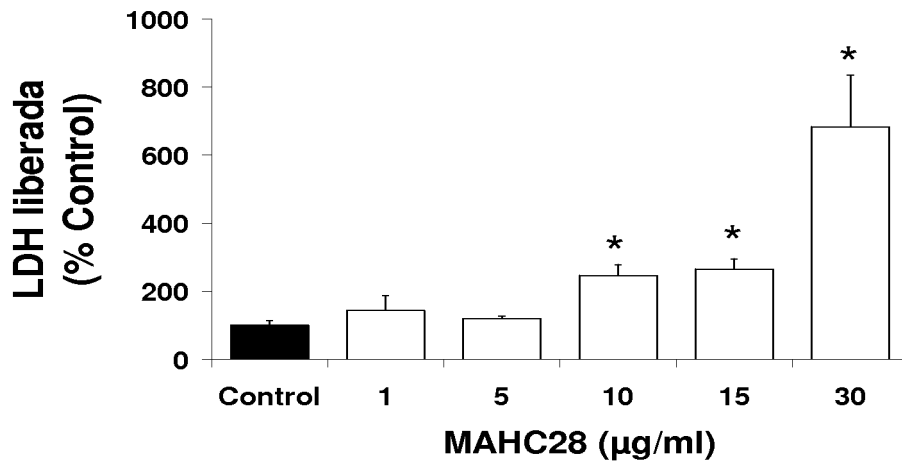


FIG. 11

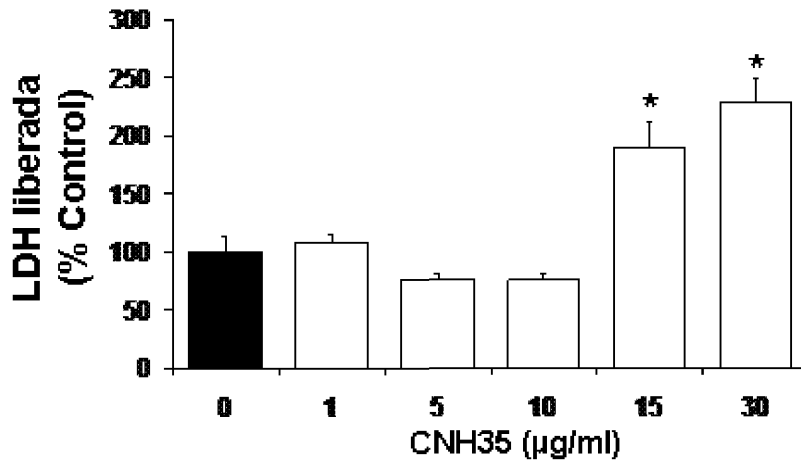


FIG. 12

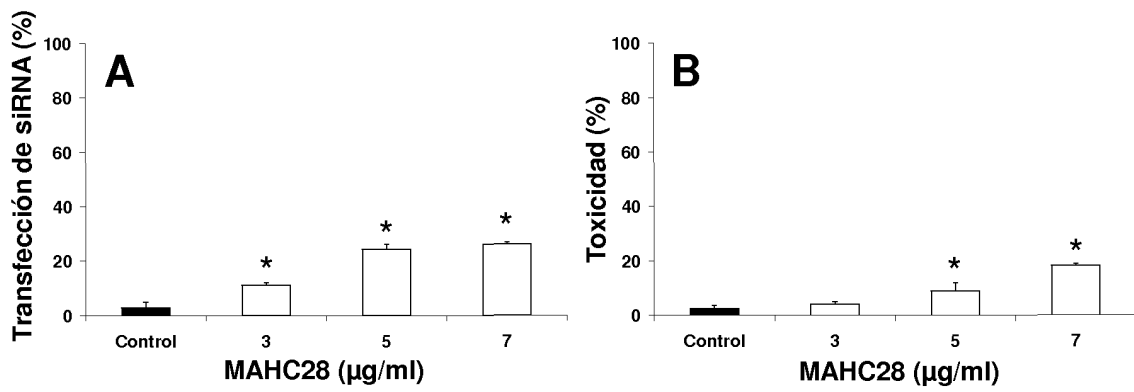


FIG. 13

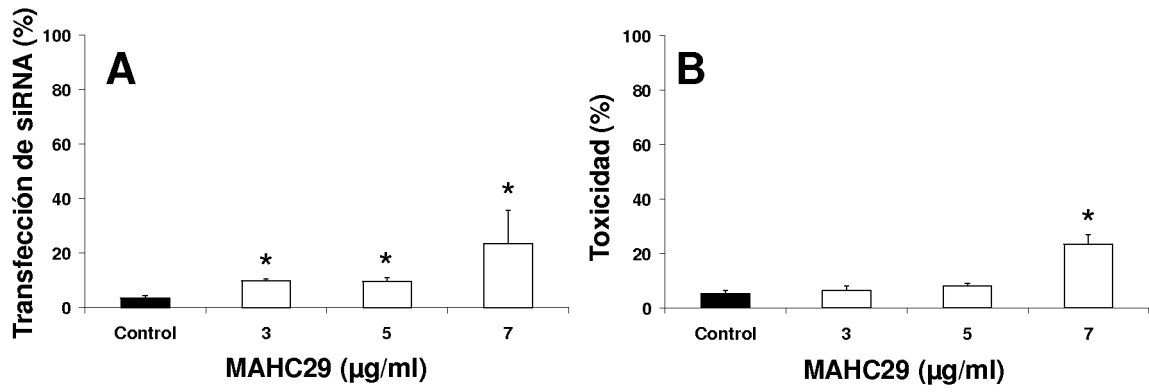


FIG. 14

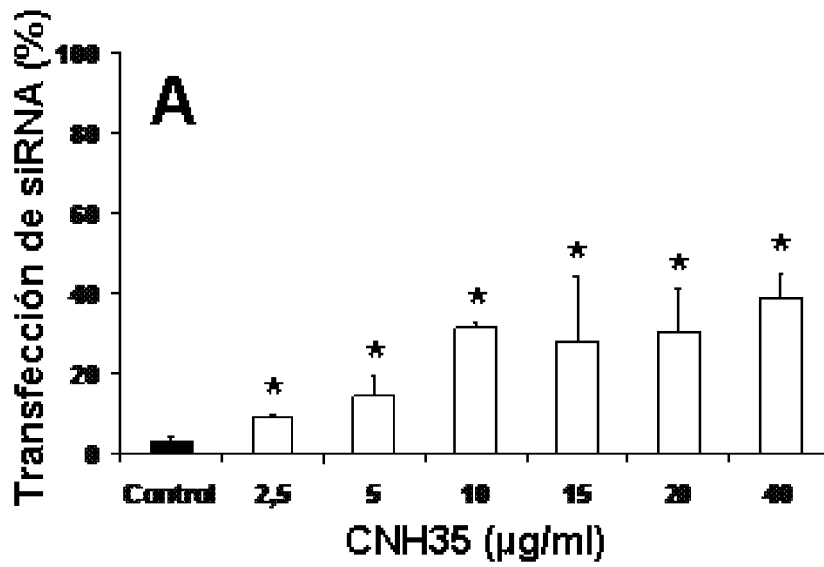


FIG. 15A

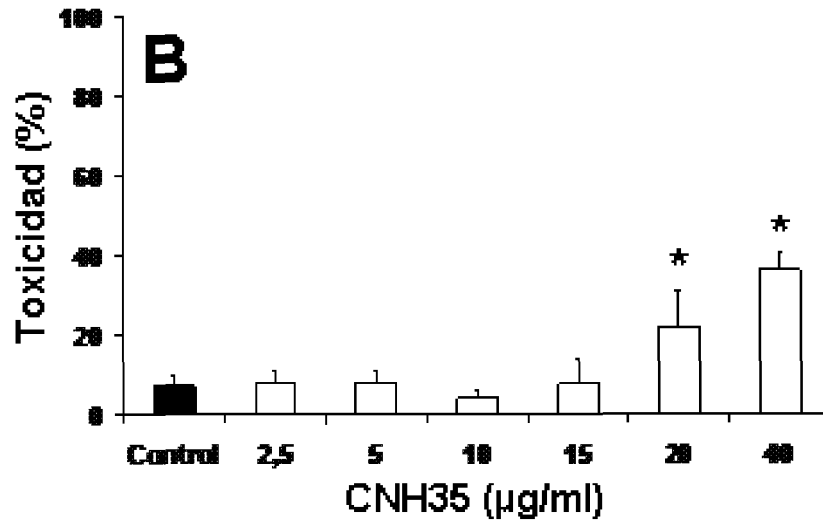


FIG. 15B

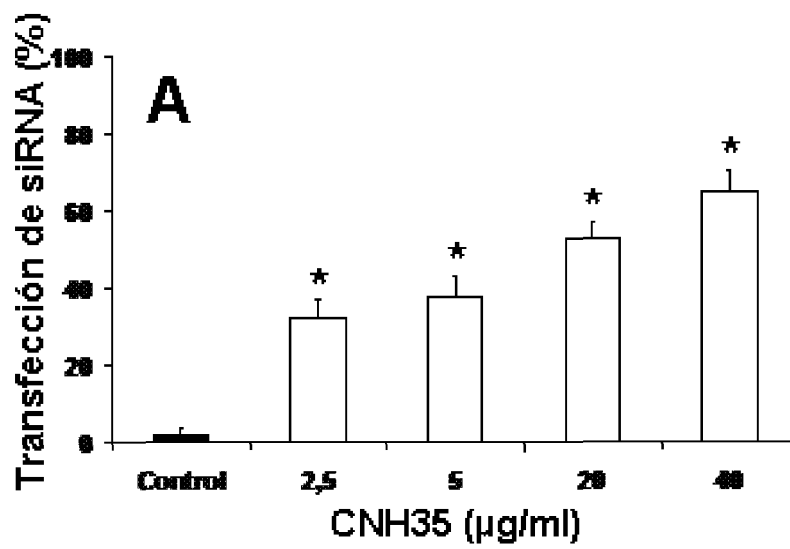


FIG. 16A

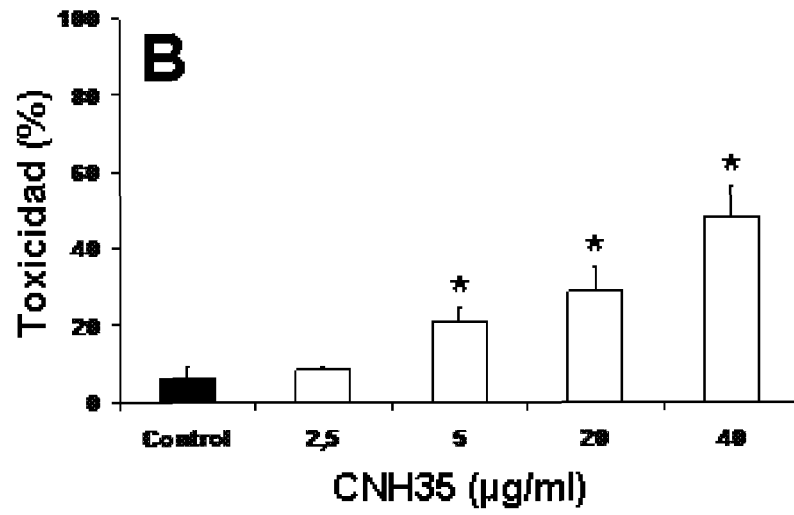


FIG. 16B

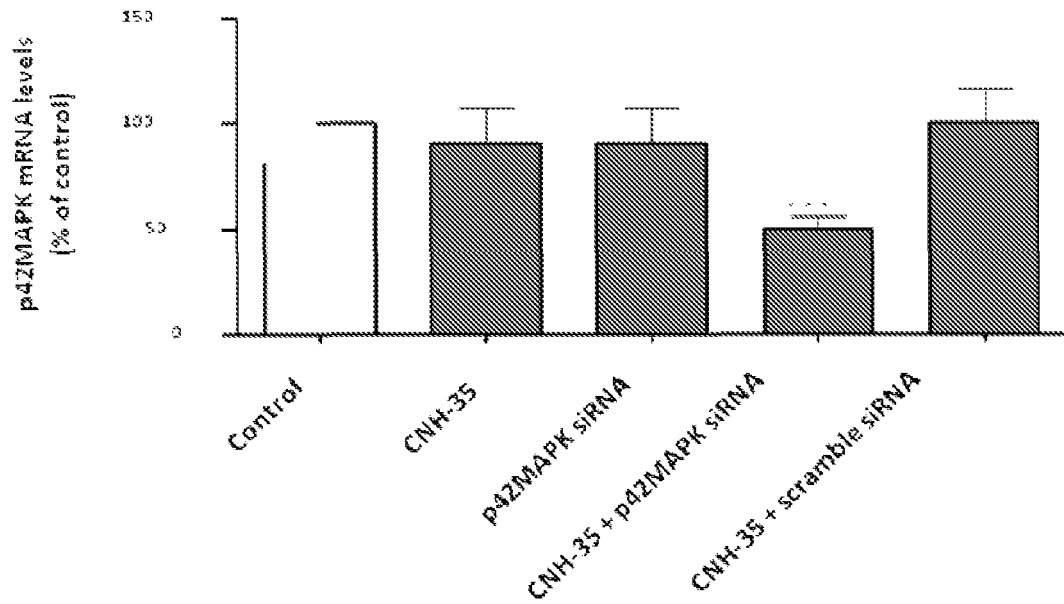


FIG. 17



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031203

22 Fecha de presentación de la solicitud: 02.08.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	PAN et al. "Design of dendrimer modified carbon nanotubes for gene delivery". Chinese Journal of Cancer Research". 2007. Vol 19(1), páginas 1-6, todo el documento.	1-5,7-23,27-31,36,38-42,45,49 6,24,32-35,37,46-48
X	HERRERO et al. "Synthesis and characterization of a carbon nanotube-dendron series for efficient siRNA delivery". Journal of the American Chemical Society. 2009. Vol. 131, páginas 9843-9848, todo el documento.	25-26,43-44
Y	HERRERO et al. "Gold dendrimer encapsulated nanoparticles as labeling agents for multiwalled carbon nanotubes". ACS Nano. 29.01.2010. Vol. 4(2), páginas 905-912, especialmente resumen; páginas 906, 910; figura 1.	24,48
Y	FARAJI & WIPF. "Nanoparticles in cellular drug delivery". Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009. Vol. 17, páginas 2950-2962, especialmente resumen; páginas 2959-2960.	32
Y	ROSEN & ELMAN. "Carbon nanotubes in drug delivery: focus on infectious diseases". Expert Opinion on Drug Delivery. 2009. Vol. 6(5), páginas 517-530, especialmente resumen; páginas 522-523.	33-35
Y	TCHOUL et al. "Effect of mild nitric acid oxidation on dispersability, size, and structure of single-walled carbon nanotubes". Chemistry of Materials. 2007. Vol. 19, páginas 5765-5772, especialmente resumen; páginas 5765, 5769, 5771.	6,46-47
Y	US 20030180491 A1 (HIRSCH et al.) 25.09.2003, resumen; página 5, párrafo 87.	37

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

19.09.2011

Examinador

M. D. García Grávalos

Página

1/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K47/34 (2006.01)
A61K48/00 (2006.01)
C12N15/87 (2006.01)
B82Y5/00 (2011.01)
C01B31/02 (2006.01)
A61K31/00 (2006.01)
A61K49/00 (2006.01)
A61P25/00 (2006.01)
A61P29/00 (2006.01)
A61P31/00 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

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

A61K, C12N, B82Y, C01B, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.09.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-6, 19, 24-26, 32-35, 37, 40-49	SI
	Reivindicaciones 1-3, 7-18, 20-23, 27-31, 36, 38-39	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-49	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PAN et al. Chinese Journal of Cancer Research. 2007. Vol 19(1), páginas 1-6.	2007
D02	HERRERO et al. Journal of the American Chemical Society. 2009. Vol. 131, páginas 9843-9848.	2009
D03	HERRERO et al. ACS Nano. 29.01.2010. Vol. 4(2), páginas 905-912.	29.01.2010
D04	FARAJI & WIPF. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009. Vol. 17, páginas 2950-2962.	2009
D05	ROSEN & ELMAN. Expert Opinion on Drug Delivery. 2009. Vol. 6(5), páginas 517-530.	2009
D06	TCHOUL et al. Chemistry of Materials. 2007. Vol. 19, páginas 5765-5772.	2007
D07	US 20030180491 A1	25.09.2003

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

La presente solicitud se refiere a vectores no virales obtenidos mediante la funcionalización de nanotubos de carbono con dendrones y/o dendrímeros, y al uso de dichos vectores en terapia génica y en procedimientos de diagnóstico por imagen.

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

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

El documento D03 se refiere a la preparación de nanotubos de carbono que interactúan en su superficie con dendrímeros tipo PAMAM que contienen átomos de oro (ver resumen; páginas 906, 910; figura 1).

El documento D04 divulga una revisión de diferentes aproximaciones al uso de nanopartículas como transportadores de compuestos para el tratamiento de patologías que comprenden patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (ver resumen; páginas 2959-2960).

El documento D05 se refiere al uso de nanotubos de carbono funcionalizados como vectores útiles en terapia génica contra enfermedades infecciosas provocadas por agentes bacterianos o virales (ver resumen; páginas 522-523).

El documento D06 divulga los resultados de un estudio sobre el efecto producido en la estructura de los nanotubos de carbono por el tratamiento con ácido nítrico (ver resumen; páginas 5765, 5769, 5771).

El documento D07 se refiere a nanopartículas basadas en fulerenos, y en particular nanotubos de carbono, a cuya superficie se pueden unir, entre otros, péptidos con motivos para el reconocimiento de antígenos. Estas nanopartículas son útiles como vectores de transporte de agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas patologías, entre las que se incluyen enfermedades tumorales, infecciosas o la artritis (ver resumen; página 5, párrafo 87).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986).**1.1. Reivindicaciones 1-49.**

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

Para la construcción de los vectores, según D01, se producen grupos carboxilo en la superficie de los nanotubos mediante tratamiento con ácido nítrico. Después proceden a la unión del dendrímero mediante enlaces amida formados por reacción de los grupos carboxilo del nanotubo con los grupos amino de los dendrímeros. Una vez formadas las partículas nanotubo-dendrímero, la unión del oligonucleótido antisentido a los extremos del dendrímero ocurre por interacción electrostática que, predeciblemente, en algunos casos implicará la interacción entre el fosfato con carga negativa del extremo 5' terminal del oligonucleótido y el grupo amino del extremo del dendrímero.

Asimismo, en el documento D01 se menciona expresamente el potencial uso de los vectores anteriormente descritos como transportadores de agentes de contraste útiles en técnicas de diagnóstico por imagen, y en particular de resonancia magnética.

En base a lo anterior, el documento D01 anticiparía de forma idéntica el objeto de las reivindicaciones 1-3, 7-18, 20-23, 27-31, 36 y 38-39 de la presente solicitud, por lo que dichas reivindicaciones no satisfacerían el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. Reivindicaciones 4-5, 19, 40-42, 45, 49.

Una de las diferencias entre el objeto de las reivindicaciones 4-5 y 19 y el documento D01 consiste en que en D01 no se menciona de forma explícita las magnitudes concretas de diámetro y longitud de los nanotubos empleados para la construcción de los vectores ni la relación carga/masa de los dendrímeros a pH inferior a 5. Sin embargo, los nanotubos de D01 son obviamente compatibles con el uso de los mismos objetos de la presente solicitud, y además los dendrímeros de D01 tienen la misma composición que algunos de los dendrímeros de la invención. Así pues, aun en el caso de que los nanotubos y dendrímeros de D01 no presentaran valores para esos parámetros particulares incluidos exactamente en los rangos definidos en las reivindicaciones 4, 5 y 19, se podría concluir que el objeto de las citadas reivindicaciones constituiría una mera alternativa sin efecto inventivo para un experto en la materia.

Por otra parte, en relación con las reivindicaciones 40-42, la elaboración de una composición farmacéutica para terapia génica antitumoral que comprendiera como principio activo un vector como el divulgado en el documento D01 sería una consecuencia técnica lógica de la utilidad terapéutica del vector, y resultaría obvia para un experto en la materia a partir del conocimiento del estado de la técnica.

En cuanto al procedimiento de síntesis de los vectores no virales objeto de las reivindicación 45, la diferencia con el método de síntesis anticipado en D01 estriba meramente en el orden de ejecución de los pasos del procedimiento. Sin embargo, de lo divulgado en la solicitud y en el estado de la técnica no se deduce que el cambio de orden en las etapas aporte ninguna ventaja técnica especial o mejora inesperada en el rendimiento. Por ello, se considera que un experto en la materia consideraría el procedimiento reivindicado una mera alternativa de lo anticipado en el estado de la técnica. Por otra parte, la reivindicación 49 define varias opciones para la funcionalización de los nanotubos de carbono entre las que se encuentra la oxidación directa, que es el método aplicado en D01.

2.2. Reivindicaciones 25-26, 43-44.

El documento D02 anticipa el uso de nanotubos de carbono multicapa asociados a dendrímeros tipo PAMAM que poseen en sus extremos grupos amino cuaternarios y que, en particular, contienen el sustituyente $R = -CH_2-CH(OH)-CH_2-N+(CH_3)_3$. Dicho R en D02 se enlaza covalentemente al extremo del dendrímero a través de un grupo amino secundario y no cuaternario como define la reivindicación 26. Sin embargo, en ausencia de una justificación en la descripción de la invención de las ventajas aportadas por el diferente grado de sustitución del grupo amino, los dendrímeros definidos en las reivindicaciones 25 y 26 constituirían meras alternativas a la estructura anticipada en D02 cuya elección resultaría obvia para un experto en la materia.

Respecto a las reivindicaciones 43-44, cabe destacar que los vectores no virales anticipados en D02 cumplen la definición de los vectores de la presente solicitud dada en la reivindicación 1. Dichos vectores se emplean para transfectar con siRNA células tumorales de la línea HeLa con el propósito de silenciar genes. Por lo tanto, la fabricación de un kit de transfección de ARN de silenciamiento con las características del reivindicado en la solicitud y su uso en células tumorales resultaría evidente para un experto en la materia a partir de lo divulgado en D02.

2.3. Reivindicaciones 24, 48.

El documento D01 no anticipa el uso de dendrímeros tipo PAMAM que contengan partículas de oro. Sin embargo, el documento D03 se refiere a nanotubos de carbono cuya superficie se asocia a dendrímeros PAMAM de sexta generación en los que se encuentran encapsuladas partículas de oro, los cuales se obtienen por adición a una solución del dendrímero de una solución acuosa de $HAuCl_4$ y posterior reducción con $NaBH_4$. Así pues, la combinación de los documentos D01 y D03 permitiría a un experto en la materia llegar sin esfuerzo inventivo al objeto de las reivindicaciones 24 y 48.

2.4. Reivindicaciones 32-35, 37.

El documento D01 difiere del objeto de las reivindicaciones 32-35, 37 en que el uso terapéutico de los vectores de D01 se refiere sólo a terapia génica antitumoral. Sin embargo, en el estado de la técnica podemos encontrar referencias al uso de vectores no virales para el tratamiento de otras patologías. Así, por ejemplo, el documento D04 menciona el uso de nanopartículas para el transporte de fármacos contra enfermedades neurodegenerativas, y D05 y D07 anticipan el uso de nanopartículas basadas en nanotubos de carbono como transportadores de moléculas con actividad antiinfecciosa (antiviral o antibacteriana) o antiartrítica respectivamente. Por lo tanto, un experto en la materia podría llegar al objeto de las reivindicaciones 32-35 y 37 mediante la combinación de lo divulgado en D01 alternativamente con D04, D05 ó D07.

2.5. Reivindicaciones 6, 46-47.

Una diferencia adicional entre D01 y la presente solicitud consiste en que D01 no menciona expresamente la utilización de nanotubos de carbono cortados ni que éstos sean dispersados en una disolución de N,N-dimetilformamida (DMF). Cabe señalar, sin embargo, que estos elementos se encuentran recogidos, entre otros, en el documento D06 donde se muestra que el tratamiento con ácido nítrico para su funcionalización produce nanotubos acortados que son solubles en DMF. Por lo tanto, el uso de vectores preparados a partir de nanotubos de carbono cortados y solubles en DMF resultaría obvio para un experto en la materia a la luz de lo divulgado en D01 y D06.

En base a todos los razonamientos anteriormente expuestos, el objeto de las reivindicaciones 4-6, 19, 24-26, 32-35, 37, 40-49 no cumpliría el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).