

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 994**

21 Número de solicitud: 201130804

51 Int. Cl.:

C08G 83/00 (2006.01)

C07D 249/04 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

18.05.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.12.2012

Fecha de la concesión:

14.10.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

24.10.2013

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (50.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES;
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GREGORIO
MARAÑÓN (FIBHGM) (25.0%) y
UNIVERSIDAD DE NAVARRA (25.0%)

72 Inventor/es:

DE LA MATA DE LA MATA, Francisco Javier;
GOMEZ RAMIREZ, Rafael;
ARNAIZ GARRIDO, Eduardo;
GARCIA GALLEGO, Sandra;
COPA PATIÑO, Jose Luis;
SOLIVERI DE CARRANZA, Juan;
HERNANDEZ ROS, Jose Manuel;
MUÑOZ-FERNANDEZ, M^a Angeles;
BRIZ SEBASTIAN, Veronica;
SERRAMIA LOBERA, M^a Jesus y
TROS DE ILARDUYA, Conchita

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **DENDRIMEROS CARBOSILANOS CATIÓNICOS OBTENIDOS MEDIANTE "CLICK CHEMISTRY", SU PREPARACIÓN Y SUS USOS**

57 Resumen:

Dendrimeros carbosilanos catiónicos obtenidos mediante "click chemistry", su preparación y sus usos. La presente invención se refiere a macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifuncional, denominadas dendrimeros, de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos catiónicos que dan a la macromolécula una carga neta positiva. Estos dendrimeros contienen en su estructura grupos 1,2,3 triazoles resultantes al aplicar una reacción de cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar entre alquinos y azidas. Además la invención se refiere a su procedimiento de obtención y sus usos en biomedicina, tanto como vector no viral de ácidos nucleicos para procesos de terapia génica como su uso como agentes terapéuticos "per se".

ES 2 392 994 B1

DESCRIPCIÓN

Dendrimeros carbosilanos catiónicos obtenidos mediante “click chemistry”, su preparación y sus usos.

La presente invención se refiere a macromoléculas altamente ramificadas sintetizadas a partir de un núcleo polifuncional, denominadas dendrímeros, de estructura carbosilano y funcionalizados en su periferia con grupos catiónicos que dan a la macromolécula una carga neta positiva. Estos dendrímeros contienen en su estructura grupos 1,2,3 triazoles resultantes al aplicar una reacción de cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar entre alquinos y azidas. Además la invención se refiere a su procedimiento de obtención y sus usos en biomedicina, tanto como vector no viral de ácidos nucleicos para procesos de terapia génica como su uso como agentes terapéuticos “*per se*”.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La observación de las moléculas creadas en la naturaleza demuestra una preferencia hacia la formación de enlaces carbono-heteroátomo frente a la formación de enlaces carbono-carbono, así ocurre por ejemplo en los ácidos nucleicos, proteínas u oligosacáridos que pueden ser considerados como polímeros de condensación de subunidades unidas a través de enlaces carbono-heteroátomo. Esto llevó a Sharpless y colaboradores (Hartmuth C. y cols, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004) a proponer una estrategia sintética denominada “*click-chemistry*” basada en reacciones que permitan el acoplamiento de “bloques” modulares de una manera selectiva y eficiente tanto en aplicaciones a pequeña escala como en procesos a gran escala. Las reacciones que pueden considerarse dentro de esta estrategia “click” deben cumplir una serie de requisitos bien definidos, como son los siguientes: debe ser modular, aplicable en un rango amplio de situaciones, de elevado rendimiento, generar como subproductos sustancias no tóxicas y debe ser estereoespecífica (no necesariamente enantioselectiva). Además, estas reacciones se deben poder llevar a cabo en condiciones suaves, a partir de productos de partida fácilmente disponibles y en ausencia de disolventes o en pequeñas cantidades de los mismos y los productos finales deben ser fáciles de aislar.

Existen varios tipos de transformaciones que podrían incluirse dentro de la categoría de “*click chemistry*”, pero sin duda la reacción de cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar de alquinos y azidas catalizada por Cu(I), para dar lugar a 1,2,3 triazoles es el ejemplo más característico y utilizado de todas ellas. Ello se debe a la facilidad de síntesis de derivados alquino y azida, junto a su estabilidad cinética y su tolerancia a una gran variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción. Esta reacción se puede llevar a cabo sin la presencia de grupos funcionales y en rendimientos prácticamente cuantitativos.

Las características específicas que presenta esta tecnología la hacen especialmente útil para abordar la síntesis de dendrímeros, que son especies que presentan una gran cantidad de grupos funcionales, ya que la funcionalización de estos derivados es a menudo difícil y conduce a especies que se encuentran parcialmente funcionalizadas, si no se utilizan reacciones cuantitativas. Por ello, la reacción de cicloadición de Huisgen catalizada por Cu(I) ha sido ampliamente utilizada en la bibliografía para llevar a cabo de una manera cuantitativa y localizada la funcionalización de macromoléculas dendríticas, permitiendo una gran variedad de condiciones de reacción, ver por ejemplo, P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. J. Fréchet, K. B. Sharpless and V. V. Fokin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3928.

Por otro lado, los dendrímeros carbosilano de naturaleza catiónica se han mostrado como un nuevo tipo de compuestos útiles para aplicaciones en biomedicina, ver por ejemplo N. Weber, P. Ortega, M. I. Clemente, D. Shcharbin, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernandez. *J. of Controlled Released* . **2008**, 132, 55-64. Estos derivados no son tóxicos en un rango de concentraciones entre 1 y 5 μM y son capaces de interactuar de forma electrostática con material nucleico como oligonucleótidos o pequeños ARN de interferencia (siRNA) formando bioconjugados denominados “*dendriplexes*”. Estos “*dendriplexes*” han mostrado también una baja toxicidad, capacidad para proteger al material nucleico del ataque de las proteínas del suero y de las nucleasas y son capaces de transportar este material hasta el interior de las células, por lo que se pueden considerar como vectores no virales para la transfección de material nucleico al interior de varios tipos de líneas celulares en procesos de terapia génica.

También, los dendrímeros carbosilano catiónicos han mostrado actividad antimicrobiana tanto frente a bacterias Gram positivas como frente a bacterias Gram negativas. Esta actividad parece estar relacionada con la multivalencia que presentan los dendrímeros, que permite la presencia de un número elevado de funcionalidades sobre una misma molécula. Así, dendrímeros carbosilano con grupos amonio terminales de primera, segunda o tercera generación se han mostrado eficaces como biocidas multivalentes, mostrando una actividad antibacteriana que es más de dos órdenes de magnitud mayor que la de los compuestos análogos monofuncionales (Beatriz Rasines, Jose Manuel Hernández-Ros, Natividad de las Cuevas, Jose Luis Copa-Patiño, Juan Soliveri, María Angeles Muñoz-Fernández, Rafael Gómez, F. Javier de la Mata. *Dalton Transactions* , **2009**, 40, 8704-8713; ES2265291).

Otros posibles usos de los dendrímeros carbosilano catiónicos son: agentes antivirales, agentes antipiróxicos o como vehículos de transporte de fármacos aniónicos.

La eficacia mostrada por los dendrímeros carbosilano catiónicos en diferentes campos de la biomedicina hace necesario el encontrar un método fácil y versátil que permita la obtención de estos derivados en un proceso de elevado rendimiento a partir de reactivos fácilmente accesibles y mediante reacciones químicas cuantitativas que toleren una gran variedad de condiciones de reacción.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

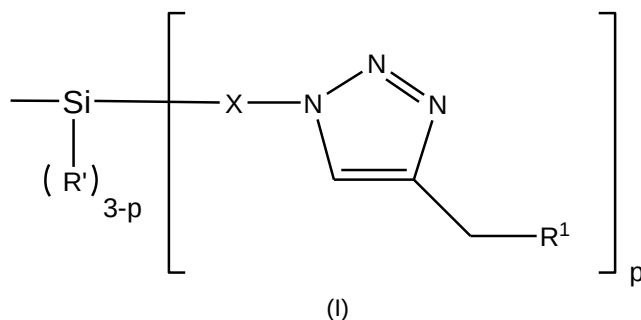
Esta invención describe la funcionalización selectiva de dendrímeros que contienen un esqueleto de naturaleza carbosilano con grupos amina terminales, utilizando para ello reacciones de "click chemistry" entre dendrímeros carbosilano con grupos azida terminales y derivados amino que presentan un grupo alquino terminal en su estructura, conduciendo a dendrímeros carbosilano funcionalizados en su superficie con grupos amino que se unen al esqueleto dendrímérico a través de la formación de derivados 1,4 disustituídos, 1,2,3 triazoles. Además estas macromoléculas altamente ramificadas o dendrímeros, sintetizados a partir de un núcleo polifuncional y de estructura carbosilano, están funcionalizados en su periferia con grupos amonio de naturaleza catiónica, que dotan a la macromolécula de una carga neta positiva. Además, la invención proporciona un procedimiento, que hace uso de la denominada "click chemistry", para su obtención y se refiere también a sus usos en biomedicina.

Los dendrímeros carbosilanos con grupos amonio en su periferia de la presente invención son más estables y solubles en agua que otros dendrímeros carbosilano catiónicos del estado de la técnica, como por ejemplo los descritos en la patente ES2265291, esto confiere una ventaja a los dendrímeros de la invención ya que la estabilidad en agua es un requerimiento esencial para algunas aplicaciones en biomedicina. Esta estabilidad en agua permite, en el caso de los dendrímeros descritos en la presente invención, poder estudiar su actividad antibacteriana y su capacidad de vehiculización de ácidos nucleicos en diferentes condiciones de pH y a distintos tiempos. Por otro lado, en este caso es posible llevar a cabo un estudio de la actividad de estos derivados en los procesos descritos anteriormente en función de la generación del dendrímero.

Además, la síntesis de los nuevos dendrímeros catiónicos descritos en esta solicitud de patente, a través de una reacción de tipo "click" es un proceso más sencillo que los procesos de hidrosililación de alquenilaminas descritos la patente ES2265291 y que transcurre en condiciones suaves y con elevados rendimientos. Además, estos dendrímeros carbosilano de la invención presentan una gran inercia química, lo que es muy útil para el estudio de cualquier aplicación biomédica.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un dendrímero carbosilano que comprende:

- un núcleo polifuncional (Nu), y
- una capa externa, que consiste total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes de grupos de fórmula (I):



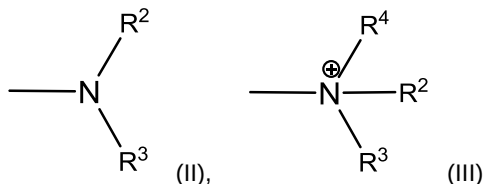
donde:

R' es un alquilo C₁-C₄,

p es un número entero que varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 1,

X un grupo alquilo C₁-C₆,

R¹ se selecciona de entre los grupos de fórmula (II), (III) o el grupo -O-R⁵:



R², R³, R⁴, son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de entre un hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo alquilo C₁-C₄ sustituido con un grupo amino terciario o cuaternario; con la condición de que al menos un grupo R², R³ o R⁴ sea un grupo alquilo o alquilo sustituido; y R⁵ es un alquilo C₁-C₄ sustituido con al menos un grupo amino terciario o cuaternario.

Por "dendrúmero carbosilano" se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada con forma esférica, donde el núcleo de crecimiento del dendrúmero es polifuncional, las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano y la capa externa, superficie o periferia del dendrúmero incorpora grupos funcionales. Esta superficie o periferia sería la correspondiente a las extremidades de las ramificaciones.

Por "núcleo polifuncional" (Nu) se entiende en la presente invención a un elemento o compuesto polivalente enlazado de la manera covalente con al menos dos ramificaciones, es decir, al menos deberá ser divalente. En una realización preferida, el núcleo es tetravalente y más preferiblemente, el núcleo es de silicio (grupo sililo). Sin embargo, el núcleo puede ser cualquiera derivado polifuncional a partir del cual sea posible crecer un dendrúmero de naturaleza carbosilano, de los conocidos por un experto en la materia, como por ejemplo, y sin limitarse a un núcleo polifenólico, un núcleo amino o poliamino.

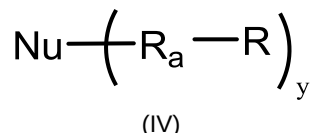
El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas. En el caso de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , y R^5 estas cadenas tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo o sec-butilo, preferiblemente se seleccionan independientemente de entre un alquilo C_1 - C_2 , más preferiblemente el grupo alquilo es un metilo. En el caso de X esta cadena tiene de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo o sec-butilo, preferiblemente X es un grupo butilo. Los grupos alquilo de R^2 , R^3 , R^4 , y R^5 , pueden estar opcionalmente sustituidos por grupos amina terciarias o cuaternarias, es decir, $-NR^6R^7$ o $-N(+)R^6R^7R^8$ respectivamente, donde R^6 , R^7 y R^8 representan hidrógeno, grupos alquilo (C_1 - C_4) o grupos alquilos (C_1 - C_4) sustituidos por grupos amino terciarios o cuaternarios, tal y como se han definido anteriormente.

En una realización preferida, R^1 es un grupo de fórmula (III), más preferiblemente R^2 , R^3 o R^4 , son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de entre un alquilo C_1 - C_2 , más preferiblemente R^2 , R^3 o R^4 son un grupo metilo.

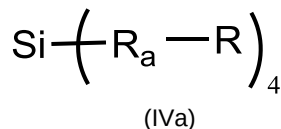
En otra realización preferida, R_1 es el grupo $-O-R^5$ y R^5 es un alquilo C_1 - C_4 sustituido con un grupo amino terciario o cuaternario, es decir, R^5 es un grupo alquilo C_1 - C_4 sustituido por $-NR^6R^7$ o $-N(+)R^6R^7R^8$, donde R^6 , R^7 y R^8 representan hidrógeno, grupos alquilo (C_1 - C_4) o grupos alquilos (C_1 - C_4) sustituidos a su vez por grupos amino terciarios o cuaternarios $-NR^6R^7$ o $-N(+)R^6R^7R^8$. Más preferiblemente, R^5 es grupo etilo sustituido por un grupo amino terciario sustituido por un grupo etilo sustituido a su vez por un grupo amino terciario o cuaternario, más preferiblemente aún, un grupo etilo sustituido por un grupo cuaternario, donde preferiblemente R^6 , R^7 y R^8 son, iguales o diferentes, un grupo alquilo (C_1 - C_4), más preferiblemente un grupo alquilo (C_1 - C_2) y aún más preferiblemente un grupo metilo.

En una realización preferida, el dendrúmero de la invención puede ser de primera, segunda o tercera generación. El término "generación" se refiere al número de ramificaciones iterativas que son necesarias para la preparación del dendrúmero.

Sin embargo, el dendrúmero también puede ser de generación cero, tal y como se representa en la fórmula (IV):

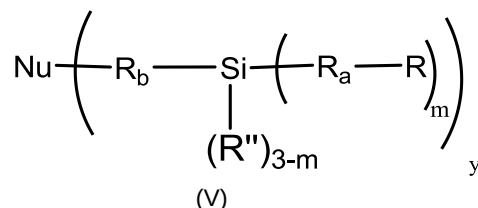


donde: Nu representa un núcleo polifuncional como se define anteriormente, R_a es un grupo alquilo (C_1 - C_6); y es un número entero que varía entre 2 y 6, preferiblemente y es 4 cuando el núcleo es de silicio; y R es el grupo terminal de fórmula general (I) según se ha descrito anteriormente. Si el núcleo es de silicio el dendrúmero de fórmula (IV) puede ser de fórmula (IVa):



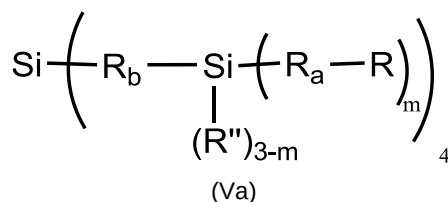
donde: R y R_a están definidos anteriormente.

En otra realización preferida, el dendrúmero es al menos de primera generación y se puede representar con la siguiente fórmula general (V):



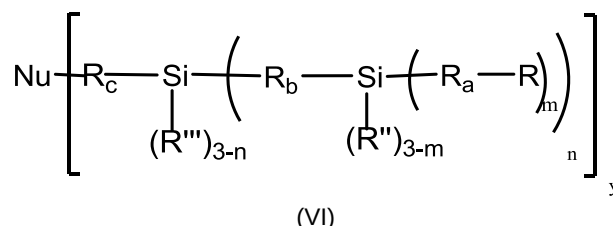
donde: Nu representa un núcleo polifuncional como se define anteriormente, R_a , R_b y R'' , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_1 - C_6); m es un número entero que varía entre 1 y 3 preferiblemente m es 2; y es un

número entero que varía entre 2 y 6; y R es el grupo terminal de fórmula general (I) según se ha descrito anteriormente. Si el núcleo es de silicio el dendrímero de fórmula (V) puede ser de fórmula (Va):

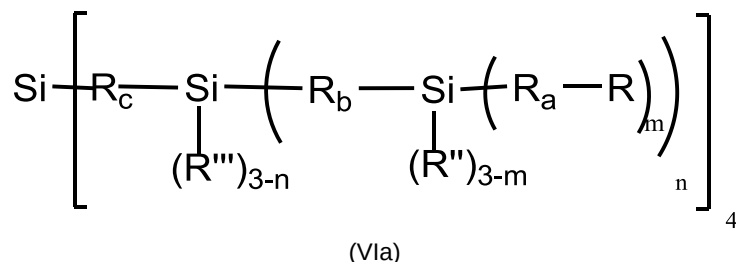


donde: R, R_a, R_b, R'' y m están definidos anteriormente.

En otra realización preferida, el dendrímero es al menos de segunda generación y se puede representar con la siguiente fórmula (VI):

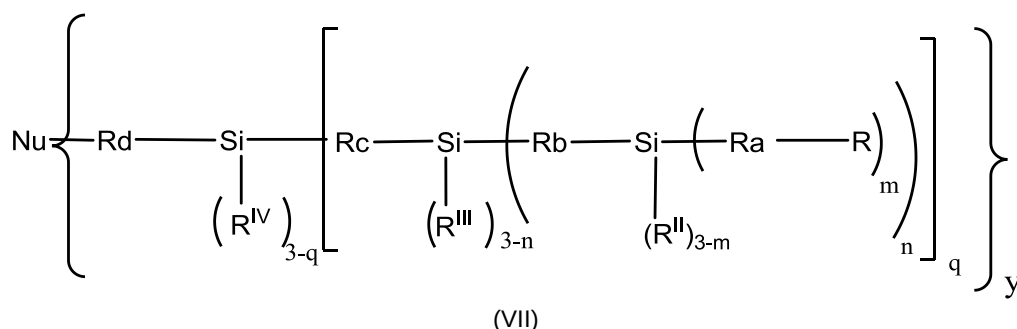


donde: Nu representa un núcleo polifuncional como se define anteriormente, R_a, R_b, R_c, R'' y R''', son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆); m y n son iguales o diferentes y son un número entero que varía entre de 1 y 3; preferiblemente m y/o n es 2; y es un número entero que varía entre 2 y 6; y R es el grupo terminal de fórmula general (I) según se ha descrito anteriormente. Si el núcleo es de silicio el dendrímero de fórmula (VI) puede ser de fórmula (VIa):

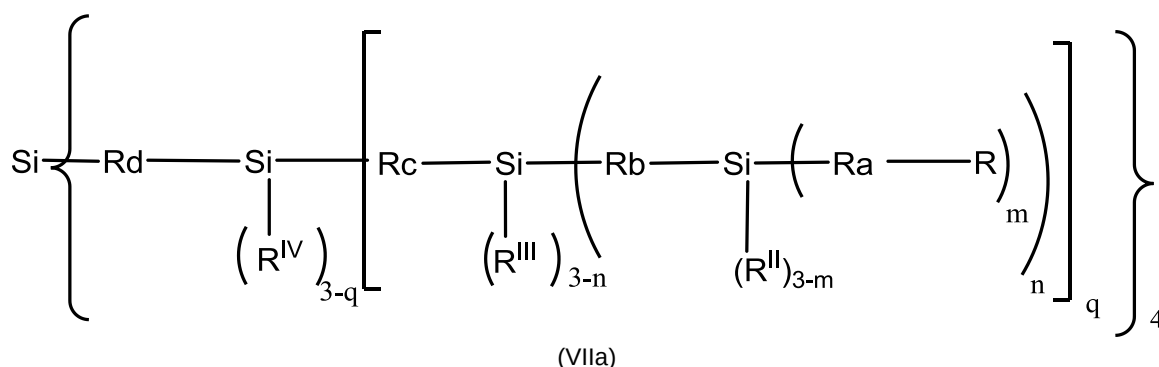


donde: R, R_a, R_b, R_c, R'', R''', m y n están definidos anteriormente.

En otra realización preferida, el dendrímero es al menos de tercera generación y se puede representar con la siguiente fórmula (VII):



donde: Nu representa un núcleo polifuncional como se define anteriormente, R_a, R_b, R_c, R_d, R'', R''' y R^{IV} son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆); m, n y q son iguales o diferentes y es un número entero que varía entre 1 y 3; preferiblemente es m, n y/o q es 2; y es un número entero que varía entre 2 y 6; y R es el grupo terminal de fórmula general (I) según se ha descrito anteriormente. Si el núcleo es de silicio el dendrímero de fórmula (VII) puede ser de fórmula (VIIa):



donde: R, Ra, Rb, Rc, Rd, R^{II}, R^{III}, R^{IV}, m, n y q se ha descrito anteriormente.

En estos dendrímeros de fórmula (IV), (IVa), (V), (Va), (VI), (VIa), (VII) o (VIIa), los radicales Ra, Rb, Rc o Rd pueden ser iguales o diferentes, y preferiblemente representan un grupo alquilo (C₂-C₄), más preferiblemente son un grupo butilo. En otra realización preferida, los radicales R^{II}, R^{III} o R^{IV} son, independiente unos de otros, y representar un grupo alquilo (C₁-C₄), más preferiblemente son un grupo metilo.

Los dendrímeros de la presente invención además pueden ser catiónicos, con grupos amonio terminales de diferente naturaleza. Por lo tanto, la presente invención no solo incluye los dendrímeros por sí mismos, sino cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de cloruro, bromuro, yoduro o triflato. Preferiblemente las sales son de yoduro.

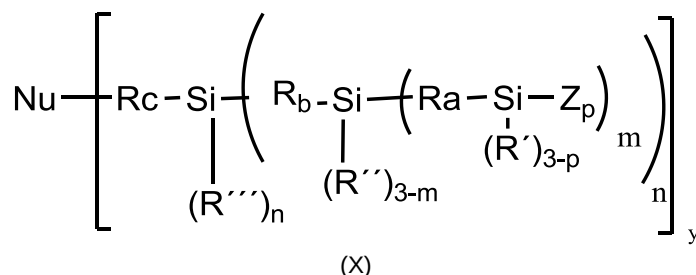
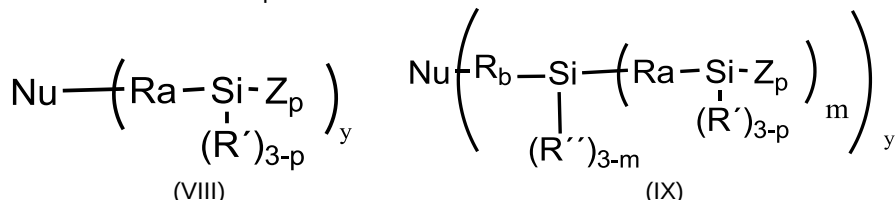
Esta familia de dendrímeros de naturaleza carbosilano que se describe puede ser preparada siguiendo un procedimiento de síntesis divergente (crecimiento desde dentro hacia fuera), a partir de un núcleo polivalente, preferiblemente de silicio tetraalilo y posterior funcionalización de la superficie con diferentes grupos funcionales de naturaleza catiónica.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los dendrímeros según se han descrito anteriormente, que comprende la síntesis de dendrímeros con grupos terminales amino, -NR₂, y posterior cuaternización de estos grupos amino terminales con diversos agentes cuaternizantes como por ejemplo, pero sin limitarse, a HCl o yoduro de metilo (MeI). Los grupos amino terminales se unen al esqueleto carbosilano a través de una reacción de cicloadición de Huisgen, utilizando para ello dendrímeros carbosilano funcionalizados con grupos azida en la periferia y derivados amino que contienen un grupo alquino terminal.

Estos dendrímeros organosilano se pueden preparar de diferentes generaciones con rendimientos elevados, a través de métodos divergentes y utilizando la tecnología *click chemistry* para su funcionalización. Su síntesis es relativamente sencilla, lo que facilita su obtención en grandes cantidades.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del dendrímero de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- adición de un dendrímero de tipo azida con fórmula (VIII), (IX), (X) o de siguientes generaciones a una alquililamina en un medio líquido.



Donde: Nu es un núcleo polivalente como se ha definido anteriormente, Z es un grupo $-(CH)_x-N_3$, x es un valor de entre 1 a 4, preferiblemente x es 1, e y tiene un valor de entre 2 y 6. Preferiblemente Nu es de silicio e y es 4.

- b. adición de un inhibidor de reacción a la disolución de la etapa (a),
- c. extracción en un disolvente orgánico del dendrímero obtenido (b), y
- d. concentración del producto obtenido en (c).

En una realización preferida del procedimiento de la invención, además comprende una etapa (e) de adición de un agente cuaternizante al producto obtenido en (d). Los agentes cuaternizantes se pueden seleccionar de entre halogenuros de alquilo (C_1-C_{24}), HCl, sulfatos de dialquilo (C_1-C_5), triflato de metilo, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente se seleccionan de entre cloruro de metilo, bromuro de metilo, yoduro de metilo, cloruro de etilo, bromuro de etilo, cloruro de propilo, cloruro de hexilo, cloruro de dodecilo, cloruro de arilo y halogenuros de bencilo, cloruro de bencilo, bromuro de bencilo o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la alquililamina es una propalgilamina, más preferiblemente se puede seleccionar, pero sin limitarse a propargildimetilamina o propargildiamina.

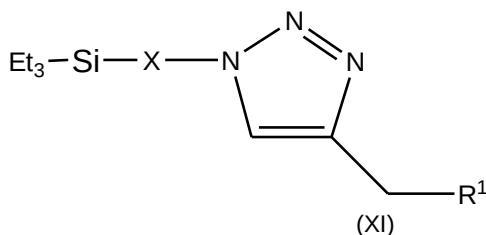
En otra realización preferida del procedimiento de la invención, el medio líquido de la etapa (a) es de tipo orgánico, como por ejemplo pero sin limitarse a tetrahidrofurano, tolueno o DMF (N,N-Dimetilformamida).

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, el inhibidor de la etapa (b) es cualquier agente acomplejante del cobre conocido por cualquier experto en la materia, como por ejemplo, pero sin limitarse al hidróxido amónico o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, la extracción de la etapa (c) se realiza con un disolvente orgánico, como por ejemplo, pero sin limitarse a acetato de etilo, diclorometano o éter etílico.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, la concentración de la etapa (d) se realiza a vacío.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (XI):



donde: Et es un grupo etilo y
X y R^1 están descritos anteriormente

La presente invención se refiere también a los usos en biomedicina de los dendrímeros descritos anteriormente que presentan grupos amino o amonio terminales, entre ellos destacan la utilización de los derivados catiónicos como agentes de transporte no virales para la transfección o internalización de material nucleico en el interior de diferentes líneas celulares en procesos de terapia génica o también el uso de estos dendrímeros como agentes terapéuticos "per se", por ejemplo como agentes antibacterianos o antivirales.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los dendrímeros de la invención para la elaboración de un medicamento. Más preferiblemente, el medicamento se utiliza para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos. Más preferiblemente la prevención y/o el tratamiento son para enfermedades causadas por el VIH.

Teniendo en cuenta la actividad biocida de los dendrímeros de la invención, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de estos dendrímeros como agentes biocidas para aplicaciones no terapéuticas, como por ejemplo para realizar controles, como pueden ser los usados con detergentes para impedir la aparición de microorganismos en superficies.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un dendrímero según se ha descrito anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, esta composición farmacéutica puede comprender otro principio activo, preferiblemente un antibiótico, más preferiblemente un antibiótico del grupo de los betalactámicos, y aún más preferiblemente la penicilina.

Una composición farmacéutica que aúna el uso de los dendrímeros de la invención junto con algún antibiótico, como los descritos, produce una sinergia de su actividad como se puede observar por ejemplo en la Tabla 7 de los ejemplos. Además, al reducir la concentración necesaria de antibiótico disminuirían los problemas de aparición de resistencia a los

antibióticos y se podrían evitar otro tipo de resistencias, como por ejemplo los efectos de destrucción del antibiótico por enzimas, al protegerlo el dendrímero. Además, cuando un microorganismo presente resistencias intrínsecas a un antibiótico, el dendrímero puede vehiculizar el antibiótico saltándose esas barreras de resistencia.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por un experto en la materia.

Como ejemplos de preparaciones farmacéuticas se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (geles, soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, nasal, tópica o parenteral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos en un mamífero, preferiblemente un humano, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende al menos un dendrímero de la invención. Preferiblemente, la administración de la composición se puede realizar por vía oral, nasal, tópica o parenteral.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de la composición, la edad, estado y antecedentes del paciente, la severidad de la enfermedad, y de la ruta y frecuencia de administración.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los dendrímeros de la invención como vector no viral. Preferiblemente, el vector se utiliza para la transfección o internalización de material nucleico en procesos de terapia génica, es decir, los dendrímeros de la invención pueden actuar como agentes de transfección en terapia génica.

Por "material nucleico" se refiere en la presente invención a un material, aislado y/o purificado, que comprende una secuencia nucleótida y se puede seleccionar entre oligonucleótidos, ARNip o ADN.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector no viral que comprende al menos un dendrímero de la presente invención. Este vector además puede comprender material nucleico, tal y como se ha descrito anteriormente,

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del vector no viral de la invención, para la elaboración de un medicamento. Más preferiblemente, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer en terapia génica.

La posibilidad de síntesis y fácil manipulación de estos dendrímeros y la posibilidad de agregar a este tipo de polímeros, ligandos que permitan su direccionamiento hacia un lugar específico de acción, supone una gran ventaja frente a otros vectores utilizados en terapia génica.

La mayor ventaja de los complejos, dendrímero/material nucleico formulados en la presente invención, reside en que poseen una estructura uniforme y flexible permitiendo la posibilidad de modificar de manera versátil el esqueleto y la superficie de los mismos.

También es posible el uso de los dendrímeros de la invención como vehículos de transporte de moléculas, preferiblemente moléculas con actividad farmacológica (principios activos), y más preferiblemente moléculas aniónicas, el principio activo puede ser un antibiótico, entre ellos por ejemplo y sin limitarse a un antibiótico del grupo de los betalactámicos, como puede ser la penicilina.

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.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Gel de retardo para los distintos complejos preparados. Línea 1: ADN desnudo. Línea 2: complejo con PAMAM comercial. Líneas 3 a 5: complejos Familia 1 G0. Líneas 6 a 8: complejos Familia 1 G1. Líneas 9 a 11: complejos Familia 1 G2. Todos los poliplejos de la Familia 1 se prepararon a relaciones de carga 1, 5 y 20 respectivamente. Líneas 12 a 15: complejos Familia 2 G0. Líneas 16 a 19: complejos Familia 2 G1. Todos los poliplejos de la Familia 2 se prepararon a relaciones de carga 1, 5, 20 y 30 respectivamente.

FIG. 2. Transfección *in vitro* para la Familia 1 en la línea celular HepG2 (A) y en la línea celular HeLa (B). La cantidad de ADN por pocillo fue de 1 µg. Los datos se representan como la media ± desviación estándar (d.s.) de tres pocillos.

FIG. 3. Transfección *in vitro* para la Familia 2 en la línea celular HepG2 (A) y en la línea celular HeLa (B). La cantidad de ADN por pocillo fue de 1 µg. Los datos se representan como la media ± d.s. de tres pocillos

FIG. 4. Toxicidad de los complejos dendrímero/ADN de la Familia 1 evaluada en la línea celular HepG2 (A) y en la línea celular HeLa (B). Los resultados se expresan como la media ± d.s. de tres pocillos.

FIG. 5. Toxicidad de los complejos dendrímero/ADN de la Familia 2, evaluada en la línea celular HepG2 (A) y en la línea celular HeLa (B). Los resultados se expresan como la media ± d.s. de tres pocillos.

FIG. 6. Muestra la viabilidad de las dos generaciones de dendrímeros click sintetizados en la Familia 1 y Familia 2, en un rango de creciente de concentraciones (1 µM, 5 µM, 10 µM y 15 µM) en las líneas celulares de linfocitos T SupT1 y Jurkat. En todos los casos se observa un límite de toxicidad superior a 10 µM. Figuras A y B, ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de actividad mitocondrial de los dendrímeros de la FAMILIA 2. Figuras C y D, ensayo de MTT de los dendrímeros de la FAMILIA 1. El Trit-0,2 (triton x-100) al 0,2 % representa el 100% de toxicidad. Dextrano se utiliza como control de molécula inocua.

FIG. 7. Muestra la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) según el ensayo MTT, en presencia de distintas concentraciones de los compuestos de mayor generación de cada una de las familias: G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**).

FIG. 8. Caracterización de la unión dendrímero/siRNA a una concentración de siNEF de 400 nM de los compuestos sintetizados de mayor generación de ambas familias: G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**) a los distintos ratios 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8.

FIG. 9. Muestra la inhibición de la entrada del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) en CMSP tras 48 horas de tratamiento con los compuestos sintetizados de mayor generación de ambas familias: G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**) y de los complejos dendrímero/siRNA a ratio 1:4. Se infectaron las células antes de añadir los dendrímeros con las cepas X4 VIH NL4.3.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de los dendrímeros carbosilano y sus procedimientos de síntesis.

Síntesis de dendrímeros carbosilano con núcleos de silicio y con grupos amino y amonio terminales obtenidos vía "click chemistry".

La síntesis de dendrímeros de estructura carbosilano con grupos amino terminales se llevó a cabo mediante la utilización de la metodología "click chemistry" para la unión de propargildimetilamina o la propargildiamina ($\text{HCC-CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$) sobre dendrímeros carbosilano de diferentes generaciones con funcionalidades azida terminales.

En general los dendrímeros que se describen en este apartado se pueden representar como **ck-G_n-(F)_x**, donde:

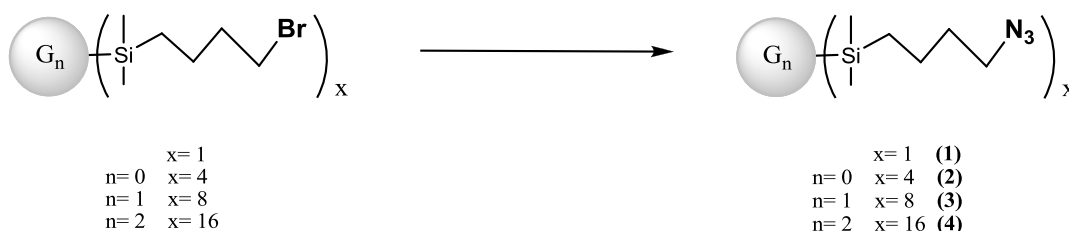
ck indica que se trata de dendrímeros obtenidos por acoplamiento *click* entre un grupo azida y un triple enlace carbono-carbono.

n indica el número de la generación **G**.

F, indica la naturaleza de los grupos funcionales situados en la periferia del dendrímero.

x denota el número de unidades terminales presentes en el dendrímero.

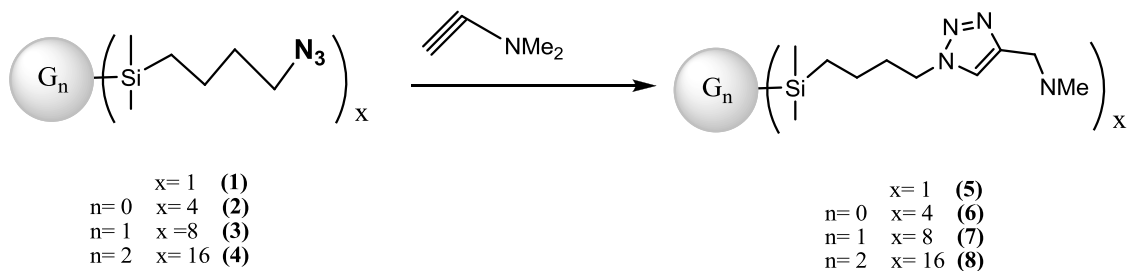
Esta ruta sintética conlleva inicialmente la preparación de dendrímeros carbosilano, crecidos a partir de un núcleo de silicio tetraalilo, con grupos azida terminales. La preparación de estos derivados azida se llevó a cabo a partir de dendrímeros carbosilano de diferentes generaciones con grupos $-\text{CH}_2\text{Br}$ terminales. La posterior reacción de estos derivados con azida de sodio da lugar a los dendrímeros de estructura carbosilano con grupos azida terminales $\text{G}_n\text{-[Si-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3]_x$ (triethylsililo, $x = 1$ (**1**); $n = 0$, $x = 4$ (**2**); $n = 1$, $x = 8$ (**3**); $n = 2$, $x = 16$ (**4**)) (ver esquema 1).



Esquema 1

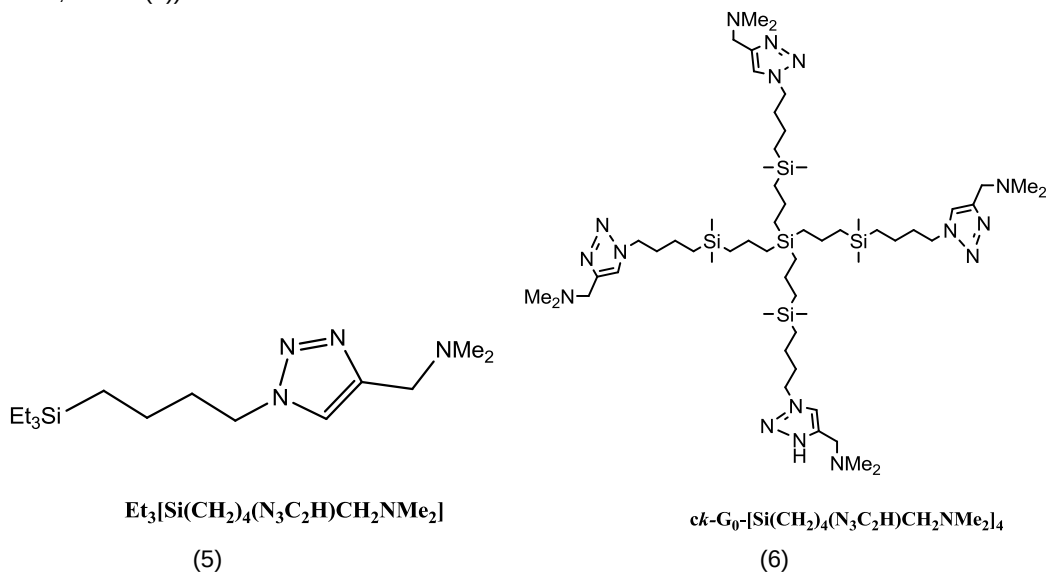
Los compuestos **1-4** son sólidos aceitosos estables al aire y a la humedad, solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos de uso común y pueden ser almacenados sin descomposición durante largos periodos de tiempo. Estos compuestos han sido caracterizados por análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno, resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , y espectrometría de masas.

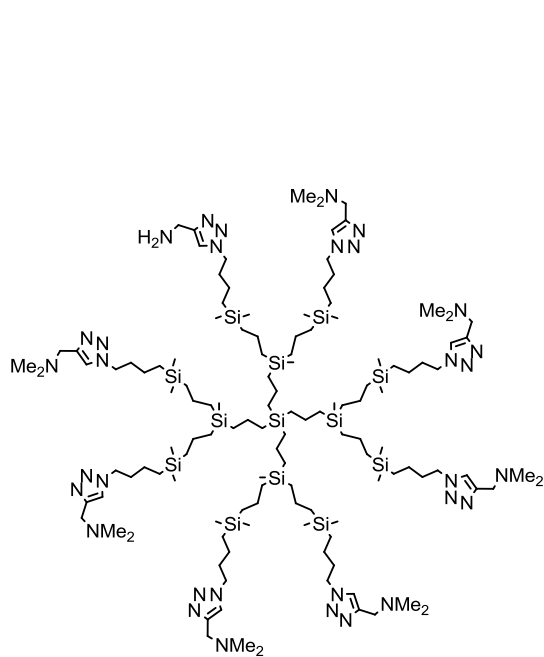
Una vez preparados los dendrímeros con grupos azida terminales, la síntesis de dendrímeros con grupos amino ($-\text{NR}_2$) en la superficie se produce por una reacción de tipo “*click chemistry*”, entre los compuestos **1-4** y diferentes propargil aminas como por ejemplo, propargildimetilamina o la propargildiamina ($\text{HCC}-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$). En el caso de llevar a cabo la reacción de “*click chemistry*” con propargildimetilamina se obtienen los derivados *ck*-Gn- $[\text{Si}(\text{CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NMe}_2]_x$ (trietilsililo, $x = 1$ (**5**); $n = 0$, $x = 4$ (**6**); $n = 1$, $x = 8$ (**7**); $n = 2$, $x = 16$ (**9**)) (ver esquema 2).



Esquema 2

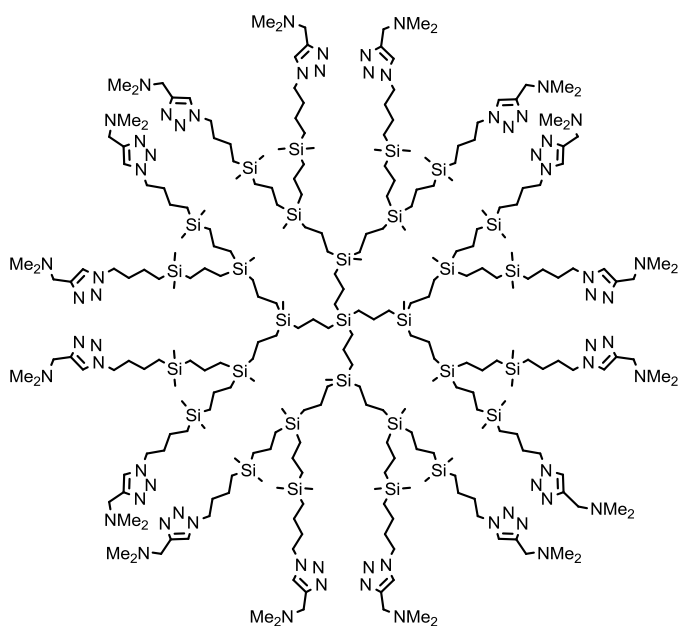
Estructuras de los dendrímeros *ck*-Gn- $[\text{Si}(\text{CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NMe}_2]_x$ (trietilsililo, $x = 1$ (**5**); $n = 0$, $x = 4$ (**6**); $n = 1$, $x = 8$ (**7**); $n = 2$, $x = 16$ (**8**))





$ck-G_1-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2NMe_2]_8$

(7)



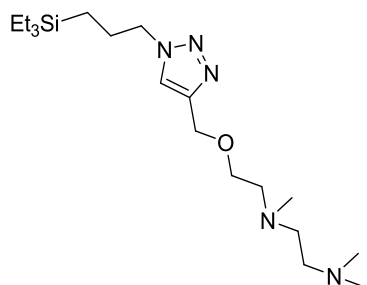
$ck-G_2-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2NMe_2]_{16}$

(8)

5

Si la amina utilizada es la propargildiamina ($HCC-CH_2OCH_2CH_2N(Me)CH_2CH_2NMe_2$) se obtienen los siguientes compuestos $ck-G_n-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2OCH_2CH_2N(Me)CH_2CH_2NMe_2]_x$ (triethyl sililo, $x = 1$ (**9**); $n = 0$, $x = 4$ (**10**); $n = 1$, $x = 8$ (**11**); $n = 2$, $x = 16$ (**12**)) (ver esquema 3).

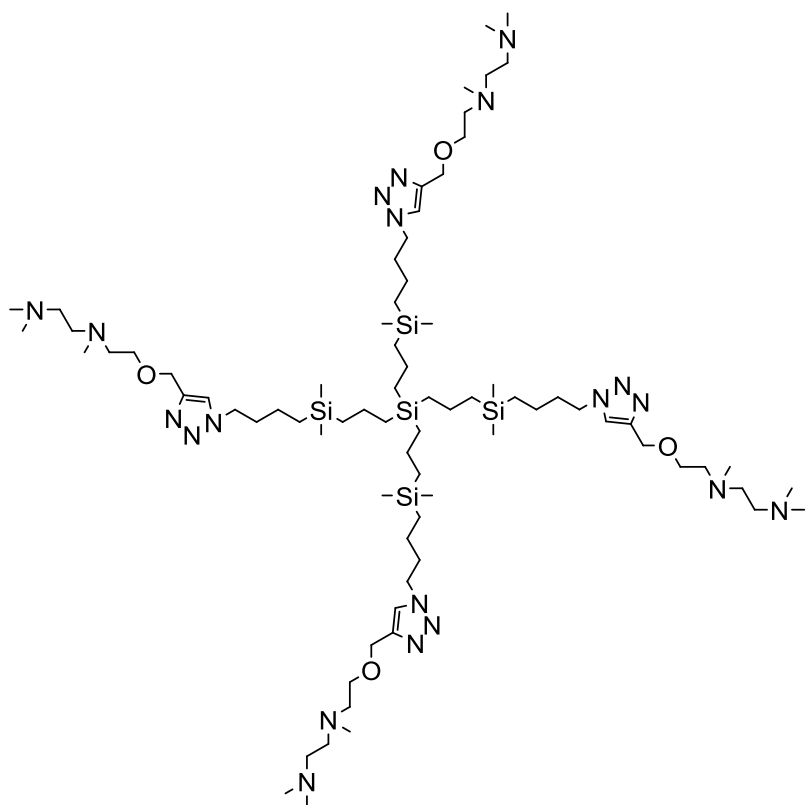
Las estructuras propuestas para los dendrímeros $ck-G_n-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2OCH_2CH_2N(Me)CH_2CH_2NMe_2]_x$ (triethylsililo, $x = 1$ (**9**); $n = 0$, $x = 4$ (**10**); $n = 1$, $x = 8$ (**11**); $n = 2$, $x = 16$ (**12**)) son las siguientes:



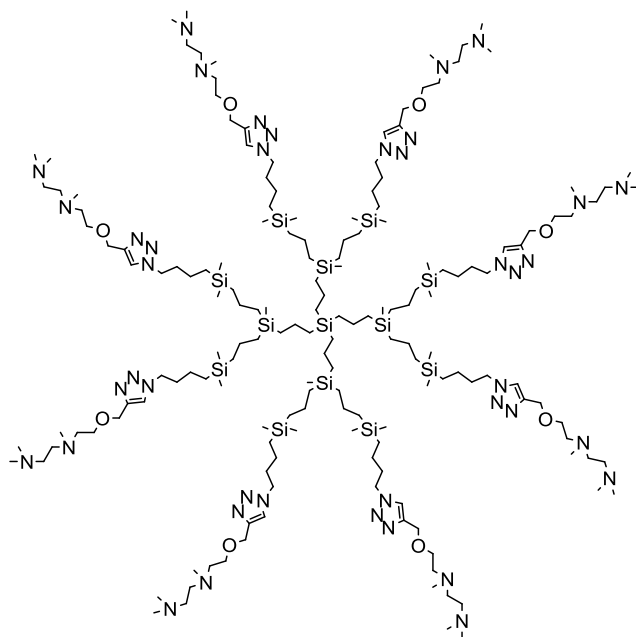
$Et_3Si-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2OCH_2CH_2N(Me)CH_2CH_2NMe_2]$

(9)

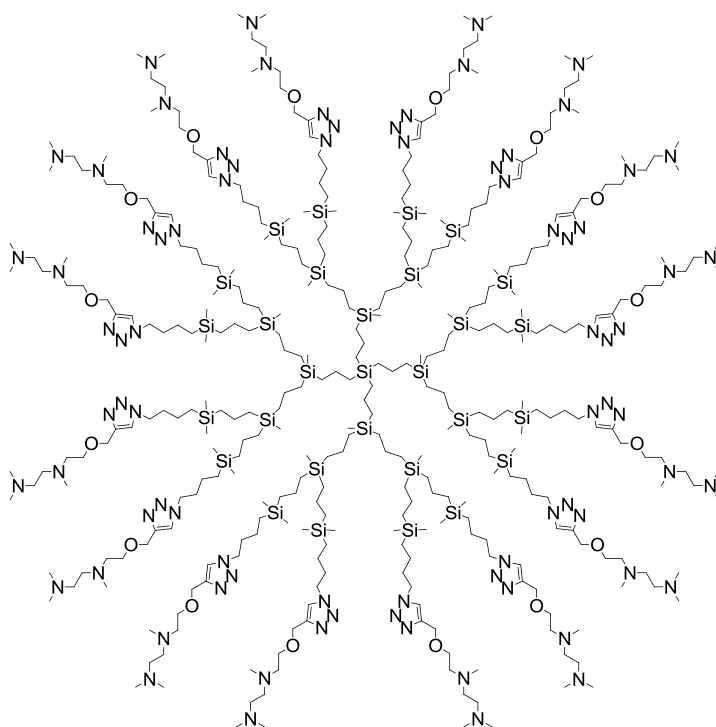
10



***ck-G₀*-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]₄** (10)



***ck-G₁*-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]₈**
(11)



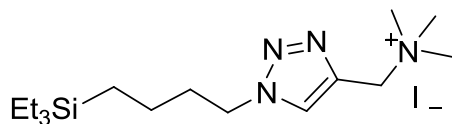
(12)

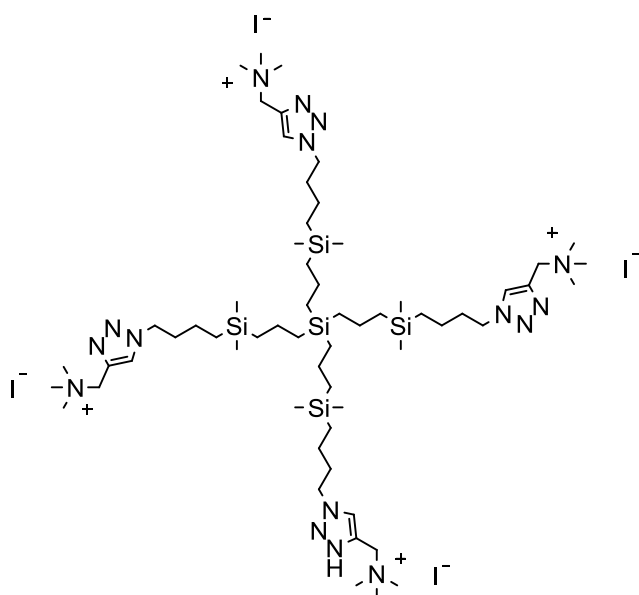
Los compuestos **5-12** son sólidos aceitosos estables al aire y a la humedad, solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos de uso común y pueden ser almacenados sin descomposición durante largos periodos de tiempo.

A partir de estos compuestos, **5-12**, la obtención de dendrímeros catiónicos con grupos amonio terminales, se produce mediante una reacción de cuaternización utilizando un derivado RX como agente cuaternizante (R= hidrógeno, alquilo; X= Cl, Br, I), como por ejemplo yoduro de metilo, MeI. Así hemos obtenido las familias de compuestos que se describen a continuación.

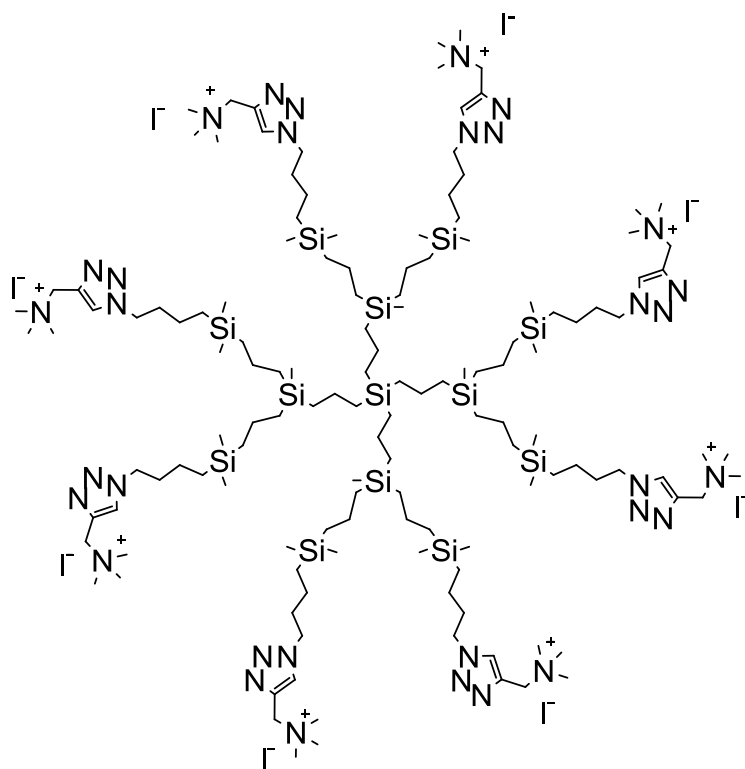
La reacción de adición de yoduro de metilo (MeI) sobre los dendrímeros terminados en grupos $-NMe_2$, **5-8**, utilizando las condiciones de reacción descritas en el esquema 4 permiten obtener los dendrímeros $ck-G_n-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2NMe_3^+, I^-]_x$ (trietilsililo, $x = 1$ (**13**); $n = 0$, $x = 4$ (**14**); $n = 1$, $x = 8$ (**15**); $n = 2$, $x = 16$ (**16**)) como sólidos blancos solubles en agua. Esta solubilidad en agua va disminuyendo al aumentar la generación como consecuencia del aumento de la lipofilia del esqueleto carbosilano al ir creciendo la generación.

Los dendrímeros **13 a 16** tienen las estructuras: $ck-G_n-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2NMe_3^+, I^-]_x$ (trietilsililo, $x = 1$ (**13**); $n = 0$, $x = 4$ (**14**); $n = 1$, $x = 8$ (**15**); $n = 2$, $x = 16$ (**16**))

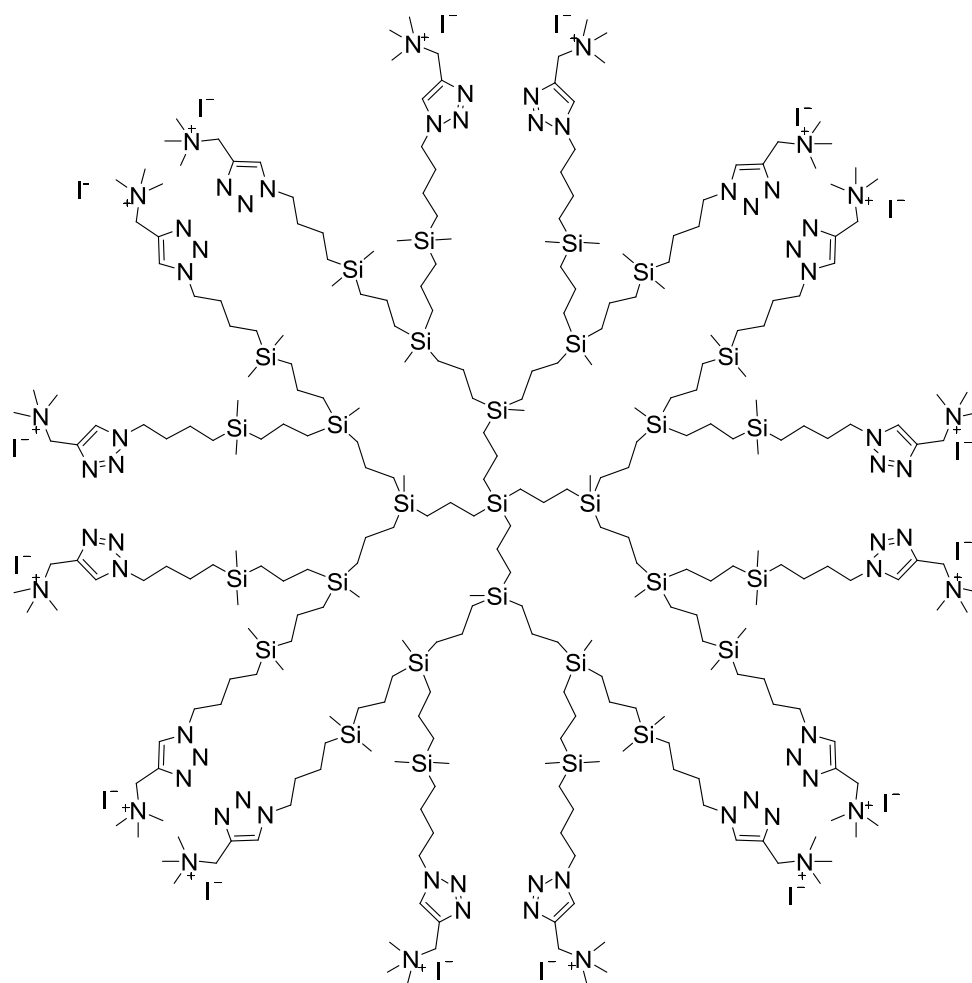




$ck-G_0-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2NMe_3^+, I^-]_4$
(14)



$ck-G_1-[Si(CH_2)_4(N_3C_2H)CH_2NMe_3^+, I^-]_8$
(15)



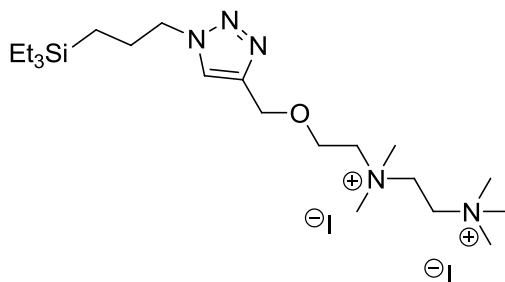
ck-G₂-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₃⁺, I⁻]₁₆
(16)

5

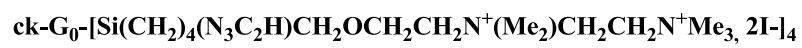
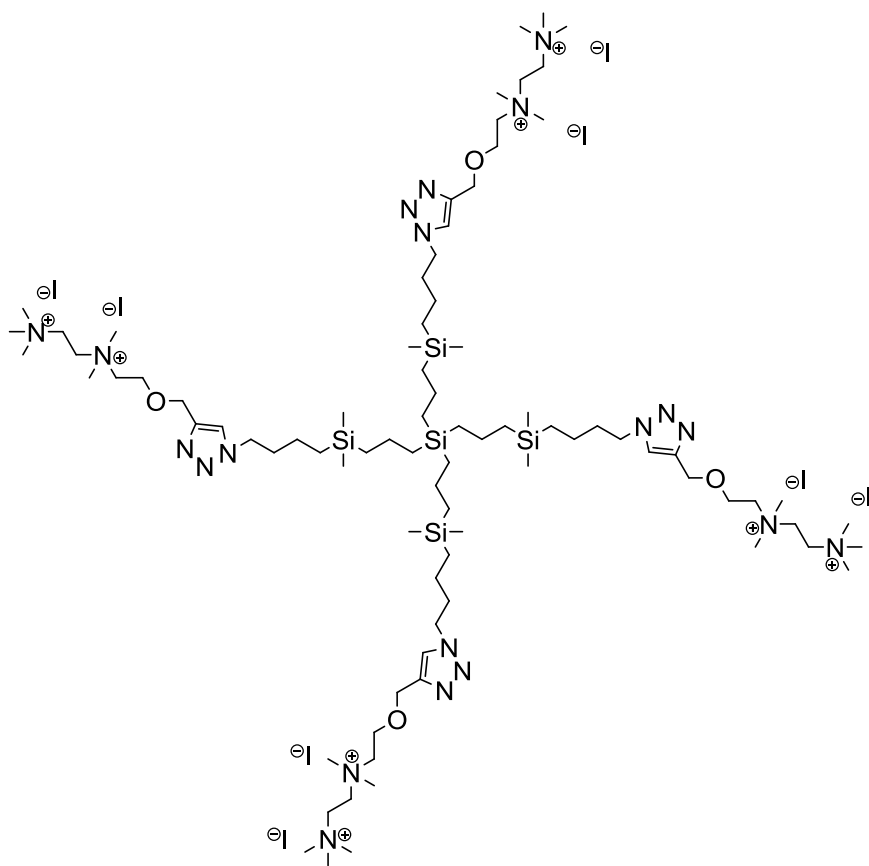
La reacción de adición de yoduro de metilo (MeI) sobre los dendrímeros terminados en grupos $\text{-N(Me)CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$, **9-12**, utilizando las condiciones de reacción descritas en el esquema 5 permiten obtener los dendrímeros *ck*-G_n-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N⁺(Me₂)CH₂CH₂N⁺Me₃, 2I⁻]_x (triethylsililo, $x = 1$ (**17**); $n = 0$, $x = 4$ (**18**); $n = 1$, $x = 8$ (**19**); $n = 2$, $x = 16$ (**20**)) como sólidos amarillos solubles en agua. Esta solubilidad en agua va disminuyendo al aumentar la generación como consecuencia del aumento de la lipofilia del esqueleto carbosilano al ir creciendo la generación.

10

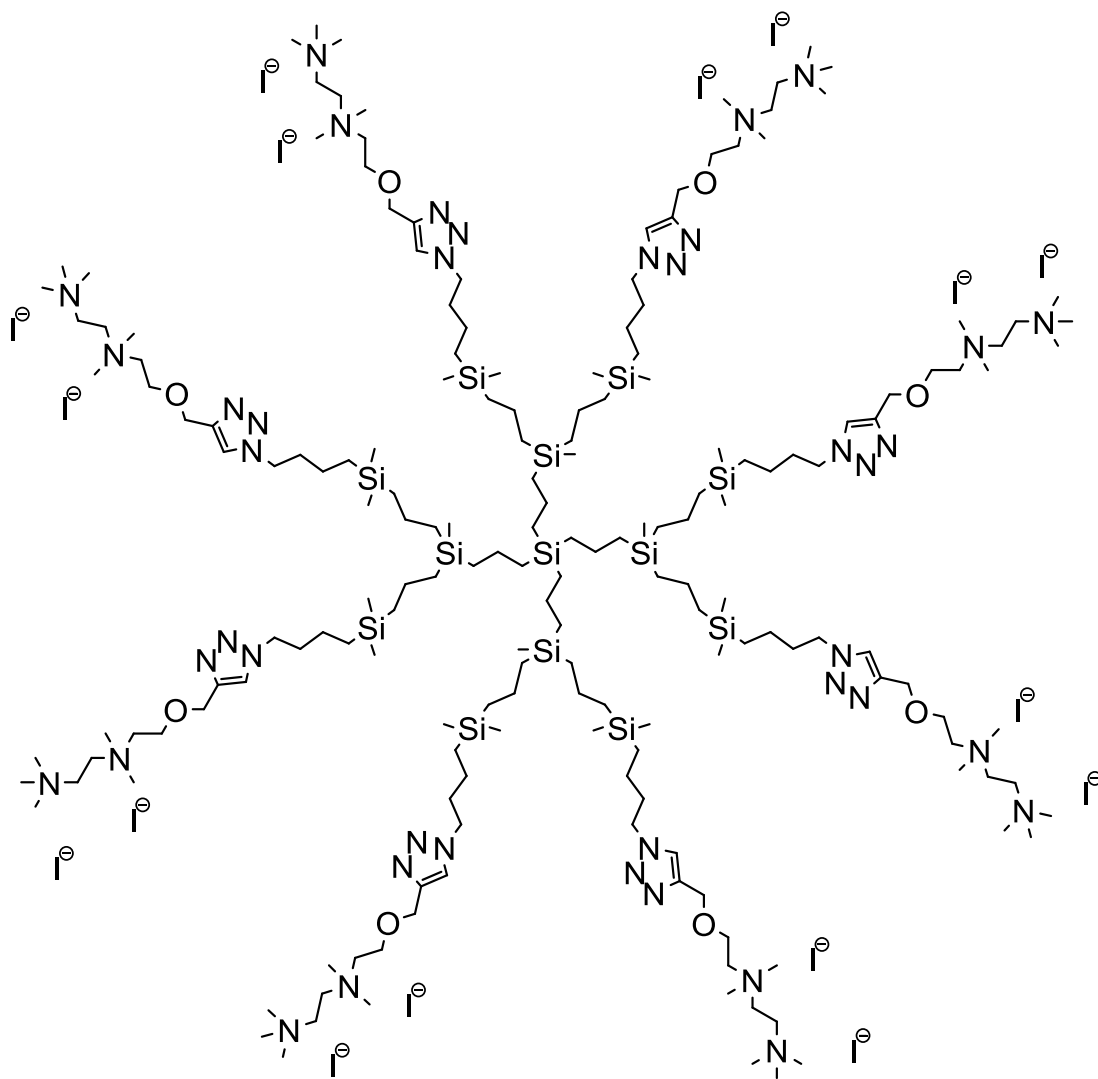
Los dendrímeros **17 a 20** tienen las estructuras:



Et₃-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N⁺(Me₂)CH₂CH₂N⁺Me₃, 2I⁻]
(17)

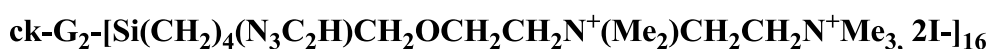
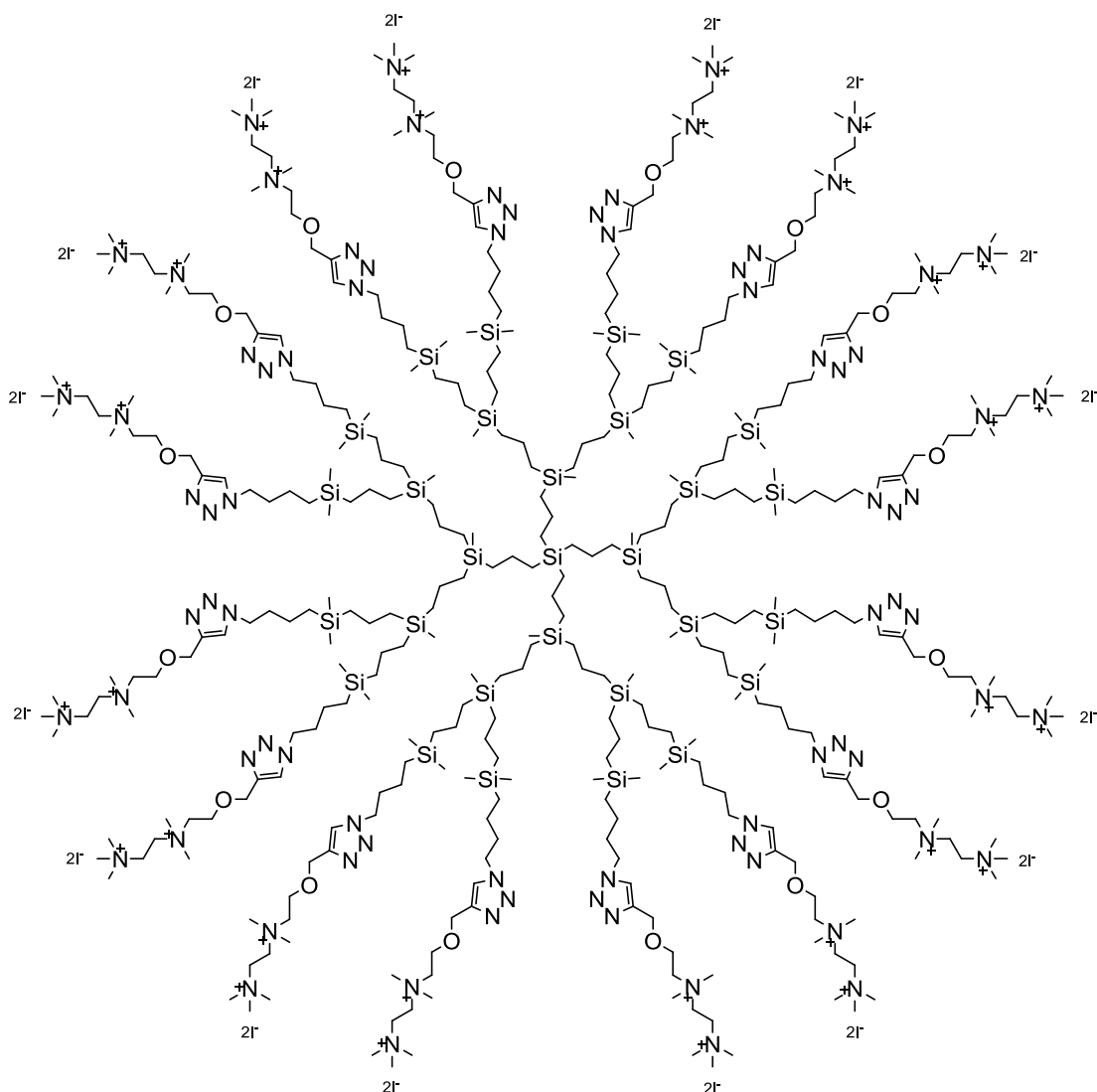


(18)



ck-G₁-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N⁺(Me₂)CH₂CH₂N⁺Me₃, 2I⁻]₈

(19)



(20)

Los dendrímeros neutros **1-12** y los catiónicos **13-20** han sido caracterizados por análisis elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno, resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , y espectrometría de masas. Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos están de acuerdo con las estructuras propuestas para estos derivados.

La síntesis y caracterización de estos compuestos, junto con los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos para alguno de ellos, se describen en los ejemplos detallados de síntesis de dendrímeros que se encuentran a continuación en la presente invención.

1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO.

Ejemplo 1: Síntesis de $\text{Et}_3\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{NMe}_2]$ (5)

En un matraz schlenk se disuelven 100 mg (0,47 mmol) de la azida de partida **1** en 5 ml de THF (tetrahidrofurano) y se añaden 0,06 ml (0,56 mmol) de N,N-dimetilpropargilamina. A continuación, se añade una disolución recién preparada de 11 mg (0,06 mmol) de ascorbato sódico en 0,2 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 6 mg de sulfato de cobre pentahidratado en 0,2 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 4 horas la reacción se interrumpe añadiendo 0,5 ml de una disolución al 23 % de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x5 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (10 ml), se secan sobre MgSO_4 . A continuación se filtra y se concentra a vacío para obtener un aceite amarillo que se caracteriza como el compuesto **5** (101 mg, 73%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,45 (1H, s, NCHCN), 4,33 (2H, t, CH₂CH₂N), 3,61 (2H, s, CCH₂N), 2,27 (6H, s, N(CH₃)₂), 1,90 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,29 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0,88 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0,47 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂CH₂CH₂CH₂N). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 145,0 (NCHCN), 121,9 (NCHCN), 54,3 (CCH₂N), 49,7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45,0 (N(CH₃)₂), 34,0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20,7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 10,7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 7,2 (SiCH₂CH₃), 3,0 (SiCH₂CH₃). ANÁLISIS ELEMENTAL C₁₅H₃₂N₄Si. Calc. %: C, 60,76; H, 10,88; N, 18,99; Exp. %: C 60,02; H, 10,61; N, 18,96.

Ejemplo 2: Síntesis de ck-G₀-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₂]₄ (6)

La preparación del dendrímero de primera generación, **6**, con cuatro grupos amino terminales se realiza de un modo similar al descrito para el compuesto **5**. En un schlenk se disuelven 300 mg (0,37 mmol) del dendrímero de primera generación con grupos azida en la superficie, **2**, en 20 ml de THF y 0,17 ml (1,61 mmol) de N,N-dimetilpropargilamina. A continuación, se añade una disolución recién preparada de 34 mg (0,18 mmol) de ascorbato sódico en 1,7 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 18 mg (0,07 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado en 0,14 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 15 horas la reacción se interrumpe añadiendo 1,5 ml de una disolución al 23 % de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x15 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (20 ml), se secan sobre MgSO₄, se filtra la suspensión resultante y se concentra a vacío para obtener un aceite amarillo que se identifica como **6** (382 mg, 91%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,41 (4H, s, NCHCN), 4,28 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,55 (8H, s, CCH₂N), 2,21 (24H, s, N(CH₃)₂), 1,85 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,25 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0,49 (24, m, SiCH₂), -0,13 (24H, s, Si(CH₃)₂). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 145,0 (NCHCN), 122,0 (NCHCN), 54,4 (CCH₂N), 49,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45,1 (N(CH₃)₂), 33,9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20,8-14,7 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3,5 (Si(CH₃)₂). ANÁLISIS ELEMENTAL C₅₆H₁₁₇N₁₆Si₅. Calc. %: C, 58,28; H, 10,13; N, 19,42; Exp. %: C 58,07; H, 10,61; N, 18,96.

Ejemplo 3: Síntesis de ck-G₁-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₂]₈ (7)

La preparación del dendrímero de segunda generación, **7**, con ocho grupos amino terminales se realiza de un modo similar al descrito para el compuesto **5**. En un matraz schlenk se disuelven 300 mg (0,15 mmol) del dendrímero de segunda generación con grupos azida en la superficie, **3**, en 20 ml de THF y 0,14 ml (1,29 mmol) de N,N-dimetilpropargilamina. A continuación se añade una disolución recién preparada de 29 mg (0,15 mmol) de ascorbato sódico en 1,5 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 15 mg (0,06 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado en 0,13 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 14 horas la reacción se interrumpe añadiendo 1,2 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x15 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (20 ml), se secan sobre MgSO₄, se filtra la suspensión resultante y se concentra a vacío para obtener un aceite amarillo que se identifica como **7** (345 mg, 86%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,39 (8H, s, NCHCN), 4,26 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,52 (16H, s, CCH₂N), 2,19 (48H, s, N(CH₃)₂), 1,83 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,21 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0,46 (64H, m, SiCH₂), -0,01 (12H, s, SiCH₃), -0,15 (24H, s, Si(CH₃)₂). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 145,0 (NCHCN), 121,9 (NCHCN), 54,3 (CCH₂N), 49,7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45,0 (N(CH₃)₂), 33,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20,8-14,7 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3,5 (Si(CH₃)₂), -5,2 (SiCH₃). ANÁLISIS ELEMENTAL C₁₂₈H₂₆₈N₃₂Si₁₃. Calc. %: C, 58,66; H, 10,31; N, 17,10; Exp. %: C 58,50; H, 10,67; N, 16,32.

Ejemplo 4: Síntesis de ck-G₂-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₂]₁₆ (8)

La preparación del dendrímero de tercera generación, **8**, con dieciséis grupos amino terminales se realiza de un modo similar al descrito para el compuesto **5**. En un matraz schlenk se disuelven 300 mg (0,07 mmol) del dendrímero de tercera generación con grupos azida en la superficie, **4**, en 30 ml de THF y 0,13 ml (1,21 mmol) de N,N-dimetilpropargilamina. A continuación, se le añade una disolución recién preparada de 27 mg (0,14 mmol) de ascorbato sódico en 1,4 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 14 mg (0,06 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado en 0,12 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 14 horas la reacción se interrumpe añadiendo 1,2 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x15 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (20 ml), se secan sobre MgSO₄, se filtra la suspensión resultante y se concentra a vacío para obtener un aceite amarillo que se identifica como **8** (252 mg, 64%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,42 (16H, s, NCHCN), 4,27 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,54 (32H, s, CCH₂N), 2,20 (96H, s, N(CH₃)₂), 1,84 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,22 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0,47 (144, m, SiCH₂), 0,00 (12H, s, SiCH₃), -0,14 (120H, s, Si(CH₃)₂ y SiCH₃). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 144,9 (NCHCN), 122,0 (NCHCN), 54,3 (CH₂N), 49,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45,0 (N(CH₃)₂), 33,9 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20,8-14,7 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3,5 (Si(CH₃)₂), -5,1 (SiCH₃). ANÁLISIS ELEMENTAL C₂₇₂H₅₇₂N₆₄Si₂₉. Calc. %: C, 58,82; H, 10,38; N, 16,14; Exp. %: C 56,67; H, 10,51; N, 11,56.

Ejemplo 5: Síntesis de [HCC-CH₂OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]

Esta propagil diamina se prepara siguiendo el procedimiento experimental que se cita a continuación. A 652 mg (16,32 mmol) de hidruro sódico al 60% se le añaden 10 ml de hexano, la mezcla se filtra y sobre el sólido se adicionan 50 ml de THF. La suspensión resultante se enfría a -30 °C y se añaden 2,21 ml (13,6 mmol) de 2-[[2(dimetilamino)etil]metilamino]etanol gota a gota. Transcurridas 3 horas se acopla un embudo de adición al matraz

schlenk y se transfieren sobre la suspensión anterior, gota a gota, 1,8 ml (16,32 mmol) de bromuro de propargilo al 80% en tolueno, disueltos en 16 ml de THF. La reacción se mantiene con agitación durante 16 horas, dejando que se alcance lentamente la temperatura ambiente. Para interrumpir la reacción se añade gota a gota una disolución saturada de cloruro amónico hasta que no se observe desprendimiento de hidrógeno. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x50 ml), las fases orgánicas se juntan y se lavan con 100 ml de una disolución saturada de cloruro sódico. Las fase orgánica se secan sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente a vacío, obteniendo un aceite amarillo oscuro (1,27 g, 51%)
 RMN- ^1H (CDCl_3): 4,14 (2H, d, CCH_2O), 3,62 (2H, t, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,60 (2H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,51 y 2,40 (5H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$, solapado con CCH), 2,28 (3H, s, NCH_3), 2,22 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$). RMN- ^{13}C { ^1H } (CDCl_3): δ 79,6 (CCH), 74,2 (CCH), 67,6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 58,0 (CCH_2O), 57,2 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 56,9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 55,7 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 45,7 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 42,8 (NCH_3).
 ANÁLISIS ELEMENTAL $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$: Calc. %: C 65,18; H 10,94; N 15,20; Exp. %: C 64,32; H 10,56; N 14,81.

Ejemplo 6: Síntesis de

$\text{Et}_3\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N(Me)CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2\text{] (9)}$

Este compuesto se prepara siguiendo un método similar al descrito para el complejo **5**, utilizando la propargil diamina del ejemplo anterior para llevar a cabo el acoplamiento click. En un matraz schlenk se disuelven 300 mg (0,47 mmol) de la azida de partida, **1**, en 15 ml de THF y se añaden 259 mg (1,41 mmol) de N,N,N'-trimetil-N'-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina ($\text{HCCHCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N(Me)CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$). A continuación se añade una disolución recién preparada de 34 mg (0,17 mmol) de ascorbato sódico en 0,2 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 18 mg (0,07 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado en 0,2 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 4 horas la reacción se interrumpe añadiendo 1,5 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x15 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (30 ml), se secan sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente a vacío, obteniendo un aceite amarillo que se identifica como **9** (510 mg, 91%).
 RMN- ^1H (CDCl_3): δ 7,50 (1H, s, NCHCN), 4,63 (2H, s, CCH_2O), 4,32 (2H, t, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,61 (2H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,61 (2H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,50 y 2,37 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,26 (3H, s, NCH_3), 2,21 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1,90 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,32 (2H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 0,89 (9H, t, SiCH_2CH_3), 0,48 (8H, m, SiCH_2CH_3 y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$). RMN- ^{13}C { ^1H } (CDCl_3): δ 144,7 (NCHCN), 122,1 (NCHCN), 68,1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 64,3 (CCH_2O), 56,9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 56,5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 55,0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 49,6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 45,1 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 42,7 (NCH_3), 34,0 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20,7 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 10,6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7,2 (SiCH_2CH_3), 3,0 (SiCH_2CH_3).
 ANÁLISIS ELEMENTAL $\text{C}_{20}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{OSi}$: Calc. %: C 60,40; H 10,90; N 17,61; Exp. %: C 60,66; H 11,17; N 18,47.

Ejemplo 7: Síntesis de

$\text{ck-G}_0\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N(Me)CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2\text{]}_4$ (10**)**

El compuesto **10** se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el derivado anterior **9**. En un matraz schlenk se disuelven 300 mg (0,47 mmol) del dendrímero de primera generación con grupos azida en la superficie, **2**, en 12 ml de THF y se añaden 269 mg (1,46 mmol) de N,N,N'-trimetil-N'-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina. A continuación se añade una disolución recién preparada de 35 mg (0,17 mmol) de ascorbato sódico en 0,2 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 18 mg (0,07 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado en 0,2 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 14 horas la reacción se interrumpe añadiendo 1,5 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x10 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (20 ml), se secan sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente a vacío, obteniendo un aceite amarillo oscuro que se identifica como **10** (473 mg, 91%).
 RMN- ^1H (CDCl_3): δ 7,51 (8H, s, NCHCN), 4,63 (8H, s, CCH_2O), 4,31 (8H, t, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,61 (8H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,61 (8H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,52 y 2,40 (16H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,26 (12H, s, NCH_3), 2,23 (24H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1,90 (8H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,28 (16H, m, SiCH_2CH_2), 0,52 (24, m, SiCH_2), 0,08 (24H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). RMN- ^{13}C { ^1H } (CDCl_3): δ 144,9 (NCHCN), 122,2 (NCHCN), 68,3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 64,4 (CCH_2O), 57,1 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 57,0 y 55,6 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 55,6, 49,8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 45,6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 42,9 (NCH_3), 33,9 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20,9-14,8 (SiCH_2 y SiCH_2CH_2), -3,5 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$). ANÁLISIS ELEMENTAL $\text{C}_{76}\text{H}_{160}\text{N}_{20}\text{O}_4\text{Si}_5$: Calc. %: C 58,56; H 10,35; N 17,97; Exp. %: C 58,07; H 10,61; N 16,96.

Ejemplo 8: Síntesis de

$\text{ck-G}_1\text{-[Si(CH}_2)_4(\text{N}_3\text{C}_2\text{H})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N(Me)CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2\text{]}_8$ (11**)**

El compuesto **11** se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el derivado anterior **9**. En un matraz schlenk se disuelven 494 mg (0,25 mmol) del dendrímero de segunda generación con grupos azida en la superficie, **3**, en 20 ml de THF y se añaden 373 mg (2,02 mmol) de N,N,N'-trimetil-N'-(2-(prop-2-iniloxi)etil)etano-1,2-diamina. A continuación, se añade una disolución recién preparada de 48 mg (0,24 mmol) de ascorbato sódico en 0,25 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 25 mg (0,10 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado en 0,3 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 16 horas la reacción se interrumpe añadiendo 2 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x20 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (40 ml), se secan sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente a vacío, obteniendo un aceite amarillo oscuro que se identifica como **11** (721 mg, 83%).
 RMN- ^1H (CDCl_3): δ 7,51 (8H, s, NCHCN), 4,62 (16H, s, CCH_2O), 4,31 (16H, t, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,61 (16H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,61 (16H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,50 y 2,37 (32H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,26 (24H, s, NCH_3), 2,21 (48H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$),

1,90 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,28 (48H, m, SiCH₂CH₂), 0,53 (80H, m, SiCH₂), -0,08 (12H, s, SiCH₃), -0,10 (48H, s, Si(CH₃)₂). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 144,9 (NCHCN), 122,0 (NCHCN), 68,3 (OCH₂CH₂N), 64,4 (CCH₂O), 57,1 (OCH₂CH₂N), 57,0 y 56,0 (NCH₂CH₂N), 49,7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45,6 (N(CH₃)₂), 42,8 (NCH₃), 33,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 20,8-14,7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3,3 (Si(CH₃)₂), -5,0 (SiCH₃). ANÁLISIS ELEMENTAL C₁₆₈H₃₅₆N₄₀O₈Si₁₃: Calc. %: C, 58,83; H, 10,46; N, 16,33; O, 3,73; Si, 10,64; Exp. %: C 57,61; H, 10,42; N, 15,29.

Ejemplo 9: Síntesis de

ck-G₂-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N(Me)CH₂CH₂NMe₂]₁₆ (12)

El compuesto **12** se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el derivado anterior **9**. En un matraz schlenk se disuelven 200 mg (0,05 mmol) del dendrímero de tercera generación con grupos azida en la superficie, **4**, en 20 ml de THF y se añaden 140 mg (0,76 mmol) de N,N,N'-trimetil-N'-(2-(prop-2-inilo)etil)etano-1,2-diamina. A continuación, se añade una disolución recién preparada de 18 mg (0,09 mmol) de ascorbato sódico en 0,1 ml de agua destilada y una disolución recién preparada de 9 mg (0,10 mmol) de sulfato de cobre pentahidratado en 0,1 ml de agua destilada. La mezcla resultante se deja agitar a temperatura ambiente. Transcurridas 18 horas la reacción se interrumpe añadiendo 2 ml de una disolución al 23% de hidróxido amónico y se deja agitar durante 15 minutos. La mezcla se extrae con acetato de etilo (3x20 ml), las fases orgánicas se juntan, se lavan con una disolución saturada de cloruro sódico (40 ml), se secan sobre MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente a vacío, obteniendo un aceite amarillo oscuro que se identifica como **12** (155 mg, 46%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,45 (16H, s, NCHCN), 4,55 (32H, s, CCH₂O), 4,24 (32H, t, CH₂CH₂N), 3,54 (32H, t, OCH₂CH₂N), 2,54 (32H, t, OCH₂CH₂N), 2,50 y 2,37 (64H, m, NCH₂CH₂N), 2,20 (48H, s, NCH₃), 2,15 (96H, s, N(CH₃)₂), 1,82 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,28 (96H, m, SiCH₂CH₂), 0,51 (0,54 (160H, m, SiCH₂), -0,02 (48H, s, SiCH₃), -0,15 (96H, s), -0,17 (24H, s, SiCH₃). RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 144,9 (NCHCN), 122,0 (NCHCN), 68,3 (OCH₂CH₂N), 64,4 (CCH₂O), 57,1 (OCH₂CH₂N), 57,0 (NCH₂CH₂N), 55,7 (NCH₂CH₂N), 50,0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 45,7 (N(CH₃)₂), 42,9 (NCH₃), 33,9 (CH₂CH₂N), 20,8-14,7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3,5 (Si(CH₃)₂), -5,1 (SiCH₃).

Ejemplo 10: Síntesis de Et₃-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₃⁺, I⁻] (13)

A una disolución del compuesto con un grupo dimetil amino terminal **5**, (101 mg, 0,34 mmol) en 5 ml de THF, se le añaden 0,031 ml (0,51 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtra y se seca a vacío obteniéndose un sólido blanco que se identifica como **13** (148 mg, 99%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,44 (1H, s, NCHCN), 4,68 (2H, s, CCH₂N), 4,43 (2H, t, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 3,06 (9H, s, N(CH₃)₃), 1,85 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,22 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0,85 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0,46 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂CH₂CH₂CH₂N). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 134,7 (NCHCN), 127,3 (NCHCN), 58,4 (CCH₂N), 51,2 (N(CH₃)₂), 48,7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19,6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 9,6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 6,7 (SiCH₂CH₃), 2,2 (SiCH₂CH₃).

Ejemplo 11: Síntesis de ck-G₀-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₃⁺, I⁻]₄ (14)

A una disolución del dendrímero de primera generación **6** (0,38 g, 0,33 mmol) en 15 ml de THF, se añaden 0,13 ml (2,02 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío para dar un sólido amarillento que se identifica como **14** (478 mg, 84%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,42 (4H, s, NCHCN), 4,66 (8H, s, CCH₂N), 4,41 (8H, t, SiCH₂CHCH₂CH₂N), 3,05 (24H, s, N(CH₃)₃), 1,83 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,27 (16H, m, SiCH₂CH₂), 0,51 (24, m, SiCH₂), -0,10 (24H, s, Si(CH₃)₂). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 134,7 (NCHCN), 127,3 (NCHCN), 58,5 (CCH₂N), 51,3 (N(CH₃)₂), 48,7 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19,8-13,7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3,9 (Si(CH₃)₂). ANÁLISIS ELEMENTAL C₆₀H₁₂₉I₄N₁₆Si₅: Calc. %: C, 41,85; H, 7,49; N, 13,02; Exp. %: C 41,25; H, 7,60; N, 11,21.

Ejemplo 12: Síntesis de ck-G₁-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₃⁺, I⁻]₈ (15)

A una disolución del dendrímero de segunda generación **7** (0,24 g, 0,08 mmol) en 10 ml de THF, se añaden 0,04 ml (0,68 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío para dar un sólido amarillento que se identifica como **15** (244 mg, 81%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,44 (8H, s, NCHCN), 4,64 (16H, s, CCH₂N), 4,40 (16H, s, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,05 (72H, s, N(CH₃)₃), 1,81 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,25 (40H, m, SiCH₂CH₂), 0,50 (64H, m, SiCH₂), -0,10 (60H, s, SiCH₃ y Si(CH₃)₂). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 134,8 (NCHCN), 127,3 (NCHCN), 58,5 (CCH₂N), 48,8 (N(CH₃)₂), 50,5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 32,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19,8-13,8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3,9 (SiCH₃). ANÁLISIS ELEMENTAL C₁₃₆H₂₉₂I₈N₃₂Si₁₃: C, 43,49; H, 7,84; I, 27,03; N, 11,93; Exp. %: C 43,75; H, 7,63; N, 9,86

Ejemplo 13: Síntesis de ck-G₂-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂NMe₃⁺, I⁻]₁₆ (16)

A una disolución del dendrímero de tercera generación **8** (0,32 g, 0,06 mmol) en 15 ml de THF, se añaden 0,006 ml (0,09 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío para dar un sólido amarillento que se identifica como **16** (302 mg, 68%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,38 (16H, s, NCHCN), 4,62 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 4,39 (32H, s, CCH₂N), 3,04 (144H, s, N(CH₃)₂), 1,83 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,27 (88H, m, SiCH₂CH₂), 0,51 (144, m, SiCH₂), -0,10 (132H, s, Si(CH₃)₂ y

SiCH₃) RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 134,8 (NCHCN), 127,4 (NCHCN), 58,5 (CCH₂N), 48,8 (N(CH₃)₂), 45,0 (CH₂N), 33,0 (CH₂CH₂CH₂CH₂N) 19,9-13,8 (SiCH₂CH₂ y SiCH₂), -3,9 (SiCH₃).

Ejemplo 14: Síntesis de

Et₃-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N⁺(Me₂)CH₂CH₂NMe₃⁺]₂⁻ (17)

A una disolución del compuesto **9** (0,50 g, 1,26 mmol) en 20 ml de THF, se añaden 0,195 ml (3,14 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío para dar un sólido amarillento que se identifica como **17** (751 mg, 88%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,17 (1H, s, NCHCN), 4,63 (2H, s, CCH₂O), 4,35 (4H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,97 (4H, s, NCH₂CH₂N), 3,93 (2H, t, OCH₂CH₂N), 3,67 (2H, t, OCH₂CH₂N), 3,21 (6H, s, N(CH₃)₂), 3,18 (9H, s, N(CH₃)₃), 1,81 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,23 (2H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0,86 (9H, t, SiCH₂CH₃), 0,48 (8H, m, SiCH₂CH₃ y SiCH₂CH₂CH₂CH₂N). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 142,4 (NCHCN), 123,5 (NCHCN), 62,7 (CCH₂O), 62,6 (OCH₂CH₂N), 62,4 (OCH₂CH₂N) 56,4 y 55,0 (NCH₂CH₂N), 52,5 (N(CH₃)₃), 51,2 (N(CH₃)₂), 48,4 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33,1 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19,6 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 9,6 (SiCH₂CH₃), 6,8 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 2,2 (SiCH₂CH₃).

Ejemplo 15: Síntesis de

ck-G₀-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N⁺(Me₂)CH₂CH₂NMe₃⁺]₄⁻ 8I⁻ (18)

A una disolución del dendrímero de primera generación **10** (0,47 g, 0,30 mmol) en 20 ml de THF, se añaden 0,16 ml (2,59 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío para dar un sólido amarillento que se identifica como **18** (658 mg, 83%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,18 (4H, s, NCHCN), 4,63 (8H, s, CCH₂O), 4,33 (8H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,94 (24H, s, NCH₂CH₂N y OCH₂CH₂N), 3,66 (8H, s, OCH₂CH₂N) 3,20 (24H, s, N(CH₃)₂), 3,17 (36H, s, N(CH₃)₃), 1,79 (8H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 1,24 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0,52 (16, m, SiCH₂), -0,10 (24H, s, Si(CH₃)₂). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 142,4 (NCHCN), 123,4 (NCHCN), 62,8 (CCH₂O), 62,6 (OCH₂CH₂N), 62,4 (OCH₂CH₂N), 56,5 y 55,5 (NCH₂CH₂N), 52,5 (N(CH₃)₃), 51,2 (N(CH₃)₂), 48,5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33,0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19,8-13,7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3,8 (Si(CH₃)₂).

Ejemplo 16: Síntesis de

ck-G₁-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N⁺(Me₂)CH₂CH₂NMe₃⁺]₈⁻ 16I⁻ (19)

A una disolución del dendrímero de segunda generación **11** (0,47 g, 0,30 mmol) en 20 ml de THF, se añaden 0,16 ml (2,59 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 13 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío para dar un sólido amarillento que se identifica como **19** (658 mg, 83%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,18 (8H, s, NCHCN), 4,62 (16H, s, CCH₂O), 4,33 (16H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,94 (48H, s, NCH₂CH₂N y OCH₂CH₂N), 3,66 (16H, s, OCH₂CH₂N) 3,20 (120H, s, N(CH₃)₂ y N(CH₃)₃), 1,79 (16H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0,51 (56, m, SiCH₂), -0,10 (24H, s, Si(CH₃)₂ y Si(CH₃)). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 142,4 (NCHCN), 123,4 (NCHCN), 62,8 (CCH₂O), 62,7 (OCH₂CH₂N), 62,4 (OCH₂CH₂N), 56,4 y 55,6 (NCH₂CH₂N), 52,5 (N(CH₃)₃), 51,2 (N(CH₃)₂), 48,5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33,0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19,8-13,7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3,9 (Si(CH₃)₂).

Ejemplo 17: Síntesis de

ck-G₂-[Si(CH₂)₄(N₃C₂H)CH₂OCH₂CH₂N⁺(Me₂)CH₂CH₂NMe₃⁺]₁₆⁻ 32I⁻ (20)

A una disolución del dendrímero de segunda generación **12** (0,16 g, 0,02 mmol) en 5 ml de THF, se añaden 0,04 ml (0,70 mmol) de yoduro de metilo y se deja agitar 14 horas a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtra y se seca a vacío para dar un sólido amarillento que se identifica como **20** (140 mg, 60%).

RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 8,17 (16H, s, NCHCN), 4,62 (32H, s, CCH₂O), 4,33 (32H, t, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 3,92 (96H, s, NCH₂CH₂N y OCH₂CH₂N), 3,66 (32H, s, OCH₂CH₂N) 3,20 (240H, s, N(CH₃)₂ y N(CH₃)₃), 1,79 (32H, m, SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 0,51 (144, m, SiCH₂), -0,10 (132H, s, Si(CH₃)₂ y Si(CH₃)). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-d₆): δ 142,4 (NCHCN), 123,4 (NCHCN), 62,8 (CCH₂O), 62,7 (OCH₂CH₂N), 62,4 (OCH₂CH₂N), 56,4 y 55,6 (NCH₂CH₂N), 52,5 (N(CH₃)₃), 51,2 (N(CH₃)₂), 48,5 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 33,0 (SiCH₂CH₂CH₂CH₂N), 19,8-13,7 (SiCH₂ y SiCH₂CH₂), -3,9 (Si(CH₃)₂).

2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS DENDRÍMEROS

A continuación se muestra una evaluación de la biocompatibilidad, capacidad para actuar como vectores no virales para la liberación de ADN en células tumorales, efecto microbicida y microestático y capacidad para vehicular fármacos de naturaleza aniónica de los nuevos dendrímeros catiónicos sintetizados.

2.1. ACTIVIDAD COMO VECTORES NO VIRALES PARA LA LIBERIZACIÓN DE ADN EN CÉLULAS TUMORALES.

2.1.1 Materiales y métodos

CULTIVOS CELULARES.

Las líneas celulares empleadas en este estudio fueron HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y HeLa (células de carcinoma cervical). Se mantuvieron a 37°C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. El medio de cultivo utilizado fue DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose" con 4500 mg/l de glucosa y glutamax-I) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Todos los productos empleados en los cultivos celulares se obtuvieron de Invitrogen Technologies (Reino Unido).

DENDRÍMEROS.

Para este estudio se han utilizado los dendrímeros carbosilano catiónicos de generación cero, primera y segunda generación descritos en el apartado anterior. Para la discusión de este apartado los dendrímeros se han dividido en dos familias, la FAMILIA 1, engloba a los dendrímeros de generación cero, primera y segunda generación con un solo nitrógeno cargado positivamente en cada rama del dendrímero (compuestos **14**, **15** y **16**). La FAMILIA 2 se refiere a los dendrímeros de generación cero y primera generación que contienen 2 átomos de nitrógenos cargados positivamente en cada rama del dendrímero (compuestos **18** y **19**).

Para facilitar el seguimiento del estudio biomédico de estos dendrímeros se ha adoptado una nueva nomenclatura para simplificar la representación de estos dendrímeros. Según esta nueva nomenclatura, los dendrímeros G0-ckN₄-4MeI, G1-ckN₈-8MeI y G2-ckN₁₆-16MeI se corresponden con los compuestos **14**, **15** y **16** respectivamente (familia 1), mientras que la formulación G0-ckN₈-8MeI y G1-ckN₁₆-16MeI alude a los dendrímeros **18** y **19** de la familia 2.

PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

El plásmido empleado en los estudios (pCMVLuc), se obtuvo tras el crecimiento de bacterias *E. coli* modificadas en placas de cultivo agar-agar con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml. Se tomó una unidad formadora de colonias y se creció primero en 5 ml de precultivo LB (del inglés "Lysogeny Broth") (1% p/v peptona de caseína, 0,5% p/v de extracto de levadura y 0,5 % p/v de NaCl), y kanamicina (50 µg/ml) durante 4 horas a 37°C, y después en 2 l del mismo medio durante 12 horas a la misma temperatura bajo agitación orbital en un agitador Shaker modelo 625 (New Brunswick Scientific, Co. Inc, Edison, EE.UU).

Tras la centrifugación de las bacterias a 6.000 r.p.m y 4°C durante 15 min en una centrífuga Beckman J2-HS, la purificación se llevó a cabo con el kit "Qiagen Endofree Plasmid Giga" (Qiagen, Alemania). Una vez purificado, el plásmido fue resuspendido en 1 ml de agua estéril. La concentración y pureza del plásmido se determinaron mediante espectroscopía UV midiendo la absorbancia del ADN plasmídico purificado a 310, 280 y 260 nm en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8452 (EE.UU). El cociente de las absorbancias A₂₆₀/ A₂₈₀ de todas las muestras fue siempre mayor o igual a 1,8, indicando un grado de pureza adecuado para el plásmido. La concentración del plásmido se calculó mediante la ley de Lambert-Beer, según la cual una unidad de absorción a 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN de doble cadena o a 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla. Además, para garantizar la pureza del ADN plasmídico (pADN), las muestras fueron sometidas a digestión con enzimas de restricción, comparando los fragmentos obtenidos con los productos de digestión de un pCMVLuc patrón. Para ello se tomó 1 µg de pADN, 0,5 µL de enzima Pst I, 0,5 µL de enzima Xho I, 2 µL de REact 2 (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido) y la cantidad suficiente de agua para alcanzar 20 µL. Tras mantener la muestra en un baño a 37° C durante 2 horas, se analizaron los productos de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% usando TBE (Tris, borato y EDTA) como tampón. La fuente electroforética utilizada fue un Power Pac 300 de BioRad (EE.UU). Las muestras se sometieron a un voltaje continuo de 80 mV durante 2 h. El ADN se visualizó mediante luz UV en una cámara oscura de aislamiento Gel doc 2000, (BioRad, EE.UU.) tras la intercalación con bromuro de etidio.

PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DENDRÍMERO/ADN

Los complejos se prepararon mediante la mezcla de volúmenes iguales de una solución de pADN con una solución de dendrímero, ambas preparadas en BHG (Tampón Hepes Glucosado) (HEPES 10 mM, glucosa al 10%, pH 7,4). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La concentración final del ADN en los complejos fue de 5 µg/ml. Las cantidades de dendrímeros y ADN fueron calculadas para obtener complejos a distintas relaciones de carga (+/-) respecto al número de grupos amino terminales del polímero frente al número de grupos fosfato del ADN. Para cada familia y generación de dendrímero se obtuvieron complejos con relaciones de carga desde 1/1 hasta 30/1 (dendrímero/ADN) (+ / -).

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO Y POTENCIAL ZETA

El tamaño y el potencial zeta se midieron por difracción de láser en un Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido). Para ello, se diluyeron 200 µl de complejo en 1 ml de agua bidestilada. Las medidas se realizaron por triplicado.

CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DENDRÍMERO/ADN EN LOS COMPLEJOS

Se prepararon complejos para las dos familias de cada generación de dendrímero a distintas relaciones de carga. Se incubaron 15 min y se sometieron a electroforesis. La cantidad de pADN por pocillo fue de 1 µg. Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: agarosa al 1,2 % y un voltaje constante de 80 mV durante 2 h en TBE.

ESTUDIOS DE TRANSFECCIÓN IN VITRO EN CULTIVOS CELULARES

Para los cultivos de transfección se utilizaron las líneas celulares HepG2 y HeLa. Se sembraron 3×10^5 células por pocillo en DME-10 sobre placas de 48 pocillos (Iwaki Microplate 48-Well, Japón). Cuando el grado de confluencia fue del 80% se procedió a la transfección. En cada pocillo se añadieron 300 μ l de medio sin suero y 200 μ l de complejo. La cantidad de pADN por pocillo fue de 1 μ g. Tras 4 h de incubación a 37°C y 5% CO₂ en un incubador (Forma Scientific, Inc.), se sustituyó el medio de transfección y se agregó DME-10. Después de 48 h, las células se lavaron con PBS (tampón fosfato salino) y se lisaron con 100 μ l de tampón de lisis 1X (RLB, "Reporter Lisis Buffer") (Promega, EE.UU). Posteriormente, se sometieron a dos ciclos de congelación descongelación a -80°C. Se analizaron 20 μ l de muestra obtenida de cada pocillo, midiendo la expresión de luciferasa con el kit "Luciferase Assay" y la cantidad de proteína total mediante el kit "BioRad Dc Protein Assay". Los resultados se expresaron en ng de luciferasa por mg de proteína.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE LOS DENDRÍMEROS

Los estudios de toxicidad de los dendrímeros se llevaron a cabo mediante el ensayo "Alamar Blue", que permite cuantificar la viabilidad celular. Para ello, se sembraron 3×10^5 células por pocillo en DME-10 sobre placas de 48 pocillos (Iwaki Microplate 48-Well, Japón). Las células fueron transfectadas según el procedimiento del epígrafe anterior. Tras 4 h de incubación a 37°C y 5% CO₂, se sustituyó el medio de transfección y se añadió DME-10. Después de 48 h, se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 mL de solución Alamar Blue al 10% en DME-10. Tras 2 h de incubación, se determinó la absorbancia a 570 nm y 600 nm de 200 μ L de sobrenadante, mediante un lector de placas Gems READER (Labsystem, Finlandia). El porcentaje de viabilidad de las células tratadas con cada uno de los complejos se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{(A_{570} - A_{600}) \text{ células tratadas} \times 100}{(A_{570} - A_{600}) \text{ células sin tratar}}$$

2.1.2 Resultados.

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Influencia de la generación del dendrímero y de la relación de cargas dendrímero/ADN sobre el tamaño de partícula

El tamaño de partícula se analizó mediante difracción de láser. Se prepararon formulaciones con la Familia 1 y con la Familia 2 en todas sus generaciones a distintas relaciones de carga como se indicó en el apartado "Material y Métodos". En todos los casos se utilizó como control PAMAM G4 (comercial) a una relación de carga 5/1 (+/-).

En la Tabla 1 se observa para la Familia 1 cómo la generación del dendrímero influye en el tamaño de los complejos, siendo los complejos preparados con la generación 2 de mayor tamaño respecto a aquellos preparados con la generación 1 y con la generación 0. Esto se observa para la mayoría de las formulaciones estudiadas.

Tabla 1. Tamaño de los complejos para la Familia 1 en función de la generación del dendrímero y de la relación de carga dendrímero/ADN (o poliplejo) utilizando como control PAMAM comercial G4 a una relación de carga 5/1

TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm)				
Relación de cargas (+/-)	PAMAM comercial	FAMILIA 1		
	Poliplejo G4	Poliplejo G0	Poliplejo G1	Poliplejo G2
1/1	-	169 $\pm$ 18	182 $\pm$ 7	283 $\pm$ 15
5/1	138 $\pm$ 11	116 $\pm$ 15	202 $\pm$ 15	217 $\pm$ 16
10/1	-	108 $\pm$ 12	158 $\pm$ 5	163 $\pm$ 11
20/1	-	77 $\pm$ 2	119 $\pm$ 20	301 $\pm$ 18
30/1	-	93 $\pm$ 3	68 $\pm$ 1	100 $\pm$ 0

En cuanto a la influencia de la relación de carga (cargas positivas del dendrímero frente a negativas del ADN) en el tamaño de partícula, se observa que en general para las generaciones 0 y 1 se cumple que a medida que aumenta la relación de cargas hay una disminución en el tamaño de la partícula. Esto se cumple también para la generación 2 con excepción de la relación de cargas 20/1 donde se observa un tamaño especialmente grande respecto al resto de las formulaciones.

Como indica la Tabla 1 los complejos formulados con las generaciones 1 y 2 a una relación de carga 5/1, tienen un tamaño superior a la formulación con PAMAM G4 (comercial), utilizada como control, a igual relación de carga. Respecto a la generación 0, el tamaño del complejo en estudio es similar al obtenido con la formulación control.

En la Tabla 2 se observa para la Familia 2 cómo la generación del dendrímero influye en el tamaño de los complejos, teniendo los complejos preparados con la generación 1 mayor tamaño respecto a aquellos preparados con la generación 0. Esto se observa en todas las relaciones de carga estudiadas.

Tabla 2. Tamaño de los complejos para la Familia 2 en función de la generación del dendrímero y de la relación de carga dendrímero/ADN, utilizando como control PAMAM comercial G4 a una relación de carga 5/1.

TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm)			
Relación de cargas	PAMAM comercial	FAMILIA 2	
(+/-)	Poliplejo G4	Poliplejo G0	Poliplejo G1
1/1	-	107 ± 4	226 ± 9
5/1	147 ± 3	88 ± 7	131 ± 2
10/1	-	86 ± 8	121 ± 7
20/1	-	84 ± 5	99 ± 11
30/1	-	57 ± 2	78 ± 1

En cuanto a la influencia de la relación de carga (cargas positivas del dendrímero frente a negativas del ADN) en el tamaño de partícula para las dos generaciones se observa que a medida que aumenta la relación de carga existe una significativa disminución en el tamaño del complejo o poliplejo. Como indica la Tabla 2 en los complejos formulados con las generaciones 0 y 1 se observa que a igual relación de carga, el tamaño de los complejos en estudio es inferior al obtenido con PAMAM G4 comercial, utilizado como control.

Respecto a la influencia de la Familia en el tamaño de partícula (Tablas 1 y 2) se observa que no existen claras diferencias significativas entre el tamaño de partícula de las dos familias estudiadas para igual relación de carga y generación. Sí se observa mayor homogeneidad en el tamaño de los poliplejos preparados con el dendrímero correspondiente a la Familia 2 respecto a la Familia 1.

Influencia de la generación del dendrímero y de la relación de cargas dendrímero/ADN sobre el potencial zeta

Para estudiar la influencia de la generación del dendrímero y de la relación de carga sobre la carga superficial de las partículas (potencial zeta), se prepararon complejos con las Familias 1 y 2 en todas sus generaciones y a distintas relaciones de carga.

Para la Familia 1 (Tabla 3), en la generación 0 y 1, a partir de la relación 5/1 los valores son positivos; en estas dos generaciones también se observa que el potencial zeta aumenta con la relación de carga. En cuanto a la generación 2, no existe una relación entre potencial zeta de la partícula/relación de cargas dendrímero/ADN en las formulaciones estudiadas y los valores de potenciales positivos comienzan a partir de 10/1.

Respecto a la formulación con PAMAM utilizada como control, comparando los valores de las generaciones 0 y 1 con el control, se observa que no existen diferencias significativas en los valores de potencial zeta obtenidos.

Tabla 3. Potencial zeta de los complejos para la Familia 1 en función de la generación del dendrímero y de la relación de carga dendrímero/ADN utilizando como control PAMAM comercial G4 a una relación de carga 5/1

POTENCIAL ZETA (mV)				
Relación de cargas	PAMAM comercial	FAMILIA 1		
(+/-)	Poliplejo G4	Poliplejo G0	Poliplejo G1	Poliplejo G2
1/1	-	- 28 ± 8	- 26 ± 10	- 7 ± 4
5/1	11 ± 1	12 ± 3	14 ± 2	- 21 ± 1
10/1	-	22 ± 5	18 ± 3	15 ± 3
20/1	-	29 ± 3	20 ± 6	22 ± 5
30/1	-	41 ± 2	29 ± 10	15 ± 4

Para la Familia 2 (Tabla 4), en las dos generaciones estudiadas se observa que el potencial zeta de las partículas se modifica hasta la relación de carga 10/1; a partir de este punto los valores alcanzan una meseta y se mantienen constantes alrededor de 30 y 40 mV para la generación 0 y 1 respectivamente. En cuanto a la formulación control se observa que los valores de potencial zeta obtenidos con la generación 0 y 1 correspondientes a la Familia 2 (Tabla 4) son notablemente superiores al valor obtenido con PAMAM como complejo control a igual relación de carga.

Tabla 4. Potencial zeta de los complejos para la Familia 1 en función de la generación del dendrímero y de la relación de carga dendrímero/ADN

POTENCIAL ZETA (mV)			
Relación de cargas	PAMAM comercial	FAMILIA 2	
(+/-)	Poliplejo G4	Poliplejo G0	Poliplejo G1
1/1	-	- 34 ± 1	- 9 ± 10
5/1	8 ± 2	36 ± 0	34 ± 1
10/1	-	33 ± 5	39 ± 3

20/1	-	31 + 3	42 + 8
30/1	-	30 + 3	41 + 0

Respecto a la influencia de la relación de carga, para las dos familias (Tablas 3 y 4), Para la generación 1 se observa que a todas las relaciones de carga estudiadas los valores de potencial obtenidos con la Familia 2 son mayores que los obtenidos con la Familia 1.

CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DENDRÍMERO/ADN EN LOS COMPLEJOS

Para demostrar la unión del dendrímero al ADN se realizó un gel de retardo. Los resultados obtenidos se observan en la FIG. 1. El gel de retardo es el resultado de los efectos electrostáticos y estéricos debidos a la formación del complejo cargado entre el dendrímero catiónico y el ADN.

En la primera columna del gel aparecen las bandas del ADN correspondientes tanto al ADN circular abierto, como superenrollado. En la segunda columna se observa solo una banda en la línea correspondiente al ADN complejoado con la formulación PAMAM comercial. En el resto de las columnas se observa que ambas familias son capaces de retener e inmovilizar al pADN en el gel en todas las relaciones de carga. La retención total del plásmido se produce en todas relaciones de carga correspondientes a las generaciones de las dos familias, desde 5/1 hasta 20/1 para la Familia 1 y desde 5/1 hasta 30/1 para la Familia 2.

EVALUACIÓN IN VITRO EN CULTIVOS CELULARES

Para la evaluación *in vitro* de las formulaciones galénicas preparadas se realizaron estudios de eficacia de transfección y de toxicidad de los dendrímeros en dos líneas celulares: HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y HeLa (células de carcinoma cervical).

Eficacia de transfección

Los resultados de eficacia de transfección de las Familias 1 y 2 aparecen recogidos en las Figuras 2 y 3, respectivamente. Las células fueron transfectadas con los complejos preparados con las diferentes generaciones de las Familias 1 y 2 a relaciones de carga descritas en las Tablas 1 y 2 de este mismo apartado. Las células también fueron transfectadas con las siguientes formulaciones utilizadas como control:

- ADN desnudo para poder evaluar las diferencias entre ADN libre y condensado.
- PAMAM generación 4 a una relación de carga 5/1 como control de la formación del complejo.

Para la línea celular HepG2 (FIG. 2A y 3A), tras varios ensayos realizados con las diferentes formulaciones, para cada generación, se eligieron aquellos complejos que mostraron valores de transfección más elevados.

En cuanto a la Familia 1 para la línea celular HepG2 (FIG. 2A) se observa que la mayor eficacia de transfección se obtiene con la generación 1 a una relación de cargas 5/1. Este valor de eficacia es mayor que el valor obtenido con la formulación de PAMAM comercial utilizada como control. Para la línea celular HeLa (FIG. 2B) se observa que en las tres generaciones estudiadas, la eficacia de transfección aumenta con la relación de carga. En cuanto a la relación de carga 20/1 se observa que los valores obtenidos con la generación 2 son muy superiores a los obtenidos con la generación 0 y con la generación 1.

Para la línea HepG2 (FIG. 3A) en la Familia 2, por comparación entre las dos generaciones estudiadas se observa que la mayor eficacia de transfección se obtiene con la generación 1 a una relación de cargas 5/1.

Para la línea celular HeLa (FIG. 3B), en la Familia 2, para las dos generaciones, la eficacia de transfección aumenta hasta la relación de carga 10/1, observándose para relaciones de carga superiores una ligera tendencia a la disminución de la expresión génica.

Toxicidad de los dendrímeros

Como se muestra en las Figuras 4 y 5, los complejos preparados resultaron no ser tóxicos, ya que los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en este ensayo fueron cercanos al 100% y en ningún caso inferiores al 75%, independientemente de la relación de carga, la generación y la familia empleada.

2.1.3 Discusión de resultados.

Para caracterizar los complejos preparados en este trabajo, se han realizado medidas de tamaño, carga superficial y estudios de caracterización de la unión dendrímero/ADN en gel de agarosa.

La Familia 2 dobla en su número de nitrógenos terminales a la Familia 1, es decir, posee un mayor número de cargas positivas, lo que explicaría que los complejos de la Familia 2 tengan mayor carga (B. Singh, A. T. Florence. *Int. J. Pharm.* **2005**, 298, 348) (Tablas 1 y 2). En las dos familias estudiadas se observa que al aumentar la generación hay un aumento en el tamaño de los complejos formados, siendo en la mayoría de las formulaciones para la Familia 1, los complejos correspondientes a la generación 2 los de mayor tamaño en todas las relaciones de carga analizadas y para la Familia 2 los complejos correspondientes a la generación 1 los de mayor tamaño en todas las relaciones de carga estudiadas. Esto podría explicarse debido a que los pesos moleculares de las dos familias de dendrímeros aumentan en

relación con la generación, siendo la generación 2 para la Familia 1 y la generación 1 para la Familia 2 las generaciones con peso molecular más elevado. Cabe destacar que el dendrímero correspondientes a la generación 2 de la Familia 1 tiene un peso molecular mayor que el resto de todos los dendrímeros utilizados en estos ejemplos.

En general, para cada generación de las dos familias de dendrímeros se cumple que el tamaño de los complejos formados disminuye con el incremento en la relación de carga ya que a mayor número de cargas positivas mayor capacidad de condensación.

Resultados similares han sido descritos por Ramaswamy y colaboradores en un estudio realizado con polilisina (C. Ramaswamy, T. Sakthivel, A. Wilderspin, A. T. Florence. *Int. J. Pharm.* **2003**, 254, 17). Esto no se observa a la relación de carga 20/1 de la generación 2 para la Familia 1. Cabría pensar que esta diferencia en el tamaño pudiera deberse a una tendencia a la agregación, que se explicaría debido a que en generaciones grandes un aumento en la relación de cargas conlleva una disminución en el tamaño del complejo y una mayor superficie de interacción.

Por otro lado, con el incremento en la relación de carga, el exceso de cargas positivas es mayor, haciendo que los complejos aumenten su potencial zeta en prácticamente todas las generaciones.

El ensayo de caracterización de la unión dendrímero/ADN (FIG. 1) demostró que todas las formulaciones preparadas de las dos familias son capaces de retener e inmovilizar al pADN en el gel de agarosa a todas las relaciones de carga estudiadas.

La evaluación de la eficacia de transfección *in vitro* mostró diferencias significativas entre los diferentes complejos. La familia(1 ó 2), la generación del dendrímero y la relación de carga influyen en la eficacia de transfección (FIG's 2 y 3).

Para la Familia 1, en la línea celular HepG2 (FIG. 2A), la eficacia de transfección es notablemente superior para la generación 1 a relación de carga 5/1 respecto a la generación 0, e incluso superior a la eficacia de transfección del PAMAM comercial a igual relación de carga. En la línea celular HeLa, para esta misma familia, se observa que en las tres generaciones a mayor relación de carga, mayor potencial zeta y mayor eficacia de transfección. En cuanto a la Familia 2, en la línea celular HepG2, la mayor eficacia de transfección se obtiene con la generación 1 a relación de carga 5/1. Para la Familia 2, en la línea celular HeLa, se observa que en las dos generaciones, hay un incremento en la eficacia de transfección en relación con el incremento en la relación de carga.

Este aumento en la eficacia de transfección puede deberse a que los complejos formulados con mayor relación de carga tienen mayor potencial zeta. Un exceso de cargas positivas favorece la interacción con las proteínas aniónicas y los fosfolípidos de la membrana celular y con ello la internalización del complejo.

Las dos líneas celulares presentan niveles de expresión muy distintos, obteniéndose mejores resultados en las células HepG2 (Figuras 2A y 3A). Cabría pensar que las diferencias de eficacia de transfección de los distintos complejos y líneas celulares, se pudieran deber a diferencias en la toxicidad de los complejos, sin embargo, los estudios de toxicidad realizados en este trabajo demostraron que todas las formulaciones estudiadas resultaron no ser tóxicas, ya que en todos los casos se observó una viabilidad celular cercana al 100% y en ningún caso inferior al 75% (FIG's 4 y 5).

2.2. ACTIVIDAD COMO VECTORES NO VIRALES PARA EL TRANSPORTE DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN PROCESOS DE TERAPIA GÉNICA FRENTE AL VIH.

A continuación se muestra una evaluación de la toxicidad celular, la caracterización de la unión de los dendrímeros sintetizados con pequeños ARN de interferencia (siRNA), la caracterización de la unión dendrímero/siRNA en los complejos y por último la inhibición del VIH debida a estas moléculas sintetizadas.

2.2.1 Materiales y métodos

CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP):

La sangre se obtuvo de *buffy coats* procedentes de donantes sanos del Centro de Transfusiones de Madrid. Dicha sangre se diluye 2 veces con solución salina tamponada con fosfato 6,7 mM (PBS, Bio-Whittaker®) y se procede a su centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Isopaque®). Tras dicha centrifugación se recupera el halo que contiene las CMSP y se procede a dos ciclos de lavado-centrifugado posteriores con PBS (10 minutos a 1.500 r.p.m.). Las CMSP resultantes se resuspenden en medio de completo y en condiciones de cultivo.

LÍNEA CELULAR T JURKAT CLON E6 (ATCC; línea celular de linfocitos T):

Se creció de forma rutinaria en RPMI 1640 (Biochrom KG Seromed, Berlin, Alemania) suplementado con 5% suero fetal de ternera (FCS) inactivado por calor, 1% penicilina/streptomicina, y 2 mM L-glutamina (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA-U.S.A.) a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂.

LÍNEA SUPT1 (HUMAN LEUKEMIA T-LYMPHOCYTES):

Se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) (catCRL 1942). Se cultivaron en medio complete RPMI 1640 (Biochrom AG) suplementado con 10% suero bovino fetal inactivado (FBS), 2 mM L-glutamina, 1% ampicilina, 1% cloxaciclina, 0,32% gentamicina, 10 mM ácido 4(2-hidroxil)1-piperazinaetansulfúrico (HEPES), 1mM piruvato sódico y 4,5 g/l de glucosa. Se incubaron a 37°C y 5% CO₂.

DENDRÍMEROS

Para este estudio se han utilizado los dendrímeros carbosilano catiónicos de generación cero, primera y segunda generación descritos en el apartado 2.1. Para la discusión de este apartado los dendrímeros se han dividido en dos familias, la FAMILIA 1, engloba a los dendrímeros de generación cero, primera y segunda generación con un solo nitrógeno cargado positivamente en cada rama del dendrímero (compuestos **14**, **15** y **16**). La FAMILIA 2 se refiere a los dendrímeros de generación cero y primera generación que contienen 2 átomos de nitrógenos cargados positivamente en cada rama del dendrímero (compuestos **18** y **19**). Los estudios de inhibición frente al VIH se han ejemplificado con los resultados obtenidos para los dendrímeros de primera generación **15** y **19**.

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

Se utilizaron distintas técnicas con el fin de evaluar la viabilidad en diferentes aspectos: la integridad de membrana se comprobó mediante la inclusión de azul de tripano por microscopía óptica y la inclusión de yoduro de propidio por citometría de flujo y la actividad mitocondrial se midió por el reactivo MTT. Estas técnicas se aplicaron para el estudio de la toxicidad de las generaciones de dendrímeros en líneas celulares T (Jurcat y SupT1) así como en cultivos primarios (CMSP humanas).

a) Tinciones con azul de tripano

Se preparó una solución con azul de tripano (Sigma®) al 0,8%. Las células tratadas con los dendrímeros se centrifugaron y se decantó el sobrenadante; tras resuspender el sedimento celular, se trató con la solución de azul de tripano durante 30 segundos, procediéndose a centrifugación y lavado posteriormente con PBS dos veces. Las células se observaron bajo microscopía óptica y se contaron las positivas para la presencia de azul de tripano (las células azules están muertas o su membrana está dañada) en relación con el porcentaje de células negativas (células vivas). Para ello se seleccionó un campo amplio con al menos 100 células cada vez.

b) Ensayo MTT

Esta técnica se utilizó para evidenciar efectos deletéreos sobre el metabolismo celular. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células viables para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma®) en cristales insolubles de formazán. Tras el tiempo deseado de incubación de las distintas poblaciones celulares con diferentes concentraciones de dendrímeros en placa de 96 pocillos (100.000 células/pocillo respectivamente), y con 3 pocillos como control positivo de inactividad celular [20% de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma®)], el sobrenadante que contenía dendrímero se retiró y se sustituyó por 200 µl de un medio de cultivo sin suero ni rojo fenol (Opti-MEM®). Además de los 200 µl de Opti-MEM®, se añadieron 20 µl de MTT filtrado previamente para conseguir su esterilidad (Azul de Tiazolil, Sigma®) en PBS a una concentración de 5 mg/ml (concentración final en pocillo de 0,5 mg MTT/ml). Después de 4 horas de incubación en condiciones de cultivo, se procedió a la centrifugación de la placa a 2.000 r.p.m. 10 minutos y a la posterior retirada del sobrenadante con el exceso MTT que no reaccionó. Los cristales de formazán se observaron al microscopio de contraste de fase y se disolvieron posteriormente con 200 µl de DMSO. La placa se agitó a 700 r.p.m. en un agitador Eppendorf® para asegurar la correcta disolución de dichos cristales. La concentración de formazán se determinó por espectrofotometría utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm con una referencia de 690 nm. El espectrofotómetro se calibró utilizando Opti-MEM® sin células. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calculó en base a la fórmula: $[A]_{\text{test}} / [A]_{\text{control}} \times 100$. Cada concentración de dendrímero se ensayó por triplicado, siguiendo las directivas del ATCC. Se utilizó como control de lisis de las células Tritón x-100 al 0,2%.

CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DENDRÍMERO/siRNA EN LOS COMPLEJOS

Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de retención de pequeños ARN de interferencia (siRNA o ARNpi) con los distintos dendrímeros sinterizados. Para ello, se utilizó el ARNi siNEF (5'-GUGCCUGGCUAGAAGCACAdTdT-3', marcado con cianina 3 (cy3) en el extremo 5' de la hebra sentido (SEQ ID NO: 1) y el siNEF antisentido (SEQ ID NO: 2): 3'-UGUGCUUCUAGCCAGGCACdTdT-5'. Los complejos se formaron en H₂O estéril y se almacenaron a 4°C. La concentración dependió en cada caso del ratio de cargas deseado (desde ratio 1:1 hasta 1:8). Para comprobar la formación de los complejos, con los siRNA y valorar su total retención por parte del dendrímero, se realizaron electroforesis en las que se analizó la capacidad del dendrímero para evitar la migración del siRNA al polo positivo. El complejo formado en su totalidad se queda retenido en el pocillo o migra al polo negativo, según el ratio de cargas de cada complejo. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 minutos, se cargaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, y se corrieron a 90 V durante 30 min. Los geles se visualizaron con luz UV. La caracterización de la unión dendrímero/siRNA en los complejos se ha ejemplificado con los resultados obtenidos para los dendrímeros de primera generación **15** y **19**.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL VIH**a) Preparación de la cepa X4 VIH-1_{NL4-3}**

El aislado viral X4 VIH-1_{NL4-3} es una cepa viral de laboratorio establecida y se utilizaron células MT-2 (línea celular de leucemia de células T con ADN de HTLV-1 integrado, que se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC) para la expansión del virus. Se lavaron 2×10^6 células MT-2 dos veces con medio completo (RPMI 1640 (Gibco) suplementado con con 10% de Suero Fetal de Ternera (SFT), 2mM L-glutamina y antibióticos (1% cloxaciclina, 1% ampicilina y 0.32% gentamicina)] en placas de 24 o 96 pocillos, en condiciones de cultivo (37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa) y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio completo. Posteriormente, se añadió VIH-1_{NL4-3} a una concentración de 1 partícula por célula o lo que es lo mismo, 1 M.O.I. (*"Multiplicity Of Infection"*). Se cultivaron las MT-2 con el virus durante 2 horas en condiciones de cultivo, agitando el cultivo cada 15-30 minutos. Finalmente se lavaron los cultivos (células-virus) dos veces para retirar el virus no integrado en el genoma celular. Las células se transfirieron a un pocillo de placa de seis pocillos en un volumen de 3-4 ml. Se dejó en cultivo durante 2-3 días y se observó la presencia de sincitios en el pocillo. Cuando la presencia de sincitios alcanzó un 80-90% de producción, se añadieron 12 ml de medio completo con 20×10^6 MT-2 y se dispensaron en placa petri. A los 2-3 días, se centrifugó todo el volumen y se recogió el sobrenadante. Se añadieron 12 ml de medio completo con 20×10^6 MT-2 a las células anteriores (MT-2 infectadas) y se dispensaron en placa petri. Se repitió este proceso hasta 3 veces. El sobrenadante se alicuotó y se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido, para posteriormente ser titulado.

b) Titulación de los virus

El aislado viral VIH-1_{NL4-3} se tituló en la línea celular MT-2. Se cultivaron 2×10^4 células MT-2 con medio completo en placas de 96 pocillos y se añadieron 40 µl de la preparación viral a distintas concentraciones, para lo que se realizaron las correspondientes diluciones. Se dispusieron las diluciones por octuplicado y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante una semana. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la titulación por visualización del efecto citopático. El título se calculó aplicando la fórmula de Spearman-Kärber. También se tituló mediante cuantificación de proteína p24 por un inmunoensayo enzimático (ELISA p24. INNOTESTTM HIV antigen mAB, Innogenetics®) con el que se establece la relación partículas infectivas por ml y µg de virus por ml. El aislado viral VIH-1_{Ba-L} se tituló mediante cuantificación de proteína p24 por ELISA. Para asegurar la pureza del virus, las alícuotas descongeladas se filtraron a través de filtros de 0,22 µm antes de la cuantificación.

c) Infección in vitro de los cultivos celulares primarios

Las CMSP se estimularon durante 48 horas con 2 µg/ml de PHA (fitohemaglutinina) y 50 UI de IL-2 (interleuquina 2), para provocar una activación policlonal; a las 48 horas se lavan las células con PBS. La concentración deseada de células se incubó con el número de partículas de VIH deseado en medio completo durante 2 horas en condiciones de cultivo. Tras este tiempo se recogen las células del cultivo y se lavan tres veces con PBS para eliminar el virus no integrado en el genoma celular. A continuación, las CMSP previamente infectadas se colocan en una placa de 96 pocillos (2×10^5 células por pocillo) en medio completo (200 µl por pocillo) y se les añade los distintos complejos a ratio 1:4. Como controles se usan los fármacos AZT (Zidovudina®), inhibidor de la retrotranscriptasa análogo de nucleósido y T20 (Fuzeon®), inhibidor de la entrada viral, en particular de la fusión. Tras la adición de los dendrímeros se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 48 horas. Trascurrido el tiempo se recoge el sobrenadante para cuantificar antígeno p24 por ELISA.

2.2.2 Resultados**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS DENDRÍMEROS**

Para realizar una completa caracterización de las dos generaciones de cada nuevo dendrímero sintetizado, se elaboró un sistema de *screening* para determinar las concentraciones biocompatibles que requerían un estudio más detallado. Antes de nada, se establecieron los límites de solubilidad de los dendrímeros de cada generación en agua. Se disolvieron los dendrímeros a concentraciones de 3 mM, 2 mM y 1 mM, siendo esta última la que mejor solubilidad presentaba sin la ayuda de factores físicos adicionales para su perfecta solubilización (vortex, calor, etc). Una vez asentada la concentración de partida en todos los dendrímeros ensayados, se procedió a evaluar su citotoxicidad en las células diana de nuestro estudio, las líneas celulares T Jurkat y SupT1. A concentraciones crecientes de dendrímero y se contó el porcentaje de células muertas a las 24 h mediante la técnica de azul de tripano.

Las células mostraron tinción azul superior al control a partir de 15 µM de dendrímero, por lo que se decidió centrar los estudios de viabilidad en una concentración determinada, 10 µM. La citotoxicidad se evaluó llevando a cabo ensayos de actividad celular de la mitocondria, donde la reducción de sales de tetrazolio a cristales de formazán es un reflejo indirecto del correcto metabolismo de las células. Véase la Figura 6, donde se evaluaron inicialmente las 3 generaciones de los dos tipos de dendrímeros, obteniendo unos niveles aceptables de biocompatibilidad y siempre dentro de los márgenes de aceptabilidad indicados para este ensayo (no más de una disminución del 20% en la actividad celular). Este experimento se llevó a cabo en las líneas celulares Jurkat y SupT1. A las 24 horas de tratamiento, se evaluó la viabilidad celular cuantificando la reducción de sales de tetrazolio (MTT) por la mitocondria de los distintos tipos de células tratadas 24 h con los dendrímeros. Se obtuvieron niveles de producción de cristales de formazán por encima de un 80% y se determinó que la concentración de dendrímero de 10 µM es biocompatible con el metabolismo celular de las Jurkat y SupT1 tras 24h. El control de células tratadas con una molécula inerte como el dextrano no mostró toxicidad.

Para reproducir la toxicidad en una línea más fisiológica, se evaluó la toxicidad en CMSP de los dendrímeros de mayor generación G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**). La viabilidad en este caso fue similar a la obtenida en líneas celulares observándose el punto de inflexión a partir de 10 μ M. Véase la Figura 7. Se observó una buena integridad de la membrana a las 24 horas con respecto al control. Otros factores pueden modificar la lectura por espectrofotometría, y se aceptó ese ligero aumento de la viabilidad debido a la presencia del dendrímero. El control positivo de muerte, el Tx-100 al 0,2%, funcionó en ambos experimentos y representó el 0% de viabilidad frente al control. La toxicidad se presentó a partir de 10 μ M. La actividad mitocondrial se mostró estable a la concentración de 10 μ M. El bajo daño que produce a la membrana de células fisiológicas como las CMSP, unido a la óptima actividad mitocondrial de las células en presencia de una concentración de 10 μ M, determinó que los G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**) se seleccionaran para poner a punto los ensayos de inhibición del VIH en CMSP.

CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DENDRÍMERO/SIRNA EN LOS COMPLEJOS

Tras 3h de incubación, se observa la formación del complejo dendrímero/sirna en los compuestos G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**) a partir de los ratios 1:4 y 1:8 respectivamente caracterizada por la falta de expresión de la banda a nivel del siRNA. A ratios inferiores, se observa una ligera unión caracterizada por una menor expresión de banda a nivel del siRNA a partir del ratio 1:2. El patrón de retención observado con el dendrímero G2-ckN8-8MeI (compuesto **15**) se mantiene a lo largo del tiempo. Sin embargo, en el compuesto G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**) se observa que a ratio 1:4 se ha producido formación total del complejo dendrímero/sirna. Véase la figura 8. Como ejemplo se muestran los geles de retención de los dendrímeros G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**).

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL VIH

Se evaluó el posible efecto terapéutico de los dendrímeros sintetizados. Como ejemplo se muestran los ensayos de inhibición llevados a cabo con los dendrímeros G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**). Ambos compuestos mostraron una elevada capacidad de inhibición del VIH (77% y 87%, respectivamente), lo que confirma la aplicación terapéutica como antiviral de estos dendrímeros en un sistema más fisiológico como es una línea primaria linfocitaria. Se potencia de esta forma la inhibición de la replicación viral en células ya infectadas por el VIH-1 NL4.3. Se utilizó T-20 (Fuzeon) y AZT como controles de inhibición de la fusión viral y de la retrotranscriptasa inversa. Como ejemplo se muestran los ensayos de inhibición llevados a cabo con los dendrímeros G1-ckN8-8MeI (compuesto **15**) y G1-ckN16-16MeI (compuesto **19**). Véase la Figura 9. La inhibición observada debida a los complejos fue similar a la observada con los dendrímeros sin complejar (84% y 88%, respectivamente). Véase la Figura 9.

2.3. EFECTO BACTERICIDA/BACTERIOSTÁTICO DE LOS DENDRÍMEROS CARBOSILANO CATIÓNICOS.

2.3.1 Materiales y métodos

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los productos se determinó en microplacas de 96 pocillos, utilizando el método estándar ISO 20776-1. El ensayo se realiza por sextuplicado para cada concentración analizada. Para los ensayos se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva). Ambas cepas fueron proporcionadas por la "Colección Española de cultivos tipo" (CECT). Se prepara una disolución madre disolviendo 0,01024 g del compuesto en estudio en 10 ml de agua destilada. Después de eso, se añade agua destilada estéril hasta obtener la concentración deseada. Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 h utilizando un lector de microplacas ELX808iu (Bio-Tek Instruments). La concentración mínima bactericida (CMB) se calcula inoculando 100 μ l de las muestras utilizadas para el cálculo de CMI, en una placa de Petri con agar Mueller-Hinton (ref. 02-136, Scharlau). Tras 48 h de incubación a 37°C, se midió la presencia de colonias. La CMB se determinó como la concentración mínima en la que no se detecta el crecimiento de bacterias.

2.3.2 Resultados

La invención recoge el estudio de la capacidad antibacteriana de los dendrímeros **14-16** y el dendrímero de primera generación **19**, así como las del derivado monofuncional **13**, sobre bacterias Gram positiva y Gram negativa, comparando los datos obtenidos con los del antibiótico penicilina V utilizado como referencia. En particular, hemos medido la CMI y CMB (concentración mínima bactericida) de nuestros dendrímeros frente a *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa). El término CMI representa la concentración mínima de un dendrímero que puede inhibir el crecimiento de un microorganismo (efecto bacteriostático), mientras que CMB indica la concentración mínima de un agente que puede matar a un microorganismo (efecto bactericida).

Los datos de actividad biocida obtenidos para los dendrímeros recogidos en esta memoria aparecen en las tablas 5-7.

Tabla 5:- Resultados obtenidos utilizando *Escherichia coli* como microorganismo para analizar la capacidad antimicrobiana del dendrímero derivado monofuncional (Et₃), G0, G1 y G2 (generación del dendrímero). CMI, concentración mínima inhibitoria. CMB, concentración mínima bactericida.

<i>E. coli</i>	Et ₃						G0						G1						G2					
	CMI			CMB			CMI			CMB			CMI			CMB			CMI			CMB		
	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
Dendrímero																								
13	256	584	256	584																				
14							16	9,3	16	9,3														
15													512	136,3	512	136,3								
19													128	22,5	256	45								
16																	>512	>65,4	>512	>65,4				>65,4

Tabla 6: Resultados obtenidos utilizando *Staphylococcus aureus* como microorganismo para analizar la capacidad antimicrobiana del dendrímero. Derivado monofuncional (Et₃), G0, G1 y G2 (generación del dendrímero). CMI, concentración mínima inhibitoria. CMB, concentración mínima bactericida.

<i>S. aureus</i>	Et ₃						G0						G1						G2					
	CMI			CMB			CMI			CMB			CMI			CMB			CMI			CMB		
	mg/l	μM		mg/l	μM		mg/l	μM		mg/l	μM		mg/l	μM		mg/l	μM		mg/l	μM		mg/l	μM	
Dendrímero																								
13	16	36,5	16	36,5																				
14							4	2,3	4	2,3														
15												16	4,2	16	4,2									
19												32	5,6	32	5,6									
16																32	4	64	8					

Tabla 7:- Resultados obtenidos utilizando *Escherichia coli* como microorganismo para analizar la capacidad antimicrobiana de la penicilina, del dendrímero y del dendrímero a una concentración sin actividad frente al microorganismo junto con penicilina. CMI, concentración mínima inhibitoria. CMB, concentración mínima bactericida.

<i>E. coli</i>				
	CMI		CMB	
	mg/L	µM	mg/L	µM
Penicilina	256	766	256	766
Dendrímero 15	512	136,3	512	136,3
Dendrímero 15 (32 mg/l) + Penicilina (512-0,125 mg/l)	64	191,4	64	191,4

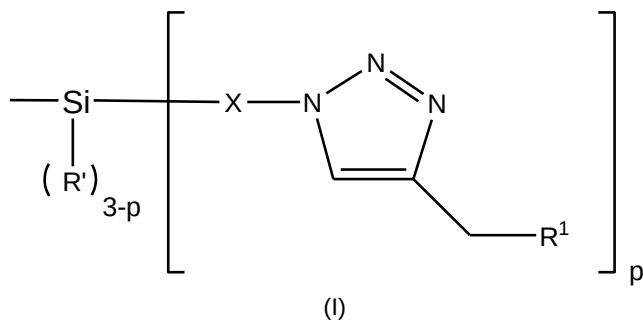
La capacidad bactericida de estos sistemas depende de la multivalencia del sistema dendrítico, ya que incluso el dendrímero de generación cero, con 4 cargas positivas en la periferia, es bastante más potente que su correspondiente derivado monofuncional. No obstante, la capacidad antibacteriana de estas moléculas está supeditada a una situación de compromiso entre el tamaño y el número de cargas en la periferia.

Las tablas 5 y 6 muestran que los dendrímeros carbosilano catiónicos **14-16** son más activos frente a bacterias gram positivas que frente a bacterias gram negativas, donde únicamente el dendrímero de generación cero **14** presenta una actividad moderada. Dada la poca actividad del dendrímero de primera generación **15** frente a *Escherichia coli*, decidimos llevar a cabo un estudio para analizar la posible sinergia entre este dendrímero y un antibiótico como la penicilina V cuya actividad frente a este tipo de bacterias es también muy limitada. Para ello llevamos a cabo la adición de cantidades variables de penicilina V sobre una cantidad constante de 32 mg/l del dendrímero **15**, concentración a la cual estamos seguros que el dendrímero no presenta efecto bacteriostático ni bactericida (ver tabla 5). En la tabla 7 se puede observar como si bien, tanto la penicilina como el dendrímero carecen prácticamente de actividad antibacteriana frente a esta bacteria gram negativa, la utilización conjunta de ambos sistemas aumenta en 4 veces la capacidad biocida de la penicilina frente a esta bacteria, pasando su CMI y CMB de 256 mg/l a 64 mg/l. Así pues, este resultado muestra la capacidad de nuestros dendrímeros catiónicos de interaccionar con fármacos aniónicos como la penicilina V, vehiculizándolos y ayudándolos a ejercer su acción biocida, por lo que podrían ser propuestos como agentes potenciadores de la actividad antibacteriana de antibióticos u otros compuestos con actividad antimicrobiana.

REIVINDICACIONES

1. Dendrúmero carbosilano que comprende:

- un núcleo polifuncional, y
- una capa externa, que consiste total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes de grupos de fórmula (I):



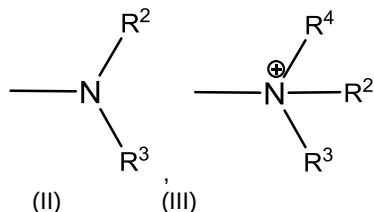
donde:

R' es un alquilo C₁-C₄,

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

X un grupo alquilo C₁-C₆,

R¹ se selecciona de entre los grupos de fórmula (II), (III) o el grupo -O-R⁵:



R², R³, R⁴, son iguales o diferentes, y se seleccionan independiente entre un hidrógeno, un grupo alquilo C₁-C₄ o un grupo alquilo C₁-C₄ sustituido con un grupo amino terciario o cuaternario; con la condición de que al menos un grupo R², R³ o R⁴ sea un grupo alquilo o alquilo sustituido; y R⁵ es un alquilo C₁-C₄ sustituido con un grupo amino terciario o cuaternario.

2. Dendrúmero según la reivindicación 1, donde el núcleo polifuncional es de silicio.

3. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde p es 1.

4. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R' es metilo.

5. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde X es un grupo butilo.

6. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R¹ es un grupo de fórmula (III).

7. Dendrúmero según la reivindicación 6, donde R², R³ o R⁴, son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de entre un alquilo C₁-C₂.

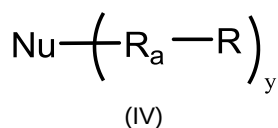
8. Dendrúmero según la reivindicación 7, donde R², R³ o R⁴ son un grupo metilo.

9. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R¹ es el grupo -O-R⁵ y R⁵ es un alquilo C₁-C₄ sustituido con un grupo amino terciario o cuaternario.

10. Dendrúmero según la reivindicación 9, donde R⁵ es grupo etilo sustituido por un grupo amino terciario sustituida por al menos un grupo alquilo C₁-C₄ sustituido a su vez por un grupo amino terciario o cuaternario.

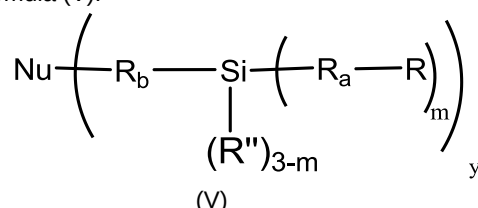
11. Dendrúmero según la reivindicación 10, donde R₅ es grupo etilo sustituido por un grupo amino terciario sustituida por un grupo etilo sustituido a su vez por un grupo amino cuaternario.

12. Dendrúmero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho dendrúmero tiene la siguiente fórmula (IV):



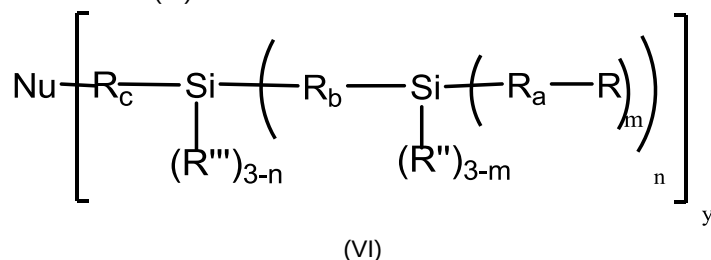
donde: Nu representa un núcleo polifuncional según se describe en las reivindicaciones 1 ó 2;
y tiene un valor de entre 2 y 6;
R_a es un grupo alquilo (C₁-C₆); y
R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

13. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho dendrímero es al menos de primera generación con la siguiente fórmula (V):



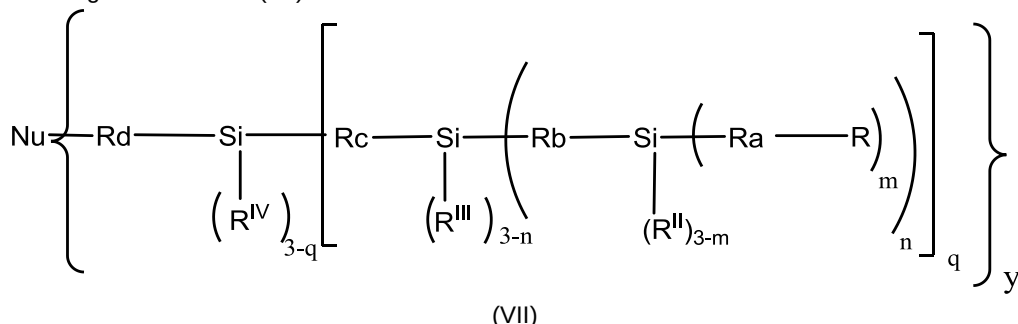
donde: Nu representa un núcleo polifuncional según se describe en las reivindicaciones 1 ó 2;
y tiene un valor de entre 2 y 6;
R_a, R_b y R'', son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆);
m tiene un valor de 1 a 3; y
R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

14. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho dendrímero es al menos de segunda generación con la siguiente fórmula (VI):



donde: Nu representa un núcleo polifuncional según se describe en las reivindicaciones 1 ó 2;
R_a, R_b, R_c, R'' y R''', son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆);
y tiene un valor de entre 2 y 6;
m y n son iguales o diferentes y tienen un valor de 1 a 3; y
R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

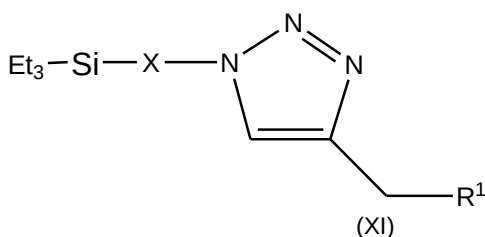
15. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho dendrímero es al menos de tercera generación con la siguiente fórmula (VII):



donde: Nu representa un núcleo polifuncional según se describe en las reivindicaciones 1 ó 2;
R_a, R_b, R_c, R_d, R'', R''' y R^{IV}, son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆);
y tiene un valor de entre 2 y 6;
m, n y q son iguales o diferentes y es un número entero que varía entre 1 y 3; y
R es el grupo terminal de fórmula (I) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

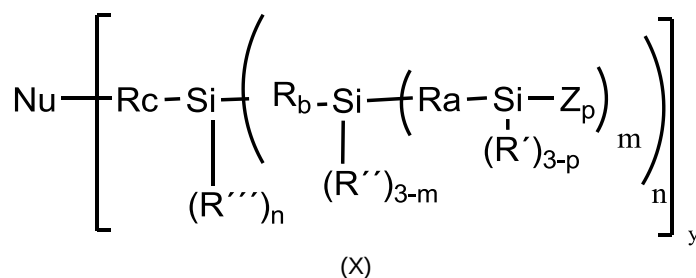
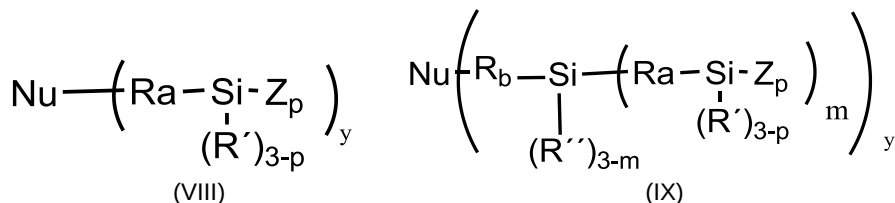
16. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde dicho dendrímero es de primera, segunda o tercera generación.

17. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde R_a , R_b , R_c o R_d , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_2-C_5).
18. Dendrímero según la reivindicación 17, donde R_a , R_b , R_c o R_d son un grupo butilo.
19. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, donde R'' , R''' o R^{IV} , son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C_1-C_4).
20. Dendrímero según la reivindicación 19, donde R'' , R''' o R^{IV} son un grupo metilo.
21. Dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde dicho dendrímero está en forma de sal catiónica.
22. Dendrímero según la reivindicación 21, donde el anión es el ioduro.
23. Compuesto de fórmula (XI):



donde: Et es un grupo etilo y
X y R^1 están descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

24. Procedimiento de obtención del dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que comprende las siguientes etapas:
- a. adición de una azida con fórmula (VIII), (IX), (X) o siguientes generaciones con una alquilamina en un medio líquido.



donde: Nu representa un núcleo polifuncional según se describe en las reivindicaciones 1 ó 2; Z es un grupo $-(CH)_x-N_3$ y x es un valor de entre 1 a 4, preferiblemente x es 1; e y tiene un valor de entre 2 y 6;

b. adición de un inhibidor de reacción a la disolución de la etapa (a),

c. extracción en un disolvente orgánico del dendrímero obtenido (b), y

d. concentración del producto obtenido en (c).

25. Procedimiento según la reivindicación 24, que además comprende la adición de un agente cuaternizante al producto obtenido en (d).
26. Procedimiento según la reivindicación 25, donde los agentes cuaternizantes se seleccionan de entre halogenuros de alquilo C_1 a C_{24} , HCl, sulfatos de dialquilo (C_1-C_5), o cualquiera de sus combinaciones.
27. Procedimiento según la reivindicación 25, donde los agentes cuaternizantes se seleccionan de entre cloruro de metilo, bromuro de metilo, yoduro de metilo, cloruro de etilo, bromuro de etilo, cloruro de propilo, cloruro de hexilo,

cloruro de dodecilo, cloruro de laurilo y halogenuros de bencilo, cloruro de bencilo, bromuro de bencilo o cualquiera de sus combinaciones.

- 5 28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde la alquilamina de la etapa (a) son propargilaminas.
29. Procedimiento según la reivindicación 28, donde la propargilamina se selecciona de entre propargildimetilamina o propargildiamina.
- 10 30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, donde el medio líquido de la etapa (a) se selecciona entre tetrahidrofurano, tolueno o N,N-Dimetilformamida.
31. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, donde el inhibidor de la etapa (b) se selecciona entre hidróxido amónico o ácido etilendiaminotetraacético.
- 15 32. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 31, donde la extracción de la etapa (c) se realiza con acetato de etilo, diclorometano o éter etílico.
- 20 33. Uso del dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para la elaboración de un medicamento.
34. Uso del dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por virus, bacterias u hongos.
- 25 35. Uso del dendrímero según la reivindicación anterior, donde la enfermedad es causada por el VIH.
36. Composición farmacéutica que comprende al menos un dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 37. Composición según la reivindicación 36, que además comprende otro principio activo, preferiblemente un antibiótico.
38. Uso del dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, como vector no viral.
- 35 39. Uso según la reivindicación 38, donde el vector no viral es empleado para la transfección o internalización de material nucleico en procesos de terapia génica.
- 40 40. Uso según la reivindicación 39, donde el material nucleico se selecciona entre oligonucleótidos, ARNip o ADN.
41. Vector no viral que comprende al menos un dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
42. Vector según la reivindicación 41, que además comprende material nucleico,
43. Vector según la reivindicación 42, donde el material nucleico se selecciona entre oligonucleótidos, ARNip o ADN.
- 45 44. Uso del vector no viral según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, para la elaboración de un medicamento.
45. Uso del vector no viral según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer en terapia génica.
- 50 46. Uso del dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, como vehículo de transporte de moléculas.
47. Uso según la reivindicación 46, donde la molécula es aniónica.
- 55 48. Uso según la reivindicación 47, donde la molécula es un fármaco, preferiblemente un antibiótico.
49. Uso del dendrímero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, como agente biocida.

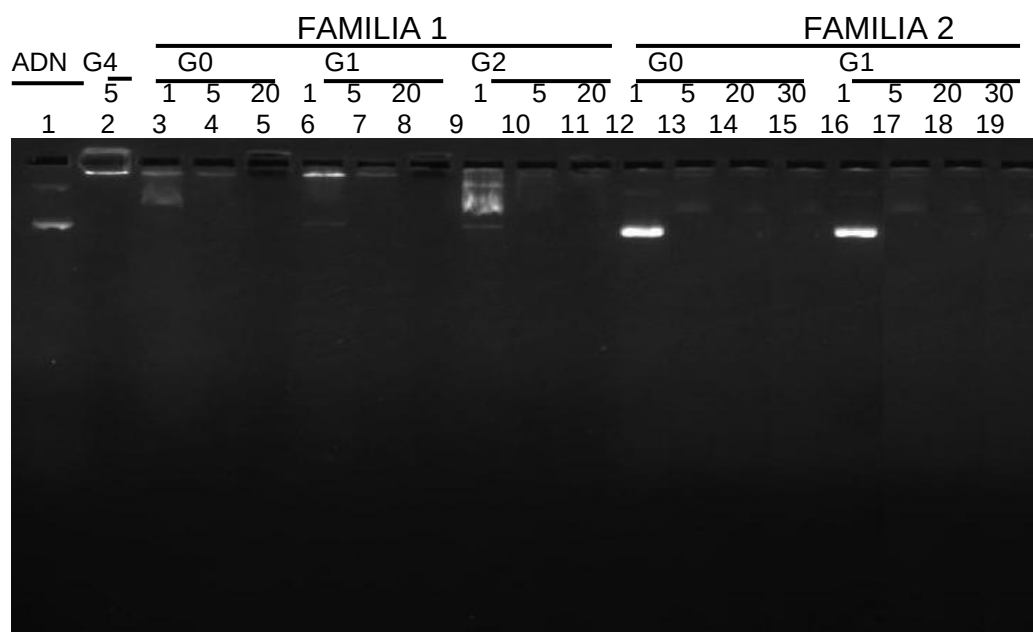


FIG. 1

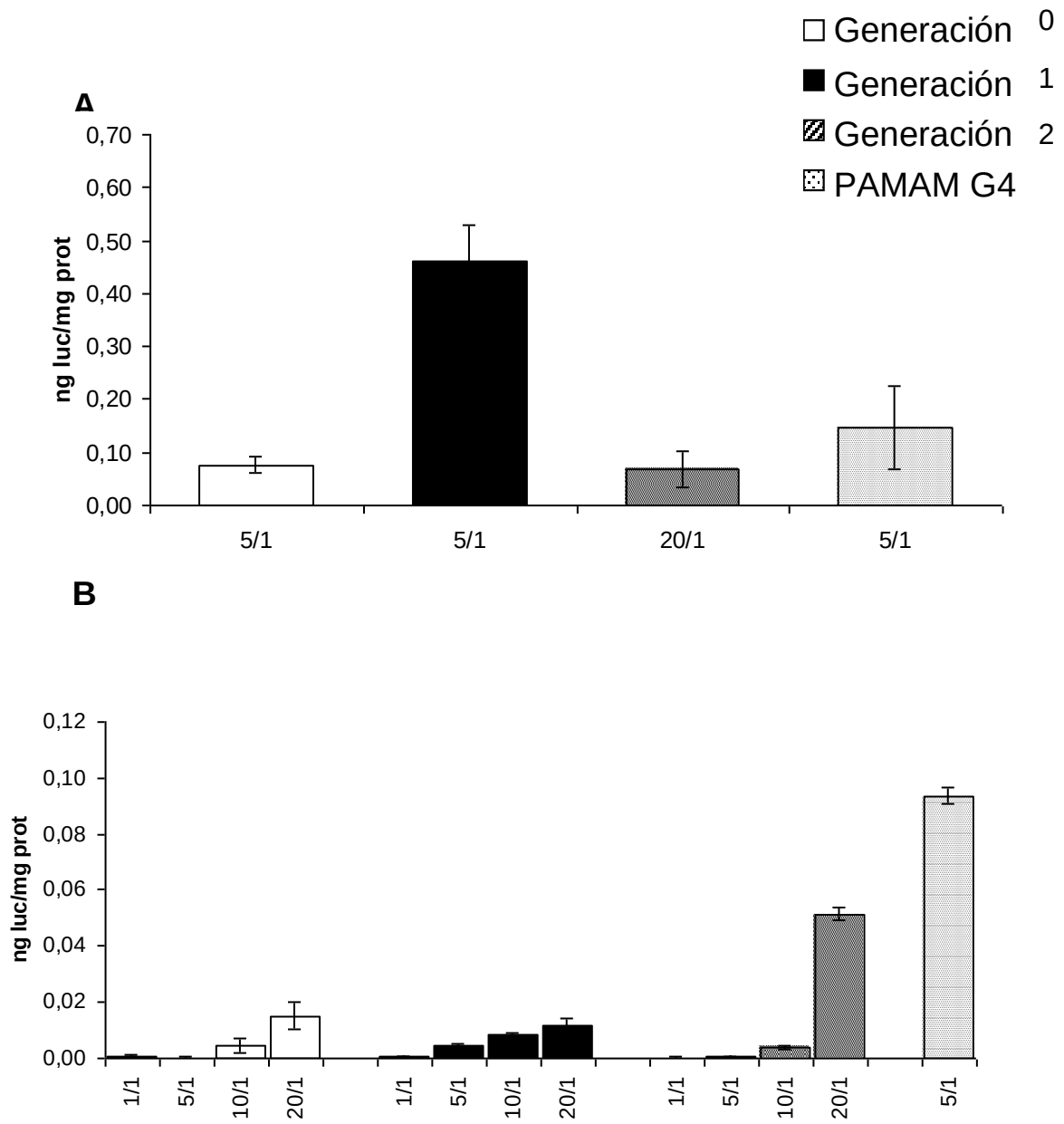


FIG. 2

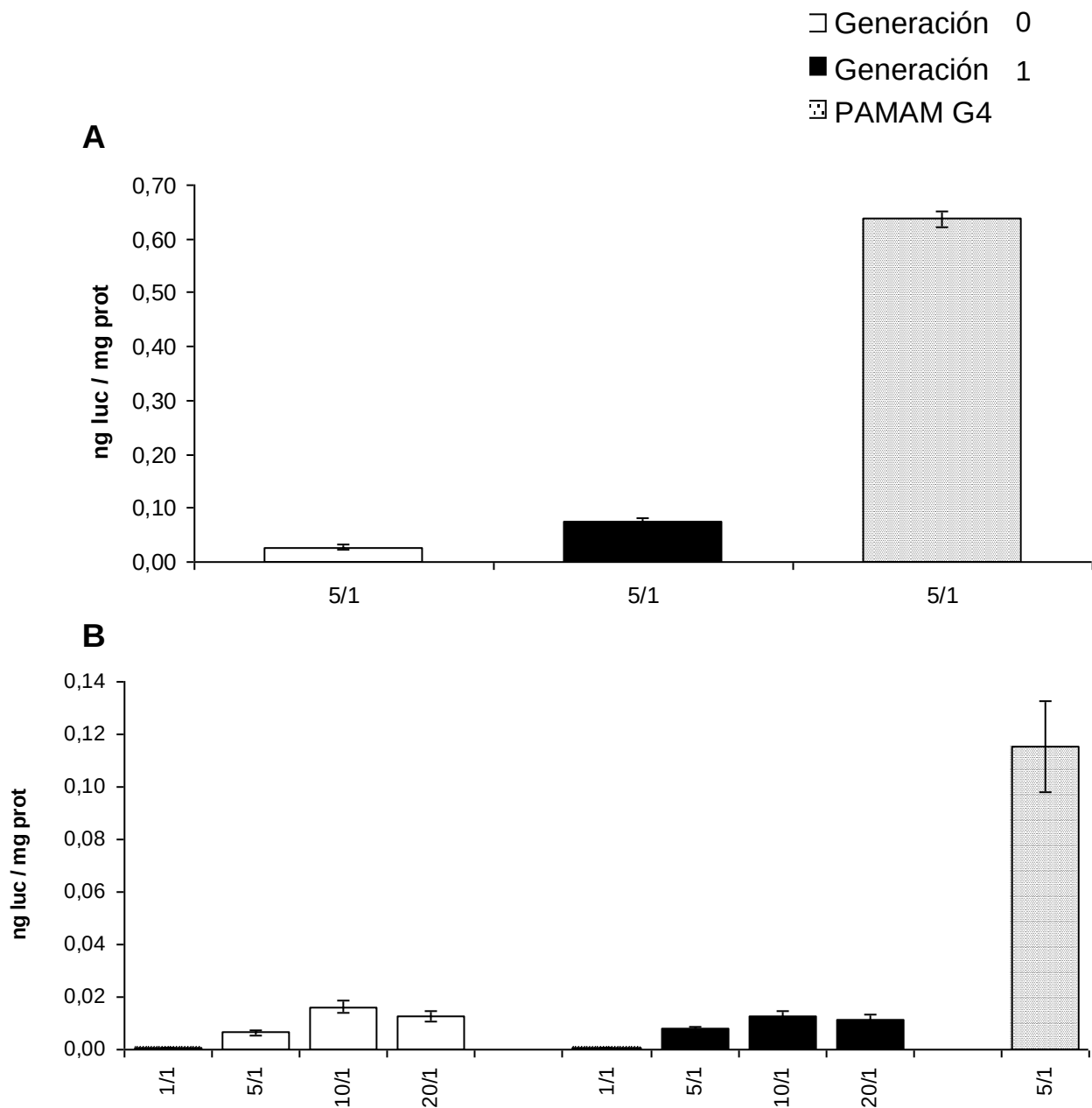


FIG. 3

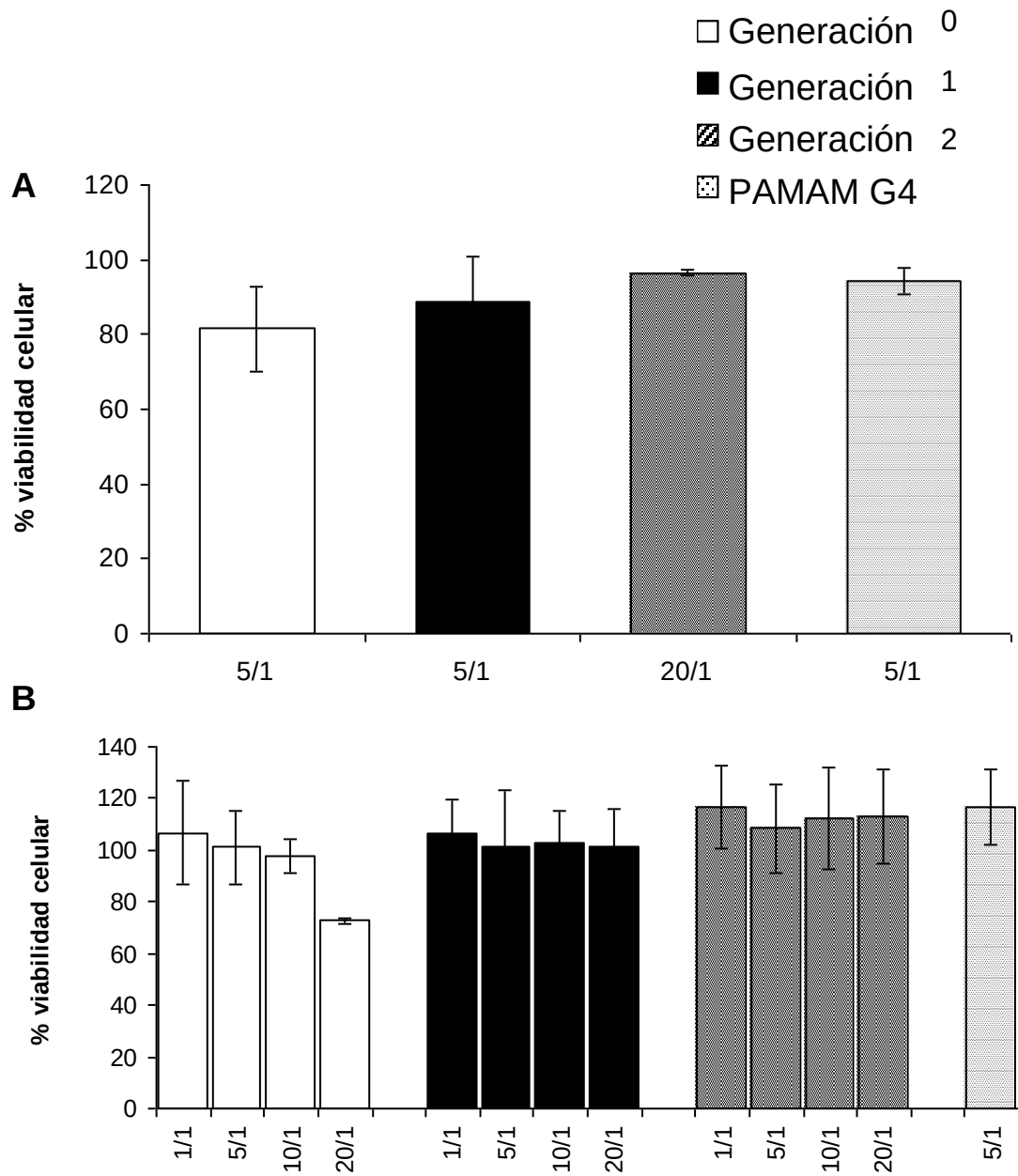


FIG. 4

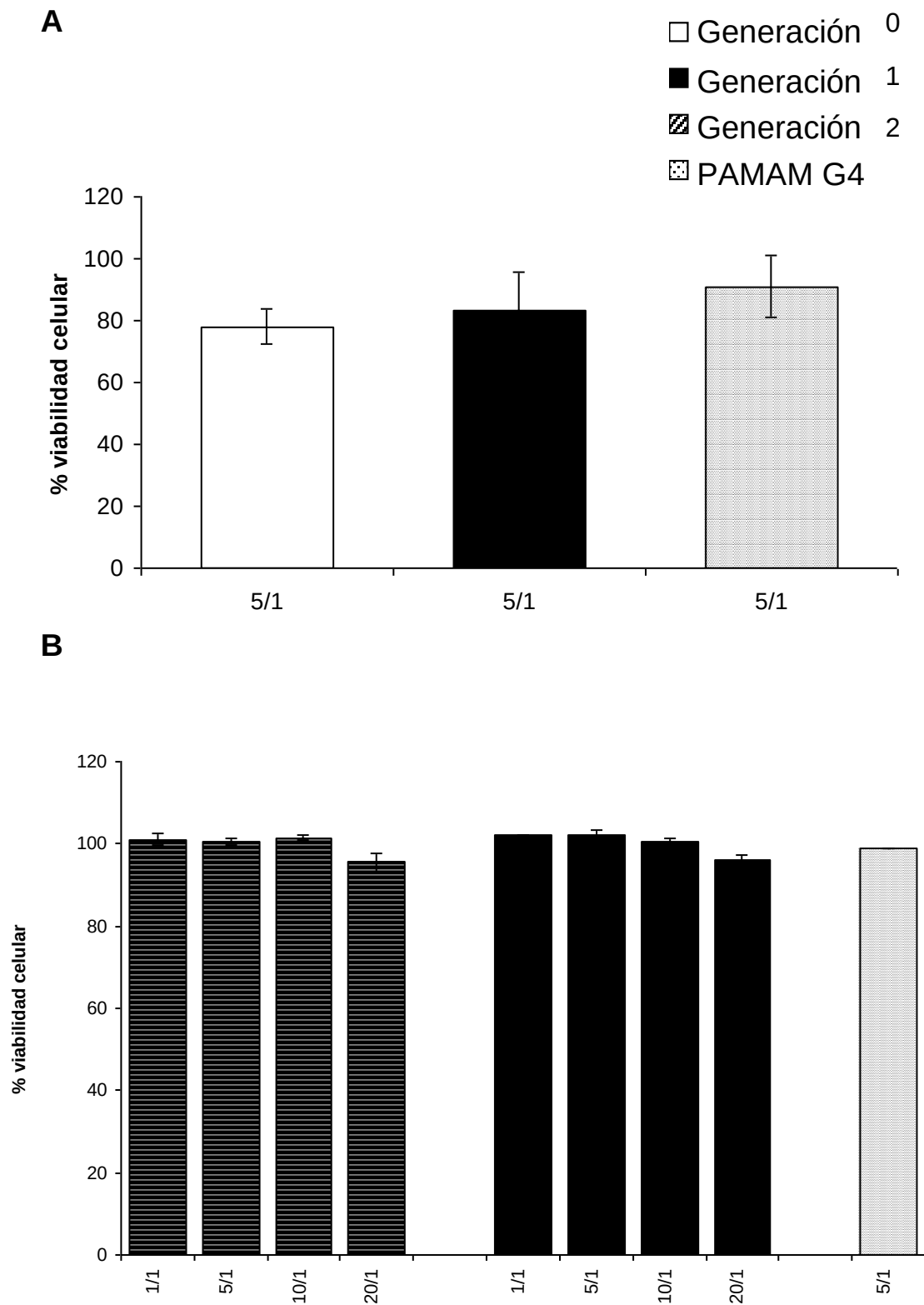
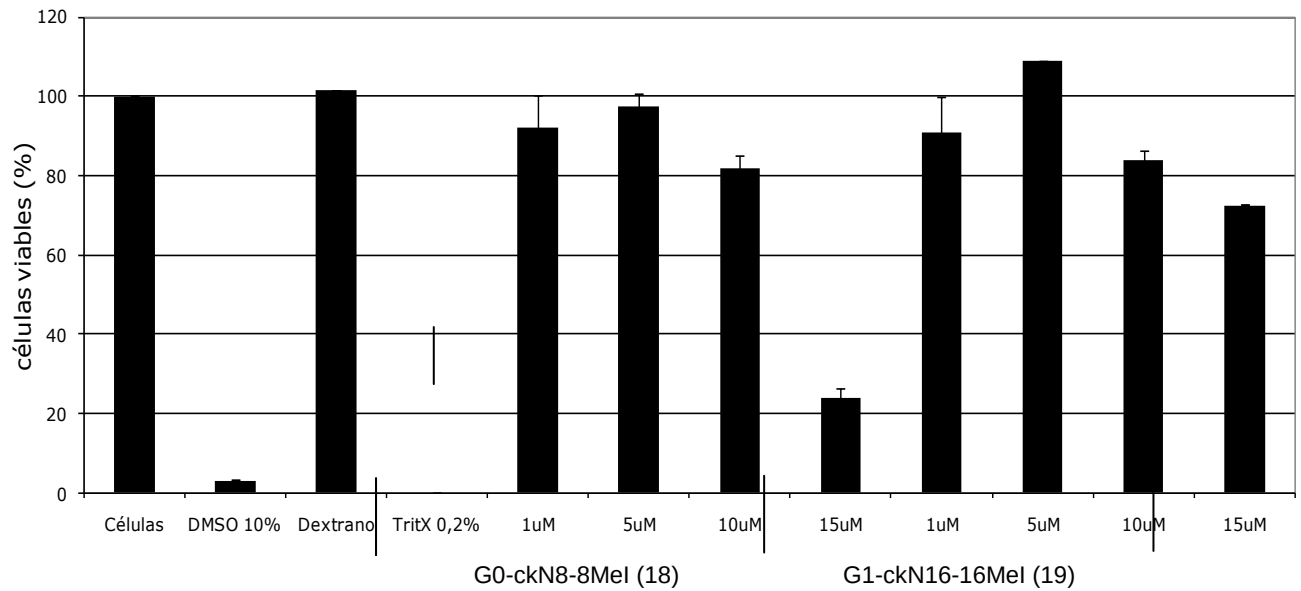
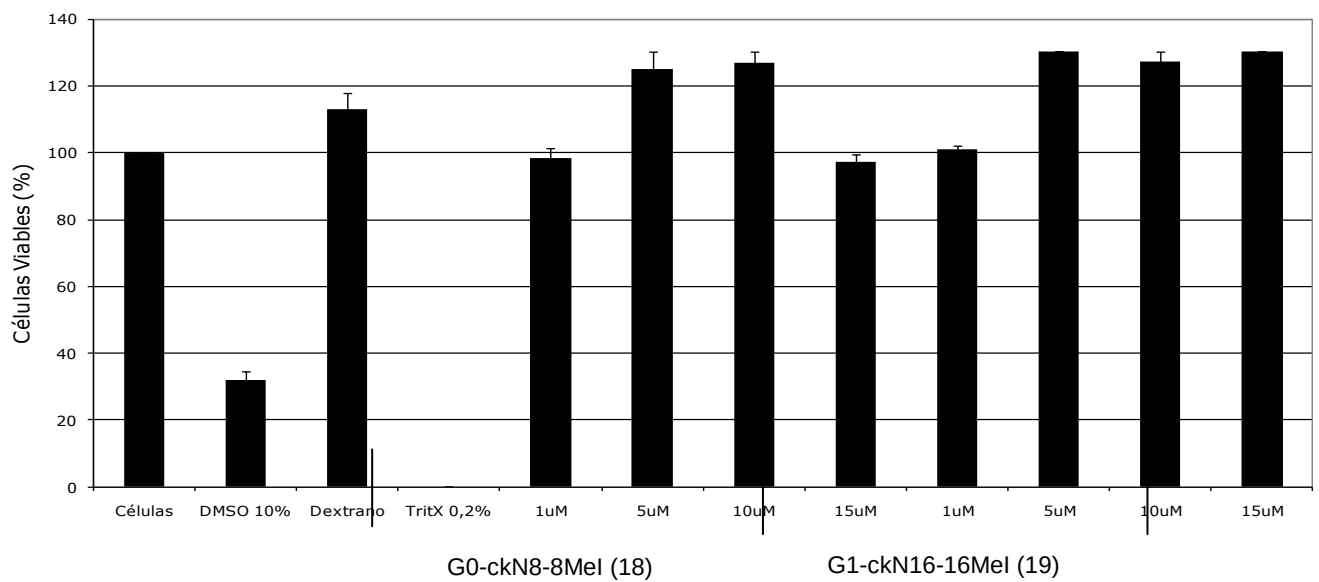


FIG. 5

A) MTT- SupT1



B) MTT - Jurkat



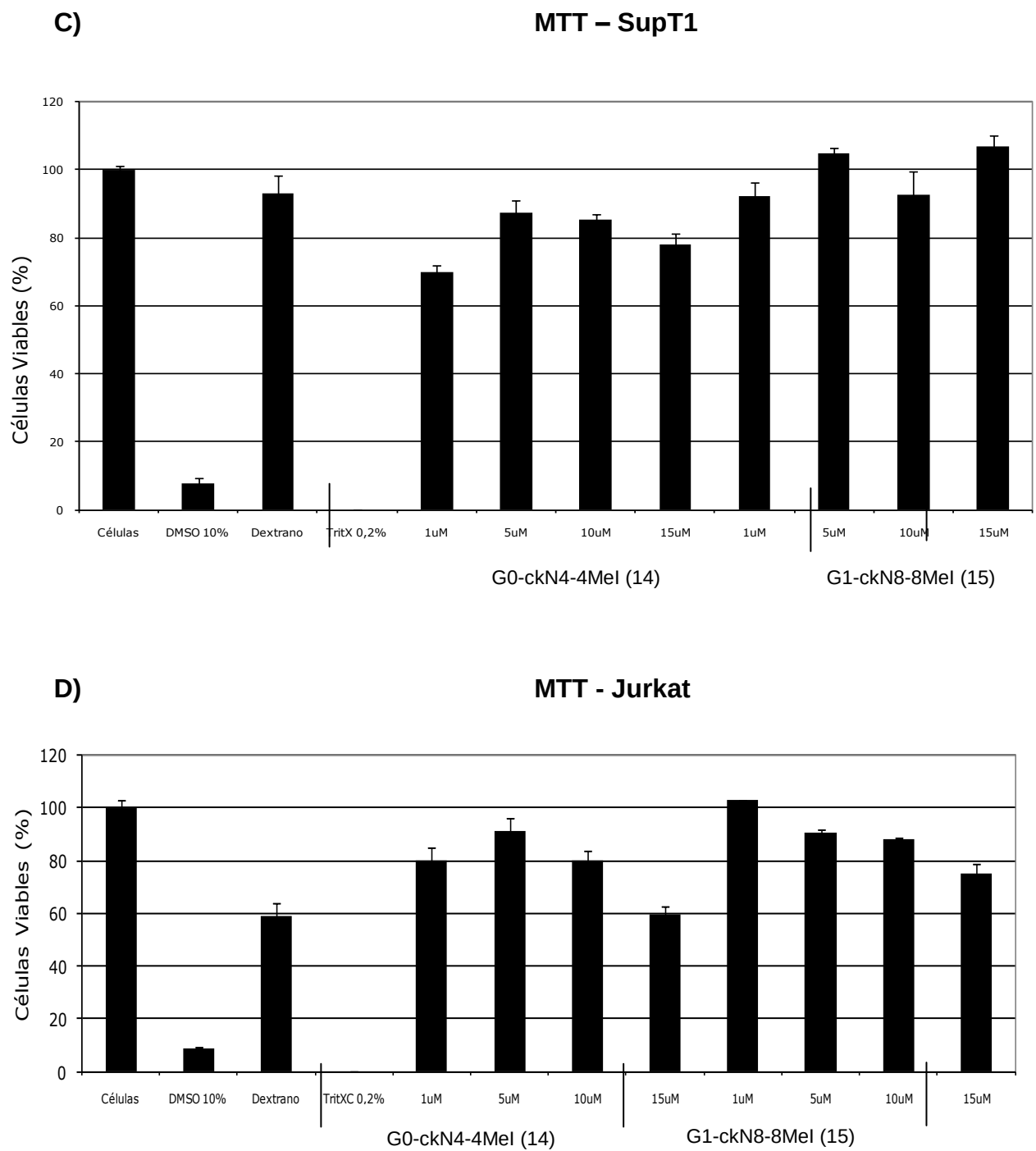


FIG. 6

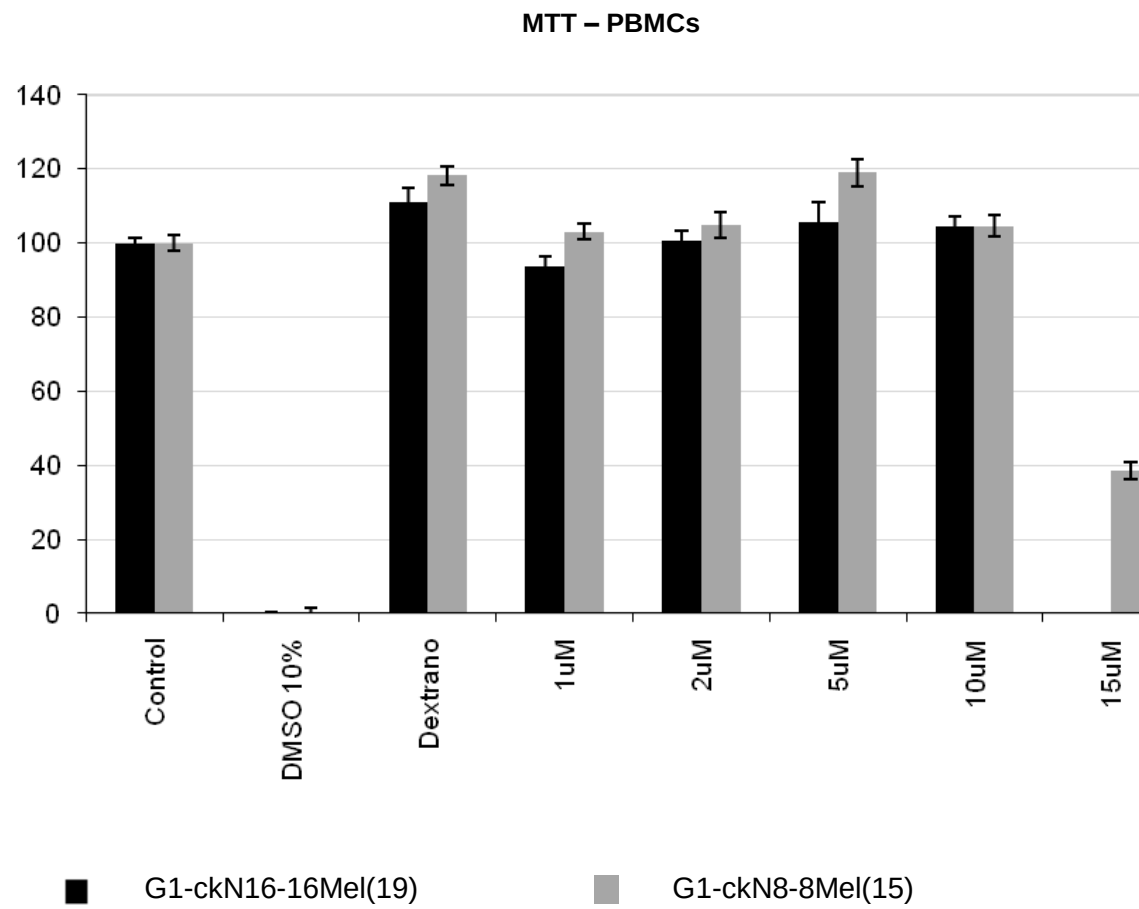
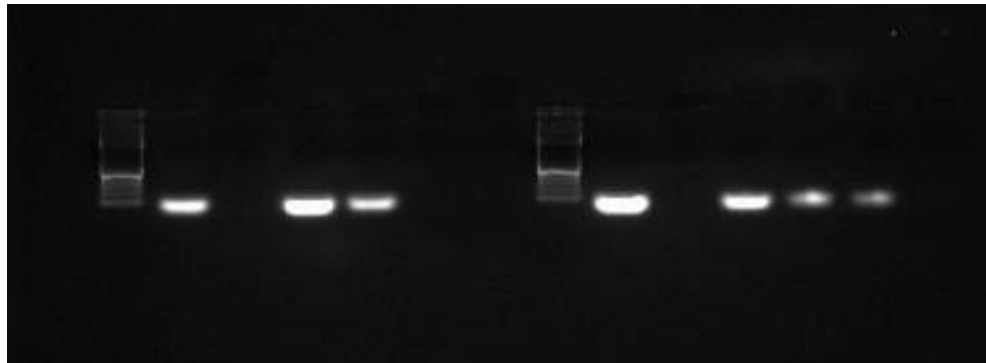


FIG. 7

A)

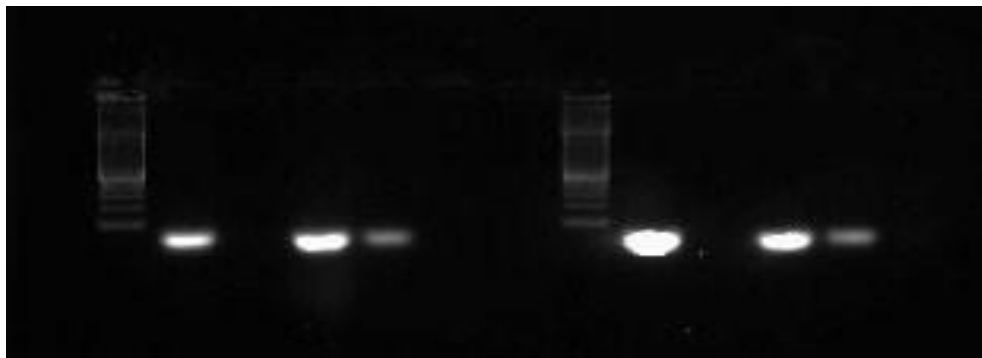


siNEF (400nM)
G1-ckN8-8MeI
(15)
G1-ckN16-16MeI
(19)

+		1	1	1	1
-		1	2	4	8
-		-	-	-	-

+		1	1	1	1
-		-	-	-	-
-		1	2	4	8

B)



siNEF (400nM)
G1-ckN8-8MeI
(15)
G1-ckN16-16MeI
(19)

+		1	1	1	1
-		1	2	4	8
-		-	-	-	-

+		1	1	1	1
-		-	-	-	-
-		1	2	4	8

FIG. 8

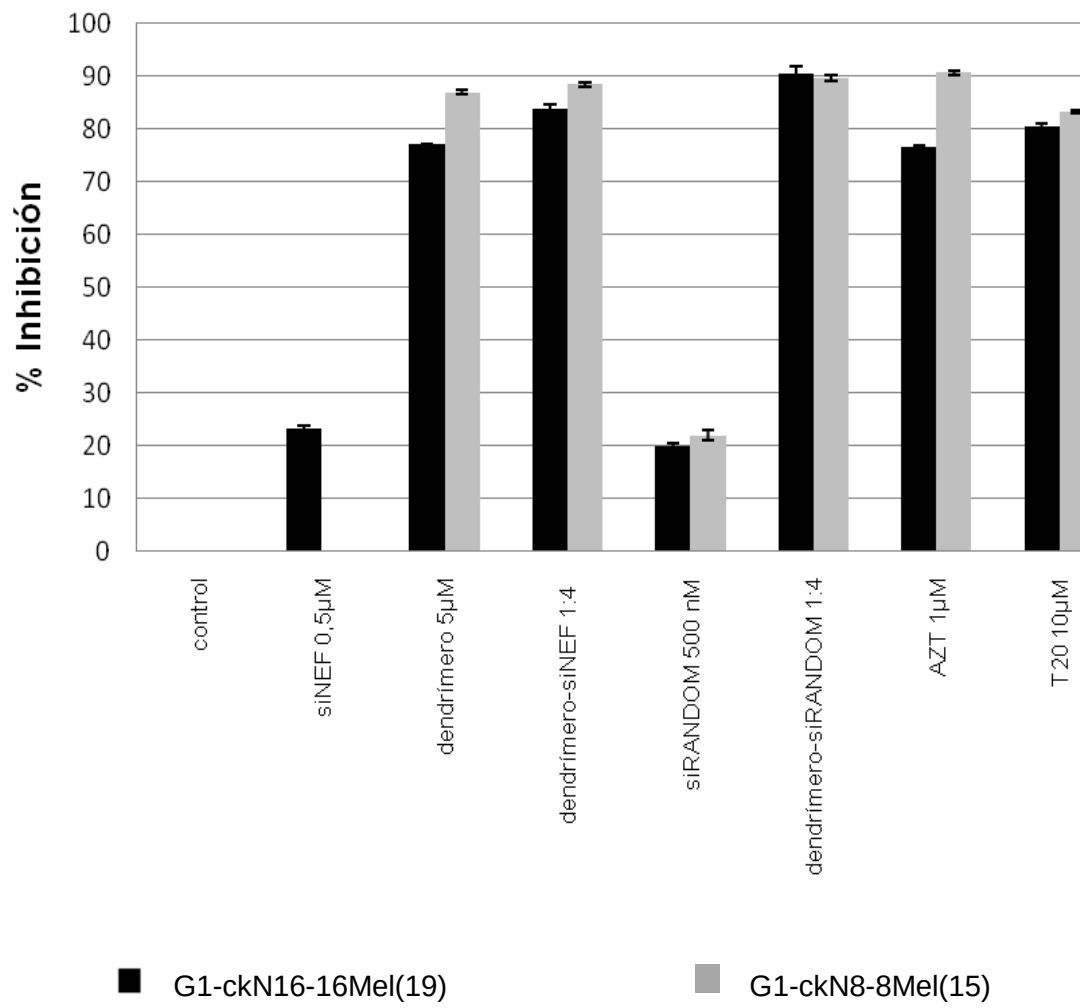


FIG. 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130804

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.05.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2265291 B1 (UNIVERSIDAD DE ALCALA) 01-02-2007, todo el documento	1-49
A	B RASINES et al, Dalton Transactions 2009, págs. 8704-8713. "Water-stable ammonium-terminated carbosilane dendrimers as efficient antibacterial agents", todo el documento	1-49
A	P ORTEGA et al, Organic & Biomolecular Chemistry 2008, vol 6, págs 3264-3269. "Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies"	1-49

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
26.03.2012

Examinador
M. P. Fernández Fernández

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G83/00 (2006.01)**C07D249/04** (2006.01)**A61K47/48** (2006.01)

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

C08G, C07D, A61K

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, CAS, REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-49	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-49	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2265291 B1 (UNIVERSIDAD DE ALCALA)	01.02.2007
D02	B RASINES et al, Dalton Transactions 2009, págs 8704-8713. "Water-stable ammonium-terminated carbosilane dendrimers as efficient antibacterial agents", todo el documento	08-2009

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 solicitud se refiere a un dendrímero carbosilano de primera, segunda o tercera generación (reivindicaciones 1-22) que comprende:

- un núcleo polifuncional de silicio

- una capa externa que consiste en unidades iguales o diferentes de grupos de fórmula (I) de la reivindicación 1;

el procedimiento de obtención que comprende las siguientes etapas (reivindicaciones 24-32): a) adición de una azida de fórmula (VIII), (IX) o (X), b) adición de un inhibidor de reacción, c) extracción y concentración del dendrímero obtenido.

También se reivindica el compuesto de fórmula (XI) (reivindicación 23), el uso de los dendrímeros para la preparación de un medicamento así como la composición farmacéutica que lo comprende (reivindicaciones 36 y 37) y el uso como vector no viral en procesos de terapia génica, como vehículo de transporte de moléculas y como agente biocida (reivindicaciones 33-35 y 38-49).

El documento D1 divulga dendrímeros carbosilano que llevan en los extremos de sus ramificaciones grupos amino primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios (ver en D1 figuras 1a,1b, 2a y 2b) y los procedimientos para su preparación así como su uso como vehículos de transporte de ácidos nucleicos y fármacos aniónicos y su actividad antibacteriana. Las fórmulas de estos dendrímeros son distintas a las de la solicitud, descritas en las páginas 25 a 29, pues éstos contienen en su estructura grupos triazol intermedios formados por reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre alquinos y azidas, por lo que los dendrímeros de las reivindicaciones 1-22 son nuevos.

El documento D2 divulga dendrímeros carbosilano con grupos amonio terminales (ver página 8707 de D2), sus fórmulas también son distintas de las de la solicitud por el mismo motivo.

Respecto al compuesto (XI) de la reivindicación 23 no se ha encontrado divulgado anteriormente, por lo que es nuevo.

Se concluye que los dendrímeros carbosilano de la solicitud son nuevos y, por tanto, el procedimiento para su preparación y sus aplicaciones, por lo que se considera que las reivindicaciones 1-49 de la solicitud son nuevas y tienen actividad inventiva, de acuerdo con los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.