

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 282**

21 Número de solicitud: 201800146

51 Int. Cl.:

C07F 7/08 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

A61K 31/695 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

15.06.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.12.2019

Fecha de concesión:

08.04.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.04.2020

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

MATA DE LA MATA, F. Javier;
GÓMEZ RAMÍREZ, Rafael;
ORTEGA LÓPEZ, Paula;
GARCIA GALLEGO, Sandra;
SANZ DEL OLMO, Natalia;
TRIGUERO RUBIO, Alicia y
MAROTO DÍAZ, Marta

54 Título: **Metalodendrimeros de naturaleza carbosilano conteniendo rutenio y cobre coordinados a ligandos base de Schiff, su preparación y sus usos**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a metalodendrimeros de naturaleza carbosilano que contienen complejos metálicos coordinados a ligandos bases de Schiff. Además, la invención describe el procedimiento para su obtención y sus usos como agentes antitumorales así como antibacterianos frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) para su uso en la industria farmacéutica.

ES 2 735 282 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN**METALODENDRÍMEROS DE NATURALEZA CARBOSILANO CONTENIENDO**
5 **RUTENIO Y COBRE COORDINADOS A LIGANDOS BASE DE SCHIFF, SU**
PREPARACIÓN Y SUS USOS

10 La presente invención se refiere a macromoléculas dendríticas que contienen un esqueleto de naturaleza carbosilano y que presentan en su estructura complejos metálicos coordinados a ligandos bases de Schiff. Los compuestos de la invención son potentes agentes antitumorales y antibacterianos, y son útiles para su aplicación en medicina.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las bases de Schiff son grupos funcionales de fórmula general $R_2C=NR'$ (donde $R' \neq H$) que han sido utilizadas en una gran variedad de aplicaciones como ligandos coordinantes de iones metálicos, gracias a la posibilidad de modular con facilidad su diseño.¹ En este sentido, los grupos imina pueden participar en la formación de
20 complejos de tipo quelato gracias a la presencia de un átomo de nitrógeno, o un grupo funcional, como puede ser -OH o -SH, cerca del grupo -C=N.

A nivel terapéutico, las bases de Schiff y los complejos metálicos derivados de ellas han demostrado una gran variedad de actividades biológicas incluyendo antibacteriano,
25 antifúngico, antiviral, antimalárico, antiinflamatorio, antioxidante, pesticida, citotóxico, inhibidor de enzima y anticancerígeno.¹ Uno de los ejemplos más representativos es el compuesto mononuclear $[Cu(Pyimp)(Cl)_2]$, también conocido como Cu-P1, metalocomplejo capaz de inhibir el crecimiento del cáncer de mama en ratas.²

30 La estrategia terapéutica de utilizar complejos polinucleares frente a enfermedades como el cáncer o las infecciones bacterianas permite potenciar su actividad mediante la unión a diferentes dianas biomoleculares a través de más de un núcleo metálico. Sin embargo, en algunos casos la tasa de respuesta al tratamiento es muy baja, tanto en sistemas metálicos mononucleares como polinucleares, debido a i) su limitada

solubilidad, ii) la aparición de resistencias intrínsecas o adquiridas al tratamiento o iii) una distribución no específica que afecta tanto a células cancerígenas como normales. El uso de la nanotecnología propone nuevas soluciones para estos obstáculos a través de plataformas de tamaño nanoscópico que facilitan el transporte de fármacos y proporcionan propiedades adicionales como un aumento de la solubilidad, selectividad, multivalencia o liberación controlada.³ Estos nanosistemas incluyen micelas, nanopartículas metálicas, liposomas, nanotubos de carbono y sistemas dendríticos, entre otros. En particular, los dendrímeros son estructuras altamente ramificadas de tipo polimérico con estructura monodispersa y globular, cuya síntesis controlada permite establecer una relación estructura-reactividad única entre los sistemas nanoscópicos.⁴ La funcionalización de sistemas dendríticos con ligandos de tipo imina en la superficie se considera una estrategia útil y versátil para el anclaje de iones metálicos. Diversos metalodendrimeros con ligandos base de Schiff han sido descritos, con resultados prometedores. Entre ellas, destacan los sistemas con esqueleto de tipo polipropilenimina (DAB),⁵ poliamidoamina (PAMAM)⁶ y fosforohidrazona.⁷

En el campo de la biomedicina, los sistemas dendríticos de tipo carbosilano han demostrado ser muy versátiles con prometedoras aplicaciones como agentes de transporte de material nucleico y/o fármacos, como agentes antibacterianos, anticancerígenos o antivirales entre otras.^{8, 9, 10, 11, 12} Asimismo, metalodendrimeros derivados de ellos han mostrado novedosas aplicaciones terapéuticas.^{13, 14, 15}

Los metalodendrimeros de naturaleza carbosilano con grupos imina en su estructura de la presente invención suponen una alternativa interesante para el uso en la industria farmacéutica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

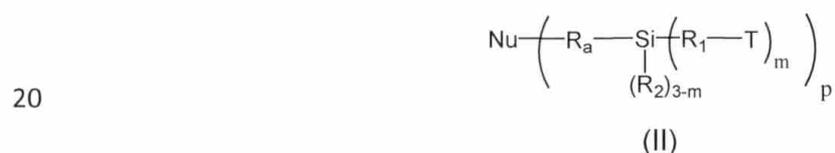
La presente invención recoge dendrímeros de estructura carbosilano, cuyo esqueleto se compone de enlaces silicio-carbono y carbono-carbono, funcionalizados en sus grupos terminales con ligandos base de Schiff que coordinan complejos metálicos. Base de Schiff (o azometino) se define como un grupo funcional que contiene un enlace doble carbono-nitrógeno, donde el átomo de nitrógeno está unido a un grupo arilo o alquilo que estabiliza la imina. Dendrimer se define como una macromolécula de tipo polimérico con naturaleza monodispersa, altamente ramificada y topología esférica. La familia de polimeros dendríticos aumenta de forma notable las propiedades

ó C-OH; y Z es CH ó N. El ligando terminal ha de coordinar complejos metálicos, donde preferiblemente M es rutenio (II) ó cobre (II). La esfera de coordinación del ión metálico puede contener ligandos adicionales X, iguales o diferentes, siendo x un número entero que varía entre 1 y 4.
 5 Preferiblemente, X es Cl, ONO₂, H₂O, η⁵-C₅H₅, 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano (PTA), CH₃CN.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que presentan de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-
 10 propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo o sec-butilo, preferiblemente cadenas de 1 a 3 átomos de carbono.

En una realización preferida, el metalodendrímico de la invención puede ser de primera, segunda o tercera generación. El término "generación" (G_n) se refiere al número de
 15 etapas iterativas que son necesarias para la preparación del dendrímico, siendo n un número entero, preferentemente 1-3.

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

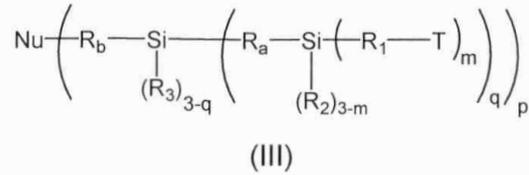


dónde: Nu representa un núcleo polifuncional como se define anteriormente; R_a, R₁ y R₂, son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆); m es un
 25 número entero que varía entre 1 y 3, preferiblemente m es 2; p es un número entero que varía entre 2 y 6, preferiblemente p es 4 cuando el núcleo es de silicio; y T queda definido en la fórmula I. Si el núcleo es de silicio el dendrímico de fórmula (II) puede ser de fórmula (IIa):



dónde: R₁, R₂, R_a, m y T, están definidos anteriormente.

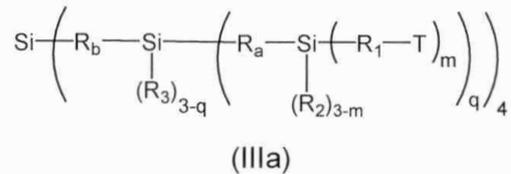
En otra realización preferida, el dendrímero es al menos de segunda generación y se puede representar con la siguiente fórmula (III):



5

dónde: Nu representa un núcleo polifuncional como se define anteriormente; R_a, R_b, R₁, R₂ y R₃, son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆); m y q son iguales o diferentes y son un número entero que varía entre de 1 y 3; preferiblemente m y/o q es 2; T es el grupo terminal base de Schiff definido anteriormente el cual queda definido en la fórmula I. Si el núcleo es de silicio el dendrímero de fórmula (III) puede ser de fórmula (IIIa):

10

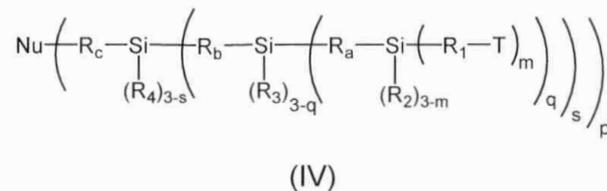


15

dónde: R_a, R_b, R₁, R₂ y R₃, m, q y T, están definidos anteriormente.

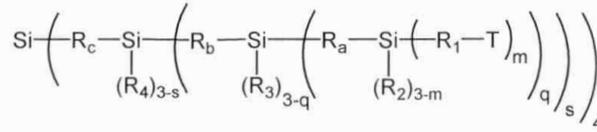
En otra realización preferida, el dendrímero es al menos de tercera generación y se puede representar con la siguiente fórmula (IV):

20



25

dónde: Nu representa un núcleo polifuncional como se define anteriormente; R_a, R_b, R_c, R₁, R₂, R₃ y R₄ son iguales o diferentes, y representan un grupo alquilo (C₁-C₆); m, q, s y p son iguales o diferentes y es un número entero que varía entre 1 y 3; preferiblemente m, q, s y/o p es 2; y T queda definido en la fórmula I. Si el núcleo es de silicio el dendrímero de fórmula (IV) puede ser de fórmula (IVa):



(IVa)

dónde: R_a, R_b, R_c, R₁, R₂, R₃, R₄, m, q, s, p y T, están definidos anteriormente.

5

En estos dendrímeros de fórmula (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) ó (IVa), los radicales R₁, R_a, R_b o R_c pueden ser iguales o diferentes, y preferiblemente representan una cadena alquílica (C₂-C₄), más preferiblemente son una cadena de tipo propilo. En otra realización preferida, los radicales R₂, R₃ o R₄ son independientes unos de otros, y representan un grupo alquilo (C₁-C₄), más preferiblemente son un grupo metilo.

10

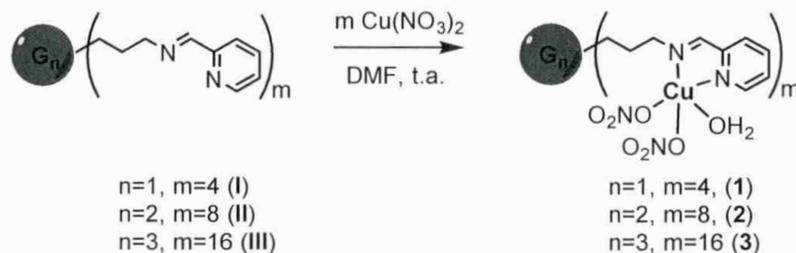
Síntesis de metalodendrímeros esféricos con grupos iminopiridina terminales.

La síntesis de metalodendrímeros esféricos se realiza a partir de los precursores iminopiridina G₁-[NCPH(o-N)]₄ (I), G₂-[NCPH(o-N)]₈ (II) y G₃-[NCPH(o-N)]₁₆ (III) previamente descritos¹³ con una sal metálica de interés mediante reacciones de coordinación. En función del precursor metálico utilizado, reacciones posteriores de intercambio de ligando y de contracción podrían ser necesarias.

15

En una síntesis preferida del procedimiento de la invención, la reacción entre el precursor dendrítico y la sal metálica de Cu(II), preferiblemente Cu(NO₃)₂, se lleva a cabo en presencia de un disolvente orgánico, preferiblemente DMF, en un solo paso a temperatura ambiente (esquema 1).

20



25

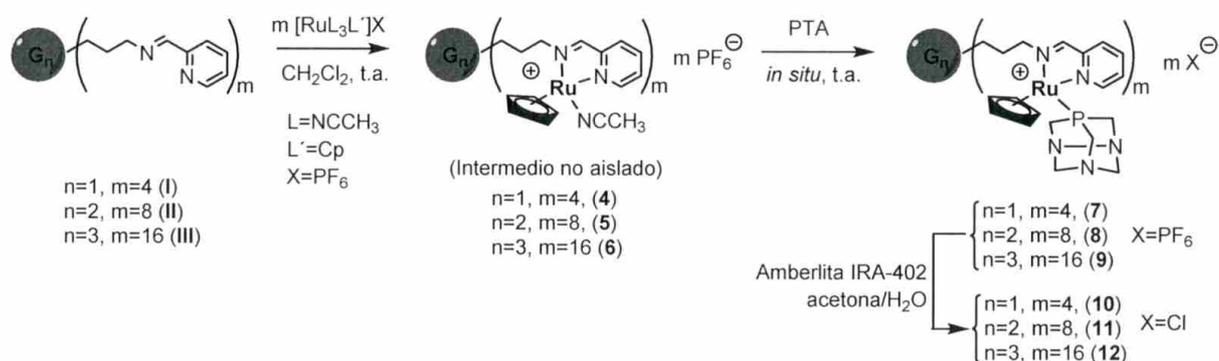
Esquema 1

En otra síntesis preferida del procedimiento de la invención, la reacción entre el precursor dendrítico y la sal metálica de Ru(II), preferiblemente [(η⁵-

$C_5H_5)Ru(CH_3CN)_3]PF_6$, se lleva a cabo en presencia de un disolvente orgánico, preferiblemente diclorometano seco, en tres pasos (esquema 2).

- 5 1. Reacción de coordinación de la sal metálica al precursor dendrítico en un disolvente orgánico, preferentemente diclorometano seco, durante 30 minutos.
2. Reacción de intercambio de ligando, preferentemente PTA, en un disolvente orgánico como diclorometano seco, a temperatura ambiente y durante 12 h.
3. Reacción de intercambio de contraión, preferentemente cloruro, mediante una resina de intercambio iónico.

10



Esquema 2

15

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de estructuras de metalodendrimeros carbosilano de cobre con ligandos nitrato.

20 **Figura 2.** Ejemplos de estructuras de metalodendrimeros carbosilano de rutenio con ligandos $\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$ y PTA.

EJEMPLOS

25 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo ilustrativo, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Síntesis de $G_1\text{-[NCPH}(o\text{-N})\text{Cu}(\text{ONO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]_4 (1)$

El precursor dendrítico $G_1\text{-[NCPH}(o\text{-N})]_4 \text{ I}$ (69.2 mg, 0.068 mmol) disuelto en DMF se añade lentamente sobre una disolución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (65.7 mg, 0.27 mmol) en

DMF. La reacción progresa con agitación a temperatura ambiente durante 24 h. El compuesto **1** se aísla por evaporación del disolvente a vacío como un sólido verde (102.5 mg, 82%). $C_{56}H_{100}Cu_4N_{16}O_{28}Si_5$ (1840.1 g/mol). A.E.(%): calc. C, 36.55; H, 5.48; N, 12.18. exp. C, 36.15; H, 5.17; N, 12.34. $IR_{\nu}(C=N)$: 1646.39 cm^{-1} .

5

Síntesis de G_2 -[NCPH(o-N)Cu(ONO₂)₂·H₂O]₈ (**2**)

El metalodendrímico de segunda generación se prepara siguiendo el mismo procedimiento que para el análogo de primera generación, utilizando los siguientes reactivos: G_2 -[NCPH(o-N)]₈ **II** (54.1 mg, 0.023 mmol) y Cu(NO₃)₂·3H₂O (44.5 mg, 0.18 mmol). El compuesto **2** se aísla por evaporación del disolvente a vacío como un sólido verde (64.7 mg, 70%). $C_{128}H_{236}Cu_8N_{32}O_{56}Si_{13}$ (3992.9 g/mol). A.E.(%): calc. C, 38.50; H, 5.96; N, 11.23. exp. C, 38.91; H, 5.95; N, 11.97. $IR_{\nu}(C=N)$: 1646.42 cm^{-1} .

10

Síntesis de G_1 -{[NCPH(o-N)Ru(η^5 -C₅H₅)(CH₃CN)]PF₆}₄ (**4**)

Utilizando condiciones de atmósfera inerte, el precursor dendrítico G_1 -[NCPH(o-N)]₄ **I** (78.4 mg, 0.077 mmol) se añade a 0°C sobre una disolución de la sal de rutenio [(η^5 -C₅H₅)Ru(CH₃CN)₃]PF₆ (133.6 mg, 0.31 mmol) en CH₂Cl₂ seco. La reacción progresa a 0°C durante 5 min, y posteriormente se deja 30 min hasta alcanzar temperatura ambiente, con agitación continua. El compuesto **4** se obtiene como un sólido rojizo que no fue aislado. $C_{84}H_{124}F_{24}N_{12}P_4Ru_4Si_5$ (2426.5 g/mol). ¹H-RMN (CD₃CN): δ -0.01 (s, 24H, -(CH₃)₂Si^{G1}); 0.57 (m, 24H, -SiCH₂-); 1.36 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂Si); 1.70 (m, 8H, (-SiCH₂CH₂CH₂N); 4.16 (m, 4H, -SiCH₂CH₂CH₂N); 4.42 (m, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂N y -C₅H₅); 7.44 (m, 4H, CH^{Py(p)}); 7.88 (m, 8H, CH^{Py(o&m)}); 8.53 (s, 4H, N=CH); 9.33 (m, 4H, CH^{Py(m)}).

20

25

Síntesis de G_2 -{[NCPH(o-N)Ru(η^5 -C₅H₅)(CH₃CN)]PF₆}₈ (**5**)

El metalodendrímico de segunda generación se prepara siguiendo el mismo procedimiento que para el análogo de primera generación, utilizando los siguientes reactivos: G_2 -[NCPH(o-N)]₈ **II** (81.3 mg, 0.034 mmol) y [(η^5 -C₅H₅)Ru(CH₃CN)₃]PF₆ (119.6 mg, 0.27 mmol). El compuesto **5** se obtiene como un sólido rojizo que no fue aislado. $C_{184}H_{282}F_{48}N_{24}P_8Ru_8Si_{13}$ (5163.7 g/mol). ¹H-RMN (CD₃CN): δ -0.07 (s, 12H, -CH₃Si^{G1}); -0.01 (s, 48H, -(CH₃)₂Si^{G2}); 0.56 (m, 64H, -SiCH₂-); 1.35 (m, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-); 1.81 (m, 16H, (-SiCH₂CH₂CH₂N); 4.17 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N); 4.39 (m, 48H, -SiCH₂CH₂CH₂N y -C₅H₅); 7.44 (m, 8H, CH^{Py(p)}); 7.88 (m, 16H, CH^{Py(o&m)}); 8.53 (s, 8H, N=CH); 9.33 (m, 8H, CH^{Py(m)}).

30

35

Síntesis de G₁-{[NCPPh(o-N)Ru(η⁵-C₅H₅)(PTA)]PF₆}₄ (7)

Sobre la mezcla de la reacción preparada para obtener el compuesto **4** (0.077 mmol), se añade el ligando 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano PTA (48.4 mg, 0.308 mmol). La reacción se agita durante 12 h y la disolución se lava con agua. Tras la evaporación del disolvente, se obtiene el compuesto **7** como un sólido rojizo (122.4 mg, 55%).

C₁₀₀H₁₆₀F₂₄N₂₀P₈Ru₄Si₅ (2890.9 g/mol). ¹H-RMN ((CD₃)₂CO): δ 0.05 (s, 24H, -(CH₃)₂Si^{G1}); 0.68 (m, 24H, -SiCH₂-); 1.45 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂Si); 2.07 (m, 8H, (-SiCH₂CH₂CH₂N); 3.82 (s, 24H, -NCH₂N^{PTA}); 4.35 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N y -NCH₂P^{PTA}); 4.90 (s, 20H, -C₅H₅); 7.44 (m, 4H, CH^{Py(p)}); 8.01 (m, 4H, CH^{Py(m)}); 8.16 (m, 4H, CH^{Py(o)}); 8.76 (s, 4H, -N=CH); 9.30 (m, 4H, CH^{Py(m)}). ¹³C{¹H}-RMN ((CD₃)₂CO): δ -2.9 (-(CH₃)₂Si^{G1}); 13.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N); 18.5-20.9 (-SiCH₂CH₂CH₂Si); 27.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N); 53.0 (-NCH₂N^{PTA}); 72.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N); 73.5 (-NCH₂P^{PTA}); 77.2 (C^{CP}); 125.7-156.9 (-C₅H₅); 162.6 (-N=CH). ³¹P-RMN ((CD₃)₂CO): δ -38.3 (s, -CH₂P^{PTA}); -144.1 (sp, PF₆). ESI: [M+4]⁺=577,68 uma.

15

Síntesis de G₂-{[NCPPh(o-N)Ru(η⁵-C₅H₅)(PTA)]PF₆}₈ (8)

El metalodendrímico de segunda generación se prepara siguiendo el mismo procedimiento que para el análogo de primera generación, utilizando los siguientes reactivos: mezcla de reacción del compuesto **5** (0.034 mmol) y PTA (43.2 mg, 0.275 mmol). El compuesto **8** se aísla como un sólido rojizo (107.7 mg, 52%).

C₂₁₆H₃₅₄F₄₈N₄₀P₁₆Ru₈Si₁₃ (6092.6 g/mol). ¹H-RMN ((CD₃)₂CO): δ -0.07 (s, 12H, -(CH₃)Si^{G1}); -0.01 (s, 48H, -(CH₃)₂Si^{G2}); 0.56 (m, 64H, -SiCH₂-); 1.35 (m, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂Si); 1.81 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N); 3.80 (m, 48H, -NCH₂N^{PTA}); 4.39 (m, 64H, -SiCH₂CH₂CH₂N y -NCH₂P^{PTA}); 4.89 (s, 40H, -C₅H₅); 7.44 (m, 8H, Ar); 7.88 (m, 16H, Ar); 8.17 (m, 8H, Ar); 8.53 (s, 8H, -N=CH); 9.33 (m, 8H, Ar). ¹³C{¹H}-RMN ((CD₃)₂CO): δ -4.2 (-(CH₃)₂Si^{G2}); -2.5 (-(CH₃)Si^{G1}); 13.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N); 18.6-20.9 (-SiCH₂CH₂CH₂Si); 27.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N); 52.7 (-NCH₂N^{PTA}); 72.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N); 73.5 (-NCH₂P^{PTA}); 77.3 (C^{CP}); 125.7-156.9 (C^{Ar}); 162.6 (-N=CH). ³¹P-RMN ((CD₃)₂CO): δ -38.1 (s, -CH₂P^{PTA}); -144.4 (sp, PF₆).

30

Síntesis de G₁-{[NCPPh(o-N)Ru(η⁵-C₅H₅)(PTA)]Cl}₄ (10)

El metalodendrímico **7** (122.4 mg) se disuelve en una mezcla Acetona/H₂O y se realiza el cambio de contraión, añadiendo a la disolución la resina de intercambio iónico Amberlita IRA-402. El compuesto **10** se aísla como un sólido rojizo tras evaporar el disolvente (122.7 mg, 65%).

C₁₀₀H₁₆₀Cl₄N₂₀P₄Ru₄Si₅ (2452.9 g/mol). ¹H-RMN

35

$((\text{CD}_3)_2\text{CO})$: δ 0.10 (s, 24H, $-(\text{CH}_3)_2\text{Si}^{\text{G}1}$); 0.67 (m, 24H, $-\text{SiCH}_2-$); 1.46 (m, 8H, $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$); 1.96 (m, 8H, $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.77 (s, 24H, $-\text{NCH}_2\text{N}^{\text{PTA}}$); 4.42 (m, 32H, $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ y $-\text{NCH}_2\text{N}^{\text{PTA}}$); 4.87 (s, 20H, $-\text{C}_5\text{H}_5$); 7.46 (m, 4H, Ar); 7.98 (m, 4H, Ar); 8.12 (m, 4H, Ar); 8.66 (s, 4H, $-\text{N}=\text{CH}$); 9.22 (m, 4H, Ar). ^{31}P -RMN $((\text{CD}_3)_2\text{CO})$: δ -36.4 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^{\text{PTA}}$). A.E.(%). Calc.: C, 48.97; H, 6.57; N, 11.42. Exp.: C, 48.92; H, 6.99; N, 9.98. ESI: $[\text{M}+4]^+=577,68$ uma.

Síntesis de $\text{G}_2\text{-}\{[\text{NCP}(\text{o-N})\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PTA})]\text{Cl}\}_8$ (11)

El metalodendrímico de segunda generación se prepara siguiendo el mismo procedimiento que para el análogo de primera generación, utilizando los siguientes reactivos: compuesto **8** (107.7 mg) y Amberlita IRA-402. El compuesto **11** se aísla como un sólido rojizo tras evaporar el disolvente (106.4 mg, 60%). $\text{C}_{216}\text{H}_{354}\text{Cl}_8\text{N}_{40}\text{P}_8\text{Ru}_8\text{Si}_{13}$ (5216,48 g/mol). ^1H -RMN $((\text{CD}_3)_2\text{CO})$: δ -0.01 (s, 12H, $-(\text{CH}_3)\text{Si}^{\text{G}1}$); 0.11 (s, 48H, $-(\text{CH}_3)_2\text{Si}^{\text{G}2}$); 0.67 (m, 64H, $-\text{SiCH}_2-$); 1.44 (m, 24H, $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$); 1.97 (m, 16H, $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.78 (m, 48H, $-\text{NCH}_2\text{N}^{\text{PTA}}$); 4.45 (m, 64H, $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ y $-\text{NCH}_2\text{N}^{\text{PTA}}$); 4.86 (s, 40H, $-\text{C}_5\text{H}_5$); 7.43 (m, 8H, Ar); 7.99 (m, 16H, Ar); 8.15 (m, 8H, Ar); 8.69 (s, 8H, $-\text{N}=\text{CH}$); 9.22 (m, 8H, Ar). ^{31}P -RMN $((\text{CD}_3)_2\text{CO})$: δ -36.2 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^{\text{PTA}}$). A.E.(%). Calc.: C, 49.73; H, 6.84; N, 10.74. Exp.: C, 49.69; H, 6.99; N, 9.34.

20 CAPACIDAD ANTITUMORAL Y ANTIBACTERIANA DE LOS METALODENDRÍMEROS DE LA INVENCION

Como ejemplos de la capacidad antitumoral y antibacteriana que presentan algunos compuestos de la presente invención, se detallan los métodos de determinación empleados y los resultados obtenidos para compuestos seleccionados.

25

1. Capacidad antitumoral *in vitro* mediante ensayo MTT

Los ensayos de actividad antitumoral se llevaron a cabo en diversas líneas celulares tumorales y sanas. Las líneas tumorales seleccionadas fueron PC3, correspondiente a cáncer de próstata avanzado; MCF7 y HCC1806, de cáncer de mama; HT29, de cáncer de colon; y HeLa, de cáncer de cuello uterino. La línea 142BR de fibroblastos se utilizó como referencia no tumoral. La técnica empleada para determinar la viabilidad celular fue un ensayo MTT. Cada uno de los compuestos ha sido medido al menos tres veces independientes con el fin de obtener resultados reproducibles.

30

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una concentración de 1.1×10^5 células/ml. Transcurridas 24 h, se añadieron los compuestos a diferentes concentraciones en el rango 0-100 μM . Tras 24 h de tratamiento, se añadió Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en PBS, a una concentración de 0.1 mg/ml, en oscuridad. Tras 1.5 h, se eliminó el medio de los pocillos, disolviendo los cristales formados en DMSO con agitación suave. La viabilidad celular se determinó en el espectrofotómetro Multiskan FC, mediante medidas de absorbancia de la sal de formazán soluble generada por las células vivas a 570 nm restándole el "fondo" medido a 620 nm. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calcula en base a la fórmula: $[A]_{\text{test}} / [\bar{A}]_{\text{control}} \times 100$. Cada ensayo se realiza por triplicado.

Tabla 1. Resultados de actividad antitumoral *in vitro* de metalodendrimeros seleccionados en líneas celulares tumorales (HeLa, MCF7, PC3, HCC1806 y HT29) y sanas (142BR).

Comp.	Átomos metal	$IC_{50} \pm SD (\mu\text{M})$ (Factor de Selectividad)					
		HeLa	MCF7	PC3	HCC1806	HT29	142BR
1	4	1.7 ± 0.5 (4.5)	2.1 ± 0.2 (4)	3.4 ± 0.2 (2)	1.9 ± 0.1 (4)	9.3 ± 0.5 (-)	7.7 ± 0.4
2	8	5.2 ± 0.3 (1)	9.6 ± 1.4 (-)	2.5 ± 0.3 (2)	0.69 ± 0.03 (9)	12.3 ± 0.2 (-)	6.1 ± 0.2
10	4	6.3 ± 0.2 (3)	10.3 ± 0.5 (2)	8.3 ± 0.6 (2)	2.2 ± 0.1 (9)	11.4 ± 0.4 (2)	19.2 ± 0.2
11	8	4.5 ± 1.1 (8)	14.9 ± 0.5 (2.5)	6.6 ± 0.3 (6)	2.3 ± 0.1 (16)	9.1 ± 0.5 (4)	37.7 ± 0.3

Los resultados del ensayo MTT muestran valores significativamente menores de IC_{50} para las líneas tumorales tratadas con metalodendrimeros de primera y segunda generación, en comparación con la línea celular utilizada como control. Además, en algunos casos los sistemas de primera generación son más eficaces que sus análogos de mayor generación, probablemente debido al balance de hidrofobia-hidrofilia necesario o a su mayor capacidad para interactuar con la membrana celular debido a su estructura.

2. Capacidad antibacteriana mediante evaluación de CMI y CMB

La actividad antibacteriana de compuestos seleccionados ha sido evaluada en *Staphylococcus aureus* (Gram+) y *Escherichia coli* (Gram-) mediante el cálculo de la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la CMB (concentración mínima bactericida). La

5 CMI indica la mínima cantidad de un agente que puede inhibir el crecimiento de un microorganismo (efecto bacteriostático), mientras que la CMB hace referencia a la mínima cantidad de un agente que puede matar a un microorganismo (efecto bactericida).

10 Ensayo de determinación de CMI (ISO 20776-1). El ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada concentración de compuesto deseada. Las microplacas son incubadas a 37 °C usando un lector de ultra microplacas ELX808iu (Instrumentos Bio-Tek).

Ensayo de determinación de CMB. La CMB se calculó inoculando 5 µL de las muestras 15 utilizadas para calcular la CMI en una placa de Petri con agar Muller-Hinton. Después de 24 h de incubación a 37 ° C, se determinó la CMB seleccionando para ello la mínima concentración donde no se detectó crecimiento.

20 **Tabla 2.** Efectos bacteriostáticos y bactericidas de los metalodendrimeros seleccionados.

Compuesto	Átomos de metal	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB
Cu(NO₃)₂	1	>512	>512	>512	>512
1	4	8	8	4	4
2	8	256	256	256	256
10	4	4	4	16	16
11	8	16	32	128	128

Los resultados (Tabla 2) muestran la potente actividad bacteriostática y bactericida de los metalodendrimeros, especialmente aquéllos de primera generación, en comparación con la sal metálicas precursora Cu(NO₃)₂ utilizada como control. Esta actividad es 25 reproducible en ambos tipos de bacterias.

REFERENCIAS

1. Hameed, A., al-Rashida, M., Uroos, M., Abid Ali, S. & Khan, K. M. Schiff bases in medicinal chemistry: a patent review (2010-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **27**, 63-79 (2017).
5
2. Chakraborty, A., Kumar, P., Ghosh, K. & Roy, P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *European Journal of Pharmacology* **647**, 1-12 (2010).
3. Davis, M. E., Chen, Z. & Shin, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 771 (2008).
10
4. García-Gallego, S., Franci, G., Falanga, A., Gómez, R., Folliero, V., Galdiero, S., de la Mata, F. & Galdiero, M. Function Oriented Molecular Design: Dendrimers as Novel Antimicrobials. *Molecules* **22**, 1581 (2017).
5. Govender, P., Antonels, N. C., Mattsson, J., Renfrew, A. K., Dyson, P. J., Moss, J. R., Therrien, B. & Smith, G. S. Anticancer activity of multinuclear arene ruthenium complexes coordinated to dendritic polypyridyl scaffolds. *Journal of Organometallic Chemistry* **694**, 3470-3476 (2009).
15
6. Zhao, X., Loo, S. C. J., Lee, P. P.-F., Tan, T. T. Y. & Chu, C. K. Synthesis and cytotoxic activities of chloropyridylimineplatinum(II) and chloropyridyliminecopper(II) surface-functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Journal of inorganic biochemistry* **104**, 105-110 (2010).
20
7. El Brahmi, N., El Kazzouli, S., Mignani, S. M., Essassi, E. M., Aubert, G., Laurent, R., Caminade, A.-M., Bousmina, M. M., Cresteil, T. & Majoral, J.-P. Original Multivalent Copper(II)-Conjugated Phosphorus Dendrimers and Corresponding Mononuclear Copper(II) Complexes with Antitumoral Activities. *Molecular Pharmaceutics* **10**, 1459-1464 (2013).
25
8. Jesus Serramia, M., Alvarez, S., Fuentes-Paniagua, E., Isabel Clemente, M., Sanchez-Nieves, J., Gomez, R., de la Mata, J. & Angeles Munoz-Fernandez, M. In vivo delivery of siRNA to the brain by carbosilane dendrimer. *Journal of Controlled Release* **200**, 60-70 (2015).
30
9. Milowska, K., Szwed, A., Mutrynowska, M., Gomez-Ramirez, R., Javier de la Mata, F., Gabryelak, T. & Bryszewska, M. Carbosilane dendrimers inhibit alpha-synuclein fibrillation and prevent cells from rotenone-induced damage. *International Journal of Pharmaceutics* **484**, 268-275 (2015).
35

10. Moreno, S., Ortega, P., Javier de la Mata, F., Francesca Ottaviani, M., Cangiotti, M., Fattori, A., Angeles Munoz-Fernandez, M. & Gomez, R. Bifunctional Chelating Agents Based on Ionic Carbosilane Dendrons with DO3A at the Focal Point and Their Complexation Behavior with Copper(II). *Inorganic Chemistry* **54**, 8943-8956 (2015).
5
11. Sanchez-Rodriguez, J., Diaz, L., Galan, M., Maly, M., Gomez, R., Javier de la Mata, F., Jimenez, J. L. & Angeles Munoz-Fernandez, M. Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of Thiol-Ene Carbosilane Dendrimers and Their Potential Development as a Topical Microbicide. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **11**, 1783-1798 (2015).
10
12. Fuentes-Paniagua, E., Sanchez-Nieves, J., Hernandez-Ros, J. M., Fernandez-Ezequiel, A., Soliveri, J., Copa-Patino, J. L., Gomez, R. & Javier de la Mata, F. Structure-activity relationship study of cationic carbosilane dendritic systems as antibacterial agents. *Rsc Advances* **6**, 7022-7033 (2016).
- 15 13. Maroto-Diaz, M., Elie, B. T., Gomez-Sal, P., Perez-Serrano, J., Gomez, R., Contel, M. & de la Mata, F. J. Synthesis and anticancer activity of carbosilane metallodendrimers based on arene ruthenium(ii) complexes. *Dalton Trans* **45**, 7049-7066 (2016).
14. Sanz del Olmo, N., Maroto-Díaz, M., Gómez, R., Ortega, P., Cangiotti, M., Ottaviani, M. F. & de la Mata, F. J. Carbosilane metallodendrimers based on copper (II) complexes: Synthesis, EPR characterization and anticancer activity. *Journal of inorganic biochemistry* **177**, 211-218 (2017).
20
15. Moreno, S., Sepúlveda-Crespo, D., de la Mata, F. J., Gómez, R. & Muñoz-Fernández, M. Á. New anionic carbosilane dendrons functionalized with a DO3A ligand at the focal point for the prevention of HIV-1 infection. *Antiviral Research* **146**, 54-64 (2017).
25

4. Metalodendrímtero según las reivindicaciones 1 a 3, donde m es 1.
5. Metalodendrímtero según las reivindicaciones 1 a 3, donde R₂ es metilo.
- 5 6. Metalodendrímtero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R₁ es un grupo propilo.
7. Metalodendrímtero según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde M = Cu(II), Ru(II).
- 10 8. Procedimiento de obtención de los metalodendrímteros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende: la reacción de coordinación de una sal de Cu(II) en el precursor dendrítico con grupos base de Schiff terminales, donde la sal de Cu(II) es preferiblemente Cu(NO₃)₂.
- 15 9. Procedimiento de obtención de los metalodendrímteros según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende: la reacción de coordinación de una sal metálica de Ru(II) al precursor dendrítico con grupos base de Schiff terminales, donde la sal de rutenio preferiblemente es [(η⁵-C₅H₅)Ru(CH₃CN)₃]PF₆; la
- 20 reacción de intercambio de ligando, donde el ligando que se coordina preferiblemente es 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano (PTA); y la reacción de intercambio de contraión, donde el anión que se introduce preferiblemente es cloruro.
- 25 10. Composición que comprende al menos un compuesto de formula I, descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Composición según la reivindicación 10, donde dicha composición es farmacéutica.
- 30 12. Composición según la reivindicación 10 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Composición según la reivindicación 10, donde además comprende otro
- 35 principio activo.

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 10 a 13, donde dicha composición se encuentra en una forma adecuada para su administración tópica, oral o parenteral.
- 5 15. Uso las macromoléculas dendríticas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la elaboración de un medicamento en el tratamiento del cáncer.
- 10 16. Uso las macromoléculas dendríticas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la elaboración de un medicamento en el tratamiento de enfermedades infecciosas, de naturaleza bacteriana.

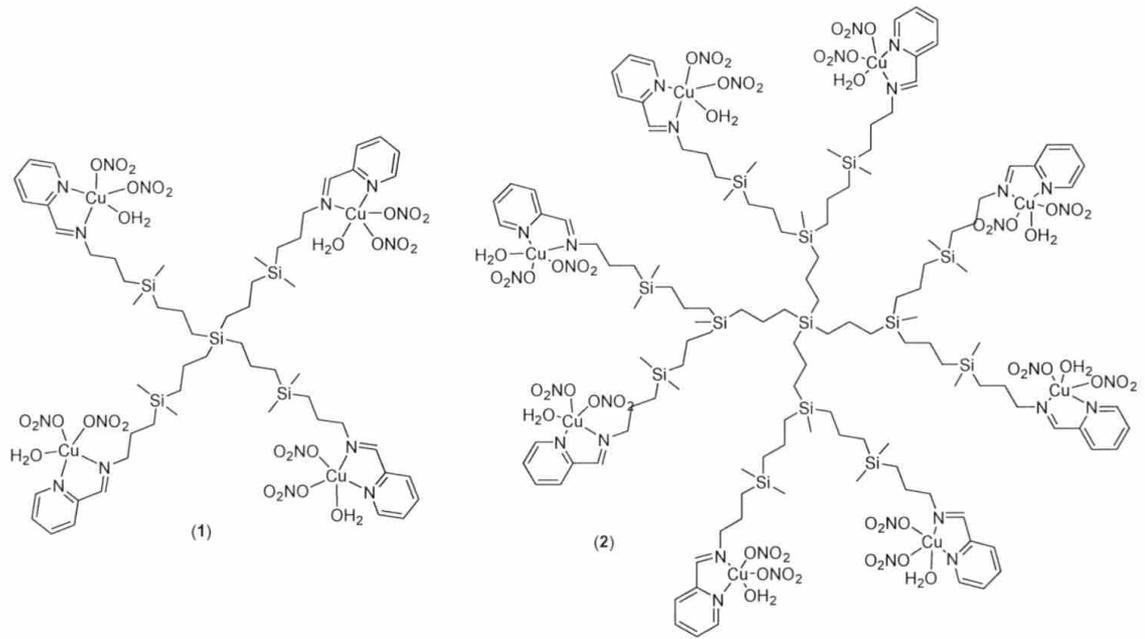


FIG. 1

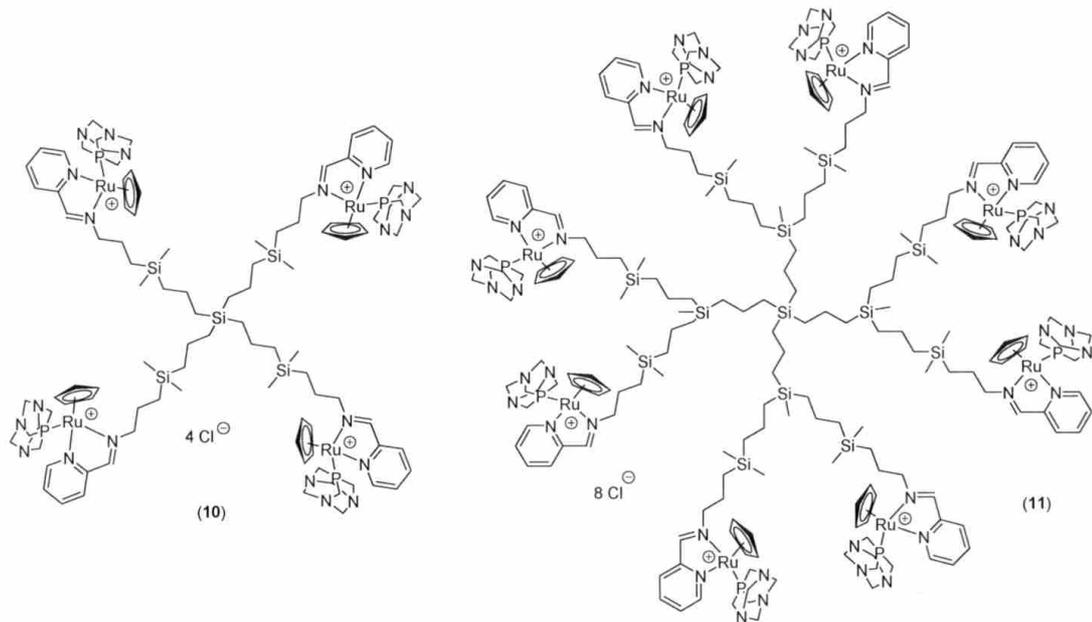


FIG. 2