



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 346 506**

② Número de solicitud: 200900979

⑤ Int. Cl.:
C08B 37/16 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **14.04.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2010**

Fecha de la concesión: **01.09.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **14.09.2011**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:
14.09.2011

⑲ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 33,3%)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Sevilla (Titular al 33,3%)
Universidad de Granada (Titular al 33,3%)

⑳ Inventor/es: **Ortiz Mellet, Carmen;**
Méndez Ardoy, Alejandro;
Gómez García, Marta;
Sevillano Traperero, Natalia;
Girón González, María Dolores;
Salto González, Rafael;
Santoyo González, Francisco y
García Fernández, José Manuel

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Ciclooligosacáridos anfífilicos policatiónicos y su uso como transportadores moleculares.**

㉓ Resumen:

Ciclooligosacáridos anfífilicos policatiónicos y su uso como transportadores moleculares.

La presente invención se refiere a un grupo de ciclooligosacáridos anfífilicos policatiónicos que, debido a su estructura molecular, pueden ser usados como transportadores de moléculas al interior de las células. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de dichos compuestos en la elaboración de un medicamento, al uso de este medicamento para terapia génica y a una composición farmacéutica que comprenda uno de dichos compuestos.

ES 2 346 506 B1

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

DESCRIPCIÓN

Ciclooligosacáridos anfífilos policatiónicos y su uso como transportadores moleculares.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y biomedicina. Específicamente, se refiere a un grupo de ciclooligosacáridos anfífilos policatiónicos, a su uso como transportador de moléculas al interior de las células, al uso de dichos compuestos en la elaboración de un medicamento, al uso de este medicamento para terapia génica y a una composición farmacéutica que comprenda uno de dichos compuestos.

10 Estado de la técnica anterior

El uso de compuestos macrocíclicos como moldes moleculares para lograr un alineamiento preciso de elementos funcionales representa una estrategia interesante para el diseño de receptores o ligandos artificiales capaces de emular los acontecimientos supramoleculares que se producen en organismos vivos o de interferir con ellos. Los ciclomal-

15 tooligosacáridos (ciclodextrinas, CDs) son, en este sentido, plataformas macrocíclicas privilegiadas para estos fines, ya que combinan biocompatibilidad, disponibilidad, una estructura simétrica tubular con caras bien diferenciadas y son susceptibles de funcionalización química controlada (Vargas-Berenguel *et al.* 2007. *Mini-Rev. Org. Chem.* 4, 1-14; García Fernández *et al.* 2006. *J. Ind. Phenom. Macrocy. yhyuyujuChem.* 56, 149-159). Además, los derivados de ciclodextrina tienen la capacidad de incluir otras moléculas en su cavidad interna para formar complejos de inclusión. Por ejemplo, CDs químicamente modificadas se han incorporado en polímeros policatiónicos que son capaces de

20 complejar y liberar eficazmente plásmidos de ADN (ADNp) con biocompatibilidad y eficacia elevadas (Davis y Brewster. 2004. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3, 1023-1035). La superficie de las partículas correspondientes puede modificarse posteriormente mediante la unión no covalente de entidades químicas que pueden interactuar con la cavidad de la CD.

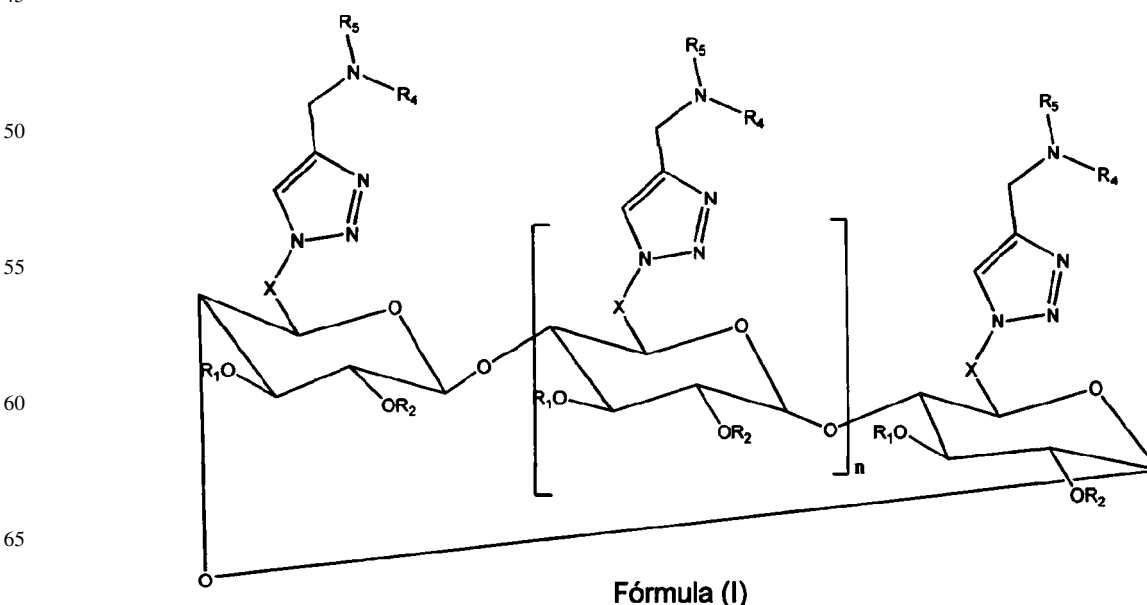
Los ejemplos mencionados ponen de manifiesto el interés de los derivados policatiónicos de CDs para la complejación y el transporte de otras moléculas, especialmente si son de naturaleza aniónica. Sin embargo, su carácter polimérico y polidisperso representa una limitación importante para el desarrollo de aplicaciones, en particular en el campo de la biomedicina. Se han preparado algunos ejemplos de derivados de CDs de naturaleza molecular mediante la funcionalización de los hidroxilos primarios de los ciclooligosacáridos naturales, pero su eficacia a la hora de proteger una biomolécula como el ADN y conducirla a una célula diana es relativamente baja (Srinivasachari *et al.* 2008. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 4618-4627; Mourtzis *et al.* 2008. *Chem. Eur. J.* 14, 4188-4200). Aunque dicha eficacia puede

30 aumentarse proporcionando carácter anfífilo a las CDs policatiónicas (Díaz-Moscoso *et al.* 2008. *Chem. Commun.* 2001-2003), la elaboración de este tipo de compuestos está muy limitada por la baja eficacia que en general tienen los métodos de acoplamiento múltiple sobre las CDs. Existe por tanto una necesidad de desarrollar nuevas estructuras de ciclodextrinas policatiónicas anfífilas que puedan prepararse con alta eficacia y que sean capaces de complejar y transportar eficazmente otras moléculas, incluyendo en particular biomoléculas polianiónicas tales como ácidos nucleicos (ADN o ARN).

35 Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado una familia de derivados macrocíclicos anfífilos policatiónicos con unas propiedades que los convierten en vehículos idóneos para introducir moléculas al interior de las células.

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



ES 2 346 506 B1

donde:

n es 4, 5 ó 6;

5 R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1 - C_{20} o acilo; donde al menos uno de R^1 y R^2 es diferente de H;

X se selecciona entre $-CH_2-$ o $-CH_2YR^3$;

10 donde Y se selecciona entre O ó S, R^3 es $-(CH_2)_p-NH-CO-(CH_2)_q-$ donde p y q pueden tener independientemente un valor comprendido entre 1 y 10.

15 R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre hidrógeno y $-(CH_2)_r-[(NH)-(CH_2)_s]_t-NH_2$; donde r puede tener un valor comprendido entre 1 y 10, s puede tener un valor entre 2 y 10 y t puede tener un valor comprendido entre 0 y 4.

o sus sales orgánicas o inorgánicas.

20 En la presente invención el término “alquilo” se refiere a radicales de cadenas de hidrocarburos lineales o ramificadas, que consisten en átomos de carbono e hidrógeno, que pueden o no contener insaturaciones, que tienen de uno a veinte átomos de carbono y que están unidas al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxycarbonilo, amino, nitro, mercapto, alquiltio, etc.

El término “acilo” se refiere, en la presente invención, a un derivado de ácido carboxílico por eliminación de un grupo hidroxilo. Los grupos acilo tienen como fórmula general R_a-CO- , donde R_a es un grupo alquilo con las acepciones anteriores y preferiblemente se refiere a grupos alquilo (C_1 - C_{20}), donde alquilo es como definido anteriormente.

30 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), donde R^1 y R^2 son C_2 - C_{14} alquilo o acilo.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), donde X es $-CH_2-$.

35 En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), donde X es $-CH_2YR^3$ Y es azufre, R^3 es $-(CH_2)_p-NH-CO-(CH_2)_q-$, p es 2 y q es 1.

40 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), donde R^4 y R^5 son $-(CH_2)_r-[(NH)M(CH_2)_s]_t-NH_2$, donde r tiene un valor de 1, s tienen un valor de 2 y t tiene un valor comprendido entre 0 y 4.

45 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) donde su sal se selecciona entre el grupo formado por acetato, trifluoroacetato, propionato, benzoato, metanosulfonato y trifluorometanosulfonato.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) donde su sal se selecciona entre el grupo formado por cloruro, bromuro y yoduro. Más preferiblemente, dicha sal es cloruro.

50 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula (I) donde n es 5.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) que se selecciona entre el siguiente grupo:

55 - Heptakis[6-(4-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa

- Heptakis[6-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa

60 - Heptakis[6-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-*O*-miristoil]ciclomaltoheptaosa

- Heptakis[6-(2-(4-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa

65 - Heptakis[6-(2-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa

ES 2 346 506 B1

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) donde alguno de los grupos amino terminales está sustituido con un fluorocromo.

5 En la presente invención, el término “fluorocromo” se refiere a un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía). La cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluorocromo como de su ambiente químico. Algunos ejemplos de fluorocromos que pueden ser empleados en la presente invención, pero sin limitarse, son rodamina, fluoresceína o dansilo.

10 En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) donde alguno de los grupos amino terminales está sustituido con un grupo que incorpora al menos un ligando capaz de ser reconocido por un receptor celular.

15 En la presente invención, el término “receptor celular” se refiere a un componente de la superficie de la célula que reconoce o interacciona de manera específica con una molécula o “ligando”. La interacción del ligando con el receptor celular puede favorecer, por ejemplo, la distribución selectiva a una determinada célula diana.

20 Más preferiblemente, este ligando se selecciona entre un mono u oligosacárido, un anticuerpo monoclonal o un derivado de ácido fólico. Aún más preferiblemente, el mono u oligosacárido se selecciona entre mañosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico, lactosa ó un oligosacárido formado a partir de cualquiera de ellos o sus combinaciones.

25 En la presente invención el término “monosacárido” se refiere a los glúcidos más sencillos, que no se hidrolizan, es decir, que no se descomponen para dar otros compuestos, conteniendo de tres a seis átomos de carbono. Su fórmula empírica es $(\text{CH}_2\text{O})_n$ donde $n \geq 3$. La cadena carbonada de los monosacáridos no está ramificada y todos los átomos de carbono menos uno contienen un grupo alcohol (-OH). El átomo de carbono restante tiene unido un grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$). Si este grupo carbonilo está en el extremo de la cadena se trata de un grupo aldehído (-CHO) y el monosacárido recibe el nombre de aldosa. Ejemplos de aldosas, pero sin limitarse a, son gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, mañosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa. Si el carbono carbonílico está en cualquier otra posición, se trata de una cetona (-CO-) y el monosacárido recibe el nombre de cetosa. Ejemplos de cetosa, pero sin limitarse a, son dihidroxiacetona, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, sicososa, fructosa, sorbosa y tagatosa.

35 En la presente invención el término “oligosacárido” se refiere a un polímero formado a partir de monosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos, con un número de unidades monoméricas entre 3 y 10. Dentro de los oligosacáridos destacan los disacáridos, que son oligosacáridos formados por la unión de dos monosacáridos iguales o distintos mediante enlace O-glucosídico (con pérdida de una molécula de agua), mono o dicarbonílico, que además puede ser α o β en función del -OH hemiacetal o hemicetal. Los disacáridos más comunes son, sin limitarse a, glucoas, fructosa, lactosa, maltosa, isomaltosa, trehalosa y celobiosa.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) como vehículo transportador de, al menos, una molécula al interior de una célula.

45 El término “transportador” o “carrier”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la capacidad del compuesto de la invención para transportar una molécula al interior de una célula. En el ejemplo 2 de la patente, se utiliza un ácido nucleico como molécula para ilustrar el potencial del compuesto de la invención para actuar como transportador penetrante de células. Sin embargo, la molécula que puede ser introducida mediante el uso del compuesto de la invención puede ser de muy diversa naturaleza, por ejemplo, pero sin limitarse, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, un péptido, una proteína, una glicoproteína, un carbohidrato, un lípido, un glicolípido, una sonda fluorescente o un medicamento. En el ejemplo 2, el plásmido de ADN se administra a células de ovario de hámster chino tipo salvaje (CHO-k1; n° ATCC CCL-61). Sin embargo, el compuesto de la invención es útil para introducir una molécula en otros tipos de células eucariotas y también en células procariotas.

55 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de los compuestos de la invención como transportadores de ácidos nucleicos al interior de una célula.

60 El ácido nucleico, puede ser un ácido desoxirribonucleico, como, por ejemplo, pero sin limitarse, ADN de cadena doble, ADN de cadena simple o ADN circular, o un ácido ribonucleico, como por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ARN de interferencia de señal (siRNA). El compuesto de la invención puede ser empleado para introducir más de un tipo de molécula, por ejemplo, dos secuencias de ADN diferentes.

En una realización más preferida el ácido nucleico es ADN. En una realización aún más preferida, el ADN es de cadena doble. En una realización aún más preferida, el ADN de cadena doble es circular.

65 En otra realización más preferida el ácido nucleico es ARN. En una realización aún más preferida, el ARN es un ARN de interferencia de señal (siRNA).

ES 2 346 506 B1

Los transportadores de ácidos nucleicos también se denominan vectores. Tal como se utiliza en la presente invención el término “vector” se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un ácido nucleico exógeno al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación del ácido nucleico al interior de una célula.

5 El compuesto de la invención se puede emplear, por tanto, como agente de transformación o de transfección. El término “transformación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la introducción de un ácido nucleico exógeno al interior de una célula procariota. El término “agente de transformación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un transportador penetrante de un ácido nucleico al interior de una célula procariota. El término “transfección”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la introducción de un ácido nucleico exógeno al interior de una célula eucariota. El término “agente de transfección”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un transportador penetrante de un ácido nucleico al interior de una célula eucariota.

15 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) como agente de transformación de ácidos nucleicos al interior de una célula procariota.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) como agente de transfección de ácidos nucleicos al interior de una célula eucariota.

20 El compuesto de la invención puede servir para transportar, al menos, una molécula con capacidad terapéutica al interior de una célula de un organismo, preferiblemente un mamífero y, más preferiblemente, un humano. En el ejemplo 2, se muestra la capacidad del compuesto de la invención para introducir un ácido nucleico en el interior de una célula eucariota. Por tanto, el compuesto de la presente invención es útil como vector capaz de transferir un ácido nucleico profiláctico, de diagnóstico o terapéutico en el contexto de la terapia génica.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del medicamento descrito anteriormente para terapia génica.

30 El término “medicamento para terapia génica, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un producto obtenido mediante un conjunto de procesos de fabricación destinados a transferir, bien *in vivo* bien *ex vivo*, un ácido nucleico profiláctico, de diagnóstico o terapéutico a células animales, preferiblemente humanas, y su posterior expresión *in vivo*. La transferencia genética supone un sistema de expresión contenido en un sistema de distribución conocido como vector, de origen viral o no viral, que puede incluirse asimismo en una célula animal. Entre los medicamentos de terapia génica se encuentran, pero sin limitarse los siguientes, ácido nucleico desnudo, vectores no virales, vectores virales o células modificadas genéticamente, Puede tratarse de medicamentos de terapia génica basados en células autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales).

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

45 Como se emplea aquí, los términos “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo del ser humano u otros animales.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal y, más preferiblemente, a un mamífero, incluyendo a un humano, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, o tópica.

55 La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, edad, peso, sexo o tolerancia del animal. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición farmacéuticamente efectiva que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y del efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” o “vehículos” farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

65 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. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra una representación esquemática de la síntesis de derivados de β CD policatiónicos anfífilos rígidos 9-11.

Figura 2. Muestra una representación esquemática de la síntesis de derivados de β CD policatiónicos anfífilos flexibles 16 y 17.

Figura 3. Representa un ensayo de desplazamiento por electroforesis en gel que muestra la unión de los derivados de β CD anfífilos (9-11, 16 y 17) o no anfífilos 18 y 19) al ADNp al aumentar las relaciones de N/P (a) y la cuantificación de la intensidad de las bandas (b).

Figura 4. Muestra la cuantificación de la intensidad relativa (valor de ADNp sin tratar igual a 100) de la suma de bandas electroforéticas de ADNp relajado y superenrollado correspondientes a las muestras de ADNp complejadas con la ciclodextrinas policatiónicas anfífilas 9-11, 16 y 17 y tratadas con ADNasa I. Los datos representan la desviación estándar de la media (n = 4). Se incluyen los datos para los derivados no anfífilos 18 y 19 como elementos de comparación.

Figura 5. Muestra la eficacia de la transfección de genes *in vitro* de los complejos con ADNp de 9-11,16 y 17 en células CHO-k1 en comparación con complejos derivados de derivados policatiónicos no anfífilos (18 y 19), poliplejos basados en Lipofectamine™ 2000 (LP) y ADN desnudo (control). Los datos representan la desviación estándar de la media (n = 8).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1*Síntesis química de los compuestos*

Materiales. Los siguientes derivados, utilizados en la preparación de los compuestos de la invención, se prepararon siguiendo métodos descritos en la bibliografía:

- heptakis(6-azido-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil)ciclomaltoheptaosa (1) (Defaye *et al.* WO2008009831).

- heptakis(6-azido-6-desoxi-2,3-di-*O*-miristoil)ciclomaltoheptaosa (2) (Defaye *et al.* WO2008009831).

- *N*-(*tert*-butoxicarbonil)propargilamina (3) (Wu *et al.* 2007. *J. Org. Chem.* 72, 2897-2905),

- bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]amina (Westerberg *et al.* 1989. *J. Med. Chem.* 32, 236-243), y

- heptahidrocloruro de heptakis[6-(2-aminoetil)tió]-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]-ciclomaltoheptaosa (5) (Díaz-Moscoso *et al.* 2008. *Chem. Commun.* 2001-2003).

3-[Bis(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil)amino]propino (4) se preparó a partir de bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]amina como se detalla: a una solución de bis[2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etil]amina (872 mg, 2,86 mmol) y Et₃N (1,2 mL, 8,6 mmol, 3,0 eq) en CH₃CN (15 mL), se añadió bromuro de propargilo (0,90 mL, 8,6 mmol, 3,0 eq) y la mezcla se agitó a ta durante 2 h. Se eliminó el disolvente a vacío y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (100 mL), se lavó con agua (3 x 30 mL), se secó (MgSO₄ y se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (30:1 en CH₂Cl₂-MeOH). Rendimiento: 567 mg (58%); *R*_f = 0.22 (50:1 CH₂Cl₂-MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.93 (bs, 2 H, NH), 3.42 (d, 2 H, ⁴*J*_{H,H} = 2.4 Hz, CH₂C≡CH), 3.20 (q, 4 H, ³*J*_{H,H} = 5.7 Hz, CH₂NHBoc), 2.64 (t, 4 H, CH₂CH₂NHBoc), 2.20 (t, 1 H, C≡CH), 1.45 (s, 18 H, CMe₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.0 (CO), 79.2 (C_q), 77.9 (C≡CH), 73.4 (C≡CH), 52.8 (CH₂CH₂NHBoc), 41.8 (HC≡CCH₂), 38.0 (CH₂NHBoc), 28.4 (CMe₃). EM-ESI: *m/z* 364.2 [M + Na]⁺, 342.2 [M + H]⁺.

El plásmido pEGFP-N3 (n° de registro de Genbank: U57609) se obtuvo de Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Este plásmido de 4729 pb codifica una variante desplazada hacia el rojo de GFP de tipo salvaje. El plásmido se purificó a partir de bacterias transfectadas usando procedimientos habituales (Sterzel *et al.* 1985. *Anal. Biochem.* 147, 462-467). La concentración de ADN se midió usando un procedimiento fluorimétrico usando el colorante Hoechst 33258.

ES 2 346 506 B1

Preparación de precursores de los compuestos de la invención con espaciador rígido (fórmula (I), X = CH₂) protegidos en forma de los correspondientes terc-butil carbamatos

5 *Heptakis[6-(4-terc-butoxicarbonilaminometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (6)*

A una disolución de 1 (765 mg, 0,28 mmol) y N-terc-butoxicarbonilpropargilamina (3, 405 mg, 2,59 mmol, 1,3 eq) en acetona (10 ml) se añadieron Cul·(EtO)₃P (71 mg, 200 μmol, 0,3 eq) y DIPEA (0,34 ml, 0,29 mmol, 1 eq) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 h. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (50:1 → 20:1 de CH₂Cl₂-MeOH). Rendimiento: 871 mg (81%). R_f 0,47 (15:1 de CH₂Cl₂-MeOH); [α]_D = +24,7 (c 1,0, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 313 K): δ 7,62 (s, 7 H, =CH), 5,45 (s, 7 H, H-1), 5,40 (s, 7 H, NHBoc), 5,38 (t, 7 H, J_{2,3} = J_{3,4} = 8,0 Hz, H-3), 4,86 (da, 7 H, J_{6a,6b} = 13,7 Hz, H-6a), 4,75 (dd, 7 H, J_{1,2} = 2,1 Hz, H-2), 4,57 (sa, 7 H, H-6b), 4,48 (sa, 7 H, H-5), 4,29 (dd, 7 H, ²J_{H,H} = 15,2 Hz, J_{CH,NH} = 5,4 Hz, CHaNHboc), 4,18 (dd, 7 H, J_{CH,NH} = 3,0 Hz, CHbNHboc), 3,55 (t, 7 H, J_{4,5} = 8,0 Hz, H-4), 2,36-2,13 (m, 28 H, CH₂CO), 1,57 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,40 (s, 63 H, CMe₃), 1,30 (m, 56 H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃), 0,90 (t, 42 H, ³J_{H,H} = 7,0 Hz, CH₃). RMN ¹³C (125,7 MHz, CDCl₃, 313 K): δ 172,9, 171,6 (CO éster), 155,8 (CO carbamato), 145,2 (C-4 triazol), 124,6 (C-5 triazol), 96,4 (C-1), 79,5 (C-4, C_q), 70,1 (C-3), 69,8 (C-5), 69,6 (C-2), 50,2 (C-6), 36,1 (CH₂NHBoc), 33,8 (CH₂CO), 31,4, 31,2 (CH₂CH₂CH₃), 28,3 (CMe₃), 24,3 (CH₂CH₂CO), 22,3 (CH₂CH₃), 13,8 (CH₃). EM-ESI: m/z 1908,1 [M + 2 Na]²⁺.

20 *Heptakis[6-(4-(2,2-bis-terc-butoxicarbonilamino)etilaminometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (7)*

A una disolución de 1 (156 mg, 58 μmol) y 3-bis[2-(terc-butoxicarbonilamino)etil]aminopropino (4, 182 mg, 0,53 mmol, 1,3 eq) en acetona (10 ml) se añadió Cul(EtO)₃P (15 mg, 41 μmol, 0,1 eq) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 h. El disolvente se evaporó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (30:1 → 9:1 de CH₂Cl₂-MeOH). Rendimiento: 256 mg (87%); R_f = 0,61 (9:1 de CH₂Cl₂-MeOH); [α]_D = +25,9 (c 1,0, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 323 K): δ 7,73 (s, 7 H, =CH), 5,44 (d, 7 H, J_{1,2} = 3,2 Hz, H-1), 5,36 (t, 7 H, J_{2,3} = J_{3,4} = 8,7 Hz, H-3), 5,21 (sa, 14 H, NHBoc) 4,90 (da, 7 H, J_{6a,6b} = 13,6 Hz, H-6a), 4,75 (dd, 14 H, H-2, H-6b), 4,51 (m, 7 H, H-5), 3,78, 3,74 (2 d, 14 H, ²J_{H,H} = 15,6 Hz, CH₂N), 3,53 (t, 7 H, J_{4,5} = 8,5 Hz, H-4), 3,16 (q, 28 H, ³J_{H,H} = 5,6 Hz, CH₂NHBoc), 2,56 (t, 28 H, CH₂CH₂NHBoc), 2,45-2,13 (m, 28 H, CH₂CO), 1,60 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,44 (sa, 126 H, CMe₃), 1,30-1,20 (m, 56 H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃), 0,94, 0,93 (2 t, 42 H, ³J_{H,H} = 7,2 Hz, ³J_{H,H} = 6,8 Hz, CH₃); RMN ¹³C (100,6 MHz, CDCl₃, 323 K): δ 172,7, 171,5 (CO éster), 156,0 (CO carbamato), 143,6 (C-4 triazol), 125,4 (C-5 triazol), 96,5 (C-1), 78,8 (C-4, C_q), 70,0 (C-3), 69,7 (C-5), 69,3 (C-2), 53,0 (CH₂CH₂NHBoc), 50,0 (C-6), 48,0 (CH₂N), 38,5 (CH₂NHBoc), 33,8, 33,5 (CH₂CO), 31,1, 31,0 (CH₂CH₂CH₃), 28,3 (CMe₃), 24,1 (CH₂CH₂CO), 22,1 (CH₂CH₃), 13,6 (CH₃); EM-ESI: m/z 2558,2 [M + 2 Na]²⁺, 1713,6 [M + 3 Na]³⁺.

40 *Heptakis[6-(4-(2,2-bis(terc-butoxicarbonilamino)etilaminometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-O-mirisitoil]ciclomaltoheptaosa (8)*

Una disolución de heptakis[6-azido-6-desoxi-2,3-di-O-mirisitoil]ciclomaltoheptaosa (2, 50 mg, 11 μmol), 3-bis[2-(terc-butoxicarbonilamino)etil]aminopropino (4, 34 mg, 0,1 mmol, 1,3 eq), Cul(EtO)₃P (3 mg, 8 μmol, 0,1 eq) y N-etildisopropilamina (13 μl, 80 μmol, 1 eq) en acetona (5 ml) se sometió a reflujo durante 6 h. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (30:1 → 9:1 de CH₂Cl₂-MeOH) para dar un sólido amorfo. Rendimiento: 61,3 mg (80%). [α]_D = +26,2 (c 0,9, CH₂Cl₂); R_f = 0,51 (9:1 de CH₂Cl₂-MeOH); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 333 K): δ 7,28 (s, 7 H, =CH), 5,45 (s, 7 H, H-1), 5,38 (t, 7 H, J_{2,3} = J_{3,4} = 9,2 Hz, H-3), 5,19 (sa, 14 H, NHBoc), 4,90 (d, 7 H, J_{6a,6b} = 13,7 Hz, H-6a), 4,75 (dd, 14 H, J_{1,2} = 3,6 Hz, H-2, H-6b), 4,53 (m, 7 H, H-5), 3,78 (2d, 14 H, ²J_{Ha,Hb} = 15,7 Hz, CH₂N), 3,55 (t, 7 H, J_{4,5} = 8,1 Hz, H-4), 3,18 (qa, 28 H, ³J_{H,H} = 5,2 Hz, CH₂NHBoc), 2,58 (sa, 28 H, CH₂CH₂NHBoc), 2,44-2,15 (m, 28 H, CH₂CO), 1,60-1,54 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,46 (s, 126 H, CMe₃), 1,38-1,29 (m, 280 H, (CH₂)₁₀), 0,92 (t, 42 H, ³J_{H,H} = 6,5 Hz, CH₃); RMN ¹³C (125,7 MHz, CDCl₃, 313 K): δ 172,9, 171,7 (CO éster), 156,2 (CO carbamato), 143,6 (C-4 triazol), 125,7 (C-5 triazol), 96,6 (C-1), 79,0 (C-4, C_q), 70,1 (C-3), 69,7 (C-5, C-2), 53,1 (CH₂CH₂NHBoc), 50,1 (C-6), 48,0 (CH₂N), 38,4 (CH₂NHBoc), 34,0, 33,7 (CH₂CO), 31,9 (CH₃CH₂CH₂), 29,8-28,9 (CH₃CH₂CH₂(CH₂)₇), 28,5 (CMe₃), 24,6 (CH₂CH₂CO), 22,5 (CH₃CH₂), 14,0 (CH₃); EM-ESI: m/z 2228,6 [M + 2 Na + H]³⁺, 1681,2 [M + K + 2 Na + H]⁴⁺.

55 *Procedimiento general para la preparación de derivados macrocíclicos policatiónicos anfifílicos con espaciador rígido, de fórmula (I) en los que X es CH₂ (compuestos 9-11)*

60 El tratamiento del hepta o tetradecacarbamato correspondiente (6-8, 33 μmol) con TFA-CH₂Cl₂ (1:1, 2 ml) a temperatura ambiente durante 2 h, seguido de evaporación de los disolventes y liofilización en una disolución diluida de HCl, dio 9-11 puros.

65 *Heptahidrocloruro de heptakis[6-(4-aminometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (9)*

El compuesto 9 responde a la fórmula (I) en la que n = 5, los grupos R¹ y R² son iguales y representan hexanoilo (CH₃(CH₂)₄CO-), X es CH₂, y R⁴ y R⁵ son iguales y representan hidrógeno, en forma de la correspondiente sal de heptahidrocloruro.

ES 2 346 506 B1

Rendimiento: 106,4 mg (99%); $[\alpha]_D = +31,5$ (c 1,0, MeOH); RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 7,98 (s, 7 H, =CH), 5,49 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 5,46 (s, 7 H, H-1), 4,88 (d, 7 H, $J_{6a,6b} = 14,0$ Hz, H-6a), 4,78 (dd, 7 H, $J_{1,2} = 2,1$ Hz, H-2), 4,65 (s, 7 H, H-6b), 4,53 (sa, 7 H, H-5), 3,91 (s, 14 H, CH_2NH_2), 3,67 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8,5$ Hz, H-4), 2,47-2,21 (m, 28 H, CH_2CO), 1,64 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,36 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,94 (t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,0$ Hz, CH_3); RMN ^{13}C (125,7 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 174,3, 173,4 (CO éster), 145,5 (C-4 triazol), 126,8 (C-5 triazol), 98,1 (C-1), 78,8 (C-4), 71,5 (C-5), 71,1 (C-3, C-2), 51,6 (C-6), 36,5 (CH_2NH_2), 35,0, 34,9 (CH_2CO), 32,5, 32,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 25,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 23,4 (CH_2CH_3), 14,2 (CH_3); EM (ESI): m/z 1023,9 $[\text{M} + 3 \text{H}]^{3+}$, 1535,3 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$.

10 *Tetradecahidrocloruro de heptakis[6-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (10)*

El compuesto 10 responde a la fórmula (I) en la que $n = 5$, los grupos R^1 y R^2 son iguales y representan hexanoilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CO}-$), X es CH_2 , y R^3 y R^4 son iguales y representan 2-aminoetilo ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2-$). en forma de la correspondiente sal de tetradecahidrocloruro.

Rendimiento: 136,4 mg (99%); $[\alpha]_D = +18,5$ (c 1,0, MeOH); RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 8,11 (s, 7 H, =CH), 5,60 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9,9$ Hz, H-3), 5,59 (s, 7 H, H-1), 5,15 (dd, 7 H, $J_{6a,6b} = 15,2$ Hz, $J_{5,6a} = 2,5$ Hz, H-6a), 4,58 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 3,0$ Hz, H-6b), 4,57 (m, 14 H, $J_{1,2} = 3,5$ Hz, H-2, H-5), 3,91, 3,89 (2 d, 14 H, $^2J_{\text{Ha,Hb}} = 15,3$ Hz, CH_2N), 3,54 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8,9$ Hz, H-4), 3,15 (t, 28 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6,0$ Hz, CH_2NH_2), 2,83 (t, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2,49-2,17 (m, 28 H, CH_2CO), 1,73-1,58 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,37 (m, 56 H, CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0,94, 0,92 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6,9$ Hz, CH_3); RMN ^{13}C (125,7 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 175,7, 174,6 (CO éster), 144,6 (C-4 triazol), 129,7 (C-5 triazol), 99,2 (C-1), 79,4 (C-4), 73,0 (C-2), 72,9 (C-5), 71,7 (C-3), 53,0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 52,6 (C-6), 48,3 (CH_2N), 39,4 (CH_2NH_2), 36,3, 36,2 (CH_2CO), 33,9, 33,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 26,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 24,7 (CH_2CH_3), 15,6 (CH_3); EM-ESI: m/z 1837 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$, 1225,0 $[\text{M} + 3 \text{H}]^{3+}$, 919,0 $[\text{M} + 4 \text{H}]^{4+}$, 735,4 $[\text{M} + 5 \text{H}]^{5+}$.

11 *Heptakis[6-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-O-miristoil]ciclomaltoheptaosa (11)*

El compuesto 11 responde a la fórmula (I) en la que $n = 5$, los grupos R^1 y R^2 son iguales y representan miristoilo (tetradecanoilo; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$), X es CH_2 , y R^4 y R^5 son iguales y representan 2-aminoetilo ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2-$), en forma de la correspondiente sal de tetradecahidrocloruro.

Rendimiento: 178,8 mg (99%); $[\alpha]_D = +30,7$ (c 0,9, CH_2Cl_2); RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , 313 K): δ 8,12 (s, 7 H, =CH), 5,61 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 5,60 (s, 7 H, H-1), 5,13 (d, 7 H, $J_{6a,6b} = 13,9$ Hz, H-6a), 4,97 (d, 7 H, H-6b), 4,57 (m, 14 H, H-2, H-5), 3,90 (2d, 14 H, $^2J_{\text{H,H}} = 15,3$ Hz, CH_2N), 3,55 (t, 7 H, $J_{4,5} = 9,2$ Hz, H-4), 3,16 (t, 28 H, $^3J_{\text{H,H}} = 5,5$ Hz, CH_2NH_2), 2,82 (t, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2,50-2,15 (m, 28 H, CH_2CO), 1,80-1,55 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,50-1,25 (m, 280 H, CH_3 (CH_2)₁₀ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 0,93 (t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6,6$ Hz, CH_3); RMN ^{13}C (125,7 MHz, CDCl_3 , 313 K): δ 172,9, 171,8 (CO éster), 142,0 (C-4 triazol), 126,9 (C-5 triazol), 96,6 (C-1), 76,7 (C-4), 70,4 (C-5, C-2), 69,1 (C-3), 50,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 49,9 (C-6), 45,7 (CH_2N), 36,7 (CH_2NH_2), 33,6 (CH_2CO), 31,7, 29,8-29,1, 22,3 (CH_3 (CH_2)₁₀ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 24,6, 24,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 13,0 (CH_3); EM-ESI: m/z 2622,0 $[\text{M} + 2 \text{H}]^{2+}$, 1748,4 $[\text{M} + 3 \text{H}]^{3+}$, 1311,7 $[\text{M} + 4 \text{H}]^{4+}$, 1049,7 $[\text{M} + 5 \text{H}]^{5+}$.

Preparación de precursores de los compuestos de la invención con espaciador flexible, de fórmula (I) en los que X es $-\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2-$ (compuestos 12-15)

Heptakis[6-(2-cloroacetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]-ciclomaltoheptaosa (12)

A una disolución del heptahidrocloruro 5 (500 mg, 0,16 mmol) en DMF seca (10 ml), bajo atmósfera de Ar, se añadió en porciones DMAP (270 mg, 2,24 mmol, 2 eq) y la mezcla se agitó durante 15 min. Se añadió anhídrido cloroacético (570 mg, 3,36 mmol, 3 eq) y la reacción se agitó adicionalmente durante la noche a ta. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 , se lavó con agua ligeramente acidificada (3 x 20 ml), NaHCO_3 acuoso saturado (3 x 20 ml) y agua (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (30:1 de CH_2Cl_2 -MeOH). Rendimiento: 325 mg (59%); $R_f = 0,53$ (9:1 de CH_2Cl_2 -MeOH); $[\alpha]_D = +80,3$ (c 1,0, CH_2Cl_2); RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, 313 K) δ 5,35 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9,5$ Hz, H-3), 5,14 (d, 7 H, $J_{1,2} = 4$ Hz, H-1), 4,80 (dd, 7 H, H-2) 4,21 (m, 7 H, $J_{4,5} = 9,0$ Hz, $J_{5,6a} = 2,5$ Hz, $J_{5,6b} = 5,0$ Hz, H-5) 4,11 (2 d, 14 H, $^2J_{\text{H,H}} = 15,0$ Hz, CH_2Cl), 3,82 (t, 7H, H-4), 3,55 (m, 14 H, $\text{CH}_2\text{NH}_{\text{cist}}$), 3,16 (dd, 7H, $J_{6a,6b} = 14,0$ Hz, H-6a), 3,10 (dd, 7H, H-6b), 2,85 (2dt, 14 H, $^2J_{\text{H,H}} = 13,5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{S}_{\text{cist}}$), 2,43-2,17 (m, 28 H, CH_2CO), 1,70-1,57 (m, 28 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,36-1,29 (m, 56 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2CH_3), 0,92 (2 t, 42 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7,5$ Hz, CH_3); RMN ^{13}C (125,7 MHz, CDCl_3 , 313 K) δ 173,3, 171,7 (CO éster), 166,5 (CO amida), 96,6 (C-1), 78,6 (C-4), 71,3 (C-5), 70,5 (C-2) 70,3 (C-3), 42,7 (CH_2Cl), 39,4 ($\text{CH}_2\text{NH}_{\text{cist}}$), 34,1, 33,8 (CH_2CO , C-6), 32,9 ($\text{CH}_2\text{S}_{\text{cist}}$), 31,4, 31,3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24,3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 22,3 (CH_2CH_3), 13,8 (CH_3); EM-ESI: m/z 1175,3 $[\text{M} + 3 \text{Na}]^{3+}$, 1752 $[\text{M} + 2 \text{Na}]^{2+}$, 3477,7 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

65 *Heptakis[6-(2-azidoacetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]-ciclomaltoheptaosa (13)*

A una disolución de 12 (109 mg, 31 μmol) en DMF seca (10 ml), bajo atmósfera de Ar, se añadió NaN_3 (43 mg, 0,66 mmol, 3 eq) y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se disolvió en

ES 2 346 506 B1

CH₂Cl₂ (50 ml), se lavó con H₂O (3 x 15 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (50:1 → 30:1 de CH₂Cl₂:MeOH). Rendimiento: 93,2 mg (89%); *R_f* = 0,48 (9:1 de CH₂Cl₂:MeOH), $[\alpha]_D^{25} = +94,0$ (*c* 1,0, CH₂Cl₂); RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5,34 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9,6$ Hz, H-3), 5,12 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 4,80 (dd, 7 H, H-2) 4,17 (m, 7 H, H-5) 4,02 (s, 14 H, CH₂N₃), 3,82 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8,7$ Hz, H-4) 3,51 (m, 14 H, CH₂NH_{cist}), 3,10 (m, 14 H, H-6a, H-6b), 2,82 (2 dt, 14 H, $^2J_{H,H} = 13,8$ Hz, $^3J_{H,H} = 7,2$ Hz, CH₂S_{cist}), 2,44-2,12 (m, 28 H, CH₂CO) 1,62-1,55 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,34-1,30 (m, 56 H, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₃), 0,92 (2 t, 42 H, $^3J_{H,H} = 11,1$ Hz, $^3J_{H,H} = 11,4$ Hz, CH₃); RMN ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃, 313 K) δ 173,7, 172,0 (CO éster), 167,7 (CO amida), 96,7 (C-1), 78,8 (C-4), 71,5 (C-5), 70,8 (C-2), 70,5 (C-3), 52,8 (CH₂N₃), 39,2 (CH₂NH_{cist}), 34,3, 34,1 (CH₂CO), 33,8 (C-6), 33,1 (CH₂S_{cist}), 31,7, 31,6 (CH₂CH₂CH₃), 24,7 (CH₂CH₂CO), 22,7 (CH₂CH₃), 14,2 (CH₃); EM-ESI: *m/z* 1774,6 [M + 2 Na]²⁺.

Heptakis[6(2-(4-(N-terc-butoxicarbonil)aminometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (14)

A una disolución de 13 (45 mg, 13 μ mol) y 3 (40 mg, 0,12 mmol, 1,3 eq) en acetona (5 ml) se añadieron (EtO)₃P-Cul (3 mg, 9 μ mol, 0,1 eq) y DI PEA (15 μ l, 90 μ mol, 1 eq) y la mezcla se sometió a reflujo durante 4 h. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (20:1 → 9:1 de CH₂Cl₂:MeOH). Rendimiento: 53 mg (89%); *R_f* = 0,4 (9:1 de CH₂Cl₂:MeOH); $[\alpha]_D^{25} = +67,6$ (*c* 1,0, CH₂Cl₂); RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz, 323 K) δ 7,90 (s, 7 H, =CH), 5,32 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8,5$ Hz, H-3), 5,15 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 5,13 (s, 14 H, CH₂CONH), 4,87 (dd, 7 H, H-2), 4,34 (s, 14 H, CH₂NHBoc), 4,28 (m, 7 H, H-5), 3,84 (t, 7 H, $J_{4,5} = 8,0$ Hz, H-4), 3,54 (m, 14 H, CH₂NH_{cist}), 3,40 (m, 7 H, H-6a), 3,08 (dd, 7 H, $J_{6a,6b} = 13,9$ Hz, $J_{5,6b} = 7,0$ Hz, H-6b), 2,88 (m, 14 H, CH₂S_{cist}), 2,50-2,22 (m, 28 H, CH₂CO), 1,70-1,57 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,42 (s, 63 H, CMe₃), 1,40-1,30 (m, 56 H, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₃), 0,96, 0,95 (2 t, 42 H, $^3J_{H,H} = 7,0$ Hz, CH₃); RMN ¹³C (125,7 MHz, CD₃OD): δ 174,5, 173,3 (CO éster), 167,9 (CO amida), 158,1 (CO carbamato), 147,4 (C-4 triazol), 125,7 (C-5 triazol), 98,3 (C-1), 80,6 (C-4, C_q), 72,9 (C-5), 72,1 (C-3), 71,6 (C-2), 53,4 (CH₂CONH), 40,7 (CH₂NH_{cist}), 37,0 (CH₂NHBoc) 35,1 (CH₂CO), 32,6, 32,5 (CH₂CH₂CH₃, CH₂S_{cist}, C-6), 28,9 (CMe₃), 25,5 (CH₂CH₂CO), 23,4 (CH₂CH₃), 14,4 (CH₃); EM-ESI: (*m/z*) 4606,9 [M + Na]⁺, 2317,9 [M + 2 Na]²⁺, 1552,2 [M + 3 Na]³⁺.

Heptakis[6-(2-(4-(2,2-bis(terc-butoxicarbonilamino)etilaminometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (15)

A una disolución de 13 (48 mg, 14 μ mol) y 4 (44 mg, 0,13 mmol, 1,3 eq) en acetona (5 ml) se añadieron Cul·(EtO)₃P (4 mg, 10 μ mol, 0,1 eq) y DIPEA (17 μ l, 0,1 mmol, 1 eq) y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 h. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (30:1 → 9:1 de CH₂Cl₂:MeOH) para dar 15. Rendimiento: 65 mg (79%); *R_f* = 0,36 (9:1 de CH₂Cl₂:MeOH); $[\alpha]_D^{25} = +51,5$ (*c* 1,0, CH₂Cl₂); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, 313 K): δ 7,81 (s, 7 H, =CH), 5,34 (s, 14 H, NHBoc) 5,26 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 7,9$ Hz, H-3), 5,10 (m, 21 H, CH₂CONH, H-1), 4,76 (da, 7 H, H-2), 4,14 (sa, 7 H, H-5), 3,81 (sa, 14 H, CH₂N), 3,72 (ta, 7H, $J_{4,5} = 6,95$ Hz, H-4), 3,44 (m, 14 H, CH₂NH_{cist}), 3,18 (sa, 14 H, CH₂NHBoc), 2,98 (sa, 7 H, H-6a), 2,80 (sa, 14 H, CH₂S_{cist}), 2,73 (sa, 7 H, H-6b), 2,58 (s, 14 H, CH₂CH₂NHBoc), 2,42-2,10 (m, 28 H, CH₂CO), 1,65-1,50 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,42 (s, 126 H, CMe₃), 1,38-1,20 (m, 56 H, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₃), 0,95-0,84 (2 t, 42 H, $^3J_{H,H} = 7,3$ Hz, $^3J_{H,H} = 7,0$ Hz, CH₃); RMN ¹³C (125,7 MHz, CDCl₃, 313 K): δ 173,4, 171,6 (CO éster), 166,0 (CO amida), 156,3 (CO carbamato) 144,1 (C-4 triazol), 125,1 (C-5 triazol), 96,6 (C-1), 79,1 (C-4, C_q), 71,4 (C-5), 70,4 (C-3, C-2), 53,3 (CH₂CONH), 52,4 (CH₂CH₂NHBoc), 48,3 (CH₂N), 39,4 (CH₂NH_{cist}), 38,4 (CH₂NHBoc) 34,0, 33,8 (CH₂CO), 32,9 (C-6, CH₂S_{cist}), 31,3, 31,2 (CH₂CH₂CH₃), 28,5 (CMe₃), 24,3 (CH₂CH₂CO), 22,3 (CH₂CH₃), 13,8 (CH₃); EM-ESI: *m/z* 2969,7 [M + 2 Na]²⁺, 2959,0 [M + H + Na]²⁺.

Procedimiento general para la preparación de derivados macrocíclicos policatiónicos anfífilicos con espaciador flexible, de fórmula (I) en los que X es -CH₂S(CH₂)₂- (compuestos 16 y 17)

El tratamiento del hepta o tetradecacarbamato correspondiente (14 ó 15, 19 μ mol) con TFA-CH₂Cl₂ (1:1, 2 ml) a ta durante 2 h, seguido de evaporación de los disolventes y liofilización en una disolución diluida de HCl, dio 16 y 17 puros.

Heptakis[6(2-(4-aminometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil]ciclomaltoheptaosa (16)

El compuesto 16 responde a la fórmula (I) en la que n = 5, los grupos R¹ y R son iguales y representan hexanoilo (CH₃(CH₂)₄CO-), X es -CH₂S(CH₂)₂-, y R⁴ y R⁵ son iguales y representan hidrógeno, en forma de la correspondiente sal de heptahidrocloreuro.

Rendimiento: 72 mg (91%); $[\alpha]_D^{25} = +22,1$ (*c* 0,8, MeOH); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD, 323 K): δ 8,21 (s, 7 H, =CH), 5,34 (t, 7 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 7,9$ Hz, H-3), 5,26 (s, 14 H, CH₂CONH), 5,16 (d, 7 H, $J_{1,2} = 3,2$ Hz, H-1), 4,85 (dd, 7 H, H-2), 4,33 (s, 14 H, CH₂NH₂), 4,29 (sa, 7 H, H-5), 3,87 (t, 7 H, $J_{4,5} = 7,9$ Hz, H-4), 3,54 (m, 14 H, CH₂NH_{cist}), 3,42 (da, 7 H, $J_{6a,6b} = 11,4$ Hz, H-6a), 3,12 (dd, 7 H, $J_{5,6b} = 4,3$ Hz, H-6b), 2,91 (m, 14 H, CH₂S_{cist}), 2,50-2,20 (m, 28 H, CH₂CO), 1,65 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,45-1,30 (m, 56 H, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₃), 1,00-0,92 (2 t, 42 H, $^3J_{H,H} = 7,3$ Hz, $^3J_{H,H} = 6,9$ Hz, CH₃); RMN ¹³C (100,3 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 173,3, 171,9 (CO éster), 166,3 (CO amida), 139,7 (C-4 triazol), 126,0 (C-5 triazol), 96,8 (C-1), 79,2 (C-4), 71,2 (C-5), 70,4 (C-3), 70,1 (C-2), 51,8 (CH₂CONH), 39,1 (CH₂NH_{cist}), 34,9 (CH₂NH₂), 33,6 (CH₂CO, CH₂S_{cist}, C-6), 31,5, 31,1 (CH₂CH₂CH₃), 24,1

ES 2 346 506 B1

(CH₂CH₂CO), 22,0 (CH₂CH₃), 13,0, 12,8 (CH₃). EM-ESI: *m/z* 1976,6 [M + 2 Na]²⁺, 1317,8 [M + 3 Na]³⁺, 988,1 [M + 2 H + 2 Na]⁴⁺.

5 *Heptakis[6(2-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-O-hexanoil] ciclomaltoheptaosa (17)*

El compuesto 17 responde a la fórmula (I) en la que n = 5, los grupos R¹ y R² son iguales y representan hexanoilo (CH₃(CH₂)₄CO-), X es -CH₂S(CH₂)₂-, y R⁴ y R⁵ son iguales y representan 2-aminoetilo (NH₂(CH₂)₂-), en forma de la correspondiente sal de tetradecahidrocloreuro.

10 Rendimiento: 81,0 mg (91%). [α]_D = +39,6 (c 1,0 en MeOH); RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 8,05 (s, 7 H, =CH), 5,36 (t, 7 H, J_{2,3} = J_{3,4} = 8,7 Hz, H-3) 5,21 (s, 14 H, CH₂CONH), 5,17 (d, 7 H, J_{1,2} = 3,5 Hz, H-1), 4,83 (dd, 7 H, H-2), 4,21 (sa, 7 H, H-5), 3,90 (sa, 21 H, CH₂N, H-4), 3,52 (m, 14 H, CH₂NH_{cist}), 3,15 (t, 14 H, CH₂NH₂, ³J_{H,H} = 5,5 Hz), 3,11 (m, 7 H, H-6a), 2,88 (m, 21 H, CH₂S_{cist}, H-6b), 2,84 (t, 7 H, CH₂CH₂NH₂), 2,50-2,22 (m, 28 H, CH₂CO), 1,73-1,58 (m, 28 H, CH₂CH₂CO), 1,43-1,30 (m, 56 H, CH₂CH₃), 0,99-0,91 (2 t, 42 H, ³J_{H,H} = 6,9 Hz, ³J_{H,H} = 5,8 Hz, CH₃); RMN ¹³C (125,7 MHz, CD₃OD, 313 K): δ 176,0, 174,7 (CO éster), 169,2 (CO amida), 145,4 (C-4 triazol), 128,5 (C-5 triazol), 99,5 (C-1), 81,8 (C-4), 74,5 (C-5), 73,0 (C-3, C-2), 54,4 (CH₂CONH), 53,4 (CH₂CH₂NH₂), 49,1 (CH₂N), 42,0 (CH₂NH_{cist}), 39,6 (CH₂NH₂) 36,4, 36,3 (CH₂CO), 33,8, 33,7 (CH₂CH₂CH₃), 32,0 (C-6, CH₂S_{cist}) 26,8 (CH₂CH₂CO), 24,7 (CH₂CH₃), 15,7, 15,6 (CH₃).

20 Ejemplo 2

Preparación de los complejos entre macrociclos anfífilicos policatiónicos y ADN plásmido

25 *Preparación de complejos a partir de derivados policatiónicos anfífilicos de β CD y plásmido pEGFP-N3.* El plásmido pEGFP-N3, usado para la preparación de los complejos de ADN y para el ensayo de transfección, es un plásmido de 4729 pb (pares de bases). Las cantidades de derivados policatiónicos anfífilicos de β CD usados se calcularon según la concentración de ADN deseada de 0,02 mg/ml (fosfato 50 μ M), la relación de N/P, el peso molecular y el número de cargas positivas en el derivado de CD seleccionado. Los experimentos se realizaron para N/P 5, 10, 30 y 50. El ADN se diluyó en agua mili-Q hasta una concentración final de fosfato 50 μ M, luego se añadió la cantidad deseada de derivado de CD a partir de una disolución madre de 20 mg/ml (1:2 de Me₂SO-agua). La preparación se removió con vórtex durante unos pocos segundos y se incubó durante 30 minutos.

35 Ejemplo 3

Análisis de las propiedades de las nuevas CD policatiónicas

40 La capacidad de las nuevas CD policatiónicas anfífilicas para complejar, proteger y transfectar el ADNp fue analizada mediante ensayos de desplazamiento por electroforesis en gel, ensayo de protección frente a la acción de ADNasa y análisis de la eficiencia de transfección del plásmido pEGFP-N3 en células eucariotas, detallados a continuación.

45 *Ensayo de retardo por electroforesis en gel.* La capacidad de unión del complejo ADN- β CD anfífilica policatiónica se analizó por electroforesis en gel. Las disoluciones madre de derivados de β CD se prepararon en Me₂SO-agua 1:2, mientras que el ADN se disolvió en NaCl 150 mM. El ADN de pEGFP-N3 (10 μ l a 0,1 μ g/ μ l) se mezcló con un volumen igual de derivado de β CD usando relaciones de N/P de 0 a 10 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente antes de la adición de tampón de carga (2 μ l). Una alícuota (5 μ l) de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). La electroforesis se llevó a cabo a 7 V/cm y los geles se tiñeron después de la electroforesis con bromuro de etidio. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó con el software NIH Image (Rasband *et al.* 1995. *Microbeam Analysis Soc. J.* 4, 137-149). Se ha asignado un valor de 100 a la intensidad de la banda correspondiente al ADN desnudo.

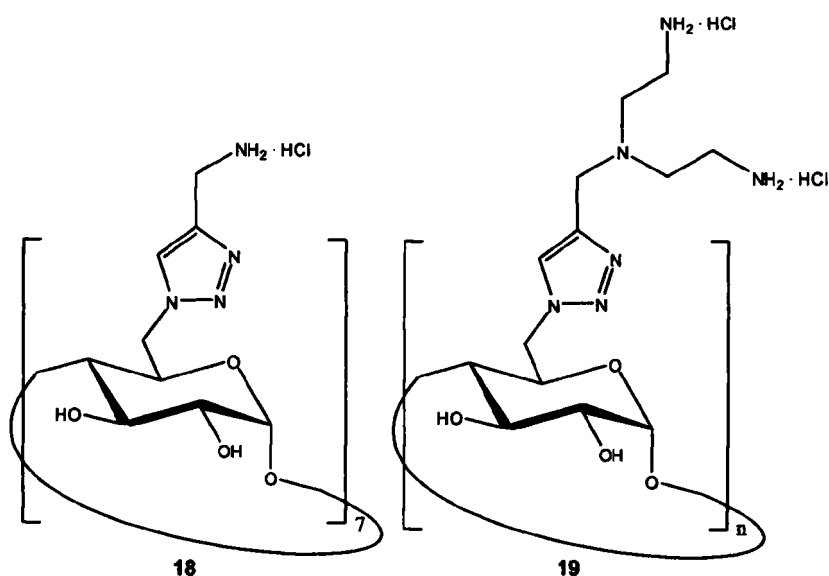
50 *Ensayos de protección de ADNasa.* El ADN de pEGFP-N3 (10 μ l a 0,1 μ g/ μ l) se mezcló con un volumen igual de disolución madre de derivado de β CD usando N/P = 5 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. A la mezcla se añadieron 15 μ l de una disolución de ADNasa I (0,1 mg/ml en Tris HCl 50 mM, pH 8, 2000 U/mg) y se incubó durante 45 minutos a 37°C. Después de la digestión se añadieron 20 μ l de una disolución de SDS al 10% y las muestras se incubaron durante 2 h a 85°C. Finalmente, una alícuota (20 μ l) de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa (0,8% p/v) en tampón TAE.

60 *Cultivo celular y ensayos de transfección de ADN.* Se cultivaron células de ovario de hámster chino tipo salvaje (CHO-k1; n° ATCC CCL-61) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, glutamina plus 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 0,1 μ g/ml de estreptomina. Antes de la transfección, las células se sembraron en 24 placas de pocillos y se incubaron durante 24 h para alcanzar una confluencia de células del 80-90%. Para los experimentos de transfección, el plásmido pEGFP-N3 (1 μ g) se mezcló con el derivado de CD correspondiente a relaciones de N/P de 0,1 a 20 a temperatura ambiente durante 20 minutos en un volumen final de 20 μ l. La mezcla se diluyó hasta 0,5 ml con DMEM sin suero y se añadió a cada pocilio. Las células sin transfectar y el pEGFP-N3 desnudo se usaron como controles negativos. Como control positivo se realizó un experimento de transfección usando 1 μ l de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) y 1,0 μ g de ADN, según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con las mezclas de ADN- β CD policatiónica anfífilica durante 18 h, luego se eliminó

el medio de transfección y las células se cultivaron adicionalmente en medio DMEM más 10% de SBF durante un periodo adicional de 48 h.

Ensayos de fluorescencia y de proteínas. Las células transfectadas se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 600 μ l de tritón X-100 al 0,5% en PBS. Las placas se agitaron durante 10 min a temperatura ambiente, el lisado se recuperó y la fluorescencia se cuantificó en un fluorímetro Shimadzu RF-5301 PC con longitudes de onda de excitación de 460 nm (5 nm) y de emisión de 510 nm (10 nm). La concentración de proteínas se midió usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.).

Los datos sobre las capacidades relativas de complejación de ADNp (plásmido de pEGFP-N3 que codifica GFP) de las nuevas CD policatiónicas anfifílicas a diferentes valores de N/P (relación entre nitrógenos protonables en el vehículo de CD/grupos fosfato en el plásmido), el grado de protección del plásmido en los complejos correspondientes frente a la acción de ADNasa y la eficiencia para promover la transfección (células CHO-k1) se presentan en las figuras 3, 4 y 5, respectivamente. Los derivados de β CD modificados por una única cara 18 y 19 se usaron como compuestos de control para evaluar la influencia de la anfifilicidad en la interacción entre los macrociclos policatiónicos anfifílicos de la invención y ADNp. Aunque la arquitectura dendrítica 19 es mucho más eficaz que el derivado de heptamina 18 en la compactación del ADNp y en la protección de la degradación por ADNasa, ninguno de ellos pudo promover la transfección de genes en un grado significativo.



El derivado heptacatiónico tetradecahexanoilato 9 presentó capacidades de complejación de ADNp mejoradas en comparación con el análogo no anfifílico 18. A pesar de ello, el plásmido todavía permanece accesible a la ADNasa en los complejos 9:ADNp correspondientes y los niveles de transfección permanecieron muy bajos. Los beneficios conferidos por la anfifilicidad resultan mucho más evidentes cuando se comparó el comportamiento dentro de la serie de derivados anfifílicos policatiónicos ramificados 9, 10 y 11. El compuesto 10, que posee cadenas de hexanoato, dio lugar a complejos 10:ADNp estables que garantizaban la protección completa del ADNp del entorno para valores de N/P superiores a 4. Además, mostraron eficiencias de transfección sorprendentemente altas, análogas a las obtenidas usando Lipofectamine™ 2000. El aumento de la longitud de las cadenas de acilo de hexanoato a tetradecanoato no alteró la eficiencia de complejación, como se observa en los datos para 11, pero disminuyó drásticamente la capacidad de transfección, lo que destaca la importancia de poder ajustar el balance hidrófobo-hidrófilo no sólo para optimizar la formación de nanopartículas de CD policatiónica anfifílica-ADN, sino también para los procesos adicionales que conducen a la internalización de células y la expresión génica. La facilidad y eficacia con que este ajuste puede realizarse en el caso de los compuestos de fórmula (I) es una característica importante de la presente invención.

Los compuestos 16 y 17 reproducen la decoración de poliaminotriazol/tetradeca-*O*-hexanoílo de 10 y 11 en la cara primaria y secundaria de la β CD, respectivamente, pero incorporan un brazo espaciador entre los anillos de triazol y el núcleo macrocíclico que dota al sistema de una flexibilidad mucho mayor. Un análisis de los datos correspondientes indicó aumentos moderados en la estabilidad del complejo 16:ADNp, en la eficacia en la protección de ADNp contra la acción de ADNasa y en la eficiencia de la transfección de ADN en comparación con el correspondiente complejo 10:ADNp. Inesperadamente, los datos para 11 y 17 no mostraron la misma tendencia, siendo en este caso más ventajoso el motivo rígido en comparación con la arquitectura flexible.

ES 2 346 506 B1

En conjunto, los ejemplos recogidos ilustran la utilidad de los macrociclos policatiónicos anfífilos de la invención como sistemas de transporte de moléculas y biomoléculas al interior de células, en especial de compuestos polianiónicos como los ácidos nucleicos. Un aspecto muy importante de la invención es que los macrociclos policatiónicos anfífilos objeto de la misma pueden prepararse mediante la combinación de procedimientos sintéticos muy eficaces, que permiten acceder a macromoléculas completamente homogéneas. La estrategia bidireccional orientada hacia la diversidad molecular, ilustrada en los ejemplos anteriores, es especialmente adecuada para la realización de estudios estructura-actividad y de optimización. Se ha mostrado que la flexibilidad molecular, la densidad de carga y el equilibrio hidrófobo-hidrófilo son parámetros críticos que pueden ajustarse con exactitud en los compuestos objeto de la invención.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)

5

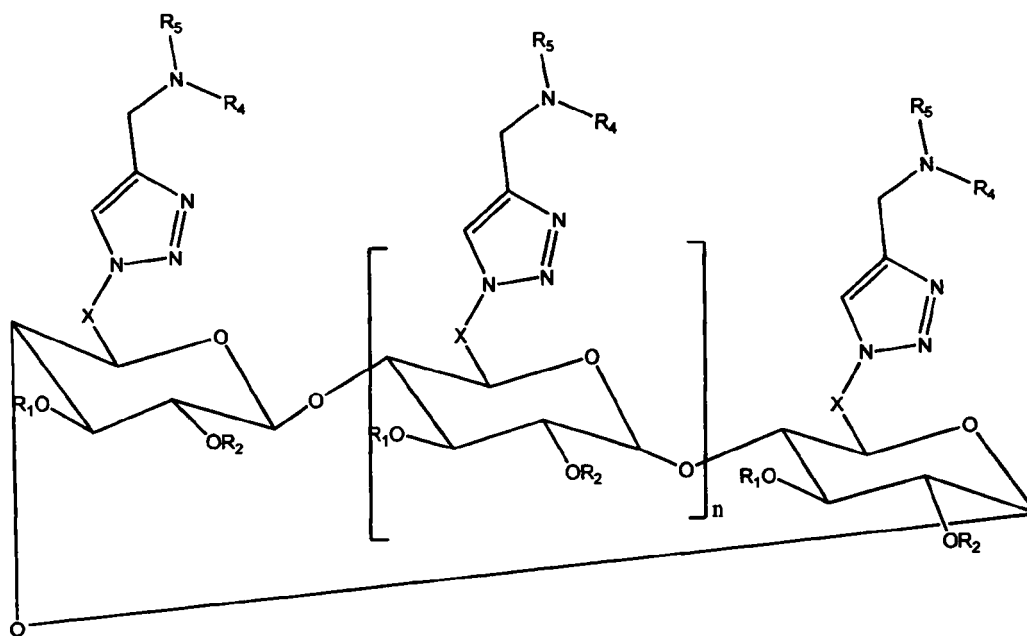
10

15

20

25

30



Fórmula (I)

donde:

35

n es 4, 5 ó 6;

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₂₀ acilo C₂-C₂₀; donde al menos uno de R¹ y R² es diferente de H;

40

X se selecciona entre -CH₂- o -CH₂YR³;

donde Y se selecciona entre oxígeno o azufre, R³ es -(CH₂)_p-NH-CO-(CH₂)_q- donde p y q pueden tener independientemente un valor comprendido entre 1 y 10.

45

R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre hidrógeno y -(CH₂)_r[(NH)-(CH₂)_s]_tNH₂; donde r puede tener un valor comprendido entre 1 y 10, s puede tener un valor entre 2 y 10 y t puede tener un valor comprendido entre 0 y 4,

o sus sales orgánicas o inorgánicas.

50

2. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, donde R¹ y R² son C₂-C₁₄ alquilo o acilo.

3. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde X es -CH₂-.

55

4. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde X es -CH₂YR³, Y es azufre, R³ es -(CH₂)_p-NH-CO-(CH₂)_q- p es 2 y q es 1.

5. Compuesto de fórmula (I) según las cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R⁴ y R⁵ son -(CH₂)_r[(NH)-(CH₂)_s]_t-NH₂, donde r tiene un valor de 1, s tienen un valor de 2 y t tiene un valor comprendido entre 0 y 4.

60

6. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde su sal se selecciona entre el grupo formado por acetato, trifluoroacetato, propionato, benzoato, metanosulfonato y trifluorometanosulfonato.

7. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde su sal se selecciona entre el grupo formado por cloruro, bromuro y yoduro.

65

8. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 6, donde su sal es cloruro.

ES 2 346 506 B1

9. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde n es 5.

10. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 que se selecciona entre el siguiente grupo:

5 - Heptakis[6-(4-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-il)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa

- Heptakis[6-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa

10 - Heptakis[6-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-6-desoxi-2,3-di-*O*-miristoil]ciclomaltoheptaosa

- Heptakis[6-(2-(4-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa

15 - Heptakis[6-(2-(4-(2,2-diaminoetilaminometil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)acetamidoetiltio)-6-desoxi-2,3-di-*O*-hexanoil]ciclomaltoheptaosa.

20 11. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde alguno de los grupos amino terminales está sustituido con un fluorocromo.

25 12. Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde alguno de los grupos amino terminales está sustituido con un grupo que incorpora al menos un ligando capaz de ser reconocido por un receptor celular.

13. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 12 donde el ligando se selecciona entre un mono u oligosacárido, un anticuerpo monoclonal o un derivado de ácido fólico.

30 14. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 13 donde el mono u oligosacárido se selecciona entre mañosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico, lactosa ó un oligosacárido formado a partir de cualquiera de ellos o sus combinaciones.

35 15. Uso del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 como transportadores de, al menos, una molécula al interior de una célula procariota o eucariota.

16. Uso del compuesto según la reivindicación 15 donde la molécula es de la lista que comprende: ácido nucleico, ácidos nucleico peptídico, péptido, proteína, glicoproteína, carbohidrato, lípido o glicolípido.

40 17. Uso del compuesto según la reivindicación 16 donde la molécula es un ácido nucleico.

18. Uso del compuesto según la reivindicación 17 donde la molécula es ADN.

19. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 donde la célula es eucariota.

45 20. Uso del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la elaboración de un medicamento.

21. Uso del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para terapia génica.

50 22. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 24. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 que además comprende otro principio activo.

60

65

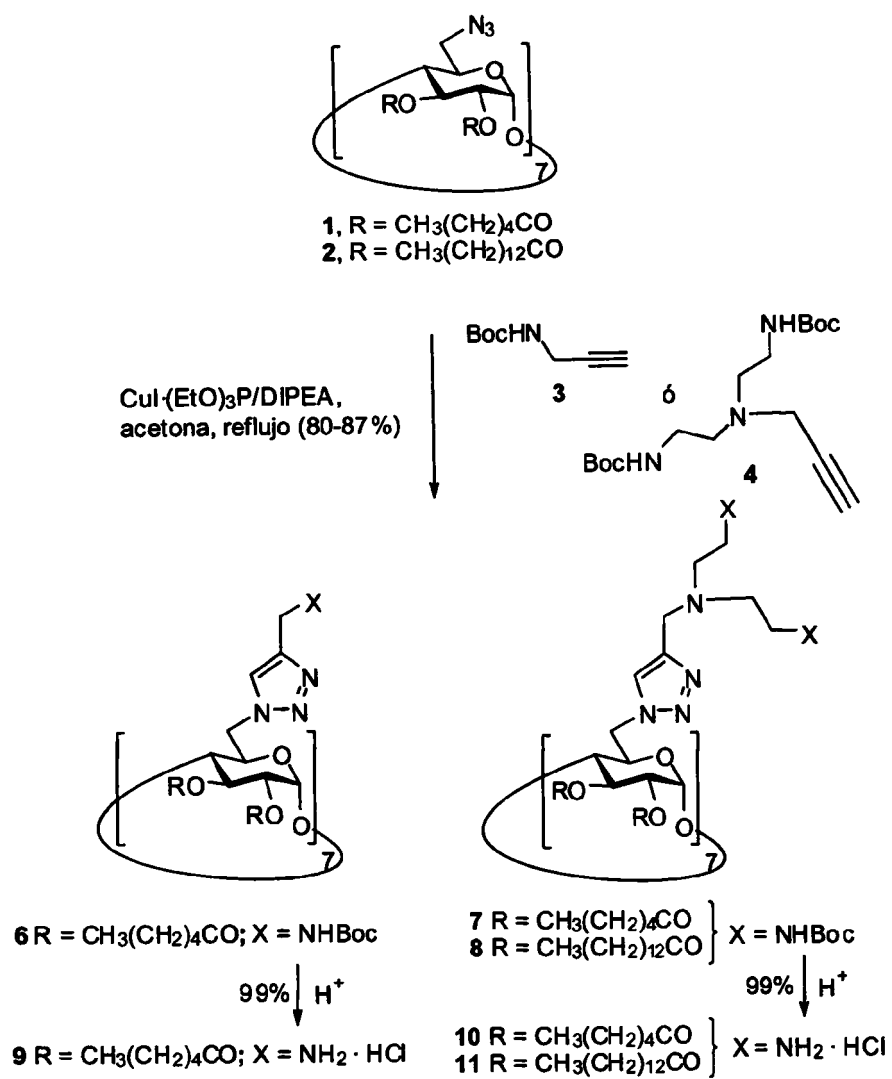


FIG.1

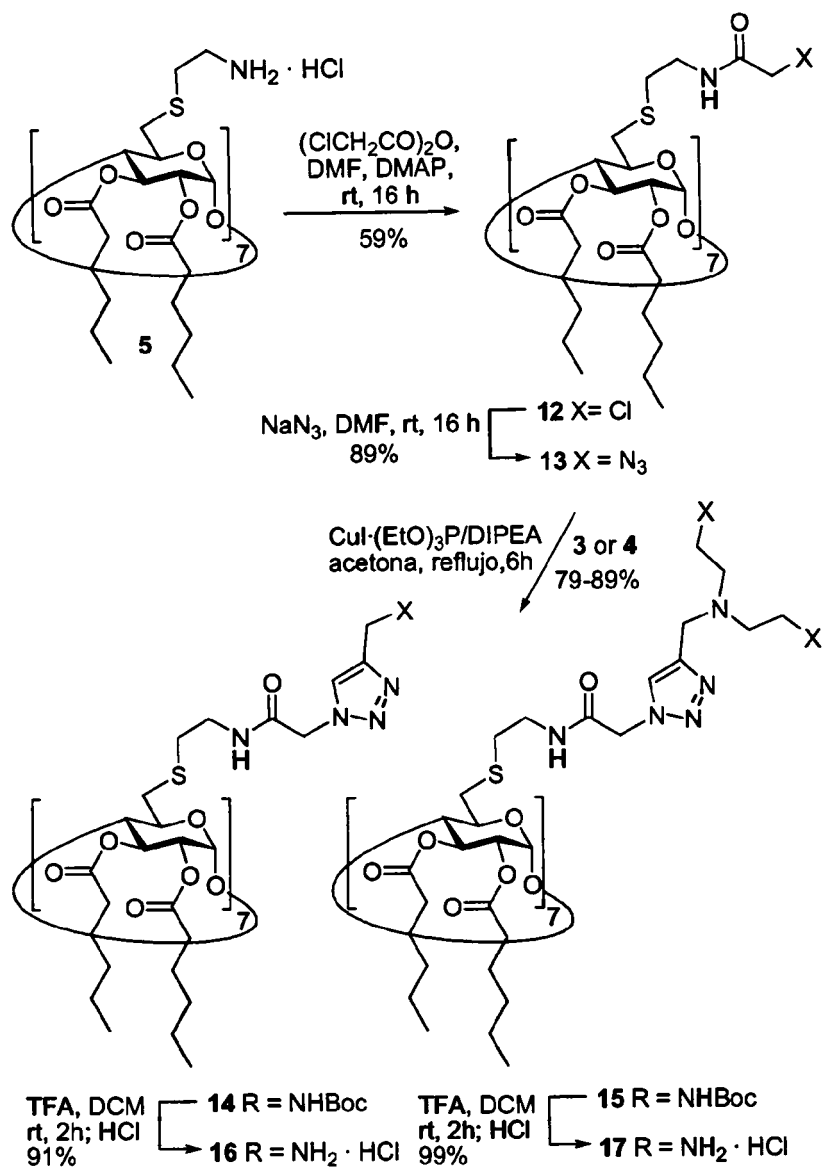


FIG.2

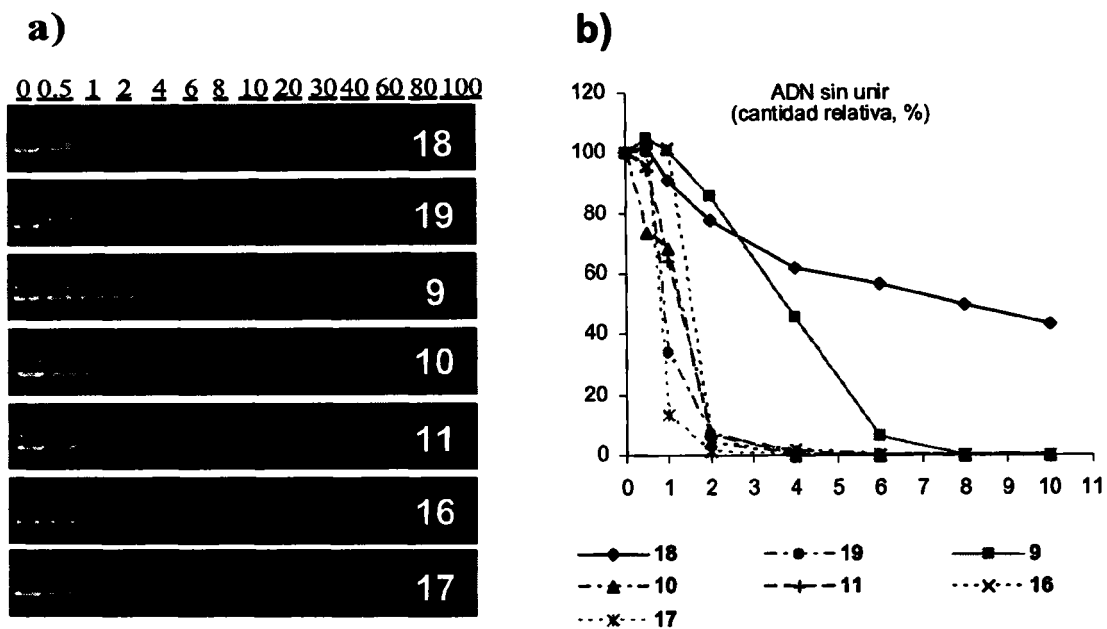


FIG. 3

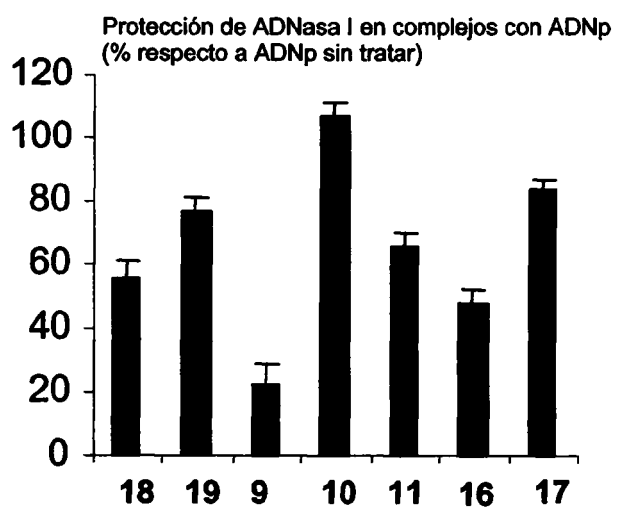


FIG. 4

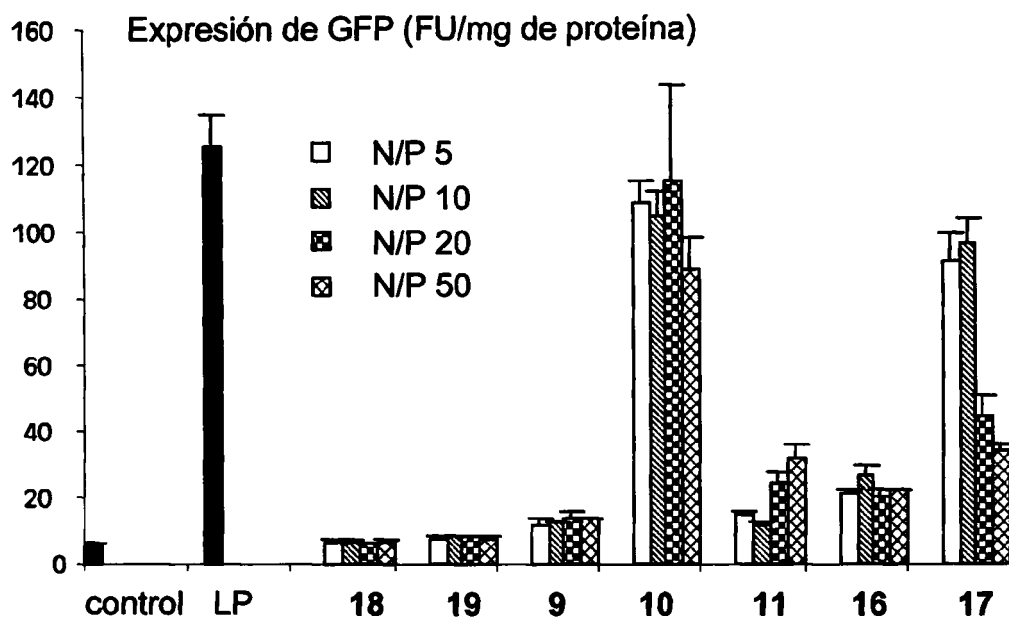


FIG.5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 506

② N° de solicitud: 200900979

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.04.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SRINIVASACHARI, S. et al. "Polycationic beta-cyclodextrin "Clic Clusters": Monodisperse and Versatile Scaffolds for Nucleic Acid Delivery". Journal of the American Chemical Society 2008, Volumen 130, Número 14, páginas 4618-4627. [Disponible en línea el 14.03.2008]. Ver página 4618, resumen e introducción; página 4620, esquema 3; fórmulas 8 y 9; página 4626, conclusión.	1-24
X	WO 2008009831 A2 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS) 24.01.2008, página 1, líneas 6-10; página 3, fórmula (I); página 8, fórmula (III); página 9, líneas 9-29, fórmula (IV); página 13, líneas 3-6; página 21, líneas 8-17.	1-24
A	US 20070142324 A1 (PERLY, B. et al.) 21.06.2007, página 1, fórmula (I); reivindicaciones.	1
A	PIETRZIK, N. et al. "Dimerization of propargyl and homopropargyl 6-azido-6-deoxy-glycosides upon 1,3-dipolar cycloaddition". Beilstein Journal of Organic Chemistry 2008, Volumen 4, Número 30. Ver especialmente página 1, resumen; páginas 4-5, tabla 1.	1
A	MUNTEANU, M. et al. "Supramolecular structures based on dimeric combinations of cyclodextrin and adamantane via click chemistry". Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 2008, Volumen 62, páginas 197-202. Ver página 197, resumen e introducción; página 198, esquema 1, compuesto 3.	1

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

27.09.2010

Examinador

G. Esteban García

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C08B 37/16 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

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

C08B, C12N, 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, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, EMBASE, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-24	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 ha sido publicada.

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	J. Am. Chem. Soc. 2008, Vol. 130, N° 14, pp. 4618-4627	14-03-2008
D02	WO 2008/009831 A2	24-01-2008

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

El objeto de la invención es una serie de compuestos de fórmula (I) con estructura de ciclooligosacárido, su uso como transportadores de moléculas al interior de una célula procariota o eucariota y la composición farmacéutica que comprende dicho compuesto de fórmula (I).

El documento D01 divulga una serie de "click clusters" de beta-ciclodextrinas policatiónicas multivalentes y su uso como transportadores de pDNA. Estas moléculas presentan un núcleo de beta-ciclodextrina que les confiere una arquitectura biocompatible multivalente y unas cadenas de oligoetilenamina que facilitan su unión al DNA, la encapsulación y absorción celular, lo que les proporciona aplicación como vehículos transportadores de fármacos y en terapia génica (ver página 4618, resumen e introducción; página 4626, conclusión).

En concreto, en este documento se divulgan los clusters de fórmulas 8 y 9, obtenidos por reacción de la per-azido-beta-ciclodextrina acetilada 4 con dendrones que poseen un grupo acetileno terminal y aminas secundarias protegidas en forma de carbamato (NHBOC), que presentan un anillo de 1,2,3-triazol como enlazador o "linker" entre el núcleo oligosacárido y los restos de etilén o polietilénamina aportados por los dendrones (ver página 4620, esquema 3).

Estos compuestos de fórmula 8 se diferencian del compuesto de la invención en que dichas cadenas de (poli)etilénamina se encuentran unidas a la posición 4 del anillo de triazol a través de un grupo C=O, mientras que en el compuesto de la invención lo hacen por medio de un grupo CH₂.

El documento D02 divulga derivados de ciclodextrinas anfífilas de fórmula (I) y su aplicación en el campo farmacéutico, cosmético y alimentario, particularmente para la transferencia de ácidos nucleicos a las células (ver página 1, líneas 6-10; página 3). Entre los compuestos divulgados se encuentran las per(6-azido-6-desoxi)ciclodextrinas de fórmula (III), que pueden utilizarse como productos de partida para la preparación de otras ciclodextrinas neutras o catiónicas, debido a la reactividad del grupo azida, capaz de participar en una reacción de adición 1,3-dipolar, catalizada por el catión Cu(II), con un alquino, lo que permite la introducción de una gran variedad de sustituyentes a través de un ciclo de 1,2,3-triazol (ver página 8, fórmula (III); página 21, líneas 8-17).

En este documento se divulgan también compuestos de fórmula (IV), que poseen un grupo -CH₂S- como puente entre el anillo de ciclomaltosa y la cadena de poliamina (ver página 9, líneas 9-29), y que además pueden presentar en dicha cadena lateral un sustituyente o elemento de reconocimiento celular, como puede ser un péptido o un derivado de un mono o un oligosacárido (ver página 11, líneas 6-26), o bien una sonda fluorescente o radioactiva que permita la visualización y detección del sistema (ver página 13, líneas 3-6).

Aunque ninguno de los documentos citados divulga los compuestos de la invención, en ellos sí se recogen compuestos muy cercanos estructuralmente con la misma actividad biológica. Teniendo en cuenta que el problema técnico que plantea la solicitud es la provisión de compuestos alternativos a los ya existentes en el estado de la técnica con actividad como transportadores de moléculas al interior de una célula, y a la vista de los compuestos divulgados en D01, se considera que el experto en la materia se plantearía los compuestos de la invención como alternativas evidentes a los compuestos conocidos, más aún considerando que en el documento D02 se recoge la posibilidad de modificación de las cadenas laterales del núcleo ciclooligosacárido con grupos tioalquilo diferentemente sustituidos.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-24 carece de actividad inventiva con respecto a lo divulgado en cada uno de los documentos D01 y D02 (Artículo 8.2 de la Ley de Patentes).