

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 021 807**

21 Número de solicitud: 202330973

51 Int. Cl.:

C07F 7/18 (2006.01)

C08L 101/10 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

24.11.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.05.2025

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.00%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

GÓMEZ CASANOVA, Natalia;
HEREDERO BERMEJO, Irene;
COPA PATIÑO, José Luis;
PÉREZ SERRANO, Jorge;
SOLIVERI DE CARRANZA, Juan;
VERDÚ EXPÓSITO, Cristina;
DE LA MATA DE LA MATA, F. Javier y
SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ, Javier

54 Título: **DENDRÍMERO CARBOSILANO Y SU USO PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN SUSPENSIÓN O EN BIOPELÍCULA**

57 Resumen:

Dendrímtero carbosilano y su uso para la eliminación de microorganismos patógenos en suspensión o en biopelícula.

Es objeto de la invención un dendrímtero carbosilano catiónico que comprende un núcleo ciclotetrasiloxano, donde cada silicio del núcleo se encuentra unido mediante una estructura carbosilano $(CH_2)_2\{Si(Me)_2\}(CH_2)_2S(CH_2)_2$ a una estructura periférica que comprende un grupo amonio unido mediante una cadena alquílica $(CH_2)_2$ a un grupo hidroxilo. Es asimismo objeto de la invención el uso de dicho dendrímtero para la eliminación de al menos una especie de microorganismo patógeno, bien en suspensión o bien adherido a una superficie, formando una biopelícula, así como vehículo de transporte de al menos un fármaco. Adicionalmente, es objeto de la invención el dendrímtero para su uso como medicamento o en la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad causada por al menos un microorganismo patógeno.

ES 3 021 807 A1

DESCRIPCIÓN

DENDRÍMERO CARBOSILANO Y SU USO PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN SUSPENSIÓN O EN BIOPELÍCULA

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere a la erradicación de células en suspensión y adheridas a una superficie, incluidas biopelículas mixtas (levaduras y bacterias en un cultivo común), utilizando un dendrímero carbosilano catiónico que presenta en su periferia grupos amonio modificados con una función hidroxilo (compuesto BDNG001).

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La eliminación de microorganismos patógenos, especialmente los más preocupantes y de alta relevancia clínica, es un proceso cada vez más complejo debido a la aparición de resistencias microbianas. Por ello, los tratamientos empleados requieren la utilización de compuestos altamente tóxicos o el uso de concentraciones tremendamente elevadas para conseguir su completa erradicación, sobre todo si estos microorganismos son eucariotas o se presentan en forma de biopelículas microbianas. Por ello, es imprescindible el desarrollo de nuevas alternativas capaces de favorecer la eliminación de microorganismos potencialmente problemáticos, minimizando el impacto medioambiental y, en particular, los efectos secundarios en las personas que reciben dichas terapias antimicrobianas.

15

20

El uso de sistemas dendríticos con actividad antibacteriana y antifúngica está ampliamente reconocido en la literatura (de la Mata, F.J. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 2022, e1871). De igual forma, se ha observado su actividad antibiopelículas con prometedores resultados (Heredero-Bermejo, I *et al. Pharmaceutics*. **2020**,12(10):918; Gómez-Casanova, N. *et al. J Fungi (Basel)*. **2021**, 7(7):574; Gómez-Casanova, N. *et al. Pharmaceutics* **2022**, 14, 1604). Generalmente, estos compuestos son sistemas que presentan cargas positivas en la periferia junto con un esqueleto hidrofóbico, como por ejemplo carbosilano (CBS), que facilita la interacción con la membrana bacteriana. Una importante ventaja de los sistemas dendríticos es que son moléculas polifuncionales de estructura bien definida (de la Mata, F.J. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 2022, e1871).

25

30

La formación de estas moléculas suele realizarse por una serie de pasos repetitivos en los que se aumenta cada vez el grado de funcionalización del sistema dendrítico, dando lugar

35

a moléculas de naturaleza globular con ramas que surgen a partir de un grupo multivalente central.

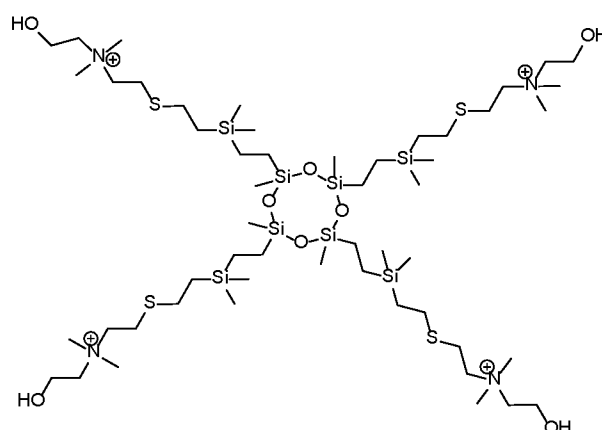
El proceso de tratar y eliminar las levaduras es bastante complejo y complicado, y esto especialmente se debe a que se trata de células eucariotas. Por ello, la mayor parte de los antifúngicos utilizados en la actualidad son altamente tóxicos para las células de la persona tratada, las cuales en ocasiones pueden llegar a ser también dianas de estos tratamientos (Kagan, S. *et al. Antimicrob Agents Chemother.* **2012**, 56(11):5603-11). Sumado a lo expuesto, las biopelículas, especialmente las biopelículas mixtas formadas por levaduras y bacterias, son un problema incluso mayor, debido a que su tratamiento requiere concentraciones muy elevadas de compuesto para ser destruidas en su totalidad (Lara HH, *et al. Pathogens.* **2020**, 9(10):784).

La presente invención surge por tanto de la necesidad de proporcionar una innovadora solución para eliminar microorganismos, tanto en su forma planctónica, como en estado de biopelículas. De este modo, la invención proporciona un nuevo compuesto capaz de actuar activamente como principio activo de antisépticos y/o desinfectantes, siendo eficaz tanto para el tratamiento de una sola especie, como para el tratamiento de comunidades microbianas formadas por diferentes especies.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El compuesto al que se refiere la invención es un sistema dendrítico CBS, similar a los descritos en WO2014016460, pero en esta invención es un sistema dendrítico catiónico con grupos hidroxilo en la periferia unido al grupo amonio por una cadena alquílica.

En particular, es un primer objeto de la invención un dendrímero carbosilano catiónico (en adelante, también denominado BDNG001) que comprende un núcleo ciclotetrasiloxano, donde cada silicio del núcleo se encuentra unido mediante una estructura carbosilano $(CH_2)_2\{Si(Me)_2\}(CH_2)_2S(CH_2)_2$ a una estructura periférica que comprende un grupo amonio unido mediante una cadena alquílica $(CH_2)_2$ a un grupo hidroxilo, de acuerdo a la siguiente fórmula:



Por "compuesto dendrítico" se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada donde las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carbosilano.

En particular, el dendrímero objeto de la presente invención es catiónico. Por lo tanto, puede comprender contraiones para neutralizar su carga. De este modo, en realizaciones particulares de la invención, el dendrímero reivindicado comprenderá al menos un anión seleccionado de un grupo que consiste en al menos un haluro (preferentemente, cloruro, bromuro o yoduro), hidróxido, triflato, nitrato y sulfato, así como cualquiera de sus combinaciones.

Es asimismo objeto de la invención el uso del dendrímero carbosilano reivindicado (o una composición farmacéutica que lo comprenda) como antibacteriano o antifúngico, es decir, para la eliminación de microorganismos patógenos (incluyendo levaduras y bacterias), bien en suspensión en un medio líquido (como células planctónicas) o bien adheridas a una superficie, en estado de biopelícula. Por "biopelícula" se entiende un conjunto de células altamente organizadas que se encuentran adheridas a una superficie, la cual puede ser biótica o abiótica. Las biopelículas pueden estar formadas por una única especie de microorganismo, o varias, rodeadas por una matriz extracelular. Es tremendamente complicado erradicar una biopelícula, especialmente si ésta ya se ha establecido, y esta dificultad es aún mayor cuando se trata de biopelículas mixtas, es decir, aquellas formadas por más de una especie. Su tratamiento está muy limitado debido a que, o bien son tóxicos los compuestos, o se requieren altas concentraciones del biocida para eliminarlas. Además, su presencia aumenta la adquisición de resistencias, otro gran problema que se encuentra en la actualidad. De este modo, una de las principales ventajas de la invención es que ha demostrado ser eficaz para tratar biopelículas mixtas, es decir, de distintos

microorganismos como levaduras y bacterias. La efectividad del compuesto frente a biopelículas se ha demostrado con métodos colorimétricos y de siembra en agar. El dendrímero reivindicado es completamente soluble en agua y no presenta ningún tipo de interacción con los medios requeridos para el estudio de los microorganismos *in vitro*.

5 Adicionalmente, se trata de un compuesto de escasa citotoxicidad.

De manera particular, la composición farmacéutica que comprenda al dendrímero objeto de la invención podrá comprender adicionalmente al menos un segundo principio activo seleccionado de un grupo que consiste en un antibiótico, antiinflamatorio y antiviral, así
10 como cualquiera de sus combinaciones.

Es asimismo objeto de la invención un método para la eliminación de al menos una biopelícula constituida por una única especie de microorganismos o por al menos dos especies distintas de microorganismos, bien durante su formación o bien una vez
15 constituida, caracterizado por que comprende aplicar a la biopelícula una disolución (preferentemente acuosa) del dendrímero objeto de la invención durante un tiempo preferentemente comprendido entre 1 hora y 72 horas.

Adicionalmente, es objeto de la invención el dendrímero carbosilano catiónico objeto de la
20 invención para su uso como medicamento, así como para su uso en la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad causada por al menos un microorganismo patógeno.

Asimismo, es objeto de la invención el uso del dendrímero reivindicado para la fabricación
25 de un medicamento para el tratamiento de al menos una enfermedad causada por al menos un microorganismo patógeno.

Finalmente, es objeto de la invención el uso del dendrímero reivindicado como vehículo de transporte de al menos un fármaco, preferentemente con propiedades antibacterianas y/o
30 antifúngicas.

NOMENCLATURA EN BIOPELÍCULAS

La nomenclatura que es definida a continuación para las biopelículas ha sido previamente estandarizada en diversas publicaciones anteriormente mencionadas, así como en un
35 capítulo de libro (Gómez-Casanova, N., Candida and Candidiasis, **2022**, capítulo en *IntechOpen*). Los compuestos dendríticos con estas características han sido evaluados

utilizando el método colorimétrico con resazurina basado en el metabolismo celular para cuantificar la viabilidad de las células de las biopelículas (método cuantitativo), y el *drop plate method* (siembra en placas de agar, método cualitativo).

5 Nomenclatura para el tratamiento de biopelículas en formación:

- CMIB: Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelícula, definida como la mínima concentración capaz de inhibir la formación de una biopelícula, pero que podría no matar las células. Se determina con el método colorimétrico con resazurina.
- CMBB o CMFB: Concentración Mínima Bactericida o Fungicida de Biopelícula, definida como la mínima concentración capaz de impedir la formación de una biopelícula y matar el total de las células. Se determina por el *drop plate method*.

Nomenclatura para el tratamiento de biopelículas previamente establecidas:

- CMDB: Concentración Mínima que Daña una Biopelícula, definida como la mínima concentración capaz de dañar gravemente una biopelícula establecida, pero que podría no matar todas las células. Se determina por el método colorimétrico con resazurina.
- CMEB: Concentración Mínima de Erradicación una Biopelícula, definida como la mínima concentración capaz de erradicar completamente una biopelícula previamente establecida. En este caso, todas las células que componen la biopelícula estarían muertas. Se trata del objetivo más complicado de alcanzar en los estudios *in vitro* e *in vivo* de nuevos compuestos. Se determina por el *drop plate method*.

25 **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Porcentaje de viabilidad de BDNG001 en biopelículas previamente establecidas de *C. albicans*.

Figura 2. Porcentaje de viabilidad de BDNG001 en biopelículas previamente establecidas de *S. aureus*.

30 **Figura 3.** Porcentaje de viabilidad de BDNG001 en biopelículas mixtas previamente establecidas de *C. albicans* y *S. aureus*.

Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular en la línea celular HeLa de BDNG001 a las 24 horas.

35 **Figura 5.** Porcentaje de viabilidad celular en la línea celular HeLa de BDNG001 a las 48 horas.

EJEMPLOS

A continuación, se describen los procedimientos de síntesis del dendrímero catiónico BDNG001, así como el estudio de su actividad antifúngica, antibacteriana y antibiopelículas de algunos microorganismos patógenos.

5

Ejemplo 1.- Síntesis del dendrímero BDNG001 ($G_0Si_4O_4Si(S-NMe_2OHBr)_4$).

Este compuesto se puede obtener a partir de $G_0Si_4O_4Si(S-NMe_2)_4$ (0.150 g, 0.13 mmol) (Heredero-Bermejo et al. *Pharmaceutics* 2020, 12, 918) por reacción con $Br(CH_2)_2OH$ (0.077 g, 0.62 mmol), sin descartar otros agentes que introduzcan el grupo etanol, preferentemente en THF (tetrahidrofurano) como disolvente, u otros como DMF (dimetilformamida), acetona, DMSO (dimetilsulfóxido), calentando durante varios días (ej. 3 días a 60°C). El producto **BDNG001** se obtiene como un sólido amarillo pálido.

10

Ejemplo 2.- Actividad microbiana de BDNG001 en células planctónicas

Se propone la utilización del compuesto de la invención, BDNG001, sistema dendrítico con grupos –OH en su periferia, para el tratamiento de microorganismos, tanto procariotas (bacterias) como eucariotas (hongo levaduriforme), como alternativa a los fármacos de uso tradicional empleados frente a dichos microorganismos. El compuesto es apto para la evaluación de su actividad antibacteriana basándose en la ISO 20776-1:2006. Para ello, las bacterias fueron crecidas en medio líquido Mueller Hinton y, tras 24 horas de incubación, la cantidad de microorganismo fue ajustada a un inóculo de 10^8 UFC/mL en bacterias. A continuación, 2 mL del inóculo ajustado fue añadido a 8 mL de agua destilada estéril. Finalmente, en una placa multipocillos se adicionaron 100 µL de compuesto, 100 µL de medio Mueller Hinton dos veces concentrado y 5 µL del inóculo ajustado. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, la absorbancia se cuantificó a 630 nm.

20

25

Por otro lado, los métodos estandarizados para el estudio de la sensibilidad antifúngica se basan en la *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Para ello, las levaduras fueron crecidas en una placa de agar de Sabouraud. Después, se recolectaron varias colonias y se homogenizó en agua destilada estéril hasta alcanzar una densidad de 0,5 McFarland (10^6 UFC/mL) (inóculo). Después, se realizó una dilución 1:10 en medio dos veces concentrado de RPMI-1640, suplementado con MOPS y glucosa. Finalmente, en una placa multipocillos se añadieron 100 µL del compuesto y 100 µL del inóculo ajustado. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, fueron analizadas a 530 nm.

30

35

Al ser un compuesto soluble en agua, no requiere de ningún procedimiento para mejorar su solubilidad durante el proceso de testado. Tanto en bacterias como levaduras, se probaron gradientes de concentración hasta 512 mg/L. Cada concentración se realizó por triplicado, así como el control de bacteria sin tratamiento. Pocillos de control de agua, medio de cultivo y compuesto también fueron incorporados para controlar las posibles contaminaciones o interferencia del compuesto en la lectura de la absorbancia.

Para estos ensayos se ha utilizado una cepa de *Candida albicans* de la Colección Española de Cepas Tipo (CECT1002), una de *Staphylococcus aureus* (CECT240) y una de *Escherichia coli* (CECT515).

Ejemplo 3.- Actividad de BDNG001 sobre biopelículas bacterianas y fúngicas en formación y establecidas

Se propone la utilización del compuesto de la invención, BDNG001, sistema dendrítico con grupos –OH en su periferia, para el tratamiento de biopelículas bacterianas y fúngicas como alternativa a los fármacos de uso tradicional. El compuesto es apto para la evaluación de su actividad frente a biopelículas en desarrollo, como biopelículas establecidas. Los procedimientos y nomenclatura comúnmente utilizada para testar la actividad antibiopelículas queda recogida en Heredero-Bermejo, I et al. *Pharmaceutics*. **2020**,12(10):918; Fernandez, J. et al. *Polymers (Basel)*. **2021**, 13(13):2127; Gómez-Casanova, N. et al. *J Fungi (Basel)*. **2021**, 7(7):574; Gómez-Casanova, N., Candida and Candidiasis, **2022** Capitulo en *IntechOpen*). Para estos ensayos se utilizó como cepa representativa eucariota a la levadura *C. albicans* (CECT 1002) y como cepa representativa procariota a la bacteria *S. aureus* (CECT240).

Las biopelículas pueden ser tratadas antes de que se generen, como prevención de la formación de la biopelícula, o una vez establecidas. Para el tratamiento de biopelículas en formación en *S. aureus* (bacteria) las células fueron crecidas en medio Mueller Hinton. Al día siguiente, se ajustó el inóculo a 0,5 McFarland. A continuación, se realizó una dilución 1:100 en medio *Tryptic Soy Broth* suplementado con glucosa dos veces concentrado. Finalmente, en una placa Nunc multipocillos de fondo plano se añadieron 50 µL de compuesto BDNG001 y 50 µL de la suspensión bacteriana. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente lavadas con *phosphate buffered saline* (PBS). Después, 100 µL de PBS fue añadido a cada pocillo junto con 20 µL de resazurina al 0,01% (previamente esterilizada por filtración). Las microplacas fueron incubadas durante 20 horas en oscuridad y fue medida a 570 nm y 600

nm. Estos datos proporcionaron el valor de la CMIB. Por último, 5 µL de cada pocillo se sembraron en *plates count agar* (PCA) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Estos datos proporcionaron el valor de la CMBB.

- 5 Por otro lado, los métodos estandarizados para el estudio de biopelícula en desarrollo de levaduras presentan ligeras diferencias. *Candida* fue crecida en medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) toda la noche y fue ajustada a 0,5 McFarland en medio RPMI-1640 suplementado con MOPS y glucosa. Después, en una placa Nunc multipocillos de fondo plano se añadieron 50 µL de compuesto BDNG001 y 50 µL de la suspensión
- 10 fúngica. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente lavadas con PBS. Después, 100 µL de PBS fueron añadidos a cada pocillo junto con 20 µL de resazurina al 0,01%. Las placas multipocillos fueron incubadas durante 20 horas en oscuridad y fue medida a 570 nm y 600 nm. Estos datos proporcionaron el valor de CMIB. Por último, 5 µL de cada pocillo fueron sembrados
- 15 en placas de agar Sabouraud e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Estos datos proporcionaron el valor de la CMFB.

- Tanto en bacterias como levaduras, se probaron gradientes de concentración hasta 512 mg/L (máxima concentración probada). Cada concentración se realizó por triplicado, así
- 20 como el control de bacteria sin tratamiento. Pocillos de control de agua, medio de cultivo y compuesto también fueron incorporados para controlar las posibles contaminaciones o interferencia del compuesto en la lectura de la absorbancia.

- Para el tratamiento de biopelículas previamente establecidas en *S. aureus*, las células
- 25 fueron crecidas en medio Mueller Hinton toda la noche. Al día siguiente, se ajustó el inóculo a 0,5 McFarland. A continuación, se realizó una dilución 1:100 en medio *Tryptic Soy Broth* suplementado con glucosa. Después, en una placa Nunc multipocillos de fondo plano se añadieron 100 µL de la suspensión bacteriana. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente lavadas
- 30 con PBS y se procedió al tratamiento con el compuesto BDNG001. Las placas multipocillos fueron nuevamente incubadas durante 24 horas a 37 °C. Finalmente, pasado este tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente lavadas de nuevo con PBS. Después, 100 µL de PBS fue añadido a cada pocillo junto con 20 µL de resazurina al 0,01%. Las placas multipocillo fueron incubadas durante 20 horas en oscuridad y fueron medida a 570 nm y
- 35 600 nm. Estos datos proporcionaron el valor de la CMDB. Por último, 5 µL de cada pocillo

fueron sembrados en placas de agar PCA e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Estos datos proporcionaron el valor de la CMEB.

Por otro lado, los métodos estandarizados para el estudio de biopelícula previamente establecidas de levaduras vuelven a presentar ligeras diferencias. *Candida* fue crecida en medio YPD toda la noche y fue ajustada a 0,5 McFarland en medio RPMI-1640 suplementado con MOPS y glucosa. Finalmente, en una placa Nunc multipocillos de fondo plano se añadieron 100 µL de la suspensión fúngica. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente lavadas con PBS y tratadas con el gradiente de concentraciones del compuesto BDNG001. Nuevamente, las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, los pocillos fueron lavados con PBS. Después, 100 µL de PBS fue añadido a cada pocillo junto con 20 µL de resazurina al 0,01%. Las placas multipocillos fueron incubadas durante 20 horas en oscuridad y la absorbancia se cuantificó a 570 nm y 600 nm. Estos datos proporcionaron el valor de CMDDB. Por último, 5 µL de cada pocillo fueron sembrados en placas de agar Sabouraud e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Estos datos proporcionaron el valor de la CMEB.

Tanto en bacterias como levaduras, se probaron gradientes de concentración hasta 1024 mg/L (máxima concentración estudiada). Cada concentración se realizó por triplicado, así como el control de bacteria sin tratamiento. Pocillos de control de agua, medio de cultivo y compuesto también fueron incorporados para controlar las posibles contaminaciones o interferencia del compuesto en la lectura de la absorbancia.

Ejemplo 4.- Actividad de BDNG001 sobre biopelículas mixtas en formación y establecidas

Se propone la utilización del compuesto e la invención, BDNG001, sistema dendrítico con grupos –OH en su periferia, para el tratamiento de biopelículas mixtas como alternativa a los fármacos de uso tradicional. El compuesto BDNG001 fue testado sobre biopelículas mixtas eucariota + procariota, siendo *C. albicans* representante eucariota y *S. aureus* microorganismo procariota. Los resultados obtenidos se basaron como anteriormente fue mencionado, bajo la nomenclatura descrita por el capítulo Gómez-Casanova, N., *Candida and Candidiasis*, 2022 Capítulo en *IntechOpen* y diversos artículos recogidos en la literatura (Heredero-Bermejo, I et al. *Pharmaceutics*. 2020,12(10):918; Fernandez, J. et al.

Polymers (Basel). **2021**, 13(13):2127; Gómez-Casanova, N. et al. *J Fungi (Basel)*. **2021**, 7(7):574).

Para el tratamiento de biopelículas mixtas en formación se deben ajustar inicialmente el
 5 inóculo de cada especie por separado. En primer lugar, se ajustó la especie *S. aureus*
 (bacteria), previamente crecida en medio líquido Mueller Hinton, a 0,5 McFarland. A
 continuación, se realizó una dilución 1:100. En segundo lugar, *C. albicans* (levadura),
 previamente crecida en medio YPD, fue ajustada a 0,5 McFarland en medio. Finalmente,
 se mezclaron a partes iguales ambas especies, quedando el inóculo ajustado (1:1). El
 10 experimento se realizó usando medio RPMI-1640. Homogeneizada la mezcla, se procedió
 a añadir 50 µL del inóculo suspensión y 50 µL de compuesto en una placa Nunc
 multipocillos de fondo plano. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C.
 Transcurrido ese tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente lavadas con PBS.
 Después, 100 µL de PBS fue añadido a cada pocillo junto con 20 µL de resazurina al 0,01%
 15 (previamente esterilizada por filtración). Las placas multipocillos fueron incubadas durante
 20 horas en oscuridad y la absorbancia se valoró a 570 nm y 600 nm. Estos datos
 proporcionaron el valor de la CMIB. Por último, 5 µL de cada pocillo se sembraron en placas
 de agar PCA y agar Sabouraud y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Estos datos
 proporcionaron el valor de la CMBB/CMFB. Se probaron gradientes de concentración hasta
 20 512 mg/L (máxima concentración probada).

Para el tratamiento de biopelículas mixtas previamente establecidas se debe ajustar
 inicialmente el inóculo de cada especie por separado. En primer lugar, se ajustó la especie
S. aureus (bacteria), previamente crecida en medio líquido Mueller Hinton, a 0,5 McFarland.
 25 A continuación, se realizó una dilución 1:100. En segundo lugar, *C. albicans* (levadura),
 previamente crecida en medio YPD, fue ajustada a 0,5 McFarland. Finalmente, se
 mezclaron a partes iguales ambas especies ajustadas (1:1). El experimento se realizó
 usando medio RPMI. Homogeneizada la mezcla, se procedió a inocular 100 µL de
 suspensión en una placa Nunc multipocillos de fondo plano. Las placas fueron incubadas
 30 durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente
 lavadas con PBS y se procedió al tratamiento con el compuesto BDNG001. Las placas
 multipocillos fueron nuevamente incubadas durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese
 tiempo, las biopelículas fueron cuidadosamente lavadas de nuevo con PBS. Después, 100
 µL de PBS fueron añadidos a cada pocillo junto con 20 µL de resazurina al 0,01%
 35 (previamente esterilizada por filtración). Las placas multipocillos fueron incubadas durante
 20 horas en oscuridad y la absorbancia se cuantificó a 570 nm y 600 nm. Estos datos

proporcionaron el valor de la CMDB. Por último, 5 µL de cada pocillo se sembraron en placas de agar PCA y agar Sabouraud y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Estos datos proporcionaron el valor de la CMEB. Se probaron gradientes de concentración hasta 1024 mg/L (máxima concentración estudiada).

5

En ambos procedimientos, tratamiento de biopelículas mixtas en formación y biopelículas mixtas previamente establecidas, cada concentración se realizó por triplicado, así como el control de bacteria sin tratamiento. Pocillos de control de agua, medio de cultivo y compuesto también fueron incorporados para controlar las posibles contaminaciones o interferencia del compuesto en la lectura de la absorbancia.

10

Ejemplo 5.- Biocompatibilidad del BDNG001

La biocompatibilidad del compuesto principal de la invención, BDNG001, fue estudiada. Para ello, se utilizaron células HeLa (ATCC[®] CCL- 2TM). Los ensayos se realizaron en placas de 24 pocillos (NUNC[™]) en medio Dulbecco's Modified Eagle suplementado con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de una mezcla antibiótica compuesta por: 10.000 U penicilina, 10 mg estreptomicina y 25 µg AmB por mL. Las células fueron ajustadas a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en 500 µL de medio fresco. Las placas fueron incubadas a 37 °C y 5% de CO₂ durante 5 días, hasta obtener una monocapa confluyente. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio fue eliminado y se añadió el gradiente de concentraciones del compuesto diluido en medio fresco. El control sólo contuvo medio fresco. Las placas se incubaron durante 24 y 48 horas. Después, el medio fue eliminado y los pocillos fueron cuidadosamente lavados con PBS. Finalmente, se añadieron 500 µL de medio fresco a cada pocillo y 50 µL de microcultivo de tetrazolio (MTT, 5 mg/mL). Las placas fueron nuevamente incubadas durante 4 horas a 37 °C. Después de la incubación, el medio fue eliminado y se añadieron 500 µL de DMSO para disolver los cristales. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia de los pocillos en una lectora a 570 nm. Estos experimentos también fueron realizados por triplicado y repetidos tres veces.

20

25

30

35

Para la valoración de estos resultados se calculó el porcentaje de viabilidad de las células HeLa. Porcentaje de viabilidad se entiende como: $OD_{570} \text{ compuesto} / OD_{570} \text{ control} \times 100$ (el control es considerado como el 100% de viabilidad). Se consideraron no citotóxicas cuando solo se obtuvo una reducción de viabilidad <10%, valores entre 10–25% fueron considerados como bajo citotóxicos y valores entre 25–40% se consideraron como niveles moderadamente citotóxicos.

RESULTADOS

Los ensayos de actividad del dendrímero objeto de la presente invención se han realizado utilizando preferentemente agua como disolvente, si bien no se descarta la posibilidad de emplear otros disolventes. El uso de agua, sin embargo, elimina el uso de disolventes nocivos por sí mismos para los microorganismos. Esta característica es tremendamente relevante, especialmente en el ámbito fúngico, donde la mayoría de los antimicóticos utilizados en clínica son escasamente solubles en agua. Esta propiedad del dendrímero objeto de la invención favorece su fácil manipulación y uso. Los rangos de concentraciones estudiados preferentemente alcanzan concentraciones máximas de 512 mg/L para células planctónicas y biopelículas microbianas en formación y hasta 1024 mg/L para biopelículas microbianas previamente establecidas.

En los ensayos realizados, se ha testado la actividad antimicrobiana del compuesto principal de la invención, BDNG001, frente a células planctónicas bacterianas (*S. aureus* y *E. coli*) y levaduras (*C. albicans*). Todas las cepas utilizadas pertenecen al stock de la Colección Española de Cepas Tipo (CECT). En la **Tabla 1** se muestran los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y concentración mínima fungida (CMF). Los resultados reflejados en esta tabla avalan la buena actividad antimicrobiana, especialmente frente a *C. albicans*.

Tabla 1. Valores de CMI, CMB y CMF (mg/L) de diferentes microorganismos (una levadura y dos bacterias) usando el principal compuesto de la invención, BDNG001. CECT: Colección Española de Cepas Tipo.

Cepas CECT	CMI	CMB/ CMF
<i>C. albicans</i> CECT1002	2	2
<i>S. aureus</i> CECT240	2-4	4
<i>E. coli</i> CECT515	16	16-32

El principal compuesto de la invención ha sido probado en biopelículas en formación y biopelículas previamente establecidas de microorganismos eucariotas (*C. albicans*) y procariotas (*S. aureus*). El compuesto es fácilmente soluble en agua y no se observan agregados en contacto con los medios de cultivo utilizados. Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios como se puede comprobar en la **Tabla 2**, donde se indican los valores obtenidos para una biopelícula en formación: Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelícula (CMIB), Concentración Mínima Fungida de Biopelícula (CMFB) y

Concentración Mínima Bactericida de Biopelícula (CMBB); y valores para una biopelícula previamente establecida: Concentración Mínima que Daña la Biopelícula (CMDDB) y Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB). Las **Figuras 1 y 2** recogen el porcentaje de viabilidad para cada concentración testada en biopelículas previamente establecidas de *C. albicans* y *S. aureus*.

Tabla 2. Valores de CMIB, CMFB, CMBB, CMDDB y CMEB (mg/L) obtenidos para el compuesto BDNG001.

	Biopelículas en formación		Biopelículas establecidas	
	CMIB	CMBB/CMFB	CMDDB	CMEB
<i>C. albicans</i> CECT1002	4-8	8	16	16
<i>S. aureus</i> CECT240	4	4	64	64

El compuesto de la invención BDNG001 ha sido testado en biopelículas mixtas en formación y biopelículas mixtas previamente establecidas de *C. albicans* (levadura) junto a *S. aureus* (bacteria). Los resultados obtenidos fueron tremendamente satisfactorios como se puede comprobar en la **Tabla 3**, donde se indican los valores obtenidos de una biopelícula mixta en formación de: CMIB y CMBB/CMFB; y valores para una biopelícula formada: CMDDB, CMEB. La **Figura 3** recoge el porcentaje de viabilidad en biopelículas mixtas previamente establecidas para cada concentración testada con BDNG001.

Tabla 3. Valores de CMIB, CMFB/CMBB, CMDDB y CMEB (mg/L) obtenidos para el compuesto BDNG001 en tratamientos de biopelículas mixtas.

BIOPELÍCULA MIXTA DE <i>C. albicans</i> CECT1002 + <i>S. aureus</i> CECT240			
Biopelículas en formación		Biopelículas establecidas	
CMIB	CMBB/CMFB	CMDDB	CMEB
4	8	8	32

Estos resultados obtenidos presentan una gran relevancia. Son muy pocos los estudios que se han realizado sobre biopelículas mixtas. El dendrímero objeto de la presente invención ha logrado erradicar en su totalidad una biopelícula previamente establecida de dos especies completamente diferentes, a bajas concentraciones.

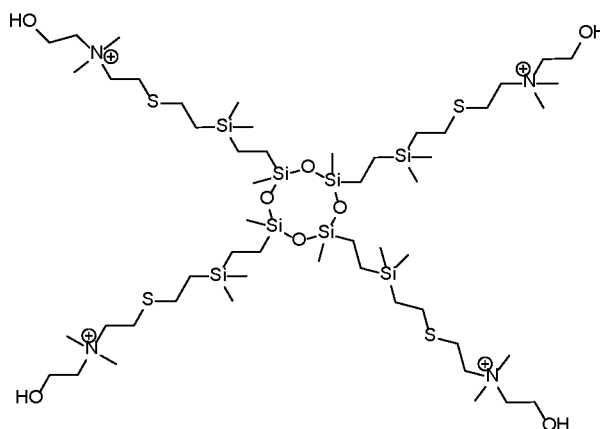
Finalmente, la citotoxicidad producida después de 24 y 48 horas de incubación del compuesto junto con la línea celular HeLa fue evaluada. Esta invención garantiza una ausencia de toxicidad a las principales concentraciones con efecto sobre biopelículas,

incluidas unas de las más complicadas de eliminar, las biopelículas mixtas. Estos resultados aparecen representados en las **Figuras 4 y 5**. En dichas figuras aparecen los porcentajes de viabilidad, demostrando la buena biocompatibilidad que presenta el dendrímero objeto de la presente invención.

5

REIVINDICACIONES

1. Dendrúmero carbosilano catiónico que comprende un núcleo ciclotetrasiloxano, donde cada silicio del núcleo se encuentra unido mediante una estructura carbosilano $(CH_2)_2\{Si(Me)_2\}(CH_2)_2S(CH_2)_2$ a una estructura periférica que comprende un grupo amonio unido mediante una cadena alquílica $(CH_2)_2$ a un grupo hidroxilo, de acuerdo a la siguiente fórmula:



2. Dendrúmero carbosilano, de acuerdo a la reivindicación 1, donde la carga de dicho dendrúmero se encuentra neutralizada por al menos un anión seleccionado de un grupo que consiste en al menos un haluro, hidróxido, triflato, nitrato y sulfato, así como cualquiera de sus combinaciones.

3. Dendrúmero carbosilano, de acuerdo a la reivindicación 2, donde el haluro es seleccionado de un grupo que consiste en cloruro, bromuro y yoduro.

4. Uso de un dendrúmero carbosilano, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la eliminación de al menos una especie de microorganismo patógeno, donde dicho microorganismo se encuentra bien en suspensión o bien adherido a una superficie, formando una biopelícula

5. Uso, de acuerdo a la reivindicación 4, donde dicho microorganismo es seleccionado de un grupo que consiste en levaduras y bacterias.

6. Uso, de acuerdo a la reivindicación 4 o 5, donde la biopelícula está constituida por una única especie de microorganismos o por al menos dos especies distintas de microorganismos.
- 5 7. Método de eliminación de al menos una especie de microorganismo patógeno, caracterizado por que comprende aplicar al microorganismo patógeno una disolución del dendrímero definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 8. Método de eliminación de al menos una biopelícula constituida por una única especie de microorganismos o por al menos dos especies distintas de microorganismos, bien durante su formación o bien una vez constituida, caracterizado por que comprende aplicar a la biopelícula una disolución del dendrímero definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 9. Método de acuerdo a la reivindicación 7 u 8, donde la aplicación de la disolución del dendrímero se lleva a cabo durante un tiempo de entre 1 hora y 72 horas.
- 20 10. Método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la disolución es una disolución acuosa.
11. Dendrímero carbosilano catiónico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento.
- 25 12. Dendrímero carbosilano catiónico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la prevención y/o tratamiento de al menos una enfermedad causada por al menos un microorganismo patógeno.
- 30 13. Uso de una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la eliminación de al menos una especie de microorganismo patógeno, donde dicho microorganismo se encuentra bien en suspensión o bien adherido a una superficie, formando una biopelícula.
- 35 14. Uso de una composición de acuerdo a la reivindicación 13, donde dicha composición comprende adicionalmente al menos un segundo principio activo

seleccionado de un grupo que consiste en un antibiótico, antiinflamatorio y antiviral, así como cualquiera de sus combinaciones.

15. Uso de un dendrímero carbosilano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3
5 como vehículo de transporte de al menos un fármaco.

16. Uso, de acuerdo a la reivindicación 15, donde el fármaco es un fármaco con propiedades antibacterianas y/o antifúngicas.

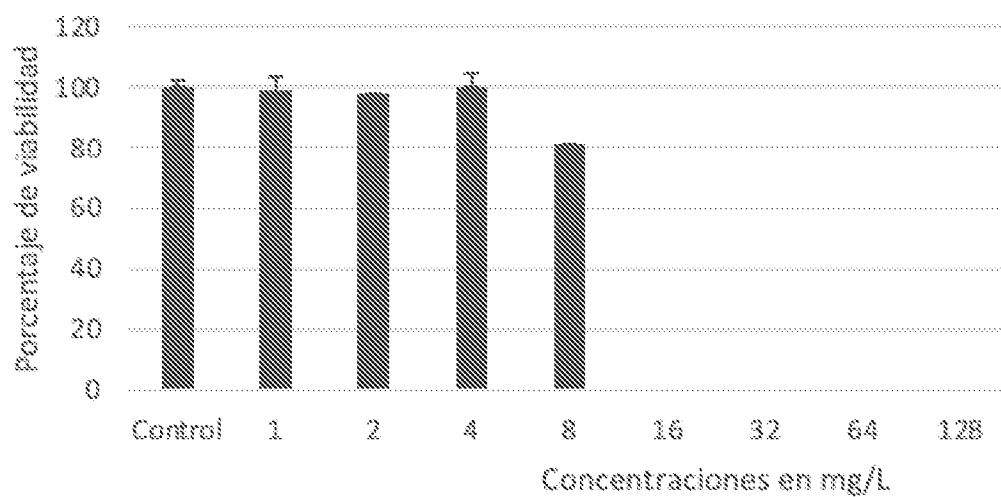


FIG. 1

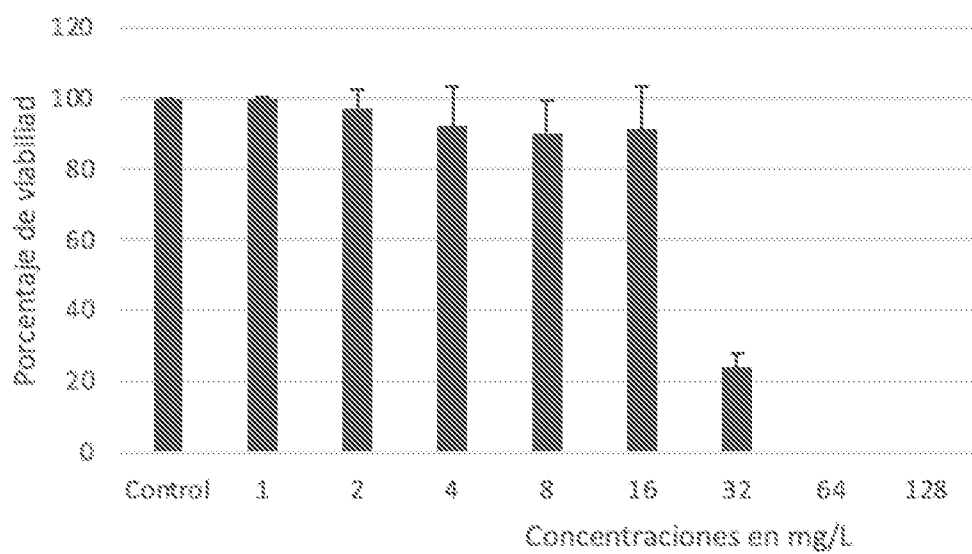


FIG. 2

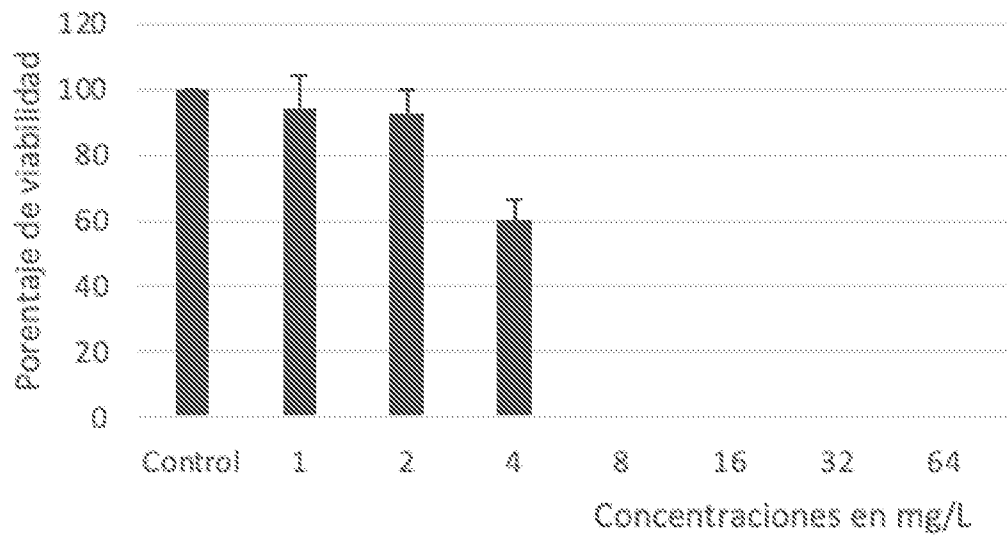


FIG. 3

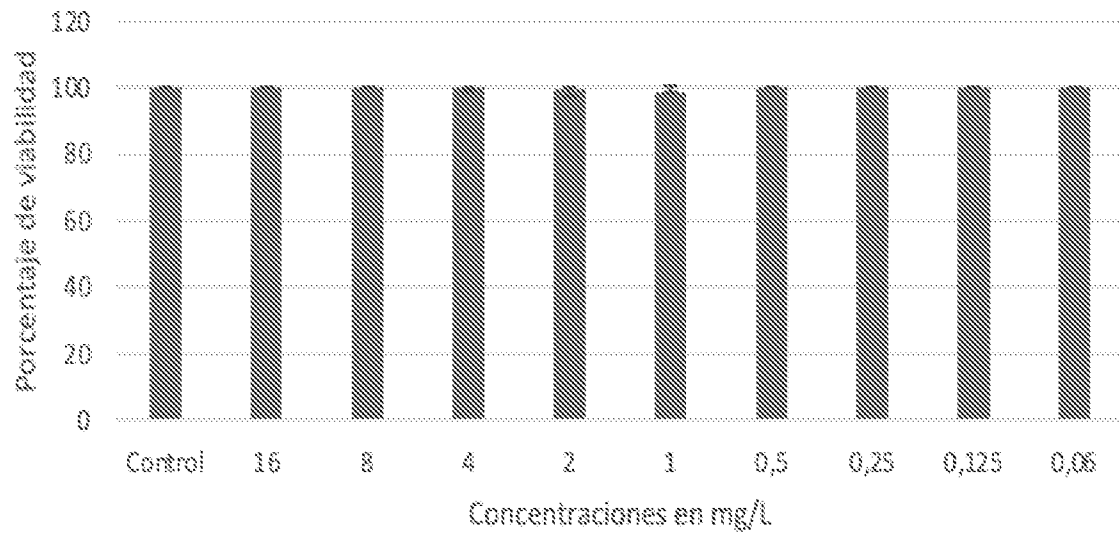


FIG. 4

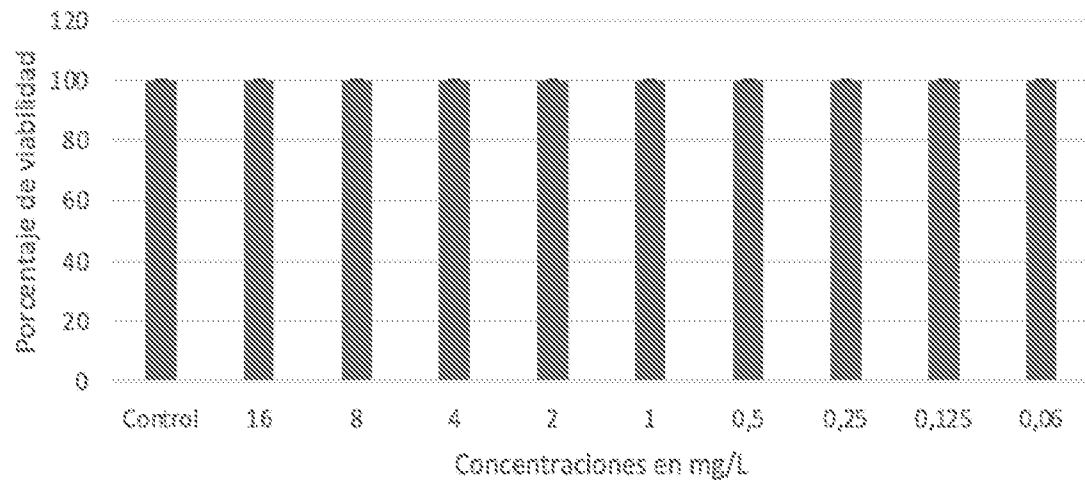


FIG. 5



- 21 N.º solicitud: 202330973
22 Fecha de presentación de la solicitud: 24.11.2023
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HERNANDO-GOZALO MARCOS et al. "Study of the antimicrobial activity of cationic carbosilane dendrimers against clinical strains of multidrug-resistant bacteria and their biofilms". Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10/10/2023, Vol. 13, Páginas 1-12. No.: 1203991, ISSN 2235-2988(print) ISSN 2235-2988(electronic), <DOI: doi:10.3389/fcimb.2023.1203991>. Ver resumen; apartados 2.1 y 2.2; figura 1.	1-16
A	WO 2014016460 A1 (UNIV DE ALCALA UAH et al.) 30/01/2014, ejemplos 12-15; páginas 33-35; reivindicaciones 1-36.	1-16
A	EP 2537880 A2 (UNIV DE ALCALA DE HENARES UAH et al.) 26/12/2012, ejemplos.	1-16

Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica	O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud
--	--

El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 04.11.2024	Examinador N. Martín Laso	Página 1/2
---	-------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07F7/18 (2006.01)

C08L101/10 (2006.01)

A61P31/00 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

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

C07F, C08L, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, CAS