(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 333 835**

(21) Número de solicitud: 200802520

(51) Int. Cl.:
C07D 207/34 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación: **29.08.2008**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2010**

Fecha de la concesión: **22.06.2010**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **05.07.2010**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **05.07.2010**

(73) Titular/es:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-CITT - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

(72) Inventor/es: **Vázquez Vázquez, Olalla;**
Vázquez Sentís, Eugenio;
Blanco Canosa, Juan Bautista;
Martínez Costas, José;
Mascareñas Cid, José Luis y
Castedo Expósito, Luis

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Compuestos híbridos tripirrol-octaarginina.**

(57) Resumen:
Compuestos híbridos tripirrol-octaarginina.
Híbridos formados por un grupo tripirrol unido a un péptido de poliarginina que permiten la internalización celular eficiente y promueve una mayor afinidad por el ADN. Su método de obtención y sus usos.

ES 2 333 835 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Compuestos híbridos tripirrol-octaarginina.

La presente invención se refiere a un compuesto formado por un grupo tripirrol unido a un péptido de poliarginina. Además, se refiere a su método de obtención y sus usos, puesto que dicho compuesto permite la internalización celular eficiente y promueve una mayor afinidad por el ADN.

Estado de la técnica anterior

Una de las estrategias moleculares de mayor interés para el desarrollo de agentes antibióticos o antitumorales se basa en la interacción de determinadas moléculas con zonas específicas del ADN (L. Strekowski, Mutation Res. 2007, 623, 3-13).

Algunas de estas moléculas se encuentran en fase de ensayo clínico, y otras, como las antraciclinas o la bleomicina, ya se vienen utilizando en clínica desde hace años.

La mayoría de los *DNA minor groove-binding ligands* (MGBLs) presentan dificultad para atravesar las membranas celulares y alcanzar de forma eficiente el núcleo celular. Así, por ejemplo, poliamidas basadas en el antibiótico Distamicina A, a pesar de que son capaces de interaccionar con secuencias específicas del ADN, experimentan procesos de internalización celular muy lentos, y dependientes de su estructura. (N.G. Nickols, C.S. Jacobs, M.E. Farkas, P.B. Dervan, *Nucleic Acids Res*. **2007**, *35*, 363-370; Edelson, T.P. Best, B. Olenyuk, N.G. Nickols, R.M. Doss, S. Foister, A. Heckel, P.B. Dervan, *Nucleic Acids Res*. **2004**, *32*, 2802-281)).

En este sentido algunos documentos del estado de la técnica, por ejemplo la solicitud de patente WO2008043366, que se refieren a compuestos para el transporte de agentes biológicos a través de membrana. Algunos de estos compuestos son péptidos cationicos.

Explicación de la invención

La presente invención pretende solucionar el problema de la dificultad de ciertos agentes que interaccionan con ADN en atravesar las membranas celulares y alcanzar de forma rápida el núcleo celular, así como mejorar la interacción con el ADN sin pérdida de selectividad. Para ello, la presente invención se refiere a la conjugación de un elemento de reconocimiento del surco menor del ADN de tipo tripirrólico con fragmentos de poliarginina con el fin de obtener agentes que interaccionan con ADN "*in vivo*" de forma rápida y eficiente (Fig. 1).

Con el fin de estudiar relaciones estructura-función se prepararon una serie de híbridos péptido-tripirrol, así como controles sin el tripirrol y sin el péptido de poliarginina, y se incorporó un grupo fluoróforo en las moléculas para poder realizar el seguimiento del proceso de internalización celular mediante análisis con un microscopio de fluorescencia. Los ensayos de internalización se realizaron en células HeLa vivas.

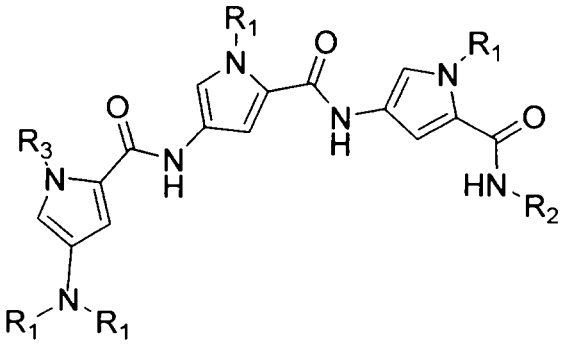
Los resultados, que se aportan en el apartado de ejemplos, demuestran como la conjugación de un tripirrol a octaargininas permiten una internalización celular eficiente y una localización muy rápida en el núcleo celular. La presencia de la región peptídica básica provoca un aumento muy destacable en la afinidad del sistema por secuencias de ADN ricas en adeninas (más de 100 veces con respecto al tripirrol solo). El funcionamiento de estos conjugados se fundamenta en la sinergia entre el elemento de reconocimiento específico (tripirrol) y el fragmento peptídico, que no solo facilita el transporte celular sino que también promueve una mayor afinidad por el ADN.

Por todo ello, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un elemento de reconocimiento del surco menor del ADN de tipo tripirrólico unido a un péptido poliarginina, más concretamente la octaarginina ($(Arg)_8$). Esta unión se produce por medio de un grupo espaciador que comprende, al menos, una lisina (Lys) por la que se une el tripirrol. (A partir de ahora los denominaremos compuestos de la invención).

Como elemento de reconocimiento del surco menor del ADN ó ligandos del surco menor del ADN (DNA *minor groove-binding ligands ó MGBLs*) se conocen una serie de compuestos que exhiben una serie de propiedades antitumorales, antimicrobianas, antivirales y antiprotozoo. Se conoce que las estructuras que contienen un imidazol y un pirrol, del tipo de la poliamida heterocíclica Distamicina pueden unirse al surco menor de la doble hélice, preferentemente en zonas ricas en AT, aumentando la torsión de la doble hélice, induciendo un superenrollamiento positivo e interfiriendo tanto en la replicación como en la transcripción. La unión al ADN se debe en parte a que los hidrógenos amida de las N-metilpirrolcarboxamidas forman puentes de hidrógeno bifurcados con los átomos N_3 de la adenina y O_2 de la timidina en el surco menor (Koopka *et al*., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 82:1376; Koopka *et al*., 1985. *J. Mol. Biol*. 183:553). Los anillos de pirrol llenan completamente el surco, excluyendo el grupo amino de la guanina de los pares de bases G,C, mientras establecen fuerzas de van der Waals con las paredes del surco, mostrando afinidad por las secuencias ricas en A y T (Taylor *et al*., 1985. Tetrahedron 40:457; Schultz & Dervan. 1984. *J. Biomol. Struct. Dyn*. 1:1133).

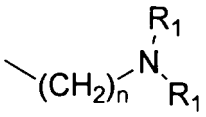
Con el fin de estudiar la internalización y la unión de este complejo con el ADN, se unió a un grupo fluoróforo, por lo que en una realización preferida de la invención, este compuesto puede estar unido a su vez a un grupo fluoróforo, preferiblemente fluoresceína (Flu).

En otra realización preferida de la presente invención, el tripirrol presenta la fórmula general (I):



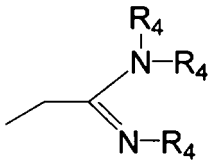
(I)

Donde, R_1 es un sustituyente que puede ser igual o diferente en cada caso y se selecciona independientemente de la lista que comprende H, un grupo alquilo (C_1-C_6) o un grupo acilo; R_2 es un grupo alquilo sustituido de fórmula general (IIA):



(II)

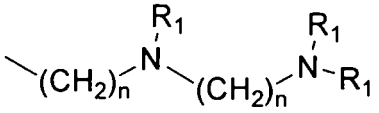
o de fórmula general (IIB):



(IIB)

Donde R_1 se define como anteriormente y n toma valores entre 1 y 6, preferiblemente 3, 4 y 5, y R_4 es un sustituyente que puede ser igual o diferente en cada caso y se selecciona independientemente de la lista que comprende H, o un grupo alquilo (C_1-C_6), preferentemente un metilo.

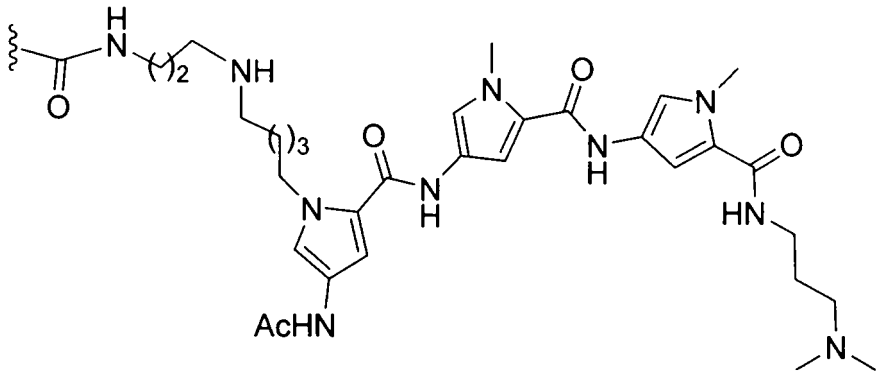
R_3 es un grupo alquilo sustituido de fórmula general (III):



(III)

Donde R_1 y n se definen como anteriormente.

En una realización aún más preferida, R_1 es igual o diferente en cada caso y se selecciona independientemente de la lista que comprende H, un grupo alquilo (C_1-C_3), preferiblemente metilo o un grupo acetilo. Más preferiblemente el compuesto tripirrolico es el siguiente:

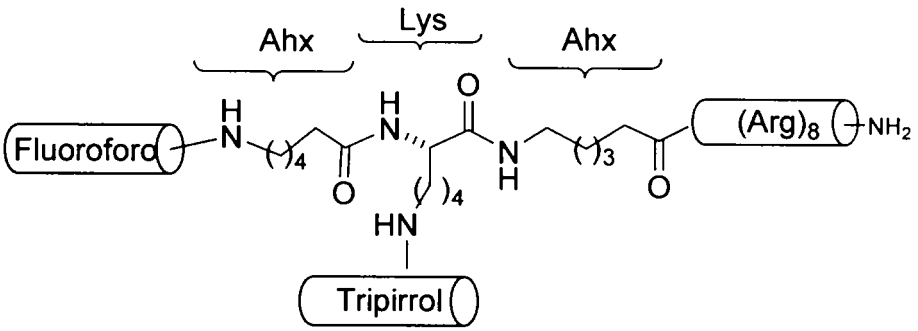


Donde ∿ representa el sitio de unión con la lisina del espaciador.

El término "alquilo" citado como sustituyente de R_1 se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 3 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo o n-propilo.

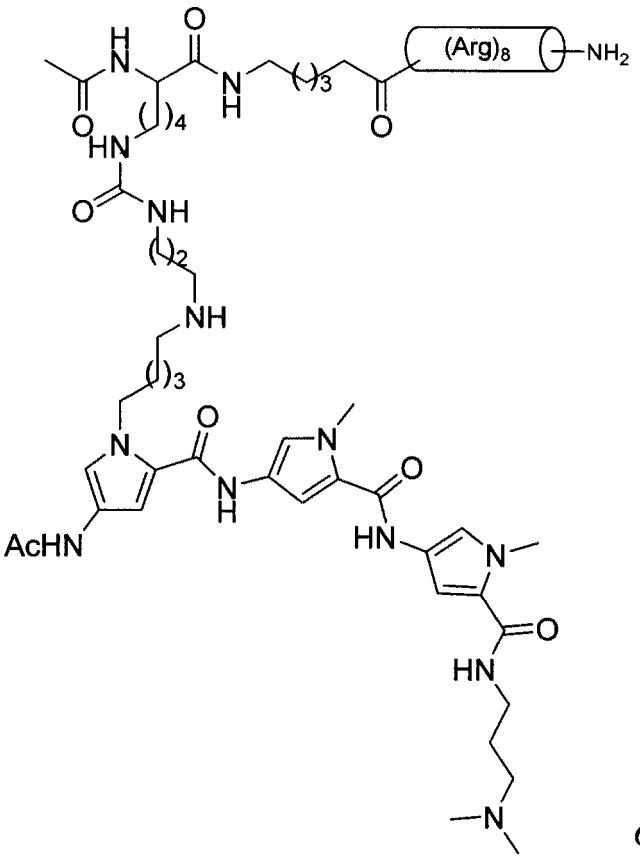
En cuanto al espaciador de la presente invención, se trata de una estructura compuesta por al menos un aminoácido lisina (Lys), al que se unirá el tripirrol y grupos ácido 6-aminohexanoico (Ahx), donde se unirá el péptido y/o el fluoróforo en caso de que este se incluya.

En una realización preferida, el espaciador es del tipo (Lys-Ahx) o (Ahx-Lys-Ahx), esta última presentaría la siguiente fórmula (IV):



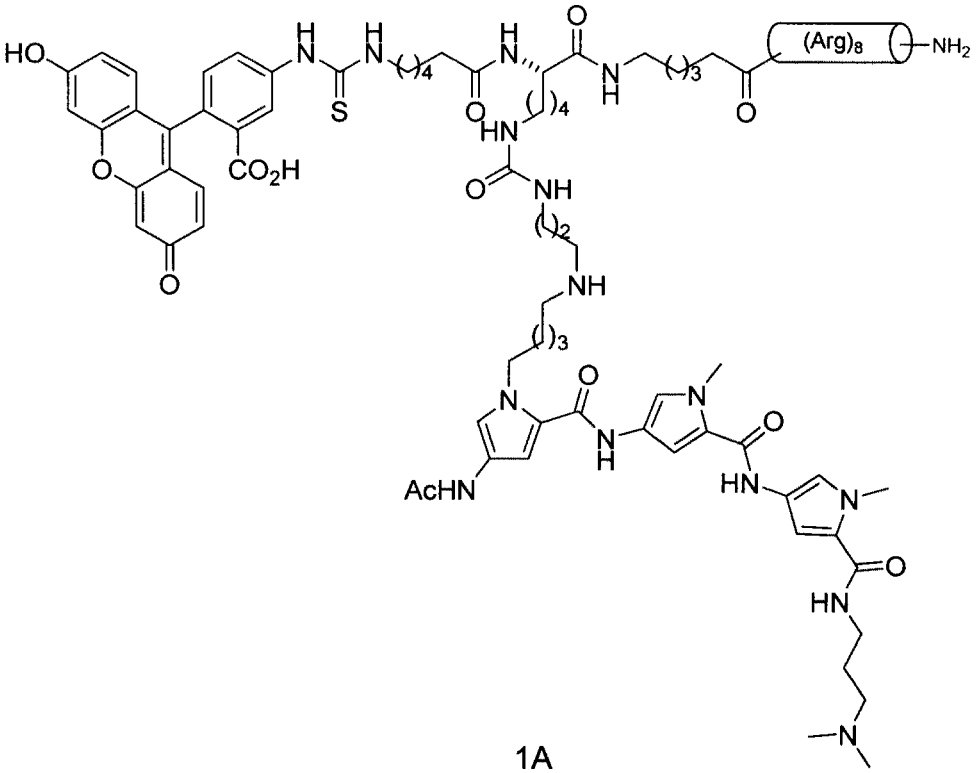
(IV)

En una realización más preferida, el compuesto es el de fórmula 6A o cualquiera de sus sales o isómeros:



6A

En otra realización más preferida, el compuesto es el de fórmula 1A o cualquiera de sus sales o isómeros, similar al compuesto 6A, y que incorpora el grupo fluoróforo en su estructura:



1A

La síntesis de estas moléculas se realizó usando metodologías en fase sólida, por lo que otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos descritos, que comprende los siguientes pasos:

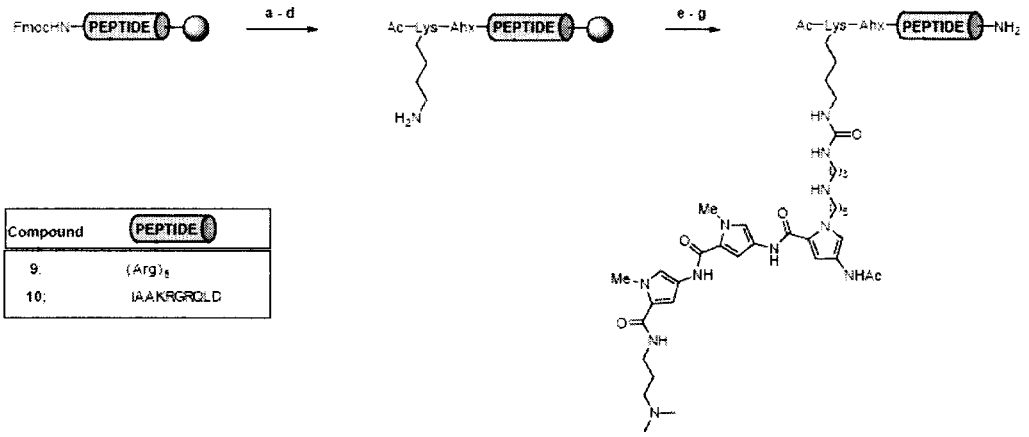
a) *Síntesis de los péptidos mediante métodos Fmoc en fase sólida (fmoc-péptidos)*

- desprotección temporal del grupo Fmoc
- acoplamiento de los aminoácidos
- desprotección selectiva del residuo lisina
- fraccionamiento y desprotección.

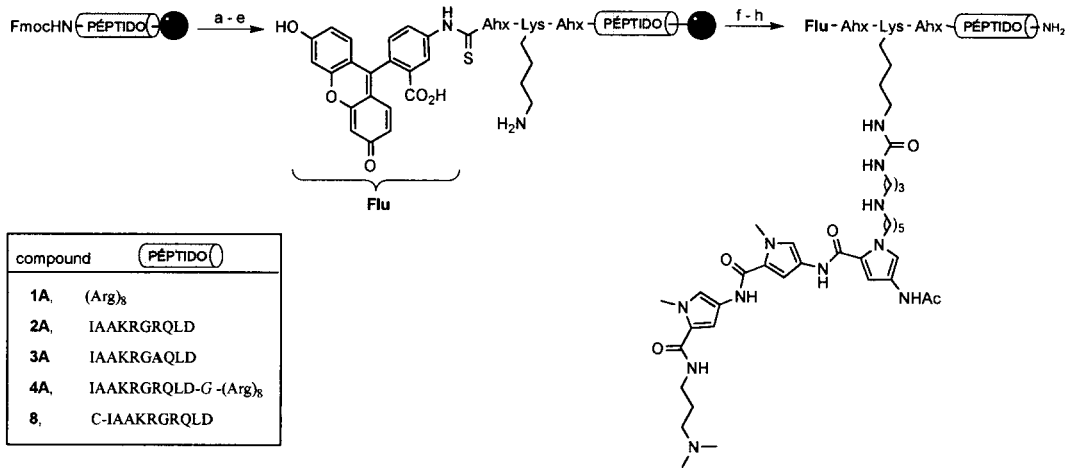
b) *Síntesis de los compuestos tripirrol-poliarginina*

- acoplamiento del amino tripirrol al péptido, mientras este está todavía unido a la fase sólida y protegido.
- Eliminación de los grupos protectores y separación de la resina sólida.

Esquema general síntesis de compuestos sin fluoroforo



Esquema general síntesis de compuestos con fluoroforo



Los compuestos DNA *minor groove binders* (MGBLs) constituyen una importante clase de derivados en la terapia antitumoral, siendo de interés intrínseco por sus propiedades biológicas y médicas. Además, la estrategia de reconocimiento podría ser aplicable para la obtención de nuevos agentes reguladores de procesos genéticos con posibilidades clínicas.

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención, tal y como se ha descrito anteriormente, o cualquiera de sus combinaciones,en cantidad terapéuticamente efectiva, o una sal, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Las soluciones para inyección o infusión intravenosa pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o, preferiblemente, pueden estar en forma de soluciones salinas acuosas isotónicas estériles. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden comprender, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo propilenglicol, y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

En las formas para aplicación tópica, por ejemplo, cremas, lociones o pastas para uso en tratamiento dermatológico, se puede mezclar el componente activo con excipientes oleaginosos o emulsionantes convencionales.

Las formas orales sólidas, por ejemplo tabletas y cápsulas, pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, por ejemplo lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz y almidón de patata; lubricantes, por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o de calcio y/o polietilenglicoles; agentes ligantes, por ejemplo almidones, gomas arábigas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y polivinilpirrolidona; agentes desintegrantes, por ejemplo almidón, ácido algínico, alginatos y glicolato de sodio y almidón; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes, por ejemplo lecitina, polisorbatos y laurilsulfatos, y, en general, substancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en la formulación farmacéutica. Dicha preparación farmacéutica puede ser fabricada por técnicas conocidas, por ejemplo por medio de procedimientos de mezcla, granulación, formación de tabletas, revestimiento de azúcar o revestimiento de película.

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

El uso de los compuestos de la invención es compatible con su uso en protocolos en que los compuestos de la invención, o sus mezclas se usan por sí mismos o en combinaciones con otros tratamientos o cualquier procedimiento médico.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos descritos o de las composiciones farmacéuticas que los incluyen para la elaboración de un medicamento.

Los compuestos de la invención son útiles como agentes antineoplásicos y antimicrobianos. Concretamente, muestran propiedades citostáticas hacia las células tumorales, de tal forma que pueden ser útiles para inhibir el crecimiento de ciertos tumores en mamíferos, incluídos los humanos, tales como, por ejemplo, carcinomas, como el carcinoma mamario, el carcinoma pulmonar, el carcinoma de vejiga, el carcinoma de colon y los tumores de ovario y endometrio. Otras neoplasias en las que pueden hallar aplicación las composiciones farmacéuticas de la presente invención son, por ejemplo, los sarcomas, como el sarcoma de tejidos blandos y de hueso, y las malignidades hematológicas, tales como por ejemplo, las leucemias. Así pues, una realización preferida de este aspecto de la invención, es el uso de cualquiera de los compuestos descritos o de las composiciones farmacéuticas que los incluyen para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Forma parte de esta realización preferida un método combinado para tratar el cáncer o mejorar las condiciones de mamíferos, incluidos los humanos, que sufren de cáncer, cuyo método consiste en administrar a menos un compuesto de la invención o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y un agente antitumoral adicional, lo suficientemente próximos en el tiempo y en cantidades suficientes para producir un efecto terapéuticamente útil.

Los antineoplásicos son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento, y/o proliferación de células tumorales malignas.

El término "agente antitumoral" pretende incluir tanto un fármaco antitumoral único como "cócteles", es decir, una mezcla de dichos fármacos, según la práctica clínica.

Los compuestos de la invención muestran también una notable efectividad en la interferencia con la actividad reproductora de virus patógenos y protegen las células tisulares frente a las infecciones víricas. Por ejemplo, muestran

actividad frente a virus ADN tales como, por ejemplo, herpes, por ejemplo virus herpes simplex y herpes zoster, virus de la vaccinia, virus ARN tales como, por ejemplo, *Rhinovirus y Adenovirus*, y frente a retrovirus tales como, por ejemplo, virus del sarcoma, por ejemplo virus del sarcoma murino, y virus de la leucemia, por ejemplo virus de la leucemia de Friend. Así pues, otra realización preferida de este aspecto de la invención, es el uso de cualquiera de los compuestos descritos o de las composiciones farmacéuticas que los incluyen para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades microbianas. Una realización aún más preferida de la invención es el uso de cualquiera de los compuestos descritos o de las composiciones farmacéuticas que los incluyen para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades microbianas virales.

Por todo lo anteriormente citado y avalado por los resultados obtenidos y expuestos en el apartado de ejemplos, se puede afirmar que se produce una entrada eficiente en el núcleo celular de los compuestos, conjugados o híbridos que poseen la octaarginina y el tripirrol unidos covalentemente. (Se representa ilustrativamente en la Fig.1).

Además, el sistema tripirrólico al permitir una interacción fuerte con el ADN facilita el anclaje de los híbridos en los cromosomas de núcleo. Es decir, la acumulación rápida intranuclear, en particular de los compuestos de fórmula 1A (triprirrol-oligoarginina), se debe a la acción cooperativa de ambos fragmentos, la oligoarginina y la molécula de unión al surco menor del ADN (tripirrol).

Además la interacción es selectiva para sitios de ADN que contengan al menos 4 adeninas o timinas seguidas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1.- Muestra el funcionamiento de los conjugados de tripirroles con poliargininas para inducir la internalización celular y el aumento de afinidad.

Fig. 2.- Muestra la distribución intracelular de los diferentes híbridos en células HeLa. Los tiempos de exposición fueron distintos para cada muestra debido a las variaciones observadas en la emisión total como resultado de las diferentes eficiencias de internalización. Los tiempos de exposición fueron: 1A, 1B, 4A = 1/18 s; 2A = 1/2 s; 5A = 1/6 s; 3A = 1 s.

Fig. 3. PAGE de la interacción del péptido 6 con un oligonucleótido de doble cadena con la secuencia *ATTTT*. Calles 1-10: [6]= 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25 nM. Ahx = 6-aminohexanoic.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de la invención.

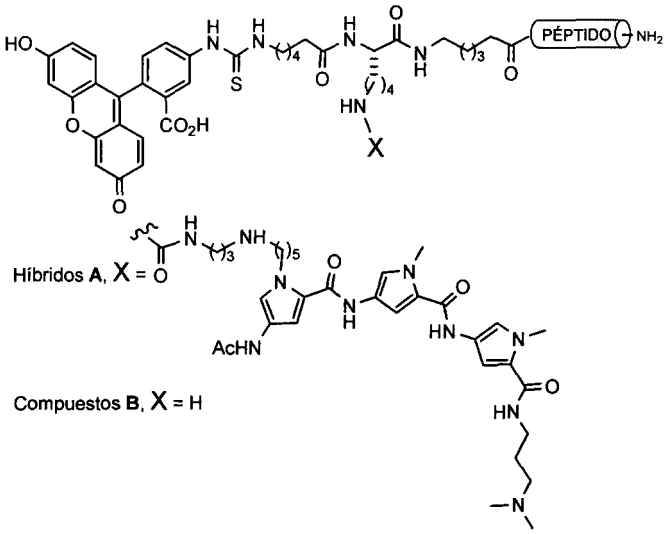
Ejemplo 1

Preparación del compuesto tripirrol-péptido y ensayos de internalización

Con el fin de estudiar relaciones estructura-función se prepararon una serie de híbridos péptido-tripirrol 1A-5A, así como controles sin el tripirrol (1B-4B). Se incorporó un grupo fluoróforo en las moléculas para poder realizar el seguimiento del proceso de internalización celular mediante análisis con un microscopio de fluorescencia. La síntesis de las moléculas se realizó usando metodologías en fase sólida.

Esquema 1

Estructuras de los compuestos estudiados



compound	PÉPTIDO
1A, 1B,	$(Arg)_8$
2A, 2B,	IAAKRGRQLD
3A, 3B,	IAAKRGAQLD
4A, 4B,	IAAKRGRQLD-G -$(Arg)_8$
5A	C-IAAKRGRQLD S-S Aba-C -$(Arg)_8$-NH_2

Los ensayos de internalización se realizaron en células HeLa vivas, registrando las imágenes de fluorescencia a 30 min, 90 min y 3 h. Tal y como se muestra en la Figura 2 (Fig. 2), la incubación de células con el conjugado tripirrol-octaarginina 1A durante 90 min a 37ºC dio lugar a una señal de fluorescencia homogénea e intensa en el núcleo celular. Posteriormente se observó que dicha señal ya se observaba a los 30 minutos. Esto demuestra que la internalización es muy rápida. Un control de internalización del mismo tripirrol desprovisto de la secuencia de octaarginina demostró que no se observaba nada de fluorescencia intracelular incluso después de 3 h. Parece claro pues que la octaarginina es clave para un transporte eficiente del conjugado.

En el caso del híbrido 2A que contiene como fragmento peptídico una señal de localización nuclear (NLS) en vez de la poliarginina, la señal de fluorescencia que se observa después de la incubación está también localizada en el núcleo celular; sin embargo la intensidad de la señal es menor que en el caso del híbrido 1A, probablemente debido a la menor capacidad de internalización citoplasmática inherente a esta secuencia. La introducción de una secuencia de octaargininas además de la NLS, bien de manera lineal (4A) o bien a través de un enlace disulfuro lábil (5A), mejoró las propiedades de internalización con respecto al híbrido que contiene exclusivamente la NLS (2A); sin embargo las capacidad de transporte fue en ambos casos menor a la del híbrido que contenía exclusivamente la octaarginina 1A. El conjugado 3A, similar a 2A pero con una mutación en la NLS no fue eficientemente internalizado, como queda de manifiesto por la baja fluorescencia observada en el interior de las células. El producto aparece distribuido uniformemente por el citoplasma celular, lo cual concuerda con la pérdida de capacidad de señalización nuclear de la NLS mutada.

Los péptidos control que no poseen el fragmento tripirrólico no son capaces de alcanzar el núcleo de las células. Particularmente relevante es el caso del péptido 1B, que es análogo a 1A, pero sin el tripirrol. Como se observa en la Figura 2 (Fig. 2), la fluorescencia es intensa, pero se localiza exclusivamente en el citoplasma.

Por otro lado, para comprobar la posible implicación del fluorofor, se utilizó el híbrido 6, similar a 1A pero desprovisto del grupo fluoróforo. Este mostró una afinidad por secuencias de ADN ricas en adenina muy alta, en torno a 6 nM a temperatura ambiente (Fig. 3). Además la interacción es selectiva para sitios de ADN que contengan al menos 4 adeninas o timinas seguidas.

Ejemplo 2

Síntesis y purificación de los péptidos

Los péptidos se sintetizaron manualmente en una escala de 0.1 mmol siguiendo los protocolos estándar de síntesis de péptidos mediante la estrategia Fmoc/tBu. Para la síntesis se utilizó una resina PAL-PEG (0.19 mmol/g). Cada amino ácido se activó durante 2 min en DMF previamente a su adición sobre la resina desprotegida. La reacción de formación del enlace peptídico se dejó transcurrir un mínimo de 45 min hasta que el test TNBS dio negativo. La desprotección del grupo temporal Fmoc se llevó a cabo por tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF durante 15 min. Los péptidos finales se obtuvieron después de la desprotección/liberación de la resina por tratamiento con el coctel estándar de desprotección con TFA tal y como se especifica a continuación.

Desprotección del grupo temporal Fmoc: Se añade piperidina (5 mL, 20% en DMF) a 0.1 mmol de Fmoc-péptido unido al soporte sólido. Se burbujea nitrógeno a través de la mezcla durante 15 min. Se filtra la resina y se lava con DMF (3 x 5 mL x 3 min). Se comprueba la desprotección haciendo un test TNBS a una pequeña fracción de la resina.

Acoplamiento de los amino ácidos: Se añade DIEA (3 mL, 0.195M en DMF) sobre el amino ácido correspondiente (0.4 mmol) disuelto en 2 mL de una disolución 0.2 M HOBt y 0.2 M HBTU en DMF. La mezcla resultante se agita durante 2 min y a continuación se añade sobre la resina. Se hace pasar nitrógeno sobre la mezcla resultante durante 45 min o hasta que se observa que el acoplamiento se completa, mediante el test TNBS en una pequeña alícuota de la resina. Se filtra la resina y se lava con DMF (3 x 5 mL x 3 min). La síntesis continúa con el siguiente ciclo de desprotección/acoplamiento de forma análoga a la descrita.

Desprotección selectiva de la cadena lateral del residuo Lys(Alloc): Una vez completada la secuencia del péptido, la desprotección selectiva de la lisina se lleva a cabo utilizando el siguiente procedimiento: Se tratan 0.1 mmol del péptido unido a la resina con $Pd(PPh_3)_4$ (1 equiv) y morfolina (190 equiv) en 2% H_2O/CH_2Cl_2 (5 mL) durante 5 h. Se filtra la resina y se lava con DMF (3 x 5 mL x 3 min), dietilditiocarbamato (DEDTC, 25 mg en 5 mL de DMF, 2 x 5 mL x 2 min), DMF (3 x 5 mL x 2 min) y CH_2Cl_2 (3 x 5 mL x 2 min).

Desprotección/liberación de la resina: El péptido sintetizado, todavía unido a la resina se seca bajo una corriente de nitrógeno y se trata en frío con el coctel de desprotección (50 μL CH_2Cl_2, 25 μL agua, 25 μL TIS y TFA hasta 1 mL para 40 mg de resina). Los péptidos que contienen cisteínas se desprotegieron utilizando el coctel alternativo específico: 25 μL EDT, 25 μL agua, 10 μL TIS y TFA hasta 1 mL, por cada 40 mg de resina. La suspensión resultante de añadir la mezcla de desprotección a la resina se agitó durante 2 h a ta. La resina se separó y los filtrados se añadieron sobre éter etílico en un baño de hielo (10 mL de éter por cada mL de coctel). Después de 10 min, se centrifuga la mezcla y el sólido decantado se lava con éter frío y se seca bajo una corriente de argon. El precipitado se disolvió en 2 mL de una mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 y se analizó por HPLC en fase reversa utilizando las condiciones descritas anteriormente. El producto mayoritario en todas las síntesis se identificó como el péptido deseado por espectrometría de masas. Las fracciones aisladas en HPLC preparativo se liofilizaron y guardaron a -20ºC.

Ejemplo 3

Síntesis de los híbridos fluorescentes

Una vez finalizada la síntesis se eliminó el grupo protector Fmoc del residuo N-terminal siguiendo el procedimiento estándar. Se lavó la resina y se añadieron una disolución de DIEA (0.5 M, 6 equiv) en DMF e isotiocianato de fluoresceína (FITC, 4 equiv. La mezcla resultante se agito durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó la resina con DMF (2 x 5 mL) y el grupo Alloc se desprotegió siguiendo el procedimiento detallado previamente. La peptidil-resina resultante se sometió al procedimiento estándar de desprotección/liberación y purificación para dar los compuestos 1B-5B. Alternativamente, la peptidil-resina se acopló a la unidad de aminotripirrol para sintetizar los derivados 1A-5A. Para los acoplamientos con los tripirroles se suspendió la resina en DMF (1 mL) y se agitó durante 30 min para expandirla convenientemente. Se filtró la DMF y sobre la resina se añadió DIEA (0.5 M en DMF, 8 equiv), DMAP (2 equiv en DMF) y *N,N'*-disuccinimidil bicarbonato (15 equiv). La mezcla resultante se agito durante 2 h. La resina se lavó con DMF y se añadieron el aminotripirrol 7 en DMF (4 equiv), DIEA (8 equiv, 0.5 M en DMF) y DMAP (2 equiv). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y a continuación se lavo con DMF (2 x 5 mL x 2 min) y éter etílico (2 x 5 mL x 2 min). La desprotección/liberación siguiendo condiciones estándar dio lugar a los conjugados esperados que se purificaron por HPLC en fase reversa e identificaron por espectrometría de masas tal y como se detalló previamente.

Ejemplo 4

Síntesis del híbrido 5A

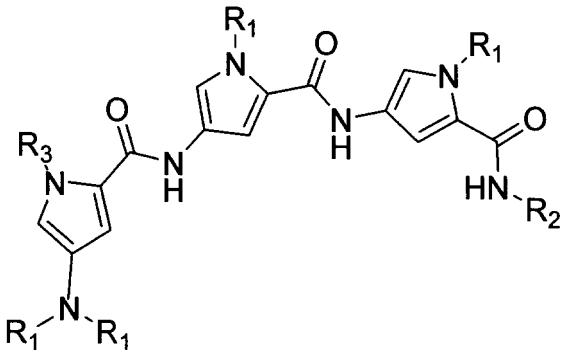
Este compuesto se obtuvo por acoplamiento del péptido correspondiente que incluye una cisterna, con el péptido de cisteina-ortaargininas activado previamente por reacción con DTNB (reactivo de Ellman). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo en tampón 100 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 7,5 agitando la mezcla a temperatura ambiente por 45 min. El producto mayoritario se purificó por HPLC siguiendo las condiciones estándar y se identificó por espectrometría de masas como el híbrido heterodimérico conteniendo el puente disulfuro deseado.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende un grupo tripirrol unido a una octaarginina ($(Arg)_8$) por medio de un espaciador que comprende, al menos, una lisina (Lys).

2. Compuesto según la reivindicación 1 que además comprende un grupo fluoróforo.

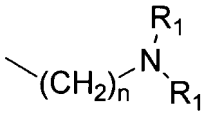
3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde el tripirrol presenta la fórmula (1):



(I)

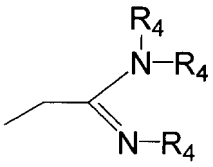
R_1 es igual o diferente y se selecciona independientemente de la lista que comprende H, un grupo alquilo (C_1-C_6) o un grupo acilo;

R_2 es un grupo alquilo sustituido de fórmula general (IIA):



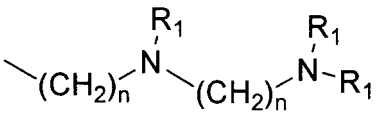
(IIA)

ó de fórmula general (IIB):



(IIB)

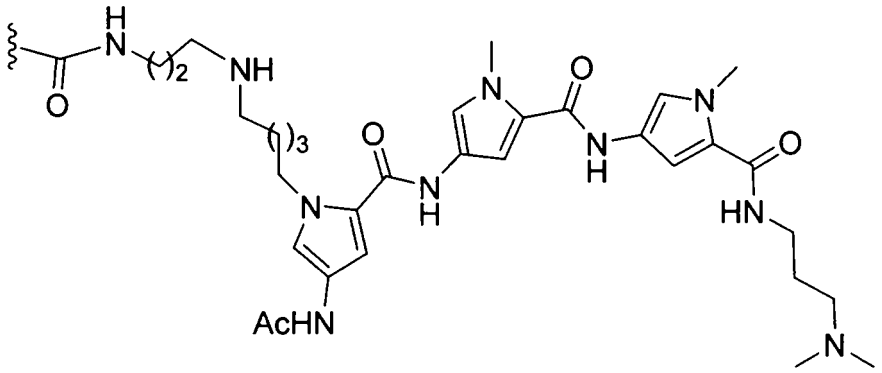
R_3 es un grupo alquilo sustituido de fórmula general (III):



(III)

donde n toma valores entre 1 y 6.

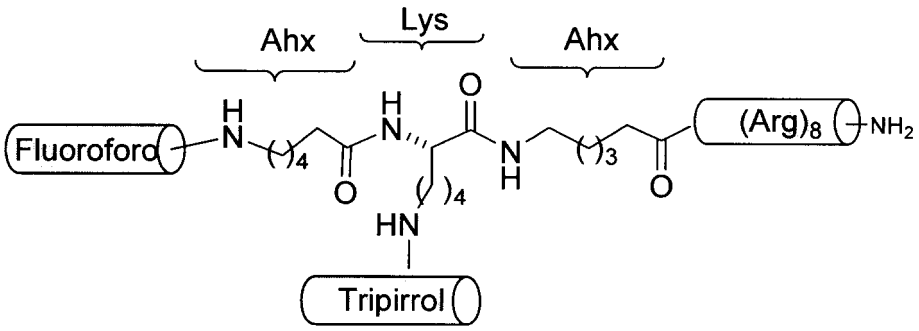
4. Compuesto según la reivindicación 3 donde el tripirrol es:



donde ~ representa el sitio de unión con la lisina del espaciador.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el espaciador además de la lisina comprende ácido 6-aminohexanoico (Ahx).

6. Compuesto según la reivindicación 5 donde el espaciador presenta la fórmula (Ahx-Lys-Ahx):



7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 donde el fluoróforo es fluoresceína.

8. Método de obtención de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende los siguientes pasos:

a. síntesis del péptido en fase sólida,

b. acoplamiento al fragmento tripirrólico,

c. desprotección de cadenas laterales y separación de la resina.

9. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración de un medicamento.

10. Uso del compuesto según la reivindicación 9 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

11. Uso del compuesto según la reivindicación 9 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades microbianas.

12. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para interferir de forma eficiente con procesos celulares a nivel del ADN.

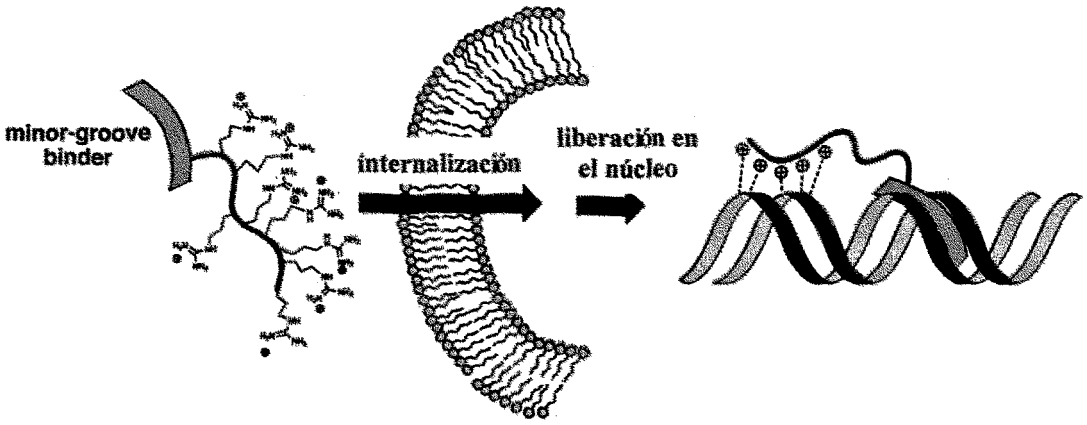

minor-groove
binder
internalización
liberación en
el núcleo

FIG. 1

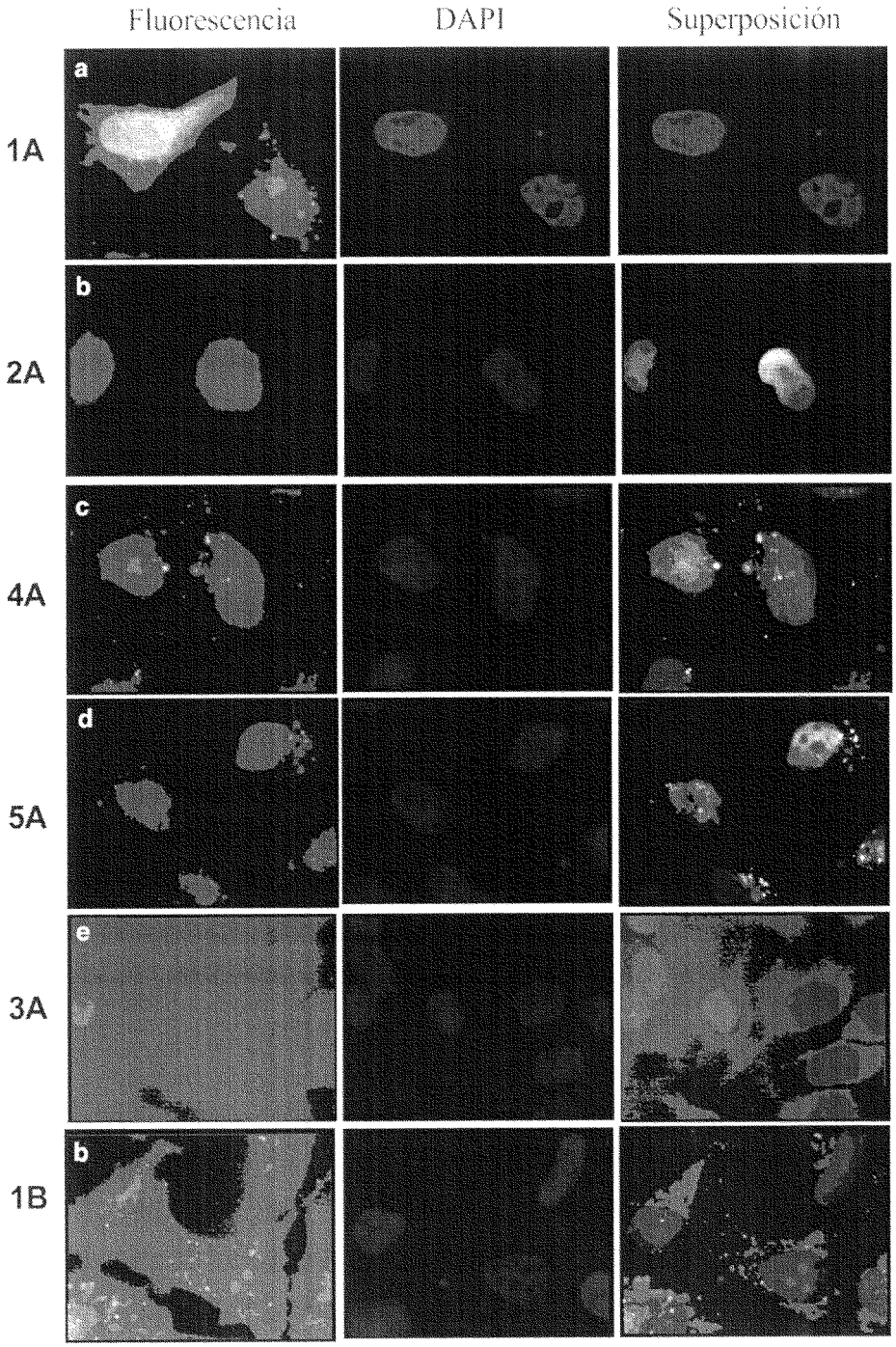


FIG. 2

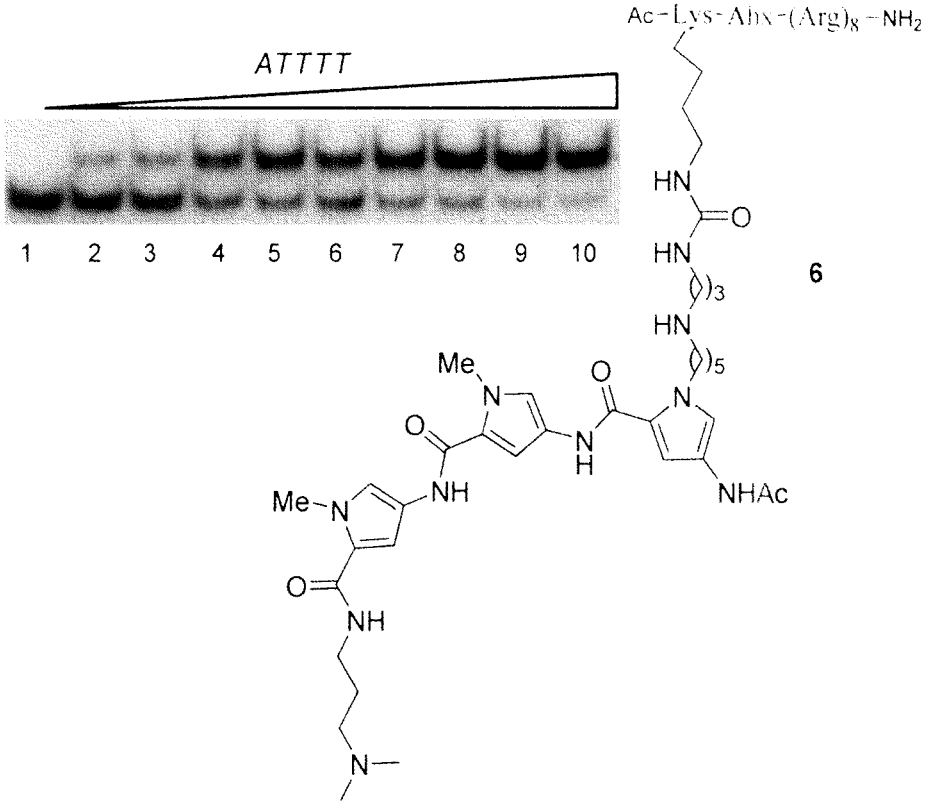

ATTTT
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Ac-Lys-Ahx-(Arg)8-NH2
HN
O
HN
)3
HN
)5
Me
N
O
N
H
NHAc
O
NH
Me-N
O
NH
N
6

FIG. 3

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 333 835

(21) Nº de solicitud: 200802520

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **29.08.2008**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BLANCO, J.B. y col. Sequence-specific DNA recognition by monomeric Bzip basic regions equipped with a tripyrrole unit on the N-terminal side. Towards the development of synthetic mimics of Skn-1. ChemBioChem. 2005, Vol. 6, Nº 12, páginas 2173-2176.	1-12
A	VAZQUEZ, E. y col. An Fmoc solid-phase approach to linear polypyrrole-peptide conjugados. Tetrahedron Letters. 1999, Vol. 40, páginas 3621-3624.	1-12
A	VAZQUEZ, E. y col. A practical approach to orthogonally connected oligopyrrole-peptide conjugates. Tetrahedron Letters. 1999, Vol. 40, páginas 3625-3628.	1-12

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	Examinador	Página
23.11.2009	E. Albarrán Gómez	1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 207/34 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

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

C07D, C07K, A61K, 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, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.11.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-12	**SÍ**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-12	**SÍ**
	Reivindicaciones		**NO**

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

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	ChemBioChem.	2005
D02	Tetrahedron Letters. 1999, Vol. 40, páginas 3621- 3624.	1999
D03	Tetrahedron Letters. 1999, Vol. 40, páginas 3625-3628.	1999

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

La invención se refiere a compuestos híbridos formados por un grupo tripirrol de fórmula general I, unido a una octaarginina por medio de un espaciador que comprende, al menos una lisina, a su método de obtención y a su uso como medicamento, en el tratamiento del cáncer o de enfermedades microbianas. El grupo tripirrólico permite el reconocimiento específico del surco menor del ADN mientras que el fragmento peptídico de octaarginina no solo facilita el transporte celular sino que también promueve una mayor afinidad por el ADN.

Los documentos D01 a D03 del estado de la técnica divulgan compuestos híbridos péptidicos formados por análogos de distamicina -tripirrol unidos a un péptido correspondiente a la región básica de la proteína GCN4 (un factor de transcripción del tipo bZIP) .

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica compuestos híbridos con un grupo tripirrol unido al péptido octaarginina como los recogidos en las reivindicaciones de la presente solicitud, por lo que se considera que las reivindicaciones 1 -12 tienen novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Asimismo se puede reconocer actividad inventiva, ya que los resultados aportados en la descripción de la presente solicitud demuestran como la conjugación en los compuestos reivindicados de un tripirrol a octaargininas permiten una internalización celular eficiente así como un aumento significativo en el porcentaje de inhibición celular. En consecuencia se considera que las reivindicaciones 1-12 de la solicitud implican actividad inventiva (Art. 8.1LP 11/1986).