(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 396 076**

(21) Número de solicitud: 201131415

(51) Int. CI.:

C07C 257/18 (2006.01)
C07D 221/06 (2006.01)
C07D 209/14 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación:

24.08.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2013

Fecha de la concesión:

25.11.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

05.12.2013

(73) Titular/es:

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES

(72) Inventor/es:

ISIDRO SÁNCHEZ, Mateo ;
VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Olalla ;
VÁZQUEZ SENTÍS, Marcos Eugenio y
MASCAREÑAS CID, José Luis

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

(54) Título: **INTERNALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN FOTOCONTROLADA DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS CAPACES DE UNIRSE AL ADN DE DOBLE HEBRA.**

(57) Resumen:

La presente invención se refiere a compuestos formados por una molécula pequeña capaz de unir al ADN de doble hebra conjugada covalentemente a un grupo protector fotolábil, y a sus usos. La desprotección de estos compuestos mediante irradiación con luz permite controlar de forma espacial y temporal la activación de dichas moléculas de unión al ADN.

ES 2 396 076 B2

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

DESCRIPCIÓN

INTERNALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN FOTOCONTROLADA DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS CAPACES DE UNIRSE AL ADN DE DOBLE HEBRA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a compuestos que permiten la activación controlada, espacial y temporalmente, de moléculas pequeñas de unión al ADN de doble hebra, así como a sus usos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La molécula de ADN está implicada en numerosos procesos básicos para la vida de la célula y es la diana terapéutica con la que interaccionan numerosos fármacos.

A través de esta interacción, se producen cambios físico-químicos en el ADN que pueden tener importantes consecuencias en las diversas actividades en las que la molécula de ADN interviene. Como resultado, los compuestos capaces de unirse al ADN constituyen herramientas de gran utilidad tanto en el ámbito diagnóstico como terapéutico.

Estas moléculas de unión al ADN pueden provocar la activación, modulación o inhibición de la función del ADN. Habitualmente actúan provocando la inhibición de procesos básicos para la supervivencia de la célula como la transcripción o replicación, provocando la muerte celular. Por ello, este tipo de moléculas se han empleado en quimioterapia y para el tratamiento de enfermedades bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, entre otros. Además el ADN es una de las dianas más habituales de muchos de los fármacos anticáncer usados en quimioterapia.

Sin embargo, algunas de estas moléculas presentan una baja especificidad de tejido celular, atacando no sólo a la célula cancerosa o al microorganismo sino también a células sanas o células del hospedador, respectivamente.

Con el fin de disminuir la alta toxicidad que conlleva el empleo de moléculas de unión al ADN, existe la necesidad de desarrollar métodos que permitan controlar de forma eficaz la actividad de dichas moléculas, tanto en términos de espacio, como de tiempo.

Los documentos *Current Opinion in Chemical Biology 2009, 13, 678-686* y *Organic & Biomolecular Chemistry 2007, 5, 999-1005*, describen el empleo de grupos protectores sensibles a la luz para controlar la activación de moléculas biológicas, como inductores de la expresión génica, oligonucleótidos o proteínas.

La publicación *Tetrahedron Letters 2003, 44, 7307-7309*, describe un derivado de Berenilo que, tras irradiación con luz, descompone en 4-amidino-N-(3-hidroxipropil)anilina y el catión 4-amidinobenzenodiazonio. Este último podría producir ruptura del ADN. El derivado de Berenilo descrito en este documento es capaz de interaccionar con el ADN y, por tanto, no puede utilizarse para controlar la inactivación y posterior activación en el lugar y momento deseado de la sal de diazonio 4-amidinobenzenodiazonio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han descubierto que la utilización de grupos protectores fotolábiles permite inactivar temporalmente la actividad de moléculas pequeñas que interaccionan selectivamente con ADN de doble hebra. El compuesto protegido resultante no es capaz de unirse al ADN de doble hebra, con lo cual es posible disponer de un derivado no activo que se puede manejar cómodamente, y que se libera en el momento y lugar precisos en los que se desee que actúe mediante irradiación con luz, induciendo así la interacción de la molécula pequeña con el ADN de forma controlada.

De esta forma, es posible activar las moléculas pequeñas de unión al ADN de doble hebra de forma eficaz y controlada.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se dirige a un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra, conjugada covalentemente a un grupo protector fotolábil, con la condición de que dicho compuesto no sea a su vez una molécula de unión al ADN de doble hebra.

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, para el control *in vitro* de la expresión génica y/o la síntesis de proteínas.

Estas moléculas pequeñas que unen ADN provocan un cambio en la estructura y/o funcionalidad de la molécula de ADN de doble hebra cuando interaccionan con ella, impidiendo procesos básicos para la supervivencia y proliferación de la célula, como por ejemplo la transcripción y replicación. Por ello, este tipo de moléculas pequeñas de unión al ADN de doble hebra tienen importantes aplicaciones como antitumorales, antibacterianos, antivirales, antifúngicos y antiparasitarios, entre otros.

Por tanto, en otro aspecto la invención se refiere al uso de un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, para la preparación de un medicamento. Este medicamento puede ser un medicamento de acción controlada, es decir, un medicamento cuya actividad puede activarse de forma controlada en el momento y/o lugar deseado mediante irradiación con luz.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas o de enfermedades microbianas.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Por otro lado, las características espectrales de algunas moléculas pequeñas que unen ADN de doble hebra cambian al unirse al ADN y, por ello, son útiles como marcadores o colorantes de ADN.

Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, para marcar in vitro zonas específicas del ADN y/o células.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Izquierda: la línea sólida representa el espectro de HPLC del compuesto protegido **©1** en solución tampón Tris-HCl buffer 20 mM; 100 mM NaCl; pH 7.5; la línea de trazos representa el espectro de HPLC de la misma disolución tras irradiar durante 15 min con luz UV. Derecha: espectro de emisión de fluorescencia al

aumentar el tiempo de irradiación de una disolución 0,5 µM de **©1** en tampón HEPES 50 mM, NaCl 100 mM en presencia del oligonucleótido horquilla (*hairpin*) que contiene la secuencia diana AAATTT (5 µM). Secuencia de la horquilla AAATTT: 5'-GGCG *AAATTT* CGC TTTTT GCG *AAATTT* CGCC-3' (SEQ ID NO: 1).

Figura 2. Arriba: espectro de emisión de fluorescencia de una disolución 0,8 µM de **©2** en tampón Tris-HCl buffer 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 al aumentar el tiempo de irradiación. Abajo: microscopía de emisión de fluorescencia de células pertenecientes a la línea celular *Vero* (12,5 µM **©2** tras 15 min de incubación); A: antes de irradiación y desprotección, B: tras desprotección mediante irradiación con luz UV durante 10 min, C: experimento control con 12,5 µM de **2** tras 15 min. de incubación.

Figura 3. Arriba: microscopía de fluorescencia de células pertenecientes a la línea *Vero* incubadas con el compuesto **©2**, tras incrementar los tiempos de irradiación ($\lambda_{exc} \geq 365$ nm). Abajo: A) Placa de cultivo donde las células están formando una monocapa antes de la irradiación; B) mismo cultivo después de la irradiación a través de un molde de cartulina. Estas fotos se tomaron sobre las muestras irradiadas con un transiluminador.

Figura 4. Izquierda: Microscopía de fluorescencia de células *Vero* incubadas con 50 µM de **©3** mostrando la desprotección y redistribución de la fluorescencia desde la membrana nuclear al núcleo (t=0 imagen con luz blanca y fluorescencia, t=4 min hasta t=16 min imágenes de fluorescencia). Derecha: Representación esquemática de la propuesta de dinámica de activación del compuesto **©3.**

Figura 5. Control del efecto de la irradiación UV sobre el bromuro de etidio. A: Bromuro de etidio 50 microM antes de ser irradiado. B: después de ser irradiado, donde se observa claramente que no sufre variación alguna y se presenta en el núcleo celular.

Figura 6. Control del efecto de la irradiación UV sobre **©2** ($Nvoc_2$-ethidium) 50 microM. A: imagen con luz blanca. B: antes de la irradiación. C: después de 15 minutos de irradiación. Se observa que **©2** no es visible con los cubos ópticos del microscopio que abarcan el rojo; sólo después de la irradiación las células son visibles.

Figura 7. Control del efecto de la irradiación UV sobre el DAPI. A: DAPI 50 microM antes de ser irradiado. B: después de ser irradiado no se observa cambio.

Figura 8. Control del efecto de la irradiación UV sobre ©**3** ($Nvoc_2$-DAPI) 50 microM. A: imagen con luz blanca. B: antes de la irradiación. C: después de 15 minutos de irradiación. Se observa que ©**3** no es visible con los cubos ópticos del microscopio que abarcan el azul; sólo después de la irradiación las células son visibles.

Figura 9. Actividad antimicrobiana del compuesto ©**4** medida por difusión en disco de *Candida albicans*. (a) disco estéril con el compuesto ©**4** (sin irradiar); (b) control positivo con aza-pentamidina; (c) compuesto ©**4** irradiado con luz UV; (d) antibiótico comercial (clotrimazol); (e) control negativo (tampón); (f) control negativo irradiado con luz UV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Moléculas pequeñas de unión al ADN de doble hebra

Según el primer aspecto mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra que está unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, con la condición de que dicho compuesto no sea a su vez una molécula de unión al ADN de doble hebra.

El objetivo de la presente invención es controlar la capacidad de moléculas pequeñas para unirse a ADN de doble hebra. Para ello se utilizan grupos protectores fotolábiles que inactivan la capacidad de unión de la molécula al ADN. Por tanto, es necesario que el compuesto de la invención, es decir, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, no sea a su vez una molécula capaz de unirse al ADN. De esta forma es posible dirigir el compuesto inactivo al lugar deseado para la posterior liberación de la molécula de unión al ADN de forma controlada.

La expresión “molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra” o “molécula pequeña capaz de unirse al ADN de doble hebra” se refiere, según la presente invención, a una molécula de peso molecular inferior a 300 Da que es capaz de interaccionar con ADN de doble hebra. Este tipo de moléculas son bien conocidas en el estado de la técnica (e.g., S.M. Nelson, L.R. Ferguson, W.A. Denny, Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. *Mutation Res.* 2007, *623*, 24-40;*“Small molecule DNA and RNA binders”, Wiley-VCH 2003*). Además, la interacción de una molécula con el ADN produce cambios físico-químicos en éste, lo que ha dado

lugar a diversas técnicas experimentales que permiten determinar si una molécula interacciona con el ADN y distinguir además los distintos tipos de interacción molécula-ADN (*Oncología, 2004, 27(2), 69-79*), como por ejemplo mediante espectrofotometría UV/visible, espectrometría de masas, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, métodos calorimétricos, dicroísmo circular, viscosimetría, etc.

Existen distintos modos de interacción entre moléculas pequeñas y ADN de doble hebra. Según el tipo de interacción, se distingue entre unión covalente (se forman uniones de tipo covalente entre la molécula y el ADN) o no covalente (como, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas). Dentro de las moléculas que se unen covalentemente al ADN se encuentran los agentes alquilantes. Entre las moléculas que se unen al ADN de forma no covalente se encuentran las moléculas que se unen a los surcos (mayor o menor) del ADN y los agentes intercalantes.

Por lo tanto, en una realización de la invención, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra se selecciona de entre moléculas que se unen al ADN de doble hebra de forma covalente y moléculas que se unen de forma no covalente. Preferiblemente, dicha molécula se selecciona de entre un agente alquilante, un agente intercalante y una molécula de unión al surco, preferiblemente de unión al surco menor.

En la presente invención, el término “agente alquilante” se refiere a moléculas que se unen al ADN de forma covalente. Este término incluye tanto agentes alquilantes clásicos en los que grupos alquilo de estos agentes se unen a la molécula de ADN, como compuestos que no presentan un grupo alquilo pero que también se unen de forma covalente al ADN, por ejemplo generando uniones entre dos cadenas de ADN (*cross-link*). En general, son moléculas con grupos electrófilos reactivos que se unen covalentemente al ADN preferiblemente a través de las bases nitrogenadas.

Los agentes alquilantes son bien conocidos en el estado de la técnica (e.g., L. Kelland, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nature Rev. Cancer* 2007, 7, 573-584; T. Bando, H. Sugiyama, Synthesis and biological properties of sequence-specific DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamides, *Acc. Chem. Res.* 2006, *39*, 935-944) Algunos agentes alquilantes típicos incluyen, por ejemplo, nitrosoureas (e.g. carmustina, lomustina, semustina, fotemustina, estreptozocina), mostazas nitrogenadas (biscloroetilaminas, e.g. clorambucilo, ciclofosfamida,

ifosfamida, mecloretamina, melfalan, mostaza de uracilo, trofosfamida, estramustina), aziridinas (e.g. tiotepa, mitomicina C), alquilsulfonatos (e.g. busulfán, clomesona), hidrazinas y triazinas (e.g. altretamina, dacarbazina, procarbazina, temozolamida) y complejos de platino (e.g. cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, saltraplatino, lobaplatino).

En la presente invención, el término "agente intercalante" se refiere a moléculas que se unen al ADN bicatenario de forma no covalente al intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN. En general, son estructuras policíclicas planas que interaccionan con el ADN a través de fenómenos de apilamiento o stacking e interacciones hidrofóbicas.

Los agentes intercalantes son bien conocidos en el estado de la técnica (e.g., L. Strekowski, B. Wilson, Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Res.* 2007, *623*, 3-13; J.B. Chaires, Drug-DNA Interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998, *8*, 314-320) Algunos agentes intercalantes típicos incluyen, por ejemplo, antraciclinas (e.g. doxorubicina, daunorubicina, rubidazone, epirubicina, aclarubicina), acridinas (e.g. naranja de acridina, proflavina, amsacrina, quinacrina), antraquinonas (e.g. mitoxantrona), naftalimidas (e.g. amonafide, elinafide), bromuro de etidio, ioduro de propidio, Actinomicina D, quinina, mefloquina, elipticina y ditercalinio.

En la presente invención, el término "molécula de unión al surco" se refiere a una molécula que se une dentro del surco de un ADN bicatenario, preferiblemente dentro del surco menor, a través de uniones no covalentes. Más preferiblemente, se trata de una molécula que se une al surco menor del ADN de doble hebra a través de secuencias ricas en A y T.

Las moléculas de unión al surco menor son bien conocidas en el estado de la técnica (e.g., C. Bailly, J.B. Chaires, Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues, *Bioconjugate Chem.* 1998, *9*, 513-538; D.E. Wemmer, Designed Sequence-Specific Minor Groove Ligands, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000, *29*, 439-461). Algunas moléculas de unión al surco menor típicas incluyen, por ejemplo, diarilamidinas (e.g. pentamidina, propamidina, aza-propamidina, aza-pentamidina, furamidina, estilbamidina, berenilo, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)), netropsina, distamicina, lexitropsina, mitramicina,

cromomicina A_3, olivomicina, antramicina, sibiromicina, bis-benzimidazoles (e.g. Hoechst 33258, Hoechst 33342).

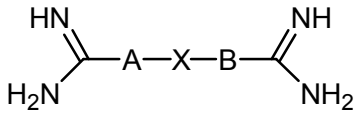
En una realización de la invención, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra se selecciona de entre un colorante de ADN, un agente antitumoral y un agente antimicrobiano.

De acuerdo con una realización particular, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra es un colorante de ADN. Preferiblemente, el colorante de ADN se selecciona de entre naranja de acridina, DAPI, bromuro de etidio, ioduro de propinio Hoechst 33258 y Hoechst 33342.

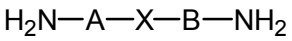
De acuerdo con otra realización particular, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra es un agente antitumoral. Preferiblemente, el agente antitumoral se selecciona de entre agentes alquilantes del ADN, como nitrosoureas (e.g. carmustina, lomustina, semustina, fotemustina, estreptozocina), mostazas nitrogenadas (biscloroetilaminas, e.g. clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfalan, mostaza de uracilo, trofosfamida, estramustina), aziridinas (e.g. tiotepa, mitomicina C), alquilsulfonatos (e.g. busulfán, clomesona), hidrazinas y triazinas (e.g. altretamina, dacarbazina, procarbazina, temozolamida) y complejos de platino (e.g. cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, saltraplatino, lobaplatino); antraciclinas (e.g. doxorubicina, daunorubicina, rubidazone, epirubicina, aclarubicina); acridinas (e.g. naranja de acridina, proflavina, amsacrina, quinacrina); antraquinonas (e.g. mitoxantrona); naftalimidas (e.g. amonafide, elinafide); Actinomicina D; elipticina; ditercalinio; netropsina; y bis-benzimidazoles (e.g. Hoechst 33258, Hoechst 33342).

De acuerdo con otra realización particular, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra es un agente antimicrobiano. Preferiblemente, el agente antimicrobiano se selecciona de entre acridinas (e.g. naranja de acridina, proflavina, amsacrina, quinacrina), quinina, mefloquina, diarilamidinas (e.g. pentamidina, propamidina, aza-propamidina, aza-pentamidina, furamidina, estilbamidina, berenilo, DAPI), netropsina.

En una realización de la invención, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib):



(Ia)



(Ib)

donde:

A y B se seleccionan cada uno independientemente de arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos;

X puede no existir, de forma que A y B se encuentren condensados, o representa un enlace sencillo, -O-, -S-, -NH-, -O-Y-O-, -S-Y-S-, -NH-Y-NH-, o un alquilo C_1-C_6, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos;

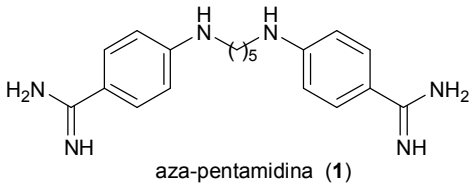
Y se selecciona de alquilo C_1-C_8, arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos,

o una sal o solvato del mismo.

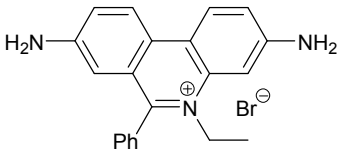
Preferiblemente, A y B se seleccionan independientemente de entre fenilo, indol o juntos forman un anillo de fenantridina, opcionalmente sustituidos, preferiblemente por alquilo C_1-C_3 o arilo C_6-C_{10}. En una realización preferida, A y B se seleccionan independientemente de entre fenilo, indol, o juntos representan un anillo de 5-etil-6-fenilfenantridinio.

Preferiblemente, X se selecciona de entre un enlace, -O-Y-O- y -NH-Y-NH-; donde Y representa preferiblemente un grupo alquilo C_1-C_8, más preferiblemente un grupo pentilo.

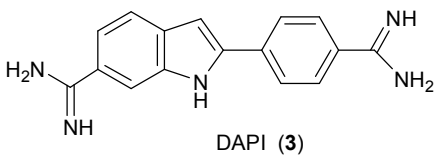
En una realización preferida, la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra se selecciona de entre pentamidina, aza-pentamidina, bromuro de etidio, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), o una sal o solvato del mismo.



aza-pentamidina (**1**)



bromuro de etidio (**2**)



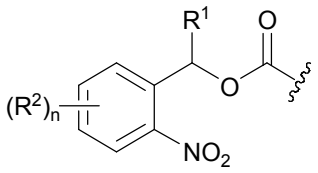
DAPI (**3**)

Grupos protectores fotolábiles

En la presente invención, el término “grupo protector fotolábil” se define como un grupo protector cuya unión a una molécula se rompe o libera mediante la exposición a luz de una longitud de onda apropiada. Grupos protectores fotolábiles, así como las condiciones para su preparación y posterior desprotección, son conocidos en el estado de la técnica (e.g. *P.J. Kocienski, “Protecting Groups”, Thieme 2005*) e incluyen, por ejemplo, derivados de *o*-nitrobencilo, derivados de benzoína, derivados de fenacilo, etc.

Preferiblemente, en la presente invención el grupo protector fotolábil se desprotege mediante irradiación con luz UV (preferiblemente de una longitud de onda de entre 200 y 400 nm, más preferiblemente $\geq$ 365 nm), preferiblemente con una potencia de entre 5 y 10 W, más preferiblemente de 8 W.

En una realización particular, el grupo protector fotolábil presenta la siguiente estructura:



(II)

donde

n se selecciona de 0, 1, 2, 3 y 4;

R^1 y cada R^2 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, arilo C_6-C_{15}, heteroarilo de 3 a 15 miembros y heterociclo de 3 a 15 miembros opcionalmente sustituidos, NO_2, CN, halógeno, -OR’, -SR’, -S(O)R’, $-S(O)_2R'$, $-OS(O)_2R'$, -N(R’)(R’’), -C(O)R’, -C(O)OR’, -C(O)N(R’)(R’’), -OC(O)R’ y -N(R’)C(O)R’’; donde cada R’ y R’’ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, arilo C_6-C_{15}, heteroarilo de 3 a 15 miembros y heterociclo de 3 a 15 miembros, opcionalmente sustituidos;

o dos grupos R^2 forman, junto con el anillo de fenilo al que están unidos, un grupo heterociclo.

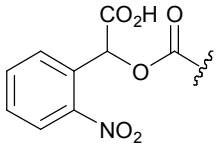
En una realización particular de la invención, n se selecciona de 0, 1 y 2. En otra realización particular, R^1 se selecciona de entre hidrógeno, metilo, trifluorometilo y carboxilo. En una realización adicional, R^2 representa metoxilo, o dos radicales R^2 contiguos forman un grupo $–O-CH_2-O-$.

De acuerdo con una realización particular, n se selecciona de 0, 1 y 2; R^1 se selecciona de entre hidrógeno y carboxilo; y R^2 representa metoxilo.

Adicionalmente, los inventores han observado que la presencia en el grupo protector de grupos ionizables a pH fisiológico permite controlar de forma aún más eficaz la inactivación de la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra. En particular, se ha observado que cuando se emplea el grupo protector Nmoc, el grupo carboxílico se encuentra ionizado como carboxilato a pH fisiológico, provocando repulsiones electrostáticas entre el compuesto protegido y los grupos fosfato del ADN, lo cual permite controlar aún más eficazmente que el compuesto protegido objeto de la presente invención no se pueda unir al ADN.

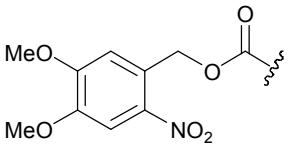
Por tanto, en una realización adicional, el grupo protector fotolábil presenta un grupo funcional ionizable a pH fisiológico. Preferiblemente, al menos uno de R^1 y R^2 comprende un grupo ionizable a pH fisiológico. Más preferiblemente, al menos uno de R^1 y R^2 es un grupo carboxilo.

En una realización adicional, el grupo protector fotolábil se selecciona de:



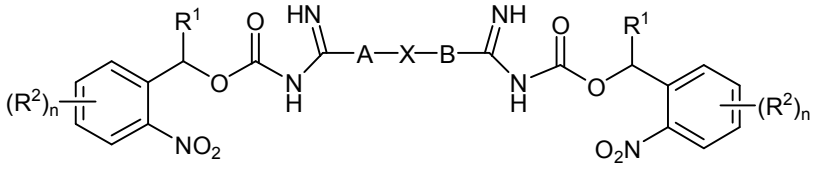
Nmoc

y

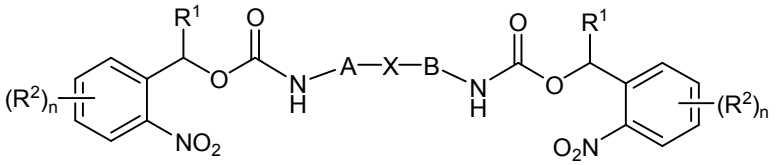


Nvoc .

En una realización adicional, el compuesto de la invención se selecciona de un compuesto de fórmula (IIIa) y (IIIb):



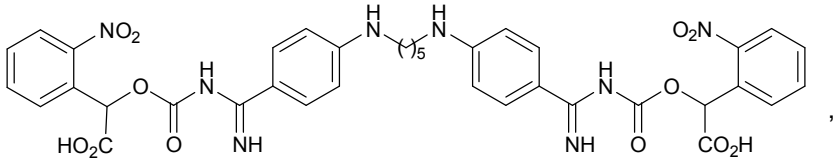
(IIIa)



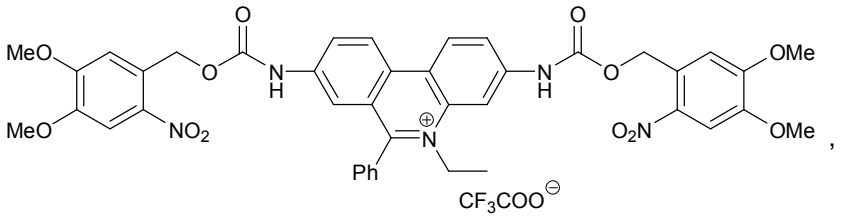
(IIIb)

donde A, B, X, n, R^1 y R^2 son tal y como se han definido previamente, o una sal o solvato del mismo.

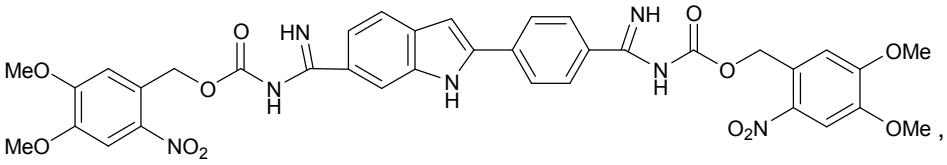
En otra realización particular, el compuesto de la invención se selecciona de:



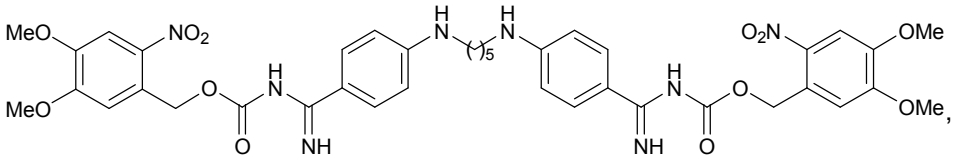
© 1



© 2



© 3



© 4

o una sal o solvato del mismo.

Adicionalmente, los inventores han observado que el empleo de grupos protectores permite no sólo controlar la activación de la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra, sino también modular sus propiedades fisicoquímicas. Se ha observado, por ejemplo, que el uso de Nvoc como grupo protector fotolábil mejora las propiedades de internalización en la célula del bromuro de etidio. Es importante destacar que el bromuro de etidio, debido a su elevada polaridad, atraviesa muy difícilmente la membrana celular, lo que ha dificultado el uso de esta molécula en experimentos *in vivo*. El uso de los grupos protectores mencionados previamente permite solucionar este problema al aumentar la hidrofobicidad de la molécula.

Definiciones

El término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene ninguna insaturación, que tiene de uno a ocho (C_1-C_8), de uno a seis (C_1-C_6), o de uno a tres (C_1-

C_3) átomos de carbono, y que está un o de la molécula mediante un enlace sencillo. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, isobutilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 3,3-dimetil-1-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo y n-hexilo.

El término "cicloalquilo C_3-C_7" significa un anillo monocíclico o policíclico, no aromático, que comprende átomos de carbono e hidrógeno. Un grupo cicloalquilo puede tener uno o más dobles enlaces carbono-carbono en el anillo siempre que el anillo no sea aromático. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, grupos cicloalquilo completamente saturados, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo, y terpenos cíclicos y bicíclicos saturados y grupos cicloalquenilo, tales como ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo y cicloheptenilo, y terpenos cíclicos y bicíclicos insaturados. Un grupo cicloalquilo puede no estar sustituido o estar sustituido con uno o dos sustituyentes adecuados. Preferiblemente, el grupo cicloalquilo es un anillo monocíclico o anillo bicíclico.

El término "heterociclo" se refiere a un anillo monocíclico o policíclico no aromático que comprende átomos de carbono e hidrógeno y al menos un heteroátomo, preferiblemente, de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre y que puede incluir sistemas de anillos condensados. Un grupo heterociclo puede estar total o parcialmente saturado, o puede ser aromático (heteroarilo). Preferiblemente, el grupo heterociclo es un anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico que comprende de 3 a 15, preferiblemente de 5 a 15, más preferiblmente de 5 a 10 miembros y de 1 hasta 3 heteroátomos. Ejemplos de grupos heterociclo incluyen aziridinilo, pirrolidinilo, pirrolidino, piperidinilo, piperidino, piperazinilo, piperazino, morfolinilo, morfolino, tiomorfolinilo, tiomorfolino, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, tetrahidropiranilo, piranilo, benzimidazol, benzotiazol, furano, pirrol, tiofeno, piridina, bipiridina, pirimidina, isotiazol, isoxazol, imidazol, indol, purina, quinolina, tiadiazol. Un grupo heterocicloalquilo.

El término "halógeno" se refiere a cloro, bromo, yodo o flúor.

El término "arilo" se refiere a un grupo aromático que tiene entre 6 y 15, preferiblemente entre 6 y 10 átomos de carbono, que comprende 1, 2 ó 3 núcleos

aromáticos, opcionalmente condensados, incluyendo los siguientes ejemplos no limitativos: fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo.

El término “haloalquilo” se refiere a un grupo alquilo tal y como se ha definido previamente, donde al menos un átomo de hidrógeno ha sido sustituido por un halógeno. Preferiblemente, el término haloalquilo se refiere a un grupo CF_3.

Tal como se entiende en esta área técnica, puede haber un cierto grado de sustitución en los radicales definidos anteriormente. Las referencias del presente documento con respecto a los grupos sustituidos indican que el radical especificado puede estar sustituido en una o más posiciones disponibles con uno o más sustituyentes. Dichos sustituyentes incluyen, por ejemplo y en un sentido no limitativo, alquilo C_{1-6}, cicloalquilo C_{3-7}, arilo, heterociclo, heteroarilo, halógeno, ciano, nitro, trifluorometilo, -$N(R_a)(R_b)$, -OR_a, -SR_a, -$C(O)R_a$, -$C(O)OR_a$, -$C(O)N(R_a)(R_b)$, -$OC(O)R_a$; en los que cada R_a y R_b se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, arilo, heterociclo, heteroarilo y trifluorometilo.

Los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de sales, preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, o en forma de solvatos. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualquier sal que tras su administración al receptor puede proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como se describe en el presente documento.

El término “solvato” según esta invención se entiende que significa cualquier forma del compuesto activo según la invención que tiene otra molécula (lo más probablemente un disolvente polar) unido a él mediante enlaces no covalentes. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo metanolato. Preferiblemente, los solvatos son solvatos farmacéuticamente aceptables.

La preparación de sales y solvatos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico, tales como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Preferiblemente, trifluoroacetato.

Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención, tal y como se ha definido previamente, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar como trastornos gástricos, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano o un animal. Preferiblemente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno estatal o federal o está incluido en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "excipiente" se refiere a un diluyente, adyuvante, portador o vehículo con el que se administra el principio activo. Tales excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Preferiblemente se emplean agua o soluciones salinas de disolución acuosa y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores, particularmente para disoluciones inyectables. Portadores farmacéuticos adecuados se describe en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

Para una mejor formulación de la presente invención, también pueden añadirse agentes dispersantes, tales como tensioactivos y/o polímeros.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse en una pluralidad de formas farmacéuticas de administración, por ejemplo sólidas (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquidas (disoluciones, suspensiones o emulsiones). Puede llevarse a cabo la administración, por ejemplo, por vía oral (sublingual, gastroentérica, rectal), parenteral (intravenosa, intraarterial, intracardíaca, subcutánea, transdérmica, intraperitoneal o intramuscular) o tópica.

Usos

La interacción entre moléculas pequeñas y ADN de doble hebra provoca cambios en la estructura y funcionalidad de dicho ADN, lo que puede permitir modular,

mediante activación o inhibición, diversos procesos en los que el ADN está involucrado, como la transcripción o replicación, y con ello regular la actividad celular.

Según se ha descrito en esta solicitud, el uso de grupos protectores fotolábiles permite inactivar temporalmente moléculas pequeñas de unión al ADN de doble hebra. La posterior irradiación con luz permite liberar de nuevo la molécula y, de esa forma, controlar espacial y temporalmente la actividad de la molécula, lo que podría permitir tener control sobre procesos biológicos como la expresión génica, la síntesis de proteínas y la proliferación celular.

Además, las características espectrales de estas moléculas pequeñas cambian al unirse al ADN, por lo que aquéllas que absorben en el UV se emplean habitualmente como marcadores o colorantes de ADN y células (e.g. naranja de acridina, DAPI, bromuro de etidio, ioduro de propinio Hoechst 33258 y Hoechst 33342). De nuevo, siguiendo un proceso de protección/desprotección (inactivación/activación) como se ha mencionado previamente, es posible controlar de forma eficaz la actividad de estos marcadores. Por tanto, un aspecto adicional se dirige al uso de los compuestos de la invención, tal y como se han descrito previamente, para marcar in vitro secuencias de ADN o células.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a un método in vitro para marcar secuencias de ADN o células, que comprende (a) hacer interaccionar la secuencia de ADN o la célula con una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra, y (b) irradiar la muestra con luz UV.

Los cambios causados por la unión de moléculas pequeñas al ADN de doble hebra provocan alteraciones funcionales en el ADN debido a la imposibilidad, disminución o modificación de la interacción de otras moléculas con el ADN, como factores de transcripción, enzimas, etc. Generalmente, estas moléculas pequeñas de unión al ADN de doble hebra actúan inhibiendo los procesos de transcripción, replicación y reparación del ADN, lo que inhibe la reproducción de la célula y causa su muerte. Por ello, este tipo de moléculas tienen importantes aplicaciones terapéuticas como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos, antiparasitarios y antitumorales.

Un aspecto adicional se refiere al uso de los compuestos de la invención, tal y como se han descrito previamente, para la preparación de un medicamento.

Otro aspecto adicional se refiere al uso de los compuestos de la invención, tal y como se han descrito previamente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas y enfermedades microbianas.

En otro aspecto, la invención se dirige a un método terapéutico, que comprende la administración de los compuestos de la invención y posterior irradiación con luz UV. Preferiblemente, el método terapéutico se dirige al tratamiento de enfermedades proliferativas y enfermedades microbianas.

La expresión "enfermedades proliferativas" se refiere a un crecimiento anómalo de las células o a un crecimiento de células anómalas sin control fisiológico. Las enfermedades proliferativas pueden ser tumores benignos o malignos (cánceres). Las enfermedades proliferativas no cancerosas incluyen lipomas, adenomas, hemangiomas, linfanginomas, nevus, teratomas, fibromas, mixomas, condromas, osteomas, meningiomas, tumores gliómicos, leiomiomas, rabdomiomas, papilomas, angiomas y miomas.

Ejemplos de cánceres incluyen, pero sin limitarse a, cáncer de bazo, colorectal y/o de colon, carcinomas de colon, carcinomas de ovario, cáncer de ovario, cáncer de mama, carcinomas del útero, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de hígado, carcinomas del páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de hueso, cáncer de piel, sarcoma, sarcomas de Kaposi, tumores cerebrales, miosarcomas, neuroblastomas, linfomas y leucemias, melanoma, glioma, meduloblastoma, carcinoma de cabeza y cuello.

En una realización particular, la enfermedad proliferativa es cáncer.

La expresión "enfermedades microbianas" según se emplea en el presente documento incluye enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos. Por tanto, una realización particular se refiere al uso de los compuestos de la invención, tal y como se han definido previamente, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades microbianas, preferiblemente enfermedades bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias.

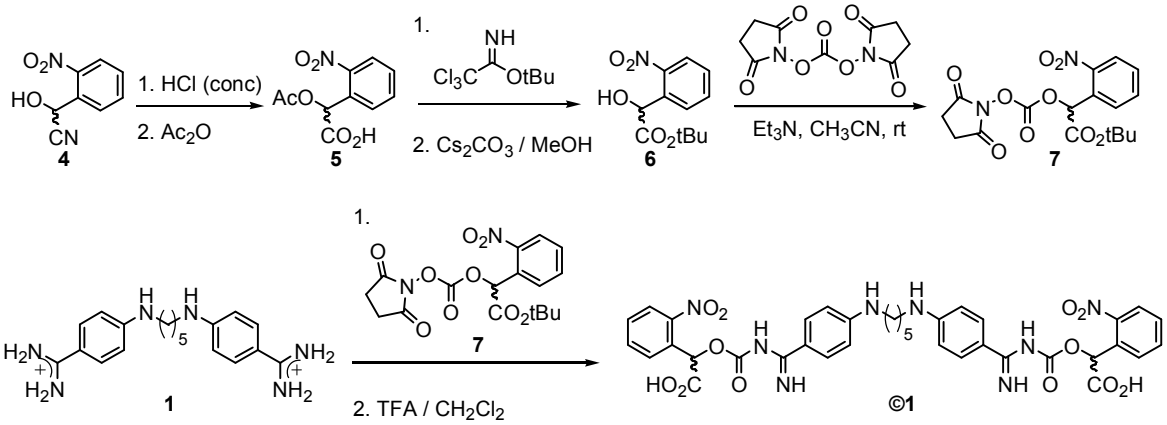
Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por reacción de la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra y el grupo protector fotolábil, mediante métodos sintéticos habituales en el estado de la técnica y conocidos por el

experto en la materia (e.g. *P.J. Kocienski, "Protecting Groups", Thieme 2005; "March's Advanced Organic Chemistry", Wiley-Interscience 2001; T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Chemistry", Wiley 2007*).

La invención se ilustrará a continuación mediante pruebas realizadas por los inventores.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Procedimiento de síntesis del ácido 2,2'-{1,5-pentanodiilbis[imino-4,1-fenilen(iminometilen)imino]}bis[(2-nitrofenil)acetico (Nmoc$_2$-pentamidina, ©**1**)



Síntesis del ({[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]carbonil}oxi)(2-nitrofenil)acetato de terc-butilo (**7**)

Sobre una disolución del alcohol 6 (200 mg, 0.79 mmol - obtenido según el procedimiento descrito por Rossi et al. *J. Biol. Chem*. 1997, 272, 32933-32939) disuelto en MeCN (8 mL) se añadió Et_3N (320 mg, 3.16 mmol) y N,N´-disuccinimidil carbonato (213 mg, 0.95 mmol). Se agitó durante 8 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, se eliminó el disolvente y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice (60% AcOEt/hexanos), obteniéndose el producto como un sólido blanco (178 mg, 60%).

^{1}H-RMN (250MHz, $CDCl_3$): 1.12-1.43 (m, 9H), 2.83 (s, 4H), 6.7 (s, 1H), 7.55-7.62 (m, 1H), 7.5-7.5 (m, 2H), 7.9-8.1 (m, 1H).

^{13}C-RMN (250MHz, $CDCl_3$): 25.4 (CH2), 27.6 (CH3), 75.7 (CH), 84.8 (C), 125.4 (CH), 128.0(C), 128.8 (CH), 130.3 (CH), 133.9 (CH), 147.6 (C), 150.8 (C), 164.3 (C), 168.2 (C).

Síntesis del ácido 2,2'-{1,5-pentanodiilbis[imino-4,1-fenilen(iminometilen)imino]}bis[(2-nitrofenil)acetico (Nmoc$_2$-pentamidina, ©**1**)

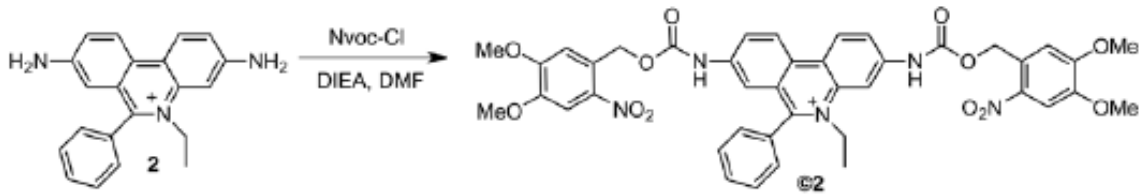
La di-sal trifluoroacética de la azapentamidina (50 mg, 0.088 - obtenida según el procedimiento descrito por Bakunova et al. *J. Med. Chem*. 2009, 52, 2016-2035) se disolvió en 1.8 mL de una disolución previamente preparada de DIEA/DMF (0.195 M). El compuesto ({[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]carbonil}oxi)(2-nitrofenil)acetato de terc-butilo (75 mg, 0.19 mmol) se añadió a la disolución y el crudo de reacción resultante se agitó magnéticamente bajo atmosfera de Ar y en ausencia de luz durante 8 horas. Trascurrido ese tiempo el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se aisló y purificó por cromatografía en columna de sílice gel, obteniéndose como un sólido amarillento.

El producto aislado que contiene el grupo protector terc-butilo se disolvió en 4.5 mL de CH_2Cl_2 y enfriado a 0 ºC. A continuación, se añadieron 4.4 mL de TFA lentamente. Se dejó reaccionar con agitación magnética durante 2 h y posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida. Finalmente el crudo de reacción se purificó en fase reversa (Agua/MeCN) y las fracciones que contenían el producto deseado se liofilizaron obteniéndose un sólido amarillento (63 mg, 0.079 mmol, 89% en total).

^{1}H RMN (300 MHz, MeOD-d_4): 1.28-1.30 (m, 2H), 1.69-1.73 (m, 4H), 2.86 (s, 2H, NH), 2.99 (s, 2H, NH), 3.24 (t, J = 6.95 Hz, 4H), 6.74 (d, J = 9.12 Hz, 4H), 6.99 (s, 2H, CH), 7.67-7.83 (m, 12 H), 8.12 (s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, NH).

^{13}C RMN (300 MHz, MeOD-d_4): 25.6 (CH_2), 29.7 (CH_2), 43.7 (CH_2), 73.5 (CH), 111.8 (C), 112.9 (CH), 126.4 (CH), 129.7 (C), 131.0 (CH), 131.8 (CH), 132.4 (CH), 135.0 (CH), 149.7 (C), 154.0 (C), 157.0 (C), 165.5 (C), 169.7(C).

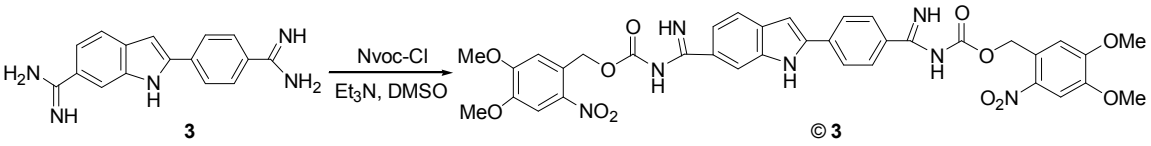
Ejemplo 2. Procedimiento de síntesis de 3,8-bis({[(4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil)oxy]carbonil}amino)-5-metil-6-fenilfenantridinio (Nvoc$_2$-etidio, ©2)



A una disolución de bromuro de etidio (100 mg, 0.253 mmol) en 25 mL de DIEA/DMF (0.195 M) se agregó moderadamente cloruro de nitroveratril (209 mg, 0.759 mmol). La mezcla resultante se dejó reaccionar con agitación magnética, bajo atmosfera de Argón y en ausencia de luz durante 16 horas. Después de concentrar el disolvente a presión reducida el crudo de reacción se purificó en fase reversa

(Agua/MeCN) y las fracciones que contenían el producto deseado se liofilizaron obteniéndose el producto como una sal trifluoroacética de color naranja (77 mg, 0.086 mmol, 34%).

Ejemplo 3. Procedimiento de síntesis de 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil[(4-{6-[({[(4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil)oxi]carbonil}amino)(imino)metil]-1H-indol-2-il}fenil)(imino)metil]carbamato (Nvoc$_2$-DAPI, ©**3**)

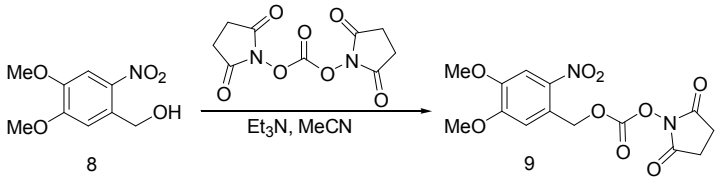


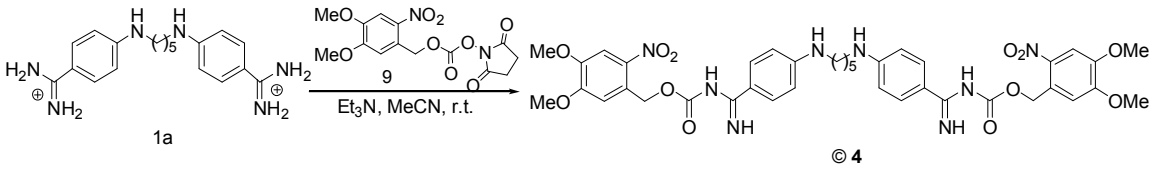
En un eppendorf se disolvió DAPI (12 mg, 0,034 mmol) en 0.7 mL de DMSO. A continuación, se añadió Et_3N (30 mg, 41 µL, 0.296 mmol, 8 equiv) y finalmente el cloruro de nitroveratril (56 mg, 0.204 mmol, 6 equiv). La mezcla resultante se dejó reaccionar con agitación magnética y en ausencia de luz durante 16 horas. El crudo de reacción se purificó en fase reversa (Agua/MeCN) y las fracciones que contenían el producto deseado se liofilizaron obteniéndose el producto como un sólido amarillento (14 mg, 0.018 mmol, 54 %).

^{1}H RMN (500 MHz, MeOH-d_4): 3.93 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 5.76 (s, 2H), 5.78 (s, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.33 (d, J = 4.56 Hz, 2H), 7.51 (dd, J = 8.43, 1.72 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 2.99 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.44 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 8.57 Hz, 2H), 8.03 (s, 1H), 8.16 (d, J = 8.49 Hz, 2H).

^{13}C RMN (300 MHz, MeOH-d_4): 56.9 (CH_3), 57.1 (CH_3), 67.4 (CH_2, Bn), 103.3 (CH), 109.5 (CH), 113.0 (CH), 114.3 (CH), 120.6 (CH), 121.8 (C), 122.9 (CH), 126.0 (C), 126.2 (C), 127.3 (CH), 130.7 (CH), 135.4 (C), 138.3 (C), 138.7 (C), 141.6 (C), 142.4 (C), 150.5 (C), 154.6 (C), 155.2 (C), 167.9 (C), 168.7 (C).

Ejemplo 4. Procedimiento de síntesis del 2,2'-{1,5-pentanodiilbis[imino-4,1-fenilen(iminometilen)imino]}bis({[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]carbonil}oxi)(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)] (Nvoc$_2$-pentamidina, ©**4**)





Síntesis del ({[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]carbonil}oxi)-4,5-dimetoxi-2-nitrofenil (**9**)

Sobre una disolución del alcohol **8** (500 mg, 2.35 mmol) disuelto en MeCN (23.5 mL) se añadió Et_3N (950 mg, 9.4 mmol) y N,N´-disuccinimidil carbonato (721 mg, 2.82 mmol). Se agitó durante 8 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar, se eliminó el disolvente y se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice (60% AcOEt/hexanos), obteniéndose el producto como un sólido amarillo (607 mg, 73%).

^{1}H-RMN (250MHz, $CDCl_3$): 2.85 (s, 4H), 3.96 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 5.78 (s, 2H), 7.04 (s, 1H), 7.75 (s, 1H).

^{13}C-RMN (250MHz, $CDCl_3$): 25.4 (CH2), 56.4 (CH3), 56.6 (CH3), 69.1 (CH2), 108.2 (CH), 108.6 (CH), 125.3 (C), 139.1 (C), 148.5 (C), 151.3 (C), 154.1 (C), 168.4 (C).

Síntesis del 2,2'-{1,5-pentanodiilbis[imino-4,1-fenilen(iminometilen)imino]}bis({[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]carbonil}oxi)(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)] (Nvoc$_2$-pentamidina, **©4**)

La di-sal trifluoroacética de la azapentamidina (50 mg, 0.088 - obtenida según el procedimiento descrito por Bakunova et al. *J. Med. Chem*. 2009, 52, 2016-2035) se disolvió en 1.8 mL de una disolución previamente preparada de DIEA/DMF (0.195 M). El compuesto **9** (93 mg, 0.26 mmol) se añadió a la disolución y el crudo de reacción resultante se agitó magnéticamente bajo atmosfera de Ar y en ausencia de luz durante una noche. Trascurrido ese tiempo el disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se aisló y purificó por cromatografía en columna de sílice gel, obteniéndose el producto deseado (60 mg, 0.073 mmol, 83%).

^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): 1.46 (m, 2H), 1.59 (m, 4H), 3.08 (dd, J = 12.42, 6.59 Hz, 4H), 3.87 (s, 6H), 3.87 (s, 6H), 5.37 (s, 4H), 6.42 (t, J = 5.35 Hz, 2H), 6.57 (d, J = 8.97 Hz, 4H), 7.21 (s, 2H), 7.69 (s, 2H), 7.81 (d, J = 8.88 Hz, 4H).

^{13}C RMN (300 MHz, DMSO-d_6): 24.1 (CH_2), 28.2 (CH_2), 42.2 (CH_2), 55.9 (CH_3, OMe), 56.0 (CH_3, OMe), 62.8 (CH2), 108.0 (CH), 110.5 (CH), 111.1 (CH), 119.2 (CH), 127.7 (C), 129.3 (CH), 139.6 (C), 147.6 (C), 152.3 (C), 153.0 (C), 163.3 (C), 166.8 (C).

Espectroscopía de Fluorescencia

Las medidas se realizaron en un aparato Jobin−Yvon Fluoromax−3 (*DataMax 2.20*) acoplado a un controlador de temperatura Wavelength Electronics LFI−3751. Todos los datos se midieron a 20 ºC.

Los experimentos in vitro con **©1** se realizaron con los siguientes parámetros: incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de ranura de excitación: 2.0 nm; ancho de ranura de emisión: 4.0 nm; longitud de onda de excitación 329 nm y medida de 345 nm a 500 nm.

Los experimentos in vitro con **©2** se realizaron con los siguientes parámetros: incremento: 1.0 nm; tiempo de integración: 0.25 s; ancho de ranura de excitación: 2.0 nm; ancho de ranura de emisión: 4.0 nm; longitud de onda de excitación 360 nm y medida de 380 nm a 600 nm.

El oligonucleótido horquilla que contiene la secuencia diana AAATTT (SEQ ID NO: 1) fue suministrado por Thermo Fischer Scientific GmbH.

La desprotección de los grupos protectores fotolábiles se llevó a cabo mediante irradiación con un transiluminador con lámpara de 8 watt (λmax aprox. 360 nm).

Ejemplo 5. Ensayos in vivo con los compuestos protegidos **©2** y **©3**

Las células en las cuales se realizaron los experimentos *in vivo* pertenecen a la línea celular *Vero*, el medio de cultivo de éstas es tampón *DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)* que contiene un 10% de *FBS (Fetal Bovine Serum)*. El día anterior al experimento se trasladaron a unos pocillos que contenían sus correspondientes cubreobjetos de 15 mm, posteriormente se lavaron y almacenaron con PBS sin suero.

Los ensayos con los compuestos ($Nvoc_2$-ethidium, **©2**) y ($Nvoc_2$-DAPI, **©3**) se realizaron a una concentración de 50 microM salvo en el caso en que se estudió el efecto de la concentración en relación con su permeabilidad a las membranas celulares.

Una vez añadido al medio de cultivo ($Nvoc_2$-ethidium, **©2**) o ($Nvoc_2$-DAPI, **©3**), se incubaron las células durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, transcurrido ese tiempo se lavaron 3 veces con PBS, una vez lavadas se trasladaron los cubreobjetos con las células a los portaobjetos donde se montaron con Mowiol 4-88® [100 mg/mL in 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 25% glycerol and 0.1% DABCO (como agenta antifúngico)] para su irradiación y posterior visualización con microscopía de fluorescencia.

La desprotección se realizó con un transiluminador UV para geles durante diferentes tiempos antes de su observación en el microscopio de fluorescencia. Las imágenes seleccionadas fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-50, después estas fueron procesadas con el programa informático Adobe Photoshop (Adobe Systems).

En las Figuras 5 a 8 se muestran las imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia de las células incubadas con los compuestos **2**, **©2**, **3** y **©3**, antes y después de ser irradiadas con luz UV.

Ejemplo 6. Ensayos de difusión en disco

La actividad antimicrobiana del compuesto **©4** se midió mediante el método convencional de difusión en disco con *Candida albicans*, siguiendo el procedimiento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006).

La disolución antimicrobiana se prepararó utilizando agua o DMSO como disolvente. Los discos estériles de 6 mm de diámetro (Liofilchem, Italia) embebidos en el fármaco se mantuvieron en la superficie de Agar Mueller Hinton (Cultimed, España) inoculado con la levadura.

Las placas se incubaron a 37 ºC durante 24 h y las zonas de inhibición se midieron en milímetros. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9, donde se muestra la actividad antimicrobiana del compuesto **©4** tras ser irradiado con luz UV.

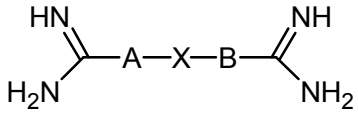
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra que está unida covalentemente a un grupo protector fotolábil, con la condición de que dicho compuesto no sea a su vez una molécula de unión al ADN de doble hebra.

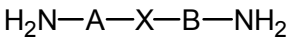
2. Compuesto según la reivindicación 1, donde la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra se selecciona de entre un agente intercalante, un agente alquilante o un molécula de unión al surco menor.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra es un colorante de ADN, un agente antitumoral o un agente antimicrobiano.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib):



(Ia)



(Ib)

donde

A y B se seleccionan cada uno independientemente de arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos;

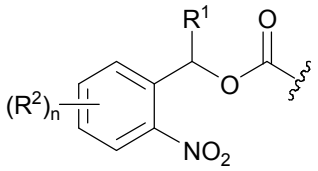
X puede no existir, de forma que A y B se encuentren condensados, o representa un enlace, -O-, -S-, -NH-, -O-Y-O-, -S-Y-S-, -NH-Y-NH-, o un alquilo C_1-C_6, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituidos;

Y se selecciona de alquilo C_1-C_8, arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos,

o una sal o solvato del mismo.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra se selecciona de entre pentamidina, aza-pentamidina, bromuro de etidio y 4',6-diamidinio-2-fenilindol.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grupo protector fotolábil es un compuesto de fórmula (II):



(II)

donde

n se selecciona de 0, 1, 2, 3 y 4;

R^1 y cada R^2 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, arilo C_6-C_{15}, heteroarilo C_3-C_{15} y heterociclo C_3-C_{15} opcionalmente sustituidos, NO_2, CN, halógeno, -OR', -SR', -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$OS(O)_2$R', -N(R')(R''), -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)N(R')(R''), -OC(O)R' y -N(R')C(O)R''; donde cada R' y R'' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_7, arilo C_6-C_{15}, heteroarilo C_3-C_{15} y heterociclo C_3-C_{15} opcionalmente sustituidos;

o dos grupos R^2 forman, junto con el anillo de fenilo al que están unidos, un grupo heterociclo.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde:

n se selecciona de 0, 1 y 2;

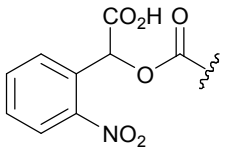
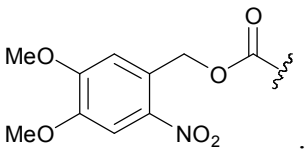
R^1 se selecciona de entre hidrógeno, metilo, trifluorometilo y carboxilo;

R^2 representa metoxilo, o dos radicales R^2 contiguos forman un grupo –O-CH_2-O-.

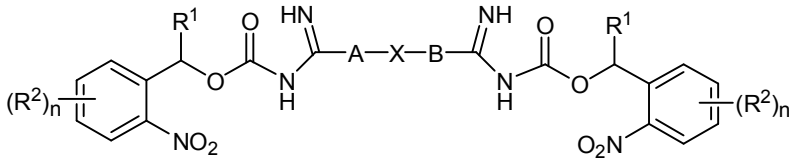
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos uno de R^1 y R^2 comprende un grupo ionizable a pH fisiológico.

9. Compuesto según la reivindicación anterior, donde al menos uno de R^1 y R^2 es un grupo carboxilo.

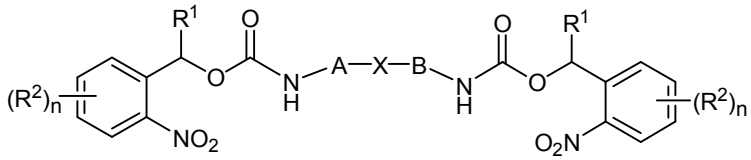
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el grupo protector fotolábil se selecciona de:


y

.

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado de entre un compuesto de fórmula (IIIa) y (IIIb):



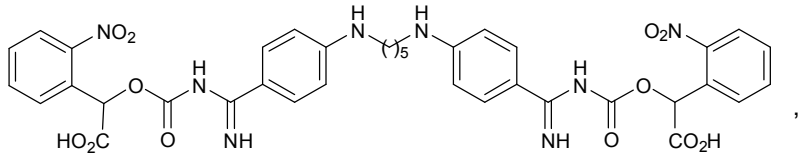
(IIIa)

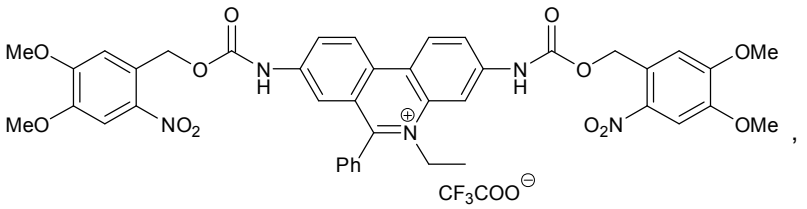


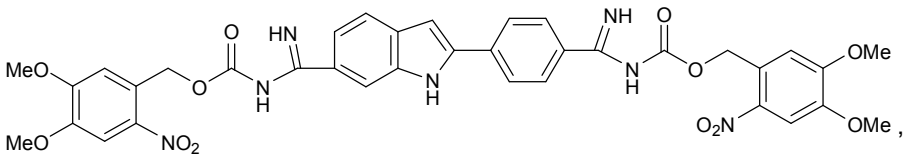
(IIIb)

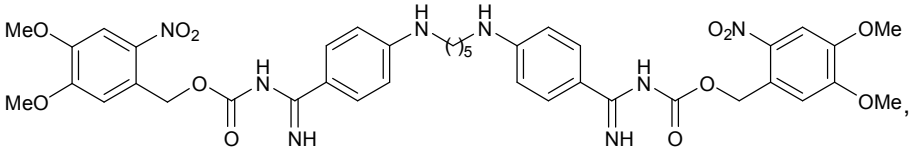
donde A, B, X, n, R^1 y R^2 son tal y como se han definido en las reivindicaciones anteriores.

12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado de:


, © 1


, © 2


, © 3


, © 4

o una sal o solvato del mismo.

13. Uso de un compuesto tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el control in vitro de la expresión génica y la síntesis de proteínas.

14. Uso de un compuesto tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para marcar in vitro secuencias de ADN o células.

15. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

16. Uso de un compuesto tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para preparar un medicamento.

17. Uso de un compuesto tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas o de enfermedades microbianas.

18. Uso según la reivindicación 17, donde la enfermedad proliferativa es cáncer.

19. Uso según la reivindicación 17, donde la enfermedad microbiana es una enfermedad bacteriana, viral, fúngica o parasitaria.

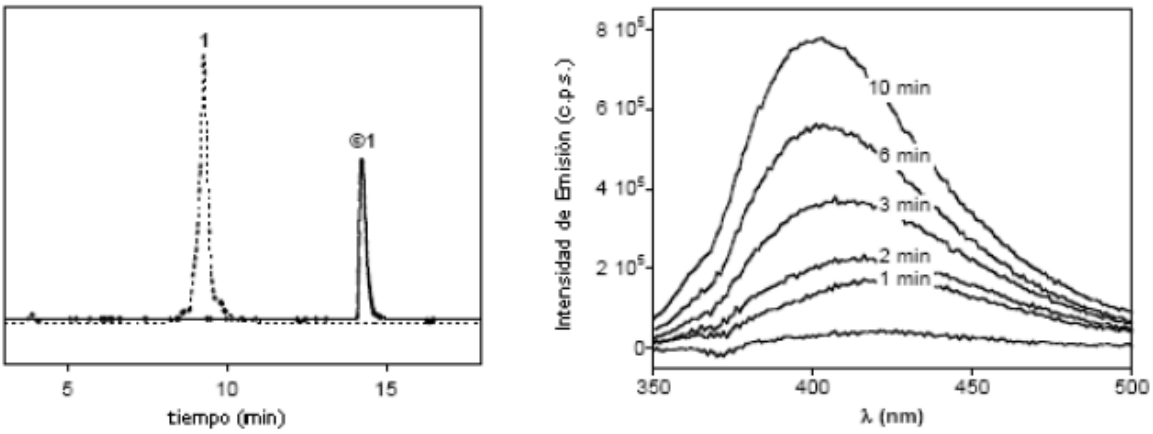


Figura 1

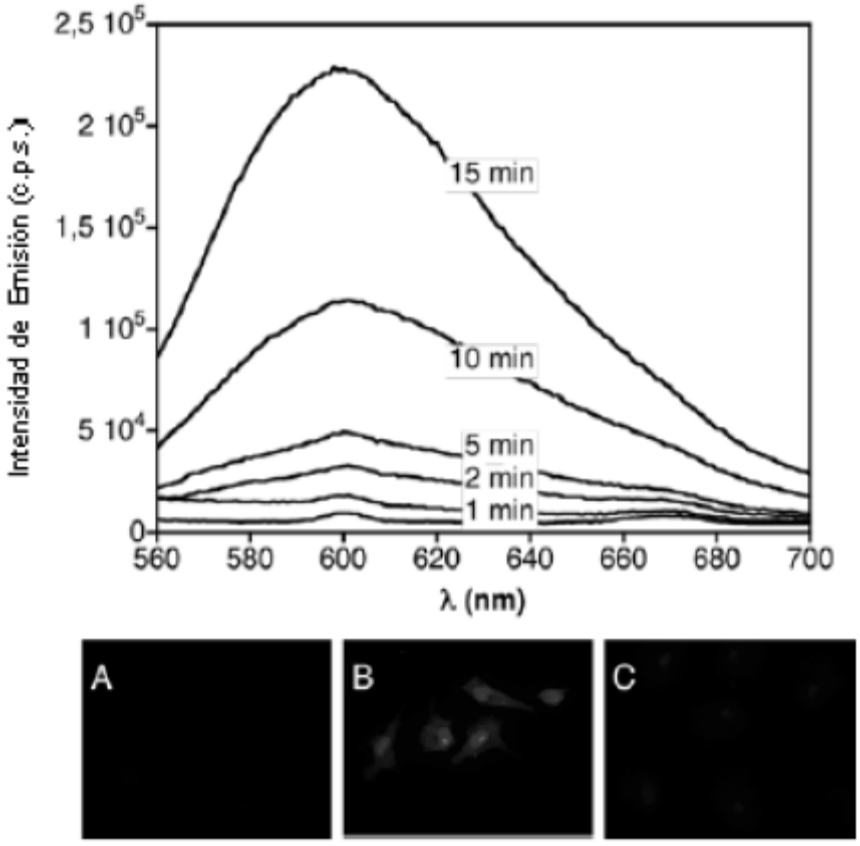


Figura 2

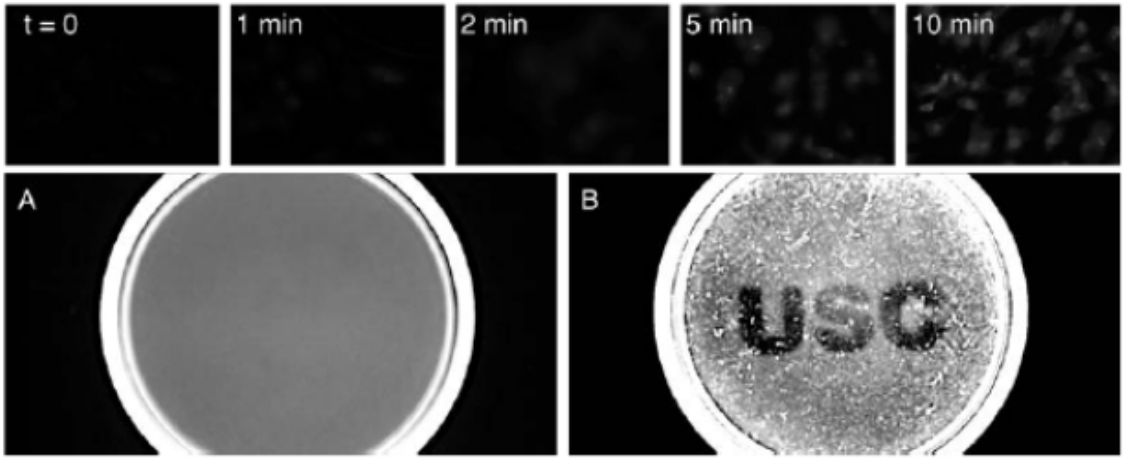


Figura 3

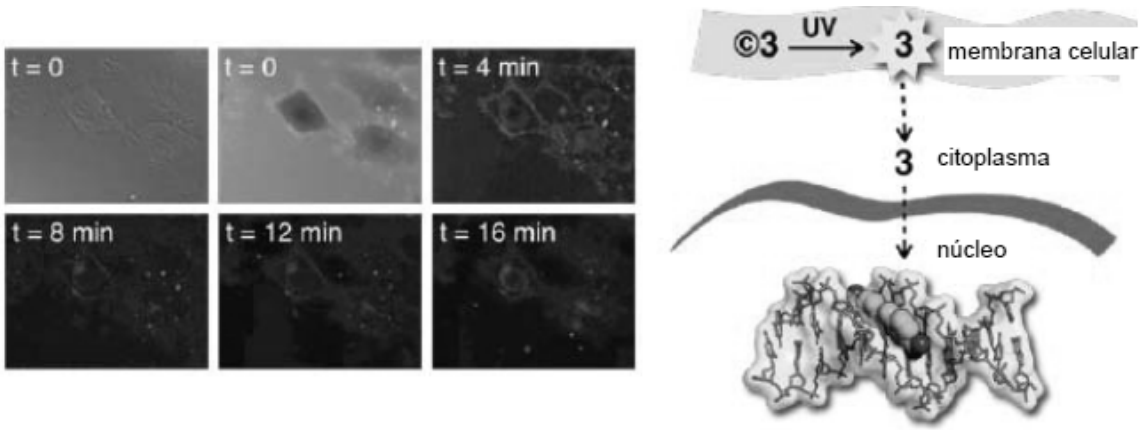


Figura 4

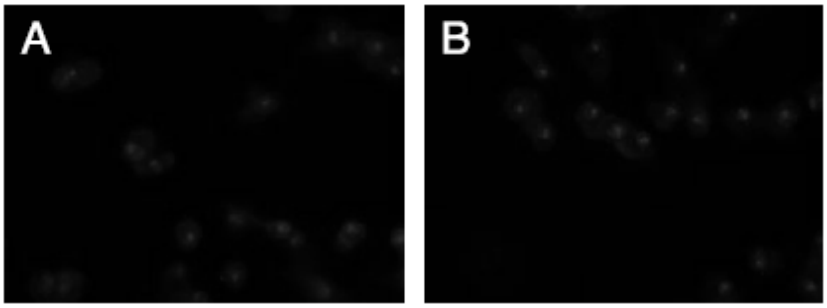


Figura 5

Figura 6

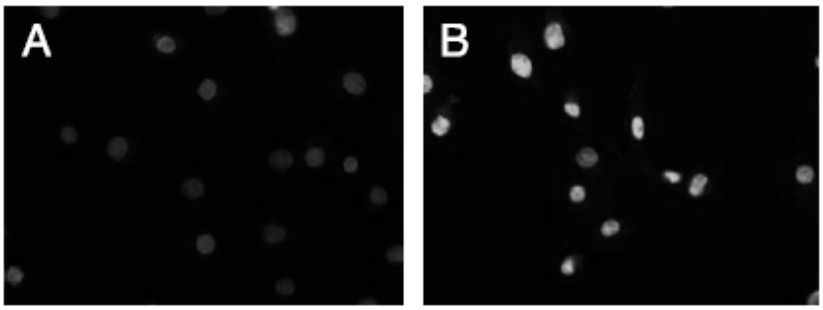


Figura 7

Figura 8

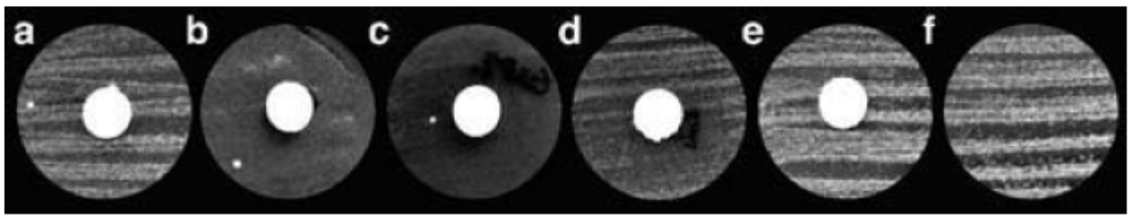


Figura 9

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela

<120> INTERNALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN FOTOCONTROLADA DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS CAPACES DE UNIRSE AL ADN DE DOBLE HEBRA

<130> P6352ES00

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleótido horquilla (hairpin) que contiene la secuencia diana AAATTT

<400> 1
ggcgaaattt cgctttttgc gaaatttcgc c 31

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201131415

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 24.08.2011

(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	WO 2011007038 A2 (UNIV. SANTIAGO DE COMPOSTELA) 20.01.2011, reivindicaciones 1-15.	1-19
A	O. VAZQUEZ et al., "Bis-4-aminobenzamidines: Versatile, fluorogenic A/T-selective dsDNA binders", Organic Letters, 2010, vol. 12, nº 2, páginas 216-219.	1-19
A	O. VAZQUEZ et al., "dsDNA-Triggered energy transfer and lanthanide sensitization processes. Luminescent probing of specific A/T sequences", Chem. Commun., 2010, vol. 46, páginas 5518-5520.	1-19
A	W. T. MONROE et al., "Targeting expression with light using caged DNA", Journal of Biological Chemistry, 1999, vol. 274, nº 30, páginas 20895-20900.	1-19
A	H. YU et al., "Chemistry and biological applications of photo-labile organic compounds", Chem. Soc. Rev., 2010, vol. 39, páginas 464-473.	1-19

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**
12.11.2012	E. Davila Muro	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C257/18 (2006.01)
C07D221/06 (2006.01)
C07D209/14 (2006.01)
A61K31/155 (2006.01)
A61K31/404 (2006.01)
A61K31/435 (2006.01)
G01N21/77 (2006.01)

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

C07C, C07D, A61K, G01N

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, XPESP, NPL, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-19	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-19	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2011007038 A2	20.01.2011
D02	O. VAZQUEZ et al., Org. Lett., 2010, vol. 12, nº 2, pgs. 216-219	
D03	O. VAZQUEZ et al., Chem. Commun., 2010, vol. 46, pgs 5518-5520	
D04	W. T. MONROE et al., J. Biol. Chem., 1999, vol. 274, nº 30, pgs. 20895-20900	

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 un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN de doble hebra unida covalentemente a un grupo protector fotolábil. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene el compuesto, así como a los usos del compuesto para el control in vitro de la expresión génica y síntesis de proteínas, para el marcado in vitro de secuencias de ADN y para la preparación de un medicamento utilizable en el tratamiento de enfermedades proliferativas o microbianas.

El documento D01 divulga compuestos con estructura de bis-4-aminobenzamidinas, su procedimiento de obtención y uso como agentes fluorogénicos de reconocimiento de secuencias de ADN debido a su capacidad para actuar como moléculas de unión al surco menor del ADN de doble hebra. La diferencia entre los compuestos aza-pentamidina descritos en D01 y los de la invención radica en que los primeros no están unidos covalentemente a un grupo protector fotolábil (ver compuestos Ia y Ib).

El documento D02 divulga también derivados fluorogénicos de bis-4-aminobenzamidinas que presentan un aumento de su emisión de fluorescencia cuando se unen específicamente a sitios A/T del surco menor del ADN de doble hebra, por lo que resultan útiles para el reconocimiento de dichas secuencias (ver Esquema 1). Como en el caso del documento D01, la diferencia entre los compuestos descritos y los de la invención radica en que los primeros no están unidos covalentemente a un grupo protector fotolábil.

El documento D03 divulga un complejo formado por un derivado de bis-4-aminobenzamidina con un sustituyente 4-alcoxiaminopropano unido covalentemente a un conjugado macrocíclico DOTA[Ln^{3+}] o un derivado de cumarina, con capacidad como aceptores fluorófobos (ver Esquemas 1 y 2. Estos compuestos actúan sobre los procesos de transferencia de energía inducidos por sitios específicos del ADN de doble hélice. En este caso tampoco el sustituyente unido se trata de un grupo protector fotolábil.

El documento D04 divulga la activación/inactivación de un plásmido de ADN que tiene unido covalentemente un grupo protector fotolábil 1-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)diazoetano (DMNPE). La fotoactivación con luz UV permite el control de la expresión del plásmido y su uso potencial como marcador de secuencias (ver páginas 20898-20900). Aunque en este caso el grupo protector fotolábil es de tipo *o*-nitrofeniletilo sustituído, la diferencia con los compuestos de la invención radica en que no se trata de una molécula pequeña de unión al ADN (alquilante, intercalante o molécula de unión al surco menor).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la investigación. Ninguno de los documentos D01-D04, tomados solos o en combinación con los otros, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia un compuesto formado por una molécula pequeña de unión al ADN unida covalentemente a un grupo protector fotolábil (reivindicación independiente 1), ni hacia una composición farmacéutica que contenga dicho compuesto (reivindicación independiente 15), ni tampoco el uso del mismo para el control *in vitro* de la expresión génica y síntesis de proteínas (reivindicación independiente 13), para el marcado *in vitro* de secuencias de ADN o células (reivindicación independiente 14), o para la preparación de un medicamento utilizable en el tratamiento de enfermedades proliferativas o microbianas (reivindicaciones independientes 16 y 17).

Por lo tanto, el objeto de la invención según las reivindicaciones 1-19 se considera que cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los arts. 6.1 y 8.1 LP 11/1986.