



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 351 652**

② Número de solicitud: 200930462

⑤ Int. Cl.:
C07D 213/58 (2006.01)
C07C 257/18 (2006.01)
C09K 11/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **15.07.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.02.2011

⑰ Solicitante/s:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-CITT-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑱ Inventor/es: **Vázquez Sentís, Eugenio;**
Mascareñas, José Luis;
Vázquez, Olalla y
Isidro López, Mateo

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos para señalar se-
cuencias específicas de ADN de doble cadena.**

㉑ Resumen:

Uso de compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos para señalar secuencias específicas de ADN de doble cadena.

La presente invención se refiere al uso de un grupo de compuestos derivados de la propamidinapentamidina, que poseen grupos 4-aminobenzamidinios en su estructura, como agentes fluorogénicos de reconocimiento de secuencias de ADN debido a su capacidad para unirse al surco menor del ADN.

ES 2 351 652 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos para señalar secuencias específicas de ADN de doble cadena.

La presente invención se refiere al uso de un grupo de compuestos derivados de la propamidinapentamidina como agentes fluorogénicos de reconocimiento de secuencias de ADN.

10 Estado de la técnica anterior

Un importante objetivo de las investigaciones actuales en la frontera entre la química y la biología es el desarrollo de agentes químicos capaces de interactuar de forma eficiente con secuencias específicas de ADN de doble cadena. A lo largo de las últimas décadas se han descrito un gran número de agentes heterocíclicos capaces de unirse selectivamente al ADN insertándose en su surco menor (cfr. Lown, J.W. *Pharmacol. Ther.* 1999, 84, 1-111). Entre estas moléculas, probablemente las más estudiadas sean aquellas basadas en poliamidas de pirrol e imidazol en estructura de horquilla β , puesto que muestran unas propiedades excelentes en cuanto a afinidad y especificidad de secuencia. Desafortunadamente la síntesis de estos compuestos no es precisamente trivial, y su utilidad *in vivo* está en gran medida limitada debido a dificultades intrínsecas para atravesar membranas biológicas y notable toxicidad.

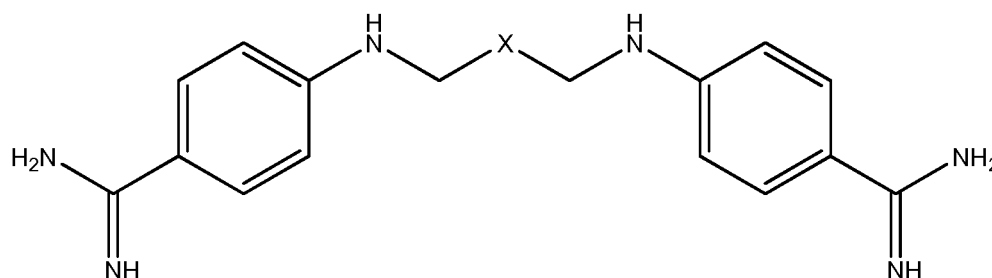
Otro tipo de agentes que también reconocen el surco menor del ADN son los compuestos de tipo bis-benzaminiobencilamidinio, tales como la pentamidina o propamidina. Estas moléculas son especialmente atractivas desde el punto de vista farmacológico, puesto que son estables y presentan buenas propiedades de transporte en numerosas líneas celulares. Así por ejemplo, la pentamidina esta siendo utilizada desde hace años contra la tripanosomiasis, la leishmaniasis y neumonía de *P. Carinii*. De entre los derivados de bis-amidinas son también especialmente importantes aquellos con conectores de tipo aromático, de hecho la DB289, una prodroga de la furamidina, se encuentra en fase clínica III contra la enfermedad del sueño, y es muy activa contra otros parásitos (cfr. Mathis, A.M., *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51, 2801-2810).

Estas propiedades, junto con su simplicidad estructural, han animado la búsqueda de nuevos análogos con propiedades de reconocimiento mejoradas y toxicidades reducidas. En estos momentos, las mayores limitaciones para el desarrollo de este tipo de benzamidinios tienen que ver con la escasa versatilidad y practicidad de las rutas sintéticas existentes y con el hecho de que no exista un método simple, rápido y fiable que permita evaluar y cuantificar su afinidad y selectividad por secuencias específicas del ADN. El método habitual para estudiar la afinidad de este tipo de moléculas se basa en la desnaturalización térmica de sus complejos con el ADN. Sin embargo, este método sólo da información indirecta y bastante cualitativa de las características de reconocimiento de estos compuestos, y además es difícil de implementar en estrategias de *high-throughput screening* (cfr. Dardonville, C. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 3748-3752).

40 Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han observado que sustituyendo las unidades de bis-4-fenoxiamidinio, características de los derivados clásicos de tipo benzamidinico, por 4-aminobenzamidinios se obtienen análogos que poseen una estructura adecuada para interactuar con secuencias de ADN ricas en A/T, con la ventaja adicional de que exhiben fluorescencia cuando interactúan con dicho ADN de doble cadena.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de compuesto de fórmula general (I)



(I)

donde X se selecciona entre arilo, heteroarilo o alquilo C_1-C_{10} como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN.

ES 2 351 652 A1

En la presente invención, el término “agente fluorogénico” se refiere a una molécula fluorescente que posee un grupo funcional que absorbe energía de una longitud de onda específica y la emite en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía), y en el que la cantidad de energía emitida (rendimiento cuántico) depende tanto del propio grupo funcional fluorescente como de su ambiente químico. En concreto, para el caso de las bis-benzamidas objeto de la presente invención, se produce un aumento significativo (más de 60 veces) en la intensidad de emisión de fluorescencia en presencia de ADN de doble cadena con contiene determinadas secuencias.

El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y 5 átomos de carbono. Por ejemplo, pero sin limitarse a, metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como amina, halógeno, hidroxilo o ácido carboxílico.

El término “arilo” se refiere, en la presente invención, a anillos aromáticos sencillos o múltiples, que tienen de entre 5 a 18 carbonos. Los grupos arilo son por ejemplo, pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. Preferiblemente el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquilo (C₁-C₆), halógeno, hidroxilo o ácido carboxílico.

El término “heteroarilo” se refiere, en la presente invención a un arilo como definido anteriormente que contiene al menos un heteroátomo tales como nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferiblemente nitrógeno.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto descrito anteriormente, donde X es un alquilo C₁-C₅. En una realización más preferida, X es CH₂-CH₂-CH₂-. En otra realización más preferida, X es -CH₂-.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto según descrito anteriormente, donde X es unfenilo en el que los grupos 4-aminobenzamidinio se encuentran en posición meta o para.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto según descrito anteriormente, donde X es una piridina en la que los grupos 4-aminobenzamidinio se encuentran en posición meta o para. Más preferiblemente, los grupos 4-aminobenzamidinio se encuentran en posición meta.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto según descrito anteriormente, en el que la secuencia de ADN que se reconoce está formada por 4, 5 ó 6 pares de bases A/T o G/C. Preferiblemente, la secuencia de ADN que se reconoce está formada por 6 pares de bases A/T.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto según descrito anteriormente para ensayos de identificación de agentes de reconocimiento del surco menor del ADN por desplazamiento de la fluorescencia.

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.

Descripción de las figuras

Fig. 1.- Muestra los espectros de fluorescencia de BAPPA en diferentes disolventes. La concentración de BAPPA es la misma en todos los casos, pero las propiedades fluorogénicas dan como resultado espectros de emisión diferentes.

Fig. 2.- Muestra las valoraciones de BAPPA (0.55 μM in Tris buffer 20 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, pH 7.5) con secuencias de ADN seleccionadas. AATTT (●); AATT (○); AAAA (◆); AATG (◇)(□) y GGCC (▲); ATG (▲); AAG (□). Las curvas de unión representan el mejor ajuste con un modelo de interacción 1:1 y teniendo en cuenta la contribución del oligonucleótido a la fluorescencia.

Fig 3.- Muestra las curvas de desplazamiento de BAPPA con el ADN AATTT con propamidina (●), amino-propamidina (◆) y guanidinio-propamidina (▲).

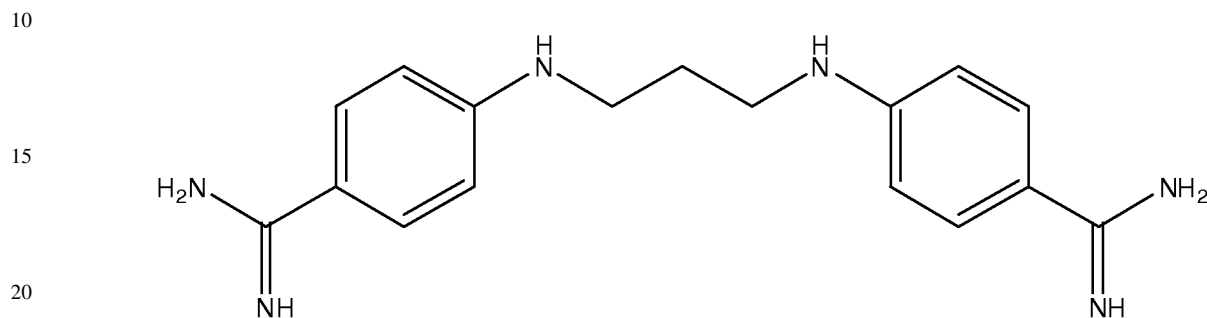
Ejemplos

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 fórmula (I) de la presente invención.

ES 2 351 652 A1

1. Síntesis de los compuestos.

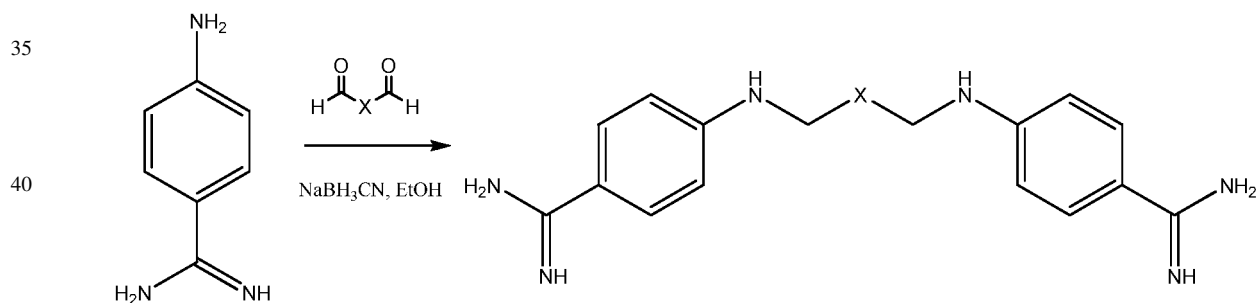
La síntesis de los compuestos de la presente invención con conectores alquílicos entre las unidades de benzamida se llevó a cabo siguiendo 5 procedimientos conocidos en la bibliografía ligeramente modificados (Tidwell, R.R.; Jones, S.K.; Geratz, J.D.; Ohemeng, K.A.; Cory, M.; Hall, J.E. *J. Med. Chem.* 1990, 33, 1252-1257). Los ensayos de fluorescencia se han realizado con el compuesto *N*¹,*N*²-bis(4-amidinofenil)propano-1,3-diamina (BAPPA) con la siguiente fórmula:



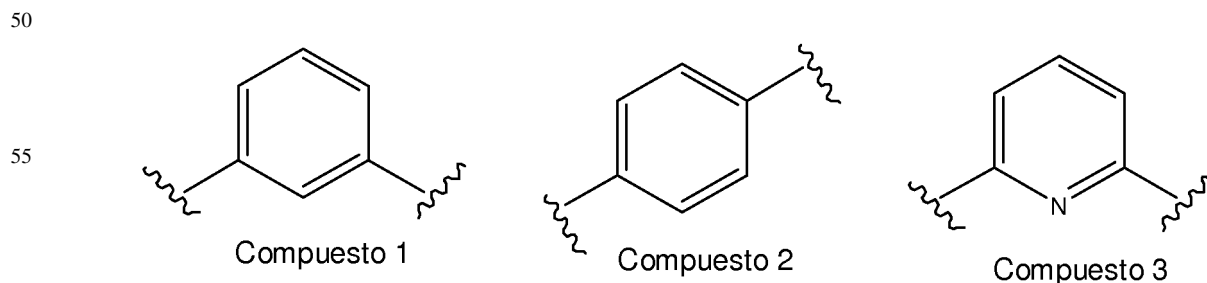
La síntesis de los compuestos de la presente invención con conectores arílicos se llevó a cabo utilizando el procedimiento que se ejemplifica a continuación con la síntesis del derivado de piridina (compuesto 3):

Esquema 1

Estrategia sintética general de afinación reductiva de 4-aminobenzimidamida



donde X es:



En un balón purgado y flameado se mezcló 2,6-pirindicarboxaldehído (100 mg, 0.74 mmol), dihidrocloruro de *p*-anilinbezanamida (338 mg 1.63 mmol) y cianoborohidruro sódico (101 mg 1.62 mmol). A continuación se añadieron 25 mL de MeOH y se dejó reaccionar durante 7 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se concentra el crudo de reacción a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía de media presión en fase reversa (*Büchi Sepacore Flash* de fase reversa (C-18) con gradiente de acetonitrilo/agua 0.1% TFA). La identidad de los productos finales se confirmó por MS (ESI) y RMN (¹H, ¹³C, DEPT).

ES 2 351 652 A1

2. Ensayos de fluorescencia

Los experimentos de fluorescencia se llevaron a cabo en fluorímetro Jobin-Yvon Fluoromax-3 (DataMax 2.20), acoplado a un sistema de control de temperatura Wavelength Electronics LFI-3751. Todas las medidas se llevaron a cabo con los siguientes parámetros de adquisición: incremento 1 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de banda de excitación: 3 nm; ancho de banda de emisión: 6 nm; longitud de onda de excitación: 329 nm. Los espectros de emisión se hicieron entre 345 y 500 nm.

Los ADNs utilizados fueron horquillas de doble hélice con las los siguientes secuencias. Se marcan en cursiva los sitios de unión:

ADN *AAATTT*: 5'-GGCAAATTTTCAGTTTTTCTGAAATTTGCC-3'

ADN *AATTT*: 5'-GGCGAATTTTCGCTTTTTGCGAAATTCGCC-3'

ADN *AATT*: 5'-GGCGAATTCAGCTTTTTGCTGAATTCGCC-3'

ADN *GGCC*: 5'-GGCAGGCCAGCTTTTTGCTGGGCCTGCC-3'

La concentración de cada ADN se midió espectroscópicamente utilizando el coeficiente de extinción teórico resultado de la suma de la contribución teórica de cada uno de los nucleótidos de la secuencia: $\xi_{260} = (n_A \times \xi_A + n_C \times \xi_C + n_G \times \xi_G + n_T \times \xi_T) 0.8$; donde n_A , n_C , n_G y n_T son el número total de adeninas, citosinas, guaninas y timinas, y ξ_A , ξ_C , ξ_G y ξ_T son los coeficientes de extinción para cada tipo de nucleótido en la secuencia 15.4, 7.4, 11.5, y 8.7 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para dA, dC, dG, y dT, respectivamente. El factor de corrección de 0.8 da cuenta de la estructura secundaria en forma de doble hélice de las cadenas de ADN en horquilla.

La concentración de los compuestos derivados de propamidina se calculó espectroscópicamente a partir de su máximo de absorbancia. En cada caso se calcularon los coeficientes de extinción correspondientes a través de medidas de la absorbancia de muestras de concentración conocida por pesada de la muestra disuelta.

El aumento en el carácter dipolar hace que BAPPA tenga longitudes de onda de excitación y de emisión máximas más largas (329 y 387 nm respectivamente) que la propamidina, una molécula similar a BAPPA (posee átomos de -O- grupos -CO en el conector alquílico en lugar de los -NH- de BAPPA) y que también reconoce el surco menor del ADN. La naturaleza electrónica del compuesto, con un estado de excitación con una configuración electrónica muy diferente a la del estado fundamental, le confiere a BAPPA una gran sensibilidad a las propiedades del microentorno (polaridad). Así, la fluorescencia de BAPPA aumenta con la hidrofobicidad, al pasar de agua a MeOH y iPrOH. Sorprendentemente, a diferencia de otros sistemas de tipo dador/aceptor, la intensidad de la fluorescencia en estos disolventes es mayor que en otros disolventes polares como DMF. Especialmente llamativas son las bandas a longitud de onda larga (~450 nm) que se observan en dioxano y THF, probablemente por la formación de un excímero intramolecular (ver figura 1).

Una vez hecha la caracterización básica de BAPPA, se estudió su comportamiento en presencia de los oligonucleótidos ADN de doble cadena (dsDNA). En presencia de un oligonucleótido de doble hebra que contiene una secuencia objetivo rica en A/T, se observa un aumento significativo en la intensidad de emisión de fluorescencia. Este aumento creemos que es debido al entorno hidrofóbico en el que se encuentra BAPPA al insertarse en el surco menor del ADN y también puede estar muy influido por el cambio en su hidratación resultado del paso de disolvente al surco del ADN. La adición de alícuotas sucesivas de un oligonucleótido de doble cadena en forma de horquilla con la secuencia *AATT* a una disolución 0.5 μM de BAPPA en tampón (Tris HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM NaCl), dio lugar a un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia. Cuando se tiene en cuenta la contribución del ADN a 329 nm en el modelo matemático, el aumento en la intensidad de emisión se pudo ajustar a un modelo 1:1. La K_D resultante de $70 \pm 659.3 \pm 0.03$ nM para *AATTT* es mejor que las constantes de disociación conocidas para compuestos similares.

A continuación se hicieron nuevas valoraciones de BAPPA con oligonucleótidos que contienen diferentes secuencias para construir la escala de afinidades relativas por en ADN (Tabla 1). Las secuencias preferidas son aquellas que contienen al menos 4 pares de bases consecutivos A/T, y entre estos, *AATT* es ligeramente mejor que *AAAA*. La introducción de una mutación G/C en estas secuencias resulta en una afinidad al menos 15 veces inferior ($K_D \approx 1.125 \mu\text{M}$). Mutaciones mayores de estas secuencias ricas en A/T reducen drásticamente la afinidad, hasta llegar a secuencias de tipo G/C que muestran únicamente una unión residual con constantes de disociación mayores de 15 μM , siendo K_D al menos 200 veces peor que para secuencias preferidas de tipo A/T (ver figura 2).

ES 2 351 652 A1

TABLA 1

Selectividad de secuencia de BAPPA obtenidas por valoraciones con ADN de doble cadena seleccionados. Todas las valoraciones se llevaron a cabo por adición de sucesivas alícuotas de ADN sobre disoluciones de BAPPA, 0.5 μ M (20 mM Tris-HCl buffer 20 mM pH 7.5, NaCl, 100 mM NaCl, pH 7.5)

Compuesto	Secuencia clave del ADN de doble hebra usado	K_D
BAPPA	GGCC ATGG	16.2 + 10 μ M
	ATGGAAGG	6.6 + 0.5
	AAGG GGCC	5.7 + 1.3 μ M
	AATG AATTT	1.1 + 0.3 μ M
	AAAA AATT	85 + 1279 +
	AATTA AAA	79 + 685 +
	AATTT AATG	70 + 10

Una vez confirmado que la fluorescencia de BAPPA puede utilizarse para estudiar el proceso de unión al ADN y obtener valores fiables de las constantes de disociación, se estudió la unión de otros agentes de reconocimiento del surco menor que en sí mismos no son fluorescentes, como por ejemplo los bis-amidinios incluidos en, análogos de tripirroles, o bisamidinios clásicos como la propamidina (ver figura 3).

En un experimento típico preparamos una disolución 0.5 μ M de BAPPA y 1.4 μ M del oligonucleótido seleccionado con la secuencia de ADN que se estudia (AATTT). Sobre esta mezcla se añaden cantidades crecientes del agente de unión al surco menor de ADN no fluorescente. Se graba el espectro de emisión de fluorescencia de cada nueva mezcla y se calcula la constante de disociación del agente a partir de la disminución de fluorescencia que resulta del progresivo desplazamiento de BAPPA del surco menor.

En resumen, se han identificado análogos de propamidina capaces de interactuar con secuencias específicas de ADN con alta afinidad y que además señalizan dicha interacción emitiendo fluorescencia. Al utilizar un oligonucleótido de doble cadena con un sitio de unión de 6 pares de bases AAATTT, la unión de BAPPA no podía describirse de forma adecuada con el modelo 1:1 esperado, pero sin embargo los datos experimentales se ajustaban perfectamente a un modelo en el que el ADN acomodaba simultáneamente a dos moléculas de BAPPA.

Los derivados de bis-amidinio con conectores arílicos muestran propiedades de fluorescencia dependientes de la polaridad del medio (fluorogénicas), lo que dan lugar a un aumento de la intensidad de emisión como consecuencia de su unión al surco menor del ADN. Esto permitió el estudio de las propiedades de reconocimiento de los compuestos 1, 2 y 3. Las constantes de disociación están resumidas en la Tabla 2, y en todos los casos se trata de complejos 1:1 con los ADNs estudiados. En ningún caso se observó la formación de complejos de tipo 2:1 como en el caso de BAPPA, y de hecho, la secuencia de reconocimiento ideal parece ser de 6 pares de bases A/T, puesto que secuencias truncadas de 5 o 4 pares de bases muestran una afinidad reducida. Sorprendentemente, al estudiar la unión a una secuencia control rica en pares de base G/C, encontramos que el compuesto derivado de para-benceno (compuesto 2) mostraba una afinidad relativamente alta por este tipo de secuencias, ($K_D = 2.3 \pm 0.21 \mu$ M) a diferencia de cualquier otro de los compuestos estudiados. Este derivado es también único en mostrar afinidades similares para secuencias de 4, 5 o 6 pares de bases. Todos estos datos sugieren un modo de unión distinto para este compuesto, probablemente a través de la inserción parcial de una única unidad de benzamidina.

TABLA 2

Propiedades de unión al ADN de derivados de aza-propamidina. Los valores estimados de K_D son resultado de tres experimentos. Los oligonucleótidos de doble cadena se utilizaron como horquillas con la secuencia objetivo insertadas (ver detalles experimentales)

Compuest o	AAATTT $K_D/ \mu\text{M}$	AATTT $K_D/ \mu\text{M}$	AATT $K_D/ \mu\text{M}$
1	724 ± 89 nM	1,2 ± 0,1	7,8 ± 0,7
2	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1
3	229 ± 63 nM	334 ± 5 nM	1,1 ± 0,30

En resumen, se han identificado análogos de propamidina con propiedades fluorogénicas que pueden utilizarse como sensores fluorescentes para ADN de doble cadena. En concreto, el derivado BAPPA presenta un gran aumento en la intensidad de emisión como consecuencia de su inserción en cadenas de ADN ricas en pares de bases A/T. El gran aumento en la fluorescencia que se observa como consecuencia de la unión al ADN los convierte en sensores ideales para detectar secuencias específicas de ADN de doble cadenas, sustancias que son todavía sorprendentemente escasas. Se ha mostrado la aplicabilidad general de estas propiedades para el estudio de la unión por inserción en el surco menor de otras moléculas no fluorescentes a través de ensayos de competición.

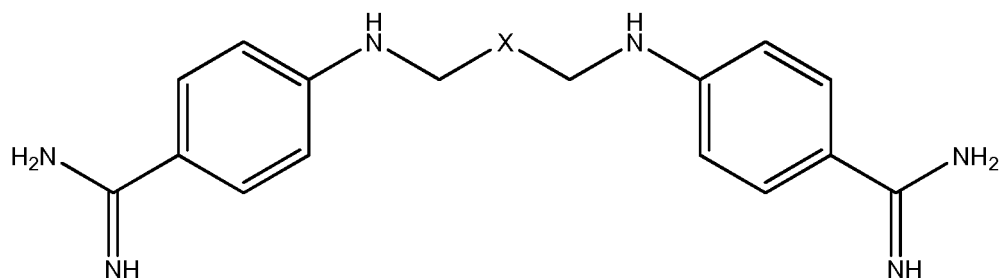
REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto de fórmula (I)

5

10

15



(I)

20

donde X se selecciona entre arilo, heteroarilo o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido,
como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN.

25

2. Uso del compuesto según la reivindicación 1, donde X es alquilo C₁-C₅.

3. Uso del compuesto según la reivindicación 2, donde X es -CH₂-CH₂-CH₂.

30

4. Uso del compuesto según la reivindicación 2, donde X es -CH₂-.

5. Uso del compuesto según la reivindicación 1, donde X es un fenilo en el que los grupos 4-aminobenzamidinio se encuentran en posición meta o para.

35

6. Uso del compuesto según la reivindicación 1, donde X es una piridina en la que los grupos 4-aminobenzamidinio se encuentran en posición meta o para.

7. Uso del compuesto según la reivindicación 6, donde X es una piridina en la que los grupos 4-aminobenzamidinio se encuentran en posición meta.

40

8. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la secuencia de ADN que se reconoce está formada por 4, 5 ó 6 pares de bases A/T ó G/C.

9. Uso del compuesto según la reivindicación 8, en el que la secuencia de ADN que se reconoce está formada por 6 pares de bases A/T.

45

10. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para ensayos de identificación de agentes de reconocimiento del surco menor del ADN.

50

55

60

65

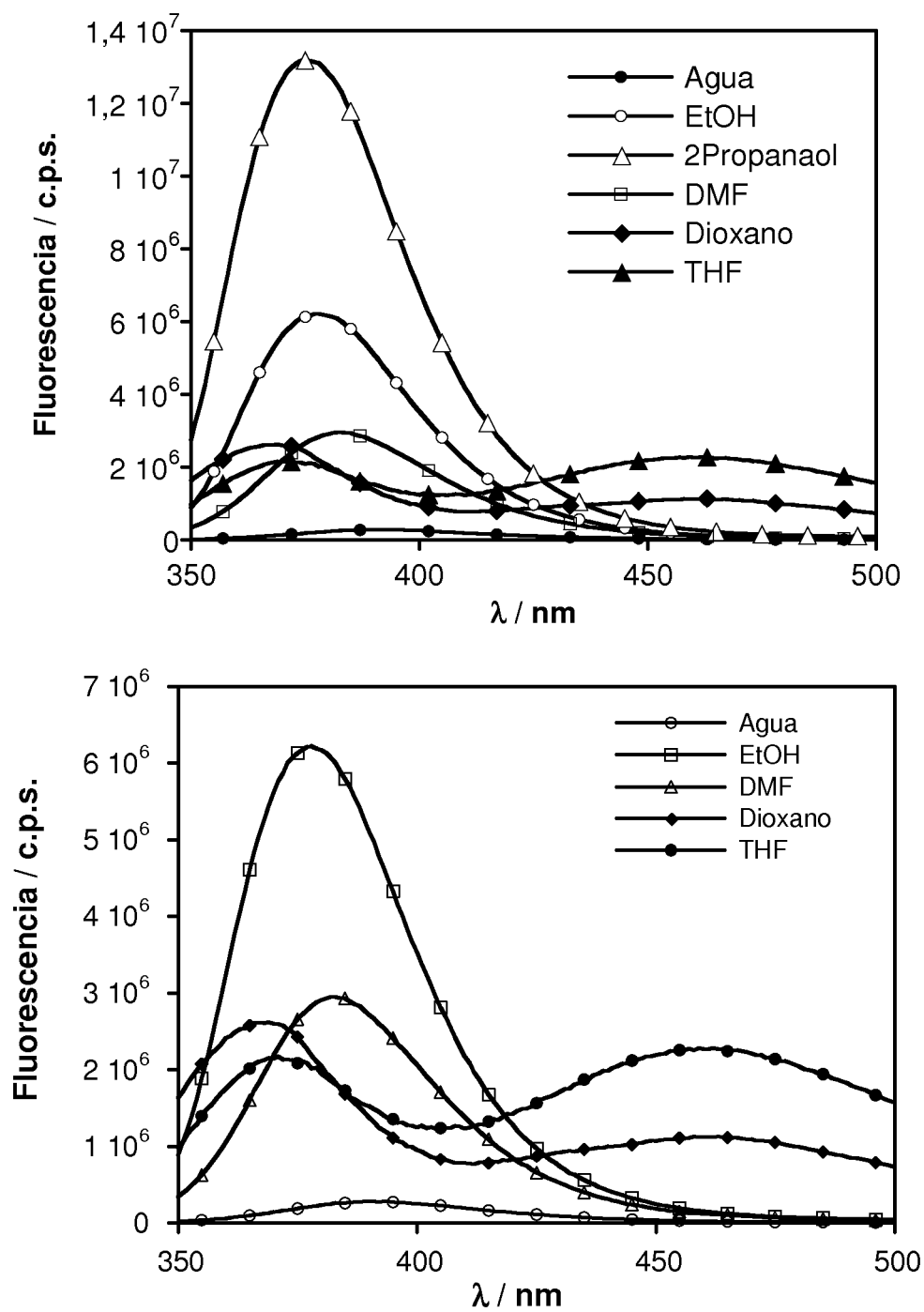


FIG. 1

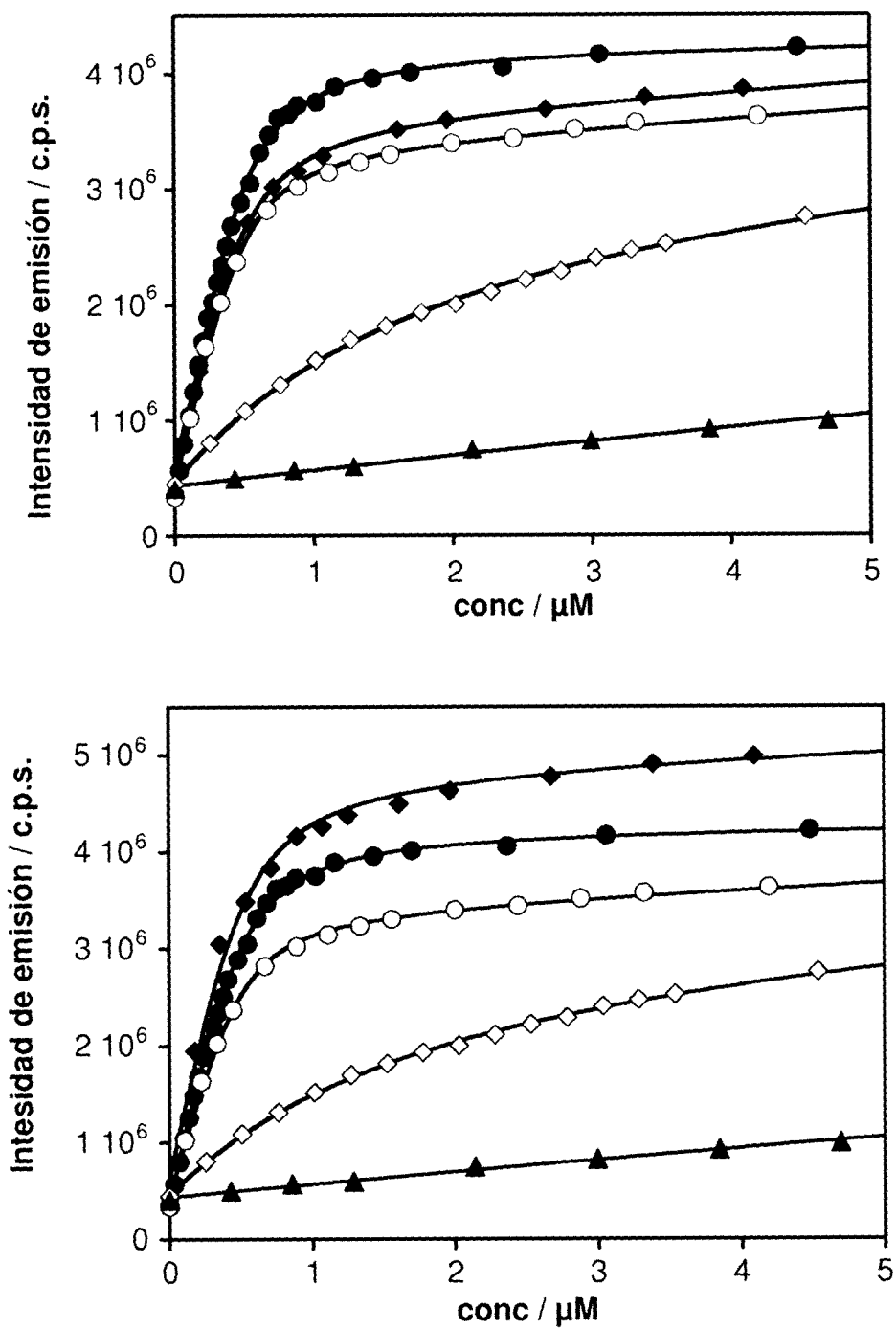


FIG. 2

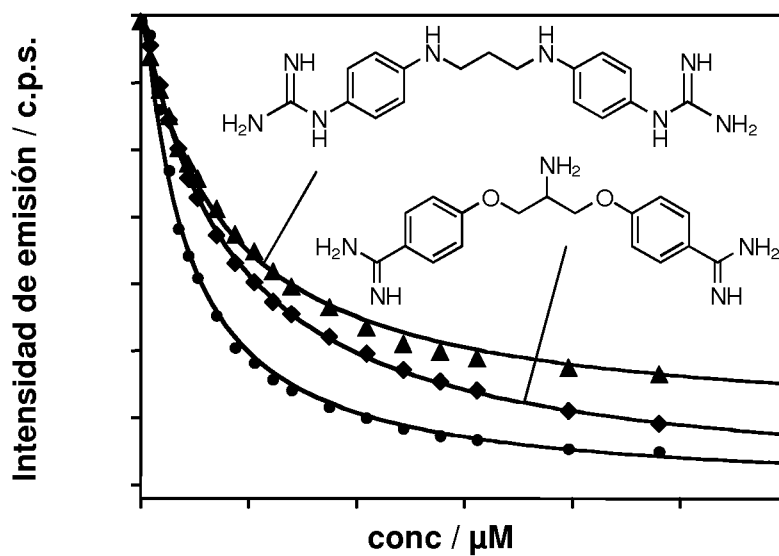
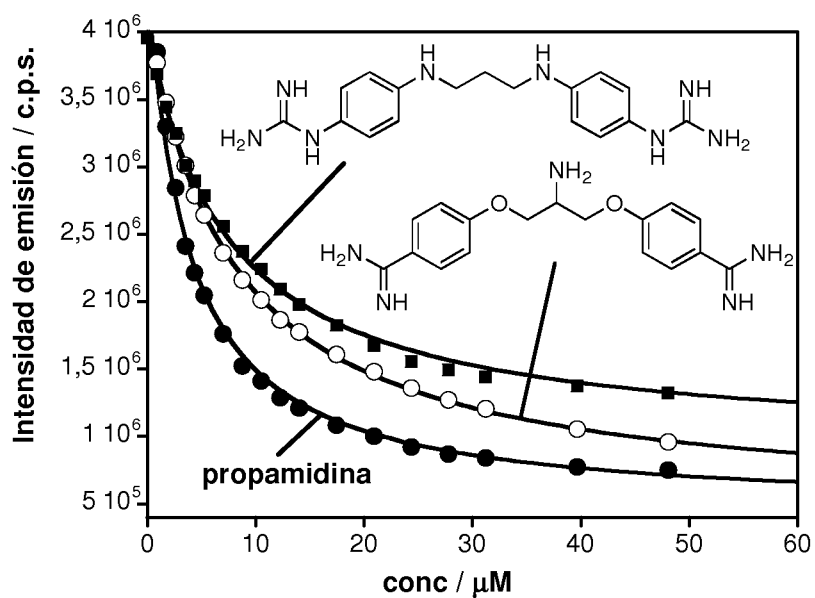


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑴ N.º solicitud: 200930462

⑵ Fecha de presentación de la solicitud: 15.07.2009

⑶ Fecha de prioridad: **00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑸ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2002/002516 A2 (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY) 10.01.2002, página 1, líneas 13-17; página 6, líneas 6-10; figura 1; página 7, líneas 5-15; página 11, líneas 8-11; página 21, línea 3; página 25, líneas 10-12.	1-10
A	HANNON, M.J. "Supramolecular DNA recognition". Chemical Society Reviews, 2007, Volumen 36, páginas 280-295. [Disponible en línea el 17.11.2006]. Ver página 280, introducción; páginas 283-284; figura 8.	1-10
A	MENEZES, F.A.S. et al. "3D-WHIM Pattern Recognition Study for Bisamidines. A Structure-Property Relationship Study". Journal of Brazilian Chemical Society, 2000, Volumen 11, Número 4, páginas 393-397. Ver página 393, resumen; página 394, figura 2, compuestos 22-25.	1-10
A	WO 2001096609 A1 (THE SRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 20.12.2001, página 1, líneas 4-8; página 2, líneas 10-15; página 17, líneas 19-20; página 19, líneas 10-15; página 23, líneas 5-20.	1-10
A	BAILLY, C. et al. "Sequence-selective binding to DNA of bis(amidinophenoxy)alkanes related to propamide and pentamide". Biochemical Journal, 1997, Volumen 323, páginas 23-31. Ver especialmente página 23, resumen; página 24, figura 1; página 27, figura 3; página 28, tabla 1.	1-10
E	VÁZQUEZ, O. et al. "Bis-4-aminobenzamidines: Versatile, Fluorogenic A/T-Selective dsDNA Binders". Organic Letters, 2010, Volumen 12, Número 2, páginas 216-219. [Disponible en línea el 10.12.2009]. Ver página 216, resumen; página 217, figura 1.	1,2,4,8-10

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: TODAS

Fecha de realización del informe
15.11.2010

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D213/58 (2006.01)

C07C257/18 (2006.01)

C09K11/00 (2006.01)

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

C07D, C07C, C09K

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, XPESP, NPL, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-10	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 2002/002516 A2	10.01.2002
D02	Chemical Society Reviews, 2007, Vol. 36, pp. 280-295	17.11.2006
D03	J. Braz. Chem. Soc., 2000, Vol. 11, Nº 4, pp. 393-397	2000
D04	WO 2001/096609 A1	20.12.2001

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

El objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula (I) con estructura de bis-aminobenzamidina como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN.

El documento D01 divulga una serie de compuestos simétricos con conformación restringida que presentan grupos aromáticos y que permiten el estudio del mecanismo de inhibición de la enzima HIV integrasa (página 1, líneas 13-17). Algunos de compuestos poseen, como grupo funcional, al menos una para-benzamidina y se integran dentro de la fórmula general (I) de la invención (ver página 6, líneas 6-10). En concreto, en este documento se divulgan los compuestos **RWH10** (X es fenilo en la fórmula (I); los grupos 4-benzamidina se encuentran en posición meta), **RWH23** (X es -CHOHCHOH- en la fórmula (I) de la solicitud), **RWH28** (X es fenilo en la fórmula (I); los grupos 4-benzamidina se encuentran en posición para), y **RHW30** (X es piridina; los grupos 4-benzamidina se encuentran en posición meta) (ver figura 1). Estos compuestos pueden actuar como inhibidores de la enzima integrasa por tres posibles mecanismos, que suponen la unión a la propia enzima, al complejo DNA-enzima o al DNA, y que se confirman mediante ensayos de fluorescencia (ver página 7, líneas 5-15; página 11, líneas 8-11).

El documento D02 presenta una revisión sobre los fenómenos relacionados con el reconocimiento del DNA, en especial por agentes sintéticos, y la importancia de dicho reconocimiento en el control de la expresión de genes específicos y, por tanto, de determinadas enfermedades (ver página 280, introducción). El documento divulga una serie de agentes que se unen al surco menor del DNA, entre los que se encuentran la molécula natural **distamicina A** y otras diarilamidinas sintéticas, como son **DAPI** (4',6-diamidino-2-fenilindol), **berenilo** y **pentamidina**, que presentan una estructura similar a los compuestos de la invención y que muestran especial afinidad por las regiones ricas en adenina y timina (**AT**) (ver páginas 283-284, figura 8).

El documento D03 divulga una serie de bisamidinas aromáticas, así como un modelo para explicar su interacción con el receptor de B-DNA a través de las regiones ricas en adenina y timina del surco menor del mismo (ver página 393, resumen). Entre las bisamidinas divulgadas se encuentran los compuestos **22-25**, que se incluyen dentro de la fórmula general (I) de la invención (ver página 394, figura 2), siendo X en dicha fórmula (I) un grupo -CH₂- (compuesto **22**), -CH₂CH₂- (compuesto **23**), -CH₂CH₂CH₂- (compuesto **24**) y -CH₂CH₂CH₂CH₂- (compuesto **25**).

El documento D04 divulga métodos para determinar la afinidad que poseen diversas moléculas por el DNA y las secuencias a las que se unen selectivamente (página 1, líneas 4-8). Estos métodos se basan en la medida de la pérdida de fluorescencia producida por el desplazamiento de un agente intercalante fluorescente unido al DNA por la molécula objeto (ver página 2, líneas 10-15) o en la medida directa del aumento de fluorescencia provocado por la unión del compuesto en sí mismo al DNA, en ausencia de un agente competitivo (ver página 17, líneas 19-20). Entre los compuestos ensayados se encuentran **DAPI** (4',6-diamidino-2-fenilindol), que se utiliza como marcador fluorescente de DNA y cromosomas (ver página 19, líneas 10-15), y **berenilo**, ambos diamidinas aromáticas capaz de unirse a los restos AT de la doble hélice de DNA (ver página 23, líneas 5-20).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de los documentos D01-D04, tomado solo o en combinación con los otros, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia el uso de un compuesto de fórmula (I) con estructura de bis-aminobenzamidina como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN.

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones **1-10** cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.