



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 357 926**

② Número de solicitud: 200902010

⑤ Int. Cl.:

C07D 221/18 (2006.01)

C07D 239/70 (2006.01)

A61K 31/473 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **19.10.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2011**

Fecha de la concesión: **16.09.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **28.09.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.09.2011

⑰ Titular/es:

**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Sobarzo Sánchez, Eduardo y
Uriarte Villares, Eugenio**

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Nuevos estándares para la fotosensibilización de oxígeno singlete.**

㉕ Resumen:

Nuevos estándares para la fotosensibilización de oxígeno singlete.

La presente invención se refiere a nuevos estándares para la fotosensibilización de oxígeno singlete. Relaciona el uso de los compuestos de fórmula I y II y sus derivados como fotosensibilizadores de oxígeno singlete, de gran eficiencia y estabilidad frente a los estándares actuales denominados fenalenonas. Entre todos los compuestos evaluados, las oxoisoaporfinas y 3-azafenalenona, mostraron rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete cercanos a uno (1), a través de un amplio rango de polaridades de solvente. La superior fotoestabilidad de las oxoisoaporfinas y 3-azafenalenona evaluadas y comparadas con la fenalenona, sugiere un novedoso y robusto estándar para la fotosensibilización de oxígeno singlete, similar al efecto que producen estos compuestos en las plantas para defenderse de agentes patógenos como hongos.

ES 2 357 926 B2

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

DESCRIPCIÓN

Nuevos estándares para la fotosensibilización de oxígeno singlete.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se dirige al uso de los compuestos de estructura I y II como fotosensibilizadores en la producción de oxígeno singlete.

10 **Estado de la técnica**1. *Mecanismos químicos de defensa de las plantas*

15 Durante su ciclo de vida las plantas soportan una gran cantidad de factores ambientales adversos para su desarrollo, tales como la sequía, falta de nutrientes, temperaturas cambiantes, plagas y ataques de diversos patógenos como hongos, virus y bacterias.

Ante la gran cantidad potencial de patógenos que podrían provocarles diversas enfermedades, las plantas son capaces de mantenerse sanas debido a las estrategias de defensa que han desarrollado a lo largo de su evolución. Estas pueden clasificarse como físicas o bioquímicas.

20 Las estrategias físicas son aquellas relacionadas con la estructura de la planta, un ejemplo es la pared celular compuesta por polímeros complejos derivados de los carbohidratos y cuyo principal componente es la celulosa; otro caso es la cutícula, la cual se deposita sobre la pared celular y está formada principalmente por moléculas derivadas de ácidos grasos. Estas dos estructuras proporcionan barreras mecánicas contra la penetración de patógenos, contribuyendo así a la defensa de la planta.

Las estrategias bioquímicas dependen de la producción de compuestos químicos tóxicos para los microorganismos, cuya síntesis se estimula cuando la planta reconoce la presencia de un posible patógeno. Estos mecanismos incluyen:

- 30 1. La acumulación de compuestos de bajo peso molecular (conocidos como fitoalexinas y fitoanticipinas) cuya diferencia radica en cómo se producen en la planta.
- 35 2. La deposición en la pared celular de glicoproteínas ricas en el aminoácido prolina que incrementan la fuerza de la pared.
- 40 3. La generación de especies reactivas derivadas del oxígeno molecular; el ión radical superóxido $[O_2^-]$, el peróxido de hidrógeno $[H_2O_2]$, el radical hidroxilo $[OH]$ y el oxígeno molecular en estado electrónico singlete $[O_2(^1\Delta_g)]$.

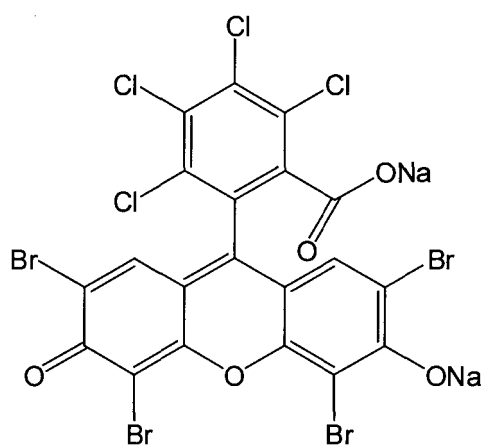
Las fitoalexinas, de estructura sesquiterpenoide, son compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microbios. La aparición, por mutación, de nuevas fitoalexinas constituye una estrategia para levantar un nuevo muro entre la planta y los fitopatógenos ya adaptados a sobrevivir al arsenal químico que existía con anterioridad.

45 Además de las fitoalexinas, existe un extenso repertorio de metabolitos secundarios cuya función principal es la defensa contra invasiones microbianas. Estas fitoanticipinas se caracterizan por ser constitutivas en la planta, mientras que las fitoalexinas se biosintetizan en el momento y lugar en que se requieren [vanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. and Farmer, E. E. *Plant Cell* 1191-1192 (1994)]. Su misión es servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta.

2. *Mecanismos fotoquímicos de defensa de las plantas*

55 Los mecanismos concretos a través de los cuales actúan las fitoalexinas (cuya formación en la planta es inducida tras la infección del patógeno) y las fitoanticipinas (compuestos antimicrobianos preformados en las plantas) son variados, pero hay al menos 100 fitoanticipinas identificadas que lo hacen a través de un proceso en el que participa la luz y que reciben el nombre de fototoxinas [vanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. and Farmer, E. E. *Plant Cell* 1191-1192 (1994)]. El interés en el estudio de las fototoxinas se encuentra en su aplicación como pesticidas activados por luz, que son productos que están empezando a desarrollarse en la industria agroquímica. La principal ventaja que aportan los fotopesticidas es la mayor seguridad ambiental y sanitaria. Por ejemplo, se estima que la Floxina B, el fotopesticida más estudiado hasta el momento, es mil veces más seguro para el hombre que el malatión, que es uno de los pesticidas organofosfatados más seguros [Heitz, J. R. *ACS Symposium Ser.* 616 Light-activated pest control, 1-16 (1995)].

65

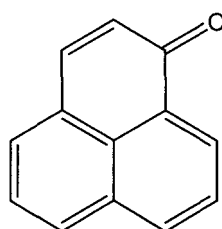
**Floxina B**

En medios biológicos, la acción fotodinámica puede producir la fotooxidación de biomoléculas como aminoácidos, bases nucleicas y lípidos para producir un daño sobre enzimas, ADN y membranas, respectivamente [Anonymous *Photodynamic Therapy. Basic Principles and Clinical Applications*, Marcel Dekker, New York (1993)].

La importancia relativa de cada mecanismo depende de factores como la concentración de oxígeno en el medio o la proximidad del fotosensibilizador al sustrato [Foote, C. S. Mechanistic characterization of photosensitized reactions. In *Photosensitisation. Molecular, Cellular and Medical Aspects*, (Edited by Moreno, G., Pottier, R. H. and Truscott, T. G.), pp. 125-144. Springer-Verlag, Berlín (1988)].

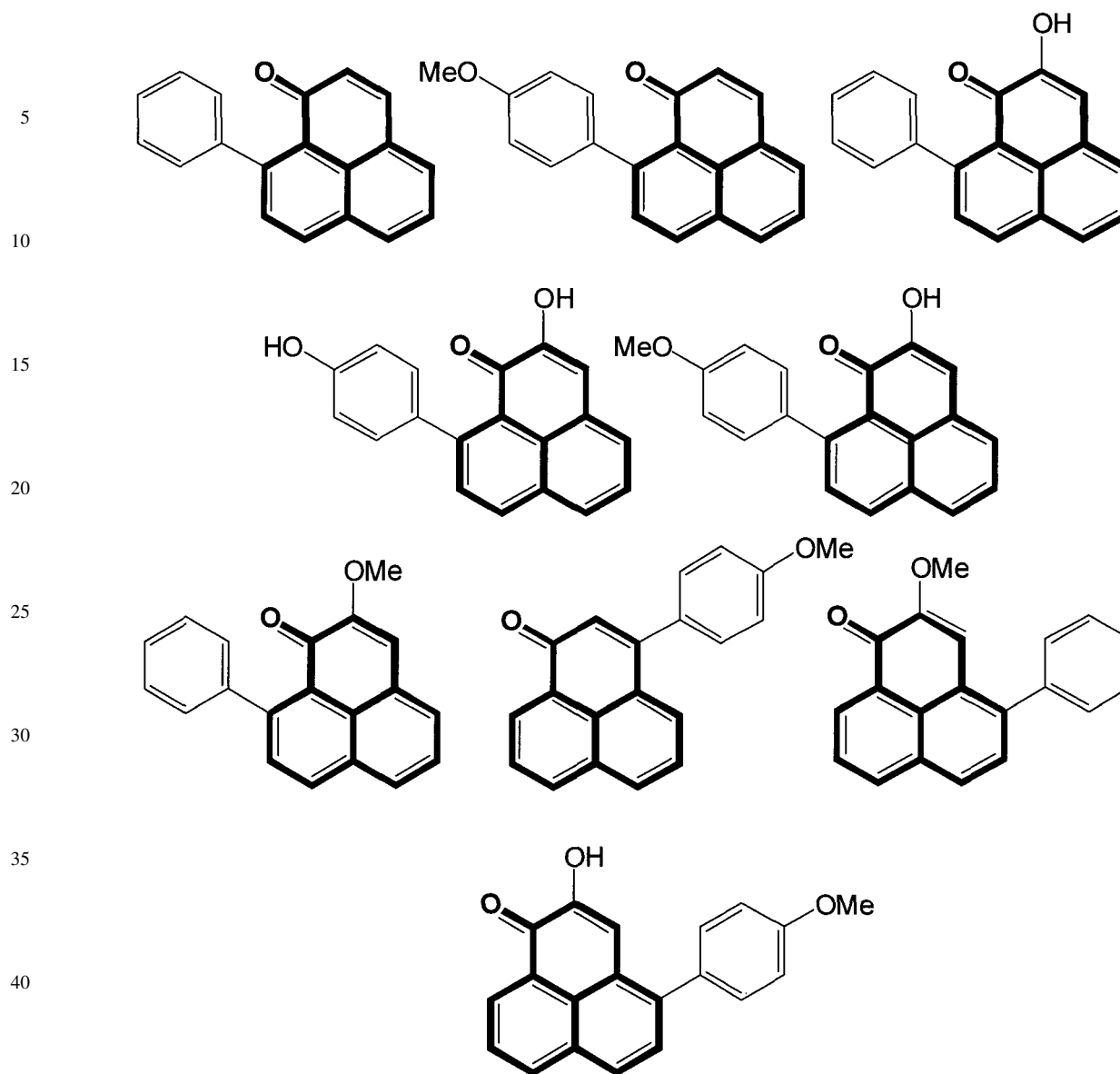
3. Fenalenonas y sus derivados

La fenalenona o 1*H*-fenalen-1-ona se usa como sensibilizador en fotoquímica y fotobiología. La fenalenona es soluble en una gran variedad de disolventes y su rendimiento cuántico (Φ_{Δ}) medido experimentalmente es cercano a la unidad en los disolventes investigados. Así, de acuerdo a estas características se propuso la fenalenona como referente de sensibilizador universal de oxígeno singlete. [Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R. and Wolff, C. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 79, 11-17(1994)].

**Fenalenona**

En los últimos años se han aislado y caracterizado un nuevo tipo de fitoalexinas y fitoanticipinas cuya estructura está basada en el esqueleto de la fenalenona. Éstas son las 4- y 9-fenilfenalenonas cuya formación como respuesta a la infección por hongos de plantas plataneras ha sido recientemente descrita [Luis, J. G. and Grillo, T. A. *Tetrahedron* 49, 6277-6284 (1993)].

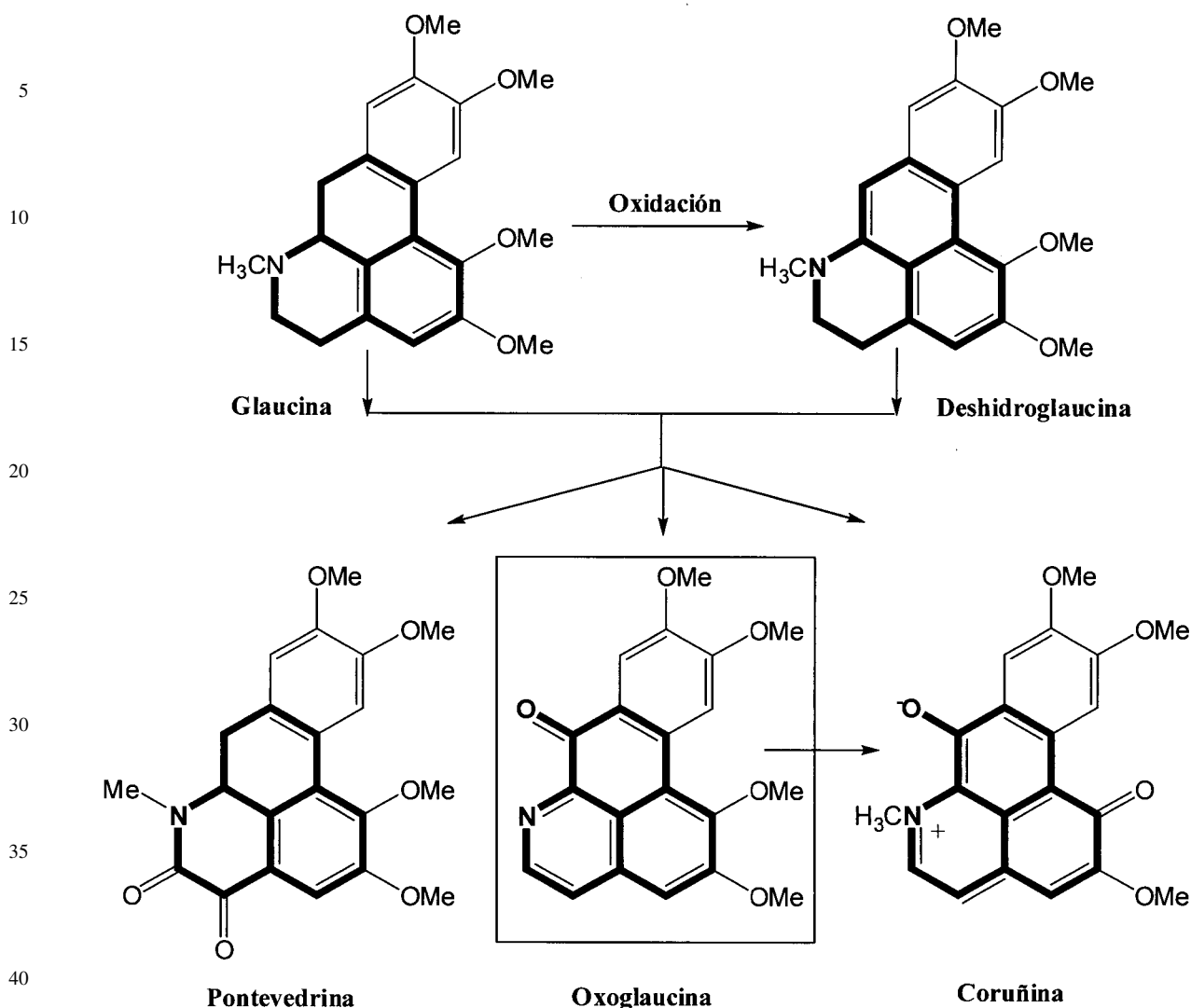
Se pueden encontrar descritos en bibliografía como metabolitos habituales en plantas y microorganismos diversos compuestos cuya estructura está basada también en el esqueleto de la fenalenona [Luis, J. G. and Grillo, T. A. *Tetrahedron* 49, 6277-6284 (1993); Cooke, R. G. and Edwards, J. M. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 40, 153-190 (1981)]. En el año 1997, el laboratorio de Fotoquímica del *Institut Químic de Sarriá*, comenzó el estudio de la fotofísica de las fenilfenalenonas como las que se presentan a continuación:



Se ha demostrado que todas las fenilfenalenonas mencionadas anteriormente son capaces de sensibilizar oxígeno singlete, pero para las 9-fenilfenalenonas esta capacidad es entre uno y dos órdenes de magnitud menor que en el caso de la fenalenona sin sustituir. Este estudio aporta evidencias que relacionan la actividad de defensa contra un patógeno con la producción fotoinducida de $^1\text{O}_2$ por la fitoalexina inducida [Lazzaro, A., Corominas, M., Martí, C., Flors, C., Izquierdo, L. R., Grillo, T. A., J. G. Luis and Nonell, S. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 706-710 (2004)]. Así, dichos autores demostraron que la presencia del esqueleto de la fenalenona en estos derivados naturales les confería “la capacidad de fotosensibilización de oxígeno singlete, y que su actividad antifúngica se ve incrementada notablemente por la presencia de luz”. Más aún, encontraron que los derivados de fenilfenalenona que tienen “mayor rendimiento cuántico (Φ_Δ) desarrollan a su vez mayor actividad antifúngica bajo iluminación”, pudiéndose generar una relación entre la producción de $^1\text{O}_2$ y la defensa de la planta frente a un patógeno.

Por otro lado, se ha llevado a cabo el estudio de fotosensibilización de oxígeno singlete en alcaloides isoquinolínicos derivados de la glaucina, concretamente la oxoglaucina, pontevedrina y la coruñina [Zanocco, A. L., Lemp, E. and Günter, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 7, 1299-1302 (1997); Suau, R., López-Romero, J. M., Rico, R., Alonso, F. J. and Lobo, C. *Tetrahedron* 52, 11307-11320 (1996)].

65



45 Las conclusiones que se extrajeron de este estudio fueron que la oxoglaucina, un alcaloide identificado positivamente como fitoalexina y proveniente de la familia de las Magnoliaceae, es un excelente sensibilizador de oxígeno singlete, pero su eficacia disminuye con la polaridad y proticidad del medio determinado por el rendimiento cuántico de oxígeno singlete versus la polaridad del disolvente [Flors, C.; Prat, C.; Suau, R.; Najera, F.; Nonell, S. *Photochem. Photobiol.* 81, 120-124 (2005)]. Además, no es un buen desactivador de oxígeno singlete. Todo esto lleva a pensar en que la participación de la oxoglaucina la defensa de las plantas ocurre a través de la fotosensibilización de oxígeno singlete (Figura 1).

55 En base a los motivos expuestos, es necesario estudiar y aportar compuestos de origen natural y que estén estructuralmente relacionados a la fenalenona, que sean eficientes y capaces de fotosensibilizar oxígeno singlete con rendimientos cuánticos (Φ_{Δ}) cercanos a la unidad, de mayor fotoestabilidad que la fenalenona y con la posible aplicación fototóxica frente a patógenos como las oxoaporfinas.

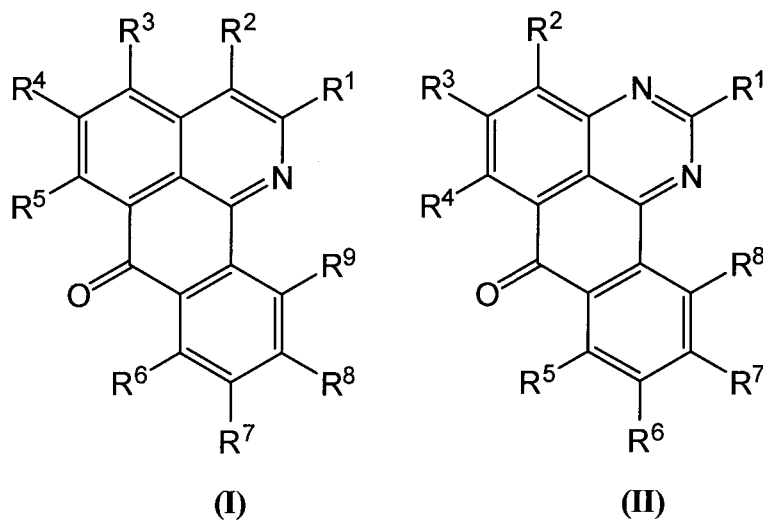
60 La presente invención aporta compuestos que cumplen estos requisitos y solucionan los problemas planteados en el estado de la técnica.

Descripción de la invención

65 La presente invención se dirige al uso de los compuestos de estructura I y II como fotosensibilizadores en la producción de oxígeno singlete, de gran eficiencia y estabilidad frente al actual estándar denominado fenalenona. Los compuestos de la presente invención mostraron un sorprendente alto grado de efectividad para fotosensibilizar la producción de oxígeno singlete [$O_2(^1\Delta_g)$], así como rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete cercanos a uno (1), a través de un amplio rango de disolventes de distinta polaridad. Debido a la superior fotoestabilidad

de la estructura de 3-azafenalenona (compuestos de fórmula II) comparada con la fenalenona, que se degrada muy rápidamente en algunos disolventes, la presente invención proporciona el uso de un novedoso y robusto estándar fotosensibilizador en la producción de oxígeno singlete. Dichos compuestos podrían ser utilizados de manera referencial como fototoxinas antimicrobianas y antifúngicas.

Así, la presente invención se dirige al uso de compuestos con la fórmula general I y II, sus sales, hidratos, solvatos, tautómeros y N-óxidos, en la producción de oxígeno singlete,



donde:

- R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, y R⁹ son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno de sustituido o no sustituido, cicloheteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, -OR^b y -NR^aR^b;

-R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloheteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o, R^a y R^b conjuntamente forman un anillo de heterociclo sustituido o no sustituido, de 4 a 7 miembros conteniendo 0-2 heteroátomos independientemente seleccionados entre oxígeno, azufre y N-R^c, donde R^c se selecciona entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, o -C(O)R^b.

Descripción detallada de la invención

“Alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que no contiene ninguna insaturación, de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre -OR^b, -NR^aS(O)_mR^b donde m se selecciona entre 1 y 2, -SR^b, -S(O)_mR^b, -S(O)_mNR^aR^b donde m se selecciona entre 1 y 2, -NR^aR^b, -C(O)R^b, -CO₂R^b, -C(O)NR^aR^b, -NR^aC(O)R^b, -NR^aC(O)OR^b, -NR^aC(O)NR^aR^b, -CF₃, -OCF₃, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

“Cicloalquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica que no contiene ninguna insaturación, de 3 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 5 a 6 átomos de carbono. El cicloalquilo puede ser monocíclico, bicíclico o tricíclico y puede incluir anillos fusionados. Opcionalmente el cicloalquilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre halógeno, ciano, -OR^b, -NR^aS(O)_mR^b donde m se selecciona entre 1 y 2, -SR^b, -S(O)_mR^b, -S(O)_mNR^aR^b donde m se selecciona entre 1 y 2, -NR^aR^b, -C(O)R^b, -CO₂R^b, -C(O)NR^aR^b, -NR^aC(O)R^b, -NR^aC(O)OR^b, -NR^aC(O)NR^aR^b, -CF₃, -OCF₃, alquilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

“Alqueno” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, cíclica o acíclica, que contiene al menos una insaturación, de 2 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituidos con uno a tres sustituyentes seleccionados entre halógeno, ciano, -OR^b, -NR^aS(O)_mR^b donde m se selecciona entre 1 y 2, -SR^b, -S(O)_mR^b, -S(O)_mNR^aR^b donde m se selecciona entre 1 y 2, -NR^aR^b, -C(O)R^b, -CO₂R^b, -C(O)NR^aR^b, -NR^aC(O)R^b, -NR^aC(O)OR^b, -NR^aC(O)NR^aR^b, -CF₃, -OCF₃, alquilo, cicloalquilo, cicloheteroalquilo, arilo y heteroarilo; donde R_a y R_b son como se definieron previamente.

ES 2 357 926 B2

“Cicloheteroalquilo” se refiere a un cicloalquilo que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre oxígeno, nitrógeno o azufre, por ejemplo: pirrolidinilo, morfolinilo, piperazinilo y piperidinilo. Opcionalmente el cicloheteroalquilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-NR^aS(O)_mR^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-SR^b$, $-S(O)_mR^b$, $-S(O)_mNR^aR^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-NR^aR^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)R^b$, $-NR^aC(O)OR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$, alquilo, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

“Arilo” se refiere a un hidrocarburo aromático de 6 a 10 átomos de carbono, por ejemplo: fenilo o naftilo; opcionalmente el arilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-NR^aS(O)_mR^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-SR^b$, $-S(O)_mR^b$, $-S(O)_mNR^aR^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-NR^aR^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)R^b$, $-NR^aC(O)OR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$, alquilo, alqueno, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

“Heteroarilo” se refiere a un arilo que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre oxígeno, nitrógeno o azufre, por ejemplo: piridilo, pirazolilo, triazolilo, pirimidilo, isoxazolilo, indolilo y tiazolilo; opcionalmente el heteroarilo puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre $-OR^b$, $-NR^aS(O)_mR^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-SR^b$, $-S(O)_mR^b$, $-S(O)_mNR^aR^b$ donde m se selecciona entre 1 y 2, $-NR^aR^b$, $-C(O)R^b$, $-CO_2R^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-NR^aC(O)R^b$, $-NR^aC(O)OR^b$, $-NR^aC(O)NR^aR^b$, $-CF_3$, $-OCF_3$, alquilo, alqueno, arilo y heteroarilo; donde R^a y R^b son como se definieron previamente.

De acuerdo a un aspecto particular, los compuestos de fórmula I se seleccionan preferentemente entre aquellos donde

$-R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o $-OR^b$; donde R^b es como se definió anteriormente.

Más particularmente, los compuestos de fórmula I se seleccionan preferentemente entre aquellos en donde $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno y $-OR^b$; donde R^b se selecciona preferentemente entre hidrógeno y alquilo sustituido o no sustituido.

De acuerdo a otro aspecto particular, los compuestos de fórmula II, se seleccionan preferentemente entre aquellos en donde

$-R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ y R^8 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o $-OR^b$; donde R^b es como se definió anteriormente.

Más particularmente, los compuestos de fórmula II se seleccionan preferentemente entre aquellos en donde R^1 es hidrógeno o alquilo y $R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ y R^9 son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno y $-OR^b$; donde R^b se selecciona preferentemente entre hidrógeno y alquilo sustituido o no sustituido.

De acuerdo a un aspecto más particular, los compuestos de fórmula I y II se seleccionan preferentemente entre los compuestos de la siguiente lista:

1. 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona
2. 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona
3. 7H-benzo[e]perimidin-7-ona

La invención también se dirige al uso de los compuestos de fórmula general I y II, que tiene la propiedad de ser un fotosensibilizador para la producción de oxígeno singlete para preparar un derivado destinado a ser una fototoxina antimicrobiana y antifúngica.

Descripción de las figuras

Figura 1. Rendimiento cuántico de formación de 1O_2 versus polaridad del disolvente (E_T^N) para oxoglaucina.

Figura 2. Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete versus polaridad del disolvente en escala E_T^N para PN. CHX = ciclohexano; TOL = Tolueno; THF = tetrahidrofurano; DMA = dimetilacetamida; ACN = acetonitrilo; CPN = carbonato de propileno; 2-POH = 2-propanol; MOH = metanol; TFP = 2,2,3,3-tetrafluoro-1-propanol.

Figura 3. Espectro de absorción normalizado de API en diferentes disolventes. CHX = ciclohexano; THF = tetrahidrofurano; DMA = dimetilacetamida; ACN = acetonitrilo; CPN = carbonato de propileno; MOH = metanol.

ES 2 357 926 B2

Figura 4. Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete versus polaridad del disolvente en escala E_T^N para AP1. CHX = ciclohexano; THF = tetrahidrofurano; DMA = dimetilacetamida; ACN = acetonitrilo; CPN = carbonato de propileno; MOH = metanol.

5 Figura 5. Comparación entre espectros de absorción de AP1 y PN en Metanol.

Figura 6. Espectro de absorción normalizado de AP2 en diferentes disolventes. TOL = tolueno; DMA = dimetilacetamida; 2-POH = 2-propanol; MOH = metanol.

10 Figura 7. Espectro de absorción normalizado de DAP en diferentes disolventes. TOL = tolueno; ACN = acetonitrilo; MOH = metanol; TFP = 2,2,3,3-tetrafluoro-1-propanol.

15 Figura 8. Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete versus polaridad del disolvente en escala E_T^N para AP2. TOL = tolueno; DMA = dimetilacetamida; 2-POH = 2-propanol; MOH = metanol.

Figura 9. Rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete versus polaridad del disolvente en escala E_T^N para DAP. TOL = tolueno; ACN = acetonitrilo; MOH = metanol; TFP = 2,2,3,3-tetrafluoro-1-propanol.

20 Figura 10. Comparación entre espectros de absorción de AP2 y PN en Metanol.

Figura 11. Comparación entre espectros de absorción de DAP y PN en Metanol.

Figura 12. Espectros de PN y AP2 en EtOH a $t = 0$ min y $t = 10$ min

25 Figura 13. Degradación térmica de PN y AP2 en EtOH.

Figura 14. Degradación de PN en EtOH irradiando durante 1 h.

Figura 15. Degradación por radiación UVA de AP2 en Etanol.

30 Figura 16. Degradación térmica de AP2 en Etanol.

Procedimiento experimental

35 *Reactivos y disolventes químicos*

Fenalenona (97%) fue adquirida de Aldrich. Ésta fue purificada por medio de dos cristalizaciones en metanol. 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona y 7H-benzo[e]perimidin-7-ona fueron sintetizadas y purificadas por los métodos descritos en la bibliografía [Sobarzo-Sánchez, E., De la Fuente, J., Castedo, L. 40 *Magn. Reson. Chem.* 43, 1080 (2005); Fabre, J.-L.; Farge, D.; James, C. *U.S. Patent* N° 4,128,650 (1978); Bu, X.; Deady, L. W.; Finlay, G. J.; Baguley, B. C.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* 44, 2004-2014 (2001)].

Los disolventes comerciales fueron usados y secados de acuerdo a los procedimientos normales para cada uno de ellos. Dichos disolventes han sido adquiridos de las siguientes casas comerciales: Ciclohexano (Romil, calidad Super 45 Purity Solvent), Tolueno (SDS, calidad Spectrosol), Tetrahidrofurano (SDS, calidad HPLC), N,N-Dimetilacetamida (Fluka, calidad UV-Spectroscopy), Acetonitrilo (SDS, calidad Spectroscopy Grade), Carbonato de propileno anhidro (Aldrich, 99.7%), Metanol (SDS, calidad Spectrosol), 2-propanol (Aldrich, 99.5+%, calidad A.C.S. spectrophotometric grade), 2,2,3,3-tetrafluoro-1-propanol (Sigma-Aldrich, 98%).

50 *Técnicas espectroscópicas*

Los espectros de absorción y de emisión fueron medidos con un espectrofotómetro Varían Cary 4, periódicamente calibrado con un filtro de óxido de holmio (Hellma), y un espectrofluorímetro Fluoromax-2, respectivamente. La producción de oxígeno singlete se evaluó con un espectrofotómetro basado en un sistema de tiempo de vida de fluorescencia PicoQuant Fluotime 200. Para esto se usa un láser de excitación Nd:YAG bombeado por el diodo CryLas 55 FTSS355-Q, emitiendo pulsos de láser a 355 nm, velocidad de repetición de 10 kHz, ancho de pulso de 1 ns y poder de 5 mW, correspondiente a $0.5 \mu\text{J}$ por pulso. La emisión es colectada a 90 grados, pasado a través de un monocromador, y detectado con un fotomultiplicador de IR cercano Hamamatsu H9170-45. Todos los fotones son contados con un escalador multicanal PicoQuant's Nanoharp 250. Los histogramas son analizados usando el software FluoFit, 60 también de PicoQuant. Los estudios de fotoestabilidad fueron conducidos exponiendo las muestras a radiación UV-A en un foto-reactor Luzchem equipado con 16 lámparas UV-A fluorescente.

Determinación del rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete $O_2 (^1\Delta_g)$

65 Para la determinación del rendimiento cuántico (Φ_Δ) de oxígeno singlete ($O_2 (^1\Delta_g)$) de las moléculas en estudio, se ha utilizado la técnica de fosforescencia en el IR cercano (NIR) resuelta en el tiempo. Para obtener valores de (Φ_Δ) se mide la fosforescencia resuelta en el tiempo a 1280 nm, que proviene de la relajación del oxígeno singlete a su estado fundamental. Se obtienen las señales de fosforescencia y se ajustan las ecuaciones que describen su cinética. Se busca

el valor de la intensidad de fosforescencia a tiempo cero, $S(0)$, y se normaliza por la energía del láser, obteniendo $S(0)_E$. Se sigue el mismo procedimiento para una muestra de Φ_{Δ} conocido en el mismo disolvente. Se obtiene el valor de Φ_{Δ} de la muestra de interés utilizando la siguiente expresión:

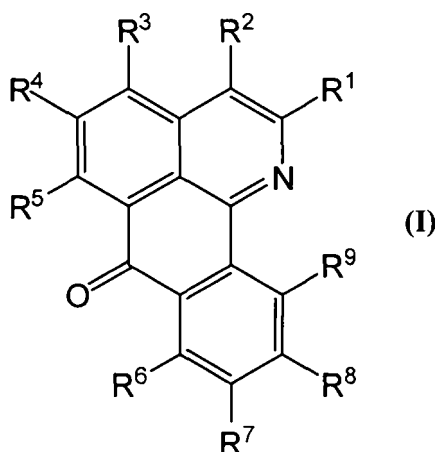
$$\Phi_{\Delta,ref} = \frac{S(0)_{EA}}{S(0)_{EA,ref}}, \text{ donde } S(0)_{EA,i} = \frac{S(0)_{Ei}}{1 - 10^{-Ai}}$$

Estudios de fotoestabilidad de la 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona (AP2) y la fenalenona (PN) en Etanol

Se pesan 1.041 mg de fenalenona, 1.015 mg de 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona y se disuelven en 25 mL de EtOH, obteniéndose una concentración final de 231.1 μM y 155.4 μM para cada compuesto respectivamente. La concentración ha de ser la misma para que los resultados de foto-degradación de las dos muestras sean comparables, así que para aprovechar las disoluciones madre se toman 2 mL de fenalenona y se les añade 1 mL de EtOH para que la concentración sea la misma que en 3 mL de 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona.

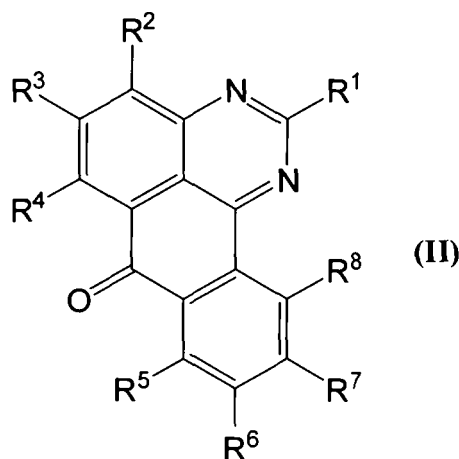
Evaluación de compuestos

Los compuestos evaluados en la presente invención están basados en las siguientes fórmulas generales, correspondiente a la fórmula general (I):



- a) en que si: - $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ y R^9 es hidrógeno, se trata de 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado de aquí en adelante API; y
- b) en que si: - $R^1, R^2, R^3, R^5, R^6, R^7, R^8$ y R^9 es hidrógeno y R^4 representa un metoxilo, se trata de 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, llamado de aquí en adelante AP2;

correspondiente a la fórmula general (II):



- c) en que si: - $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ y R^8 es hidrógeno, se trata de 7H-benzo[e]perimidin-7-ona, llamado de aquí en adelante DAP.

Resultados fotoquímicos de generación de oxígeno singlete

Se estudió la fotoestabilidad de 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona, 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona y 7H-benzo[e]perimidin-7-ona con la finalidad de demostrar que son más estables que la fenalenona (PN) (compuesto utilizado como referencia universal para la formación de oxígeno singlete), midiendo primeramente el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete del estándar y de los diferentes compuestos evaluados, usando para ello disolventes de diferente polaridad. Dichos resultados son representados en las Tablas 1-4. En todos los casos, la medición de polaridad está medida en la escala E_T^N [Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, pp. 1-630 (2003). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim].

TABLA 1

Obtención del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_Δ) de 1H-fenalen-1-ona (PN) en diferentes disolventes de polaridad variable

DISOLVENTE	POLARIDAD	RENDIMIENTO CUÁNTICO (Φ_Δ)
Ciclohexano	0,006	0,92
Tolueno	0,099	0,95
Tetrahidrofurano	0,207	0,87
N,N'-dimetilacetamida	0,377	0,87
Acetonitrilo	0,460	0,98
Carbonato de propileno	0,475	1,00
2-propanol	0,546	0,95
Metanol	0,762	0,98
2,2,3,3-tetrafluoro-1-propanol	0,886	1,00

TABLA 2

Obtención del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_Δ) de 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona (API) en diferentes disolventes de polaridad variable

DISOLVENTE	POLARIDAD	RENDIMIENTO CUÁNTICO (Φ_Δ)
Ciclohexano	0,006	0,95
Tolueno	0,099	1,00
Tetrahidrofurano	0,207	1,00
N,N'-dimetilacetamida	0,377	1,00
Acetonitrilo	0,460	0,98
Carbonato de propileno	0,475	1,00
Metanol	0,762	1,00

TABLA 3

Obtención del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) de 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona (AP2) en diferentes disolventes de polaridad variable

DISOLVENTE	POLARIDAD	RENDIMIENTO CUÁNTICO (Φ_{Δ})
Tolueno	0,099	0,95
N,N'-dimetilacetamida	0,377	0,93
2-propanol	0,546	0,89
Metanol	0,762	0,97

TABLA 4

Obtención del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) de 7H-benzo[e]perimidin-7-ona (DAP) en diferentes disolventes de polaridad variable

DISOLVENTE	POLARIDAD	RENDIMIENTO CUÁNTICO (Φ_{Δ})
Tolueno	0,099	1,00
Acetonitrilo	0,46	1,00
Metanol	0,762	0,93
2,2,3,3-tetrafluoro-1-propanol	0,886	1,00

El rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete versus la polaridad del disolvente para PN se muestra en la Figura 2, observándose un comportamiento ideal, cercano a la unidad, para los diferentes solventes de variable polaridad. A partir de esta característica se puede hacer la comparación respectiva con los compuestos evaluados.

Así, el espectro de absorción UV-vis de API en los diferentes disolventes se muestra en la Figura 3.

Como se puede observar, las bandas de absorción aparecen en el mismo rango de longitudes de onda, registrándose el máximo centrado alrededor de 380-390 nm. Son más estructuradas en disolventes menos polares, como es el caso del ciclohexano. Esto denota la ausencia de interacciones fuertes con el disolvente.

Para tener una idea más intuitiva de cómo afecta la polaridad del medio al rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete, se ha representado éste frente a la polaridad en escala E_T^N (Figura 4).

A diferencia de la fenalenona (PN), el rendimiento cuántico de API es prácticamente 1 sea cual sea la polaridad del disolvente, lo que sugiere que podría usarse también como referencia universal. Si se comparan los espectros de absorción de muestra y referencia, se observa que API presenta una ventana espectral muy similar respecto a la fenalenona lo que representa una característica favorable en su uso fotoquímico (Figura 5).

Al comparar los resultados obtenidos con los otros dos compuestos, 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona (AP2) y 7H-benzo[e]perimidin-7-ona (DAP) con la fenalenona (PN) como estándar para la fotosensibilización de oxígeno singlete, se presentan idénticas características espectrales de absorción (máximo centrado alrededor de 380-390 nm), con bandas más estructuradas en disolventes de menor polaridad, denotando la ausencia de interacciones fuertes con el disolvente (Figura 6 y 7).

ES 2 357 926 B2

Al determinar el rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) tal como en el caso de AP1, éste presenta valores cercanos a la unidad independiente de la polaridad del disolvente usado en el estudio tanto para AP2 como para DAP (Figura 8 y 9). Comparando los espectros de absorción de AP2 y DAP con PN, vemos que el primero tiene una ventana espectral muy similar a la fenalenona (Figura 10). En el caso de DAP, se observa que éste presenta una ventana espectral entre 400 y 450 nm, lo que puede ser de interés en algunas situaciones concretas (Figura 11).

Estudios de fotoestabilidad en etanol

Para comprobar que la degradación que sufren las muestras se debe a la radiación UVA y no se trata de una degradación térmica se colocan además de las muestras, las muestras tapadas con papel de aluminio. De forma se tienen 4 cubetas en el foto-reactor, 2 por cada muestra.

Se registran los espectros de las 4 disoluciones antes y después de irradiar las muestras durante 10 minutos (Figura 12). Se trabaja con 10 lámparas UVA controlando su potencia que está alrededor de 7 FC (75.32 lux) durante todo el experimento.

Se observa que AP2 es más fotoestable que PN, pero para cuantificar cuánto más estable es, se repiten los experimentos para la PN y AP2 por separado. Se observa también que no influye la degradación térmica en ninguna de las 2 muestras (Figura 13).

Para estudiar la fotodegradación de ambas muestras por separado (siempre con las mismas concentraciones utilizadas en el primer experimento), primero se intenta establecer cuál es la cinética de degradación de la PN (Figura 14).

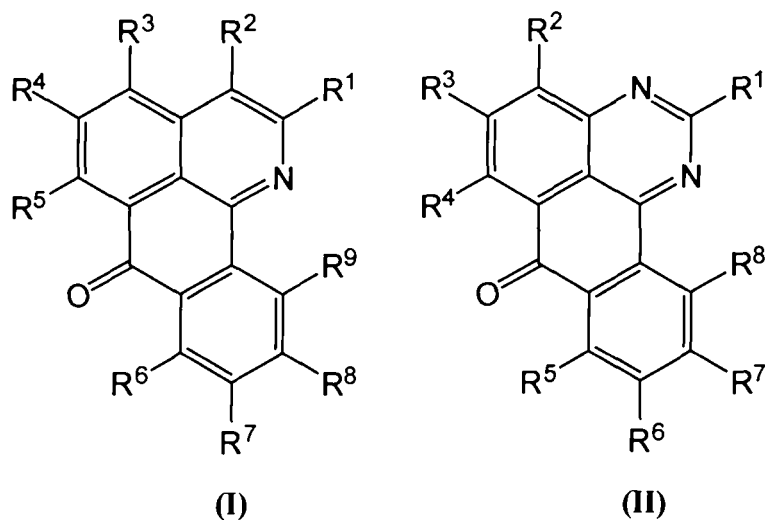
Se repite el mismo experimento para AP2 pero registrando los espectros a intervalos de tiempo mayores que en el anterior (debido a que se ha observado una fotoestabilidad mayor que para PN (Figura 15) pero se realiza simultáneamente el control de la degradación térmica en Etanol (Figura 16), de manera que se obtiene una evidente estabilidad térmica bajo largos períodos de exposición.

Con esto concluimos que la degradación que padecen las muestras de AP2 y PN es debida a la radiación UVA a la que han sido sometidas, y que presenta una mayor fotoestabilidad AP2 que PN que es la actual referencia universal.

Por lo tanto, a la vista de estos resultados experimentales derivados de los rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) cercanos a la unidad, independiente de la polaridad del disolvente utilizado en los estudios, y de la mayor fotoestabilidad que presentan estos nuevos tipos de heterociclos frente a la fenalenona, los compuestos de fórmula I y II pueden ser considerados como nuevos fotosensibilizadores para la producción de oxígeno singlete y usarlos como nuevos patrones universales de estudio. Su aplicación en terapias antineoplásicas y como fototoxinas frente a hongos como en el caso de las oxoaporfirinas es factible y aplicable a estudios estándar en el área.

REIVINDICACIONES

1. Uso de compuestos con la fórmula general I y II, sus sales, hidratos, solvatos, tautómeros y N-óxidos, en la producción de oxígeno singlete,



donde:

- R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, y R⁹ son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno de sustituido o no sustituido, cicloheteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, -OR^b y -NR^aR^b;

-R^a y R^b se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloheteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o, R^a y R^b conjuntamente forman un anillo de heterociclo sustituido o no sustituido, de 4 a 7 miembros conteniendo 0-2 heteroátomos independientemente seleccionados entre oxígeno, azufre y N-R^c, donde R^c se selecciona entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, o -C(O)R^b.

2. Uso de compuestos con la fórmula general (I), según la reivindicación 1, donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, y R⁹ son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno de sustituido o no sustituido, cicloheteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, -OR^b y -NR^aR^b; donde R^b es como se definió en la reivindicación 1.

3. Uso de compuestos con la fórmula general (I), según la reivindicación 2, donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido o no sustituido y -OR^b; donde R^b se selecciona preferentemente entre hidrógeno y alquilo sustituido o no sustituido.

4. Uso de compuestos con la fórmula general (II), según la reivindicación 1, donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, alqueno de sustituido o no sustituido, cicloheteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, -OR^b y -NR^aR^b; donde R^b es como se definió en la reivindicación 1.

5. Uso de compuestos con la fórmula general (II), según la reivindicación 4, donde R¹ es hidrógeno o alquilo y R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son cada uno de ellos seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo y -OR^b; donde R^b se selecciona preferentemente entre hidrógeno y alquilo sustituido o no sustituido.

6. Uso de compuestos de fórmula general I y II, según la reivindicación 1, seleccionados preferentemente entre:

- 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

- 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona

- 7H-benzo[e]perimidin-7-ona

ES 2 357 926 B2

7. Uso de un compuesto de fórmula general I y II, como se definieron en las reivindicaciones de 1 a 6, que tiene la propiedad de ser un fotosensibilizador para la producción de oxígeno singlete para preparar un derivado destinado a ser una fototoxina antimicrobiana y antifúngica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

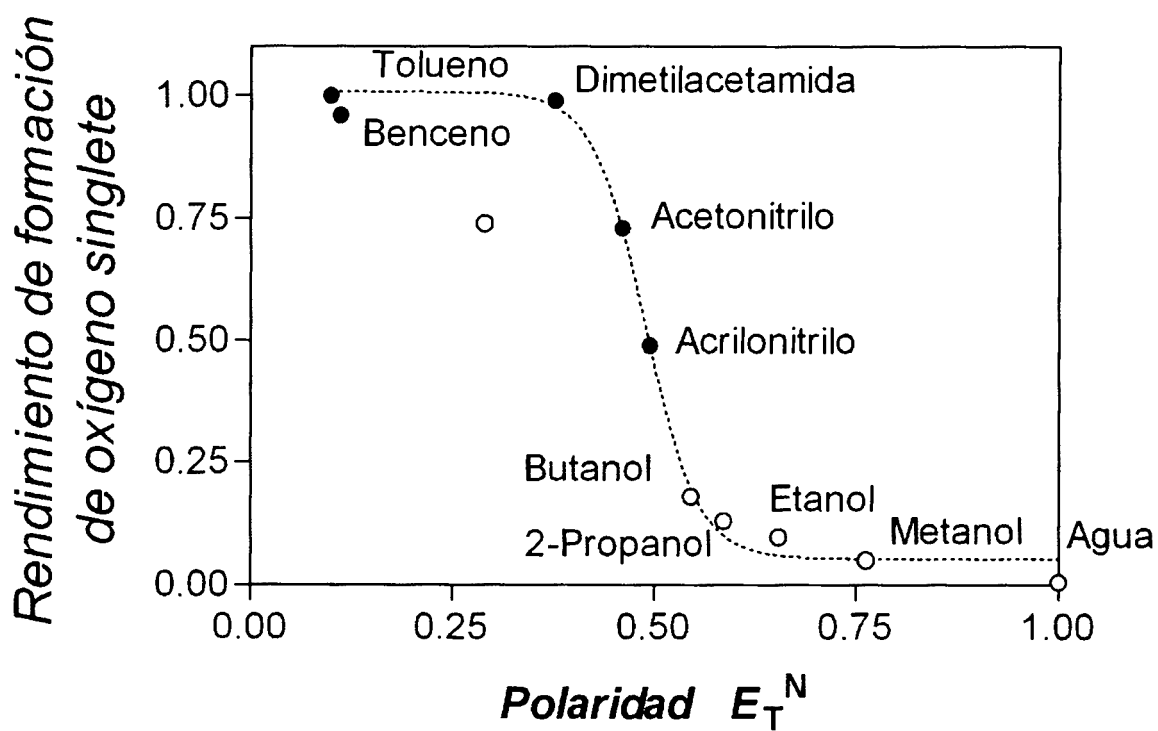


Figura 1

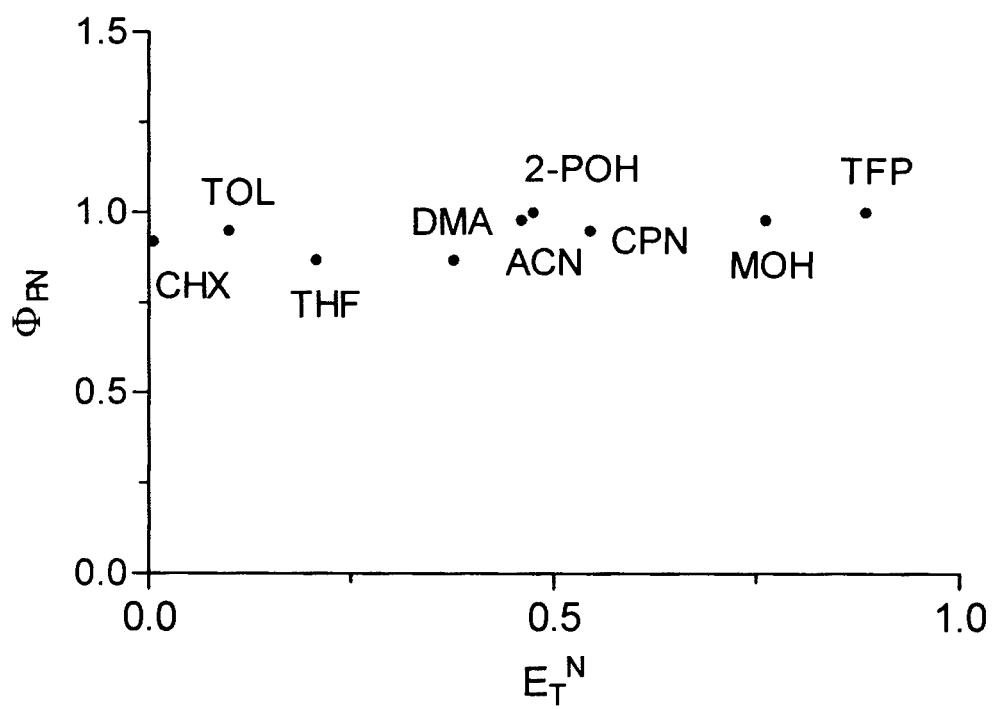


Figura 2

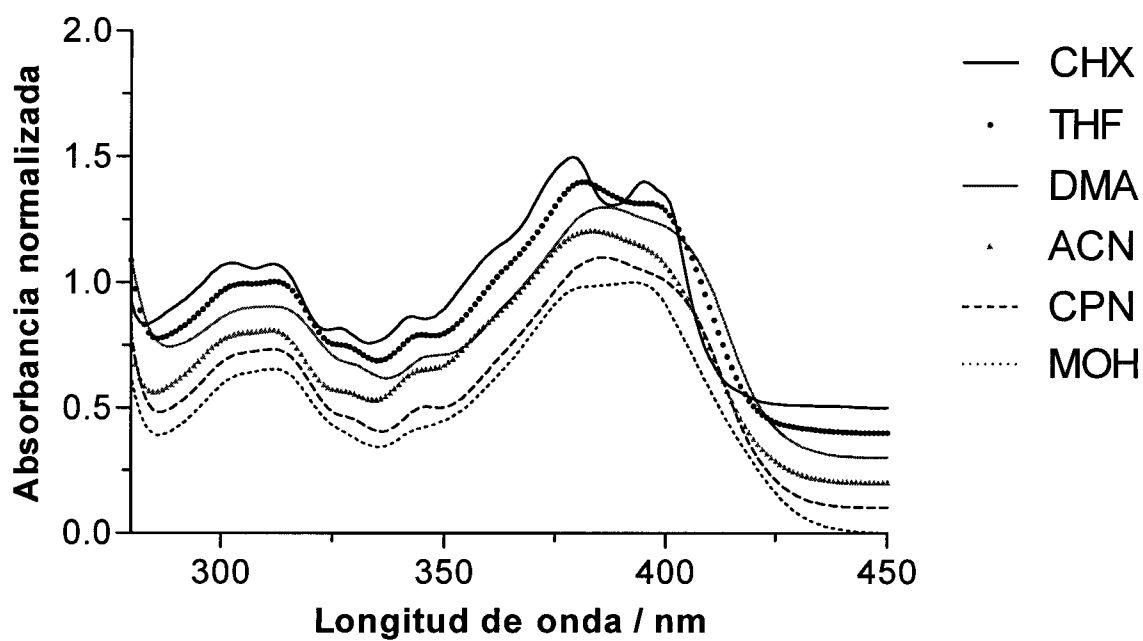


Figura 3

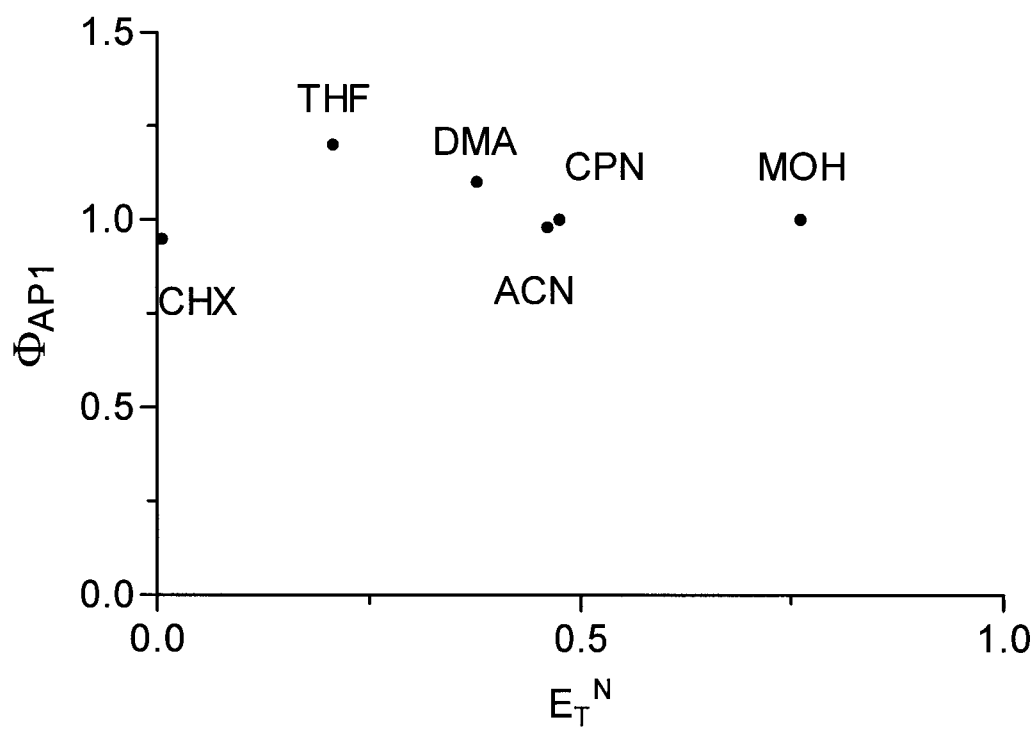


Figura 4

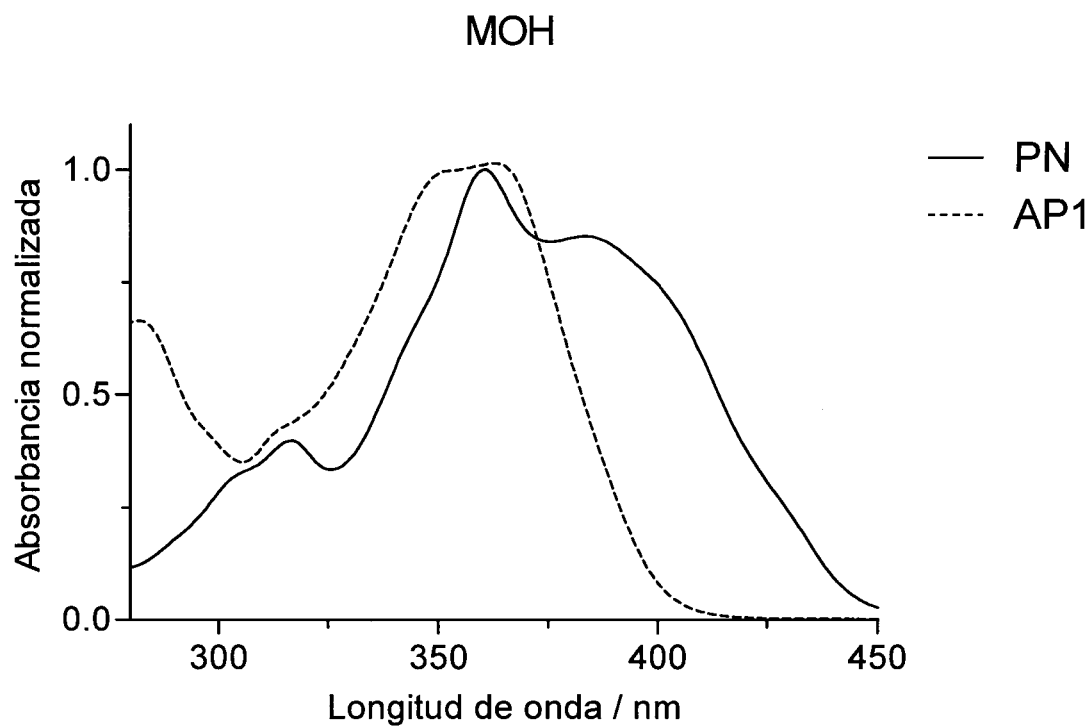


Figura 5

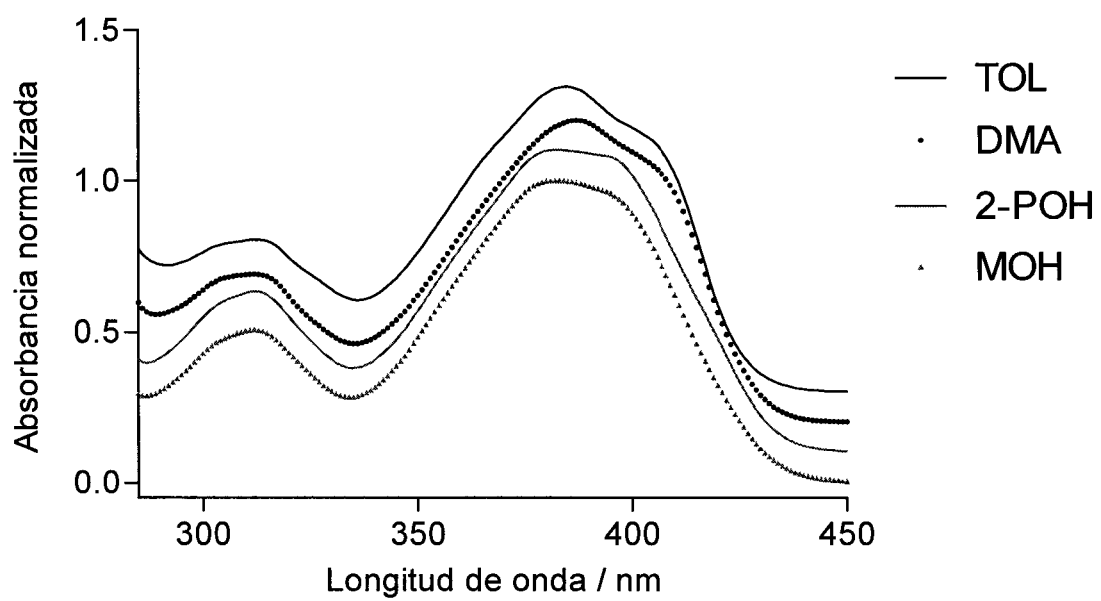


Figura 6

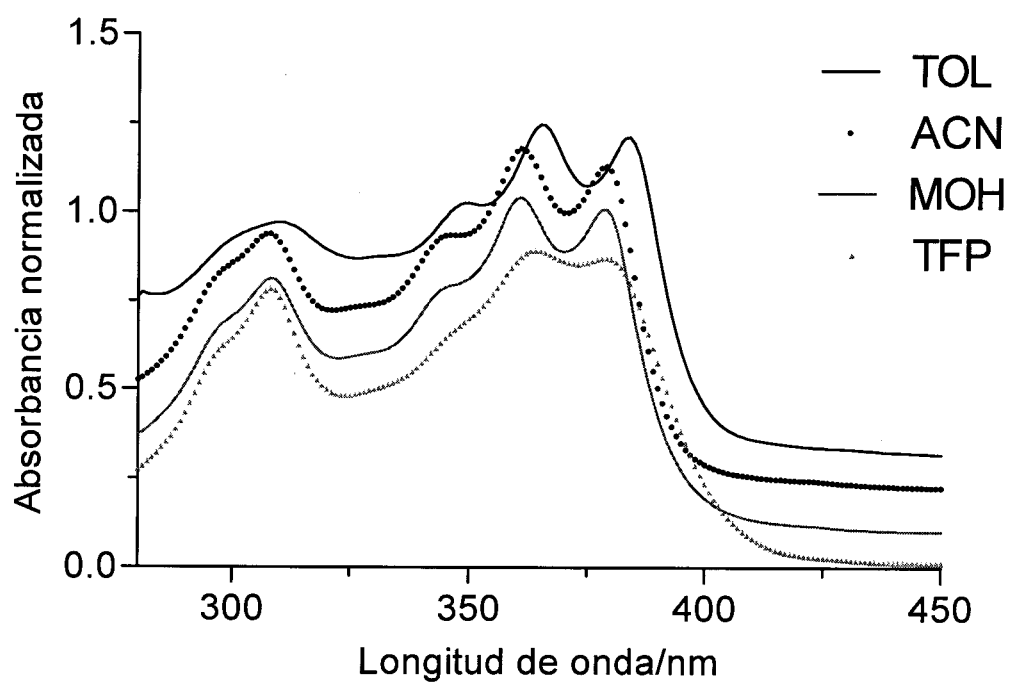


Figura 7

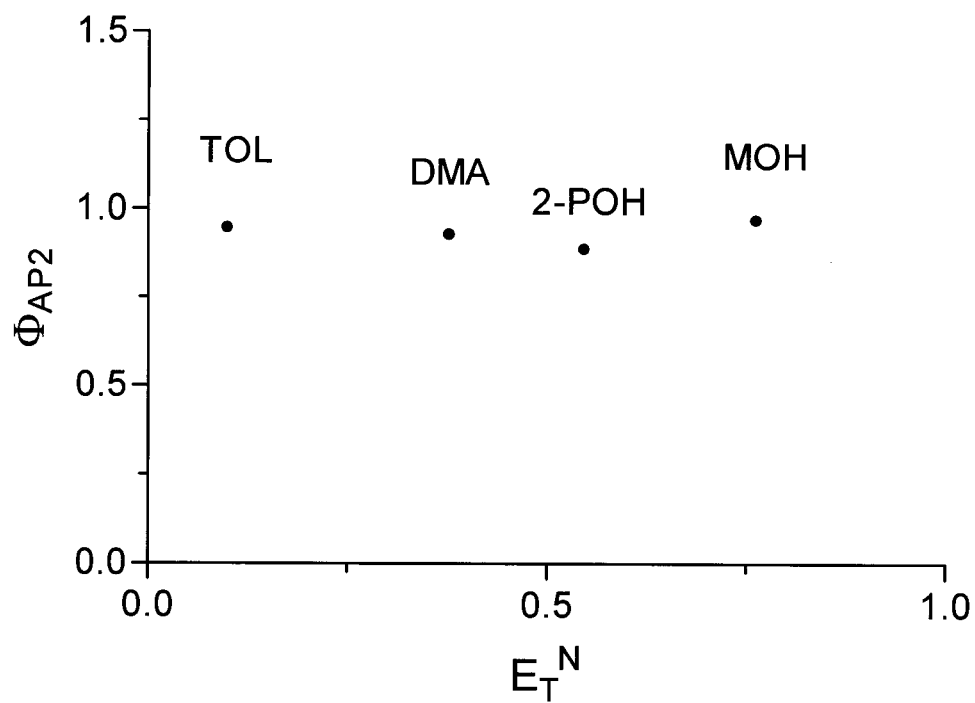


Figura 8

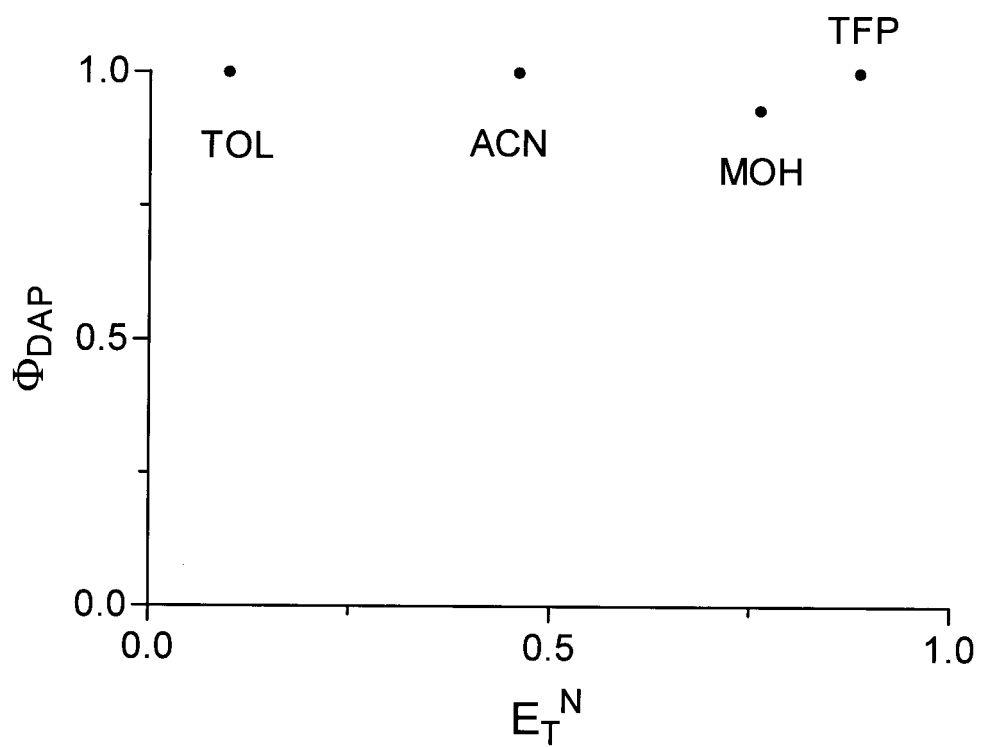


Figura 9

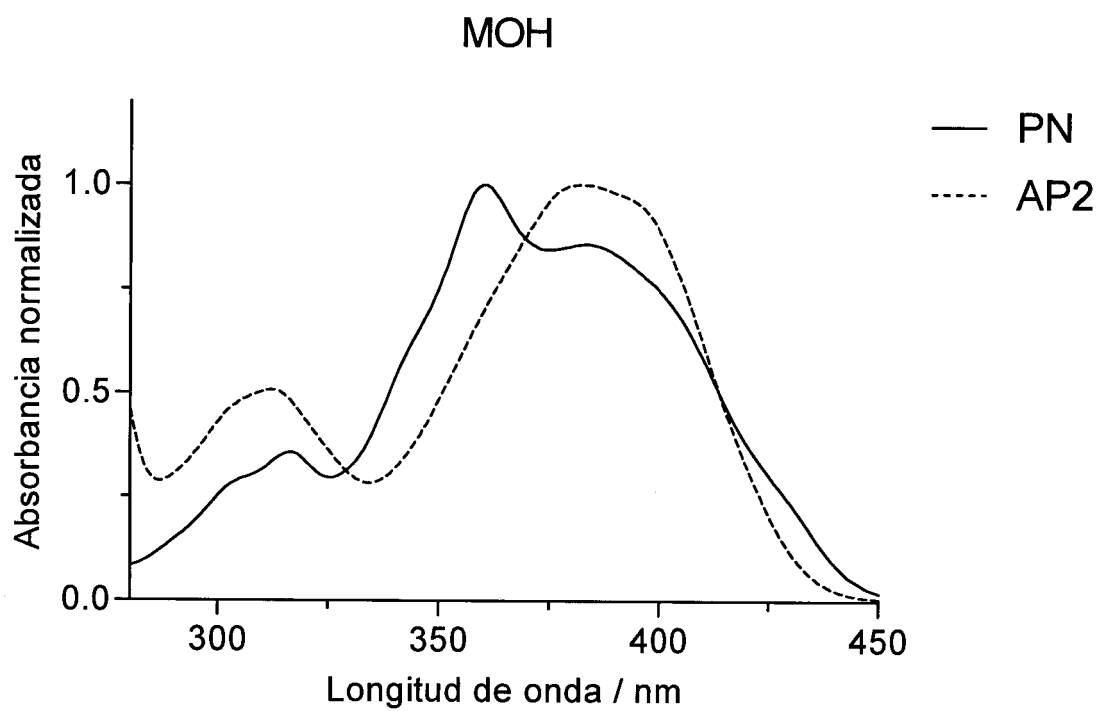


Figura 10

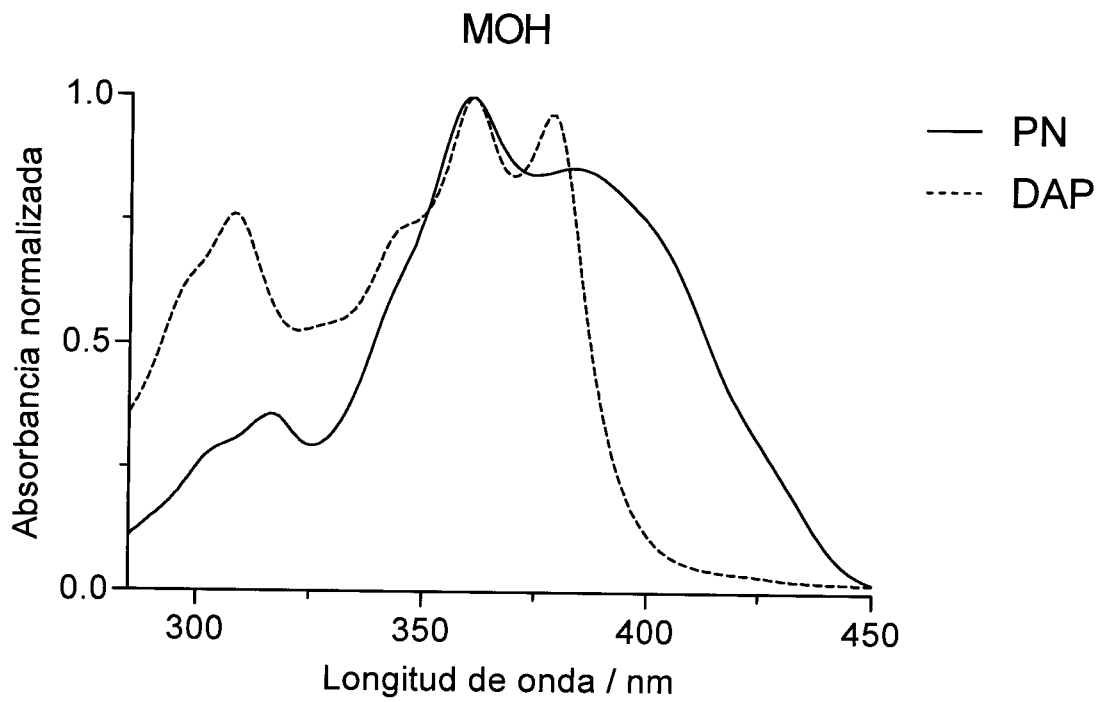


Figura 11

Degradación Fenalenona y AP2 en EtOH

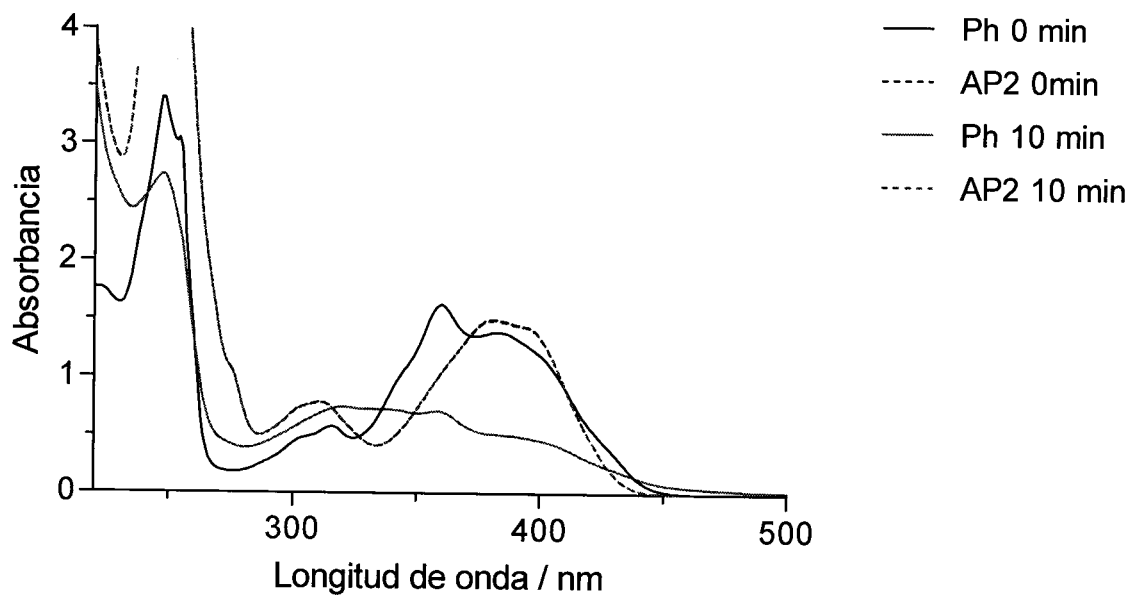


Figura 12

Degradación térmica Fenalenona y AP2 en EtOH

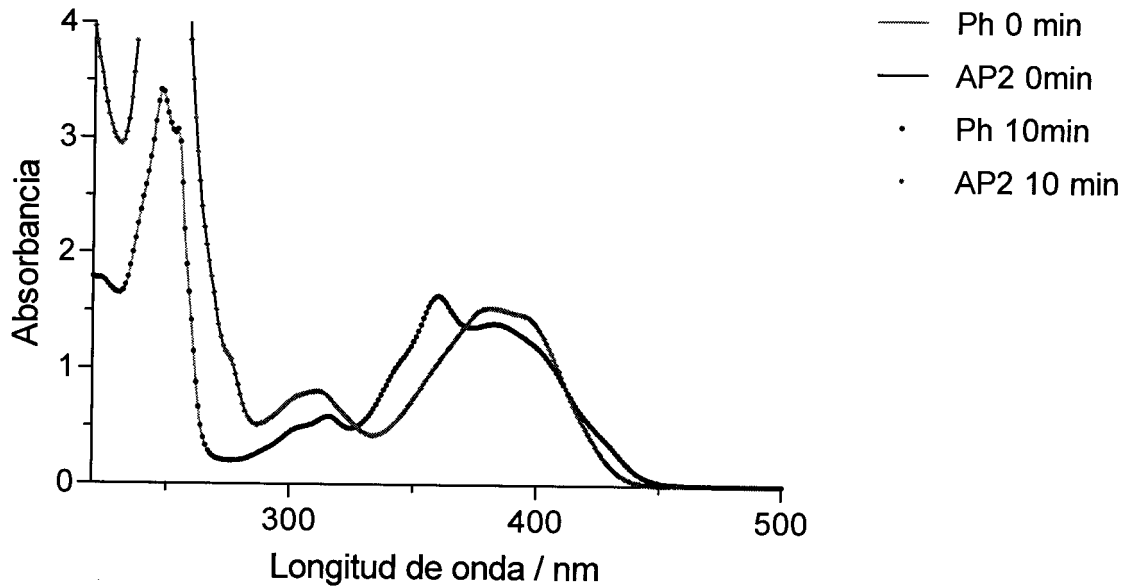


Figura 13

Cinética de degradación de Fenalenona/EtOH

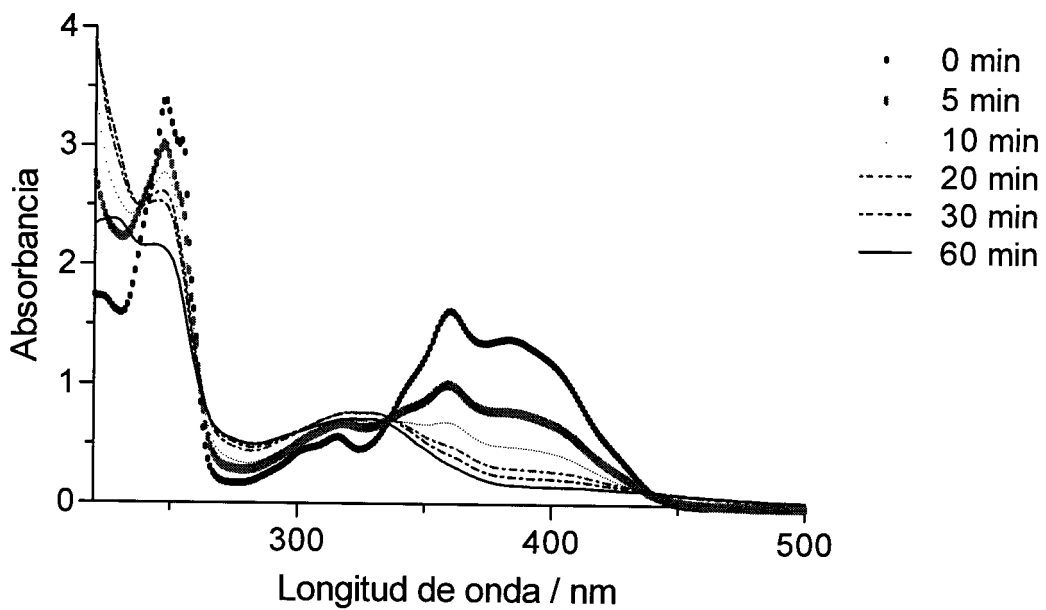


Figura 14

Degradación AP2 en EtOH

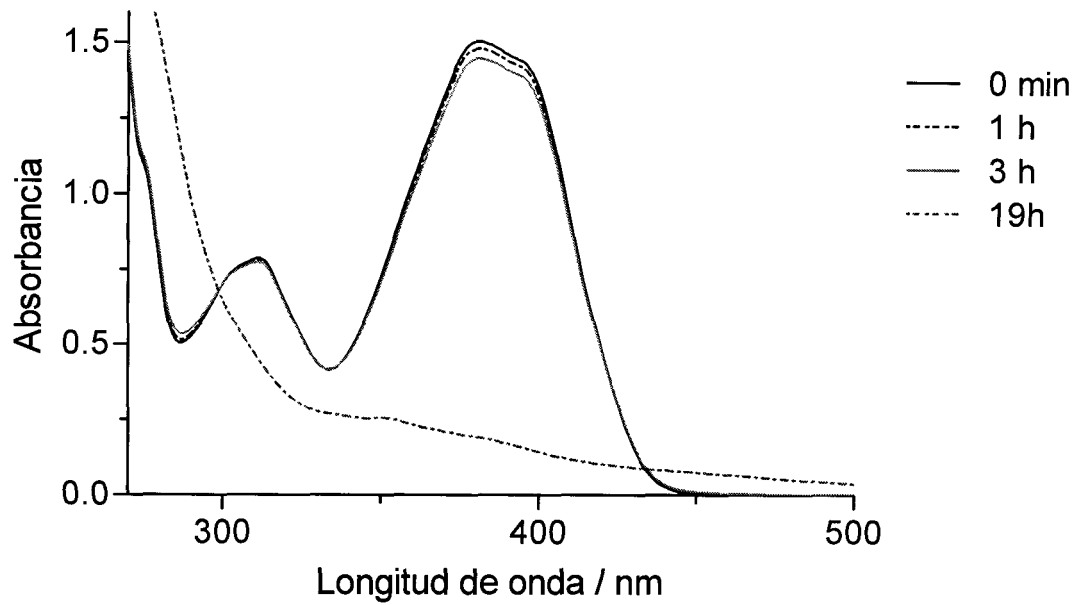


Figura 15

Degradación térmica AP2 en EtOH

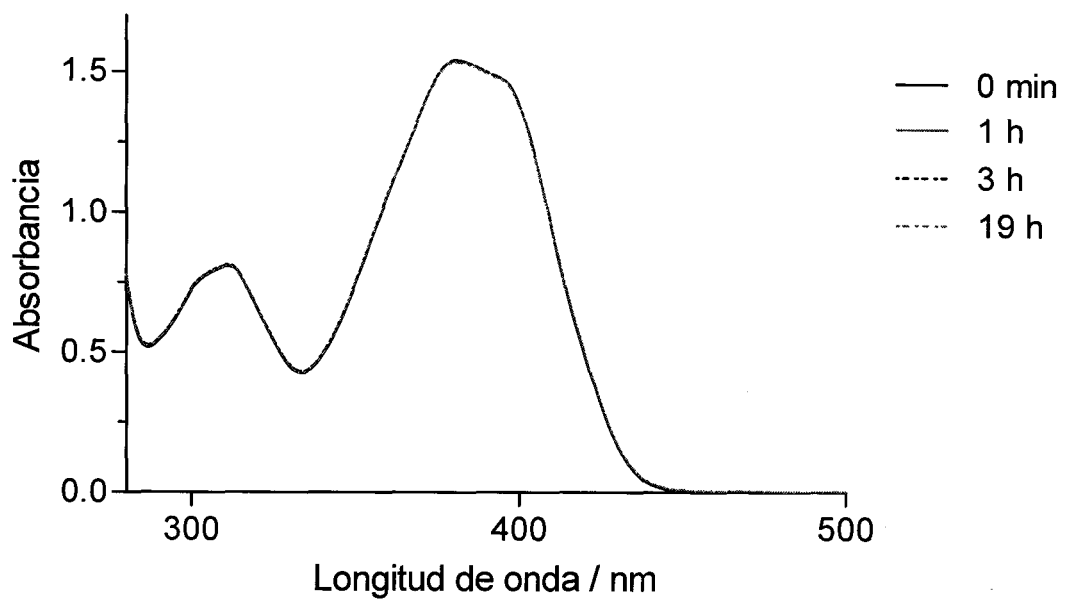


Figura 16



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200902010

②² Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LAZZARO, A. et al. "Light- and singlet oxygen-mediated antifungal activity of phenylphenalenone phytoalexins". Photochemical and Photobiological Sciences 2004, Volumen 3, Número 7, páginas 706-710. [Disponible en línea el 05.05.2004]. Ver página 706, resumen y figura 1.	1-7
A	POBLETE GONZÁLEZ, C.I. "Estudio de las especies transientes generadas durante la fotorreducción por aminas de oxoisoaporfina: 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona y 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona". Tesis Doctoral. Abril 2007. Ver página 18.	1-7
A	FLORS, C. et al. "Phototoxic Phytoalexins. Processes that Compete with the Photosensitized Production of Singlet Oxygen by 9-Phenylphenalenones". Photochemistry and Photobiology 2006, Volumen 82, Número 1, páginas 95-103. [Disponible en línea el 19.07.2005]. Ver página 95, resumen; página 96, figura 2.	1-7
A	TANG, H. et al. "Oxoisoaporphine alkaloid derivatives: Synthesis, DNA binding affinity and cytotoxicity". European Journal of Medicinal Chemistry 2008, Volumen 43, Número 5, páginas 973-980. [Disponible en línea el 15.07.2007]. Ver página 973, resumen; página 974, figura 1.	1-7

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
28.01.2011

Examinador
G. Esteban García

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D221/18 (01.01.2006)

C07D239/70 (01.01.2006)

A61K31/473 (01.01.2006)

A61K31/517 (01.01.2006)

A61P31/04 (01.01.2006)

A61P31/10 (01.01.2006)

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

C07D, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, PUBMED, XPESP, NPL, EMBASE, TXTE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-7	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	LAZZARO, A. et al. Photochemical and Photobiological Sciences 2004, Vol. 3, Nº 7, pp. 706-710.	05.05.2004
D02	POBLETE GONZÁLEZ, C.I. Tesis Doctoral.	2007

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 los compuestos de fórmula general I (derivados de 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona) y II (derivados de 7H-benzo[e]perimidin-7-ona) en la producción de oxígeno singlete y para la preparación de un derivado destinado a ser una fototoxina antimicrobiana y antifúngica.

El documento D01, que se considera el estado de la técnica más cercano a la invención, divulga una serie de fitoalexinas derivadas de fenilfenalenona que tienen la propiedad de generar oxígeno singlete por fotosensibilización, y además presentan actividad antifúngica (ver página 706, resumen y figura 1).

La diferencia entre los compuestos objeto de la invención y los divulgados en el documento D01 es que, mientras que éstos son derivados de fenaleno (benzofenoneno), y por tanto, presentan 3 ciclos bencénicos condensados, los compuestos de la invención comprenden 4 ciclos aromáticos de 6 miembros condensados entre sí, siendo uno o dos de ellos nitrogenados.

El documento D02 divulga un estudio sobre las propiedades fotoquímicas de 5-metoxi-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona y 7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-ona (compuestos de la invención), en concreto, de los procesos de fotorreducción por aminas donadoras y no donadoras de H-alfa (ver página 18).

A pesar de que en el documento D02 se divulga un estudio sobre las propiedades fotoquímicas de la invención, no se hace mención alguna a la capacidad de dichos compuestos para generar oxígeno singlete, como tampoco a sus propiedades antifúngicas.

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, contiene divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el uso de los compuestos de la invención en la producción de oxígeno singlete (reivindicaciones 1-6), como tampoco hacia su uso para la preparación de un derivado destinado a ser una fototoxina antimicrobiana y antifúngica (reivindicación 7).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-7 reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva exigidos en los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.