



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 368 276**

② Número de solicitud: 201000561

⑤ Int. Cl.:  
**C07C 257/18** (2006.01)  
**C09K 11/00** (2006.01)  
**G01N 21/77** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **27.04.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.11.2011**

⑦ Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela**  
**Edificio EMPRENDIA - Campus Vida**  
**15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Vázquez Vázquez, Olalla;**  
**Sánchez López, Mateo Isidro;**  
**Mascareñas Cid, José Luis y**  
**Vázquez Sentis, Marcos Eugenio**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos para señalar secuencias específicas de ADN de doble cadena.**

⑤ Resumen:

Compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos para señalar secuencias específicas de ADN de doble cadena. La presente invención se refiere a un grupo de compuestos de estructura benzamidinica, a su procedimiento de síntesis y a su uso como agentes fluorogénicos de reconocimiento de secuencias de ADN.

ES 2 368 276 A1

## DESCRIPCIÓN

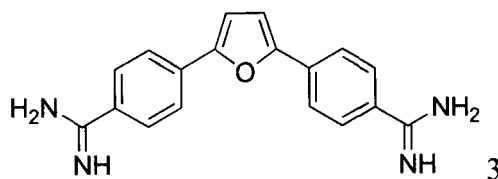
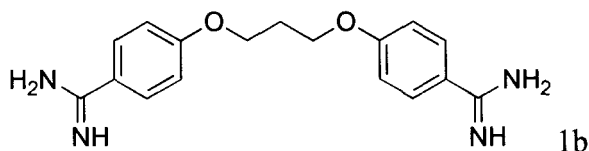
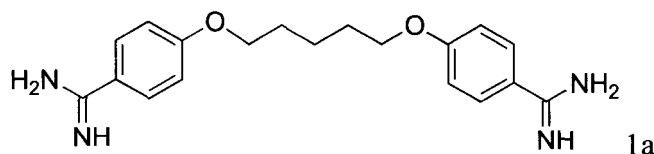
Compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos para señalar secuencias específicas de ADN de doble cadena.

La presente invención se refiere a un grupo de compuestos derivados de bis-benzamidinios como agentes fluorogénicos de reconocimiento de secuencias de ADN.

## Estado de la técnica anterior

Un objetivo importante 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, puesto que muestran unas propiedades excelentes en cuanto a afinidad y especificidad de secuencia. Desafortunadamente, la síntesis de estos compuestos es laboriosa, y su utilidad *in vivo* está en gran medida limitada debido a sus dificultades intrínsecas para atravesar membranas biológicas, así como a su notable toxicidad.

Otro tipo de agentes que también reconocen el surco menor del ADN son los compuestos de tipo bis-benzamidinio, tales como la pentamidina (1a) o propamidina (1b). 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 (3), 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 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).

La configuración dador/aceptor en las unidades de 4-carbamidoilfenoxi características de la estructura de propamidina podrían dar lugar a propiedades fluorogénicas y de emisión inducida cuando se insertan en el surco menor del ADN, como consecuencia del cambio ambiental y de polaridad que tienen lugar al insertarse estas moléculas en el surco menor del ADN; sin embargo, la longitud de onda de excitación de la estructura de propamidina coincide con la banda de absorción típica de ADN a 260 nm. Esta coincidencia impide la aplicación de técnicas de fluorescencia para el estudio de su interacción con el ADN.

Los autores de la presente invención han observado que sustituyendo las unidades de 4-fenoxiamidinio, características de los derivados clásicos de tipo benzamidínico, por 4-aminobenzamidínios se obtienen análogos que, además de interaccionar de forma selectiva con secuencias de ADN, presentan la ventaja adicional de que presentan un espectro de absorción desplazado hacia el rojo, que permite la excitación a una longitud de onda más larga (329 nm) y además experimentan un aumento significativo de su intensidad de emisión de fluorescencia a 387 nm cuando se unen a secuencias ricas en A/T pertenecientes a ADN de doble cadena, (O. Vázquez *et al.*, *Org. Lett.*, 2010, 12, 216-219).

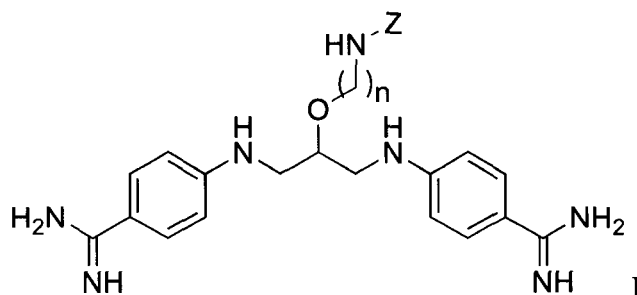
### Descripción breve de la invención

En la presente invención se describen nuevos derivados del tipo bis-4-aminobenzamidínico que incorporan en su estructura un fluoróforo aceptor. Estos compuestos presentan elevada afinidad por secuencias específicas de ADN de doble cadena, y además señalizan esta interacción emitiendo fluorescencia.

La ventaja adicional de estos compuestos es que al estar presente en su estructura un fluoróforo aceptor emiten luz a una longitud de onda todavía más alta que en los compuestos en los que no están presentes estos grupos, debido a un proceso de transferencia de energía intramolecular desde el sistema de bis-4-aminobenzamidínico hasta el grupo fluoróforo aceptor. Gracias a este proceso de transferencia se extiende de forma efectiva el rango de longitudes de onda de emisión a las cuales se puede monitorizar la presencia de ADN. En un caso particular se incrementó el desplazamiento de Stokes en 145 nm, en lugar de en 60 nm como en los casos en los que no existe este grupo fluoróforo aceptor. Y además, modificando el grupo fluoróforo aceptor es posible diseñar derivados que emitan luz a diferentes longitudes de onda que sean de interés para su aplicación como biosensores luminiscentes.

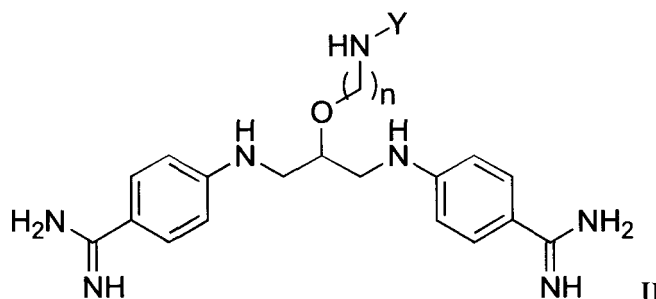
Otra ventaja adicional es que la intensidad de la banda de emisión se puede incrementar hasta 60 veces, lo que permite detectar cantidades de ADN del orden de nanogramos.

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



donde Z es un grupo fluoróforo aceptor y n tiene un valor de 1 a 5.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula general (I) que comprende una reacción entre un compuesto de fórmula II y un fluoróforo aceptor,



donde Y se selecciona entre hidrógeno y un agente quelante, y n tiene un valor de 1 a 5.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN.

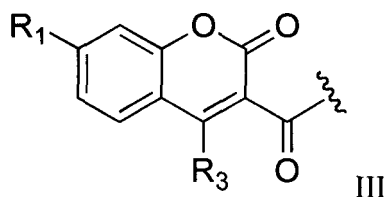
**Descripción detallada de la invención**

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.

El término “fluoróforo aceptor” se refiere, en la presente invención, a una especie que participa en un proceso de transmisión de energía de resonancia (FRET) aceptando la energía transferida por otra especie que se encuentra en estado excitado (esta transferencia puede tener lugar a través de cualquier proceso fotofísico, incluyendo mecanismos de tipo Förster o Dexter). Un parámetro clave para la transferencia de energía entre dos fluoróforos es la combinación de especies con niveles de energía próximos. Esta proximidad se relaciona con la teoría de transferencia de manera que cuanto mayor sea el valor de la integral de solapamiento entre el dador y aceptor (JDA), entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor, mejor será el FRET. En la presente invención, se incorpora la teoría de transferencia de energía, así como el cálculo de dicha integral, la interpretación de sus valores y la detección de energía de transferencia por medio del siguiente artículo: “Resonante Energy Transfer: Methods and Applications”, *Analytical Biochemistry*, 1994, 218, 1-13. Además, estos requerimientos energéticos pueden ser visualizados fácilmente por el solapamiento del espectro de emisión del fluoróforo dador y el espectro de excitación del fluoróforo aceptor. En un caso particular de la presente invención se estudió este solapamiento (figura 4) entre espectro de emisión del aminobenzamidinio derivado  $N^1, N^3$ -bis(4-aminodifenil)propano-1,3-diamina y el espectro de absorción del compuesto 6, comprobándose que esta combinación de especies es adecuada para llevar a cabo la invención.

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 modificados por uno o más sustituyentes tales como amina, halógeno, hidroxilo o ácido carboxílico.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I donde Z, el grupo fluoróforo aceptor, se selecciona entre un ión lantánido complejado con un agente quelante o una cumarina de fórmula general III.



donde R1 se selecciona entre -NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, -OH, -OR<sub>4</sub>, -OCOR<sub>4</sub>, siendo R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> iguales o diferentes seleccionados entre hidrógeno, alquilo, y

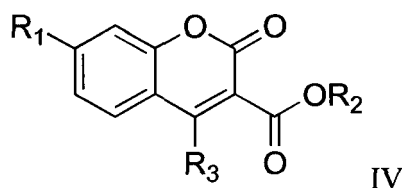
R<sub>3</sub> se selecciona entre hidrógeno, halógeno y alquilo.

En una realización más preferida, el ión lantánido se selecciona entre Eu<sup>+3</sup> y Tb<sup>+3</sup>.

En una realización preferida, el agente quelante se selecciona entre el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 4,7,10-Tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra (ácido metileno fosfónico) (DOTP), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA).

En otra realización preferida, n es 3.

En otra realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) como se describió anteriormente, que comprende la reacción entre un compuesto de fórmula II, como se describió anteriormente, con una especie fluoróforo aceptor, donde la especie fluoróforo aceptor se selecciona entre un ión lantánido o derivados de cumarina de fórmula IV,



## ES 2 368 276 A1

donde R1 se selecciona entre -NR4R5, -OH, -OCOR4, siendo R4 y R5 iguales o diferentes seleccionados entre hidrógeno, alquilo,

R2 se selecciona entre hidrógeno, alquilo, triflato, tosilo, succinimidilo o haluro, y

R3 se selecciona entre hidrógeno, halógeno y alquilo.

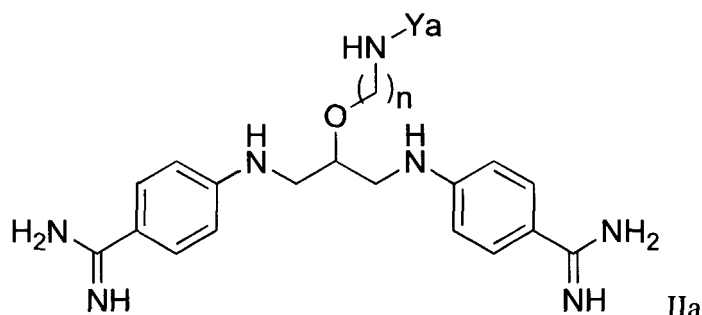
En una realización particular, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) como se describió anteriormente, que comprende la reacción entre un compuesto de fórmula II, como se describió anteriormente y una especie fluoróforo aceptor, que

- cuando Y es hidrógeno entonces la especie fluoróforo aceptor se selecciona entre derivados de cumarina de fórmula IV, como se definió anteriormente. Cuando R2 es hidrógeno el procedimiento comprende un acoplamiento entre ambos en presencia de un activador de grupos carboxílicos.

Son activadores de grupos carboxílicos aquellos que modifican el grupo carboxílico convirtiendo el hidroxilo en un mejor grupo saliente y permiten llevar a cabo la reacción de acoplamiento de forma más rápida, más eficaz y en condiciones más suaves. Por ejemplo, son activadores de grupos carboxílicos los derivados de carbodiimidas como la diciclohexilcarbodiimida, o la diisopropilcarbodiimida; derivados de triazoles como por ejemplo el 1-hidroxi-benzotriazol, 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol; derivados de sales de fosonio o de uronio de un anión no nucleofílico como tetrafluoroborato o hexafluorofosfato, por ejemplo hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU), hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio matanaminio (HATU), hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-iloxi-tris-(pirrolidino)-fosfonio (PyOAP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-(pirrolidino)-fosfonio (PyBOP);

- cuando Y es un agente quelante entonces el fluoróforo aceptor se selecciona entre iones lantánidos, preferentemente entre  $\text{Eu}^{+3}$ ,  $\text{Tb}^{+3}$ , y la reacción que tiene lugar es una reacción de complejación con la correspondiente sal del ión trivalente del lantánido, pudiendo ser tricloruros, tribromuros y triyoduros, sulfatos o triflatos.

En una realización más particular, el compuesto de fórmula II donde Y es un grupo quelante se prepara mediante un procedimiento que comprende una reacción de acoplamiento entre un compuesto de fórmula IIa



donde Ya es hidrógeno y n se selecciona entre 1 y 5,

y un agente quelante que posee un grupo ácido carboxílico, como por ejemplo ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 4,7,10-Tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra(ácido metilen fosfónico) (DOTP), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA), en presencia de un agente activador de grupos carboxílicos. De forma preferida el agente quelante se encuentra en la forma protegida, es decir, todos los grupos acéticos están protegidos excepto uno, por ejemplo con grupos terc-butilo como ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-terc-butylacetato-10-acético.

En otra realización particular, el compuesto II se puede desproteger mediante reacciones rutinarias conocidas por el experto en la materia en condiciones habituales de desprotección (*Greene, T.W. "Protective Groups in Organic Síntesis", 3rd Ed, Wiley-Interscience, 1999*). Es típica la desprotección de un terc-butylcarboxilato en medio ácido, por ejemplo, ácido trifluoroacético.

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

Preferiblemente, la secuencia de ADN que se reconoce está formada por 4 ó 5 pares de bases A/T.

## ES 2 368 276 A1

En otra realización preferida, la secuencia de bases se selecciona entre AATT y AATTT.

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

### Descripción de las figuras

Figura 1a. Espectros de emisión del compuesto 5a en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, que muestra las transiciones electrónicas correspondientes; espectros en ausencia de ADN (■); con 9 equivalentes de ADN no específico GGCCC (○); con 9 equivalentes de ADN AATTC (□); con 9 equivalentes de ADN diana AATTT (●).

Figura 1b. Espectros de emisión del compuesto 5b en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, que muestra las transiciones electrónicas correspondientes; espectros en ausencia de ADN (■); con 9 equivalentes de ADN no específico GGCCC (○); con 9 equivalentes de ADN AATTC (□); con 9 equivalentes de ADN diana AATTT (●).

Figura 2. En la gráfica se compara:

- la emisión de fluorescencia de  $N^1, N^3$ -bis(4-aminodifenil)propano-1,3-diamina ( $0.5 \mu\text{M}$  en tampón Tris-HCl) con 9 equiv. de ADN diana (AATTT, ■);
- la emisión de fluorescencia del compuesto 6 ( $0.5 \mu\text{M}$  en tampón Tris-HCl) (○; la intensidad de este espectro se presenta multiplicado por 10 para mayor claridad); y
- la emisión de fluorescencia del compuesto 6 ( $0.5 \mu\text{M}$  en tampón Tris-HCl) en presencia de 9 equiv. de ADN diana (AATTT, ●).

En la figura insertada se muestra la fluorescencia de las cubetas con soluciones de 500 nM de 6 con una excitación a 329 nm: a) no se añadió ADN; b) 2 equiv de ADN AATTT.

Figura 3a. Espectros de emisión de una solución 0.5 micromolar del compuesto 6 incrementando las cantidades de ADN diana (AATTT): 0, 0.4, 0.7, 1, 1.8, 2.5, 3.2 y 4 micromolar. La gráfica insertada muestra la valoración a 472 nm del compuesto 6 en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 100 mM NaCl con ADN AATTT y demuestra que se ajusta a un modelo de unión 1:1, siendo la constante de disociación ( $814 \pm 90$ ) nM.

Figura 3b. Espectros de emisión de una solución 0.5 micromolar del compuesto 6 incrementando las cantidades de ADN truncado (AAT): 0, 0.4, 0.7, 1, 1.8, 2.5, 3.2 y 4 micromolar. La gráfica insertada muestra la valoración a 472 nm del compuesto 6 en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 100 mM NaCl con ADN AATGC y demuestra que se ajusta a un modelo de unión 1:1, siendo la constante de disociación ( $2.38 \pm 0.08$ )  $\mu\text{M}$ .

Figura 4. Banda de absorción de la unidad aza-benzamidinio: línea punteada a). Banda de absorción de la cumarina: línea punteada b). Banda de emisión de fluorescencia de  $N^1, N^3$ -bis(4-aminodifenil)propano-1,3-diamina, línea sólida (○). Banda de emisión de fluorescencia del compuesto 6, línea sólida (●). Los espectros se normalizaron para la comparación.

Figura 5a. Espectro de excitación a 472 nm de 0.5 micromolar del compuesto 6 en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 100 mM NaCl (línea punteada); y con 9 equiv. de AATTT ADN (línea continua).

Figura 5b. Espectro de emisión del compuesto 6 en ausencia de ADN (■); espectro de emisión del compuesto 6 con 9 equiv. de AATTT ADN y longitud de onda de excitación de 432 nm (○); espectro de emisión con 9 equiv. de AATTT ADN y longitud de onda de excitación de 329 nm (●).

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Ejemplos

#### 60 Preparación de compuestos

Los reactivos y disolventes se adquirieron en casas comerciales, y en concreto el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-terc-butilacetato-10-acético fue suministrado por Macrocylics y las cumarinas pueden adquirirse a Sigma-Aldrich.

65

## Ejemplo 1

## Preparación del compuesto 3

5

10

15

20

25

30

35

40

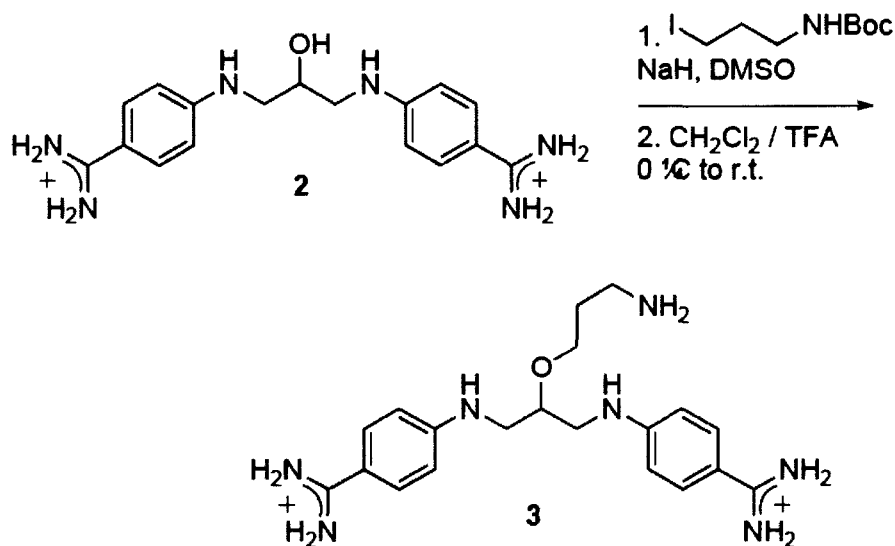
45

50

55

60

65



Una dispersión del 60% de hidruro sódico (68 mg, 476  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv) se añadió a una disolución del compuesto 2 (66 mg, 119  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv) en DMSO seco (1.5 mL). Después de 30 min, se añadió 1-yodo-*tert*-butil-2-aminopropil-carbamato (19 mg, 239  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv) en porciones. La mezcla de reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 6 h. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en fase reversa (Büchi Sepacore) (A: metanol; B: agua 0.1% ácido trifluoroacético; gradiente: 15% B, 5 min; 15%  $\rightarrow$  95% B, 30 min.).

El compuesto aislado se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) y se enfrió a 0°C, se añadió ácido trifluoroacético (1 mL) y se agitó la mezcla a 0°C durante 1 h. Se eliminó el disolvente a sequedad y el crudo se purificó mediante cromatografía en fase reversa (Büchi Sepacore) (gradiente: 0% B, 5 min; 0%  $\rightarrow$  50% B, 30 min.) para obtener el compuesto 3 (13 mg, 39%).  $^1\text{H-RMN } \delta$  (DMSO- $d_6$ ): 1.72-1.82 (m, 2H), 2.81-2.91 (m, 2H), 3.11-3.16 (m, 2H), 3.27-3.40 (m, 4H), 3.78-3.90 (m, 1H), 6.75 (d,  $J = 8.8$  Hz, 4H), 7.65 (d,  $J = 8.8$  Hz, 4H), 8.66 (s, 4H), 8.80 (s, 4H).  $^{13}\text{C-RMN } \delta$  (DMSO- $d_6$ ): 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 36.5 ( $\text{CH}_2$ ), 43.8 ( $\text{CH}_2$ ), 66.4 ( $\text{CH}_2$ ), 76.4 (CH), 111.2 (CH), 112.4 (C), 129.6 (CH), 153.5 (C), 158.4 (C, TFA), 164.1 (C).

## Ejemplo 2

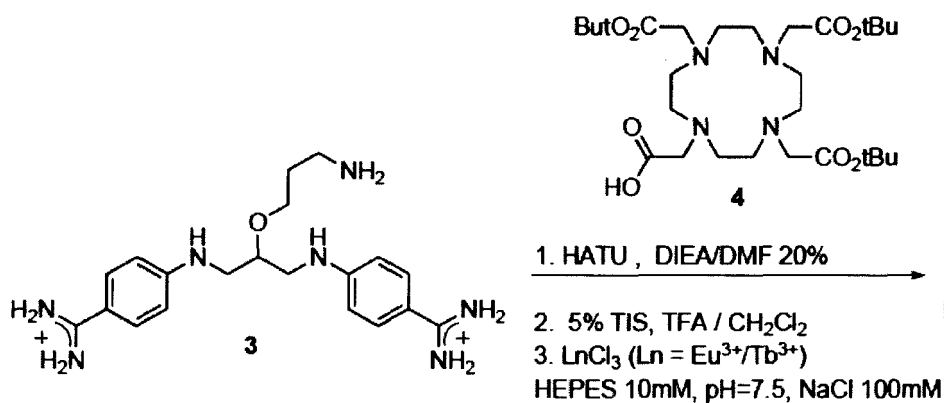
## Preparación de los compuestos 5a y 5b

50

55

60

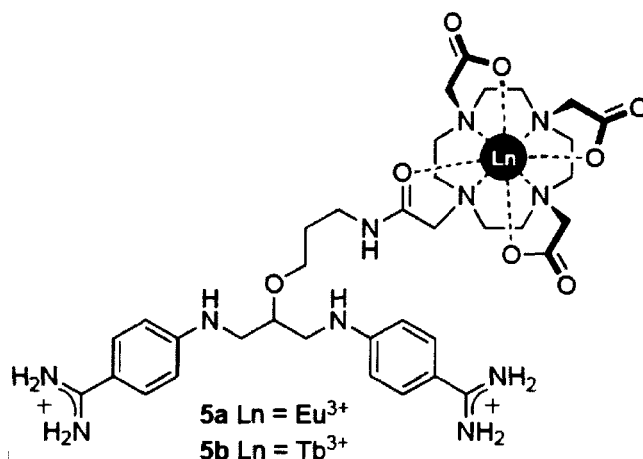
65



5

10

15



20

25

30

Una disolución del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-tris-*tert*-butil acetato-10-acético (4, 52 mg, 92  $\mu$ mol, 4 equiv) en dimetilformamida/diisopropiletilamina 0.2M (460  $\mu$ L, 92  $\mu$ mol 4 equiv) sea activó con HATU (35 mg, 92  $\mu$ mol, 4 equiv) durante 5 min, se añadió sobre 3 (9 mg, 23  $\mu$ mol, 1 equiv) en dimetilformamida/diisopropiletilamina 0.2M (230  $\mu$ L, 46  $\mu$ mol 2 equiv) y se agitó durante 2 h. Se eliminó el disolvente y el crudo se redisolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500  $\mu$ L), se enfrió y se añadió ácido trifluoroacético (500  $\mu$ L). Se concentró a sequedad y el crudo se purificó mediante cromatografía en fase reversa (*Büchi Sepacore*) (gradiente: 8% B, 5 min; 8%  $\rightarrow$  40% B, 30 min.), obteniendo el compuesto intermedio (19 mg, 85%). <sup>1</sup>H-RMN  $\delta$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>/CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 1.72-1.82 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.72 (s, 3H), 2.84 (dd, *J* = 13.1, *J* = 6.61 Hz, 2H), 2.88 (s, 4H), 3.05 (s, 2H), 3.11-3.16 (m, 4H), 3.27-3.36 (m, 4H), 3.39 (s, 2H), 3.58-3.64 (m, 8H), 3.80-4.50 (b, 1H overlays by water signal), 6.75 (d, *J* = 8.9, 4H) 7.65 (d, *J* = 8.9, 4H), 8.73 (s, 4H), 8.80 (s, 4H). <sup>13</sup>C-RMN  $\delta$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>/CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 27.6 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 28.8 (CH<sub>2</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 36.6 (CH<sub>2</sub>), 41.7 (CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (CH<sub>2</sub>), 45.0 (CH<sub>2</sub>), 47.5 (CH<sub>2</sub>), 66.5 (CH<sub>2</sub>), 76.5 (CH), 111.1 (CH), 112.4 (C), 129.7 (CH), 153.5 (C), 158.0 (C, TFA), 164.0 (C), 169.5 (C).

35

La quelación con el lantánido se llevó a cabo del mismo modo para los dos casos. Se disolvió el intermedio obtenido en una disolución tampón 600  $\mu$ L HEPES buffer 10 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM y se añadió el cloruro de lantano correspondiente (50 mM en HCl 1 mM). La mezcla se agitó durante 1 h y se purificó mediante cromatografía (gradiente: 95/5  $\rightarrow$  25/75 30 min, agua/acetronitrilo, 0.1% ácido trifluoroacético).

40

**5a: MALDI/TOF-MS:** [M+H]<sup>+</sup> calcd. para C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>Eu N<sub>11</sub>O<sub>8</sub> = 920.3 encontrado 920.1.

**5b: MALDI/TOF-MS:** [M+H]<sup>+</sup> calcd. para C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>Tb = 926.3 encontrado 926.3.

45

### Ejemplo 3

#### Preparación del compuesto 6

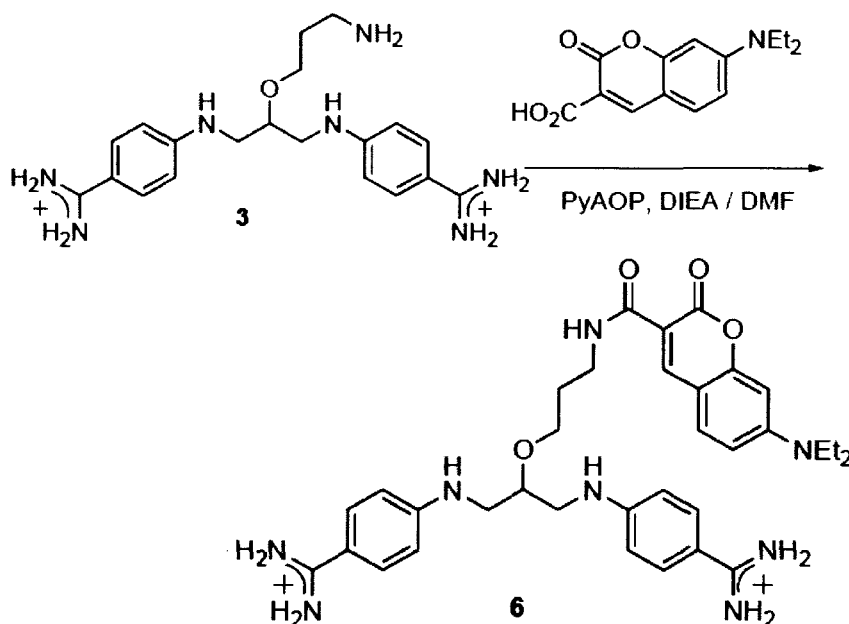
45

50

55

60

65





## ES 2 368 276 A1

Una disolución del ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico (24 mg, 92  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv) en dimetilformamida/diisopropiletilamina 0.2 M (460  $\mu\text{L}$ , 92  $\mu\text{mol}$  4 equiv) se activó con PyAOP (48 mg, 92  $\mu\text{mol}$ , 4 equiv), se añadió sobre 3 (9 mg, 23  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv) en dimetilformamida/diisopropiletilamina 0.2 M (230  $\mu\text{L}$ , 46  $\mu\text{mol}$  2 equiv) y se agitó durante 2 h. El residuo se purificó mediante cromatografía en fase reversa (Büchi Sepacore) (gradiente: 15% B, 5 min; 15%  $\rightarrow$  95% B, 30 min.), para obtener el producto (12 mg, 62%).  $^1\text{H-RMN } \delta$  (DMSO- $d_6$ ): 1.14 (t,  $J = 6.9$  Hz, 6H), 1.87 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 3.10-3.14 (m, 2H), 3.22-3.32 (m, 2H), 3.44-3.52 (m, 4H), 3.82-3.86 (b, 1H), 5.23 (s, 1H) 6.62 (s, 1H), 6.73 (d,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 6.81 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J_2 = 46.4$ ,  $J_1 = 8.8$  Hz, 4H), 7.68 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.78 (s, 4H), 8.95 (s, 1H), 9.18 (s, 1H).  $^{13}\text{C-RMN } \delta$  (DMSO- $d_6$ ): 12.3 (CH<sub>3</sub>), 27.7 (CH<sub>2</sub>), 36.4 (CH<sub>2</sub>), 44.1 (CH<sub>2</sub>), 44.3 (CH<sub>2</sub>), 46.6 (CH<sub>2</sub>), 67.6 (CH), 95.5 (CH), 107.6 (C), 109.3 (CH), 110.1 (CH), 111.9 (C), 113.5 (C), 129.7 (CH), 131.6 (CH), 147.7 (CH), 152.4 (C), 153.7 (C), 157.2 (C), 158.2 (C, TFA), 162.1 (C), 162.5 (C), 164 (C).

### 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.

Las medidas para el compuesto 5a se llevaron a cabo con los siguientes parámetros de adquisición: incremento 1 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de banda de excitación: 6 nm; ancho de banda de emisión: 6 nm; longitud de onda de excitación: 329 nm. Los espectros de emisión se registraron a 20°C entre 550 y 750 nm.

Las medidas para el compuesto 5b 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 registraron a 20°C entre 345 y 600 nm.

Los ADNs, suministrados por Termo Fischer Scientific GMBH, fueron horquillas de doble hélice con las siguientes secuencias.

30

DNA	Secuencia completa (5' to 3')
<b>AATTT</b>	GGCG <b>AATTT</b> CGC TTTT GCG AAATT CGCC
<b>AATTC</b>	GGCG <b>AATTC</b> AGC TTTT GCT GAATT CGCC
<b>AATGC</b>	GGCG <b>AATGC</b> AGC TTTT GCT GCATT CGCC
<b>GGCCC</b>	GGCA <b>GGCCC</b> AGC TTTT GCT GGGCC TGCC

40

Los espectros de emisión se muestran en la figura 1a y 1b. Como los espectros con AATGC son muy similares a los obtenidos con GGCCC, se concluye que tres pares de bases A/T es una secuencia demasiado corta para acomodar la unidad de bis-aminobenzamidinio. Se acomodan mejor en pares de bases A/T de 4, 5 ó 6 pares de bases.

45

### Diseño y fluorescencia del compuesto 6

La fluorescencia de emisión del compuesto 6 se realizó con una disolución tampón, y con 9 equiv. de AATTT ADN. Después de la excitación a 329 nm, la fluorescencia de emisión del compuesto 6 en tampón es muy débil y esta dominada por la banda de emisión de cumarina a 472 nm.

La adición de ADN AATTT induce un incremento de aproximadamente 60 veces la intensidad de la fluorescencia de emisión del compuesto 6. La emisión es tan intensa en este caso que incluso es posible detectar menos de 3 nanogramos de ADN (figura 2).

Así, la adecuada conjugación de la estructura bis-(benzamidinio) con el grupo fluoróforo aceptor, de estructura derivada de la cumarina, conlleva a un cambio de fluorescencia significativo cuando se une a secuencias específicas de ADN (AATTT), como lo demuestra el incremento del desplazamiento (145 nm) respecto a la fluorescencia de emisión de *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-bis(4-aminodifenil)propano-1,3-diamina, un derivado bis(benzamidino) en el que no están presentes grupos fluoróforos aceptores (figura 2).

En la figura 5b se comparan los espectros anteriores con el espectro de emisión del compuesto 6 (realizado en las mismas condiciones) con 9 equiv. de ADN AATTT y a una longitud de onda de excitación de 432 nm.

65

El máximo de excitación del compuesto 6 corresponde con la banda de excitación esperada para cumarina a 432 nm. Tras la adición de AATTT, se observa un gran incremento en la intensidad del espectro de excitación, y la banda

## ES 2 368 276 A1

de excitación de la bis(benzamidina) a 329 nm se vuelve más intensa, mostrando la energía de transferencia de los dos fluoróforos: excitando a 329 nm la bis(benzamidina) resulta un incremento en la emisión de cumarina a 472 nm (figuras 5a y 5b).

5 Los espectros de excitación se registraron desde 220 nm a 470 nm a 20°C con los siguientes parámetros: incremento 1 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de banda de excitación: 3 nm; ancho de banda de emisión: 4 nm; longitud de onda de emisión: 474 nm.

10 Los espectros de emisión se llevaron a cabo con los siguientes parámetros: incremento 1 nm; tiempo de integración: 0.2 s; ancho de banda de excitación: 3 nm; ancho de banda de emisión: 4 nm; longitud de onda de excitación: 329 nm o 434 nm registrado desde 345 a 640 nm.

### 15 *Valoración del compuesto 6 con diferentes ADNs*

Los experimentos de fluorescencia se llevaron a cabo en fluorímetro Jobin-Yvon Fluoromax-3 (software DataMax 2.20), acoplado a un sistema de control de temperatura Wavelength Electronics LFI-3751.

20 Excepto para el caso de los experimentos con lantánidos, 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 registraron a 20°C entre 345 y 640 nm (figura 3).

25 Todas las valoraciones se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento: sobre 1 mL de disolución de 0.5 microM del compuesto 6 en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, 100 mM NaCl, se añadieron sucesivas alícuotas de aproximadamente 400 microM de disolución de ADN y se registró el espectro de fluorescencia para cada adición.

30 Se observó que la adición del ADN truncado AATGC induce incrementos significativamente más pequeños en la emisión del compuesto 6 que la adición del ADN AATTT a 472 nm.

El máximo de emisión se empleó en la determinación de la constante de unión. Así, los valores de la constante de disociación KD que se encontraron para el compuesto 6 conjugado con ADN AATTT, AATCG, fueron respectivamente (814 ± 90) nM, y (2.38 ± 0.08) μM (figura 3).

35

40

45

50

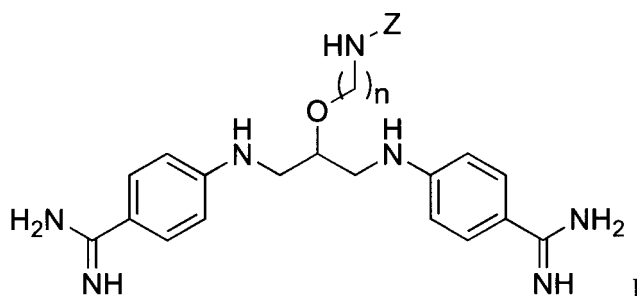
55

60

65

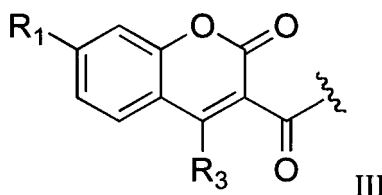
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I)



donde Z es un grupo fluoróforo aceptor y n tiene un valor de 1 a 5.

2. Un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1, donde Z se selecciona entre un ión lantánido complejado con un agente quelante o una cumarina de fórmula general III,



donde R1 se selecciona entre -NR4R5, -OH, -OR4, -OCOR4, siendo R4 y R5 iguales o diferentes seleccionados entre hidrógeno, alquilo, y

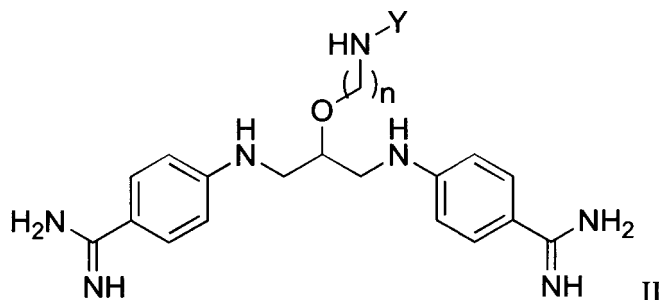
R3 se selecciona entre hidrógeno, halógeno y alquilo.

3. Un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1 y 2, donde el ión lantánido se selecciona entre  $\text{Eu}^{+3}$ ,  $\text{Tb}^{+3}$ .

4. Un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 1 y 2, donde el agente quelante se selecciona entre el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 4,7,10-Tetraazaciclododecano-1.4.7.10-tetra(ácido metileno fosfónico) (DOTP), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1.4.8.11-tetraacético (TETA).

5. Un compuesto de fórmula general (I) según las reivindicaciones anteriores, donde n es 3.

6. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula general (I) que comprende una reacción entre un compuesto de fórmula II y una especie fluoróforo aceptor,



donde Y es hidrógeno o un agente quelante, y n tiene un valor de 1 a 5.

7. Uso de un compuesto de fórmula general (I) como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN.

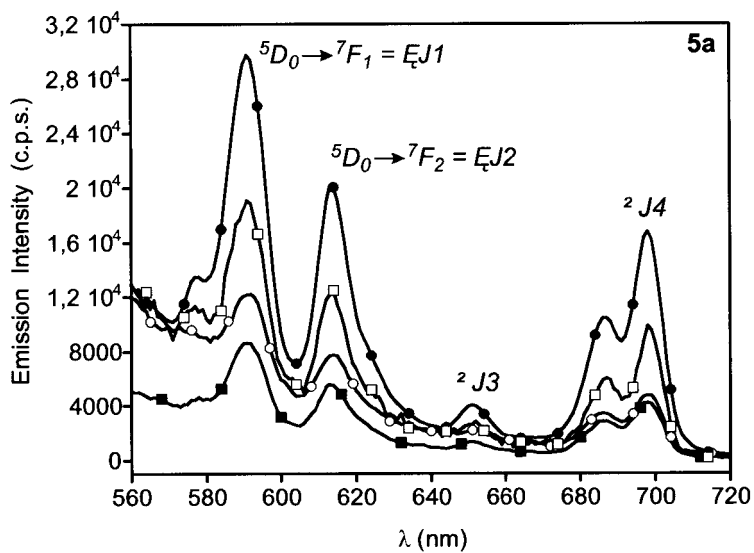


Figura 1a

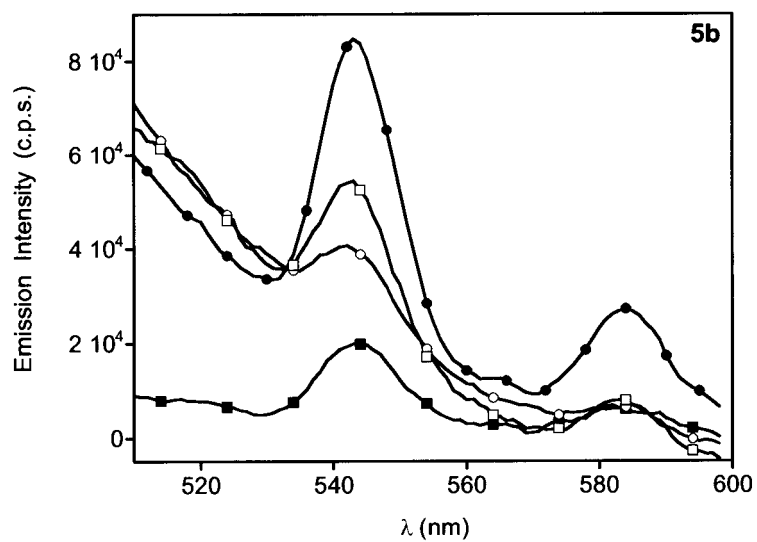


Figura 1b

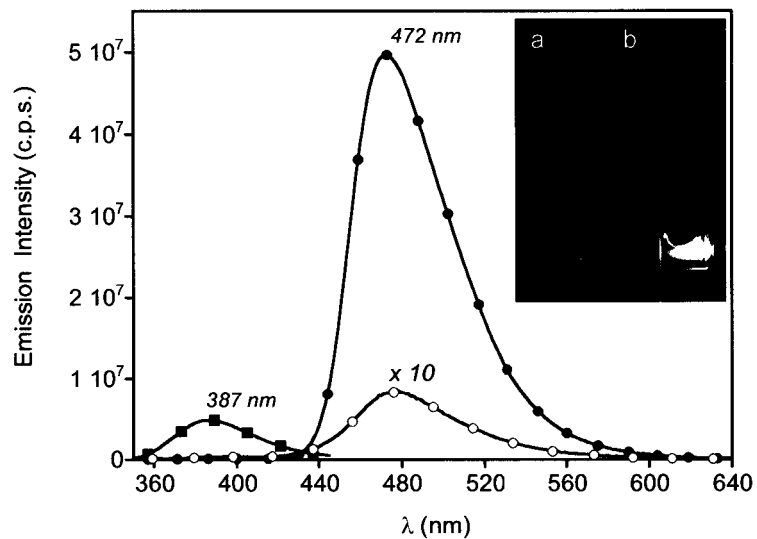


Figura 2

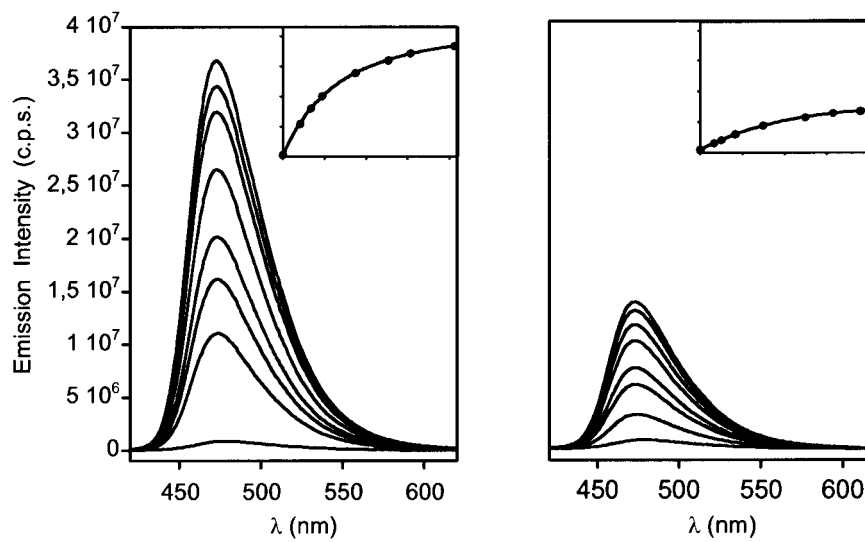


Figura 3a

Figura 3b

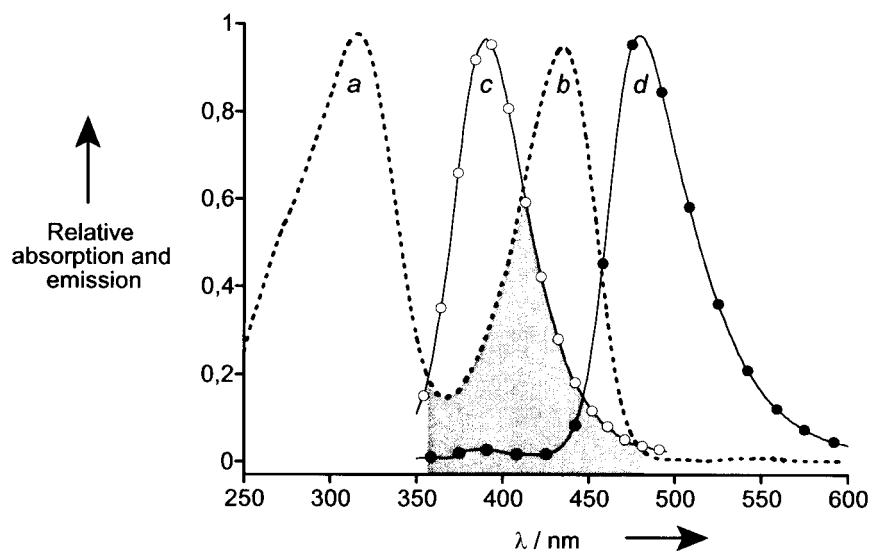


Figura 4

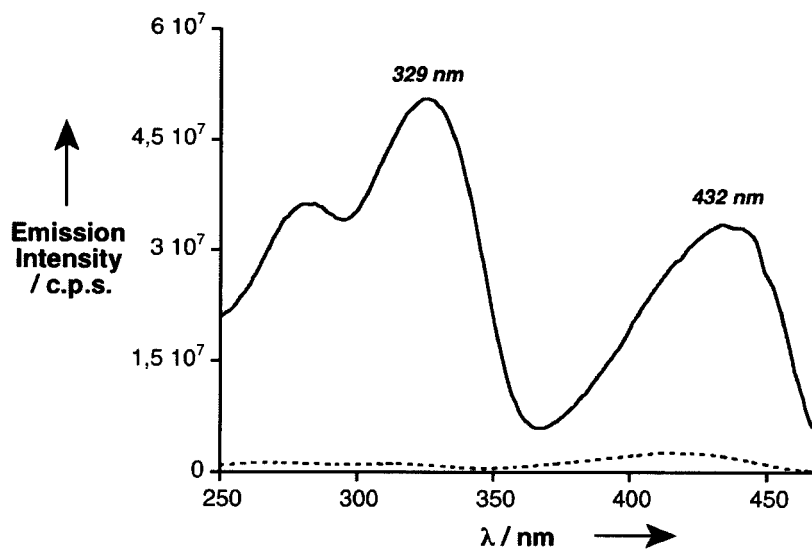


Figura 5a

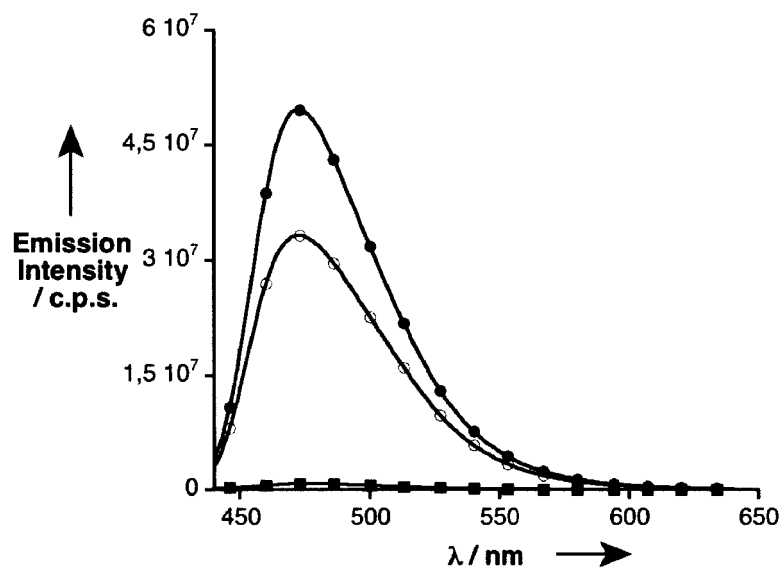


Figura 5b



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000561

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.04.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	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 219, esquema 2.	1-7
A	WO 2002002516 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.	1-7
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.	1-7
A	WO 2003017994 A1 (NEUROCHEM, INC.) 06.03.2003, páginas 17-20, fórmula I.	1-7
A	EP 2116236 A1 (UNIVERSITÉ DE MONS-HAINAUT) 11.11.2009, párrafos [0008],[0012].	1-7
E	VÁZQUEZ, O. et al. "dsDNA-triggered energy transfer and lanthanide sensitization processes. Luminiscent probing of specific A/T sequences." Chemical Communications 2010, Volumen 46, Número 30, páginas 5518-5520. [Disponible en línea el 11.05.2010]. Ver página 5518, resumen; página 5519, esquema 2.	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  
27.04.2011

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/4



## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07C257/18** (2006.01)

**C09K11/00** (2006.01)

**G01N21/77** (2006.01)

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

C07C, C07D, 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, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.05.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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	VAZQUEZ, O. et al. Organic Letters 2010, Vol. 12, Nº 2, pp. 216-219	10.12.2009
D02	WO 2002002516 A2	10.01.2002
D03	HANNON, M.J. Chemical Society Reviews, 2007, Vol. 36, pp. 280-295	17.11.2006

**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 un compuesto de fórmula general (I), con estructura de bis-aminobenzamidina y que posee un grupo fluoróforo aceptor, un procedimiento para su preparación y su uso como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN.

El documento D01 divulga derivados fluorogénicos de bis-4-aminobenzamidinas que muestran un aumento de su emisión de fluorescencia cuando se unen específicamente a sitios A/T del surco menor del ADN, por lo que resultan útiles para el reconocimiento de dichas secuencias (ver página 216, resumen). Entre los compuestos descritos se encuentra el compuesto **4**, que presenta una estructura simétrica similar a los compuestos (I) de la invención, pero que se diferencia de éstos en que el grupo OH en posición central se encuentra libre y no unido a un fluoróforo (ver página 219, esquema 2).

El documento D02 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 los compuestos poseen, como grupo funcional, al menos una *para*-benzamidina, como ocurre en el caso del compuesto **RWH23**, que presenta una estructura básica similar a los compuestos de la invención, en el que el alquilo que se encuentra entre los dos núcleos de aminobenzamidinio está sustituido por dos grupos hidroxilo (ver página 6, líneas 6-10; 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 D03 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).

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de los documentos D01-D03, tomado solo o en combinación con los otros, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia un compuesto de fórmula general (I) con estructura de bis-aminobenzamidina y que posee un grupo fluoróforo aceptor (reivindicación independiente 1), y por tanto, tampoco hacia un procedimiento para su preparación (reivindicación independiente 6) ni hacia su uso como agente fluorogénico de reconocimiento de secuencias de ADN (reivindicación independiente 7).

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones **1-7** cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.