

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 741**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2007** **E 07819248 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 2079757**

54 Título: **Procedimiento para la localización selectiva de sustancias activas en y dentro de mitocondrias, y sustancias activas correspondientes**

30 Prioridad:

24.10.2006 DE 102006050091

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.01.2015

73 Titular/es:

**UGICHEM GESELLSCHAFT FÜR ORGANISCHE
CHEMIE MBH (100.0%)
MITTERWEG 24
6020 INNSBRUCK, AT**

72 Inventor/es:

**LINDHORST, THOMAS;
WERNER, BIRGIT y
PIPER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 526 741 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la localización selectiva de sustancias activas en y dentro de mitocondrias, y sustancias activas correspondientes

5 La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para la localización selectiva de sustancias activas, tanto en como dentro de mitocondrias en el interior de células vivas, así como correspondientes sustancias activas que, sin otros agentes auxiliares, penetran a través de la membrana celular en las células y allí son localizadas selectivamente tanto en como dentro de mitocondrias.

10 La localización de sustancias activas en o bien dentro de mitocondrias significa, en toda la solicitud, la acumulación de sustancias activas en o bien dentro de mitocondrias. El término "localizado(a)" en o bien dentro de mitocondrias significa en toda la solicitud "acumulado(a)" en o bien dentro de mitocondrias.

Las mitocondrias son organelas semi-autónomas de la célula. Poseen su propio genoma (ADNmt) el cual, junto al genoma del núcleo, codifica una parte de sus proteínas. Las proteínas codificadas por las mitocondrias se transcriben, traducen y sintetizan también por parte de las mitocondrias. Vías metabólicas importantes en las mitocondrias sirven para la producción de energía y, por consiguiente, son esenciales para la vitalidad de la célula.

15 Enfermedades mitocondriales comprenden, por ejemplo, numerosas enfermedades hereditarias, cáncer, diabetes, Parkinson y arteriosclerosis. A trastornos metabólicos mitocondriales se les responsabiliza, entre otros, también de fenómenos del envejecimiento, por ejemplo sordera o la disminución de la facultad visual. Fenómenos del envejecimiento se atribuyen, por ejemplo, también a mutaciones o bien deleciones del ADN mitocondrial. ("Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer", Josephine S. Modica-Napolitano, Keshav K. Singh, *expert reviews in molecular medicine*, (02)00445-3a.pdf (código abreviado: txt001ksb); 11 de abril de 2002, ISSN 1462-3994 ©2002 Cambridge University Press. "Mitochondrial defects in cancer", Jennifer S Carew, Peng Huang, *Molecular Cancer*, **2002**, 1:9. G. A. Cortopassi, Aliu Wong, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1999**, 1410 (2), 183-193).

25 Los defectos génicos en los que se fundamentan las enfermedades mitocondriales abarcan desde mutaciones puntuales y largas que se manifiestan esporádicamente y también heredadas de forma puramente maternal del ADNmt hasta formas autosomales, dominantes o bien recesivas, heredadas en el caso de variaciones en el genoma del núcleo. Además, se discute el que variaciones en el ADNmt juegan también un papel en el caso de enfermedades poligénicas con herencias complicadas.

30 Particularidades de estas enfermedades son la diversidad de sus cuadros clínicos, la complejidad del diagnóstico y los enfoques terapéuticos existentes hasta ahora sólo de manera limitada.

Por consiguiente, la investigación y el diagnóstico de determinadas propiedades de las mitocondrias tales como, por ejemplo, mutaciones del ADN mitocondrial o trastornos mitocondriales del metabolismo es una premisa importante en el desarrollo de correspondientes sustancias activas contra enfermedades mitocondriales. La localización selectiva de sustancias activas en mitocondrias en el interior de células es, en este caso, asimismo un aspecto importante, ya que con ello se genera una elevada concentración local de sustancias activas en las mitocondrias que conduce, finalmente, a una importación de las sustancias activas a las mitocondrias.

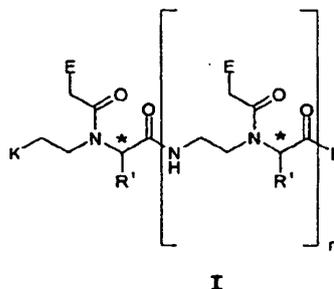
40 Blaikie et al., "Targeting Dinitrophenol to Mitochondria: Limitations to the Development of a Self-limiting Mitochondrial Protonophore", *Bioscience Reports*, tomo 26 (3), páginas 231-243 (2006) informan sobre la preparación del compuesto MitoDNP (metanosulfonato de 3-(3,5-dinitro-4-hidroxifenil)propil-trifenilfosfonio) que se acumula en las mitocondrias. Además, se comprobó que MitoDNP permanece en las mitocondrias y no se desacopla el potencial protones-membrana.

45 En el artículo recopilatorio de Weissig, "Mitochondrial-targeted drug and DNA delivery", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, tomo 20 (1), páginas 1-62 (2003) se discuten diferentes estrategias para la fijación preestablecida como objetivo de mitocondrias, así como posibles aplicaciones terapéuticas - entre otros la aportación de oligonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), o de ADN de plásmido, tanto en como también dentro de mitocondrias. Los ácidos nucleicos importados descritos en dicho artículo no muestran, sin embargo, eficacia alguna dentro de la matriz mitocondrial.

50 Sustancias activas mitocondriales son sustancias que consiguen una eficacia tanto en como dentro de mitocondrias tal como, por ejemplo, una eficacia en el tratamiento de enfermedades mitocondriales o una eficacia en relación con procedimientos diagnósticos, tanto en como también dentro de mitocondrias.

Una misión de la presente invención es habilitar sustancias activas anti-sentido que penetren sin otros agentes auxiliares a través de la membrana celular en células y se localicen allí selectivamente tanto en como también dentro de mitocondrias, con el fin de generar en las mitocondrias un efecto anti-sentido o un efecto anti-genómico.

Este problema se resuelve mediante compuestos de la fórmula general I:



5

en donde

n es un número entero de 0 a 35, preferiblemente 1 a 28, más preferiblemente 9 a 28, lo más preferiblemente 13 a 20.

10 Los radicales K, L o R¹ están sustituidos, independientemente uno de otro, con al menos un radical monohidroxi-mononitro-fenilo, preferiblemente un radical 4-hidroxi-3-nitro-fenilo, más preferiblemente un radical 4-hidroxi-2-nitro-fenilo, más preferiblemente un radical 3-hidroxi-6-nitro-fenilo, o un radical monohidroxi-dinitro-fenilo, preferiblemente un radical 3,5-dinitro-4-hidroxi-fenilo, más preferiblemente un radical 2,5-dinitro-4-hidroxi-fenilo, más preferiblemente un radical 2,4-dinitro-5-hidroxi-fenilo, estando definida la posición de enlace del radical fenilo con los radicales K, L o R¹ como la posición 1, y el radical fenilo puede estar adicionalmente sustituido con uno o varios átomos de flúor, cloro, bromo o yodo, o -COOH, COOR⁸, -CSOH, CSOR⁸, -COSH, COSR⁸, -CONH₂, -CONHR⁹, -COR¹⁰R¹¹, -OH, -OR⁸, -SH, -SR⁸, -NH₂, -NHR⁹, -NR¹⁰R¹¹, -NR¹²NOH, -NOR¹³, funciones éster del ácido fosfónico o ácido fosfónico, o grupos alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo C₅-C₉, aralquilo C₇-C₁₂ o heteroaralquilo C₂-C₁₁, siendo R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³, independientemente uno de otro, radicales alquilo C₁-C₆.

20 E es, independientemente uno de otro, un átomo de H, un radical fenilo sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido, una nucleobase eventualmente sustituida con grupos protectores, p. ej. una nucleobase que se presenta en la naturaleza o que no se presenta en la naturaleza, o un intercalador de ADN.

Preferiblemente, cada uno de E es, independientemente uno de otro, un radical adeninilo, citosinilo, pseudoisocitosinilo, guaninilo, timinilo, uracililo o fenilo.

25 Cada uno de los radicales de R¹ es, independientemente uno de otro, un átomo de H o un radical alquilo, alqueno, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico, con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, en donde al menos un radical R¹ no es un átomo de H, y está sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico.

30 Cuando el radical R¹ no está sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico puede presentar, p. ej., también independientemente uno de otro, una o varias cadenas laterales de un aminoácido natural o no natural, preferiblemente un radical alquilo, alqueno, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico, con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido.

Preferiblemente, cada uno de los radicales R¹ comprende, independientemente uno de otro, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de C.

35 Cada uno de los radicales R¹ puede estar ramificado o no ramificado independientemente uno de otro.

La expresión "eventualmente sustituido" se refiere, en toda la solicitud, a grupos en los que uno o varios átomos de hidrógeno están reemplazados por flúor, cloro, bromo o yodo, grupos -COOH, COOR⁸, -CSOH, CSOR⁸, -COSH, COSR⁸, -CONH₂, -CONHR⁹, -COR¹⁰R¹¹, -OH, -OR⁸, =O, -SH, -SR⁸, =S, -NH₂, =NH, -NHR⁹, -NR¹⁰R¹¹, -NR¹²NOH, -

NOR¹³ o NO₂, funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico. Esta expresión se refiere, además, a grupos que están sustituidos con grupos alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, heteroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₂-C₉, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo C₅-C₉, aralquil C₇-C₁₂ o heteroaralquilo C₂-C₁₁, siendo R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³, independientemente uno de otro, radicales alquilo C₁-C₆.

5 Funciones éster de ácido fosfónico pueden presentar, por ejemplo, la fórmula -P(=O) (OV)₂ o -P(=O) (OV) (OH). En este caso, cada uno de V puede ser, independientemente uno de otro, un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo o alicíclico, no sustituido, con hasta 20 átomos de C, más preferiblemente con hasta 7 átomos y lo más preferiblemente un radical metilo, etilo, ciclohexilo o bencilo.

10 En el caso de los compuestos de acuerdo con la invención, las funciones ácido fosfónico pueden presentar, por ejemplo, la fórmula -P(=O) (OH)₂.

Lo más preferiblemente, cada uno de los radicales R¹ se elige, independientemente uno de otro, de un grupo de las fórmulas -alquil(C₁-C₁₀)-[P(=O) (O-V)₂], en donde cada uno de V, independientemente uno de otro, es un átomo de H, un radical metilo, etilo, ciclohexilo o un radical bencilo.

15 K es un grupo de la fórmula -NR²R³, -N[⊕]R²R³R⁴, -NR²(CO)R³ o -NR²(CS)R³, en donde R², R³ y R⁴, independientemente uno de otro, son un átomo de H, un radical alquilo, alcarilo, alquenilo o alquinilo, un grupo protector amino, un ligando informador, un marcador de fluorescencia, un intercalador, un quelante, aminoácido, péptido, proteína, hidrato de carbono, lípido, esteroide, ácido graso, oligonucleótido, un punto cuántico, un desactivante FRET (desactivante de energía por resonancia de fluorescencia) o un polímero soluble en agua o insoluble, pudiendo estar cada uno de los radicales precedentes eventualmente sustituido.

20 Preferiblemente, K es una función NH₂, un radical -NH(CO)CH₃, una función -NH(CO)-alquilo (C₁-C₁₀), una función -NH(CO)-alcarilo (C₁-C₁₀), una función -NH(CO)-alquenilo (C₁-C₁₀), una función -NH(CO)-alquinilo (C₁-C₁₀), un grupo de la fórmula -NR²R³ o -N[⊕]R²R³R⁴, o -NR²(CO)R³, en donde R², R³ y R⁴, independientemente uno de otro, es un átomo de H, un aminoácido natural o no natural, un aminoácido no sustituido o sustituido con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, un péptido o un radical alquilo, alcarilo, alquenilo o alquinilo, pudiendo estar eventualmente sustituido cada uno de los radicales precedentes.

30 L es un grupo de la fórmula -NR⁵R⁶, -NR⁵(CO)R⁶, -NR⁵(CS)R⁶, -OR⁷ o -SR⁷, en donde R⁵ y R⁶, independientemente uno de otro, son un átomo de H, un radical alquilo, alcarilo, alquenilo o alquinilo, un ligando informador, un marcador de fluorescencia, un intercalador, un quelante, aminoácido, amida de aminoácido, péptido, amida de péptido, proteína, hidrato de carbono, lípido, esteroide, ácido graso, oligonucleótido, un punto cuántico, un desactivante FRET (desactivante de energía por resonancia de fluorescencia) o un polímero soluble en agua o insoluble, y R⁷ es un átomo de H, un radical alquilo, un ligando informador, un marcador de fluorescencia, un intercalador, un quelante, aminoácido, amida de aminoácido, péptido, amida de péptido, proteína, hidrato de carbono, lípido, esteroide, ácido graso, oligonucleótido, un punto cuántico, un desactivante FRET o un polímero soluble en agua o insoluble, pudiendo estar cada uno de los radicales precedentes eventualmente sustituido.

35 Preferiblemente, L es una función OH, una función NH₂, una función -NH-alquilo (C₁-C₁₀), una función -NH-alcarilo (C₁-C₁₀), una función -NH-alquenilo (C₁-C₁₀), una función -NH-alquinilo (C₁-C₁₀), un aminoácido natural o no natural, una unidad aminoácido, amida de aminoácido, péptido o amida de péptido, no sustituida o sustituida con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, pudiendo estar eventualmente sustituido cada uno de los radicales precedentes.

40 En toda la solicitud, los radicales alquilo pueden presentar preferiblemente 1-6 átomos de C, p. ej., pueden ser grupos metilo, etilo, propilo o butilo. Los términos "aralquilo", "alcarilo" y "arilalquilo" significan en toda la solicitud un grupo que presenta una parte alifática y una parte aromática.

45 Cuando R¹ no es un átomo de H, mediante la unión del radical R¹ a la cadena principal del compuesto general I se forma en el punto de unión un centro asimétrico (*). En cada uno de los centros asimétricos se presenta, consiguientemente, una configuración R o una configuración S.

50 En este caso, la configuración preferiblemente en el centro asimétrico se define análogamente a las reglas de Cahn-Ingold-Prelog, con la condición adicional de que la prioridad de los ligandos se defina siempre como sigue: el átomo de nitrógeno en el centro asimétrico recibe siempre la prioridad 1. El átomo de carbono del grupo carboxilo en el centro asimétrico obtiene siempre la prioridad 2. El átomo de carbono del radical R¹ en el centro asimétrico obtiene siempre la prioridad 3. El átomo de hidrógeno en el centro asimétrico obtiene siempre la prioridad 4.

De acuerdo con la invención, los compuestos de la fórmula general I presentan al menos 1 centro asimétrico, estando al menos un radical R^1 sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico.

5 Conforme a otra forma de realización preferida de la invención, cada segundo radical R^1 corresponde, independientemente uno de otro, a la cadena lateral de un aminoácido natural o no natural, preferiblemente un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y al menos un radical R^1 es un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, que está sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, siendo los radicales R^1 restantes átomos de H.

10 Conforme a otra forma de realización preferida de la invención, cada tercer radical R^1 corresponde, independientemente uno de otro, a la cadena lateral de un aminoácido natural o no natural, preferiblemente un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y al menos un radical R^1 es un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y está sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, siendo los radicales R^1 restantes átomos de H.

15 Conforme a otra forma de realización preferida de la invención, dos, tres o más radicales R^1 contiguos corresponden, independientemente uno de otro, a la cadena lateral de un aminoácido natural o no natural, preferiblemente un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y al menos un radical R^1 es un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y está sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, siendo los radicales R^1 restantes átomos de H.

25 Conforme a otra forma de realización preferida de la invención, cada uno de R^1 , independientemente uno de otro, corresponde a la cadena lateral de un aminoácido natural o no natural, preferiblemente un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y al menos un radical R^1 es un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo o alicíclico con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y está sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico.

Conforme a otra forma de realización preferida de la invención, uno o varios de los radicales R^1 presentan, independientemente uno de otro, al menos una función éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico.

Conforme a otras formas de realización preferidas de la presente invención se cumple lo siguiente:

30 Si en el compuesto de la fórmula general I está presente más de un centro asimétrico y más de un radical R^1 con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, eventualmente sustituido, al menos el 50% del número de los centros asimétricos, que presentan radicales con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, tienen la configuración R, preferiblemente el 66%, más preferiblemente el 70%, más preferiblemente el 75%, más preferiblemente el 80%, más preferiblemente el 85%, más preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95%, lo más preferiblemente el 100%.

35 Conforme a formas de realización preferidas alternativas de la presente invención, se cumple lo siguiente:

40 Si en el compuesto de la fórmula general I está presente más de un centro asimétrico y más de un radical R^1 con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, eventualmente sustituido, al menos el 50% del número de los centros asimétricos, que presentan radicales con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, tienen la configuración S, preferiblemente el 66%, más preferiblemente el 70%, más preferiblemente el 75%, más preferiblemente el 80%, más preferiblemente el 85%, más preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95%, lo más preferiblemente el 100%.

En otra forma de realización, como máximo el 80% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

45 En otra forma de realización, como máximo el 60% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

En otra forma de realización, como máximo el 50% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

En otra forma de realización, como máximo el 40% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

En otra forma de realización, como máximo el 30% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

- 5 En otra forma de realización, como máximo el 20% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

En otra forma de realización, como máximo el 10% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

- 10 En otra forma de realización, como máximo el 4% del número de los radicales R^1 están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, y los restantes radicales R^1 son átomos de H.

En otra forma de realización preferida de la invención, todos los centros asimétricos (*) del compuesto general I presentan la misma configuración.

En otra forma de realización preferida de la invención, todos los centros asimétricos (*) del compuesto general I presentan la configuración S.

- 15 En otra forma de realización preferida de la invención, todos los centros asimétricos (*) del compuesto general I presentan la configuración R.

Además, se dan a conocer composiciones de acuerdo con la invención que contienen uno o varios compuestos de acuerdo con la invención, eventualmente en combinación con adyuvantes habituales.

- 20 La síntesis de los compuestos de la fórmula general I tiene lugar preferiblemente a partir de monómeros puros en cuanto a los enantiómeros. Durante la síntesis de los compuestos de la fórmula general I, centros asimétricos individuales pueden modificar en un ligero porcentaje su configuración previamente definida en virtud de las condiciones de síntesis química. El porcentaje mayor de los compuestos de la fórmula general I formados durante la síntesis es, sin embargo, puro en cuanto a los estereoisómeros. También estas composiciones están en condiciones de cumplir la misión de acuerdo con la invención.

- 25 Un compuesto de la fórmula general I puede estar unido a través de los radicales K y L como enlazadores con un segundo compuesto de la fórmula general I, estando los radicales definidos como arriba. La configuración en los centros asimétricos de uno de los compuestos de la fórmula general I, es en este caso independiente de la configuración en los centros asimétricos del segundo compuesto de la fórmula general I unido a través del enlazador. Así, por ejemplo, todos los centros asimétricos de un compuesto de la fórmula general I pueden presentar la configuración R, y todos los centros asimétricos del segundo compuesto de la fórmula general I unido pueden presentar la configuración S. Por ejemplo, también todos los centros asimétricos de un compuesto de la fórmula general I puede presentar la configuración R y todos los centros asimétricos del segundo compuesto de la fórmula general I unido pueden presentar la configuración R.

- 35 El enlazador sirve, en particular, para ajustar la distancia entre dos compuestos de la fórmula general I de modo que entre los dos compuestos de la fórmula general I con enlazador y ARN o ADN de una sola cadena o bien ADN de doble cadena puede tener lugar una interacción mutua a través de las nucleobases respectivas.

- 40 En calidad de enlazadores se adecuan todas las moléculas de enlazador conocidas y empleadas o bien empleables para este fin. Por ejemplo, un enlazador de este tipo puede ser una cadena de alquilo eventualmente sustituida, un péptido, un oligonucleótido o un oligómero que esté constituido por al menos tres unidades ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (unidades egl).

- 45 El número y la secuencia de los radicales R^1 que están sustituidos con una función éster de ácido fosfónico o bien ácido fosfónico, puede elegirse libremente conforme a la invención. Así, por ejemplo, cada uno, cada segundo, cada tercero, cada cuarto, cada quinto, cada sexto, cada séptimo, cada octavo, cada noveno o cada décimo radical R^1 puede estar sustituido con una función éster de ácido fosfónico o bien ácido fosfónico. Las sustituciones con las funciones éster de ácido fosfónico o bien ácido fosfónico pueden ser regulares o pueden presentarse en posiciones arbitrarias.

Además, también pueden estar sustituidos varios radicales R¹ consecutivamente con una función éster de ácido fosfónico o bien ácido fosfónico (disposición contigua). En este caso, en el compuesto de la fórmula general I pueden estar contenidas también varias de estas disposiciones contiguas.

5 Sin embargo, también sólo radicales R¹ individuales pueden estar sustituidos en posiciones arbitrarias con una función éster de ácido fosfónico o bien la función ácido fosfónico.

Las posiciones con los radicales R¹ individuales, consecutivos, que están sustituidos con una función éster de ácido fosfónico o bien la función ácido fosfónico pueden ser arbitrarias.

En el documento EP 1157031 se describen compuestos que están sustituidos con funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico y, con ello, presentan una buena accesibilidad a la célula.

10 A diferencia de los compuestos descritos en el documento EP 1157031, los compuestos de acuerdo con la invención, descritos en esta memoria, están sustituidos adicionalmente con al menos un radical monohidroxi-mononitro-fenilo o un radical monohidroxi-dinitro-fenilo.

15 En el caso de estos compuestos de acuerdo con la invención, los autores de la misma han comprobado una localización sorprendente y selectiva tanto en como también dentro de mitocondrias en el interior de células vivas. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden desplegar, después de su localización selectiva, tanto en como también dentro de mitocondrias, su actividad mediante un efecto anti-sentido o anti-genómico sorprendentemente fuerte en el interior de las mitocondrias.

20 Para determinar la localización tanto en como también dentro de mitocondrias, compuestos de acuerdo con la invención fueron marcados con el colorante de fluorescencia biotina, con el fin de poder detectar a éstos en experimentos de accesibilidad celular con un microscopio confocal en virtud de la fluorescencia verde en el interior de las células. Para la tinción de las mitocondrias se utilizó "MitoTracker" adquirible en el comercio, con ayuda de los cuales se pueden reconocer las mitocondrias con el microscopio confocal en base a la fluorescencia roja. Al mismo tiempo, el núcleo celular se identificó mediante tinción "DAPI" con ayuda de su fluorescencia azul. Las células se incubaron durante 24 horas con una disolución 10 µM de los compuestos de acuerdo con la invención y marcados con biotina, y después se analizaron con el microscopio confocal. En este caso, se midieron diferentes barridos lineales a través de las células.

Los análisis de los barridos lineales en las Figuras 1-4 a través de las células HeLa o bien células 143B parentales, muestran las intensidades de señal de los compuestos de la fórmula general I, de las mitocondrias y del núcleo celular.

30 En las intensidades de señal paralelas de los compuestos de la fórmula general I de acuerdo con la invención con un radical monohidroxi-mononitro-fenilo (Figs. 1-2) o bien un radical monohidroxi-dinitro-fenilo (Figs. 3-4) y de las mitocondrias, se puede reconocer claramente la localización selectiva de los compuestos de la fórmula general I, tanto en como también dentro de las mitocondrias. Por lo contrario, en el núcleo celular no se pueden reconocer compuestos de acuerdo con la invención alguno. Los compuestos de acuerdo con la invención muestran en este caso una selectividad equiparable en relación con la localización tanto en como también dentro de mitocondrias al reactivo de tinción de mitocondrias "MitoTracker" adquirible en el comercio.

35 Los compuestos de acuerdo con la invención muestran un efecto anti-sentido y anti-genómico asimismo sorprendentemente fuerte dentro de las mitocondrias. Un compuesto de acuerdo con la invención dirigido contra la expresión de la proteína mitocondrial COX1 reduce en células HeLa, a una concentración de 10 µM, el nivel de proteínas de COX1 después de 3 días hasta el 71% y después de 9 días hasta el 20%, en comparación con células HeLa no tratadas. Junto a un efecto dependiente del tiempo se puede observar también un efecto dependiente de la concentración. Así, por ejemplo, después de 9 días el nivel de proteínas de COX1 a una concentración de 2,5 µM se ha reducido a 55%, y a 500 nM todavía a 80%.

40 También el número de copias de ADN mitocondrial en las células HeLa se reduce asimismo de manera dependiente del tiempo y de la concentración mediante el tratamiento con los compuestos de acuerdo con la invención (con secuencia anti-COX1).

45 Mientras que a una concentración de 10 µM al cabo de 3 días todavía no se puede comprobar efecto alguno, al cabo de 6 días se puede observar una reducción del ADNmt hasta el 81%, y después de 9 días hasta el 62%. Estos valores se encuentran en comparación con células HeLa no tratadas o bien en comparación con células HeLa que fueron tratadas con un compuesto de acuerdo con la invención que no posee secuencia complementaria alguna al ADNmt (control negativo).

En el caso de las células HeLa que fueron tratadas con los compuestos de acuerdo con la invención (con secuencia anti-COX1) con diferentes concentraciones, por ejemplo las copias de ADNmt se reducen después de 9 días a 10 μM hasta el 62%, a 2,5 μM hasta el 82% y a 500 nM hasta el 83%.

5 Los compuestos de acuerdo con la invención son, con ello, claramente superiores a los ácidos nucleicos peptídicos acoplados con un radical trifenil-fosfonio, conocidos (A. Muratovska, R. N. Lightowlers, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, R. A. J. Smith, J. A. Wilce, S. W. Martin, M. P. Murphy, *Nucleic Acid Research*, **2001**, Vol. 29, N° 9, 1852-1863). Las moléculas allí descritas muestran una unión al ADN mitocondrial sólo en sistemas exentos de células. Además de
10 ello, estas moléculas están ciertamente en condiciones de atravesar la membrana celular externa de una célula y de agregarse a mitocondrias, pero entonces no muestran actividad alguna en las mitocondrias en el interior de las células tal como, por ejemplo, un efecto anti-sentido o anti-genómico.

Compuestos de la fórmula general I que no portan radical monohidroxi-mononitro-fenilo o radical monohidroxi-dinitro-fenilo alguno en los sustituyentes K, L o R¹, se reparten uniformemente dentro de células o se agregan a otros
15 compartimientos de la célula que no sean las mitocondrias. Sorprendentemente, la sustitución de los compuestos de la fórmula general I con un radical monohidroxi-mononitro-fenilo o un radical monohidroxi-dinitro-fenilo conduce por sí sola a una localización selectiva de estas sustancias activas mitocondriales tanto en como también dentro de mitocondrias.

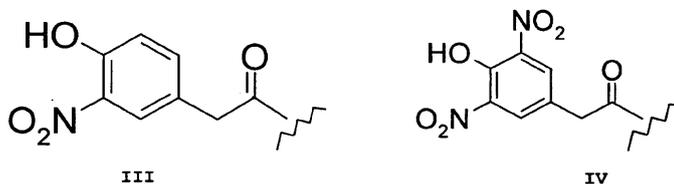
Compuestos de la presente invención que se localizan selectivamente tanto en como también dentro de
20 mitocondrias en el interior de células por el acoplamiento covalente con un radical monohidroxi-mononitro-fenilo o un radical monohidroxi-dinitro-fenilo, con el fin de poder desplegar a continuación su actividad en o dentro de mitocondrias pueden acceder al interior de la célula con o sin ayuda de reactivos de transfección en el caso de una concentración extracelular inferior a 50 μM a través de la membrana celular externa.

Los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados, con ello, para el tratamiento de enfermedades
25 mitocondriales así como para fines diagnósticos relacionados con mitocondrias. Éstos son, por ejemplo, enfermedades hereditarias, cáncer, Parkinson o diabetes. Compuestos de acuerdo con la invención pueden emplearse también como sustancias activas anti-envejecimiento.

También es objeto de la presente invención el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para la
30 producción de medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades. Por lo general, compuestos de acuerdo con la invención son administrados utilizando modos conocidos y aceptables, ya sea individualmente o en combinación con otro agente terapéutico arbitrario. La administración puede tener lugar, p. ej., por una de las siguientes vías: oral, p. ej. en forma de grageas, comprimidos revestidos, píldoras, sustancias semi-sólidas, cápsulas blandas o duras, disoluciones, emulsiones o suspensiones; parenteral, p. ej. como disolución inyectable; rectal como
35 supositorio; mediante inhalación, p. ej. como formulación en polvo o spray, transdermal o intranasal. Para la producción de comprimidos, píldoras, sustancias semi-sólidas, comprimidos revestidos, grageas y cápsulas de gelatina dura de este tipo, el producto terapéuticamente utilizable puede mezclarse con sustancias portadoras de medicamento inorgánicas u orgánicas, farmacológicamente inertes, p. ej., con lactosa, sacarosa, glucosa, gelatina, malta, gel de sílice, almidón o derivados de los mismos, talco, ácido esteárico o sus sales, leche desnatada seca y similares. Para la producción de cápsulas blandas pueden emplearse sustancias de soporte medicamentosas tales como, p. ej., aceites vegetales, petróleo, aceites animales o sintéticos, ceras, grasas, polioles. Para la preparación
40 de disoluciones líquidas y jarabes pueden utilizarse sustancias de soporte medicamentosas tales como, p. ej., agua, alcoholes, disolución salina acuosa, dextrosa acuosa, polioles, glicerol, aceites vegetales, petróleo, aceites animales o sintéticos. Para supositorios pueden utilizarse sustancias de soporte medicamentosas tales como, p. ej., aceites vegetales, petróleo, aceites animales o sintéticos, ceras, grasas y polioles. Para formulaciones de aerosol pueden emplearse gases comprimidos que son adecuados para este fin tales como, p. ej., oxígeno, nitrógeno, hidrocarburos fluoroclorados, hidrocarburos fluorados, hidrocarburos clorados y dióxido de carbono. Los agentes
45 farmacéuticamente utilizables pueden contener también aditivos para la conservación, estabilización, emulsionantes, edulcorantes, sustancias aromatizantes, sales para modificar la presión osmótica, tampones, aditivos para el revestimiento y antioxidantes.

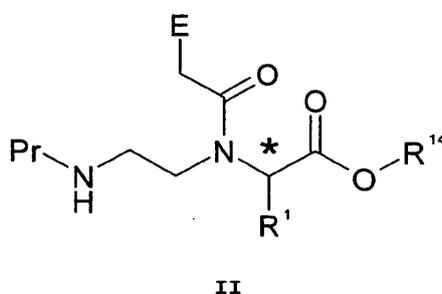
Los compuestos de la fórmula general I de acuerdo con la invención se pueden preparar, por ejemplo, mediante
50 procedimientos descritos en la bibliografía, mediante reacción de compuestos de la fórmula general II de manera en sí conocida (p. ej. L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K.H. Petersen, H.F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P.E. Nielsen, J. Coull, R.H. Berg, *J. Pept. Sci.*, **3**, **1995**, 175-183. T. Koch, H.F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H.G. Batz, K. Otteson, H. Örum, *J. Pept. Res.* **49**, **1997**, 80-88, F. Bergmann, W. Bannwarth, S. Tam, *Tetrahedron Lett.* **36**, **1995**, 6823-6826).

La introducción de radicales monohidroxi-mononitro-fenilo o radicales monohidroxi-dinitro-fenilo como sustituyente en los compuestos de acuerdo con la invención puede tener lugar, por ejemplo, a través del acoplamiento de los compuestos de la fórmula general III o IV a una función amina en los radicales K, L o R¹.



- 5 En lo que sigue, el compuesto de la fórmula general III se abrevia como MMPA (“mononitro-hidroxi-fenil-acetato”), el compuesto de la fórmula general IV como DNPA (“dinitro-hidroxi-fenil-acetato”).

En los compuestos de la fórmula general II



el radical R¹⁴ es, p. ej., un átomo de H, o un radical alilo, bencilo, etilo, metilo o un polímero soluble o insoluble.

- 10 Pr es un átomo de H o un grupo protector de amina disociable. El grupo protector de amina debe ser selectivamente disociable en presencia de grupos protectores de nucleobases. Preferiblemente, Pr es un átomo de H, un grupo protector de oxocarbamato o un grupo protector de tiocarbamato, lo más preferiblemente Pr es un átomo de H o un grupo protector de Fmoc, Boc, Cbz, Mmt o un grupo protector de Bhoc.

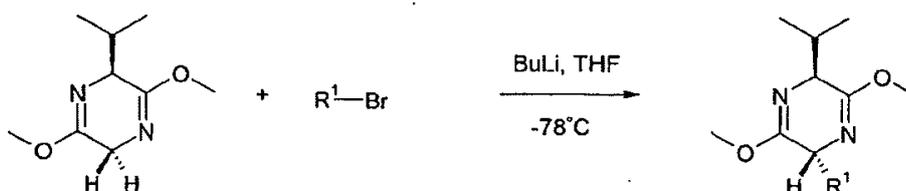
E y el radical R¹ están definidos como arriba.

- 15 El centro asimétrico (*) al que se une el radical R¹ puede presentar la configuración R o S.

Los compuestos de la fórmula general II pueden prepararse, por ejemplo, según el siguiente procedimiento.

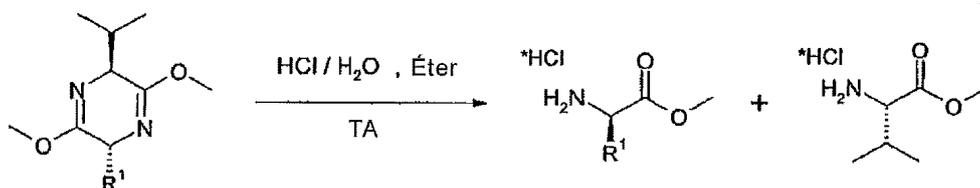
Preparación de los compuestos de la fórmula general II con configuración R en el centro asimétrico:

Etapa de reacción 1:



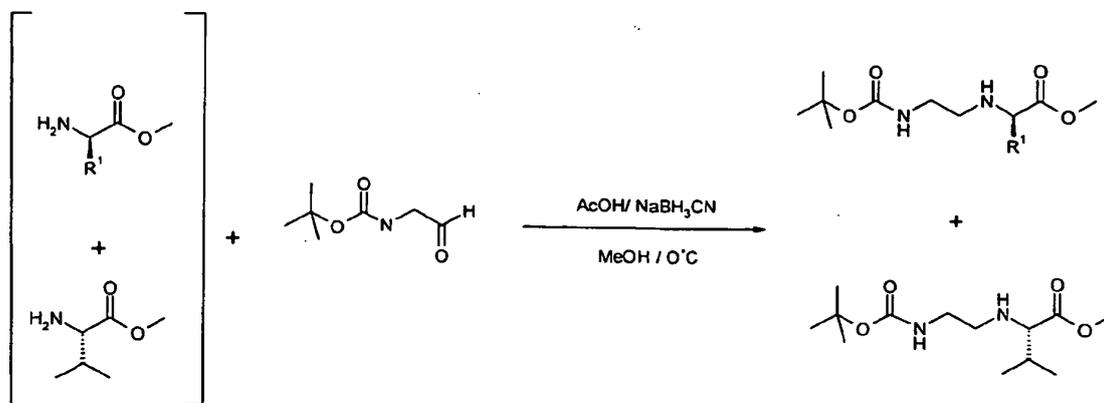
- 20 Partiendo de la configuración S del precursor de pirazina, la realización puede tener lugar, por ejemplo, tal como se describe en la bibliografía (U. Schöllkopf, U. Busse, R. Lonsky, R. Hinrichs, Liebigs Ann. Chem. **1986**, 2150-2163; A. Schick, T. Kolter, A. Giannis, K. Sandhoff, Tetrahedron **51**, **1995**, 11207-11218).

Etapa de reacción 2:



La realización puede tener lugar, por ejemplo, tal como se describe en la bibliografía (U. Schöllkopf, U. Busse, R. Lonsky, R. Hinrichs, Liebigs Ann. Chem. **1986**, 2150-2163).

5 Etapa de reacción 3:

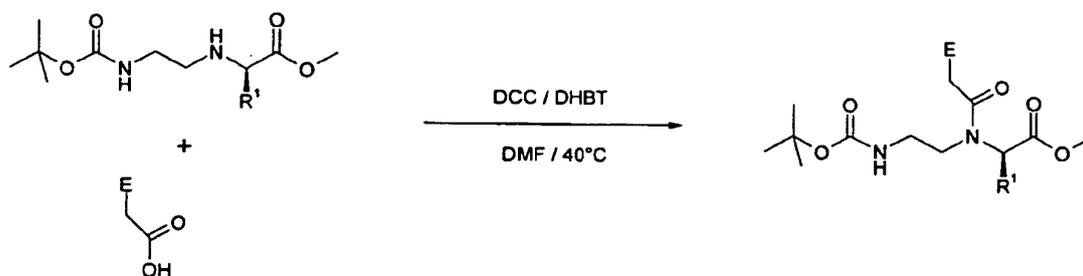


La mezcla de productos de la etapa de reacción 2 puede emplearse, después de la liberación de las aminas a partir de sus hidrocloruros por una base (p. ej. NaHCO₃, NH₃), en la reacción consecutiva. Esta aminación reductora puede llevarse a cabo tal como se describe en la bibliografía (G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P.E. Nielsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, **1996**, N° 17, 1939-1942).

10

En lugar de cianoborohidruro de sodio pueden utilizarse también otros agentes reductores tales como, p. ej., hidrógeno y un catalizador (p. ej. Pd/C). Los productos de la reacción se separan por cromatografía.

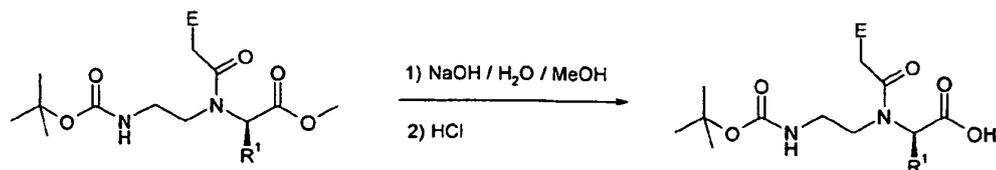
Etapa de reacción 4:



15 La realización puede describirse, por ejemplo, como en la bibliografía (G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P.E. Nielsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, **1996**, N° 17, 1939-1942). En este caso, también pueden emplearse otros reactivos de acoplamiento en lugar de DCC/DHBT.

La preparación del compuesto E-CH₂-COOH (por ejemplo C(PG)-CH₂-COOH, A(PG)-CH₂-COOH, G(PG)-CH₂-COOH o T-CH₂-COOH, J(PG)-CH₂-COOH, en donde A = adenililo, C = citosinilo, G = guaninilo, T = timinilo, J = pseudocitosinilo, PG = grupo protector tal como, por ejemplo, benciloxicarbonilo (Z), bencilo (Bzl), acetilo (Ac) o anisoiilo (An)) puede tener lugar, por ejemplo, tal como se describe en la bibliografía (S.A. Thomson, J.A. Josey, R. Cadilla, M.D. Gaul, F.C. Hassmann, M.J. Lazzio, A.J. Pipe, K.L. Reed, D.J. Ricca, R.W. Wiether, S.A. Noble, *Tetrahedron* 51, **1995**, 6179-6194). Otros grupos protectores posibles se describen asimismo en la bibliografía (G. Breitpohl, D.W. Will, A. Peymann, E. Uhlmann, *Tetrahedron* 53, 1997, 14671-14686; T. Kofoed, H.F. Hansen, H. Orum, T. Koch. *J. Peptide Sci.*, 7, 2001, 402-412).

Etapa de reacción 5:



La realización puede tener lugar, por ejemplo, tal como se describe en la bibliografía (G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, P.E. Nielsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, **1996**, N° 17, 1939-1942).

Para una descripción más sencilla de los compuestos de la fórmula general II, que resultan como productos en la etapa de reacción 5, se utilizan las siguientes abreviaturas:

Por ejemplo, si A(PG)-CH₂-COOH se emplea en la etapa de reacción, entonces se obtiene el correspondiente compuesto de la fórmula general II que presenta un centro asimétrico. Este compuesto se abrevia aquí en general como A^R(PG). En este caso, A representa la nucleobase en el compuesto de la fórmula general II con un centro asimétrico, el superíndice R representa la configuración R del compuesto y PG representa el grupo protector en la nucleobase.

Por ejemplo, si en la etapa de reacción 5 se emplea ácido fenilacético, entonces se obtiene un compuesto de la fórmula general II con un centro asimétrico que se abrevia como P^R.

Los compuestos de la fórmula general II correspondientes sin centro asimétrico (R¹ = H) se abrevian análogamente a los compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico, con la diferencia de que en lugar de la letra mayúscula para la nucleobase y de la letra en superíndice para la configuración (p. ej. A^R) se utiliza la letra minúscula a correspondiente. Por ejemplo, un compuesto de la fórmula general II sin centro asimétrico con C protegido con PG como nucleobase se abrevia como c(PG).

Para la preparación de los compuestos de la fórmula general II con configuración S en el centro asimétrico se emplea en la etapa de reacción 1, el precursor de pirazina con la configuración R y las etapas de reacción 1 a 5 se llevan a cabo de manera análoga. Entonces se obtiene, por ejemplo, un compuesto de la fórmula general II con la abreviatura A^S(PG).

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar de manera en si conocida, por ejemplo mediante síntesis en fase sólida por reacción de compuestos de la fórmula general II. Según la síntesis en fase sólida, los grupos protectores se disocian en las nucleobases de manera que se obtienen compuestos de la fórmula general I, que se abrevian como sigue:

Por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la invención que se preparó solamente a partir de compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico con configuración R y que se acopla en la última etapa con MNPA-OH y que después se disoció de la resina en forma de amida primaria, se abrevia como MNPA-A^RC^RG^RG^RT^RC^RG^RG^RC^RG^RA^RA^RC^RA^RT^R-NH₂.

Por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la invención que se preparó a partir de compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico con configuración R y compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico y que en la última etapa se acopló con MNPA-OH y después se disoció de la resina en forma de amida primaria, se abrevia como MNPA-A^Rc^RG^RT^Rc^RG^Rg^RA^Ra^Rc^Ra^RT^R-NH₂.

Por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la invención que se preparó solamente a partir de compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico con configuración S y que se acopla en la última etapa MNPA-OH y que después se disoció de la resina en forma de amida primaria, se abrevia como MNPA-A^SC^SG^SG^ST^SC^SG^SG^SC^SG^SG^SA^SA^SC^SA^ST^S-NH₂.

- 5 Por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la invención que se preparó solamente a partir de compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico con configuración S y compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico y que en la última etapa se acopló con DNPA y después se disoció de la resina en forma de amida primaria, se abrevia como DNPA-A^SC^SG^ST^SC^SG^SG^SC^SG^SA^Sa^ST^S-NH₂.

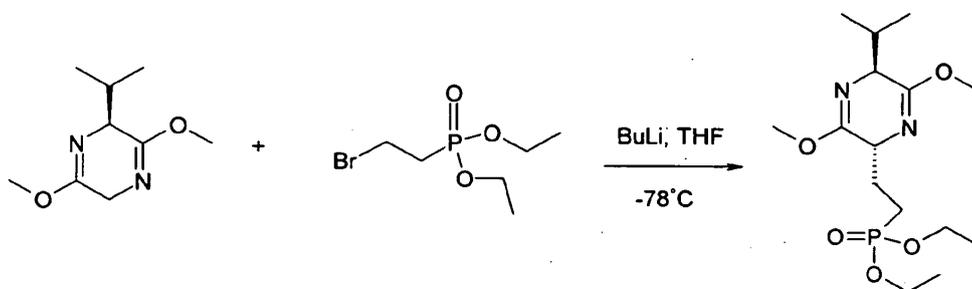
- 10 Por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la invención que se preparó en una resina Boc-Gly-PAM-MBHA solamente a partir de compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico con configuración R y compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico y que en la última etapa se acopló con DNPA y después se disoció de la resina en forma de amida primaria, se abrevia como DNPA-tG^RcC^RtA^Rggactc^RcA^RgC^R-Gly-NH₂.

- 15 Por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la invención que se preparó en una resina Boc-Gly-PAM-MBHA solamente a partir de compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico con configuración R y compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico, glicina, así como dos aminoácidos tales como ácido 4-(dietoxi-fosforil)-2-(terc.-butoxicarbonilamino)-butírico (Boc-DEPABS) y que en la última etapa se acopló con DNPA y después se disoció de la resina en forma de amida primaria, se abrevia como DNPA-(DEPABS)₂-Gly-tG^RcC^RtA^Rggactc^RcA^RgC^R-Gly-NH₂.

- 20 Por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la invención que se preparó en una resina Boc-Gly-PAM-MBHA a partir de compuestos de la fórmula general II con un centro asimétrico con configuración R y compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico, el quelante éster tri-terc.-butílico del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), y que en la última etapa se acopló con DNPA y después se disoció de la resina en forma de amida primaria, se abrevia como DNPA-DOTA-gG^RcT^RcG^RaA^RtA^RaG^RaG^RgG^R-Gly-NH₂.

Ejemplos

- 25 **Ejemplo 1: Preparación de (2R,5S)-2-(2-(dietoxi-fosforil)etil)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-isopropil-pirazina**



- 30 0,52 mol de (S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-2-isopropilpirazina se disuelven en 400 ml de THF absoluto bajo argón y se enfrían hasta -78°C. Bajo agitación, se añaden lentamente gota a gota 200 ml de una disolución de butil-litio 2,7 M (en heptano) (0,54 mol). A continuación, se añade gota a gota, lentamente y bajo agitación, una disolución de 0,52 mol de dietil-(2-bromoetil)-fosfonato en 300 ml de THF absoluto, y se continúa agitando durante 3 h a -78°C. Después se añaden lentamente 11,7 ml (aprox. 0,2 ml) de ácido acético anhidro. Después se deja calentar lentamente hasta la temperatura ambiente la mezcla de reacción. El disolvente se retira, el residuo se recoge en 600 ml de dietiléter y se lava con 200 ml de agua. La fase acuosa se extrae todavía 3 veces con sendos 100 ml de dietiléter. Las fases etéreas reunidas se secan sobre MgSO₄, se filtran y el disolvente se separa en vacío. El residuo se recoge en Et₂O/hexano (1/10) y se filtra a través de un lecho de gel de sílice. Después, el precursor que no ha reaccionado se eluye con Et₂O/hexano (1/5). Finalmente, el producto se eluye entonces con acetato de etilo.

Rendimiento: aprox. 70%, líquido amarillo

¹H-RMN (CDCl₃): 0,71, 1,04 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1,33 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂), 1,68-2,25 (m, 4H, CHCH₂CH₂P), 3,65, 3,67 (s, 6H, OCH₃), 4,02 (m, 1H), 4,10-4,20 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂).

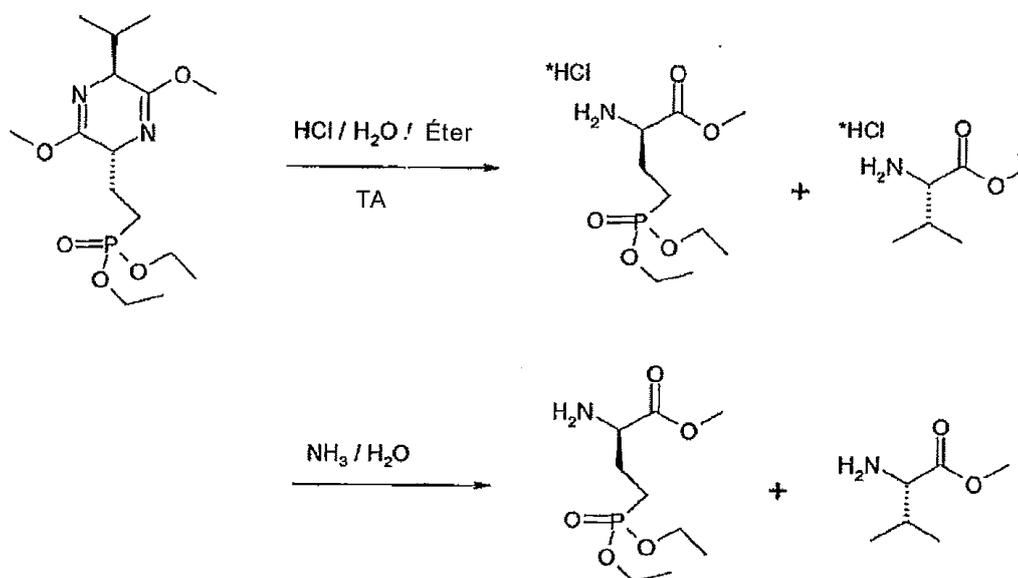
- 40 **Ejemplo 2: Preparación de (2R,5S)-2-(8-(dibenciloxi-fosforil)octil)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-isopropil-pirazina**

Análogamente al procedimiento de preparación en el Ejemplo 1, se prepara, partiendo de (S)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-2-isopropilpirazina y dibencil-(8-bromooctil)-fosfonato, (2R,5S)-2-(8-(dibenciloxi-fosforil)octil)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-isopropil-pirazina,

5 **Ejemplo 3: Preparación de (2S,5R)-2-(4-(diciclohexiloxi-fosforil)but-2-enil)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-isopropil-pirazina**

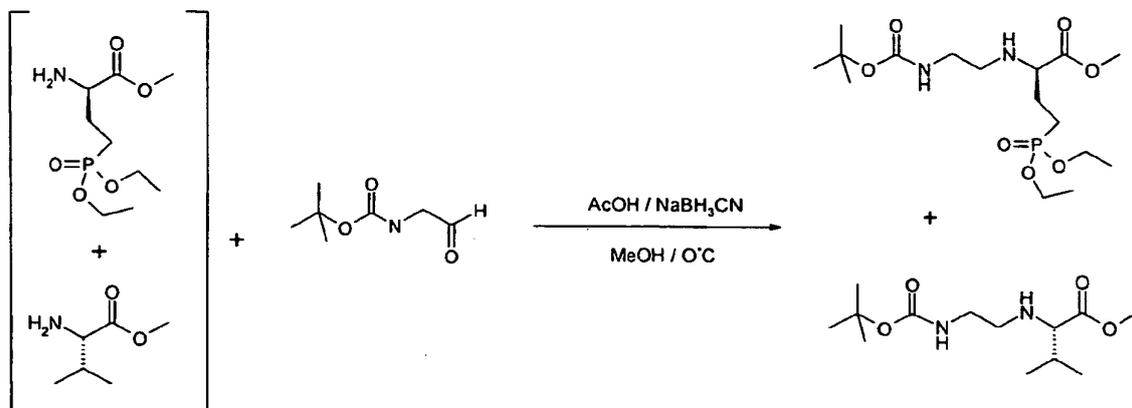
Análogamente al procedimiento de preparación en el Ejemplo 1, se prepara, partiendo de (R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-2-isopropilpirazina y dicitlohexil-(4-bromo-but-2-enil)-fosfonato, (2S,5R)-2-(4-(dicitlohexiloxi-fosforil)but-2-enil)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-isopropil-pirazina.

10 **Ejemplo 4: Preparación de éster metílico del ácido (2R)-2-[2-(terc.-butoxicarbonilamino)etil]-amino-4-(dietoxi-fosforil)-butírico**



15 0,38 mol de (2R,5S)-2-(2-(dietoxi-fosforil)etil)-2,5-dihidro-3,5-dimetoxi-5-isopropil-pirazina se disuelven en 400 ml de dietiléter. A esta disolución se añaden 1150 ml de una disolución acuosa de HCl 1 N. Al cabo de 60 min, la reacción ha finalizado y el éter se separa. Si el producto se ha de almacenar, el agua se separa en vacío también por completo.

20 Si el producto se ha hacer reaccionar inmediatamente después, el agua se separa por centrifugación aproximadamente hasta la mitad y luego el valor del pH de la mezcla de reacción se ajusta a 8-9 con disolución amoniacal. La disolución de carácter básico se extrae 6 veces con diclorometano, controlándose y, en caso necesario, corrigiéndose cada vez el valor del pH. Las fases en diclorometano se reúnen, se secan con MgSO₄ y el disolvente se separa en vacío. El aceite amarillo resultante se emplea inmediatamente en la reacción consecutiva, la aminación reductora.



El aceite amarillo (se supone una conversión completa) se recoge en 600 ml de metanol y se enfría hasta 0°C. A continuación, se añaden 0,76 mol de N-Boc-aminoacetaldehído. Después de agitar a 0°C durante 30 min, se añaden primero 0,90 mol de ácido acético anhidro y luego 0,40 ml de cianoborohidruro de sodio. La mezcla de reacción se agita a 0°C hasta que haya finalizado el desprendimiento de gas y después el disolvente se separa en el evaporador rotatorio. El residuo se recoge en éster etílico del ácido acético (aprox. 600 ml) y se lava una vez con disolución saturada de NaHCO₃ (aprox. 200 ml) y una vez con disolución saturada de NaCl (aprox. 100 ml). La fase orgánica se seca con MgSO₄ y se filtra. A continuación, el disolvente se separa en vacío. La purificación ulterior tiene lugar mediante SPE a través de una frita de vidrio cargada con gel de sílice. Las impurezas y los productos indeseados se eluyen primeramente con hexano/acetato de etilo 1:1 y luego con acetato de etilo puro. El producto deseado se obtiene finalmente mediante extracción con metanol al 10% en diclorometano.

Después de la separación del disolvente, se obtiene aprox. 75% de producto en forma de un aceite viscoso amarillo.

¹H-RMN (CDCl₃): 1,35 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂), 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,8-2,0 (m, 4H, CHCH₂CH₂P), 2,5-2,6, 2,75-2,85, 3,0-3,4 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 4,0-4,2 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂).

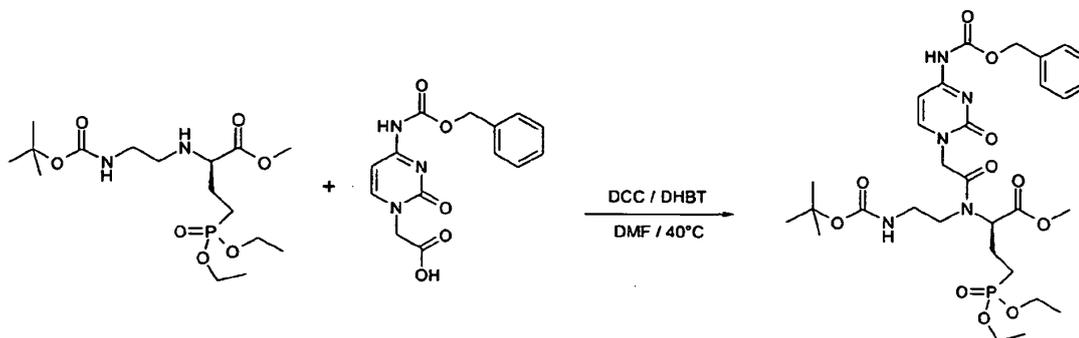
Ejemplo 5: Preparación de éster metílico del ácido (2R)-2-[2-(terc.-butoxicarbonilamino)etil]-amino-10-(dibenciloxi-fosforil)-decanoico

Análogamente al procedimiento de preparación en el Ejemplo 4, se prepara, partiendo de (2R,5S)-2-(8-(dibenciloxi-fosforil)octil)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-isopropil-pirazina, éster metílico del ácido (2R)-2-[2-(terc.-butoxicarbonilamino)etil]-amino-10-(dibenciloxi-fosforil)-decanoico.

Ejemplo 6: Preparación de éster metílico del ácido (2S)-2-[2-(terc.-butoxicarbonilamino)etil]-amino-6-(diciclohexiloxi-fosforil)-hex-4-enoico

Análogamente al procedimiento de preparación en el Ejemplo 4, se prepara, partiendo de (2S,5R)-2-(4-(diciclohexiloxi-fosforil)but-2-enil)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-5-isopropil-pirazina, éster metílico del ácido (2S)-2-[2-(terc.-butoxicarbonilamino)etil]-amino-6-(diciclohexiloxi-fosforil)-hex-4-enoico.

Ejemplo 7: Preparación de éster metílico del ácido (R)-2-[[2-(N4-bencilxycarbonilcitosin-1-il)-acetil]-[2-terc.-butoxicarbonilamino-etil]-amino)-4-(dietoxi-fosforil)-butírico



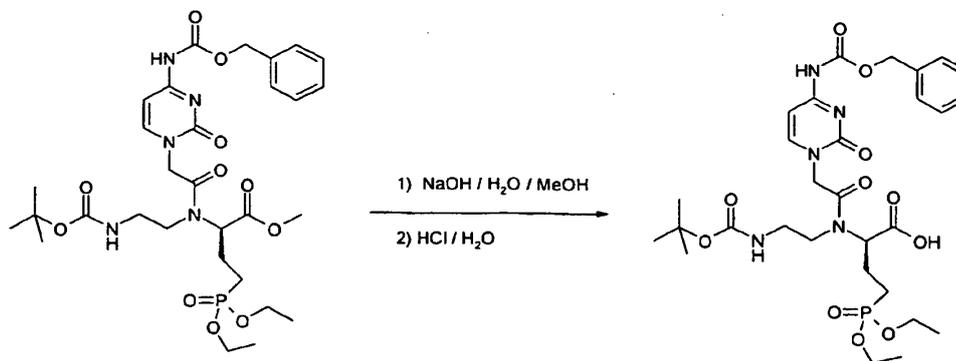
5 A una disolución agitada a base de 30,96 mmol de ácido 4-N-(benciloxycarbonil)-citosin-1-il-acético y 30,96 mol de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (DHBT-OH) en 100 ml de DMF absoluta se añaden 32,51 mmol de DCC, y esta disolución se agita durante 1 h a 40°C. A continuación, se añaden 23,84 mmol de éster metílico del ácido (2R)-2-[2-(terc.-butoxicarbonilamino)etil]-amino-4-(dietoxi-fosforil)-butírico y se agita a 40°. La reacción se vigila con HPLC y ha finalizado al cabo de 3 días.

10 Se separa por filtración del material no disuelto, y el disolvente se separa en vacío. El residuo se recoge en diclorometano y se coloca en el refrigerador a lo largo de una noche. En este caso, precipita dicitohexilurea adicional, la cual se separa por filtración. El filtrado se lava 2-3 veces con disolución diluida de NaHCO₃ (1/3 de disolución saturada de NaHCO₃, 2/3 de agua), 1-2 veces con disolución diluida de KHSO₄ (1/3 de disolución saturada de KHSO₄, 2/3 de agua), se seca con MgSO₄ y se concentra por evaporación rotatoria. La purificación adicional tiene lugar mediante disolución en acetato de etilo y almacenamiento durante una noche en el refrigerador, tras lo cual se separa por filtración dicitohexilurea adicional, eventualmente precipitada, y el disolvente se separa de nuevo. El producto bruto se disuelve entonces en diclorometano (5 mL por cada 3 g de producto bruto) y se precipita de nuevo con dietiléter (25 mL por cada 3 g de producto bruto) y hexano (5 mL por cada 3 g de producto bruto). Se separa el disolvente con impurezas y el producto se seca en vacío.

Rendimiento: aprox. 65% de un sólido amarillo claro

20 ¹H-RMN (CDCl₃): 1,32 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂), 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,75-2,45 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 3,2-3,85 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 4,07 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,28 (m, 1H, NCHC(O)); 4,42/4,99 (2d, 2H, NCH₂C(O)); 5,22 (s, 2H, OCH₂Ph); 5,56 (t, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,25 (d, 1H, CCH=CHN); 7,38 (s, 5H, Ph); 7,55 (d, 1H, CCH=CHN).

Ejemplo 8: Preparación de ácido (R)-2-([2-{N4-benciloxycarbonilamino-citosin-1-il}-acetil]-[2-terc.-butoxicarbonilamino-etil]-amino)-4-(dietoxi-fosforil)-butírico



25 19,1 mmol de éster metílico del ácido (R)-2-([2-{N4-benciloxycarbonilamino-citosin-1-il}-acetil]-[2-terc.-butoxicarbonilamino-etil]-amino)-4-(dietoxi-fosforil)-butírico se disuelven en 80 ml de THF/agua (2/3) y se enfría hasta 0°C. A ello se añaden gota a gota 48 ml de una disolución de hidróxido de litio 1 M (pH ~ 9). El progreso de la reacción se vigila con DC (metanol al 10% en diclorometano). Después de finalizada la reacción, la disolución de reacción se diluye con 130 ml de agua / disolución de NaCl y se extrae una vez con diclorometano (200 ml). La fase acuosa se ajusta a pH 2-3 con disolución de KHSO₄ 2 M y se extrae varias veces con diclorometano. En este caso, se controla una y

30

otra vez el valor del pH y en caso necesario, se corrige. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO₄ y el disolvente se separa en vacío. En caso necesario, el producto bruto puede precipitarse con dietiléter a partir de diclorometano. Finalmente, el producto se seca en el liofilizador.

Rendimiento. aprox. 80% de un sólido blanco amarillento

- 5 ¹H-RMN (CDCl₃): 1,21 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,70-2,30 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 2,90-3,60 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,93-4,02 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,25 (m, 1H, NCHC(O)); 4,50-4,83 (m, 2H, NCH₂C(O)); 5,19 (s, 2H, OCH₂Ph); 6,88 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,02 (d, 1H, CCH=CHN); 7,31-7,41 (m, 5H, Ph); 7,97 (d, 1H, CCH=CHN).

Ejemplo 9: Preparación de compuestos adicionales de la fórmula general II

- 10 Mediante síntesis análogas tal como se describen en los Ejemplos 7 y 8 en las que, junto a C(Z)-CH₂-COOH, se emplean otros componentes de nucleobases-ácido acético protegidos con Z, protegidos con bencilo (Bzl), protegidos con anisoiolo (An) o bien protegidos con acetilo (Ac) y no protegidos A(Z)-CH₂-COOH, A(An)-CH₂-COOH, A(Bzl)-CH₂-COOH, G(Z)-CH₂-COOH, G(Ac)-CH₂-COOH, C(An)-CH₂-COOH, C(Bzl)-CH₂-COOH, J(Z)-CH₂-COOH, J(Bzl)-CH₂-COOH, J(An)-CH₂-COOH o bien T-CH₂-COOH (A = adeninilo, C = citosinilo, G = guaninilo, T = timinilo, J = pseudoisocitosinilo) así como ácido fenilacético se preparan compuestos adicionales de la fórmula general II de acuerdo con la invención.
- 15

A^R(Z):

- 20 ¹H-RMN (CH₃OH-d₄): 1,20 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,34 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,70-2,30 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 3,00-3,80 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,93-4,02 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,10 (m, 1H, NCHC(O)); 5,18 (s, 2H, OCH₂Ph); 5,20-5,40 (m, 2H, NCH₂C(O)); 7,15-7,40 (m, 5H, Ph); 8,14 (s, 1H, N=CHN); 8,46 (s, 1H, N=CHN).

A^R(Bzl):

¹H-RMN (DMSO-d₆): 1,21 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,70-2,20 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 2,90-3,75 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,90-4,10 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,22 (m, 1H, NCHC(O)); 5,25-5,45 (m, 2H, NCH₂C(O)); 6,96 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,50-8,10 (m, 5H, Ph); 8,42 (s, 1H, N=CHN); 8,69 (s, 1H, N=CHN).

- 25 A^R(An):

¹H-RMN (DMSO-d₆): 1,21 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,70-2,20 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 2,90-3,750 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 3,90-4,10 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,22 (m, 1H, NCHC(O)); 5,25-5,45 (m, 2H, NCH₂C(O)); 6,96 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,08 (d, 2H, Ph); 8,05 (d, 2H, Ph); 8,42 (s, 1H, N=CHN); 8,69 (s, 1H, N=CHN).

- 30 J^R(Z):

¹H-RMN (DMSO-d₆): 1,32 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,60-2,50 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 3,10-3,55 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,65-3,90 (m, 2H, NCH₂C(O)); 4,00-4,15 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,20 (m, 1H, NCHC(O)); 5,24 (s, 2H, OCH₂Ph); 6,80 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,27 (d, 1H, C=CHN); 7,30-7,50 (m, 5H, Ph).

J^R(An):

- 35 ¹H-RMN (DMSO-d₆): 1,22 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,65-2,25 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 2,80-3,70 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 2,80-3,70 (m, 2H, CCH₂C(O)); 3,84 (s, 3H, OCH₃); 3,90-4,05 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,17 (m, 1H, NCHC(O)); 6,81 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,05 (d, 2H, Ph); 7,70 (s, 1H, N=CHN); 8,07 (d, 2H, Ph).

G^R(Z):

- 40 ¹H-RMN (DMSO-d₆): 1,18 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,37 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,70-2,30 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 2,95-3,70 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,90-4,10 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,20 (m, 1H, NCHC(O)); 4,85-5,20 (m, 2H, NCH₂C(O)); 5,269 (s, 2H, OCH₂Ph); 6,95 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,30-7,50 (m, 5H, Ph); 7,85 (s, 1H, N=CHN).

G^R(Ac):

¹H-RMN (DMSO-d₆): 1,20 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,41 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,70-2,18 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 2,20 (s, 3H, CH₃C(O)); 2,90-3,60 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,90-4,10 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,27 (m, 1H, NCHC(O)); 4,91-5,22 (m, 2H, NCH₂C(O)); 7,00 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,88 (s, 1H, N=CHN).

C^R(Bzl):

- 5 **¹H-RMN** (DMSO-d₆): 1,21 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,40 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,70-2,30 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 3,20-3,60 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,93-4,02 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,28 (m, 1H, NCHC(O)); 4,50-4,83 (m, 2H, NCH₂C(O)); 6,90 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,33 (d, 1H, CCH=CHN); 7,50-7,55 (m, 2H, Ph); 7,62 (d, 1H, CCH=CHN); 8,00-8,10 (m, 3H, Ph).

C^R(An):

- 10 **¹H-RMN** (DMSO-d₆): 1,22 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,65-2,10 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 3,20-3,60 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,84 (s, 3H, OCH₃); 3,85-4,05 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,25 (m, 1H, NCHC(O)); 4,50-4,95 (m, 2H, NCH₂C(O)); 6,90 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,04 (d, 2H, Ph); 7,30 (d, 1H, CCH=CHN); 8,00 (d, 1H, CCH=CHN); 8,03 (d, 2H, Ph).

T^R:

- 15 **¹H-RMN** (DMSO-d₆): 1,22 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,39 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,65-2,20 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 1,75 (s, 3H, C=CCH₃); 2,90-3,50 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,90-4,10 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,18 (m, 1H, NCHC(O)); 4,45-4,65 (m, 2H, NCH₂C(O)); 6,86 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,37 (s, 1H, NCH=C).

P^R:

- 20 **¹H-RMN** (DMSO-d₆): 1,20 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,46-2,30 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 3,00-3,45 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,50-3,75 (m, 2H, CCH₂C(O)); 3,80-4,00 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,22 (m, 1H, NCHC(O)); 7,10-7,30 (m, 5H, Ph).

Ejemplo 10: Preparación de compuestos adicionales de la fórmula general II con configuración S en el centro asimétrico:

- 25 El procedimiento de preparación para los compuestos de la fórmula general II con la configuración R se aplica análogamente para la preparación de los correspondientes compuestos de la fórmula general II con la configuración S. En este caso, en la síntesis descrita en el Ejemplo 1 se emplea como precursor la (R)-2,5-dihidro-3,6-dimetoxi-2-isopropilpirazina, y las síntesis siguientes se llevan a cabo análogamente a como se describe.

Por ejemplo, se preparó:

J^S(Z):

- 30 **¹H-RMN** (DMSO-d₆): 1,32 (t, 6H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 1,42 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,60-2,50 (m, 4H, CHCH₂CH₂P); 3,10-3,55 (m, 4H, NCH₂CH₂N); 3,65-3,90 (m, 2H, NCH₂C(O)); 4,00-4,15 (m, 4H, P(O) (OCH₂CH₃)₂); 4,20 (m, 1H, NCHC(O)); 5,24 (s, 2H, OCH₂Ph); 6,80 (m, ancho, 1H, C(O)NHCH₂); 7,27 (d, 1H, C=CHN); 7,30-7,50 (m, 5H, Ph).

Ejemplo 11: Prescripción de síntesis general para compuestos de acuerdo con la invención con el sustituyente MNPA en el radical K:

- 35 Mediante enlace secuencial de correspondientes compuestos de la fórmula general II con centro asimétrico y/o correspondientes compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico y/o aminoácidos y/o derivados de aminoácidos y/o marcadores de fluorescencia se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida los compuestos de acuerdo con la invención.

En este caso, se utiliza el siguiente protocolo de síntesis:

- 40 Etapa 1: expansión previa durante 3 h de 10 mg de resina (Boc-Gly-PAM-MBHA, 0,54 mmol/g) en diclorometano.

Etapa 2: comienzo del ciclo de síntesis: lavar 4 veces con diclorometano.

Etapa 3: disociación de Boc mediante reacción con TFA/m-cresol (95:5). Tiempo de reacción: 2 veces, en cada caso 3 min.

Etapa 4: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 5: lavar 5 veces con NMP.

- 5 Etapa 6: pre-activación durante 1 min de 4 equivalentes del correspondiente compuesto protegido de la fórmula general II, o bien de un aminoácido correspondientemente protegido con 3,8 equivalentes de HATU y 9 equivalentes de NMM en NMP/piridina (2:1).

Etapa 7: reacción del compuesto protegido activado de la fórmula general II o bien de un aminoácido correspondientemente protegido con la fase sólida (1^{er} acoplamiento; duración: 30 min).

- 10 Etapa 8: lavar 4 veces con NMP.

Etapa 9: lavar 1 vez con diclorometano.

Etapa 10: repetición de las etapas 6 a 8 (2^o acoplamiento).

Etapa 11: verificación de la eficacia del acoplamiento con ninhidrina (ensayo de Kaiser; cuando el ensayo de Kaiser es positivo, se han de repetir las etapas 6 a 8 con el correspondiente compuesto protegido de la fórmula general II).

- 15 Etapa 12: tras un ensayo de Kaiser negativo, terminación de la cadena 2 veces con una disolución a base de Ac₂O/NMP/piridina (1:25:25) en cada caso durante 4 min.

Etapa 13: lavar 5 veces con NMP.

- 20 Etapa 14: repetición del ciclo de síntesis (etapas 2 a 13) hasta el acoplamiento con el último compuesto de la fórmula general II correspondientemente protegido. A continuación, eventual repetición del ciclo de síntesis (etapas 2 a 13) hasta el acoplamiento con el último aminoácido correspondientemente protegido.

Etapa 15: lavar 4 veces con diclorometano.

Etapa 16: disociación de Boc mediante reacción con TFA/m-cresol (95:5). Duración de la reacción: 2 veces, en cada caso 3 min.

Etapa 17: lavar 5 veces con diclorometano.

- 25 Etapa 18: lavar 5 veces con NMP.

Etapa 19: pre-activación durante 1 min de 6 equivalentes de MNPA-OH con 5,7 equivalentes de HATU y 13 equivalentes de NMM en NMP/piridina (2:1).

Etapa 20: reacción de MNPA-OH activado con la fase sólida (duración: 30 min).

Etapa 21: lavar 4 veces con NMP.

- 30 Etapa 22: repetición de las etapas 19 a 21 (2^o acoplamiento).

Etapa 23: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 24: para el secado: lavar 5 veces con dietiléter.

Se obtiene un compuesto de la fórmula general I que está unido a la resina en el extremo C-terminal.

Disociación de la resina del compuesto de acuerdo con la invención:

- 35 La resina se agita con el compuesto de acuerdo con la invención en disolución amoniacal acuosa (NH₃ al 28-30 por ciento en peso en H₂O) a 60°C durante 20 h. La resina disociada se separa a continuación mediante filtración, y el

filtrado se concentra en vacío y se seca. El producto bruto se purifica mediante HPLC preparativa a través de una columna RP-C18 con metanol/agua. Se obtiene el compuesto de acuerdo con la invención en forma de un sólido incoloro en un rendimiento de aprox. el 50%. La masa del compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza con MALDI-TOF.

5 **Ejemplo 12: Prescripción de síntesis general para compuestos de acuerdo con la invención con el sustituyente DNPA en el radical K:**

10 Mediante enlace secuencial de correspondientes compuestos de la fórmula general II con centro asimétrico y/o correspondientes compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico y/o aminoácidos y/o derivados de aminoácidos y/o marcadores de fluorescencia se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida los compuestos de acuerdo con la invención.

En este caso, se utiliza el siguiente protocolo de síntesis:

Etapa 1: expansión previa durante 3 h de 10 mg de resina (Boc-Gly-PAM-MBHA, 0,54 mmol/g) en diclorometano.

Etapa 2: comienzo del ciclo de síntesis: lavar 4 veces con diclorometano.

15 Etapa 3: disociación de Boc mediante reacción con TFA/m-cresol (95:5). Tiempo de reacción: 2 veces, en cada caso 3 min.

Etapa 4: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 5: lavar 5 veces con NMP.

20 Etapa 6: pre-activación durante 1 min de 4 equivalentes del correspondiente compuesto protegido de la fórmula general II, o bien de un aminoácido correspondientemente protegido con 3,8 equivalentes de HATU y 9 equivalentes de NMM en NMP/piridina (2:1).

Etapa 7: reacción del compuesto protegido activado de la fórmula general II o bien de un aminoácido correspondientemente protegido con la fase sólida (1^{er} acoplamiento; duración: 30 min).

Etapa 8: lavar 4 veces con NMP.

Etapa 9: lavar 1 vez con diclorometano.

25 Etapa 10: repetición de las etapas 6 a 8 (2^o acoplamiento).

Etapa 11: verificación de la eficacia del acoplamiento con ninhidrina (ensayo de Kaiser; cuando el ensayo de Kaiser es positivo, se han de repetir las etapas 6 a 8 con el correspondiente compuesto protegido de la fórmula general II).

Etapa 12: tras un ensayo de Kaiser negativo, terminación de la cadena 2 veces con una disolución a base de Ac₂O/NMP/piridina (1:25:25) en cada caso durante 4 min.

30 Etapa 13: lavar 5 veces con NMP.

Etapa 14: repetición del ciclo de síntesis (etapas 2 a 13) hasta el acoplamiento con el último compuesto de la fórmula general II correspondientemente protegido. A continuación, eventual repetición del ciclo de síntesis (etapas 2 a 13) hasta el acoplamiento con el último aminoácido correspondientemente protegido.

Etapa 15: lavar 4 veces con diclorometano.

35 Etapa 16: disociación de Boc mediante reacción con TFA/m-cresol (95:5). Duración de la reacción: 2 veces, en cada caso 3 min.

Etapa 17: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 18: lavar 5 veces con NMP.

Etapa 19: pre-activación durante 1 min de 6 equivalentes de DNPA-OH con 5,7 equivalentes de HATU y 13 equivalentes de NMM en NMP/piridina (2:1).

Etapa 20: reacción de DNPA-OH activado con la fase sólida (duración: 30 min).

Etapa 21: lavar 4 veces con NMP.

5 Etapa 22: repetición de las etapas 19 a 21 (2º acoplamiento).

Etapa 23: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 24: para el secado: lavar 5 veces con dietiléter.

Se obtiene un compuesto de la fórmula general I que está unido a la resina en el extremo C-terminal.

Disociación de la resina del compuesto de acuerdo con la invención:

10 La resina se agita con el compuesto de acuerdo con la invención en disolución amoniacal acuosa (NH₃ al 28-30 por ciento en peso en H₂O) a 60°C durante 20 h. La resina disociada se separa a continuación mediante filtración, y el filtrado se concentra en vacío y se seca. El producto bruto se purifica mediante HPLC preparativa a través de una columna RP-C18 con metanol/agua. Se obtiene el compuesto de acuerdo con la invención en forma de un sólido incoloro en un rendimiento de aprox. el 50%. La masa del compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza con
15 MALDI-TOF.

Ejemplo 13: Prescripción de síntesis general para los compuestos de acuerdo con la invención con enlazador y sustituyente MNPA o bien sustituyente DNPA en el radical K:

20 Mediante enlace secuencial de correspondientes compuestos de la fórmula general II con centro asimétrico y/o de correspondientes compuestos de la fórmula general II sin centro asimétrico y/o aminoácidos y/o derivados de aminoácidos y/o marcadores de fluorescencia, así como monómeros de enlazador se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida los compuestos de acuerdo con la invención.

En este caso, se utiliza el siguiente protocolo de síntesis:

Protocolo de síntesis:

Etapa 1: expansión previa durante 3 h de 10 mg de resina (Boc-Gly-PAM-MBHA, 0,54 mmol/g) en diclorometano.

25 Etapa 2: comienzo del ciclo de síntesis: lavar 4 veces con diclorometano.

Etapa 3: disociación de Boc mediante reacción con TFA/m-cresol (95:5). Tiempo de reacción: 2 veces, en cada caso 3 min.

Etapa 4: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 5: lavar 5 veces con NMP.

30 Etapa 6: pre-activación durante 1 min de 4 equivalentes del correspondiente compuesto protegido de la fórmula general II, o bien de un aminoácido correspondientemente protegido con 3,8 equivalentes de HATU y 9 equivalentes de NMM en NMP/piridina (2:1).

Etapa 7: reacción del correspondiente compuesto protegido de la fórmula general II o bien de un aminoácido correspondientemente protegido con la fase sólida (1^{er} acoplamiento; duración: 30 min).

35 Etapa 8: lavar 4 veces con NMP.

Etapa 9: lavar 1 vez con diclorometano.

Etapa 10: repetición de las etapas 6 a 8 (2º acoplamiento).

Etapa 11: verificación de la eficacia del acoplamiento con ninhidrina (ensayo de Kaiser; cuando el ensayo de Kaiser es positivo, se han de repetir las etapas 6 a 8 con el correspondiente compuesto protegido de la fórmula general II).

Etapa 12: tras un ensayo de Kaiser negativo, terminación de la cadena 2 veces con una disolución a base de Ac₂O/NMP/piridina (1:25:25) en cada caso durante 4 min.

5 Etapa 13: lavar 5 veces con NMP.

Etapa 14: repetición del ciclo de síntesis (etapas 2 a 13) hasta el acoplamiento del enlazador egl (ácido 8-amino-2,6-dioxaoctanoico).

Etapa 15: acoplamiento del enlazador: lavar 4 veces con diclorometano.

10 Etapa 16: disociación de Boc mediante reacción con TFA/m-cresol (95:5). Duración de la reacción: 2 veces, en cada caso 3 min.

Etapa 17: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 18: lavar 5 veces con NMP.

Etapa 19: pre-activación durante 1 min de 4 equivalentes de egl con 3,8 equivalentes de HATU y 9 equivalentes de NMM en NMP/piridina (2:1).

15 Etapa 20: reacción del enlazador activado con la fase sólida (1^{er} acoplamiento; duración: 30 min).

Etapa 21: lavar 4 veces con NMP.

Etapa 22: lavar 1 vez con diclorometano.

Etapa 23: repetición de las etapas 19 a 21 (2^o acoplamiento).

20 Etapa 24: verificación de la eficacia del acoplamiento con ninhidrina (ensayo de Kaiser; cuando el ensayo de Kaiser es positivo, deben repetirse las etapas 19 a 21).

Etapa 25: terminación de la cadena 2 veces con una disolución a base de Ac₂O/NMP/piridina (1:25:25) en cada caso durante 4 min después de un ensayo de Kaiser negativo.

Etapa 26: lavar 5 veces con diclorometano.

Etapa 27: repetir 2 veces el tramo de síntesis (etapas 15 a 26) para (egl)₃.

25 Etapa 28: repetir el ciclo de síntesis (etapas 2 a 13) hasta el acoplamiento con el último compuesto de la fórmula general II correspondientemente protegido. A continuación, eventual repetición del ciclo de síntesis (etapas 2 a 13) hasta el acoplamiento con el último aminoácido correspondientemente protegido. A continuación, realización de las etapas 15-24 del Ejemplo 11 en el caso de acoplamiento de MNPA-OH o bien realización de las etapas 15-24 del Ejemplo 12 en el caso de acoplamiento de DNPA-OH.

30 Se obtiene un compuesto de acuerdo con la invención con enlazador que está unido a la resina en el extremo C-terminal.

Disociación de la resina del compuesto de acuerdo con la invención con enlazador:

35 La resina se agita con el compuesto de acuerdo con la invención con enlazador en disolución amoniacal acuosa (NH₃ al 28-30 por ciento en peso en H₂O) a 60°C durante 20 h. La resina disociada se separa a continuación mediante filtración, y el filtrado se concentra en vacío y se seca. El producto bruto se purifica mediante HPLC preparativa a través de una columna RP-C18 con metanol/agua. Se obtiene el compuesto de acuerdo con la invención con enlazador en forma de un sólido incoloro en un rendimiento del 50%. La masa del compuesto de acuerdo con la invención con enlazador se caracteriza con MALDI-TOF.

Ejemplo 14: Otros ejemplos de secuencias

Mediante la realización de las prescripciones de síntesis generales de los Ejemplos 11 ó 12, se prepararon otros compuestos de acuerdo con la invención:

MNPA-A^RcG^RgT^RcG^RgC^RgA^RaC^RaT^R-Gly-NH₂

5 MNPA-Bio-A^RcG^RgT^RcG^RgC^RgA^RaC^RaT^R-Gly-NH₂ (Bio = lisina, funcionalizada con biotina a través de la función amina de la cadena lateral de lisina)

DNPA-A^RcG^RgT^RcG^RgC^RgA^RaC^RaT^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-A^RcG^RgT^RcG^RgC^RgA^RaC^RaT^R-Gly-NH₂

DNPA-tG^RcC^RtA^RgG^RaC^RtC^RcA^RgC^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-tG^RcC^RtA^RgG^RaC^RtC^RcA^RgC^R-Gly-NH₂
 DNPA-tG^RcC^RtA^RggactC^RcA^RgC^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-tG^RcC^RtA^RggactC^RcA^RgC^R-Gly-NH₂

DNPA-cG^RaA^RtA^RaG^RgA^RgG^RcT^RtA^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-cG^RaA^RtA^RaG^RgA^RgG^RcT^RtA^R-Gly-NH₂
 DNPA-cG^RaA^RtA^RaggagG^RcT^RtA^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-cG^RaA^RtA^RaggagG^RcT^RtA^R-Gly-NH₂

DNPA-gG^RcT^RcG^RaA^RtA^RaG^RgA^RgG^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-gG^RcT^RcG^RaA^RtA^RaG^RgA^RgG^R-Gly-NH₂
 DNPA-gG^RcT^RcG^RaataaG^RgA^RgG^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-gG^RcT^RcG^RaataaG^RgA^RgG^R-Gly-NH₂

DNPA-aC^RaA^RaT^RgC^RaT^RgG^RgC^RtG^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-aC^RaA^RaT^RgC^RaT^RgG^RgC^RtG^R-Gly-NH₂
 DNPA-aC^RaA^RaT^RgcatgG^RgC^RtG^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-aC^RaA^RaT^RgcatgG^RgC^RtG^R-Gly-NH₂

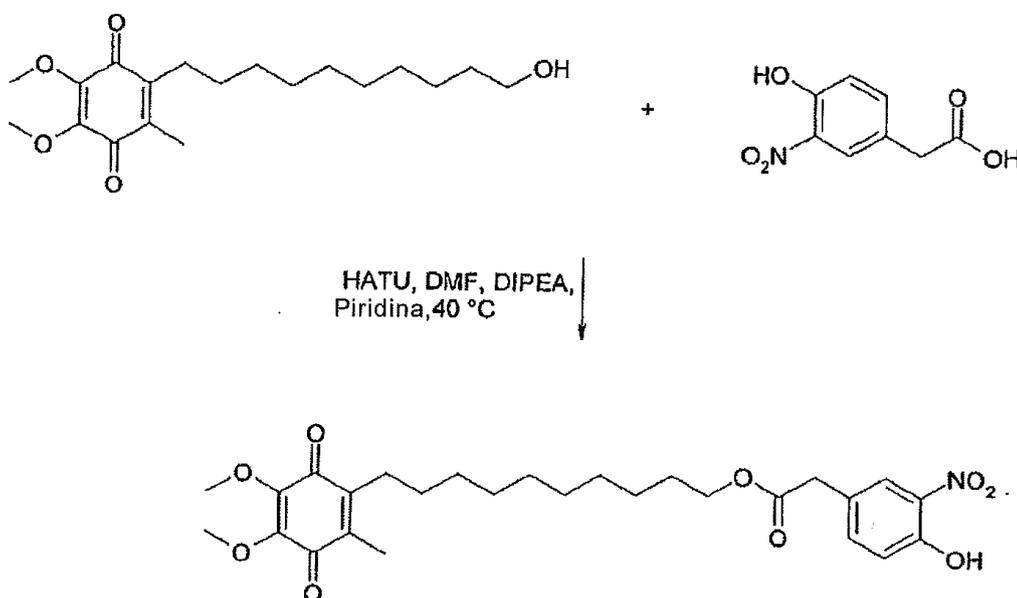
DNPA-cG^RcC^RtT^RaT^RcC^RgT^RaG^RcC^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-cG^RcC^RtT^RaT^RcC^RgT^RaG^RcC^R-Gly-NH₂
 DNPA-cG^RcC^RtT^RatccgT^RaG^RcC^R-Gly-NH₂
 DNPA-Bio-cG^RcC^RtT^RatccgT^RaG^RcC^R-Gly-NH₂

DNPA-tgccT^RaG^RgactcC^RaG^Rc-Gly-NH₂

DNPA-Dota-g^Rc^Rt^Rc^Rg^Ra^Rt^Ra^Rg^Rg^Ra^Rg^RGly-NH₂ (DOTA = lisina, funcionalizada con DOTA a través de la función amina de la cadena lateral de lisina)

Ejemplo 15: Prescripción de síntesis para compuestos de la fórmula general V de acuerdo con la invención:

5 En un recipiente de vidrio con tapa roscada se disponen 2 ml de DMF y 2 ml de piridina. Bajo agitación, se agregan 382 mg (2,95 mmol) de DIPEA y, a continuación, 291 mg (1,48 mmol) de ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilacético. A continuación, se añaden 562 mg (1,48 mmol) de HATU, disueltos en 2 ml de DMF. Se deja pre-activar durante 5 min. La disolución pre-activada se añade gota a gota a una disolución a base de 500 mg (1,48 mmol) de 2-(10-hidroxidecil)-5,6-dimetoxi-3-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona (Idebenona), disuelta en 10 ml de DMF y, a continuación, se calienta hasta 40°C. Después de un tiempo de reacción de 24 horas, se retira el disolvente y el residuo se recoge en acetato de etilo. La fase orgánica se lava dos veces con disolución de hidrógeno-sulfato de potasio 2 N y una vez con disolución de sal común saturada y, a continuación, se seca sobre sulfato de magnesio. El producto bruto se purifica mediante cromatografía (gel de sílice, hexano/acetato, 1/1, v/v).



15 **Ejemplo 16: Localización selectiva de compuestos de la fórmula general I, que portan un radical monohidroxi-mononitro-fenilo o bien un radical monohidroxi-dinitro-fenilo.**

20 Células HeLa o bien células 143B parentales se incuban con una disolución 10 µM de compuestos de la fórmula general I marcados con biotina. Después de 24 horas, se añade una disolución de MitoTracker 2 µM, y después de otros 45 minutos las células se fijan con etanol. A continuación, se deja que sobre las células actúe durante 30 minutos una disolución de fluoresceína-avidina (5 µg/ml) a la temperatura ambiente. Después del lavado de las células, se deja que una disolución de anti-avidina biotinilada (5 µg/ml) actúe durante 30 minutos sobre las células a la temperatura ambiente. Después de un lavado renovado de las células, se deja que de nuevo actúe una disolución de fluoresceína-avidina (5 µg/ml) durante 30 minutos sobre las células a la temperatura ambiente. Después de otras etapas de lavado, el núcleo celular se marca mediante contra-tinción con DAPI. A continuación, se examina con un microscopio confocal la distribución o bien la propagación en el espacio de los compuestos de la fórmula general I, de las mitocondrias así como del núcleo celular en el interior de las células.

Ejemplo 17: Reducción de COX1 y cantidad de ADNmt en células HeLa mediante tratamiento con el compuesto DNPA-tG^Rc^Rt^Ra^Rggact^Rc^Ra^Rg^RGly-NH₂ de acuerdo con la invención.

30 Células HeLa se incuban con una disolución de DNPA-tG^Rc^Rt^Ra^Rggact^Rc^Ra^Rg^RGly-NH₂ ("efectiva") que está dirigida contra una posición en el ADNmt/ARNmt, la cual codifica la proteína mitocondrial COX1 en diferentes concentraciones (100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM y 10 µM) y se incuban durante diferentes espacios de

tiempo (3, 6, 9, 11 y 17 días). En el caso de experimentos que duran más de 3 días, el sobrenadante se reemplaza cada 3 días por medio reciente, en cada caso con la misma concentración del compuesto DNPA-tG^RcC^RtA^RggactC^RcA^RgC^R-Gly-NH₂ de acuerdo con la invención.

- 5 La determinación del nivel de COX1 tiene lugar mediante transferencia Western frente a porina, una proteína de la membrana mitocondrial, cuyo contenido no se ve afectado por el tratamiento con el compuesto de acuerdo con la invención, en calidad de patrón interno. La reducción de COX1 se representa en comparación con las células HeLa no tratadas. En este caso, el nivel COX1 de las células HeLa no tratadas se define como 100%.

En el caso de una concentración de 10 µM de compuesto de acuerdo con la invención, el nivel COX1 en las células HeLa se ha reducido después de 3 días al 67% y después de 9 días al 20%.

- 10 La siguiente tabla muestra la dependencia de la concentración de la reducción de COX1 después de un tiempo de tratamiento de 9 días:

Concentración [µM]	10	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1
COX1 [%]	20	48	55	75	80	88	100

- 15 La determinación de la cantidad de ADNmt tiene lugar mediante PCR en tiempo real frente al ADN del núcleo celular que no se ve afectada por el tratamiento con el compuesto DNPA-tG^RcC^RtA^RggactC^RcA^RgC^R-Gly-NH₂ de acuerdo con la invención, en calidad de patrón interno. La reducción de ADNmt se representa en comparación con las células HeLa no tratadas. En este caso, la cantidad de ADNmt de las células HeLa no tratadas se define como 100%.

Como otra comparación se utilizó un compuesto de acuerdo con la invención sin secuencia complementaria a ADNmt / ARNmt ("control negativo").

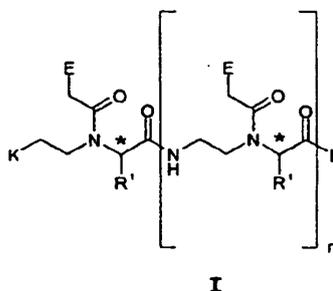
- 20 En el caso de una concentración de compuesto DNPA-tG^RcC^RtA^RggactC^RcA^RgC^R-Gly-NH₂ de acuerdo con la invención de 10 µM, todavía no se puede comprobar efecto alguno después de 3 días. Después de 6 días se puede observar, en comparación con células HeLa no tratadas o bien en comparación con células HeLa que fueron tratadas con el control negativo, una reducción del ADNmt al 81% y después de 9 días al 62%. Después de ello, el valor de la cantidad de ADNmt reducido se mantiene constante después de 11 días (64%) y 17 días (61%).

- 25 La siguiente tabla muestra la dependencia de la concentración de la reducción de ADNmt después de un tratamiento con el compuesto de acuerdo con la invención efectivo de 9 días, en comparación con el control negativo.

Concentración [µM]	10	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1
ADNmt [%] "efectivo"	62	60	82	81	84	101	97
ADNmt [%] "control negativo"	93	101	99	97	110	94	94

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula I,



en donde

5 n es un número entero de 0 a 35,

cada uno de E es, independientemente uno de otro, un átomo de H, un radical fenilo sustituido o no sustituido, un heterociclo sustituido o no sustituido, una nucleobase eventualmente sustituida con grupos protectores, o un intercalador de ADN,

10 cada uno de R¹ es, independientemente uno de otro, un átomo de H o una cadena lateral de un aminoácido natural o no natural, o un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico, con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, en donde al menos uno de los radicales alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclicos o alicíclicos, con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituidos, está sustituido con una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico,

15 K es un grupo de la fórmula -NR²R³, -N[⊕]R²R³R⁴, -NR²(CO)R³ o -NR²(CS)R³, en donde R², R³ y R⁴, independientemente uno de otro, son un átomo de H, un radical alquilo, alcarilo, alquenilo o alquinilo, un grupo protector amino, un ligando informador, un marcador de fluorescencia, un intercalador, un quelante, aminoácido, péptido, proteína, hidrato de carbono, lípido, esteroide, ácido graso, oligonucleótido, un punto cuántico, un desactivante FRET (desactivante de energía por resonancia de fluorescencia) o un polímero soluble en agua o insoluble, pudiendo estar cada uno de los radicales precedentes eventualmente sustituido,

20 L es un grupo de la fórmula -NR⁵R⁶, -NR⁵(CO)R⁶, -NR⁵(CS)R⁶, -OR⁷ o -SR⁷, en donde R⁵ y R⁶, independientemente uno de otro, son un átomo de H, un radical alquilo, alcarilo, alquenilo o alquinilo, un ligando informador, un marcador de fluorescencia, un intercalador, un quelante, aminoácido, amida de aminoácido, péptido, amida de péptido, proteína, hidrato de carbono, lípido, esteroide, ácido graso, oligonucleótido, un punto cuántico, un desactivante FRET (desactivante de energía por resonancia de fluorescencia) o un polímero soluble en agua o insoluble, y R⁷ es un átomo de H, un radical alquilo, un ligando informador, un marcador de fluorescencia, un intercalador, un quelante, aminoácido, amida de aminoácido, péptido, amida de péptido, proteína, hidrato de carbono, lípido, esteroide, ácido graso, oligonucleótido, un punto cuántico, un desactivante FRET o un polímero soluble en agua o insoluble, pudiendo estar cada uno de los radicales precedentes eventualmente sustituido,

30 en donde los radicales K, L o R¹ están sustituidos, independientemente uno de otro, con al menos un radical monohidroxi-mononitro-fenilo o un radical monohidroxi-dinitro-fenilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto según la fórmula I presenta al menos 1 átomo de carbono asimétrico, y preferiblemente al menos un radical R¹ no es un átomo de H.

35 3. Compuesto según una de las reivindicaciones precedentes, en donde cada segundo o cada tercer radical R¹, independientemente uno de otro, es un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico, con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido, y los radicales R¹ restantes son átomos de H.

4. Compuesto según una de las reivindicaciones precedentes, en donde dos, tres o más radicales R¹ contiguos, independientemente uno de otro, son radicales alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico, con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituidos, y los radicales R¹ restantes son átomos de H.

5. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 2, en donde cada R^1 , independientemente uno de otro, es un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo, heterocíclico o alicíclico, con hasta 20 átomos de C, eventualmente sustituido.
- 5 6. Compuesto según una de las reivindicaciones precedentes, en donde uno o varios de los radicales R^1 , independientemente uno de otro, presenta funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico.
7. Compuesto según una de las reivindicaciones precedentes, en donde todos los centros de asimetría presentan la misma configuración, en particular todos los centros de asimetría presentan la configuración (S) o en donde todos los centros de asimetría presentan la configuración (R).
- 10 8. Compuesto según una de las reivindicaciones precedentes, en donde cada R^1 , independientemente uno de otro, presenta una o varias funciones éster de ácido fosfónico o ácido fosfónico, en donde las funciones éster de ácido fosfónico poseen la fórmula $-P(=O)(OV)_2$ o $-P(=O)(OV)(OH)$, en donde cada V, independientemente uno de otro, es un radical alquilo, alquenilo, alquilarilo, arilo o alicíclico, con hasta 20 átomos de C, no sustituido, en particular, en donde cada V, independientemente uno de otro, es un radical metilo, etilo, ciclohexilo o bencilo.
- 15 9. Compuesto, que contiene al menos dos compuestos según una de las reivindicaciones 1 a 8, que están unidos entre sí a través de un enlazador, en donde el enlazador es preferiblemente una cadena de alquilo, un péptido, un oligonucleótido o un oligómero que está constituido por al menos tres unidades ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico.
10. Composición que contiene al menos un compuesto según una de las reivindicaciones precedentes, en particular composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 9, eventualmente en combinación con al menos un soporte, disolvente o demás coadyuvante farmacéutico.
- 20 11. Uso de un compuesto o una composición según una de las reivindicaciones 1 a 10, para la producción de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades mitocondriales.
12. Uso de un compuesto o una composición según una de las reivindicaciones 1 a 10, para la preparación de un agente para el diagnóstico de propiedades mitocondriales o enfermedades mitocondriales.
- 25 13. Uso según una de las reivindicaciones 11 a 12, en donde la enfermedad mitocondrial es una enfermedad hereditaria.
14. Uso según una de las reivindicaciones 11 a 13, para el tratamiento o profilaxis de cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson, de fenómenos de envejecimiento o de la arteriosclerosis.
- 30 15. Uso de un compuesto o una composición según una de las reivindicaciones 1 a 10, para la producción de un medicamento para impedir la transcripción de ADNmt en células o en organismos vivos, o para la producción de un medicamento para impedir la traducción de ARNmt en células o en organismos vivos.

Fig. 1: Células HeLa con compuestos de la fórmula general I de acuerdo con la invención, sustituidos con un radical monohidroxi-mononitro-fenilo.

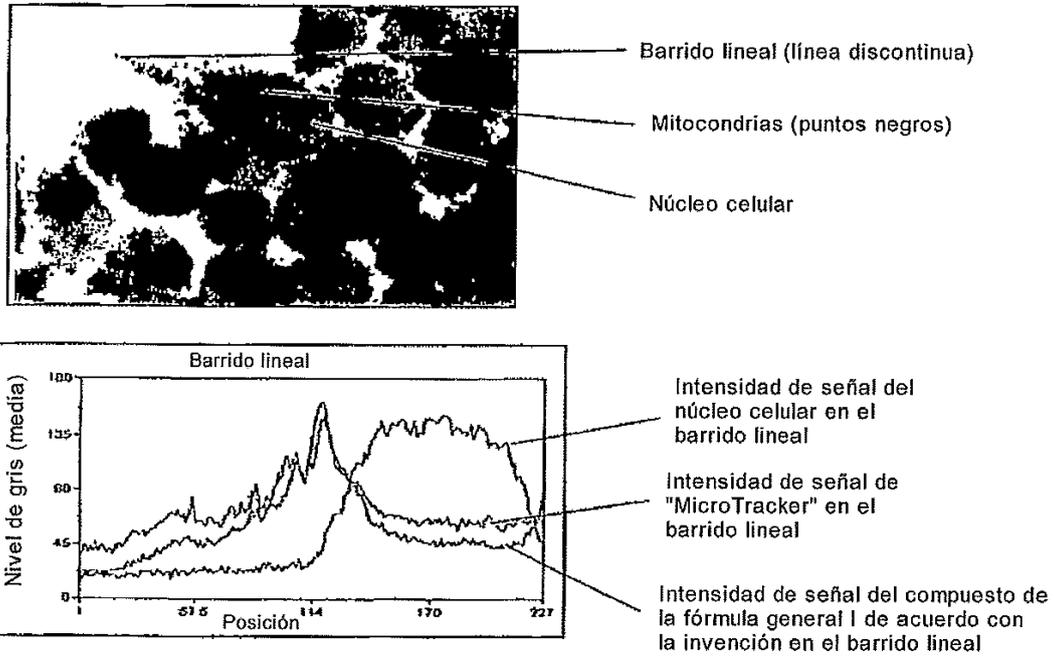


Fig. 2: Células HeLa con compuestos de la fórmula general I de acuerdo con la invención, sustituidos con un radical monohidroxi-mononitro-fenilo.

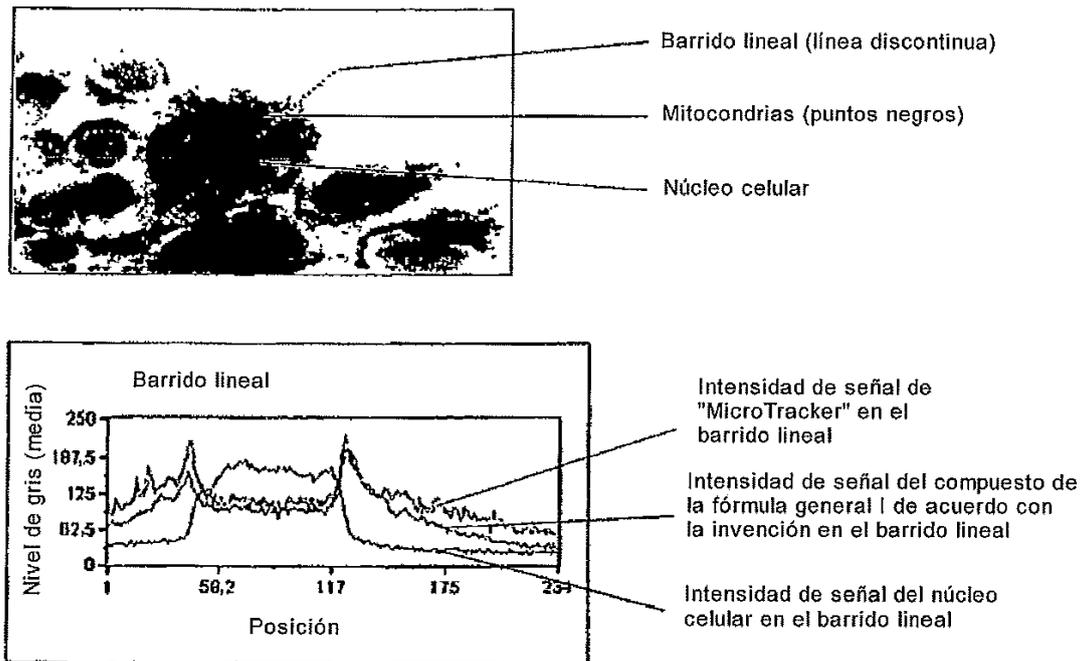


Fig. 3: Células HeLa con compuestos de la fórmula general I de acuerdo con la invención, sustituidos con un radical monohidroxi-dinitro-fenilo.

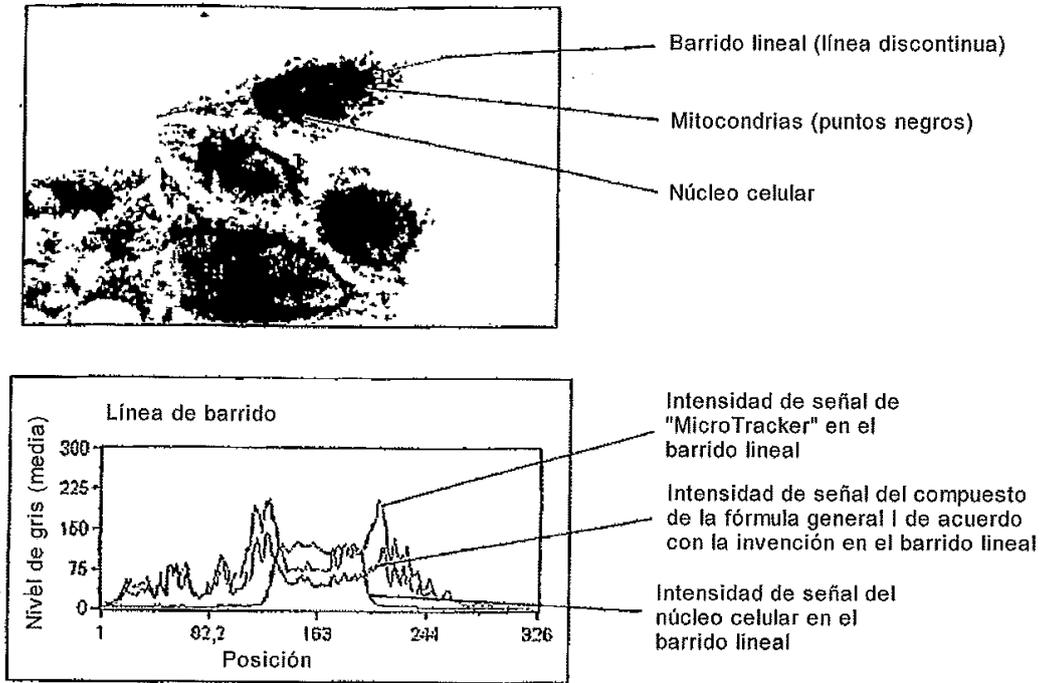


Fig. 4: Células 143B parentales con compuestos de la fórmula general I de acuerdo con la invención, sustituidos con un radical monohidroxi-dinitro-fenilo.

