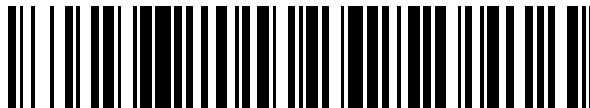


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 454**

51 Int. Cl.:

C07H 19/167 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2012 E 12729546 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2723755**

54 Título: **Nueva familia de análogos de NADP+ o NADPH, su preparación y su aplicación en agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

21.06.2011 EP 11305779

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

04.01.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (100.0%)
12, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris Cedex 06, FR**

72 Inventor/es:

**SLAMA-SCHWOK, ANNY;
BOUCHER, JEAN-LUC;
XU-LI, YUN;
DEPREZ, ERIC;
HENRY, ETIENNE;
DESSY, CHANTAL;
FERON, OLIVIER y
TARUS, BOGDAN**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 555 454 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

Nueva familia de análogos de NADP⁺ o NADPH, su preparación y su aplicación en agentes terapéuticos

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una nueva familia de análogos de NADP⁺ o NADPH, su preparación y su aplicación en agentes terapéuticos.

10 **[0002]** El suministro de sangre es esencial para la mayoría de los tumores sólidos dado que los vasos sanguíneos desarrollados alrededor y dentro de los tumores llevan los nutrientes. La formación de neovasculatura mediante angiogénesis es necesaria para la evolución y metástasis de tumores sólidos. Sin embargo, los vasos sanguíneos tumorales difieren en su morfología de sus homólogos normales. En particular, la vasculatura tumoral normalmente fracasa en satisfacer las demandas de oxígeno y nutrientes de las células tumorales; este fracaso da como resultado heterogeneidad del flujo sanguíneo tumoral que a menudo induce hipoxia intermitente, y condiciones ácidas dentro del tumor (Ingram y Porter, *Gene Ther* 2005, 12, 1058-69).

15 **[0003]** La hipoxia encontrará a menudo en tumores sólidos induce el factor HIF-1 α inducible por hipoxia, estimulando a su vez la angiogénesis asociada con VEGF (VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular). El HIF-1 α actúa como un sensor de oxígeno que forma, junto con la HIF-prolil hidroxilasa dependiente de O₂ asociada, un bucle de autorregulación (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, *J Biol Chem* 2007, 282, 1788-96).

20 **[0004]** El reconocimiento del hecho vascular como una diana importante conduce al desarrollo de la estrategia antiangiogénesis que evita la formación de nuevos vasos sanguíneos y normalizar los vasos restantes. En el contexto de terapias antiangiogénicas, se han desarrollado algunos agentes antiangiogénicos para dirigirse a VEGF, una de las proteínas principales implicadas en la neovascularización. Estos agentes antiangiogénicos son, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, inhibidores de receptores VEGF o inhibidores de la VEGFR quinasa.

25 **[0005]** Sin embargo, se observó que estos compuestos no se podían dirigir a tumores de forma eficaz sin ser coadministrados con un "vehículo" (Chen *et al.*, *J Biol Chem* 2010, 285, 22639-50). Tal "vehículo" para dirección al tumor de un compuesto farmacéutico podían ser partículas fluorescentes o magnéticas, que a menudo tienen efectos secundarios considerables debido a su toxicidad, tiempo de vida media corta, o biodisponibilidad escasa.

30 **[0006]** También se pueden usar anticuerpos específicos que reconocen algunos receptores sobreexpresados en un tumor para administración de un gen o un ARNs en terapia genética. Sin embargo, dado que los tumores no siempre podían estar bien vascularizados, a menudo fragmentos de ácidos nucleicos no podían penetrar bien en células localizadas en el núcleo de un tumor sólido.

35 **[0007]** Dado que la inhibición de la actividad de VEGF no siempre es beneficiosa para la inhibición del tumor, y algunos agentes antiangiogénicos que se dirigen a VEGF no siempre se podían administrar de forma eficaz en tumores, es necesario desarrollar nuevos compuestos antiangiogénicos que se dirigen a otras proteínas en implicadas en la vascularización tumoral.

40 **[0008]** En los mamíferos, el óxido nítrico (NO) es un radical libre producido de forma endógena. Está implicado en muchos procesos (patofisiológicos) en los sistemas cardiovascular, nervioso e inmune. Presenta propiedades tanto antivirales como anti bacterianas y ejerce papeles importantes en la apoptosis. El NO también puede estimular la vasodilatación de los vasos sanguíneos. El NO modula la percepción de oxígeno por HIF-1 α en condiciones de hipoxia pero la S-nitrosilación estabiliza HIF-1 α en normoxia (Sonveaux *et al.*, *Int J radiat Oncol Biol Phys* 2007, 67, 1155-62).

45 **[0009]** El NO se sintetiza mediante proteínas heme denominadas NO sintasas (NOS) que oxidan la L-arginina a NO. Existen tres isoformas de NO-sintasas en mamíferos: NOS neuronal (nNOS o NOS-1), NOS inducible (iNOS o NOS-2) y NOS endotelial (eNOS o NOS-3). La fuente principal de NO en la vasculatura es eNOS.

50 **[0010]** Aunque existen dos puntos de vista conflictivos con respecto al papel de NO en la carcinogénesis y la evolución del tumor, algunos estudios recientes muestran que existe una correlación positiva entre la expresión de iNOS o eNOS y la evolución de varios cánceres humanos (Muntane y laMata, *World J. Hepatol* 2010, 2, 337-344; Jadeski *et al.*, *Int. J. Cancer* 2003, 106, 496-504).

55 **[0011]** La inhibición de NO sintasas proporciona otro enfoque terapéutico antiangiogénesis que es diferente del de los agentes antiangiogénicos convencionales mencionados en el presente documento que se dirigen a proteínas VEGF.

60 **[0012]** Muchos inhibidores de NO sintasas ya se conocen en la técnica anterior, tales como análogos de sustrato L-arginina, análogos de cofactor tetrahidrobiopterina, ligandos heme, o inhibidores de dimerización. Sin embargo, la mayoría de los inhibidores de NO sintasas que se describen en la bibliografía no podrían inhibir de forma específica una isoforma de NO sintasa, en particular eNOS. De hecho, todos estos inhibidores se dirigen al dominio de oxigenasa de NO sintasas. La gran similitud entre los dominios de oxigenasa en diferentes isoformas de NO-sintasas

hace difícil inhibir de forma específica una isoforma sin inhibición de otras isoformas.

[0013] Algunas publicaciones científicas anteriores (EDWARD BEAUMONT *ET AL*: "Synchronous Photoinitiation of Endothelial NO Synthase Activity by a Nanotrigger Targeted at Its NADPH Site", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 129, nº 7, 1 de febrero de 2007, páginas 2178-2186; EDWARD BEAUMONT *ET AL*: "NO Formation by Neuronal NO-Synthase can be Controlled by Ultra fast Electron Injection from a Nanotrigger", CHEMBIOCHEM, vol. 10, nº 4, 2 de marzo de 2009, páginas 690-701; JEAN-CHRISTOPHE LAMBRY *ET AL*: "Selective probing of a NADPH site controlled light-induced enzymatic catalysis", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, vol. 23, nº 4, 1 de julio de 2010, páginas 379-388) desvelan análogo de NADPH para sincronizar y controlar la actividad enzimática de NO sintasas. Sin embargo, dicho compuesto no puede inhibir la actividad de enzimas dependientes de NADPH.

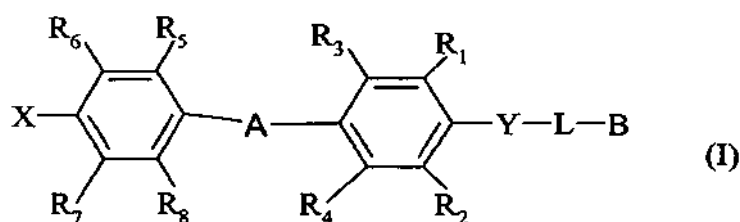
[0014] La solicitud de patente francesa FR 2 893 617 desvela análogos fotoactivables de NADPH o NADP⁺, NAD, NAD⁺, NADH. Los compuestos desvelados en el documento de patente FR 2 893 617 son capaces de iniciar la catálisis enzimática de enzimas dependientes de NADPH o NADP⁺, NAD, NAD⁺, NADH y son útiles para estudiar el mecanismo de dichas enzimas. Sin embargo, dichos compuestos no pueden inhibir la actividad de enzimas dependientes de NADPH.

[0015] La presente invención proporciona nuevos compuestos que podrían inhibir la actividad de enzimas dependientes de NADP⁺, o NADPH, en particular eNOS.

[0016] La presente invención también proporciona nuevos compuestos que se podrían usar como fármacos antitumorales.

[0017] La presente invención también proporciona nuevos compuestos que podrían ser útiles para diagnóstico del cáncer *in vitro*.

[0018] La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) :



30

en la que:

(i) X representa un grupo aceptor de electrones, elegido entre el grupo que comprende:

35

- NO₂,
- CN,
- CHO,
- COOH,
- CF₃,
- F,
- CH=C(CN)₂,
- SO₃H,

40

- CONR₉R₁₀ o SO₂NR₉R₁₀, en los que R₉ y R₁₀ cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo,
- COR₉, en el que R₉ representa un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo, o un grupo tetrazolilo,

45

(ii) Y representa un grupo dador de electrones, elegido entre el grupo que comprende -NR₉-, -OC(R₁₉R₁₄)- o -SC(R₁₉R₁₄)-, en el que:

50

- R₁₉ se elige entre:

- un hidrógeno,
- un grupo alquilo (C₁-C₈) lineal, en particular un etilo, estando dicho grupo alquilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados entre: grupo -OH, grupo -NH₂, grupo -COOH, grupo CONH-arilCOOH o grupo NHCO-aril-COOH o grupo NHCOarilsulfato, o grupo NHCOarilsulfonato, en los

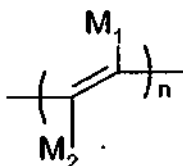
55

que el grupo arilo se elige entre fenilo, naftilo o bifenilo,
 - un grupo orgánico hidrosoluble, en particular PEG,

5 - R₁₄ representa un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con -OH.

(iii) A representa un enlace elegido entre el grupo que comprende:

- 10 (a) -C≡C-, o
 (b)



en el que:

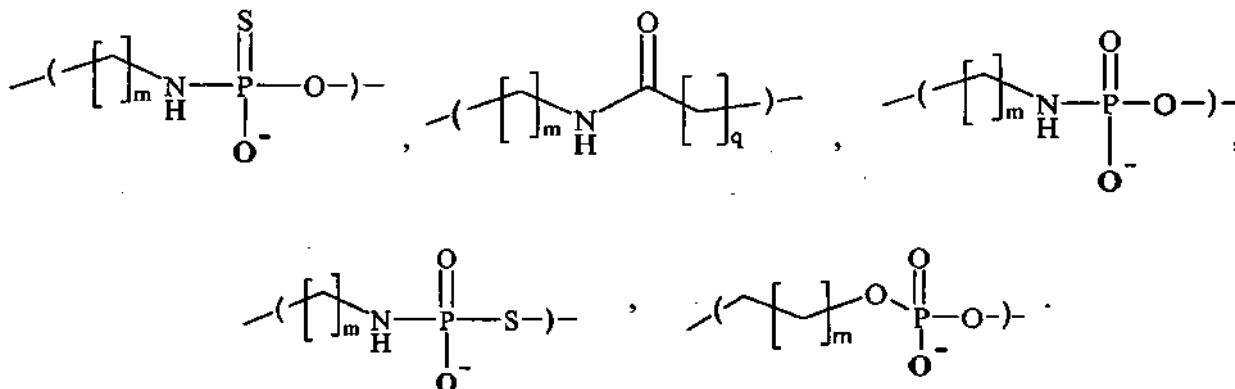
- 15 - M₁ y M₂ representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I,
 - n es un número entero elegido entre 1, 2 o 3,

(iv) cada uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ o R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que comprende:

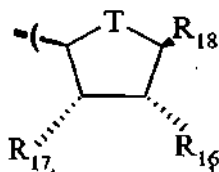
- 20 - H,
 - F, Cl, Br, I,
 - un alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos entre:
 25 - OH,
 - NR₁₁R₁₂, en el que R₁₁ y R₁₂ cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o
 - COOR₁₁, en el que R₁₁ representa un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado,

30 - CONHR₁₃ o NHCOR₁₃, en los que R₁₃ representa un grupo alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado,

(v) L representa un grupo espaciador seleccionado entre el grupo que comprende:



35 en los que m y q cada uno representa independientemente del otro un número entero elegido de 0 a 5, estando dichos grupos opcionalmente sustituidos con uno o más OH, (vi) B representa la siguiente fórmula II:
 en la que:

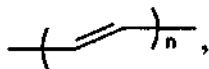


- 5
- T representa un átomo de oxígeno, o un átomo de azufre, preferentemente un átomo de oxígeno;
 - R₁₆ y R₁₇ representa cada uno independientemente del otro OH, H₂PO₄, HSO₄, OPO₃(NH₄)₂, o cualquier sal de estos grupos fosfato o sulfato,
 - R₁₈ representa una base de purina o una base de pirimidina, en particular adenina, guanina, hipoxantina, timina, uracilo o citosina, preferentemente adenina, en formas de racemato o isoméricas, en particular formas isoméricas axiales o ecuatoriales, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.
- 10 **[0019]** El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada que tiene el número indicado de átomos de carbono. Un alquilo (C₁-C₃) se refiere a que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, isopropilo. Un grupo alquilo puede estar sin sustituir u opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes. Un grupo alquilo (C₁-C₄) comprende adicionalmente n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo. Un grupo alquilo (C₁-C₈) comprende adicionalmente n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo.
- 15 **[0020]** Sin otra especificación, el término "arilo" se refiere a un sistema aromático sin sustituir, tal como un fenilo, sistema aromático sustituido con al menos un grupo OH, al menos un grupo alquilo (C₁-C₃), o al menos un grupo (C₁-C₃) alcoxi. Un grupo alcoxi pretende incluir, pero no se limita a, metoxi, etoxi, propoxi.
- 20 **[0021]** La expresión "grupo tetrazolilo" se refiere a un grupo heterocíclico, que tiene cinco átomos en el anillo que consiste en cuatro átomos de nitrógeno y uno de carbono, estando dicho anillo sin sustituir u opcionalmente sustituido con al menos uno de un grupo OH, un grupo alquilo (C₁-C₃), o un grupo alcoxi C₁-C₃, como se ha definido anteriormente.
- 25 **[0022]** La expresión "aceptor de electrones" se refiere a una entidad química que acepta electrones transferidos a la misma de otro compuesto. En el contexto de un compuesto push-pull, un grupo aceptor de electrones acepta densidad electrónica al conector conjugado.
- 30 **[0023]** La expresión "dador de electrones" se refiere una entidad química que dona electrones a otro compuesto. En el contexto de un compuesto push-pull, un grupo dador de electrones añade densidad electrónica al conector conjugado.
- 35 **[0024]** Un compuesto push-pull es un compuesto constituido por un grupo dador en un lado y un grupo aceptor en el otro lado.
- 40 **[0025]** De acuerdo con la presente invención, una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal de ácido o de base orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención. Algunas sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen, por ejemplo, sales de metal alcalino, sal de metal alcalinotérreo, sales de amonio, sales solubles en agua e insolubles en agua.
- 45 **[0026]** La presente invención se basa en el efecto inhibitorio de los compuestos de fórmula (I) en la actividad enzimática de nNOS, una enzima dependiente de NADPH; el efecto inhibitorio se origina a partir de su competición con la unión a NADPH.
- 50 **[0027]** Por primera vez, los Inventores de la presente invención proporcionan un inhibidor de enzimas dependientes de NADPH, que se dirige al dominio de reductasa de enzimas dependientes de NADPH, por ejemplo, óxido nítrico sintasa, quinona óxido-reductasas, y NADPH oxidasas.
- [0028]** Los radicales R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ o R₈ otorgan propiedades electrónicas y de unión diferentes al compuesto de fórmula (I).
- [0029]** El radical R₁₉ otorga al compuesto de fórmula (I) una interacción mejor con restos variables en el dominio de reductasa de enzimas dependientes de NADPH, otorgando de este modo de especificidad.
- 55 **[0030]** La longitud del enlace A entre los dos grupos arilo determina la longitud total de los compuestos de la invención. El aumento del número de C-C dobles enlaces entre los dos grupos arilo puede desplazar la absorción máxima hasta longitudes de onda mayores, y aumenta de forma significativa las dos secciones cruzadas de foto absorción en la región de NIR hacia el rojo. Sin embargo, la longitud total de los compuestos de fórmula (I) se debe controlar para unión eficaz al sitio enzimático. Si la longitud del doble enlace es demasiado importante, entonces el

compuesto no se ajusta dentro del sitio activo de la enzima.

[0031] En una realización, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) en la que X representa CN y A representa

5

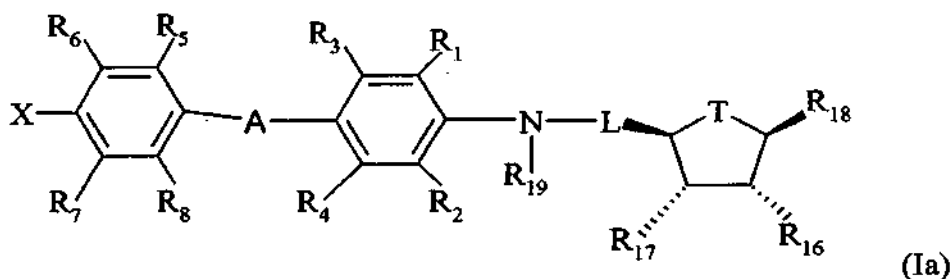


siendo n un número entero elegido de 1 a 3,

- 10 - cada uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ o R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que comprende:
- H, F, Cl, Br, I,
 - un alquilo (C₁-C₄) ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos entre:
- 15 -OH,
- NR₁₁R₁₂, en el que R₁₁ y R₁₂ cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o
 - COOR₁₁, en el que R₁₁ representa un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado,
- 20 - CONHR₁₃ o NH CO R₁₃, en los que R₁₃ representa un grupo alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado.
- Y es como se ha definido anteriormente en el presente documento.

[0032] En una realización en particular, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I), en la que:

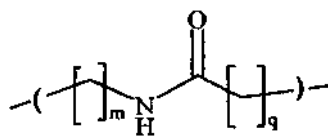
- 25 - X representa un grupo aceptor de electrones, elegido entre el grupo que comprende:
- NO₂,
 - CN,
 - CHO,
- 30 -COOH,
- CF₃,
 - F,
 - CH=C(CN)₂,
 - SO₃H,
- 35 - CONR₉R₁₀ o SO₂NR₉R₁₀, en los que R₉ y R₁₀ cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo,
- COR₉, en el que R₉ representa un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo, o
 - un grupo tetrazolilo,
- 40 - Y representa -NR₁₉-,
- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, L, R₁₈, R₁₆, R₁₇ y R₁₉ son como se han definido anteriormente en el presente documento, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (Ia):



45

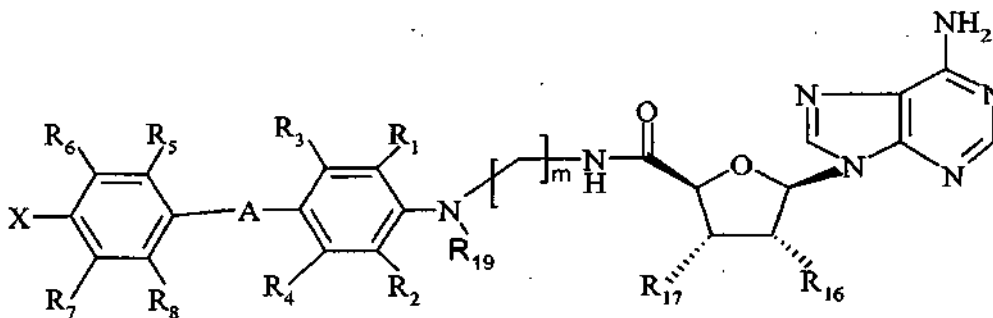
[0033] En una realización más particular, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Ia), en la que:

- T representa un átomo de oxígeno,
 - R₁₈ representa un grupo adenina,
- 50 - R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, X, L, R₁₆, R₁₇ y R₁₉ son como se han definido anteriormente en el presente documento,
- L representa



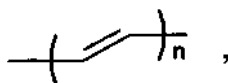
en el que m representa un número entero elegido de 0 a 5, q representa 0, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (ii):

5



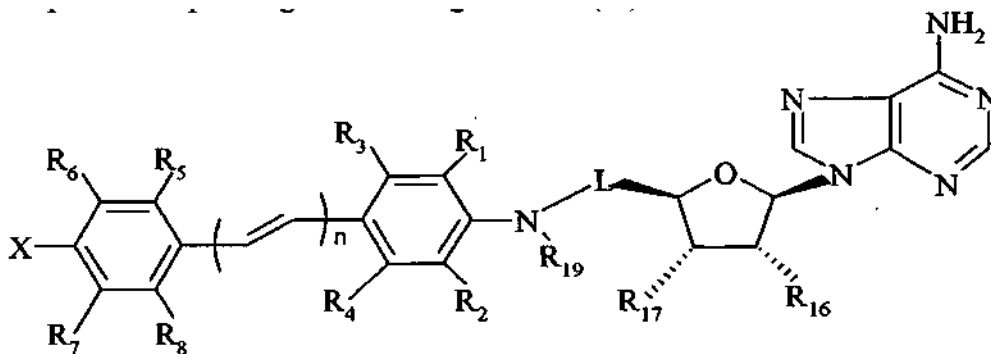
[0034] En una realización más particular, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (la), en la que:

10 - A representa :



siendo n un número entero elegido entre 1, 2 o 3,

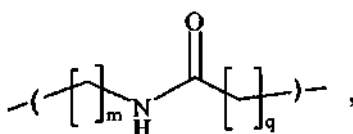
- 15
- T representa un átomo de oxígeno,
 - R₁₈ representa un grupo adenina,
 - R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, X, L, R₁₆, R₁₇ y R₁₉ son como se han definido anteriormente en el presente documento, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (lb):



20

[0035] En una realización más particular, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (lb), en la que:

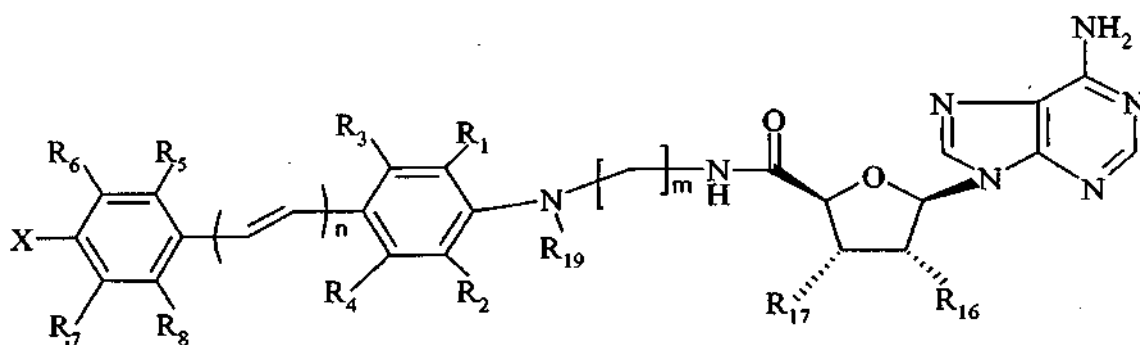
25 - L representa



en la que m representa un número entero elegido de 0 a 5, q representa 0,

- X, n, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₁₆, R₁₇ y R₁₉ son como se han definido anteriormente en el presente

documento, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (Ic):

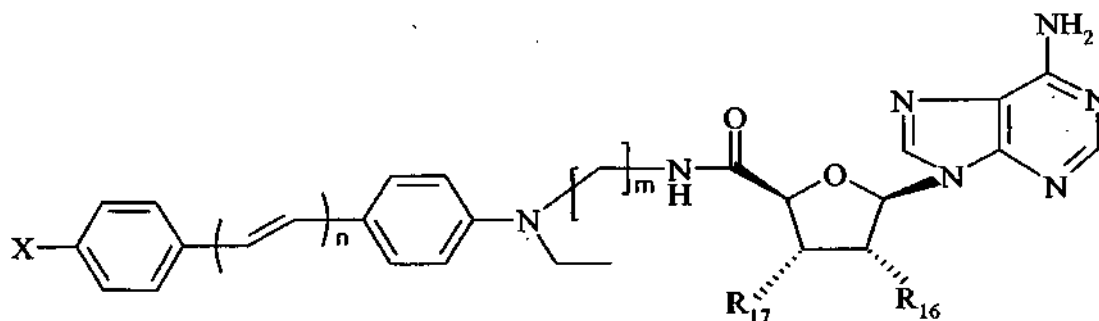


5 **[0036]** Aún en una realización más particular, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Ic), en la que:

- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ respectivamente representa un átomo de hidrógeno,
- R₁₉ representa un grupo etilo,
- 10 - R₁₆, R₁₇, X son como se han definido anteriormente en el presente documento,
- n representa un número entero elegido entre 1, 2 o 3,
- m representa un número entero elegido de 0 a 5,

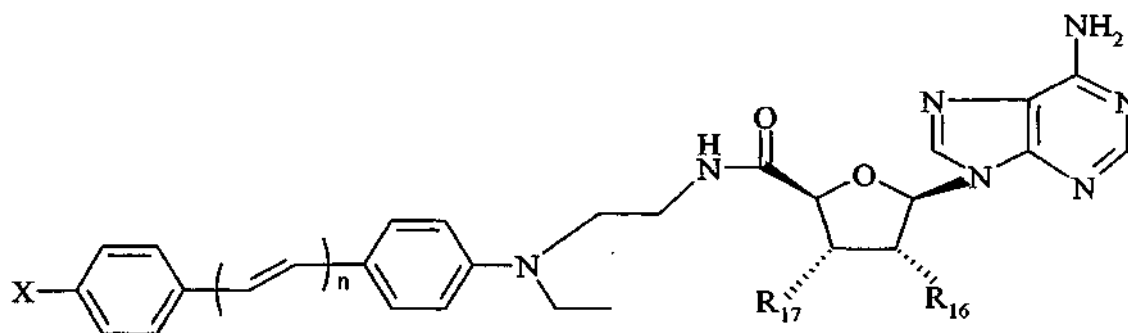
respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (Id):

15



[0037] En una realización favorable, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Id), en la que:

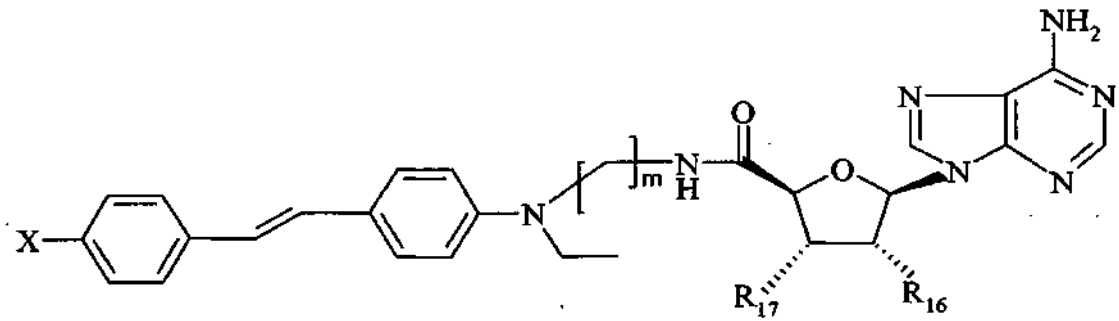
- 20 - m representa el número entero 2,
- R₁₆, R₁₇, X son como se han definido anteriormente en el presente documento,
- n representa 1, 2 o 3, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (Ie)



25

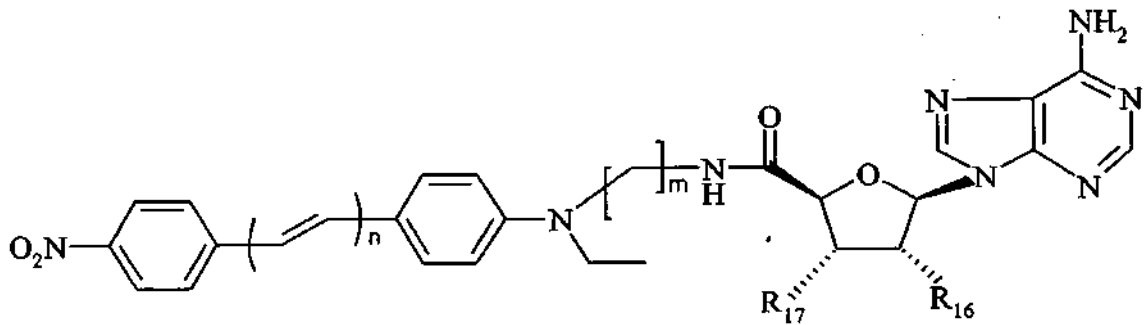
[0038] En otra realización favorable, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Id), en la que:

- n representa el número entero 1,
- R₁₆, R₁₇, X son como se han definido anteriormente en el presente documento,
- 30 - m representa un número entero elegido de 0 a 5, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula

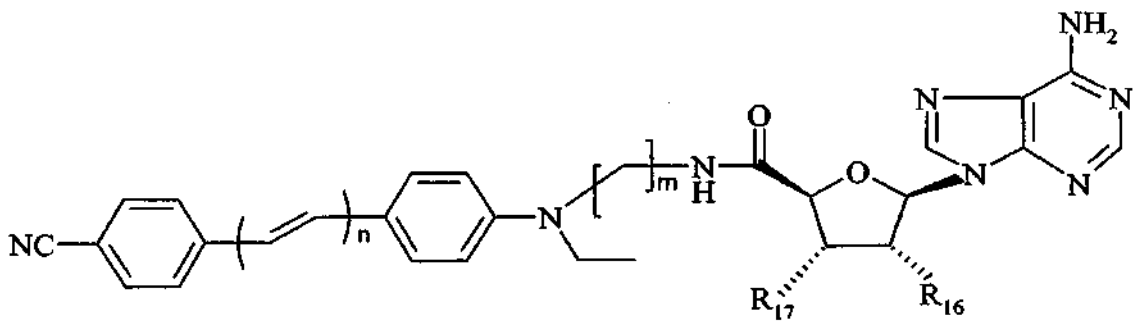


[0039] En otra realización favorable, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Id), en la que:

- 5
- X representa grupo $-NO_2$ o CN,
 - R_{16} , R_{17} son como se han definido anteriormente en el presente documento,
 - n representa un número entero seleccionado entre 1, 2 o 3,
 - m representa un número entero elegido de 0 a 5, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (Ig₁):

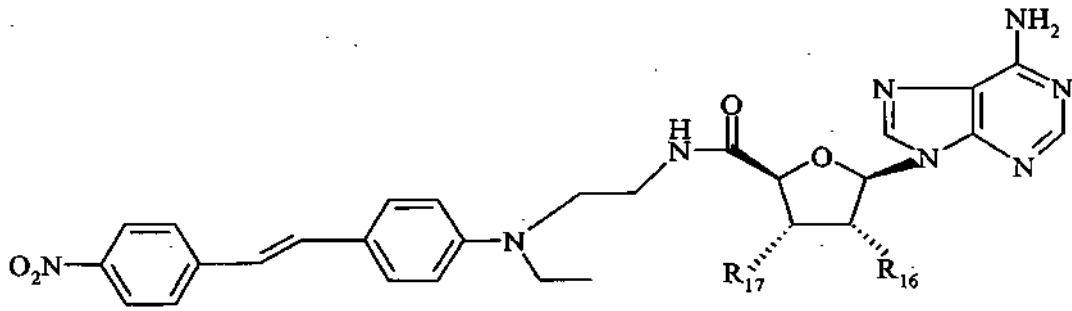


10 o la siguiente fórmula (Ig₂):



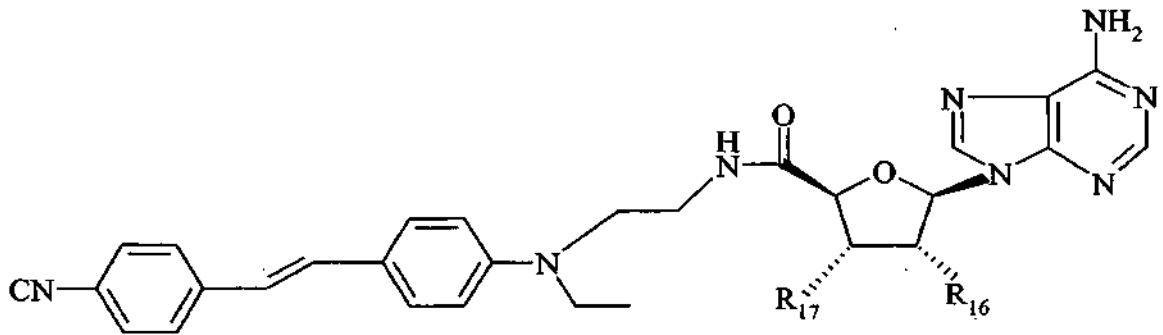
15 [0040] En una realización más favorable, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Ig₁), en la que:

- 20
- n representa el número entero 1,
 - m representa el número entero 2,
 - R_{16} , R_{17} representa cada uno independientemente del otro OH, H_2PO_4 , HSO_4 , $OPO_3(NH_4)_2$, o cualquier sal de estos grupos fosfato o sulfato, respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (Ih₁):



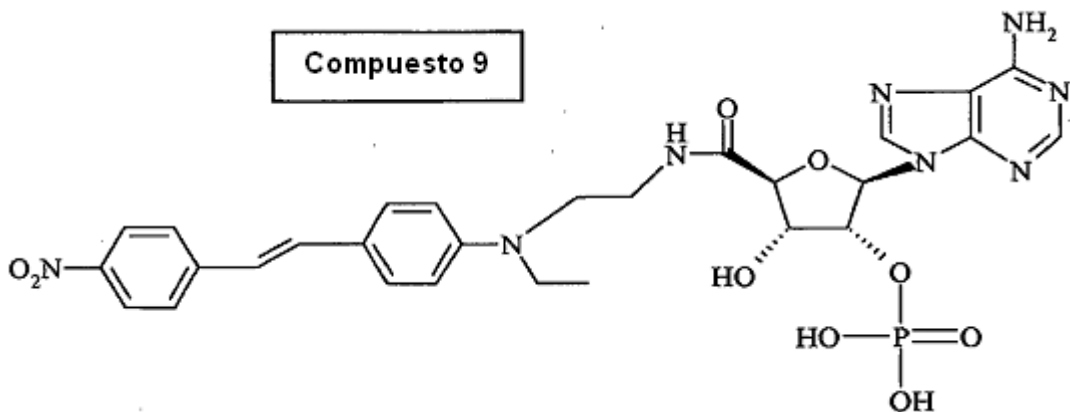
[0041] En una realización más favorable, la presente invención proporciona compuestos de fórmula (I_{g2}), en la que:

- 5 - n representa el número entero 1,
 - m representa el número entero 2,
 - R₁₆, R₁₇ representa cada uno independientemente del otro OH, H₂PO₄, HSO₄, OPO₃(NH₄)₂, o cualquier sal de estos grupos fosfato o sulfato,
 10 respondiendo dichos compuestos a la siguiente fórmula (I_{h2}):

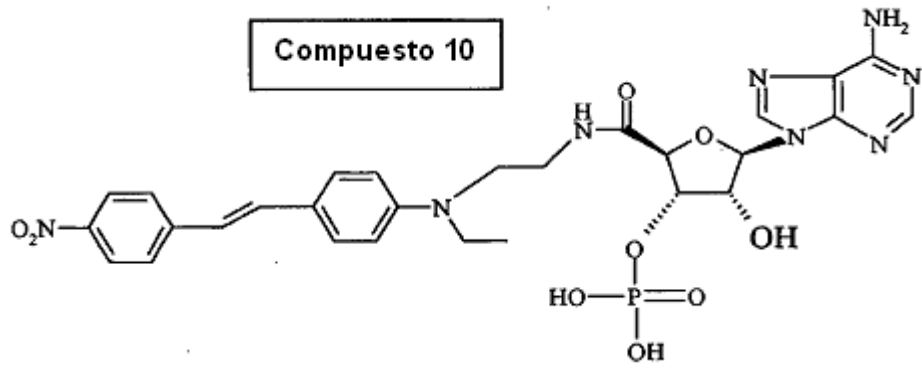


[0042] En una realización particularmente favorable, los compuestos de la presente invención de fórmula (I_a) se seleccionan entre el grupo que comprende:

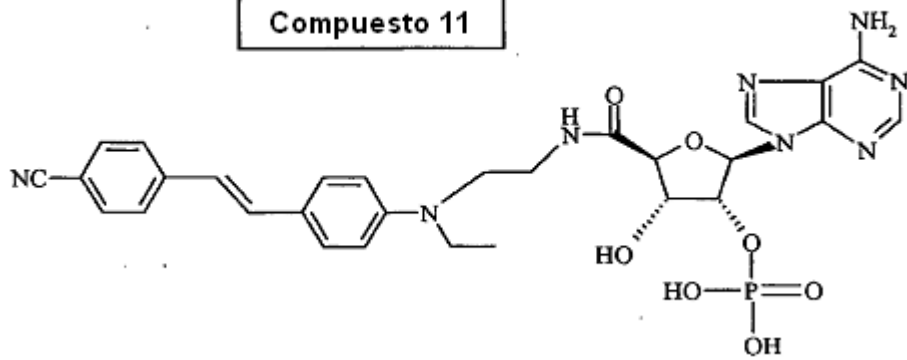
15



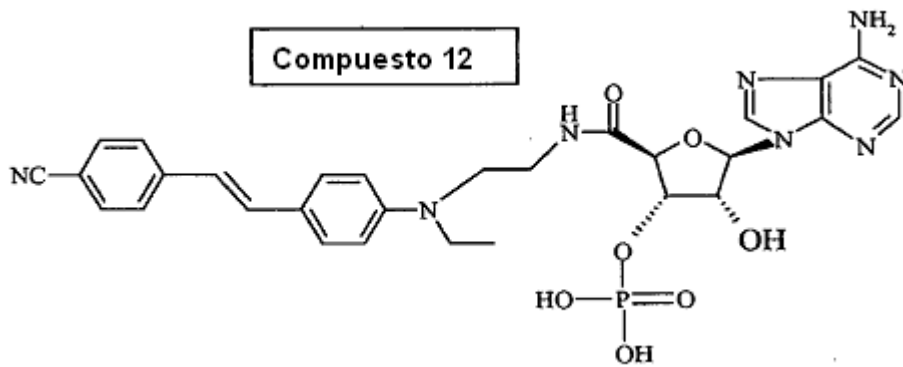
Compuesto 10



Compuesto 11

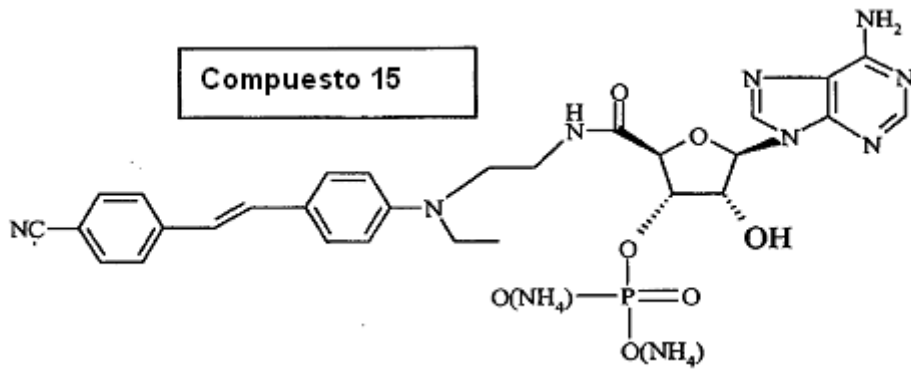


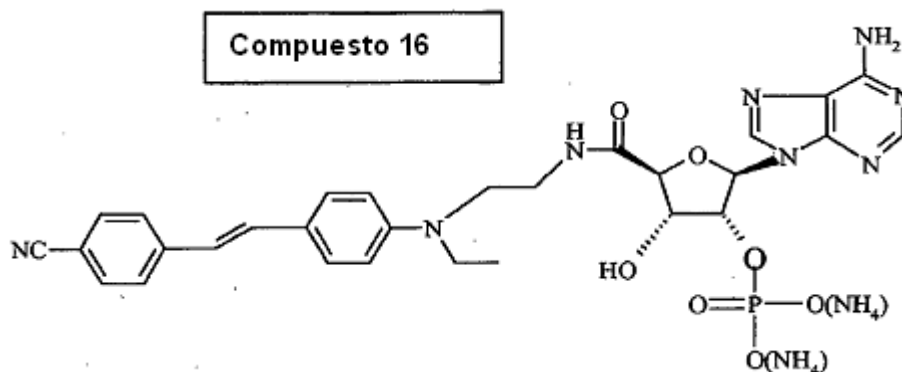
Compuesto 12



5

Compuesto 15





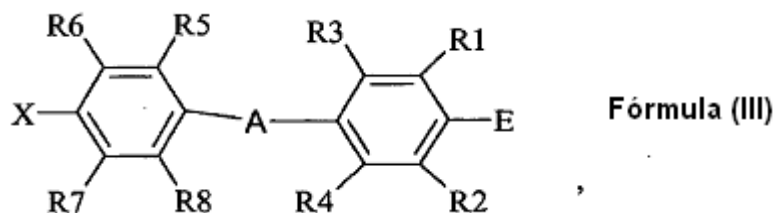
[0043] Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos para un experto en la materia, que se describen en la bibliografía.

5

[0044] La presente invención también proporciona un método para preparar un compuesto de fórmula (Ia) que comprende:

(i) preparar un compuesto de fórmula III

10



en la que:

15 - X representa un grupo aceptor de electrones, elegido entre el grupo que comprende:

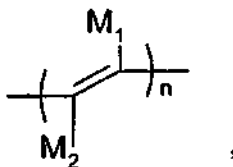
- NO₂,
- CN,
- CHO,
- COOH,
- CF₃,
- F,
- CH=C(CN)₂,
- SO₃H,

20

- CONR₉R₁₀ o SO₂NR₉R₁₀, en los que R₉ y R₁₀ cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo,
- COR₉, en el que R₉ representa un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo, o un grupo tetrazolilo,
- A representa un enlace elegido entre el grupo que comprende:

30

- (a) -C≡C-, o
- (b)



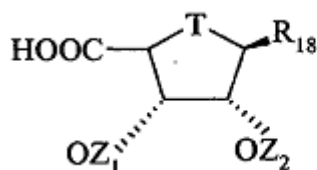
35

en el que:

- M_1 y M_2 representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I,
 - n es un número entero elegido entre 1, 2 o 3,
- 5
- cada uno de $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7$ o R_8 se selecciona independientemente entre el grupo que comprende:
 - H,
 - F, Cl, Br, I,
 - un alquilo (C_1-C_4) lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos entre:
 - 10 - OH,
 - $NR_{11}R_{12}$, en el que R_{11} y R_{12} cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_3) lineal o ramificado, o
 - $COOR_{11}$, en el que R_{11} representa un hidrógeno o un grupo alquilo (C_1-C_3) lineal o ramificado,
 - 15 - $CONHR_{13}$ o $NHCO R_{13}$, en el que R_{13} representa un grupo alquilo (C_1-C_4) lineal o ramificado,
 - E representa $-NR_{19}R_{15}$, en el que:
 - R_{19} se elige entre:
 - 20 - un hidrógeno,
 - un grupo alquilo (C_1-C_8) lineal, en particular un etilo, estando dicho grupo alquilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados entre: grupo -OH, grupo -NH₂, grupo -COOH, CONH-arilCOOH (arilo = fenilo, naftilo, bifenilo), NHCOarilCOOH, NHCOarilOSO₃H, o NHCOarilSO₃H,
 - 25 - un grupo orgánico hidrosoluble, en particular PEG,
 - R_{15} representa $[-CH_2]_t-NHZ$, en el que t es un número entero elegido de 1 a 5, y Z representa a grupo protector elegido entre el grupo que comprende ftaloilo (phth), terc-butiloxicarbonilo (Boc), bencilo (Bn),

(ii) hacer reaccionar dicho compuesto de fórmula III con un compuesto de fórmula II(a)

30



Fórmula (IIa)

en la que:

- 35
- Z_1 y Z_2 representan grupo protector de alcohol elegido entre bencilo, benzoilo, silil éter tal como TMS (trimetilsililo) u OZ_1 y OZ_2 que forman en conjunto un grupo isopropilideno,
 - R_{18} representa una base de purina o una base de pirimidina, en particular adenina, guanina, hipoxantina, timina, uracilo o citosina, preferentemente adenina,

40 para obtener un compuesto que se desprotege para producir compuestos de fórmula (Ia), en la que R_{16} y R_{17} son OH.

[0045] Dicho compuesto se trata con un fosfato o un derivado de sulfato para producir el compuesto de la invención, en el que R_{16} o R_{17} es H_2PO_4 , HSO_4 u $OPO_3(NH_4)_2$.

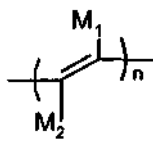
45

[0046] La reacción en la etapa (ii) se puede realizar, por ejemplo, en DMF anhidra (dimetilformamida) en presencia de HBTU (hexafluorofosfato de 1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio).

50 [0047] El compuesto de fórmula III es un cromóforo que tiene una absorción máxima a una longitud de onda encontrada en el intervalo de 300 nm y 700 nm con un coeficiente de extinción molar superior a $10\ 000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y éste puede emitir fluorescencia con una excitación de dos fotones a una longitud de onda entre 700 nm y 1100 nm, con una sección transversal de dos fotones σ_2 superior a 30 GM, preferentemente superior a 100 GM.

55 [0048] A modo de ejemplo, una mezcla de los compuestos 9 y 10 se puede sintetizar de acuerdo con el esquema representado en la Figura 1A.

[0049] Cuando A representa

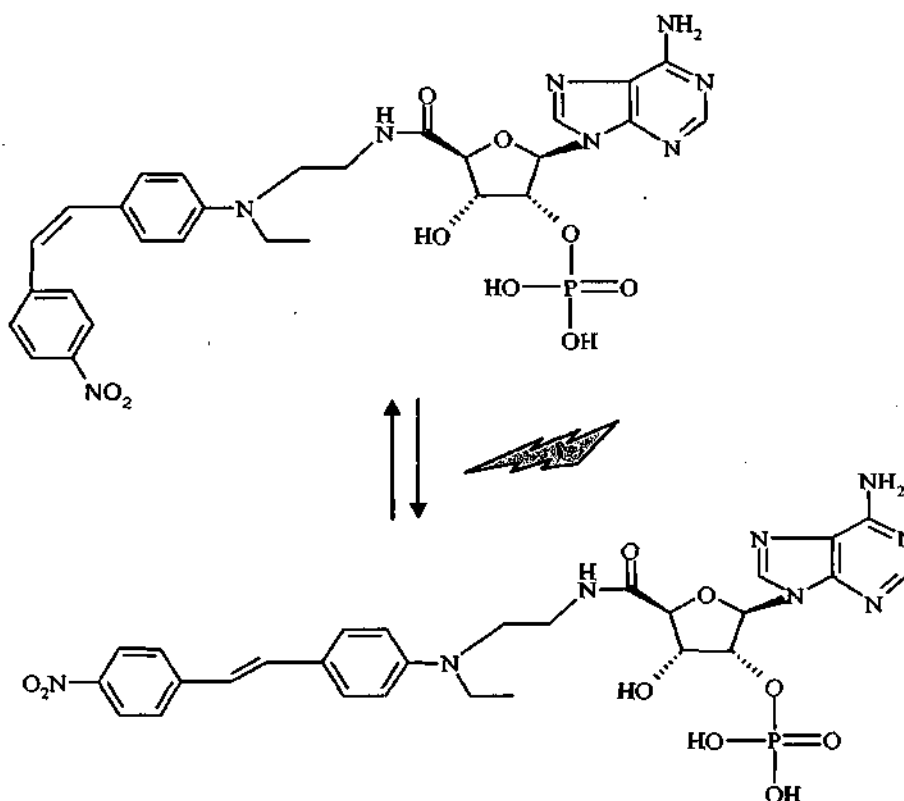


si $n = 1$, entonces el compuesto de fórmula I se puede considerar un derivado de estilbeno, en el que el doble enlace entre el grupo fenilo puede estar ya sea en forma *cis* o en forma *trans*. Los compuestos de forma *cis* no son activos, ya que son incapaces de unirse a eNOS y do no inhiben la actividad de eNOS, mientras que los compuestos de forma *trans* son activos y pueden inhibir de forma eficaz la actividad de eNOS; si $n = 2$ o 3, entonces el compuesto de la presente invención es activo, aunque todos los dobles enlaces en A estén en la forma *trans*.

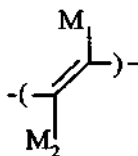
[0050] De modo interesante, ya que no son activos en la forma *cis*, están desprovistos de efectos secundarios y se pueden administrar en forma inactiva y transformar en la forma activa directamente *in situ* después de radiación.

[0051] Con radiación láser a una longitud de onda entre 300 nm y 700 nm, los compuestos de la presente invención preparados como una mezcla de isómeros *cis* y *trans* o como el isómero *cis* puro se pueden transformar en la forma *trans* activa después de la excitación de dos fotones. La mezcla *cis-trans* se podría obtener siguiendo una ruta de síntesis distinta que implica acoplamiento de Wittig como la etapa fundamental. El modelado molecular muestra que el isómero *cis* no se puede unir al sitio de NADPH y es inactivo.

[0052] Como un ejemplo, el siguiente esquema representa la transformación del isómero *cis* del compuesto A en el isómero *trans* con radiación de luz visible.

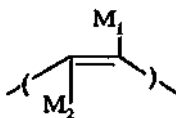


[0053] En una realización, la presente invención proporciona los compuestos de fórmula (I) mencionados anteriormente en forma *trans*, en los que el enlace A entre dos arilos de los compuestos mencionados anteriormente se representa con



en el que M_1, M_2 representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I.

- 5 **[0054]** En una realización en particular, la presente invención proporciona los compuestos de fórmula (I), (Ia), (Ii), mencionados anteriormente, cuando el enlace entre dos arilos de los compuestos mencionados anteriormente es un doble enlace, (Ib), (Ic), (Id), (Ie), (If), (Ig₁), (Ig₂), (Ih₁), (Ih₂) y los compuestos 9, 10, 11, 12, 15 o 16 en forma *trans* biológicamente activa.
- 10 **[0055]** En otra realización, la presente invención proporciona los compuestos de fórmula (I) mencionados anteriormente en forma *cis*, en los que el enlace A entre dos arilos de los compuestos mencionados anteriormente se representa con



- 15 en el que M_1 y M_2 representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I.

[0056] En una realización en particular, la presente invención proporciona los compuestos de fórmula (I), (Ia), (Ii), mencionados anteriormente, cuando el enlace entre dos arilos de los compuestos mencionados anteriormente es un doble enlace, (Ib), (Ic), (Id), (Ie), (If), (Ig₁), (Ig₂), (Ih₁), (Ih₂) y los compuestos 9, 10, 11, 12, 15 o 16 en forma *cis*.

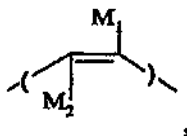
[0057] La presente invención también proporciona compuestos de fórmula (I) como un fármaco para su uso en quimioterapia.

25 **[0058]** En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso como un agente antiangiogénico en quimioterapia para el tratamiento de cánceres, en particular para el tratamiento de cánceres superficiales, tales como melanomas, cánceres del tracto respiratorio superior, o cánceres del tracto aerodigestivo superior.

30 **[0059]** La presente invención también proporciona compuestos fotoactivables de fórmula (I), en la que el enlace A entre dos arilos de los compuestos mencionados anteriormente es un doble enlace.

[0060] En una realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) como un agente de formación de imágenes para diagnóstico de cáncer, en particular para diagnóstico de cáncer superficial.

35 **[0061]** La presente invención también proporciona una composición fotoactivable que comprende al menos un compuesto de fórmula (I), en la que el enlace A se representa mediante



40 y está en la forma *cis*, o el enlace A está tanto en la forma *cis* como *trans*, en el que M_1 y M_2 representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I.

45 **[0062]** De acuerdo con la presente invención, los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables son útiles en composiciones farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención comprenden como principio activo uno o más de los compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables, en combinación con excipientes y/o diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Se puede usar cualquier material vehículo convencional. El material vehículo puede ser un material vehículo inerte orgánico o inorgánico, por ejemplo uno que sea adecuado para administración oral o para inyección *in situ*. Algunos vehículos adecuados incluyen agua, gelatina, goma arábiga, lactosa, almidón, estearato de

50

magnesio, talco, aceites vegetales, polialquilen-glicoles, glicerina y vaselina. Algunos aditivos adicionales tales como agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, agentes emulgentes, tampones y similares se pueden añadir de acuerdo con prácticas aceptadas de formulación de compuestos farmacéuticos.

5 **[0063]** Las preparaciones farmacéuticas se pueden preparar en cualquier forma convencional que incluye una forma sólida para administración oral tal como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, y supositorios rectales. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y/o pueden contener adyuvantes tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulgentes, sales para variar la presión osmótica y/o tampones.

10 **[0064]** Los compuestos de la invención también se pueden administrar a un paciente de acuerdo con la invención mediante vías tópica (incluyendo transdérmica, bucal o sublingual), o parenteral (incluyendo intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intradérmicas o intramuscular).

15 **[0065]** Además, las preparaciones farmacéuticas también pueden contener un compuesto de fórmula (I), en particular de fórmula (Ia), y otros agentes anticáncer, elegidos entre el grupo que comprende:

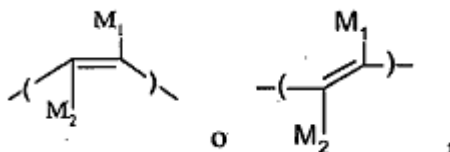
- un agente antiangiogénico, seleccionado entre Cilengitide, Vandetanib, Lenalidomida, Talidomida, Trióxido de Arsénico, Bevacizumab, anti-VEGFR-1, anti-VEGFR-2, anti-PDGFR, anti-FMS-FLT-3, anti-TK1,
- 20 - agentes de alquilación, seleccionados entre Bendamustina, Temozolomida, Meclortamina, Ciclofosfamida, Carmustina, Cisplatino, Busulfán, Tiotepa, o Decarbazina,
- agentes antimetabolitos, seleccionados entre Pentostatina, Metotrexato, Pemetrexed, Floxuridina, Fluorouracilo, Citarabina, Mercaptopurina o Tiguanina,
- antibióticos citotóxicos seleccionados entre Rubitecán, Mitomicina C, Daunorrubicina, Doxorubicina, Bleomicina, Plicamicina, Mitoxantrona HCl, u Oxaliplatino, o
- 25 - derivados de plantas, seleccionado entre Vinorelbina, BMS 184476, sulfato de Vincristina, Vinblastina, Docetaxel taxol, para una administración simultánea, separada o secuencial.

30 **[0066]** La presente invención proporciona un método para inhibir una enzima elegida entre óxido nítrico sintasa, en particular óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico sintasa neuronal, óxido nítrico sintasa inducible, reductasas, en particular P450 reductasas, catalasas y NADHP oxidasas que comprende la etapa de:

- mezclar un compuesto de fórmula (I), en la que el enlace A entre dos arilos de los compuestos mencionados anteriormente se representa con triple enlace, con una muestra biológica que contiene dicha enzima.

35 **[0067]** La presente invención también proporciona un método para inhibir una enzima elegida entre óxido nítrico sintasa, en particular óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico sintasa neuronal, óxido nítrico sintasa inducible, reductasas, en particular P450 reductasas, catalasas y NADHP oxidasas que comprende la etapa de:

- 40 (a) Mezclar un compuesto de fórmula (I), en la que el enlace A entre dos arilos de los compuestos mencionados anteriormente se representa con



- 45 en forma *cis* o mezcla *cis-trans* con una muestra biológica que contiene dicha enzima,
 (b) Radiar con luz la muestra en condiciones apropiadas para transformar la forma *cis* en compuesto activo de dicha forma *trans*.

[0068] La presente invención se ilustra mediante las siguientes figuras y ejemplos.

50 **Figuras:**

[0069]

55 La Figura 1A ilustra la ruta de síntesis del ejemplo 1 para obtener el compuesto 9 y el compuesto 10, denominando a dicha muestra YL3 en lo sucesivo en el presente documento. La N-etil anilina se hace reaccionar con el compuesto 1 en presencia de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ para obtener el compuesto 2. El compuesto 2 se transforma en el compuesto 3 en una formilación de Vilsmeier. La condensación de Knoevnagel entre el ácido 4-nitrofenilacético y el compuesto 3 conduce al compuesto 4 derivado de estilbeno. El compuesto 5 se obtiene a partir del compuesto 4 por tratamiento en presencia de $\text{NaBH}_4\text{-HOAc}$. El compuesto 6 es un derivado de adenosina obtenido por oxidación de la 2',3'-isopropilidenadenosina disponible en el mercado. El acoplamiento entre el

60

compuesto 5 y el compuesto 6 para obtener el compuesto 7 se realiza en DMF anhidra en presencia de HBTU. Después de desprotección del motivo de isopropilideno del compuesto 7, la reacción de fosforilación se realiza en presencia de clordietilfosfato iba seguido de una reacción de hidrólisis ácida para obtener los compuestos 9 y 10 y isoméricos denominados YL3 en el presente documento. Los dos isómeros se obtienen en una proporción de aproximadamente 40:60.

La Figura 1B ilustra la ruta de síntesis para obtener el compuesto 15 y el compuesto 16, denominando a dicha muestra NS2 en lo sucesivo en el presente documento. La *N*-etil anilina se hizo reaccionar con el compuesto 1 en presencia de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ para obtener el compuesto 2. El compuesto 2 se formiló en el compuesto 3 siguiendo una reacción de Vilsmeier. La condensación de Knoevnagel entre el ácido 4-cianofenil-acético y el compuesto 3 conduce al derivado de estilbeno 17. El compuesto 18 se obtuvo a partir del compuesto 17 por tratamiento en presencia de NaBH_4 -HOAc. El compuesto 6 era un derivado de adenosina obtenido por oxidación de la 2',3'-isopropilidenadenosina disponible en el mercado. El acoplamiento entre el compuesto 18 y el compuesto 6 para obtener el compuesto 13 se realizó en DMF anhidra en presencia de HBTU. Después de desprotección del motivo de isopropilideno del compuesto 13, la reacción de fosforilación se realizó en presencia de clordietilfosfato y fue seguida de una reacción de hidrólisis ácida para obtener una mezcla de los compuestos 15, 15', 16 y 16' isoméricos denominados NS2 en el presente documento. Los cuatro isómeros correspondían a una mezcla de los estilbenos isoméricos 15 y 16 Z y E, con el grupo fosfato en la posición 2' o 3', en una proporción de 30:25:25:20.

La Figura 2A ilustra la competición entre YL3 y NADPH en la inhibición de la formación de NO sintetizado mediante la NO-sintasa neuronal, de acuerdo con el ejemplo 2.1. La formación de NO se midió en presencia de diversas concentraciones de NADPH (10, 25, 50 y 100 μM) y en ausencia (d), o en presencia de 5 (■), 25 (▼), 50 (□) o 100 (○) 1 μM de YL3.

La Figura 2B muestra la dependencia lineal entre K_m ap (eje de coordenadas) y la concentración de YL3 (eje horizontal). La intersección con el eje x indica un valor de K_i de 17 μM . Estos datos son representativos de un experimento habitual. Estos datos muestran que la inhibición de la formación de NO catalizada por NOS neuronal es competitiva con respecto al cofactor de NADPH.

La Figura 3A ilustra los efectos de YL3 en las tasas de formación del aducto de espín BocMPO-OOH, de acuerdo con el ejemplo 2.4. Las producciones de O_2^- mediante nNOS (en ausencia de L-arginina y H_4B) se midieron mediante inmovilización del espín en presencia de BocMPO seguido de espectroscopía EPR. Las intensidades de la segunda línea del aducto de espín BocMPO-OOH (flechas en la Figura 3B) se informaron como una función del tiempo de las incubaciones realizadas en tampón solo (●, sin YL3), o en presencia de YL3 15 μM (▲) o 100 μM (□). El ajuste lineal de los puntos de datos se muestra como (-), (-) y (-) respectivamente. El eje horizontal representa la intensidad del campo magnético. El eje de coordenadas representa la intensidad de la señal de EPR. Estos resultados muestran que YL3 inhibe la formación de aniones superóxido mediante nNOS en condiciones de acoplamiento. La Figura 3B muestra el espectro de EPR de un aducto de espín Boc-MPOOH.

La Figura 4 presenta las medidas de producción de anión superóxido a partir de arcos aórticos aislados después de la adición de YL3 (10 μM) o vehículo mediante la sonda de espín de EPR (Cat1-H), de acuerdo con el ejemplo 3. Las medidas se realizaron a 37 °C directamente por capilaridad en el resonador del Espectrómetro *Magnettech MiniScope MS200* de EPR de banda de X CW equipado con controlador de temperatura. Los arcos aórticos (con una longitud de aproximadamente 2 mm) se obtuvieron a partir de aorta aislada de ratones C57BL/6, macho, de 15 semanas de edad. El nivel de iones superóxido se produjo por vía extracelular mediante arcos aórticos aislados y se detectó mediante la formación de los radicales Cat1., se controló en presencia (Δ) o ausencia (○) de YL3; el nivel basal corresponde al vehículo solo en ausencia de arcos aórticos con o sin YL3.

La Figura 5A representa el espectro de NOS neuronal sola (5 μM) (línea con triángulo abierto), o de YL3 solo (30 μM) (línea con círculo negro), o de NOS que se une a YL3 (usando concentraciones variables de YL3, de 0 a 30 μM , en presencia de NOS 5 μM) (líneas sin marcador) con la condición de excitación de dos fotones (λ_{ex} , 2-fotones = 940 nm; las medidas se realizaron de acuerdo con el método que se describe en el ejemplo 4 (parte 4.1). El eje horizontal representa la longitud de onda de emisión de fluorescencia de muestras. El eje de coordenadas representa la intensidad de emisión de fluorescencia.

La Figura 5B presenta el estudio de valoración del complejo YL3-nNOS, como se muestra por lo general en la Fig 5A. El eje horizontal representa la concentración de YL3 en una muestra que contiene nNOS. El eje de coordenadas representa la emisión de fluorescencia del complejo YL3-nNOS a 630 nm en condición de excitación de dos fotones (λ_{ex} , 2-fotones = 940 nm).

La Figura 6A presenta la fluorescencia emitida por células HUVEC observada mediante microscopía de dos fotones, de acuerdo con el ejemplo 5. Las células se incubaron con YL3 1 μM o 5 μM . El cultivo celular sin YL3 se usa como control. La longitud de onda de excitación fue 840 nm (Emisión: 500-650 nm).

Figura 6B: La fotografía a la izquierda ilustra formación de imágenes de epifluorescencia obtenida en células HUVEC incubadas con YL3. El diagrama a la derecha presenta espectros de emisión de fluorescencia a partir de zonas brillantes (●) o a partir de citoplasma (▲). El eje horizontal representa la longitud de onda (nm) de la fluorescencia. El eje de ordenadas representa la intensidad de la fluorescencia.

La Figura 7 representa el efecto de YL3 (10 μ M) en la relajación dependiente del epitelio de aorta de ratones contraído previamente mediante KCl. En presencia de catalasa, indometacina (un inhibidor de la ciclooxigenasa) y una concentración elevada de potasio extracelular, la relajación de los arcos aórticos de ratones, inducida por estimulación mediante receptores muscarínicos solamente descansa en el NO producido por células endoteliales. En esta situación, el YL3 inhibe la relajación inducida por acetilcolina, tal como se espera para un inhibidor de eNOS.

Figura 8: muestra el efecto de YL3 (0, 3 o 100 μ M) inhibiendo la formación del tubo endotelial estimulada por tratamiento con VEGF, de acuerdo con el ejemplo 8. El alcance de la red endotelial en las diferentes condiciones sometidas a ensayos siempre se comparó dentro de un mismo conjunto de experimentos y se usaron valores relativos para comparaciones interensayos. En estos experimentos se usaron 3-5 placas sembradas en Matrigel mediante pasaje con Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC). Las fotografías de la columna a la izquierda muestran células antes del tratamiento con concentración de YL3 diferente. Las fotografías de la columna a la derecha muestran células después de 48 horas de tratamiento con YL3 3 μ M o 100 μ M, y muestra de control solo con tratamiento con VEGF.

Figura 9: muestra la formación de imágenes de HUVEC vivas usando las propiedades de fluorescencia de dos fotones de NS1 y la colocalización del complejo de Golgi. Las HUVEC se trataron con NS1 5 μ M y se observaron adicionalmente con excitación de dos fotones (840 nm; ajuste de emisión: 520-680 nm) (a). El panel b muestra la tinción del núcleo con Hoechst 33342 de HUVEC tratadas con NS1 (excitación de dos fotones, 740 nm; emisión a 410-510 nm). Panel c, imagen combinada de a y b. Panel d, imagen de dos fotones de control de HUVEC no tratadas en el mismo entorno (inserción: tinción del núcleo de células de control). (e-h) Formación de imágenes de colocalización de NS1 y del complejo de Golgi: las HUVEC vivas se trataron con NS1 (5 μ M) y rastreador de Golgi (BODIPY TR Ceramida; 5 μ M) durante 60 min. El panel e muestra el canal de formación de imágenes de NS1 (excitación de un fotón, 488 nm; ajuste de emisión: 520-680 nm). El panel f muestra el canal de formación de imágenes del rastreador de Golgi (excitación de un fotón, 543 nm; ajuste de emisión: 600-650 nm). Panel g, imagen combinada de e y f (con tinción del núcleo). Las zonas de color amarillo indican colocalización de NS1 y del aparato de Golgi. El panel h, corresponde a la imagen de transmisión de DIC.

Figura 10: muestra la formación de imágenes de colocalización de NS1 y Retículo Endoplasmático (ER), Mitochondria o Endosoma Temprano (EEA1). (a) Imagen combinada de NS1 y ER. (b) Imagen combinada de NS1 y mitocondria. Las HUVEC vivas se trataron con NS1 (5 μ M) y rastreador de ER (colorante Rojo ER-Tracker™; 100 nM) o MitoTracker (MitoTracker® Rojo Profundo FM; 50 nM) durante 30 min y adicionalmente se observó con microscopía confocal. (c) Imagen combinada de NS1 y EEA1. Las HUVEC vivas se trataron con NS1 (10 μ M) durante 60 min antes de fijación e inmunotinción de EEA1, y adicionalmente se observaron con microscopía confocal. Los anticuerpos primario y secundario para inmunotinción fueron IgG de conejo policlonal para EEA1-Marcador de Endosoma Temprano y de burro anti-conejo Alexa Fluor® 594 (H+L), respectivamente. Ajustes de excitación y de emisión: NS1 (exc. 488 nm; em. 520-680 nm), ER (exc. 543 nm; em. 590-670 nm), mitocondria (exc. 633 nm; em. 650-700 nm), EEA1 (exc. 543 nm; em. 590-700 nm).

Figura 11: presenta experimentos de colocalización de NS1 con eNOS. (a-f) Formación de imágenes de colocalización de NS1 y eNOS. Las HUVEC vivas se trataron con NS1 (10 μ M) durante 60 min antes de fijación e inmunotinción de eNOS. Los anticuerpos primario y secundario para inmunotinción fueron IgG de ratón anti-eNOS/NOS purificada de Tipo III y cabra anti-ratón AlexaFluor® 594 (H+L), respectivamente. Los paneles a y d muestran el canal de formación de imágenes de NS1 (excitación de un fotón, 488 nm, y excitación de dos fotones, 840 nm, respectivamente; ajuste de emisión: 520-680 nm). El panel b y e muestran el canal de formación de imágenes de eNOS (excitación de un fotón, 543 nm; ajuste de emisión: 590-700 nm), que corresponde a a y d, respectivamente. Panel c: imagen combinada de a y b. Panel f: imagen combinada de d y e. Las zonas de color amarillo a naranja indican colocalización de NS1 y eNOS. En los paneles c y f también se muestra la tinción del núcleo con Hoechst 3342.

Ejemplo 1: Formación de modelos moleculares y Síntesis de mezcla YL3

1.1 Formación de modelos moleculares

[0070] La simulación de MD del complejo nNOS-YL3 se realizó usando el programa NAMD (Phillips *et al.*, J Comput Chem 2005, 26, 1781-802) con el campo de fuerza CHARMM27. El sistema molecular formado con enzima dimérica de rata nNOS, FAD, FMN (PDB ID 1TLL) e YL3 se centró en una celda cúbica de moléculas de modelo de agua de TIP3P equilibradas previamente (Jorgensen *et al.*, J. Chem. Physiol. 1983, 79, 926-35). Las interacciones de prostatica se calcularon sin truncamiento, usando el algoritmo de suma de Ewald de malla de partícula. El sistema se hizo electrostático ambiente neutro mediante la adición aleatoria de 20 cationes de sodio. Las interacciones de van

der Waals se desplazaron ligeramente a cero entre 10,0 Å y 12,0 Å. La concentración iónica del sistema se ajustó a 0,15 M mediante la adición aleatoria de iones de sodio y cloruro. La lista de las interacciones no unidas se truncó a 13,5 Å. La energía del sistema se minimizó durante 5000 etapas usando el algoritmo de minimización de energía de gradiente conjugado mientras que los átomos de soluto se limitaron armónicamente en sus posiciones iniciales con una fuerza constante de 50,0 kcal/mol/Å². Además, el sistema se calentó linealmente a 300 K durante 60 ps. Las longitudes de los enlaces que contenía átomos de hidrógeno se fijaron con el algoritmo SHAKE (Ryckaert *et al.*, J. Comp. Phys. 1977, 23, 327-41) y las ecuaciones de movimiento se iteraron usando una etapa de tiempo de 2 fs en el integrador de Verlet de velocidad. La simulación de la dinámica molecular en condiciones convencionales (NPT) se usó adicionalmente para equilibrar el sistema y para la realización de la producción. Durante la fase de equilibrio, las limitaciones aplicadas en los átomos de soluto se redujeron gradualmente de 5,0 kcal/mol/Å² a cero. La presión y la temperatura se limitaron a 1 atm y 300 K, respectivamente. Se produjeron dos trayectorias de 10 ns cada una para YL3 que forma complejo con nNOS.

1.2 Síntesis de los compuestos 9 y 10 (denominados YL3 en el presente documento) (Figura 1A) y de los compuestos 15 y 16 (denominados NS2 en el presente documento) (figura 1B)

[0071] Se realizó TLC en placas revestidas previamente Gel de Sílice 60F-254 (Merck); los componentes se detectaron con luz UV. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se registraron con un espectrómetro de 250 MHz Biospin Avance II de Bruker, y los desplazamientos químicos se refieren a un patrón interno de Me₄Si (δ = 0,00). Los espectros de masas se registraron mediante ionización por electronebulización (ESI) en modos de detección de ionización tanto positiva (ESI+) como negativa (ESI-). Los análisis elementales se realizaron en ICSN (Gif sur Yvette, Francia) y los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se obtuvieron con ESI en modo de detección del tiempo de vuelo (TOF) en un espectrómetro LCT (Waters-Micromass) en ICSN (Gif sur Yvette, Francia). El ftalimidoacetaldehído (compuesto 1) se preparó de acuerdo con un procedimiento conocido (Safavy *et al.*, Bioconjugate Chem 2002, 13, 317-26). El ácido carboxílico 6 se preparó a partir de 2',3'-isopropiliden adenosina como se informara anteriormente (Ha y Nair, Tetrahedron Lett 1996, 37, 1567-70).

[0072] Compuesto 1: se añadió HCl (0,1 N, 42 ml) a una solución de dietil acetal de ftalimidoacetaldehído (4,18 g, 15,1 mmol) en AcOH (42 ml). La suspensión resultante se calentó a 60 °C durante 24 h. El disolvente se evaporó y la mezcla se disolvió en CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. sat., H₂O, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color marrón (2,72 g, 95%). Los datos físicos son coherentes con los informados anteriormente.

[0073] Compuesto 2: se añadió NaBH(OAc)₃ (3,05 g ; 14,4 mmol) a una solución de *N*-etilnilina (1,16 g ; 9,6 mmol) y 2-ftalimidoacetaldehído (1) (2,72 g, 14,4 mmol) en CH₂Cl₂ (28 ml). Después de 24 h a 20 °C, se añadió CH₂Cl₂ y la fase orgánica se lavó con H₂O, se secó (MgSO₄) y se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (CH₂Cl₂-ciclohexano a 80:20) para proporcionar 2 en forma de un sólido de color amarillo (2,71 g, 96%). RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 7,85 (m, 2H), 7,71 (m, 2H), 7,24 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 6,86 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 6,67 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,91 (dd, J = 6,5, 8,1 Hz, 2H), 3,58 (dd, J = 6,5, 8,1 Hz, 2H), 3,46 (c, J = 6,9 Hz, 2H), 1,22 (t, J = 7,0 Hz, 3H). RMN ¹³C (63 MHz, CDCl₃): δ 168,0 (C), 147,2 (C), 133,7 (CH), 131,8 (C), 129,2 (CH), 123,0 (CH), 116,0 (CH), 111,9 (CH), 47,8 (CH₂), 44,6 (CH₂), 35,0 (CH₂), 12,2 (CH₃). MS: m/z = 295 (MH⁺). Anal. calc. para C₁₈H₁₈N₂O₂ (294,14), C 73,45, H 6,16, N 9,52. Encontrado C 73,33, H 6,17, N 9,62.

[0074] Compuesto 3: se añadió oxiclorigeno de fósforo (POCl₃, 5,24 ml) gota a gota a una solución del compuesto 2 (2,71 g, 9,2 mmol) en piridina anhidra (4,50 ml) y DMF (55 ml), a 0 °C en una atmósfera de Ar. Después de 24 h a TA, se añadió hielo (~ 600 g) y se agitó durante 30 min. El precipitado se filtró, se lavó y se disolvió con CH₂Cl₂. La fase orgánica se separó de H₂O, se secó (MgSO₄) y se evaporó. El producto en bruto se filtró sobre gel de sílice (Et₂O) para proporcionar 3 en forma de un sólido de color amarillo pálido después de la evaporación del disolvente (2,84 g, 96%). RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 9,67 (s, 1H), 7,82 (m, 2H), 7,69 (m, 4H), 6,81 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 3,89 (dd, J = 6,6, 7,3 Hz, 2H), 3,63 (dd, J = 6,6, 7,3 Hz, 2H), 3,50 (c, J = 7,3 Hz, 2H), 1,21 (t, J = 7,3 Hz, 3H). RMN ¹³C (63 MHz, CDCl₃): δ 189,9 (CH), 168,0 (C), 152,0 (C), 134,0 (CH), 132,1 (CH), 131,6 (C), 125,2 (C), 123,2 (CH), 111,8 (CH), 47,6 (CH₂), 44,9 (CH₂), 34,6 (CH₂), 12,1 (CH₃). MS: m/z = 323 (MH⁺). Anal. calc. para C₁₉H₁₈N₂O₃ (322,13), C 70,79, H 5,63, N 8,69. Encontrado C 70,28, H 5,62, N 8,62.

[0075] Compuesto 4: Una solución de ácido 4-nitrofenil acético (1,55 g, 8,6 mmol) y piperidina (655 mg, 7,7 mmol) en CH₂Cl₂ (~ 10 ml) se agitó a TA durante 10 min, y el compuesto 3 (2,48 g, 7,7 mmol) se añadió a la mezcla. Después de 10 min a TA, se evaporó CH₂Cl₂ y la reacción se calentó a 100 °C al vacío (15 mm de Hg) durante 3 h, a continuación a 150 °C / 15 mm de Hg durante 3 h. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (CH₂Cl₂-ciclohexano a 80:20) para proporcionar 4 en forma de un sólido de color (2,21 g, 65%). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 8,16 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,83 (m, 2H), 7,70 (m, 2H), 7,53 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,14 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 6,80 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 3,88 (dd, J = 6,7, 8,1 Hz, 2H), 3,58 (dd, J = 6,7, 8,1 Hz, 2H), 3,46 (c, J = 7,0 Hz, 2H), 1,20 (t, J = 7,0 Hz, 3H). RMN ¹³C (63 MHz, CDCl₃): δ 168,3 (C), 148,0 (C), 145,9 (C), 145,0 (C), 134,1 (CH), 133,5 (CH), 132,0 (C), 128,7 (CH), 126,1 (CH), 124,5 (C), 124,1 (CH), 123,3 (CH), 121,7 (CH), 112,1 (CH), 48,0 (CH₂), 45,1 (CH₂), 35,1 (CH₂), 12,4 (CH₃). MS: m/z = 442 (MH⁺). Anal. calc. para C₂₆H₂₃N₃O₄ (441,17), C 70,73, H 5,25, N 9,52. Encontrado C 70,19, H 5,13, N 9,53.

[0076] Compuesto 5: se añadió NaBH₄ (806 mg, 21,5 mmol) a una suspensión de 4 (1,88 g, 4,3 mmol) en isopropanol / agua (6 / 1, 120 ml). Después de 1 h a 60 °C, se añadió ácido acético (8 ml) a TA y la reacción se mantuvo a 80 °C durante 48 h. El isopropanol se evaporó y el precipitado se filtró. El producto en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (MeOH:CH₂Cl₂: NH₄OH = 3:97:0,25) para proporcionar 5 en forma de un sólido de color rojo (1,02 g, 77%). RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,17 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,49 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 16,4 Hz, 1H), 7,10 (d, J = 16,4 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 3,42 (m, 4H), 2,83 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 1,09 (t, J = 7,0 Hz, 3H). RMN ¹³C (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ 148,1 (C), 145,2 (C), 145,1 (C), 133,9 (CH), 128,7 (CH), 126,3 (CH), 124,0 (CH), 123,6 (C), 120,9 (CH), 111,6 (CH), 49,8 (CH₂), 44,4 (CH₂), 37,8 (CH₂), 12,0 (CH₃). HRMS (ESI) calculado para C₁₈H₂₂N₃O₂ (MH⁺) *m/z* 312,1712, encontrado 312,1701.

[0077] Compuesto 7: se añadieron Et₃N (0,8 ml) y HBTU (2,18 g, 5,7 mmol) a una solución de 5 (1,19 g, 3,8 mmol) y ácido urónico 6 (1,23 g, 3,8 mmol) en DMF anhidra (130 ml). Después de 48 h a TA en una atmósfera de Ar, se evaporó DMF y el tratamiento habitual con EtOAc / H₂O proporcionó el producto en bruto que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc-CH₂Cl₂ a 60:40) para proporcionar 7 en forma de un sólido de color rojo (1,64 g, 70%). RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,29 (s, 1H), 8,17 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 8,11 (s, 1H), 7,75 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,72 (s, 1H, D₂O intercambiable), 7,45 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 16,4 Hz, 1H), 7,33 (s, 2H, D₂O intercambiable), 7,08 (d, J = 16,4 Hz, 1H), 6,67 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,37 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 5,43 (dd, 1H, J = 1,9, 6,1 Hz, 1H), 5,40 (dd, 1H, J = 1,6, 6,1 Hz, 1H), 4,57 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 3,31-3,24 (m, 6H), 1,54 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 1,03 (t, J = 7,0 Hz, 3H). RMN ¹³C (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168,9 (C), 156,0 (C), 152,4 (CH), 148,8 (C), 148,1 (C), 145,3 (C), 145,1 (C), 140,5 (CH), 133,9 (CH), 128,7 (CH), 126,2 (CH), 124,0 (CH), 123,4 (C), 120,7 (CH), 118,9 (C), 112,9 (C), 111,3 (CH), 89,5 (CH), 86,0 (CH), 83,2 (CH), 83,1 (CH), 47,7 (CH₂), 44,2 (CH₂), 35,7 (CH₂), 26,7 (CH₃), 25,0 (CH₃), 12,0 (CH₃). MS: *m/z* = 615 (MH⁺). Anal. calc. para C₃₁H₃₄N₆O₆ (614,26), C 60,58, H 5,58, N 18,23. Encontrado C 59,98, H 5,53, N 18,11.

[0078] Compuesto 8: se añadió HCl (1 M, 20 ml) a una solución de 7 (0,75 g, 1,2 mmol) en THF (30 ml). Después de 24 h a 60 °C, se añadió K₂CO₃ sat. Hasta un pH ~ 10 y la THF se retiró por evaporación. El precipitado se filtró, se lavó (pH ~ 7) y se secó para proporcionar 8 en forma de un sólido de color rojo (0,67 g, 96%). RMN ¹H (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,16 (t a, 1H, D₂O intercambiable), 8,37 (s, 1H), 8,18 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 8,08 (s, 1H), 7,76 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,41 (d, J = 16,3 Hz, 2H), 7,09 (d, J = 16,3 Hz, 2H), 6,78 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,97 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 5,78 (d, J = 4,3 Hz, 1H, D₂O intercambiable), 5,57 (d, J = 6,2 Hz, 1H, D₂O intercambiable), 4,62 (m, 1H), 4,33 (s a, 1H), 4,17 (dd, J = 4,3, 3,5 Hz, 1H), 3,42 (m, 6H), 1,08 (t, J = 6,9 Hz, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): 170,0 (C), 161,8 (C), 156,2 (C), 152,6 (CH), 149,0 (C), 148,2 (C), 145,4 (C), 145,3 (C), 140,8 (CH), 134,1 (CH), 128,9 (CH), 126,4 (CH), 124,2 (C), 123,6 (CH), 120,9 (CH), 111,6 (CH), 87,9 (CH), 84,7 (CH), 73,0 (CH), 71,9 (CH), 48,7 (CH₂), 44,6 (CH₂), 36,5 (CH₂), 12,1 (CH₃). HRMS (ESI) calculado para C₂₈H₃₁N₈O₆ (MH⁺) *m/z* 575,2367, encontrado 575,2386.

[0079] La mezcla de YL3 (Compuestos 9 + 10): *n*Bu₂SnO (52 mg, 0,21 mmol) se añadió a una suspensión de 8 (93 mg, 0,16 mmol) en tolueno anhidro (10 ml), Después de 2 h a 130 °C en una atmósfera de Ar, el tolueno se evaporó. CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) y CIP(O)(OEt)₂ (47 µl, 0,32 mmol) se añadieron a la reacción. Después de 48 h a TA, CH₂Cl₂ se retiró por evaporación. Se añadieron THF (3 ml) y HCl (37%, 1,5 ml) y la mezcla se agitó a TA durante 2,5 h (control por TLC: CH₃OH-CH₂Cl₂-H₂O-Et₃N a 30:65:4:1). Después de la adición de una solución ac. de NH₃ (2%, hasta pH ~ 7), el sólido de color rojo profundo se filtró, se lavó con H₂O. El producto en bruto se disolvió en DMF y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice en C₁₈ (CH₃CN-H₂O-NH₄OH al 2% a 25:75:1) para proporcionar una mezcla de los dos compuestos isoméricos 9 y 10 en una proporción de 40:60 después de liofilización (76 mg, 70%).

[0080] 2-PO₄H₂ (compuesto 9): RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,16 (t a, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,17 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 8,02 (s, 1H), 7,76 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 7,48 (d, 2H, J = 9,1 Hz), 7,40 (m, 3H), 7,10 (d, 2H, J = 16,4 Hz), 6,78 (d, 2H, J = 9,1 Hz), 6,07 (d, 1H, J = 7,1 Hz), 4,83 (m, 1H), 4,49 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 4,45 (s a, 1H), 3,44-3,35 (m, 6H), 1,09 (t, 3H, J = 7,0 Hz).

[0081] 3-PO₄H₂ (compuesto 10): RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,26 (t a, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,17 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 8,02 (s, 1H), 7,76 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 7,48 (d, 2H, J = 9,1 Hz), 7,40 (m, 3H), 7,10 (d, 2H, J = 16,4 Hz), 6,78 (d, 2H, J = 9,1 Hz), 5,97 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 4,62 (m, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,36 (s a, 1H), 3,44-3,35 (m, 6H), 1,09 (t, 3H, J = 7,0 Hz).

[0082] RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169,9 (C), 169,5 (C), 156,2 (C), 152,4 (CH), 148,9 (C), 148,0 (C), 145,3 (C), 145,0 (C), 140,5 (CH), 134,0 (CH), 128,8 (CH), 126,2 (CH), 124,0 (CH), 123,4 (C), 120,8 (CH), 111,4 (CH), 88,3 (CH), 83,9 + 83,6 (CH), 75,7 (CH), 72,3 (CH), 48,7 + 48,6 (CH₂), 44,8 + 44,5 (CH₂), 36,4 (CH₂), 12,0 (CH₃). HRMS (ESI-) calculado para C₂₈H₃₀N₈O₉P [M-H]⁻ 653,1873, encontrado 653,1877.

Ejemplo 2: Ensayos enzimáticos

2.1 inhibición por YL3 de la formación de NO catalizada por nNOS

Protocolo del experimento

[0083] Las tasas iniciales de síntesis de NO se determinaron a 37 °C en cubetas de longitud de trayectoria de 1 cm usando el ensayo de oxihemoglobina para NO (Murphy y Noack, *Methods Enzymol.* 1994, 233, 240-50). Se realizaron mezclas de incubación habituales en un volumen total de 150 µl que contienen tampón Hepes 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M complementado con DTT (5 mM), oxihemoglobina (10-20 µM), 1000 U/ml cada una de SOD y catalasa, H₄B (10 µM), L-arginina (100 µM), CaCl₂ (1 mM), CaM (10 µg/ml), NADPH (normalmente 1 mM), y concentración creciente de YL3 (0-100 µM). Las mezclas se incubaron previamente durante 2 min a 37 °C antes de inicio de la reacción mediante la adición de alícuotas de 2-5 µl de nNOS (50-70 nM) a la cubeta de muestra. La conversión mediada por NO de oxihemoglobina en metemoglobina se controló en un espectrofotómetro Uvikon 941 mediante barrido repetitivo entre 380 y 480 nm cada 0,2 min y se cuantificó usando un coeficiente de extinción de 77 mM⁻¹.cm⁻¹ entre el pico en 401 nm y el valle en 420 nm (Murphy y Noack, *Methods Enzymol.* 1994, 233, 240-50). La producción de NO fue lineal durante todo el tiempo de reacción. Se realizaron incubaciones de control en presencia de cantidades similares de tampón sin inhibidor, o en presencia de N^ω-NO₂-L-arginina 100 µM (un inhibidor potente de NOS) para determinaciones del fondo. Todos los valores se expresan con respecto al control y como la media ± D.T. de 3-4 experimentos.

Resultados del experimento

[0084] El estudio cinético realizado en presencia de varias concentraciones de NADPH (10, 25, 50 y 100 µM) e YL3 (0, 5, 25, 50 y 100 µM) muestra que la mezcla de YL3 modifica el valor de K_m aparente de NADPH sin efecto significativo en la V_m aparente (Figuras 2A, 2B). En un experimento habitual mostrado en la Figura 2, se obtuvo un valor de K_i de 17 µM para esta inhibición.

2.2 Inhibición mediante YL3 de la reducción de citocromo c catalizada por nNOS

Protocolo del experimento

[0085] Los efectos de YL3 en las tasas iniciales de reducción de citocromo c catalizada por nNOS se cuantificaron de forma espectrofotométrica midiendo el aumento de la absorbancia a 550 nm, usando un coeficiente de extinción de 21 mM⁻¹.cm⁻¹. Se realizaron condiciones de incubación convencionales en cubetas de longitud de trayectoria de 1 cm (volumen total de 150 µl) que contienen tampón Hepes 50 mM (pH 7,4), KCl 0,1 M, L-arginina (100 µM), CaCl₂ (1 mM), CaM (10 µg/ml), NADPH (100 µM), y concentración creciente de YL3 (0-100 µM) disuelta en tampón Hepes. Las mezclas se incubaron previamente durante 2 min a 37 °C antes del inicio de la reacción mediante la adición de alícuotas de 2-5 µl de nNOS.

Resultados del experimento

[0086] Los experimentos realizados en presencia de varias concentraciones de NADPH (10, 25, 50 y 100 µM) e YL3 (0, 5, 25, 50 y 100 µM) muestran que la mezcla de YL3 modifica el valor de K_m aparente de NADPH sin efecto significativo en la V_m aparente y se obtuvieron valores de K_i de 25 ± 5 µM (los datos no se muestran).

2.3 Inhibición mediante YL3 de formación de peróxido de hidrógeno con nNOS

Protocolo del experimento

[0087] El H₂O₂ liberada por nNOS se determina midiendo la oxidación de tiocianato ferroso a tiocianato férrico como se ha descrito anteriormente (Heinzel *et al.*, *Biochem J* 1992, 281, 627-30). La mezcla de reacción (volumen final de 100 µl) contenía NADPH (200 µM), CaCl₂ (1,0 mM), y CaM (10 µg/ml) en tampón Hepes 50 mM a pH 7,4. La incubación se inició mediante la adición de alícuotas de 2-5 µl de nNOS (50-70 nM) y se detuvo después de 10 min a 37 °C mediante la adición de 20 µl de HCl 6 M. Se añadieron 10 µl de NH₄SCN 0,5 M (en agua) y 50 µl de Fe(SO₄)₂ (recién preparado el agua desoxigenada) a la mezcla. Después de 10 min a temperatura ambiente, la absorbancia a 492 nm del complejo de tiocianato férrico formado mediante oxidación de H₂O₂ se leyó en un lector de microplacas. La liberación de H₂O₂ se determinó mediante comparación con una curva de calibración usando cantidades conocidas de H₂O₂ (0- 25 µM) en las mismas condiciones, excepto por la ausencia de nNOS. La concentración de H₂O₂ se determinó de forma espectrofotométrica usando ε_{240 nm} = 39,4 M⁻¹.cm⁻¹.

Resultados del experimento

[0088] Los experimentos muestran que la mezcla YL3 inhibe la formación de peróxido de hidrógeno en las condiciones de desacoplamiento de nNOS (los datos no se muestran).

2.4 Inhibición mediante YL3 de formación de superóxido con nNOS medido mediante inmovilización de espín y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica

[0089] En ausencia del sustrato L-arginina y cofactor H₄B, nNOS genera especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como H₂O₂ y anión superóxido que resultan de la reducción de dióxígeno por flavinas y mediante hierro del heme sin formación de NO (desacoplamiento). La generación de O₂⁻ por nNOS en varias condiciones se controló mediante

espectroscopía de EPR usando experimentos de inmovilización de espín en presencia de la nitrona cíclica BocMPO.
Protocolo del experimento

5 **[0090]** El de *N*-óxido 5-*terc*-butiloxicarbonil 5-metil-1-pirrolina de inmovilización de espín (BocMPO) se sintetizó
usando un procedimiento descrito (Zhao *et al.*, Free Radic Biol Med 2001, 31, 599-606). Una mezcla de incubación
habitual contenía NADPH 1 mM, CaCl₂ 1,0 mM, CaM (10 µg/ml), y BocMPO 50 mM en tampón Hepes 50 mM a pH
7,4. Se mezclaron 5-10 µl de nNOS (100-150 nM) con la mezcla anterior que se transfirió rápidamente en una celda
demuestra Aqua-X equipada con una cavidad shq001 (Bruker, Wissembourg, Francia). La acumulación de datos
comenzó inmediatamente. Todas las medidas se realizaron a 21 °C en un espectrómetro EPR Elexsys 500 de
10 Bruker funcionando a frecuencia de la banda X (9,82 GHz). Se usaron los siguientes ajustes del instrumento:
frecuencia de modulación del campo, 100 kHz; amplitud de modulación del campo, 0,2 mT; constante de tiempo,
0,081 s; potencia de microondas, 5,1 mW; tiempo de barrido, 41,9 s; número de barridos, 27. Los espectros de
BocMPO-OOH y BocMPO-OH se identificaron por comparación con incubaciones realizadas en presencia de
15 xantina/xantina oxidasa (para BMPO-OOH) como se ha descrito anteriormente (Zhao *et al.*, Free Radic Biol Med
2001, 31, 599-606). Como se esperaba, el aducto de espín BocMPO-OOH se descompuso espontáneamente en el
aducto de espín BocMPO-OH con una vida media de aproximadamente 15 min, y su formación se eliminó
completamente en presencia de SOD. Las cantidades relativas de aductos BocMPO-OOH y BocMPO-OH
observados en las mezclas de incubación se calcularon mediante simulaciones con el software X-sophe (Bruker).
20 Los segundos picos de los aductos BocMPO-OOH y BocMPO-OH se superponen (máximo, 348,8 mT; mínimo,
349,2 mT), y la amplitud de este pico se usó para cuantificar las cantidades de superóxido generado en las
incubaciones de los inventores. La expresión "aducto de espín BocMPO-OOH" se usará en lugar de "aductos de
espín BocMPO-OOH y BocMPO-OH" por razones de brevedad.

Resultados del experimento

25 **[0091]** En ausencia de L-arginina y H₄B, los elementos de 4 líneas característicos que corresponden al aducto de
espín BocMPO-OOH (un nitróxido) se observaban claramente (Figura 3B) y su intensidad aumentó de una manera
dependiente del tiempo (Figura 3A). La tasa de formación del aducto de espín BocMPO-OOH se redujo fuertemente
mediante la adición de L-arginina 100 µM y H₄B 10 µM (los datos nos muestran). Como se observa en la Figura 3A,
30 la adición de YL3 15 µM a la mezcla de reacción redujo de forma significativa la tasa de formación de la señal de
EPR del aducto de espín BocMPO-OOH y la adición de YL3 100 µM eliminó totalmente su señal de EPR sin
formación de otras especies paramagnéticas.

35 *Ejemplo 3: Efectos de YL3 en la producción de anión superóxido a partir de arcos aórticos aislados medidos
mediante inmovilización de espín de EPR*

Protocolo del experimento

40 **[0092]** La formación de O₂⁻ a partir de arcos aórticos aislados se sometió ensayo mediante inmovilización de espín
de EPR usando cloruro de 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-il-trimetilamonio (CAT1-H, Alexis Biochemical Inc.).
Las aortas torácicas se diseccionaron a partir de ratones C57BL/6 anestesiados (macho, 15 semanas de edad),
limpios de tejidos conectores y grasa, y se corta en anillos pequeños (de aproximadamente 2 mm de longitud). Los
arcos aórticos se incubaron previamente en tampón KREBS-DTPA-Hepes (0,1 mmol/litro de DTPA, 10 mmol/litro de
45 HEPES, pH 7,5), y, después de la adición de CAT1-H (5 mM) e YL-3 (10 µM) o vehículo, se insertaron en capilares
(micropipetas, 50 µl, Blaubrand ®) que se colocaron directamente en el resonador del espectrómetro EPR de banda
X de CW (Magnettech MiniScope MS200), equipado con un controlador de temperatura (37 °C). La formación del
radical (CAT1) se controló durante 20 minutos y la tasa de formación de anión superóxido se cuantificó después de
sustracción de la señal basal y normalización a peso de tejido seco.

50 *Resultados del experimento*

[0093] Los experimentos *ex vivo* realizados en arco aórtico de ratones muestran que la mezcla de YL3 (10 µM)
inhibe la síntesis de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las ROS sintetizadas se pueden detectar después de la
reacción con hidroxilamina CAT1-H que se oxida a nitróxido de CAT1 medido por EPR. El resultado presentado en la
55 Figura 4 muestra que YL3 inhibe la producción de superóxido dependiente de NADPH a partir de la actividad de la
NADPH oxidasa de NO-sintasas y de otras enzimas que dependen de la presencia de NADPH en vasos.

Ejemplo 4: Métodos espectroscópicos: caracterización de YI3 libre o unido a NOS

60 *4.1 Protocolos del experimento:*

Espectro de absorción

[0094] El espectro de absorción UV-visible se realizó con un espectrofotómetro XL de Uvikon.

65

Fluorescencia de 1 fotón *in vitro*

5 [0095] Los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia de un fotón se registraron en un espectrofluorimetro Eclipse (Varian), equipado con un soporte de celda con termostato, usando soluciones de 80 μ l aireadas colocadas en microceldas (Hellma, Francia). Los espectros de emisión se registraron con rendijas de excitación y emisión ajustadas a 5 nm.

Fluorescencia de 2 fotones *in vitro* y determinación de sección transversal de 2 fotones

10 [0096] Los espectros de excitación y de emisión de dos fotones se registraron usando una preparación realizada en las instalaciones que consiste en un láser ajustable de Ti:Zafiro Mai Tai® bloqueado en modo 80 MHz (690-1040 nm, pulso del láser de 100 fs, Spectra Physics, Mountain View, California) centrado en la muestra (80 μ l colocados en una microcelda de cuarzo). La fluorescencia de dos fotones se recogió a 90 grados y se filtró adicionalmente mediante un filtro FF01-842/SP de Semrock - para desviar la luz de excitación residual -. La señal de fluorescencia se centró en una fibra óptica conectada a un espectrógrafo digital SpectraPro-275 (300 líneas/mm) acoplado a un detector de CCD enfriado con nitrógeno líquido (1024 x 256 píxeles; Princeton Instruments, Acton, Massachusetts). La calibración de la longitud de onda del espectrógrafo se realizó usando una lámpara de mercurio a alta presión. La potencia de excitación se ajustó entre 50 y 100 mW y el tiempo de adquisición estaba entre 1 y 60 s.

20 4.2 Resultados del experimento

25 [0097] **Propiedades espectroscópicas y de fluorescencia de YL3** - E YL3 disuelto en DMSO se caracterizó mediante máximo de absorción a 460 nm (coeficiente de extinción molar, $21.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Después de excitación a 460 nm, se encontró que YL3 era fluorescente en DMSO con un pico de emisión centrado a 740 nm. Sin embargo, la emisión de fluorescencia era fuertemente sensible a la polaridad del disolvente y en agua o tampón Tris a pH 7,5, la emisión de fluorescencia era muy débil. El mismo comportamiento se observó con excitación de dos fotones ($\lambda_{\text{ex}} = 940 \text{ nm}$) con una emisión de fluorescencia de dos fotones significativa de YL3 centrada a 740 nm, observada solamente en DMSO mientras que no se evidenciaba en misión en tampón Tris a pH 7,5. Se encontró que la sección transversal de dos fotones era igual al 50 GM en DMSO (los datos nos muestran).

30 [0098] **Propiedades de fluorescencia del complejo YL3-NOS** - En condiciones de excitación de un fotón, las propiedades de emisión del complejo YL3-NOS eran bastante difíciles de interpretar debido al solapamiento entre la fluorescencia intrínseca de NOS y la fluorescencia de YL3. Como la fluorescencia de dos fotones de proteína NOS es intrínsecamente débil, la emisión de dos fotones era más apropiada para controlar la recuperación de fluorescencia de YL3 después de la unión a NOS. De hecho, como se muestra en la Figura 5A, la fluorescencia de NOS no era detectable después de excitación de los fotones. La Figura 5A también confirma que YL3 no es fluorescente en tampón Tris. Sin embargo, la emisión de fluorescencia de YL3 aumentaba continuamente en presencia de nNOS. Dado que la contribución de nNOS al espectro general es insignificante, la intensidad de emisión representa la formación del complejo YL3-NOS.

35 Ejemplo 5: Formación de imágenes de 2 fotones y formación de imágenes de Epifluorescencia de células HUVEC

5.1 Protocolo de microscopía de dos fotones

45 [0099] La microscopía de dos fotones se realizó usando el microscopio confocal TCS-SP2 de Leica equipado con un láser de infrarrojos pulsado con femtosegundos Mai-Tai de Spectra-Physics de 10 vatios (720-920 nm) como la fuente de excitación. La longitud de onda de excitación fue 840 nm (Emisión: 500-650 nm).

50 [0100] La formación de imágenes de epifluorescencia se realizó usando la lámpara de Hg del microscopio confocal TCS-SP2 de Leica (Excitación: 450-490 nm - Emisión: 500-650 nm).

5.2 Resultados de la microscopía de dos fotones

55 [0101] La penetración de YL3 en células HUVEC se puede observar muy rápidamente, justamente unos pocos minutos después de la incubación de células con el compuesto YL3 y la señal intracelular óptima se obtuvo con YL3 5 μ M (Figura 6A). La señal de fluorescencia citoplasmática es heterogénea. La heterogeneidad de la señal fluorescente se puede confirmar mediante espectros de emisión distintos que se obtienen de acuerdo con zonas observadas (figura 6B).

60 Ejemplo 6: Viabilidad celular y estudios vasculares

6.1 Protocolo del ensayo de viabilidad celular usando el reactivo MTT

65 [0102] Las células HUVEC (endotelial) y **A7r5** (vascular liso) (3×10^4 células/pocillo) se cultivaron en placas de 12 pocillos a 37 °C durante 1 día en MEM. Se añadieron diluciones en serie de YL3 (1 μ M-1 μ M) se añadieron a las células que se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 24 o 48 horas. El análisis de MTT se realizó basándose en

el método convencional, como se ha descrito anteriormente [véase a continuación]. Al final de la cinética, se añadieron 20 µl de reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio, 7,5 mg/ml, Sigma) a las células y adicionalmente se incubaron a 37 °C durante 1 h. Después de lavado celular, se añadieron 100 µl de DMSO en cada pocillo. La Absorbancia se midió a 560 nm con sustracción del valor del blanco a 670 nm usando un Lector de Placas Wallac (PerkinElmer). Además, se cambió se realizaron ensayos que usan el reactivo violeta de cristal que detecta células vivas y el crecimiento celular se registró (con termostato a 37 °C) mediante videomicroscopía (AxioCam). La viabilidad celular se determinó usando el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). El MTT se reduce en células metabólicamente activas para producir un producto de formazano color púrpura insoluble. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos con diversas concentraciones de YL3 (1, 3, 10, 30, o 100 µmol/l). Después de 2 h de incubación, se añadieron 100 µl por pocillo a una solución de MTT (5 mg/ml) y se incubó a 37 °C en la oscuridad. Cuatro horas más tarde, los sobrenadantes se descartaron y se añadieron 100 µl de DMSO por pocillo para disolver el formazano durante 10 minutos. La absorbancia se midió a 570 nm y 630 nm usando un lector de placas de múltiples pocillos (Modelo VICTOR™ X4, PerkinElmer).

[0103] Para cada condición, el número de células se evaluó usando la siguiente ecuación:

$DO_{\lambda 570} \text{ muestra} - (DO_{\lambda 630} \text{ muestra} + DO_{\lambda 570} \text{ blanco})$; y los resultados se expresaron como porcentaje con respecto a la condición de control.

6.2 Número de Células y protocolos de Ensayos de Viabilidad Celular (segundo)

[0104] El número de células se evaluó mediante tinción con violeta de cristal. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron con diversas concentraciones de YL3 (1, 3, 10, 30, o 100 µmol/l). Después de 2 h de incubación, las células se tiñeron durante 15 min con 100 µl de una solución de violeta de cristal de 2 mg/ml (en agua destilada). Después de aspiración cuidadosa de la solución de violeta de cristal, las placas se lavaron abundantemente con agua, y se secaron al aire antes de la solubilización del colorante unido con 100 µl de DMSO durante 10 min en la oscuridad. La Absorbancia se midió a 570 nm y 630 nm usando un lector de placas de múltiples pocillos (Modelo VICTOR™ X4, PerkinElmer).

[0105] Para cada condición, el número de células se evaluó usando la siguiente ecuación:

$DO_{\lambda 570} \text{ muestra} - (DO_{\lambda 630} \text{ muestra} + DO_{\lambda 570} \text{ blanco})$; y los resultados se expresaron como porcentaje con respecto a la condición de control.

6.3 Protocolo de estudios de reactividad vascular

[0106] El Cloruro potásico (KCl), Acetilcolina (Ach), y Catalasa (CAT) se obtuvieron en Sigma-Aldrich y se disolvieron en agua destilada para preparar soluciones de reserva.

[0107] En estos experimentos se usaron ratones C57BL/6J macho de 15 semanas de edad (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia). Los ratones anestesiaron con inyección de Ketamina/xilasina antes de sacrificarlos y se retiraron arterias de aorta y se montaron en un miógrafo de alambre. En resumen, los vasos se montaron en dos alambres de acero inoxidable de 40 mm en las mordazas de un sistema de miógrafo de múltiples alambres (Modelo 610M, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dinamarca) y los baños de miógrafo se llenaron con solución salina fisiológica (PSS) con la siguiente composición: NaCl 130 mM, KCl 4,5 mM, MgSO₄ 1,05 mM, NaHCO₃ 20,2 mM, CaCl₂ 1,35 mM, KH₂PO₄ 0,35 mM y glucosa 11 mM. La PSS se calentó a 37 °C y se burbujó con O₂ al 95%/CO₂ al 5% para mantener un pH fisiológico de 7,4. Las características de longitud-tensión se obtuvieron mediante el software del miógrafo (Myodaq 2.01) y sobre la base de estas, se cargaron arterias de aorta hasta una tensión equivalente a una presión *in vivo*. A continuación, se dejó que los vasos se equilibrarán en estas condiciones durante 1 h, tras lo que se estimularon con 50 mmol/l de KCl y se formó una curva de concentración-respuesta con una sola dosis de Ach (10 µM). a continuación, los vasos se lavaron y se incubaron previamente en presencia o ausencia de 500U/ml de catalasa durante 20 minutos. Se realizó una nueva curva de contracción con 50 mmol/l de KCl y una vez que se consiguió una contracción máxima, se añadió una sola dosis de YL3 (10 µM) se añadió y se registraron los cambios en la tensión durante 2 horas. Al final, se formó una curva de concentración-respuesta con una sola dosis de Ach (10 µM). Las respuestas de relajación con Ach se expresaron como porcentaje de relajación con respecto a contracción con KCl. Todos los experimentos se realizaron en presencia de indometacina (10 µmol/l). Los resultados se expresan como media ± ETM y n refleja el número de animales. Las diferencias significativas entre grupos se calcularon con ANOVA seguido de un ensayo de Bonferroni. p < 0,05 se consideró significativo.

6.4 Resultados:

[0108] En presencia de catalasa, el inhibidor de cicloxigenasa y una concentración extracelular de potasio elevada, la relajación de arcos aórticos de ratones, inducida mediante la estimulación de receptores muscarínicos solamente descansa en el NO producido por células endoteliales. En esta situación, el YL3 inhibe la relajación inducida por

acetilcolina, tal como se espera para un inhibidor de (Figura 7). YL3 no puede modificar la viabilidad de células endoteliales (HUVEC). Se puede detectar una inhibición débil del metabolismo mitocondrial de células de músculo liso.

5 Ejemplo 7 : *Ensayos de Angiogénesis*

[0109] 7.1: *protocolo*: Para evaluar *in vitro* el proceso angiogénico, se usó un ensayo de formación de red endotelial (por ejemplo, siembra de célula endotelial (EC) en Matrigel) como se ha indicado anteriormente (14,20). La reorganización de EC en estructuras de tipo capilar se observó usando un microscopio de contraste de fase invertida y la longitud de la red endoteliales se cuantificó mediante análisis de imágenes capturadas aleatoriamente mediante un sistema de cámara de vidrio. Debido a diferencias de combinación inevitables en la composición de Matrigel privado de factor de crecimiento (por ejemplo, en la capacidad proangiogénica basal del Matrigel), la extensión de la red endotelial en las diferentes condiciones sometidas a ensayos siempre se comparó dentro de un mismo conjunto de experimentos y los valores relativos se usaron para comparaciones interensayos.

[0110] En estos experimentos se usaron 3-5 pasajes de Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC).

[0111] Los resultados se expresan como porcentaje de red endotelial \pm ETM con respecto a la condición de control y n refleja el número de experimentos.

[0112] Se calcularon diferencias significativas entre grupos mediante ANOVA seguido de un ensayo de Bonferroni.

[0113] $P < 0,05$ se consideró significativo.

7.2 *Resultados*: Las diferencias significativas entre grupos mostraron el efecto antiangiogénico de YL3 en un ensayo de angiogénesis (Figura 8).

Ejemplo 8: *Estudio de la formación de imágenes de NS1 y colocalización con marcadores de orgánulos subcelulares y un anticuerpo monoclonal con respecto a eNOS*

[0114] Formación de imágenes de NS1 en células endoteliales: La selectividad de la fluorescencia de NS1 para NOS constitutivas llevó a los inventores a someter a ensayo si NS1 resaltaría eNOS de forma específica en células vivas. Una rápida absorción de NS1 (máximo de 10 min en incubación) con células endoteliales de vena umbilical humana vivas (HUVEC) se controló fácilmente después de excitación en el infrarrojo cercano, mostrando la idoneidad de NS1 para estudios de fluorescencia de 2-PE de células vivas (Fig. 9). El NS1 unido presentaba una fluorescencia intensa en el citoplasma, especialmente en la región perinuclear y - en menor medida - en la membrana celular (Fig. 9a, 11a,d). Los puntos en las membranas celulares eran prominentes a confluencia celular elevada, en acuerdo con el papel de eNOS en el mantenimiento de uniones estrechas de célula a célula. La localización subcelular de NS1 dentro de los orgánulos se investigó adicionalmente a continuación mediante experimentos de colocalización. NS1 se colocalizó principalmente con el aparato de Golgi identificado mediante rastreador específico de Golgi (Fig. 9e-h). NS1 no se colocalizó con el retículo endoplasmático, núcleo celular o mitocondria mientras que se observó solamente una co localización parcial con él en dos o más temprano (EEA1) (Fig. 10). Las dos ubicaciones principales de NS1 (Golgi y membrana plasmática) son compatibles con la localización subcelular de eNOS. Usando inmunotinción específica de eNOS combinada con formación de imágenes de uno (Fig. 11a-c) o dos fotones (Fig. 11d-f) de NS1, los inventores observaron una colocalización excelente de NS1 y eNOS, en la región perinuclear y al nivel de la membrana plasmática, mostrando que NS1 realmente se dirige a eNOS en células HUVEC. Dado que el proceso de 2-PE evitaba la autofluorescencia celular, la relación de señal con respecto a ruido era notablemente superior usando formación de imágenes de dos fotones en comparación con la de un fotón, según se considera mediante la zona de colocalización más restringida obtenida usando $\lambda_{ex} = 840$ nm en lugar de 488 nm.

Ejemplo 9: *Efecto de de NS1 en la formación de superóxido con células RAW 264.7 estimuladas con PMA*

[0115] La generación de superóxido mediante células RAW 264.7 estimuladas con éster de forbol se controló mediante espectroscopía de EPR usando experimentos de inmovilización de espín en presencia de la nitrona cíclica DEPMPO.

[0116] 9.1: *Protocolo*: Las células se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% en 5 ml de medio DMEM recién preparado que contiene FCS al 5% y 12-miristato-13-acetato de forbol 10 μ M (PMA, de Sigma). Estas se lavaron dos veces con 5 ml de PBS y se añadió 1 ml de una mezcla de tripsina / EDTA para separar las células. Después de un periodo de incubación de 7 min a 37 °C, las células se recogieron en 4 ml de DMEM que contiene FCS al 5%, se centrifugaron durante 5 min a 900 g y 4 °C. El sedimento celular se volvió a suspender en 5 ml de PBS, se hizo recuento, y se centrifugó de nuevo durante 5 min a 900 g y 4 °C. El sedimento se volvió a suspender en 97 ml de PBS que contiene DTPA 100 μ M, DEPMPO 25 mM, y concentraciones variables de NS1. La suspensión se transfirió en un tubo de teflón permeable al gas y se insertó en una cavidad shq001. La acumulación de datos comenzó inmediatamente. Las medidas se realizaron a 21 °C en un espectrómetro EPR

5 Elxsys 500 de Bruker funcionando a frecuencia de la banda X (9,82 GHz). Se usaron los siguientes ajustes de instrumento: frecuencia de modulación del campo, 100 kHz; amplitud de modulación del campo, 0,2 mT; desviación del campo: 12 mT; campo central: 348 mT; constante de tiempo, 0,081 s; potencia de microondas, 10 mW; tiempo de barrido, 41.9 s; número de barridos, 40. El espectro de DEPMPO-OOH se identificó por comparación con incubaciones realizadas presencia de xantina/xantina oxidasa. Las cantidades relativas de aductos de DEPMPO-OOH y DEPMPO-OH observados en las mezclas de incubación se calcularon mediante simulaciones con el software X-sophe (Bruker).

10 **[0117] 9.2: Resultado:** La incubación es de células RAW 264.7 estimuladas con PMA en presencia de DEPMPO condujo a la formación de los elementos de 8 líneas característicos correspondientes al aducto de espín DEPMPO-OOH (un nitroxido) y su intensidad aumentó de una manera dependiente del tiempo. Las cantidades del aducto de espín DEPMPO-OOH se redujeron de una manera dependiente de la concentración mediante la adición de NS1 y se midió un valor de Cl_{50} cercano a 25 μ M.

15 **Ejemplo 10: Efecto de NS1 en la formación de nitrito mediante células RAW 264.7 estimuladas con LPS + IFN- γ**

[0118] El tratamiento de células de macrófago RAW 264.7 con LPS y IFN- γ induce la expresión NOS inducibles. El nitrito, el producto final estable de NO, se cuantificó en medio de cultivo usando reactivos de Griess.

20 **[0119] 10.1 Protocolo:** La suspensión celular (100 μ l, $2,10+6$ células/ml) en medio DMEM recién preparado que contiene FCS al 5% se distribuyó en una placa de 96 pocillos y se añadieron 100 μ l de medio que contiene 160 U/ml de IFN- γ y 200 U/ml de LPS a cada pocillo que contiene diversas concentraciones de NS1 (introducido como 2 μ l de una solución concentrada x 100 en DMSO). Las incubaciones de control contenían la misma cantidad (1%) de DMSO). Las células se incubaron durante 15 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se hicieron reaccionar 100 μ l de medio con 100 μ l de sulfanilamida al 1% inicien microlitros de N-(1-naftil)etilendiamina al 0,1% (ambas en HCl 0,5 M). La absorbancia a 540 nm se leyó en un lector de 96 placas y la concentración de nitritos se determinó a partir de una curva patrón de nitrito sódico procesado en las mismas condiciones.

30 **[0120] 10.2: Resultados:** El ión nitrito acumulado en los sobrenadantes de células RAW 264.7 tratadas con LPS + IFN- γ y se detectaron aproximadamente $60 \pm 10 \mu$ M de NO₂⁻ en los sobrenadantes de células en presencia de DMSO al 1%. Esta acumulación se inhibió de una manera dependiente de la concentración mediante la adición de NS1 con un valor de Cl_{50} de $100 \pm 20 \mu$ M.

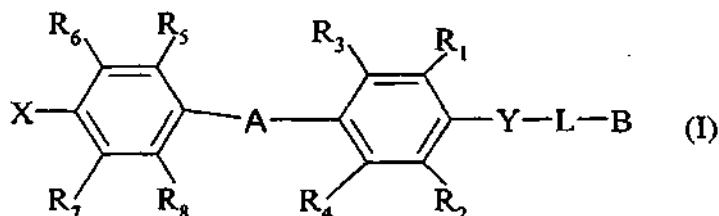
35 **Ejemplo 11: inhibición del NO formado con células BAEC (células endoteliales de arteria bovina) con NS1**

40 **[0121] 11.1 Protocolo:** Las células BAEC (células endoteliales de arteria bovina) se cultivaron hasta el pasaje 5 -7. Las células BAEC confluentes se incubaron durante una hora con o sin NS1 30 μ M en su estado basal o después de activación con ionóforo cálcico A23187 a la concentración de 2 μ M. El Fe(DETC) de inmovilización de espín se añadió a continuación a las células para inmovilizar el NO formado y el aducto Fe(DETC)-NO se cuantificó mediante espectroscopía de EPR (véase el método en: Gautier C. van Faassen E., Mikula I., Martasek P. y Slama-Schwok A.(2006) Biochem. Biophys. Res. Comm. 341 816-821 y Anatoly F. Vanin, Lonneke M. Bevers, Anny Slama-Schwok y Ernst E. van Faassen.(2007) Cellular and Molecular Life Sciences 96-103).

45 **[0122] 11.2 Resultados:** el NO formado mediante células BAEC activadas llegó a ser un 250% del formado en su estado basal. La adición de NS1 30 μ M a células activadas dio como resultado solamente un 150% de NO en comparación con el estado basal. En conjunto, el NS1 30 μ M dio como resultado una inhibición de un(60 ± 7)% del NO formado con células sin tratar (3 experimentos independientes), de acuerdo con la inhibición esperada de eNOS con NS1.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de fórmula I:



5

en la que:

(i) X representa un grupo aceptor de electrones, elegido entre el grupo que comprende:

10

- NO₂,
- CN,
- CHO,
- COOH,
- CF₃,
- F,
- CH=C(CN)₂,
- SO₃H,

15

20

- CONR₉R₁₀ o SO₂NR₉R₁₀, en los que R₉ y R₁₀ cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo,
- COR₉, en el que R₉ representa un hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o un grupo arilo, o
- un grupo tetrazolilo,

25

(ii) Y representa un grupo dador de electrones, elegido entre el grupo que comprende -NR₉-, -OC(R₁₉R₁₄)- o -SC(R₁₉R₁₄)-, en el que:- R₁₉ se elige entre:

30

- un hidrógeno,
- un grupo alquilo (C₁-C₈) lineal, en particular un etilo, estando dicho grupo alquilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados entre: grupo -OH, grupo -NH₂, grupo -COOH, grupo CONH-arilCOOH o grupo NHCO-aril-COOH o grupo NHCOarilsulfato, o grupo NHCOarilsulfonato, en los que el grupo arilo se elige entre fenilo, naftilo o bifenilo, o
- un grupo orgánico hidrosoluble, en particular PEG,

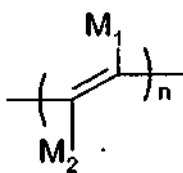
35

- R₁₄ representa un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con -OH.

40

(iii) A representa un enlace elegido entre el grupo que comprende:

- (a) -C≡C-, o
- (b)



45

en el que:

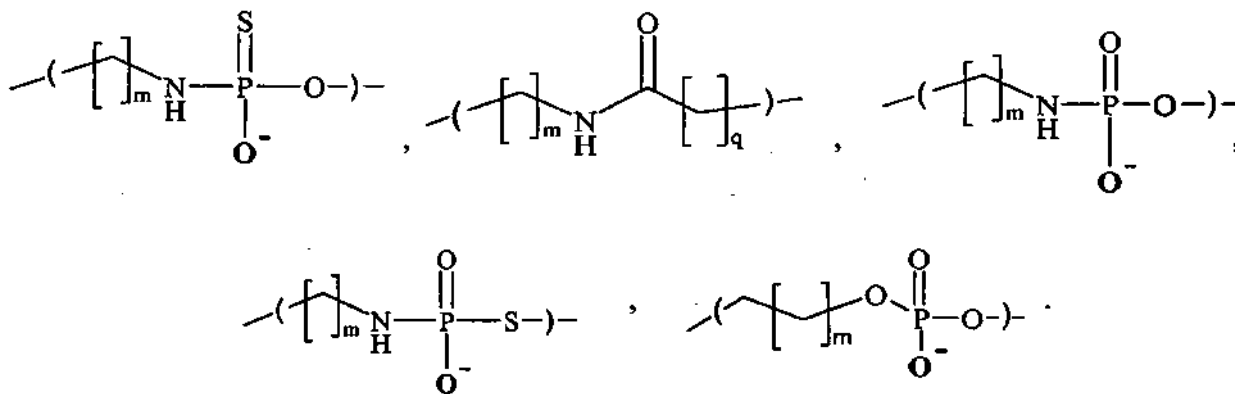
- M₁ y M₂ representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I,

- n es un número entero elegido entre 1, 2 o 3,

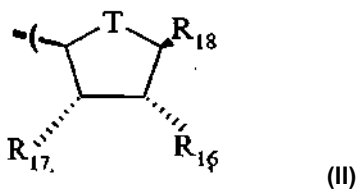
(iv) cada uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ o R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que comprende:

- 5
- H,
 - F, Cl, Br, I,
 - un alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes elegidos entre:
- 10
- OH,
 - NR₁₁R₁₂, en el que R₁₁ y R₁₂ cada uno representa independientemente del otro un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado, o
 - COOR₁₁, en el que R₁₁ representa un hidrógeno o un grupo alquilo (C₁-C₃) lineal o ramificado,
- 15
- CONHR₁₃ o NHCOR₁₃, en los que R₁₃ representa un grupo alquilo (C₁-C₄) lineal o ramificado,

(v) L representa un grupo espaciador seleccionado entre el grupo que comprende:



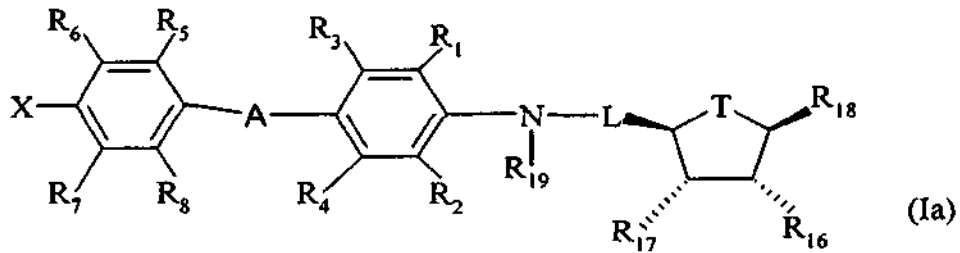
20 en los que m y q cada uno representa independientemente del otro un número entero elegido de 0 a 5, estando dichos grupos opcionalmente sustituidos con uno o más OH, (vi) B representa la siguiente fórmula II:



25 en la que:

- T representa un átomo de oxígeno, o un átomo de azufre, preferentemente un átomo de oxígeno;
 - R₁₆ y R₁₇ representa cada uno independientemente del otro OH, H₂PO₄, HSO₄, OPO₃(NH₄)₂, o cualquier sal de estos grupos fosfato o sulfato,
 - R₁₈ representa una base de purina o una base de pirimidina, en particular adenina, guanina, hipoxantina, timina, uracilo o citosina, preferentemente adenina, en formas isoméricas axiales o ecuatoriales, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.
- 30

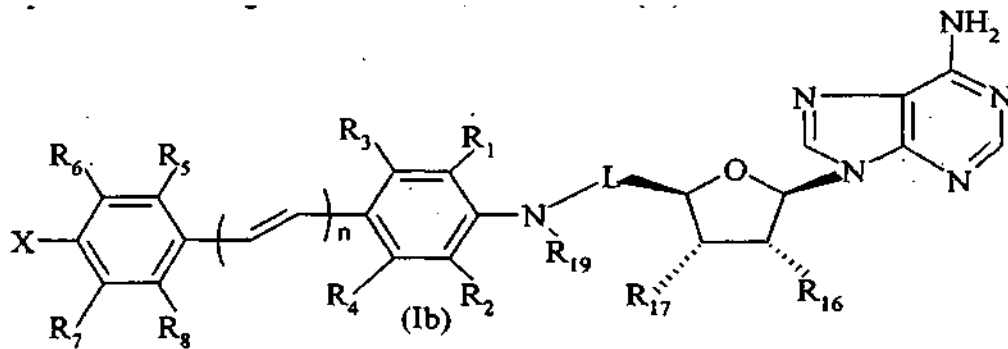
2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de fórmula (Ia):



5 en la que:

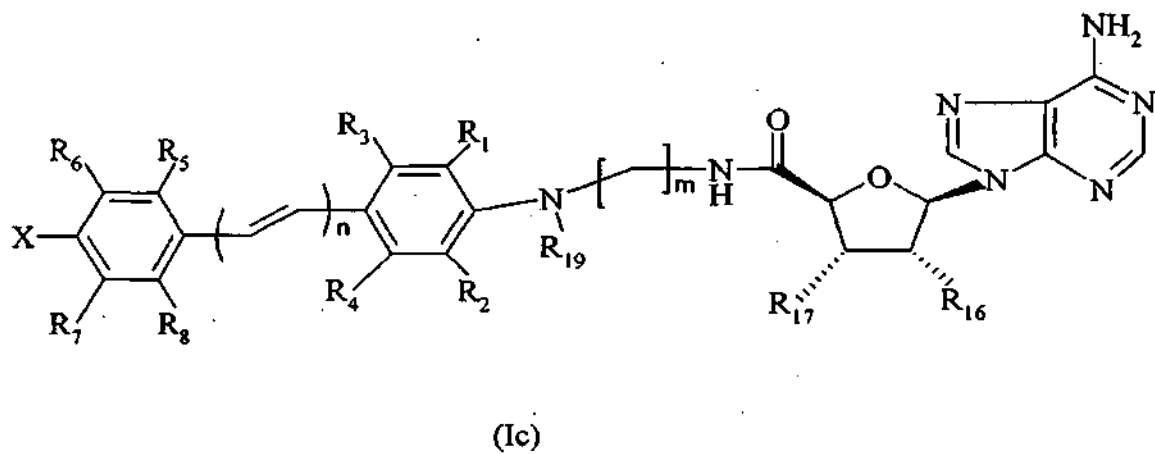
- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, X, A, L, T, R₁₆, R₁₇, R₁₈, R₁₉ son como se han definido la reivindicación 1.

10 3. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, de fórmula (Ib):
en la que:



15 - R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, X, L, n, R₁₆, R₁₇, R₁₉ son como se han definido la reivindicación 1.

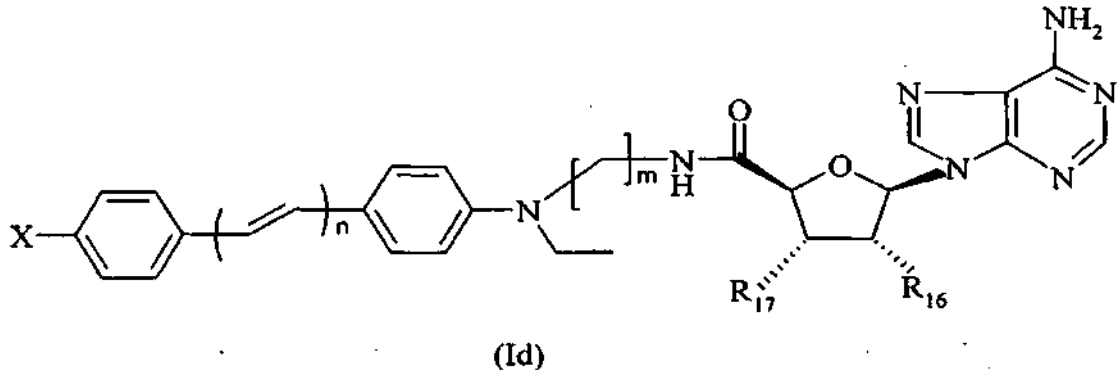
4. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, de fórmula (Ic):



20 en la que:

- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, X, n, m, R₁₆, R₁₇, R₁₉ son como se han definido la reivindicación 1.

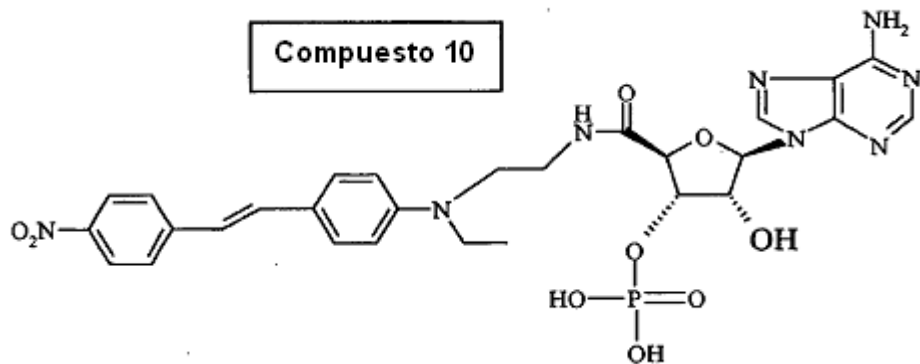
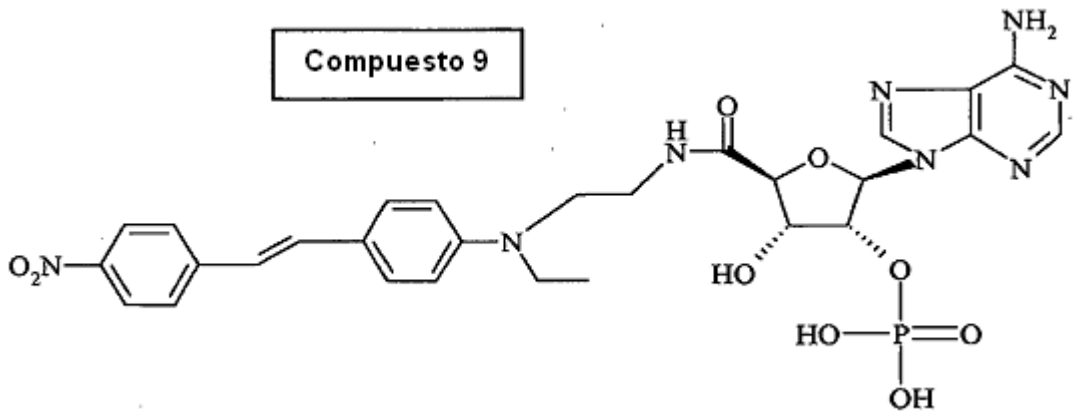
5. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, de fórmula (Id):



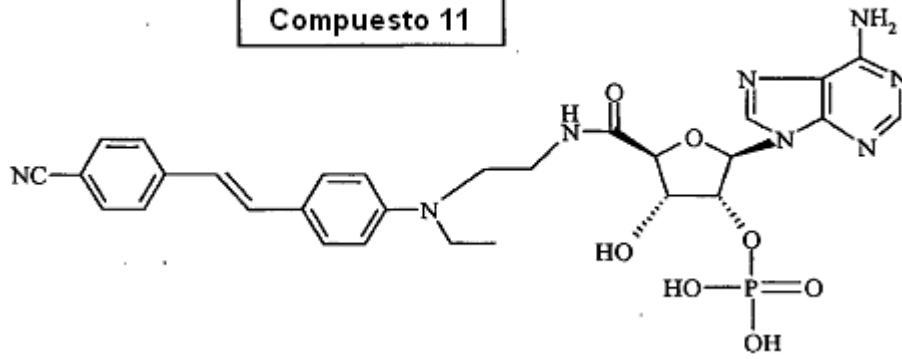
5 en la que:

- R₁₆, R₁₇, X, n, m son como se han definido la reivindicación 1.

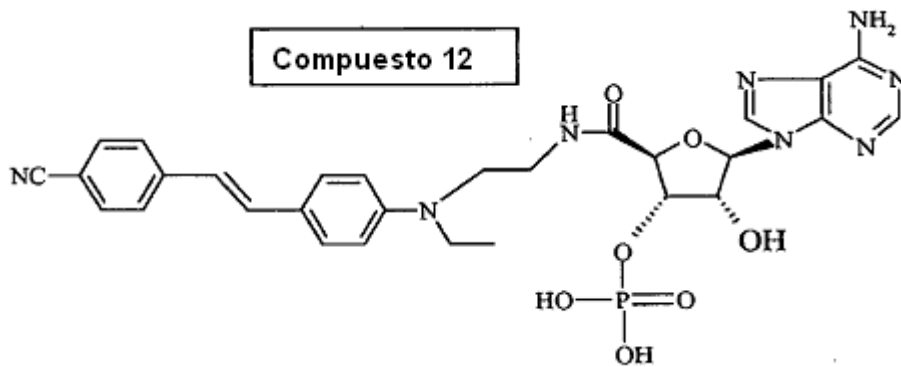
10 6. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1-5, de fórmula (Ia), seleccionado entre el grupo que comprende:



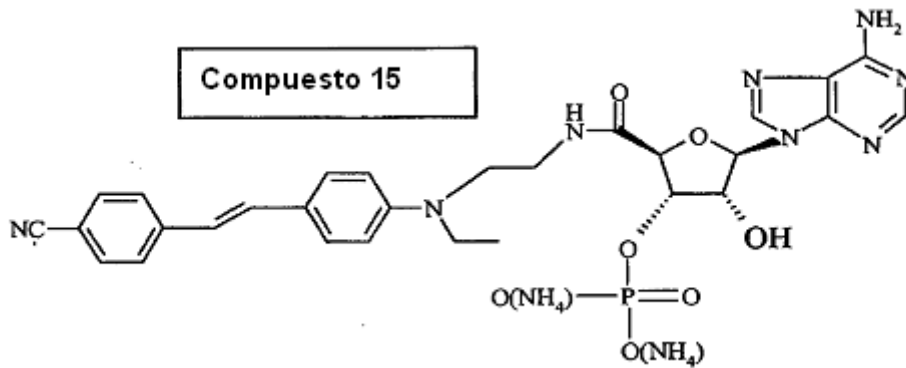
Compuesto 11



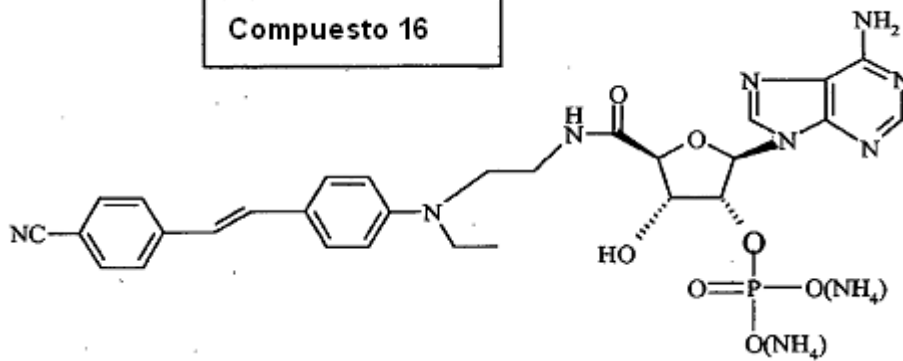
Compuesto 12



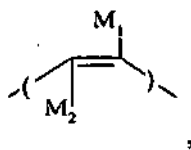
Compuesto 15



Compuesto 16

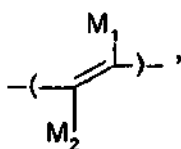


7. Compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizados por que** cuando el enlace A se representa mediante



5 en el que M₁ y M₂ representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I, dicho compuesto está en forma *cis* y es fotoactivable a la forma *trans*.

10 8. Compuestos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizados por que** cuando el enlace A se representa mediante



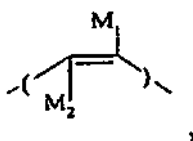
15 en el que M₁ y M₂ representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I, dicho compuesto está en forma *trans* biológicamente activa.

9. Compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso como un agente antiangiogénico en quimioterapia para el tratamiento de cánceres.

20 10. Uso de al menos un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8, como un agente de formación de imágenes para diagnóstico del cáncer.

25 11. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 o uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el cáncer es un cáncer superficial, elegido en particular entre melanomas, cánceres del tracto respiratorio superior, y cánceres del tracto aerodigestivo superior.

12. Composición fotoactivable que comprende un compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8, en el que el enlace A se representa mediante



30 y está en forma *cis*, o el enlace A está en forma tanto *cis* como *trans*, en el que M₁ y M₂ representan independientemente el uno del otro H, F, Cl, Br o I.

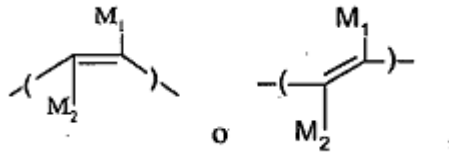
35 13. Composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en quimioterapia.

14. Composición de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 para su uso para aliviar un síntoma de cáncer superficial.

40 15. Método para inhibir una enzima elegida entre óxido nítrico sintasa, en particular óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico sintasa neuronal, óxido nítrico sintasa inducible, reductasas, en particular P450 reductasas, catalasas y NADHP oxidasas que comprende la etapa de:

(a) mezclar un compuesto de fórmula (Ia) de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el enlace A se representa mediante

45



en forma *cis* o mezcla *cis-trans* con una muestra biológica que contiene dicha enzima,
 (b) radiar con luz la muestra en condiciones apropiadas para transformar la forma *cis* en compuesto activo de dicha forma *trans*.

5

Figura 1A

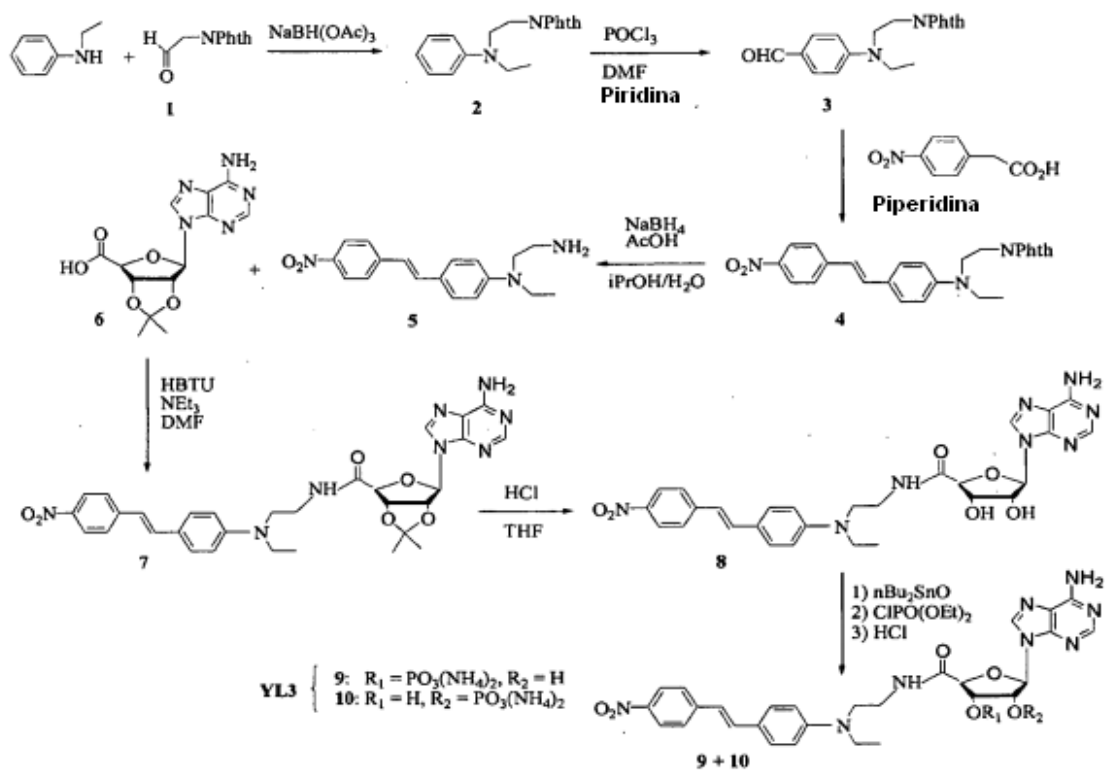


Figura 1B

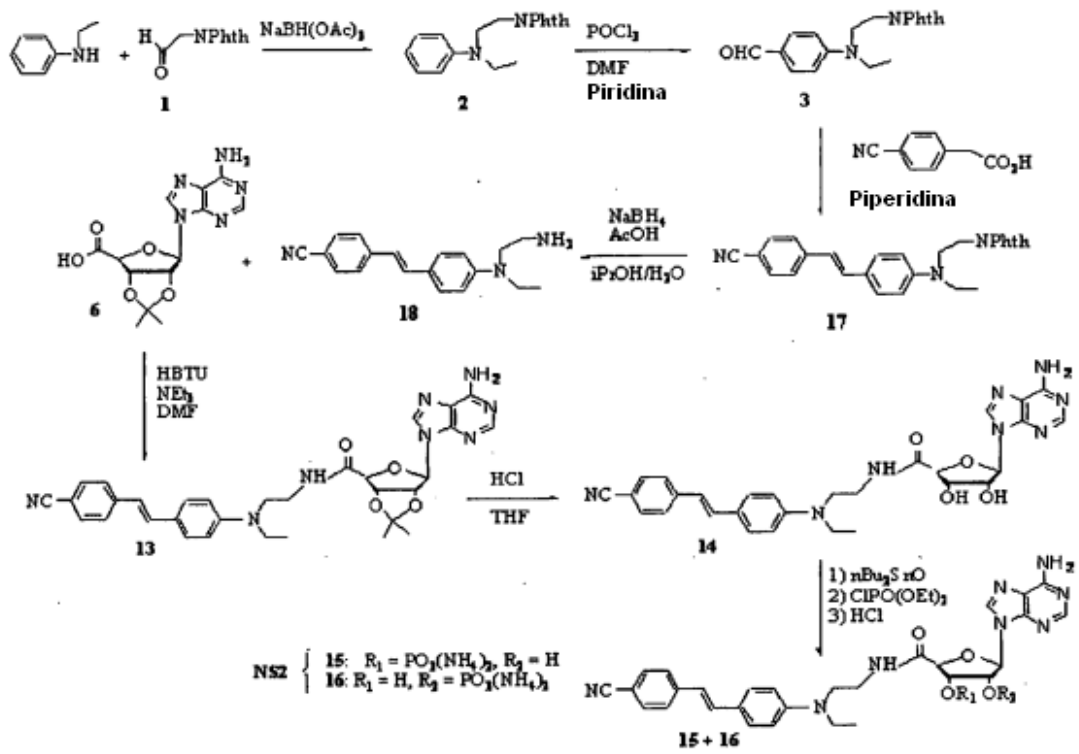


Figura 2A

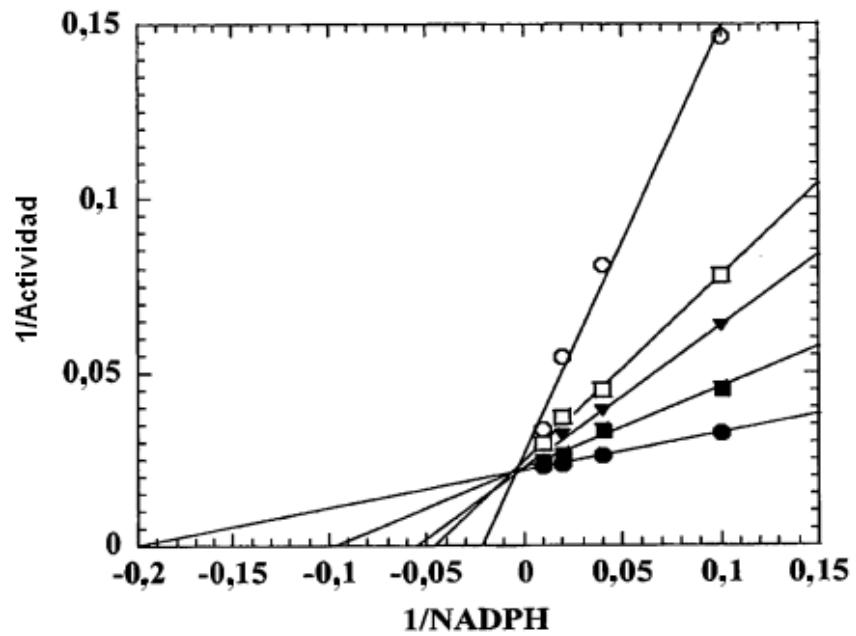


Figura 2B

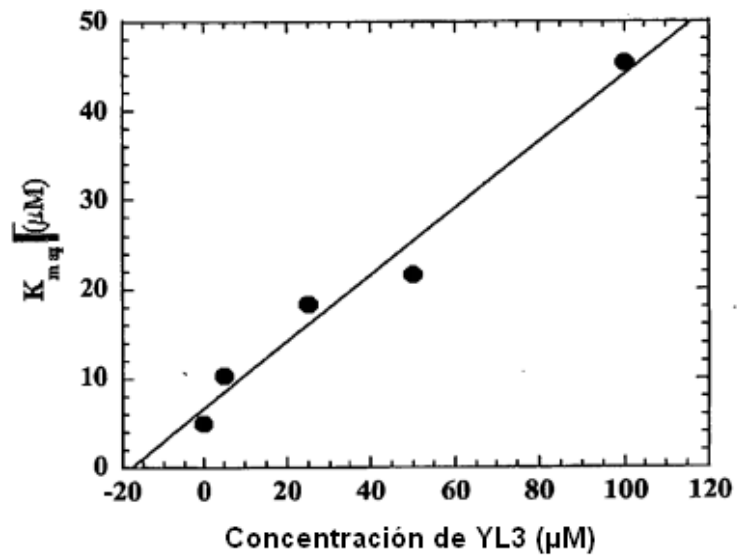


Figura 3A

A

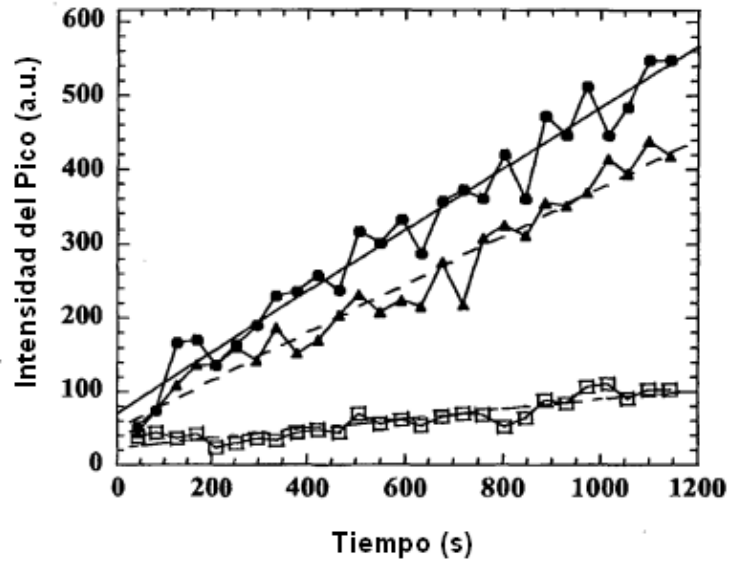


Figura 3B

B

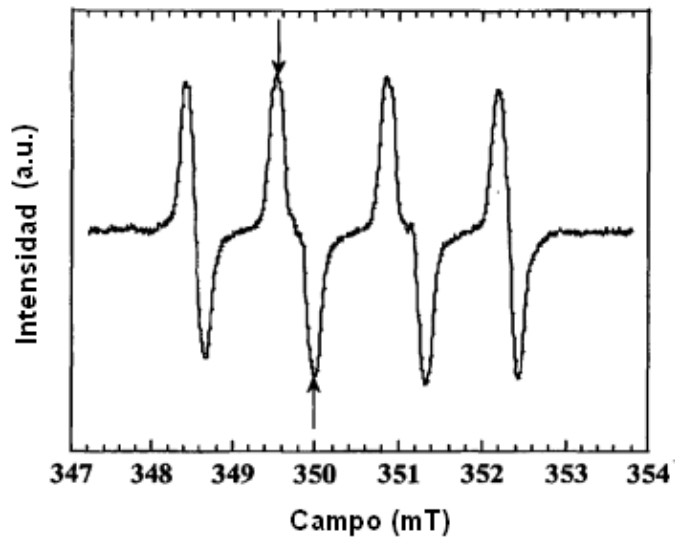


Figura 4 :

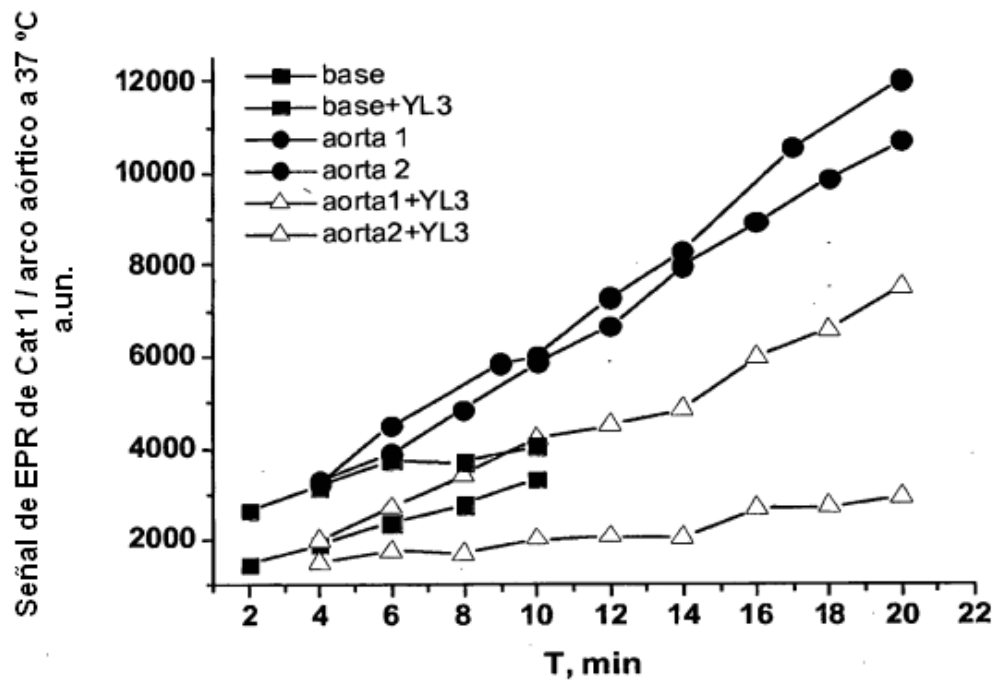


Figura 5A

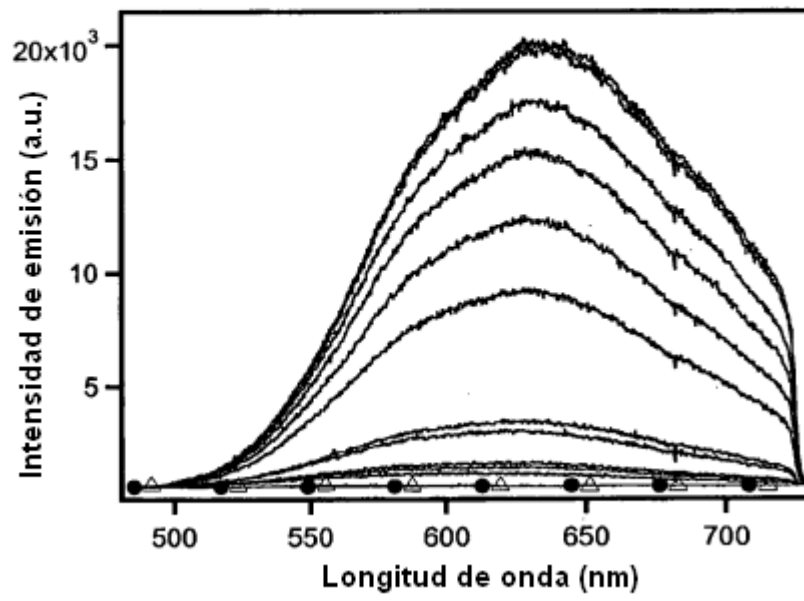


Figura 5B

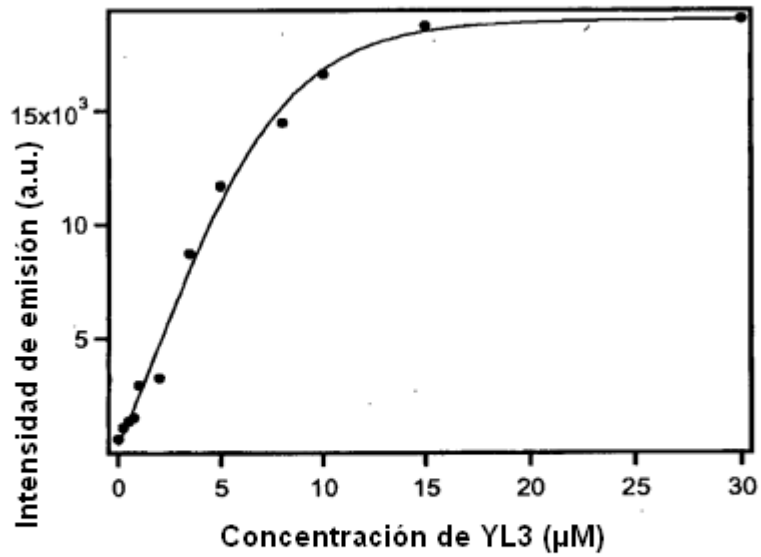


Figura 6A

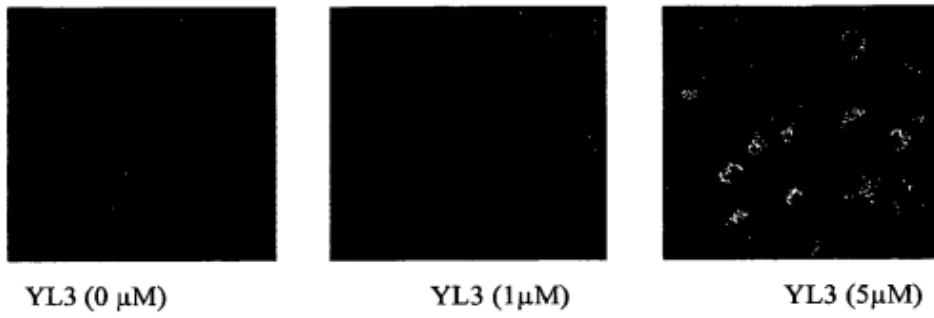


Figura 6B

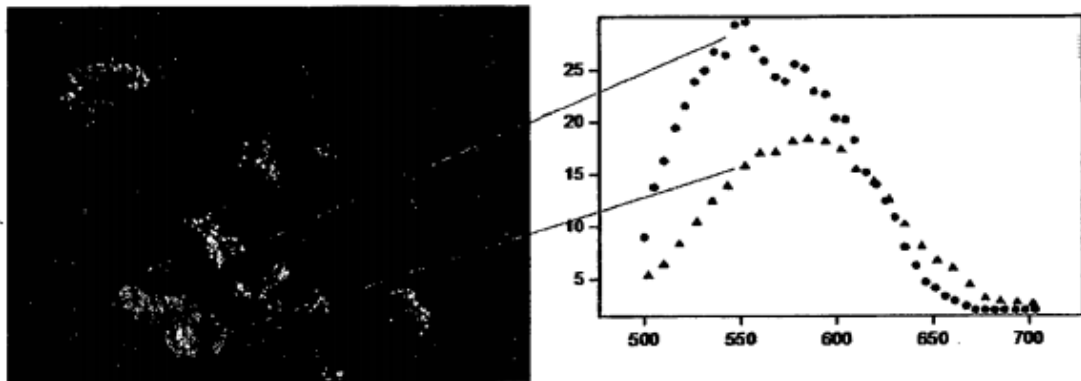


Figura 7 :

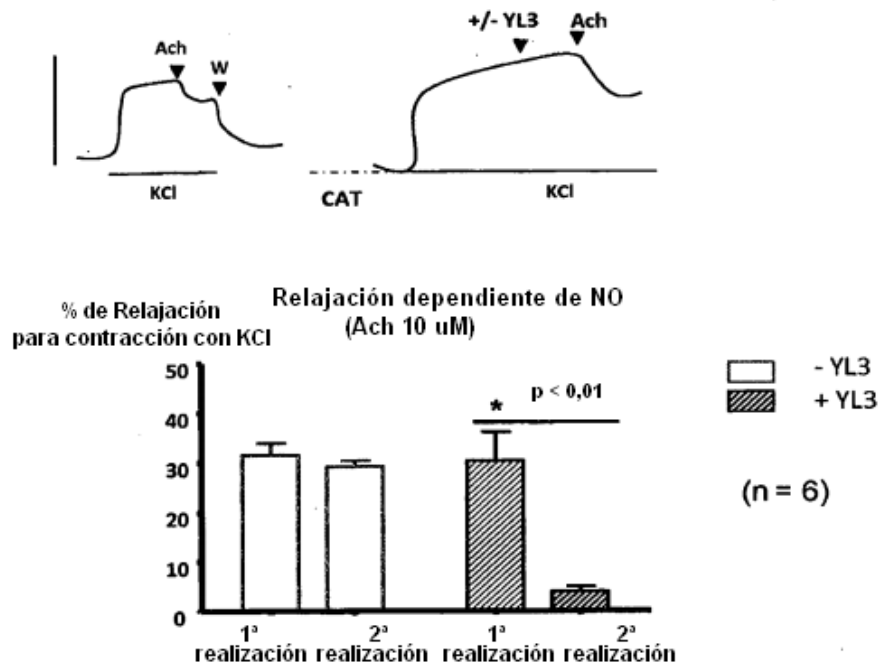


Figura 8

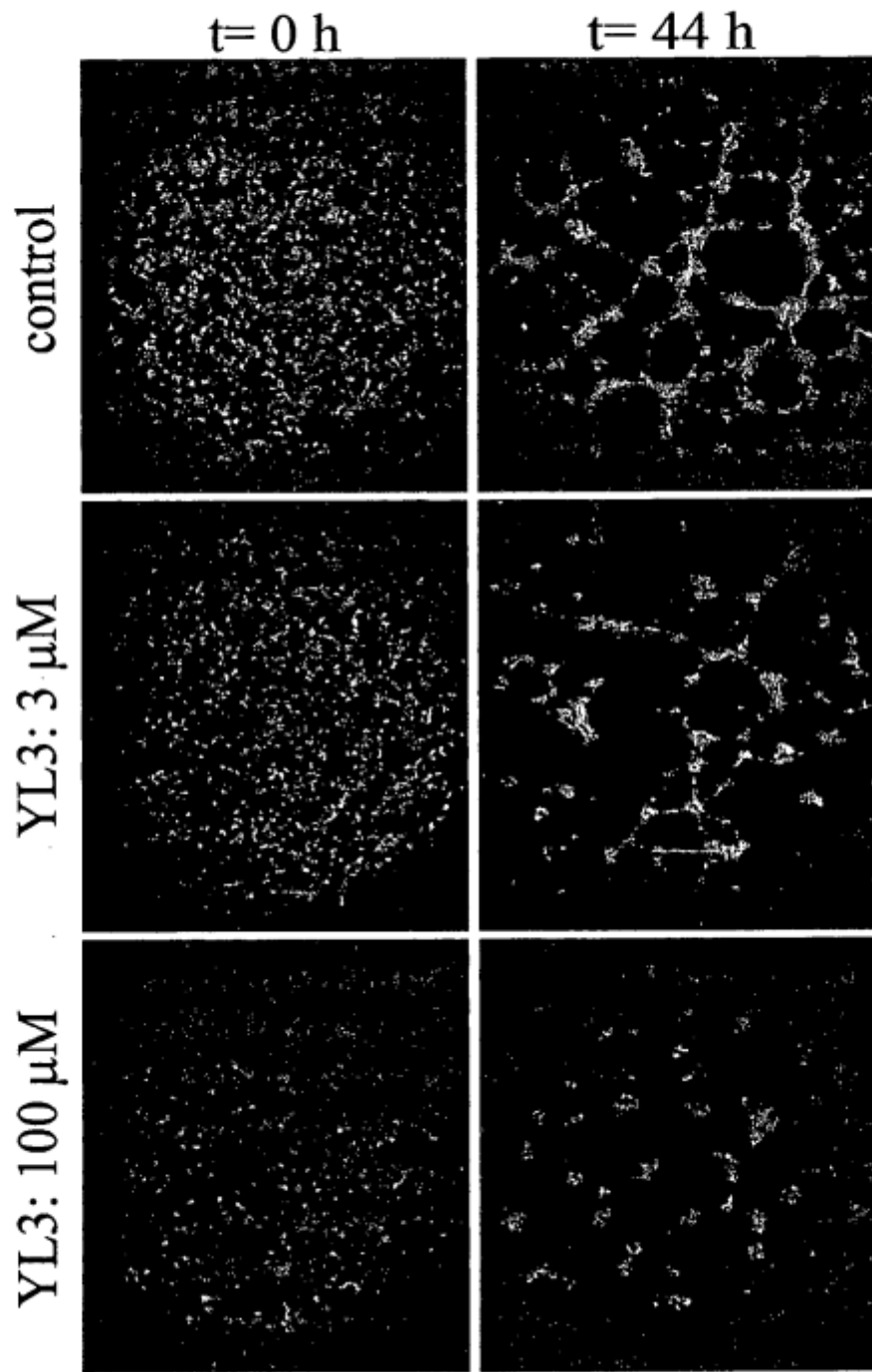


Figura 9

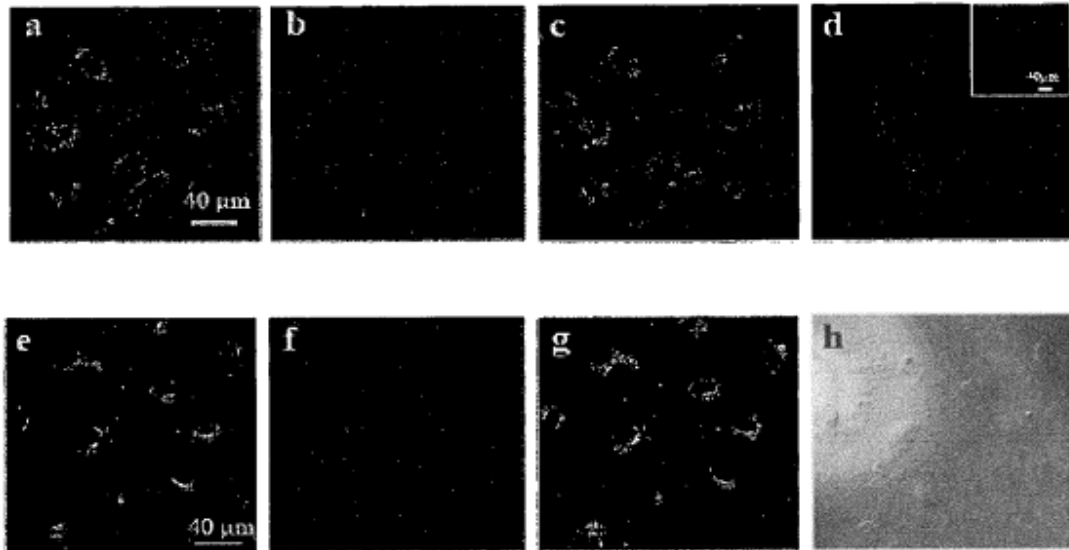


Figura 10

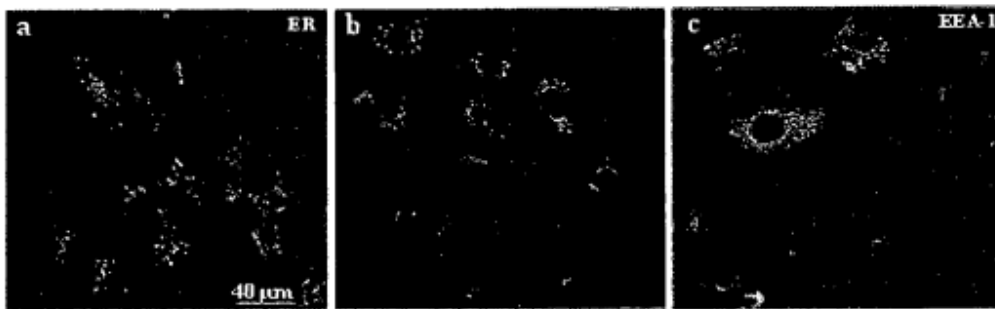


Figura 11

