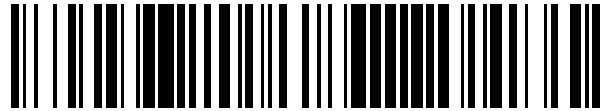


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 097**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2011 E 11802971 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2655653**

54 Título: **Procedimientos y compuestos para detectar cáncer**

30 Prioridad:

20.12.2010 GB 201021494

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

10.03.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS
LIMITED (100.0%)
7th Floor 30-36 Newport Road
Cardiff, South Glamorgan CF24 0DE, GB**

72 Inventor/es:

**WEEKS, IAN;
JAFFAR, MOHAMMED y
KNOX, RICHARD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 563 097 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

Procedimientos y compuestos para detectar cáncer

- 5 La presente solicitud se refiere a procedimientos de diagnóstico de cánceres, particularmente cáncer de vejiga y próstata, usando compuestos que son útiles en la detección de células que expresan NQO1 o NQO2.

10 El cáncer de vejiga es el noveno cáncer más común en el mundo. Es más prevalente en hombres que en mujeres. En todo el mundo, aparecen 356.600 nuevos casos estimados de cáncer de vejiga cada año (2008), con aproximadamente 20.000 muertes al año. Las tasas más altas de incidencia de cáncer de vejiga se encuentran generalmente en países industrialmente desarrollados, particularmente en América del Norte y Europa Occidental.

15 En los países desarrollados, aproximadamente un 90 % de los cánceres de vejiga son carcinomas de células transicionales (CCT, verrugas en la vejiga), mientras que el 10 % restante son carcinomas escamosos y adenocarcinomas. El carcinoma de células transicionales superficial tiende a extenderse solo en la vejiga a menos que se deje sin tratar durante un largo periodo de tiempo. Los CCT pueden extenderse por el revestimiento de la vejiga, pero no penetran profundamente en la vejiga (a menos que se dejen sin tratar) y las células se eliminan en la orina.

20 Los tumores de vejiga superficiales pueden gestionarse muy efectivamente mediante resección repetida. El tumor se retira (resecta) mediante un cistoscopio que se pasa por la uretra. Este tipo de tratamiento es altamente invasivo. Los tumores de vejiga superficiales tienden a recidivar intermitentemente y pueden requerir repetidamente la resección. El cáncer de vejiga invasivo requiere un enfoque más agresivo. En las etapas tempranas, los tumores pueden resecarse quirúrgicamente por retirada parcial o completa de la vejiga. Esto puede requerir cirugía mayor, que
25 requerirá la creación de un conducto ileal. Se usa la "cistoscopia exploratoria" rutinaria para detectar la recidiva de tumores, particularmente en las etapas tempranas, y se inicia un tratamiento adicional si es necesario. El intervalo de tiempo entre las cistoscopias exploratorias es habitualmente de 3-4 meses inicialmente, pero puede aumentar si la vejiga permanece libre de tumores en la investigación posterior. La cistoscopia exploratoria está recomendada durante un periodo de varios años para asegurar que el tumor no ha vuelto. Aproximadamente un 85 % de los
30 pacientes con cáncer de vejiga padecen recidiva al cabo de 5 años, la mayoría de pacientes al cabo de 2 años. La alta tasa de recidiva puede ser atribuida, en gran medida, a los tumores de la vejiga que están presentes en múltiples localizaciones que pueden escapar al examen o que son demasiado pequeños para ser vistos por el cirujano durante la resección inicial. Por ello, existe la necesidad clínica de un medio sensible, específico y no invasivo de detección de cáncer de vejiga.

35 La necesidad de una prueba de diagnóstico para detectar el cáncer de vejiga de etapa temprana (carcinoma de células transicionales superficial) está justificada debido al alto riesgo de recidiva (85 %) después de la intervención quirúrgica o quimioterapéutica durante los primeros 5 años. Además de los procedimientos que requieren un examen y muestreo invasivos, se han descritos varias pruebas no invasivas. Una revisión reciente (Shariat *et al.*, 2008) de dichos procedimientos concluyó que ninguna de las pruebas revisadas satisfacía todos los criterios de un marcador tumoral ideal. Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento sencillo, rápido, exacto y no invasivo para la detección temprana de cáncer de vejiga, y la invención divulgada en la presente memoria proporciona una solución a este problema.

45 Se han detectado niveles elevados de NAD(P)H:quinona reductasa-1 (NQO1, E.C. 1.6.99.2) y otras enzimas redox relacionadas en el cáncer de vejiga superficial, en comparación con el carcinoma de células transicionales invasivo (Li *et al.*, 2001, J. Urol., 166, 2500-2505; Choudry *et al.*, 2001, Br. J. Cancer, 85, 1137-1146). Esta diferencia significativa se ha explotado para tratar cánceres de vejiga de etapa temprana usando agentes específicos de NQO1. Se han desarrollado sistemas conjugados de benzoquinona-fármaco para dirigirse específicamente a células
50 tumorales ricas en NQO1.

La NQO1 se sobreexpresa también en las células de diversos otros tipos de cáncer, incluyendo cánceres de mama, pulmonar no microcítico, de páncreas, colon y próstata, respecto a células normales.

55 La enzima relacionada NQO2 se sobreexpresa también en células cancerosas, incluyendo aquellas presentadas anteriormente.

60 El documento US 2010/047839 y Biosensors and Bioelectronics, 23, 1793-1798 (2003), (Huang *et al.*) se refiere a indicadores fluorimétricos latentes para monitorizar la actividad de DT diaforasa (NQO1). Los compuestos incluyen derivados de 1,4-benzoquinona en que puede escindirise una sonda fluorimétrica del resto de la molécula usando DT diaforasa y NADH.

65 Molecular Cancer Therapeutics, 6(12), 3122-3130 (2007), Volpato *et al.*, enseña que la NQO1 es una diana para intervención terapéutica debido a su capacidad de convertir ciertas quinonas en especies citotóxicas y a que se han encontrado niveles elevados de NQO1 en varios tipos de tumores, por ejemplo cánceres de pulmón no microcítico y

pancreático. Los autores proponen tratar estos cánceres usando compuestos que se activan por NQO1 y que se reducen liberando un metabolito inerte y un agente terapéutico.

J. Med. Chem., 45, 3540-3548 (2002), Hemick *et al.* se refiere al diseño, síntesis y evaluación biológica de profármacos dirigidos a DT-diaforasa (DTD, NQO1).

J. Med. Chem., 44, 3311-3319 (2001), Swann *et al.* enseña que la NQO1 cataliza la reducción de quinonas y es por lo tanto capaz de proteger a células ante los efectos tóxicos de las quinonas, y se refiere a un estudio de la reacción de series de indoloquinonas con NQO1.

Biochem. Pharmacol., 47(8), 1325-1332 (1994), Smitskamp-Wilms *et al.* se refiere al estudio del compuesto EO9, uno de una serie de indoloquinonas biorreductoras que es sustrato de enzimas NQO de humano y roedor (DTD).

El documento WO 2011/113018 se refiere a un procedimiento de medida y modulación del "tiempo biológico", que se define como un mecanismo mediante el cual un sistema vivo coordina o sincroniza procesos biológicos. Se dice que el tiempo biológico está correlacionado con la concentración de moléculas activas redox tales como NCO1.

El documento EP1445602 se refiere a procedimientos y kits para la detección y determinación de analitos usando una reacción redox seguida de una determinación fluorimétrica. Los procedimientos se llevan a cabo usando un compuesto que comprende un grupo apagador ligado a un fluoróforo.

Tetrahedron, 65(25), 4894-4903 (2009), Blanche *et al.* se refiere a sistemas de profármaco para uso en terapia del cáncer. Los sistemas divulgados incluyen derivados de 1,4-benzoquinona que comprenden un grupo D, en que D es un residuo farmacológico, y la reducción del compuesto conduce a la liberación del fármaco DH. El documento divulga también sistemas modelo en que el residuo farmacológico D se reemplaza por un resto de oxocromeno.

El documento US 2009/0012031 se refiere a compuestos que se dirigen a la expresión de EZH2 en cáncer de próstata, y el documento WO 2004/009602 se refiere a compuestos de pirazolopiridina que son útiles como inhibidores de cinasa.

La presente invención aprovecha la sobreexpresión de NQO1 y NQO2 en células cancerosas respecto a células normales y se refiere a sustratos enzimáticos que son activados por NQO1 o NQO2, dando como resultado una señal detectable en presencia de células cancerosas. En contraposición, se observa una señal mínima en ausencia de células cancerosas (y por tanto cantidades reducidas en gran medida de NQO1 y/o NQO2).

Afirmaciones de la invención

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia, en la orina de un paciente, de células de cáncer de vejiga o próstata que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2, comprendiendo el procedimiento:

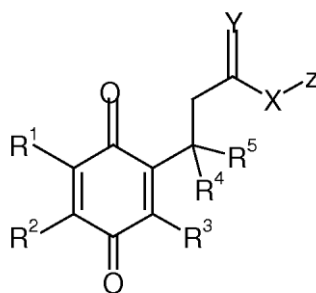
- i. poner en contacto la muestra de orina, o un derivado procesado de la misma, con un compuesto de fórmula general (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) o una sal de cualquiera de los mismos cuando sea aplicable, donde la muestra biológica contiene o se sospecha que contiene células de cáncer de vejiga o próstata que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2;
- ii. opcionalmente, en caso de que las células de cáncer de vejiga o próstata sobreexpresen o se sospeche que sobreexpresan NQO2, añadir un cosustrato de NQO2 a la muestra; y
- iii. Determinar la presencia o ausencia de un compuesto de fórmula:



o un ión de fórmula



donde z y X son como se definen en la fórmula general (I), donde la presencia del compuesto o ión indica la presencia en la muestra de células cancerosas que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2; donde la fórmula general (I) es:



(I)

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1-C_6 , $-O-(alquilo C_1-C_6)$ o $C(O)O-(alquilo C_1-C_6)$, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno; o

R^1 y R^2 , junto con los átomos de carbono a los que están conectados, forman un sistema de anillo aromático, heteroaromático, carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 miembros;

X es O, S o NR^8 ;

R^8 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

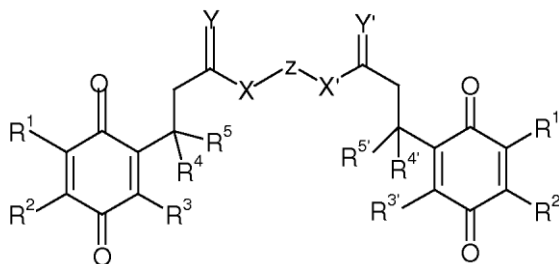
Y es O, S o NR^9 ;

R^9 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

z es un resto que está ligado covalentemente con el resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectable;

donde la muestra biológica contiene o se sospecha que contiene células cancerosas que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2;

la fórmula general (Ia) es:



(Ia)

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , X, Y y z son como se definen para la fórmula general (I);

$R^{1'}$, $R^{2'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$ y $R^{5'}$ representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1-C_6 , $-O-(alquilo C_1-C_6)$ o $C(O)O-(alquilo C_1-C_6)$, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno;

o $R^{1'}$ y $R^{2'}$, junto con los átomos de carbono con los que están conectados, forman un sistema de anillo aromático, heteroaromático, carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 miembros;

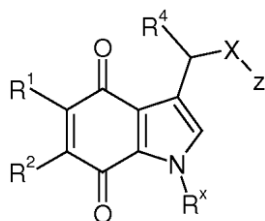
X' es O, S o NR^8 ;

R^8 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

Y' es O, S o NR^9 ;

R^9 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

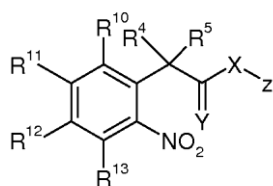
la fórmula general (Ib) es:



donde R^1 , R^2 , R^4 , X y z son como se definen para la fórmula general (I) y R^x es H o alquilo C_1 - C_3 ;

5

la fórmula general (Ic) es



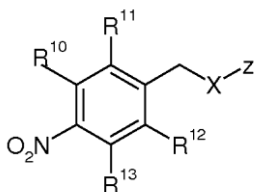
donde R^4 , R^5 , X, Y y z son como se definen para la fórmula general (I); y R^{10} , R^{11} , R^{12} y R^{13} representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1 - C_6 , -O-(alquilo C_1 - C_6) o $C(O)O$ -(alquilo C_1 - C_6), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

10

R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido con halógeno;

15

la fórmula general (Id) es:



20

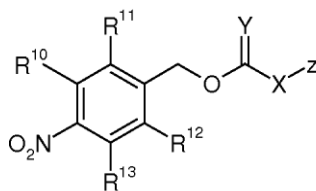
donde X y z son como se definen para la fórmula general (I); y R^{10} , R^{11} , R^{12} y R^{13} representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1 - C_6 , -O-(alquilo C_1 - C_6) o $C(O)O$ -(alquilo C_1 - C_6), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

25

R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido con halógeno;

la fórmula general (Ie) es:

30

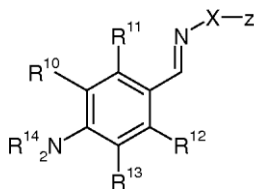


donde X, Y y z son como se definen para la fórmula general (I); y R^{10} , R^{11} , R^{12} y R^{13} representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 ,

$C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1-C_6 , $-O-(alquilo C_1-C_6)$ o $C(O)O-(alquilo C_1-C_6)$, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;
 R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno;

5

la fórmula general (If) es:



10

donde z es como se define para la fórmula general (I);
 R^{10} , R^{11} , R^{12} y R^{13} representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1-C_6 , $-O-(alquilo C_1-C_6)$ o $C(O)O-(alquilo C_1-C_6)$, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;
 R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno;

15

R^{14} es H o alquilo C_1-C_6 .

Los compuestos de fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) e (If) son susceptibles de reducción, produciendo un producto de fórmula $z-XH$ o un anión de fórmula $z-X^-$ y un residuo reducido. Como se expondrá con más detalle a continuación, el resto z es un marcador detectable y el resto de la molécula se elige de tal modo que la señal detectable emitida por el grupo z se modifica cuando forma parte del compuesto de fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) en comparación con la señal emitida por el compuesto $z-XH$ o el ión $z-X^-$.

20

Los compuestos de quinona o benzoquinona de fórmulas (I) y (Ia), los indoles de fórmula (Ib), los compuestos basados en nitro de fórmulas generales (Ic), (Id) y (Ie) y los compuestos de fórmula general (If) son todos conocidos en la materia. Por ejemplo, los compuestos de fórmula general (Ia) se enseñan en Huang *et al.*, Org. Letters, 8(2), 2665-268 (2006) y los compuestos de fórmulas generales (I), (Ib), (Ic), (Id) y (Ie) se exponen en Blanche *et al.*, Tetrahedron, 65(25), 4892-4903 (2009).

25

La naturaleza del resto detectable, concretamente si es un compuesto de fórmula $z-XH$ o un anión de fórmula $z-X^-$, dependerá de la naturaleza del marcador detectable z, del procedimiento de detección usado y del entorno en que se realice el procedimiento de detección. Por lo tanto, de aquí en adelante, debería considerarse que las referencias a un compuesto de fórmula $z-XH$ engloban también un anión de fórmula $z-X^-$. Por tanto, los procedimientos para la detección y/o cuantificación de un compuesto $z-XH$ incluyen también procedimientos para la detección y/o cuantificación de un anión $z-X^-$.

30

35

Adicionalmente, la referencia a un derivado procesado de una muestra biológica incluye la referencia a una muestra biológica después de que se ha tratado, típicamente con el fin de prepararla para el procedimiento de la invención o conservarla antes de emprender dicho procedimiento, e implica el uso de técnicas convencionales bien conocidas por los especialistas en la técnica de tomar, preparar o conservar muestras biológicas.

40

En la presente memoria descriptiva, "alquilo C_1-C_6 " hace referencia a una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, *tert*-butilo y n-hexilo.

45

El término "alquilo C_1-C_3 " hace referencia a un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono.

El término "aromático" en el contexto de la presente memoria descriptiva hace referencia a un sistema de anillo con carácter aromático que tiene 5 o 6 átomos de carbono de anillo. Los grupos aromáticos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de entre halógeno, metilo, etilo, metoxilo, etoxilo, nitro y ciano. El fenilo es un grupo arilo particularmente adecuado.

50

El término "heteroaromático" en el contexto de la memoria descriptiva hace referencia a un sistema de anillo con carácter aromático que tiene 5 o 6 átomos de anillo, al menos uno de los cuales es un heteroátomo seleccionado de entre N, O y S. Los ejemplos de grupos heteroaromáticos incluyen piridina, pirimidina, furano, tiofeno, oxazol, diazol y triazol. Los grupos heteroaromáticos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de entre halógeno, metilo, etilo, metoxilo, etoxilo, nitro y ciano.

55

El término “carbocíclico” en el contexto de la presente memoria descriptiva hace referencia a un sistema de anillo no aromático que tiene 5 o 6 átomos de carbono de anillo. El anillo puede contener uno o más dobles enlaces carbono-carbono y el término abarca por lo tanto grupos cicloalquilo y cicloalquenilo. Los ejemplos de grupos carbocíclicos incluyen ciclohexilo, ciclopentilo y ciclohexenilo. Los grupos carbocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de entre halógeno, metilo, etilo, metoxilo, etoxilo, nitro y ciano.

El término “heterocíclico” en el contexto de la presente memoria descriptiva hace referencia a un sistema de anillo no aromático que tiene 5 o 6 átomos de anillo, al menos uno de los cuales es un heteroátomo seleccionado de entre N, O y S. El anillo puede contener uno o más dobles enlaces. Los ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen grupos piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo y tetrahidrofurilo. Los grupos heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados de entre halógeno, metilo, etilo, metoxilo, etoxilo, nitro y ciano.

El término “halógeno” hace referencia a fluoro, cloro, bromo o yodo.

El término “sustituyentes reactivos” como se usa en la presente memoria hace referencia a un sustituyente que es capaz de reaccionar con un grupo pendiente de un sustrato sólido tal como una membrana, nanopartícula o superficie polimérica o sobre una proteína o polipéptido. Hay muchas reacciones mediante las que los compuestos de fórmula (I) pueden ligarse con sustratos sólidos, y los sustituyentes reactivos dependerán, por supuesto, de la naturaleza del grupo pendiente y de la reacción elegida. Los sustituyentes reactivos adecuados incluyen halógeno, hidroxilo, tiol, amino, carbonilo, carboxilo, ciano, azido, grupos alquenilo C₂-C₆ y alquinilo C₂-C₆, siendo los sustituyentes reactivos particularmente adecuados halógeno, hidroxilo, tiol, amino, carbonilo y carboxilo.

La muestra biológica puede ser una muestra de biopsia, o un derivado procesado de la misma, tomada de un paciente que tiene o se sospecha que tiene cáncer de mama, pulmonar no microcítico, de páncreas, colon, cervicouterino, testicular, de próstata o vejiga. Como alternativa, la muestra biológica puede ser un derivado procesado de muestra de biopsia, por ejemplo células recolectadas de una muestra de biopsia, por ejemplo por centrifugación y, si es necesario, resuspendidas en un medio alternativo.

El procedimiento es particularmente adecuado para diagnosticar cáncer de próstata o vejiga, especialmente tumores de vejiga superficiales, puesto que las células se eliminan en la orina, que puede usarse por tanto como muestra biológica. Como alternativa, puede usarse como muestra biológica un derivado procesado de una muestra de orina. Es un ejemplo de dicho derivado procesado las células recolectadas de una muestra de orina y, si es necesario, resuspendidas en un medio alternativo.

En un procedimiento preferido de la invención, se determina también el número de células en dicha muestra, o una cantidad de prueba de las mismas, de tal modo que la actividad de NQO1/NQO2 pueda expresarse por célula. Dichas células pueden estar presentes en la muestra bruta o pueden enriquecerse, aislarse o purificarse a partir de la muestra bruta. Esto puede conseguirse mediante centrifugación, filtración u otros procedimientos divulgados en la bibliografía científica. Idealmente, se emprende el enriquecimiento o purificación usando un procedimiento de unión a ligando tal como, pero sin limitación, el uso de partículas paramagnéticas recubiertas con un anticuerpo, receptor u otro copartícipe de unión para un marcador de superficie celular seleccionado de interés.

En un procedimiento preferido de la invención, se determina la presencia o ausencia de z-XH o z-X⁻ como la cantidad representada por la relación de concentración de z-XH o z-X⁻ de la muestra a la de un control de ensayo negativo que no contiene células, no contiene células que expresan NQO1 y/o NQO2 o contiene células normales que pueden expresar, debido a su naturaleza, niveles muy bajos de las enzimas. Idealmente, las diferentes cantidades de esta relación se correlacionan con las técnicas de estadificación de células cancerosas conocidas, de tal modo que puede usarse un ensayo *in vitro* sencillo para informar fiablemente a un médico no solo sobre la existencia de un cáncer, sino también su progresión probable. En un procedimiento preferido adicional de la invención, se ve una mayor actividad de NQO1 en aquellas muestras de pacientes con tumores de etapa posterior.

En un procedimiento preferido adicional de la invención, el protocolo de ensayo implica centrifugar una muestra que contiene células que se cree que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2, retirar el sobrenadante, resuspender las células en tampón seleccionado, incubar con un compuesto de fórmula general (I) y ensayar z-XH o z-X⁻ como anteriormente. Idealmente, la incubación se emprende durante aproximadamente 3 min. Se deduce que el ensayo de la invención puede emprenderse de forma relativamente directa y lleva solo un corto periodo de tiempo, favoreciendo una aplicación de diagnóstico inmediato.

Como se describe con más detalle a continuación, el marcador z puede ser un cromóforo o un luminóforo (p.ej., un marcador fluorescente, fosforescente, bioluminiscente o quimioluminiscente); o un modulador de emisiones de una molécula o ión fluorescente, fosforescente, quimioluminiscente o bioluminiscente; o un cofactor de una reacción quimioluminiscente o bioluminiscente. Como alternativa, el marcador puede ser una micropartícula o nanopartícula detectable tal como, pero sin limitación, una partícula coloreada o magnética. El procedimiento mediante el que se

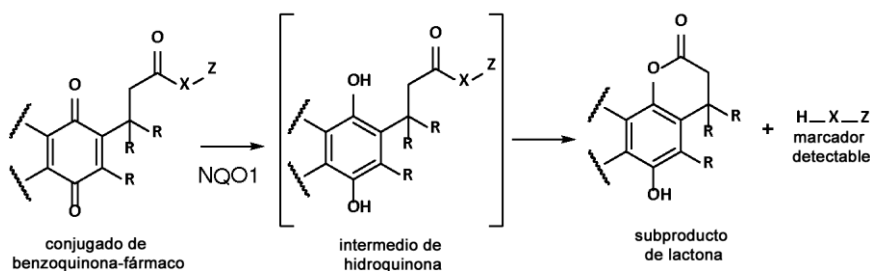
determina la presencia o ausencia del compuesto z-XH o z-X⁻ variará dependiendo de la naturaleza del marcador detectable z. Por ejemplo, pueden monitorizarse los cambios de la intensidad de fluorescencia o longitud de onda usando un fluorímetro y monitorizarse los cambios análogos de quimioluminiscencia usando un luminómetro. Si es necesario, puede aislarse el producto de la reacción enzimática, por ejemplo mediante cromatografía líquida, antes de la detección y/o cuantificación.

El compuesto escindido z-XH o z-X⁻ puede ser detectable como alternativa por su capacidad de unirse a un resto de captura, y los pares de unión de z-XH o z-X⁻ y resto de captura pueden comprender, por ejemplo, avidina o estreptavidina y biotina o un par de anticuerpo/antígeno tal como fluoresceína/antifluoresceína.

Como se describe también con más detalle a continuación, el compuesto escindido z-XH o z-X⁻ puede ser detectable como alternativa por su capacidad de unirse a un resto de captura, y los pares de z-XH o z-X⁻ y resto de captura pueden comprender, por ejemplo, avidina o estreptavidina y biotina o un par de unión de anticuerpo/antígeno tal como fluoresceína/antifluoresceína.

Los compuestos de fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) y (If) son sustratos de NQO1 y NQO2 y se reducen por estas enzimas. La reducción da como resultado la escisión del resto marcador z, que puede detectarse entonces. La escisión ocurre de acuerdo con el Esquema 1 siguiente, que ilustra el mecanismo de reacción para compuestos de fórmula general (I). La reducción de compuestos de fórmulas generales (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) y (If) procede de manera similar.

Esquema 1



Los compuestos de la invención son particularmente útiles en la detección del cáncer, puesto que el resto de quinona es un sustrato de las enzimas NQO1 y NQO2, que se sobreexpresan en células cancerosas. Los compuestos son particularmente útiles para detectar cáncer de próstata y vejiga superficial debido a que dichas células se eliminan en la orina, y por lo tanto puede llevarse a cabo una prueba diagnóstica en una muestra de orina, o un derivado procesado de una muestra de orina tal como células recolectadas de la muestra, sin necesidad de un procedimiento invasivo. En caso de que las células cancerosas sobreexpresen NQO2, puede ser necesario añadir a la muestra o derivado procesado un cosustrato de NQO2 tal como *N*-ribosildihidronicotinamida (NRH) o yoduro de 1-metil-3-carboxamidopiridinio, especialmente cuando se reduce al derivado de 1,4-dihidropiridina o 1-carbamoilmetil-3-carbamoil-1,4-dihidropiridina, todos los cuales actúan como cosustrato de NQO2. Están disponibles otros cosustratos de NQO2 y son conocidos por los especialistas en la materia, tales como los descritos por Knox *et al.* Cancer Res. 60, pág. 4179-4186, 2000. Habitualmente no es necesario añadir un cosustrato en casos en que se va a detectar la sobreexpresión de NQO1, puesto que el NAD(P)H, el cosustrato de NQO1, está presente en todas las células. Sin embargo, puede usarse este último cosustrato, o su equivalente, en situaciones en que se ha aislado anteriormente NQO1 de la muestra biológica antes de la medida de actividad, o se han lisado las células para investigar.

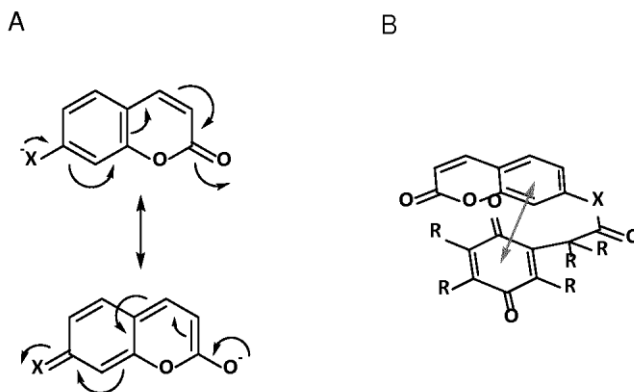
La exposición siguiente se refiere a la detección de los compuestos z-XH o iones z-X⁻. En esta exposición, las referencias a un compuesto de fórmula (I) se aplican también a compuestos de fórmulas generales (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) y (If).

Los compuestos z-XH o iones z-X⁻ detectables adecuados incluyen, en particular, cromóforos y luminóforos, por ejemplo moléculas o iones fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes o bioluminiscentes; o moduladores de emisiones de moléculas o iones fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes o bioluminiscentes; o un cofactor de una reacción quimioluminiscente o bioluminiscente. En particular, el resto z puede elegirse de tal modo que sus propiedades ópticas cambien cuando se escinde del resto del compuesto de fórmula general (I), formando el compuesto z-XH o el ión z-X⁻.

El cambio en las propiedades ópticas puede ser, por ejemplo, un cambio detectable en la longitud de onda de luz emitida, la retirada de un efecto apagador ejercido por el resto de quinona de fórmula general (I) o, en el caso de cofactores, la remodulación de su actividad.

Lo más comúnmente, cuando el resto z es un luminóforo o cromóforo, el cambio en sus propiedades ópticas tras escisión del resto del compuesto de fórmula (I) está basado en dos mecanismos subyacentes. El primero es debido a la conexión "atractora de electrones" (a través del ligamiento C-O-X) del resto de señalización activo y el otro es debido al apagamiento conseguido a través del fenómeno de (seudo) apilamiento π . Estos mecanismos se ilustran en los Esquemas 2A y 2B usando cumarina como ejemplo.

Esquema 2



En el Esquema 2A, el anión de cumarina experimenta tautomería de resonancia que da como resultado la generación de fluorescencia. Si el grupo X está conectado a un resto de quinona atractor de electrones como en la fórmula general (I), la fluorescencia se anula.

El Esquema 2B muestra el apagamiento fluorescente por pseudoapilamiento π entre los restos de quinona y de cumarina aromática.

En una realización alternativa, el resto z puede comprender un marcaje detectable, por ejemplo una partícula detectable, especialmente una micropartícula o nanopartícula detectable tal como, pero sin limitación, una micropartícula de látex coloreada, nanopartícula de oro o partícula magnética, así como numerosas moléculas detectables, todas las cuales son bien conocidas por los especialistas en la materia. El procedimiento mediante el que se determina la presencia o ausencia del compuesto z-XH o ión z-X⁻ variará dependiendo de la naturaleza del resto z detectable. Por ejemplo, pueden monitorizarse los cambios de la intensidad de fluorescencia o longitud de onda usando un fluorímetro y monitorizarse los cambios análogos de quimioluminiscencia usando un luminómetro. Si es necesario, puede aislarse el producto de la reacción enzimática, por ejemplo mediante cromatografía líquida, antes de la detección y/o cuantificación.

Como alternativa, el compuesto z-XH o ión z-X⁻ escindido puede ser detectable por su capacidad de unirse a un resto de captura. En este caso, el resto z puede comprender simplemente una porción de unión que se une selectivamente al resto de captura y el resto de captura puede comprender un copartícipe de unión del resto z y un marcaje detectable, por ejemplo una partícula detectable como se describe anteriormente.

Cuando z comprende un marcaje detectable como se describe anteriormente, puede comprender adicionalmente una porción de unión que se une selectivamente a un resto de captura.

Los ejemplos de pares de unión adecuados que pueden usarse en este tipo de realización son conocidos, por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina y pares de unión de antígeno/anticuerpo.

Por tanto, en algunos casos, uno de z y el resto de captura puede comprender biotina, o un derivado de biotina, y el otro puede comprender avidina o estreptavidina o un derivado de las mismas. Como alternativa, uno de z y el resto de captura puede comprender un antígeno y el otro un anticuerpo específico del antígeno, por ejemplo fluoresceína/anti-fluoresceína. Son conocidos en la materia otros ejemplos de pares de unión adecuados.

Es un modo de detectar dicho marcador inmovilizar el complejo formado por el marcador z y el resto de captura sobre un sustrato sólido y detectar el marcaje sobre dicho sustrato sólido. Por tanto, en una realización, se inmovilizará el resto de captura sobre un sustrato sólido tal como perlas, fibras o una membrana, y el resto z comprenderá un marcaje detectable.

Si está presente NQO1 en la muestra, se escindirá el resto z del compuesto de fórmula general (I) y se unirá el z-XH

o z-X' libre al resto de captura inmovilizado, permitiendo la detección del marcaje.

Como alternativa, puede usarse un formato de ensayo de unión y este será particularmente adecuado cuando el resto z comprenda simplemente un copartícipe de unión del resto de captura. En este caso, se usa un reactivo de unión secundario marcado apropiado para monitorizar la ocupación del resto de captura.

En algunos casos, puede inmovilizarse el compuesto de fórmula (I) sobre un sustrato sólido en una primera localización, por ejemplo mediante conexión covalente que implica cualquiera de los grupos R^1 a R^5 o derivados adecuados de los mismos, e inmovilizarse una molécula de captura en una segunda localización. Los derivados y procedimientos adecuados para inmovilizar en general moléculas en soportes sólidos son bien conocidos por los especialistas en la materia. Si está presente NQO1 o NQO2 en la muestra, se reducirá el compuesto de fórmula (I), se escindirán el resto z del residuo del compuesto de fórmula general (I) y será libre de moverse a la segunda localización, donde puede capturarse y detectarse.

Los procedimientos de detección descritos anteriormente pueden ser cualitativos o cuantitativos. La detección cuantitativa del compuesto z-XH o z-X' hace posible determinar la gravedad del cáncer y monitorizar la efectividad de cualquier tratamiento.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit para diagnosticar un cáncer que sobreexpresa NQO1 y/o NQO2, comprendiendo el kit una composición que comprende un compuesto de fórmulas generales (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) en un envase adecuado, instrucciones para usar el kit y opcionalmente una composición que comprende un cosustrato de NQO2 en un envase adecuado.

Los ejemplos específicos de restos marcadores z incluyen fluoresceína, 2-oxo-2H-1-benzopirano y 4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-ilo.

En una realización particularmente adecuada, se pone en contacto la muestra biológica con un compuesto de fórmula general (I).

En compuestos adecuados de fórmula general (I), independientemente o en cualquier combinación, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son cada uno independientemente hidrógeno, metilo o etilo; X es O o NH; e Y es O.

En compuestos más adecuados, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son cada uno independientemente hidrógeno o metilo y aún más adecuadamente: R^1 y R^2 son ambos metilo; R^3 es hidrógeno o metilo; y R^4 y R^5 son iguales y pueden ser hidrógeno o metilo.

Los compuestos particularmente adecuados de fórmula general (I) incluyen:

3-metil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)butanoato de 2-oxo-2H-1-benzopirano-7-ilo ($R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{Me}$);

3-(4,5-dimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)-3-metilbutanoato de 2-oxo-2H-1-benzopirano-7-ilo ($R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = \text{Me}$; $R^3 = \text{H}$);

3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)propanoato de 2-oxo-2H-1-benzopirano-7-ilo ($R^1 = R^2 = R^3 = \text{Me}$; $R^4 = R^5 = \text{H}$); y

3-metil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)butanoato de 4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-ilo ($R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{Me}$).

En realizaciones alternativas separadas, se pone en contacto la muestra con un compuesto de fórmula general (Ia), un compuesto de fórmula general (Ib), un compuesto de fórmula general (Ic), un compuesto de fórmula general (Id), un compuesto de fórmula general (Ie) o un compuesto de fórmula general (If).

En los compuestos de fórmula general (Ia), son valores particularmente adecuados de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , X, Y y z como se definen para la fórmula general (I), mientras que son valores particularmente adecuados de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 , X' e Y' como se definen para R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , X e Y de fórmula general (I).

En los compuestos de fórmula general (Ib), son valores particularmente adecuados de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , X, Y y z como se definen para la fórmula general (I).

En los compuestos de fórmula general (Ic), son valores particularmente adecuados de R^4 , R^5 , X, Y y z como se definen para la fórmula general (I).

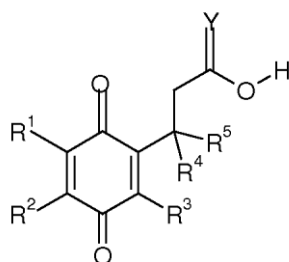
En los compuestos de fórmula general (Id), son valores particularmente adecuados de X y z como se definen para la fórmula general (I).

5 En los compuestos de fórmula general (Ie), son valores particularmente adecuados de X, Y y z como se definen para la fórmula general (I).

En los compuestos de fórmula general (If), son valores particularmente adecuados de X y z como se definen para la fórmula general (I) y R¹⁰ es adecuadamente H o metilo.

10 En compuestos más adecuados de las fórmulas generales (Ic), (Id), (Ie) e (If), cada uno de R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ representa independientemente H o alquilo C₁-C₆, particularmente H o metilo, y lo más adecuadamente H.

Los compuestos de fórmula general (I) pueden prepararse a partir de compuestos de fórmula general (II):



(II)

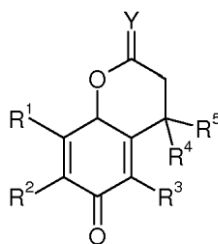
15 donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y Y como se definen para la fórmula general (I); mediante reacción con un compuesto de fórmula (III):

20
$$z\text{-XH o } z\text{-X}^{\cdot} \quad \text{(III)}$$

donde X y z son como se definen anteriormente para la fórmula general (I).

25 Típicamente, se lleva a cabo esta reacción en presencia de un reactivo de acoplamiento tal como dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y una base tal como 4-dimetilaminopiridina (DMAP). La reacción puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 15-30 °C, típicamente a temperatura ambiente. Cuando X es NR⁶, puede llevarse a cabo la reacción en presencia de DCC y *N*-hidroxisuccinimida y procede de manera similar a una reacción de acoplamiento peptídico convencional.

30 Los compuestos de fórmula general (II) pueden prepararse a partir de compuestos de fórmula general (IV):

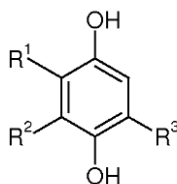


(IV)

35 donde R¹, R², R³, R⁴, R⁵ e Y son como se definen para la fórmula general (I); mediante reacción con *N*-bromosuccinimida en acetonitrilo, seguido de la adición de agua. La reacción puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 15-30 °C, típicamente a temperatura ambiente.

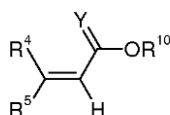
Los compuestos de fórmula general (IV) pueden prepararse haciendo reaccionar un compuesto de fórmula general (VI):

40



(VI)

donde R^1 , R^2 y R^3 son como se definen para la fórmula general (I), con un compuesto de fórmula general (VII):



(VII)

5

donde Y, R^4 y R^5 son como se definen para la fórmula general (I).

La reacción puede realizarse en condiciones ácidas, por ejemplo en presencia de ácido metanosulfónico a una temperatura de aproximadamente 60-100 °C, más habitualmente de 70-90 °C.

Los compuestos de fórmulas generales (VI) y (VII) están fácilmente disponibles o pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos por los especialistas en la materia.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los compuestos de fórmula general (Ia) se enseñan por Huang *et al.*, Org. Letters, 8(2), 2665-268 (2006) y los compuestos de fórmulas generales (Ib), (Ic), (Id) e (Ie) se exponen en Blanche *et al.*, Tetrahedron, 65(25), 4892-4903 (2009). Se enseñan procedimientos para la preparación de estos compuestos en estas referencias directamente o se describen en referencias citadas en esos documentos.

Los compuestos de fórmula general (I) y de fórmulas generales (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) e (If) son de uso en procedimientos de diagnóstico de cáncer.

Los ejemplos de cánceres con los que pueden usarse los compuestos de fórmula general (I) y de fórmulas generales (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) e (If) para diagnosticar incluyen cánceres de próstata y malignidades urológicas, donde las células tumorales pueden estar presentes en la orina. Por lo tanto, el cáncer es adecuadamente cáncer de próstata o, más adecuadamente, cáncer de vejiga, especialmente tumores de vejiga superficiales.

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los Ejemplos siguientes y a los dibujos, en que:

La FIGURA 1 muestra un ejemplo de un formato de ensayo en que puede detectarse o cuantificarse la actividad de NQO1 por su capacidad de escindir una partícula inmovilizada detectable de una conexión de fase sólida mediante la medida de las partículas en la localización inicial, localización final o ambas.

La FIGURA 2 es una gráfica que muestra la absorbancia UV (a 265 nm) (●) y la señal fluorimétrica (λ_{ex} 410nm; λ_{em} 550nm) (○) de MTL8-252 (0,1 M) en presencia de tampón fosfato (10 mM) a 37 °C monitorizado durante un periodo de 75 minutos como se detecta con el espectrofotómetro de UPLC. La gráfica demuestra que MTL8-252 es significativamente estable en tampón fosfato durante al menos 1 hora.

La FIGURA 3 es una gráfica de UV que muestra la desaparición de MTL8-252 (100 μ M) monitorizada a una absorbancia de 265 nm a pH 7 y a 37 °C con el tiempo. El control (●) designa el sustrato en tampón fosfato solo; (○) designa el sustrato en tampón y NADH (500 μ M); (Δ) designa el sustrato en presencia de hNQO1 (0,10 μ g/ml) y NADH (500 μ M) y (\blacktriangledown) designa el sustrato en presencia de hNQO1 (0,20 μ g/ml) y NADH (500 μ M). La gráfica indica que MTL8-252 es un excelente sustrato de hNQO1.

La FIGURA 4 es una gráfica que muestra la desaparición de MTL8-252 y la aparición de 4-MU en presencia y ausencia de hNQO1 con el tiempo usando un ensayo de UPLC. (○) representa la desaparición de MTL8-252 (conc. inicial 100 μ M) en presencia de hNQO1 (0,2 μ g/ml) y NADH (500 μ M); (\blacktriangle) representa la aparición de 4-MU detectado por su fluorescencia; (●) es el experimento de control en que se incubó MTL8-252 con NADH. Se calculó la velocidad de desaparición del compuesto como 13,51 μ M/min y se calculó la velocidad de aparición de 4-MU como 8,41 μ M/min.

50

La FIGURA 5 es una nueva gráfica de los datos mostrados en la Figura 6, pero en que se midieron las concentraciones usando UV (a 210 nm) en lugar de fluorescencia con el tiempo. (□) representa MTL8-252 solo; (●) representa MTL8-252 en presencia de NADH; (○) representa la desaparición de MTL8-252 en presencia de hNQO1 y NADH; (Δ) representa la aparición de 4-MU (liberación de 4-MU del proceso de activación: MTL8-252+NADH+hNQO1); (▲) representa la aparición del subproducto de lactona (formación de la lactona a partir del proceso de activación). Se calculó la velocidad de desaparición de MTL8-252 como 8,41 μg/min. Se calculó la velocidad de aparición de 4-MU como 11,48 μg/min y se midió la velocidad de aparición de lactona como 9,84 μg/min.

La FIGURA 6 es una gráfica de estabilidad con el tiempo cuando se incubaban 4-MU (100 μM) y la lactona (100 μM) con hNQO1 (0,2 mg/μl) y NADH (500 mM). (●) representa 4-MU medido por UV a 210 nm; (○) representa 4-MU medido por fluorescencia (datos de FL Plus); (▽) representa la lactona medida por UV a 210 nm. Los datos indican que tanto 4-MU como la lactona son estables en presencia de hNQO1 (concretamente no se afectan/activan por hNQO1).

La FIGURA 7 es una gráfica espectrofotométrica de luminiscencia que muestra las velocidades de formación de 4-MU con el tiempo cuando se incubaba MTL8-252 (100 mM) con líneas celulares que expresan hNQO1 (hDT7; $2,5 \times 10^5$ células/ml) y que no expresan hNQO1 (F170; $2,5 \times 10^5$ células/ml). (●) representa el compuesto en orina solo; (▼) representa el compuesto con la línea celular hDT7 que expresa NQO1; (○) representa MTL8-252 con F179, líneas celulares sin expresión de NQO1. La velocidad de formación de 4-MU en la orina sola y en las células F179 es de 0,32 nmol/min y 0,18 nmol/ml, respectivamente. La velocidad de formación de 4-MU en las células hDT7 es de 0,83 nmol/ml.

La FIGURA 8 es una gráfica espectrofotométrica de una repetición de la Figura 9 usando unos ajustes del detector FL-Plus ($\lambda_{ex} = 360$ nm; $\lambda_{em} = 450$ nm) que detectan la fluorescencia del 4-MU liberado. El experimento de control se representa por (○), que es MTL8-252 (10 μM) en PBS solo; (▲) representa MTL8-252 (10 μM) en PBS incubado con la línea celular hDT7 que expresa NQO1 (5×10^5 células/ml); (●) representa MTL8-252 (10 μM) en PBS incubado con la línea celular F179 sin expresión (5×10^5 células/ml). Se calculó la velocidad inicial de liberación de 4-MU en las células hDT7 y F179 como 6,1 μM/min y 0,068 μM/min respectivamente. La velocidad de liberación de 4-MU del experimento de control era de 0,002 μM/min.

La FIGURA 9 es una gráfica espectrofotométrica que muestra la estabilidad de MTL8-252 en PBS (○); en medio con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (●) y en medio sin FBS (□). MTL8-252 es muy estable en PBS y en medio sin FBS.

Las FIGURAS 10 y 11 son gráficas que muestran la precisión de un ensayo ejemplar. Se efectuó el ensayo en muestras duplicadas de células HDT7 productoras de NQO1 adicionadas a medio de cultivo (DMEM) (Figura 10) u orina (Figura 11). La Figura 10 muestra la precisión de las determinaciones por triplicado de 1×10^5 o 5×10^5 células indicadas adicionadas a medio de cultivo. La Figura 11 muestra la precisión de las medidas por duplicado de 10^6 células HDT7 adicionadas a orina. Las barras de error son de +1 EEM y los experimentos demuestran que las células pueden medirse en cualquiera de medio de cultivo u orina sin ningún efecto adverso sobre la precisión.

Las FIGURAS 12 y 13 son gráficas que muestran que podría usarse el ensayo ejemplar para ensayar en una serie de diferentes tipos de células la actividad de NQO1, a saber HDT7 y F179 (líneas celulares productoras de NQO1 y genomanipuladas para producción nula, respectivamente), las líneas celulares de cáncer de vejiga humanas EJ138 y RT112 y la línea celular de cáncer de próstata humana PC3. Se usaron números similares de células en cada experimento para permitir la comparación. NC representa un control negativo no celular.

La FIGURA 14 muestra que el ensayo ejemplar puede discriminar entre la actividad de NQO1 y NQO2. Las células de carcinoma de próstata (ejemplificadas por células PC3) expresan tanto la actividad de NQO1 como de NQO2. Sin embargo, esta última se activa solo por la presencia de un cosustrato no presente naturalmente en las células (EP-0152R, 1-carbamoilmetil-3-carbamoil-1,4-dihidronicotinamida). Es conocido que, en ausencia de EP-152R, hNQO2 es inactiva. La Figura 14 muestra que hay un aumento de 1,2 veces en la formación de 4-MU mediante la adición de un cosustrato selectivo de hNQO2. Esta liberación de 4-MU adicional indica que el ensayo, cuando se suplementa con cosustrato de hNQO2, puede usarse para detectar células tumorales que, adicionalmente o como alternativa, expresan la enzima hNQO2. En el primer caso, puede usarse el ensayo suplementado para proporcionar una señal de ensayo más fuerte, y en el último caso para detectar cánceres que expresan hNQO2 solo.

Las FIGURAS 15 y 16 muestran la naturaleza cuantitativa del ensayo ejemplar. Se ensayaron $2,5 \times 10^5$, $1,25 \times 10^5$, $0,625 \times 10^5$ y $0,3125 \times 10^5$ células RT112 (Figura 15). Simultáneamente, se expusieron también las células a 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), usando protocolos establecidos, para permitir la cuantificación del número total de células mediante la medida de la intensidad de fluorescencia celular de DAPI en el mismo fluorímetro (Figura 16). Por tanto, la valoración de los datos de las Figuras 15 y 16 posibilita determinar la cantidad de señal por célula y el número de células en una muestra productora de dicha señal. Esto es particularmente ventajoso cuando se desea determinar la actividad de NQO1 o NQO2 "por célula".

Las FIGURAS 17 y 18 muestran los resultados de una versión modificada del ensayo donde se mejoran la sensibilidad y/o especificidad mediante el enriquecimiento/aislamiento/purificación de células antes del ensayo. La Figura 17 muestra la compatibilidad de la presente invención con dichos procedimientos. Aquí, se aislaron muestras que contienen células cancerosas portadoras del antígeno epitelial Ber-EP4 usando partículas magnetizables (paramagnéticas) recubiertas con anticuerpos de este antígeno (Invitrogen, Dynal AS, Oslo, Noruega). Se obtuvo una suspensión de complejos de partícula/célula, que se procesó en el protocolo del ensayo ejemplar reseñado en las Figuras 10-16. La Figura 17 muestra que la recuperación de la actividad de NQO1 en células de cáncer de vejiga RT112 es de aproximadamente un 60-70 % respecto a la actividad del número total de células presentes (100 %, representado por la barra de 0 perlas de la figura) en un intervalo de densidades de partícula (ilustrado por el volumen de la solución madre de perlas del fabricante (4×10^6 partículas/ml) añadido). La Figura 18 muestra resultados comparables para células HDT7 que expresan NQO1 pero no expresan el antígeno Ber-EP4 humano. Los datos ilustran la capacidad de enriquecer específicamente la población de células epiteliales.

La FIGURA 19 muestra los resultados obtenidos cuando se usó el ensayo en muestras obtenidas de un entorno clínico. Los resultados se expresan como la relación de concentración de 4-MU de las muestras a la del control de ensayo negativo y se correlaciona con el eventual diagnóstico clínico (carcinoma de células transicionales o no). El triángulo blanco representa una muestra que contiene cantidades significativas de desechos, sugiriendo que el uso de inmunoextracción como se describe en la presente memoria con referencia a la Figura 17 sería beneficioso para aumentar la especificidad. El círculo blanco representa una muestra de un paciente diagnosticado posteriormente con cáncer de vejiga Ta de etapa muy temprana, y es probable que haya insuficientes células para un análisis fiable de esta muestra.

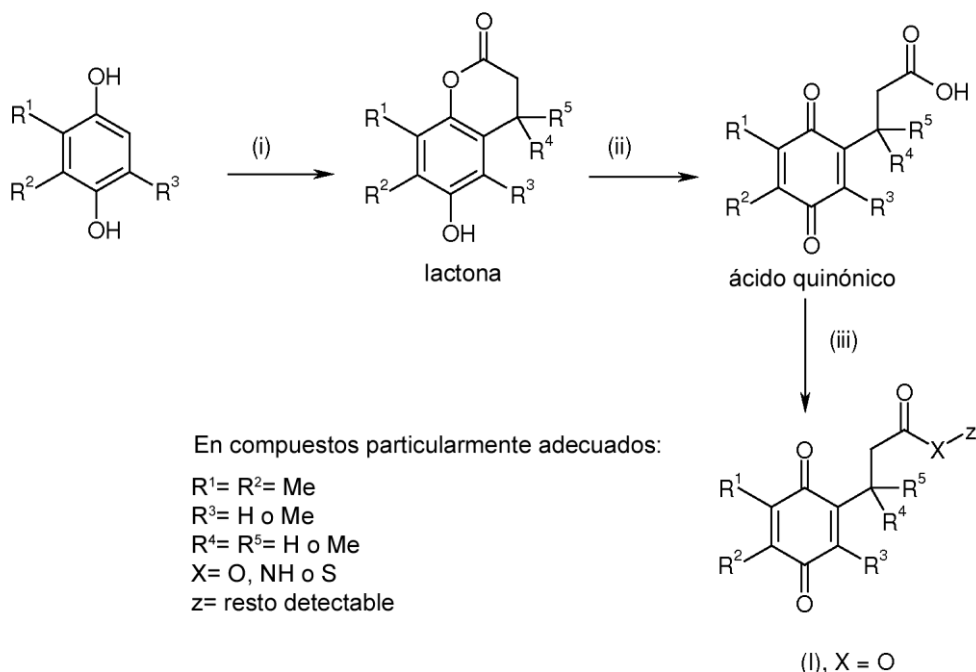
La TABLA 2 muestra los resultados de ensayo para pacientes ya diagnosticados con cáncer de vejiga pero aún no tratados. Los resultados se expresan como la relación de concentración de 4-MU de las muestras a la del control de ensayo negativo. La muestra 89 de esta serie no pudo ensayarse debido a la presencia de hematuria macroscópica.

La TABLA 3 muestra los resultados del ensayo de NQO1 para pacientes diagnosticados con carcinoma de próstata. Estas muestras se recogieron después de examen rectal digital.

Se ilustra un tipo de formato de ensayo en la Figura 1. En la mitad superior de la figura, (12) representa una primera localización definida sobre una membrana (10) adecuada con la que se ha conectado una micropartícula biotinilada (16; un resto "z") detectable a través de un resto de sustrato de NQO1 activo (14, "ensayo sensible a rédox "). Por tanto, (14) y (16) comprenden conjuntamente un compuesto de Fórmula (I). En ausencia de NQO1 humana (hNQO1), la partícula detectable (16) permanece inmovilizada en la primera localización definida (12) cuando se induce un flujo de fluido a través de la membrana en la dirección de una segunda localización definida (18). Por tanto, no hay captura de micropartículas biotiniladas por la avidina (20) inmovilizada en la segunda localización (18). En contraposición, la mitad inferior de la figura ilustra el efecto de la escisión anterior del resto sensible a rédox (14) mediante la acción de hNQO1 en una muestra aplicada a la primera localización (12). En este caso, la posterior inducción del flujo de fluido a través de la membrana da como resultado la migración de las micropartículas biotiniladas detectables (16) con posterior captura por los restos de avidina (20) inmovilizados en la segunda localización (18). La detección y/o cuantificación de micropartículas en las localizaciones primera (12) o segunda (18) definidas respecto a la otra localización respectiva es por tanto un indicador de la presencia o ausencia, o de la cantidad, de hNQO1 en la muestra aplicada a la primera localización (12) antes de la inducción del flujo de fluido.

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los ejemplos.

Esquema general para la síntesis de compuestos de fórmula general (I)



5 *Reactivos y condiciones:* (i) acrilato apropiado, MeSO_3H , 70-90 °C, 2-5 h; (ii) NBS, $\text{MeCN} : \text{H}_2\text{O}$, 1,5-3 h, TA; (iii) DCC, DMAP, Z-XH, DCM, 16-24 h, TA

Parte experimental

10 Se obtuvieron los productos químicos y reactivos en Aldrich Chemical Co., Dorset RU, Lancaster Synthesis Ltd, Lancashire, RU y VWR International, Leicestershire, RU. Se obtuvieron los disolventes deuterados y el tetrametilsilano (TMS) en Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover EE.UU. Se expresó y purificó NQO1 por Morvus Technology Ltd. Se monitorizaron las reacciones usando cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice 60-F₂₅₄ revestidas de aluminio prerrecubiertas visualizadas por radiación ultravioleta (UV) a 254 nm y 325 nm usando una lámpara de luz mineral UV GL-58 o por tinción con solución de permanganato de potasio (KMnO₄). Se llevó a cabo la cromatografía en columna usando gel de sílice de malla 100-125 de VWR International. Se registraron los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C en los espectrómetros de RMN Bruker Avance a 300 MHz o Varian a 400 MHz. Se reseñan los desplazamientos químicos como δ partes por millón (ppm) campo abajo de TMS para muestras procesadas en cloroformo deuterado (CDCl₃) o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). Se asignaron los espectros de ¹³C con la ayuda de experimentos de aumento sin distorsión por transferencia de polarización (experimentos de DEPT). Se usaron las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), dd (doblete doble), t (triplete) y m (multiplete). Valores de J medidos en Hz. Se registraron la ionización electrónica (IE) e ionización química positiva y negativa (IQ) en un espectrómetro Micromass Trio 2000. Se registraron la ionización por electropulverización positiva y negativa (IEP) usando un espectrómetro de ionización Micromass Tof Spec 2e. Se registraron los espectros de alta resolución (EMAR) en un espectrómetro Thermo Finnigan MAT95XP. Se registró la espectroscopia infrarroja usando el Jasco FT/IR-4100 running spectra manager. Se reseñaron todos los picos en longitud de onda a cm^{-1} . Se determinaron los puntos de fusión (PF) en tubos capilares de vidrio abiertos en un aparato Gallenkamp MPD.350.BM2.5 y se dejaron sin corregir. Se registraron los espectros ultravioleta (UV) en un espectrómetro Cary 100 UV procesado con software Cary Win UV usando cubetas de cuarzo de longitud de recorrido (2 lados opuestos esmerilados) de 1 cm de longitud de recorrido. Se registraron los espectros de fluorescencia para las reacciones enzimáticas en un fluorímetro Cary Eclipse usando cubetas termostalizadas de cuarzo de 4 lados de 1 cm de longitud de recorrido. Se usaron valores de ranura de 2,5, 5 y 10 dependiendo de la intensidad generada, usándose una función de obturación automática para minimizar el fotoblanqueamiento. Se registraron los espectros de emisión y excitación de fluorescencia para reducciones químicas en cubetas de cuarzo termostalizadas de 4 lados usando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC. Se suministró la fuente de luz a través de una bombilla de xenón de 150 W. Se procesaron los datos usando el software Shimadzu Rf-5301PC y el sistema ThermoFisher Accela U-HPLC (cromatografía líquida a presión ultraalta), y se consiguió la separación usando una columna en fase inversa C18 (dimensiones: 50x2,1 mm; tamaño de partícula 1,9 micrómetros). Se analizaron los datos usando un sistema de PDA (matriz de fotodiodos) y se procesaron usando el software ChromQuest (versión 4.2). Se usaron todos los disolventes sin purificación adicional. En las reacciones, se

secaron las soluciones con MgSO₄. Se evaporaron los disolventes a presión reducida. Se obtuvieron las partículas magnetizables recubiertas con anticuerpos anti-Ber-EP4 en (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega).

Abreviaturas: DCC es dicitohexilcarbodiimida; DMAP es 4-dimetilaminopiridina; DCM es diclorometano; DCE es dicloroetano; DMSO es dimetilsulfóxido y PBS es solución salina tamponada con fosfato.

Ejemplo 1- Lactonas de fórmula general (IV), Y es O

A. 6-Hidroxi-4,4,5,7,8-pentametil-1-benzopiran-2-ona ($R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=Me$)

Se añadieron 2,3,5-trimetil-1,4-hidroquinona (5,0 g, 32,9 mmol) y 3,3-dimetilacrilato de metilo (4,31 g, 4,94 ml, 37,8 mmol) a ácido metanosulfónico (50 ml). Se agitó la mezcla a 70 °C durante 3 horas, se inactivó entonces con H₂O (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x100 ml). Se lavó entonces la fase orgánica con H₂O (100 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (100 ml) y salmuera saturada (100 ml). Se secó entonces la fase orgánica sobre MgSO₄ y se condensó a vacío, dando un sólido. Se recristalizó el residuo con hexano-cloroformo (3:1), dando la lactona (5,4 g, 70,2 %) en forma de cristales incoloros. PF: 182-184 °C, bib. 186-187 °C (Borchardt y Cohen, 1972b). RMN-¹H (CDCl₃): δ 4,73 (1H, s, OH), 2,55 (2H, s, CH₂), 2,36 (3H, s, ArCH₃), 2,22 (3H, s, ArCH₃), 2,19 (3H, s, ArCH₃), 1,45 (6H, s, 2xgem-CH₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 169,3 (C=O), 148,7, 142,3, 127,6, 123,4, 120,9, 119,5 (6xArC), 45,7 (CH₂), 34,6 (C(CH₃)₂), 27,5 (2x gem-CH₃), 14,6, 12,4, 12,1 (3x ArCH₃). EM: IQ 235, (M+1)⁺ 33 %; IE 234, (M)⁺ 100 %.

B. 6-Hidroxi-4,4,7,8-tetrametil-1-benzopiran-2-ona ($R_1=R_2=R_4=R_5=Me$; $R_3=H$)

Se añadieron 2,3-dimetil-1,4-hidroquinona (5,03 g, 36,2 mmol) y 3,3-dimetilacrilato de metilo (5,68 ml, 4,96 g, 43,5 mmol) a ácido metanosulfónico (50 ml). Se agitó la mezcla a 90 °C durante 5 horas, se inactivó entonces con H₂O (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x200 ml). Se lavó entonces la fase orgánica con agua (100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml) y salmuera saturada (100 ml). Se secó entonces la fase orgánica sobre MgSO₄ y se condensó a vacío. Se recristalizó el residuo con hexano-cloroformo (3:1), dando la lactona en forma de cristales incoloros (3,40 g, 42,7 %). PF: 145-147 °C, bib.: 146-148 °C (Yenes y Messeguer, 1999). RMN-¹H (CDCl₃): δ 6,63 (1H, s, ArH), 5,21 (1H, s, OH), 2,58 (2H, s, CH₂), 2,23 (3H, s, CH₃), 2,16 (3H, s, CH₃), 1,30 (6H, s, 2x gem-CH₃); RMN-¹³C (CDCl₃): δ 169,4 (C=O), 150,3, 142,6, 126,5, 126,3, 122,7, 107,8 (6xArC), 43,6 (CH₂), 33,1 (C(CH₃)₂), 27,6 (2x gem-CH₃), 12,3, 12,0 (2x ArCH₃); EM: IQ 221, (M+1)⁺ 44,7 %; IE 220, (M)⁺ 100 %.

C. 6-Hidroxi-5,7,8-trimetil-1-benzopiran-2-ona ($R^1=R^2=R^3=Me$; $R^4=R^5=H$)

Se añadieron 2,3,6-trimetilhidroquinona (5 g, 32,9 mmol) y 3,3-dimetilacrilato de metilo (3,39 g, 3,55 ml, 39,5 mmol) a ácido metanosulfónico (50 ml). Se agitó la mezcla a 90 °C durante 2 horas, se inactivó entonces con H₂O (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x200 ml). Se lavó entonces la fase orgánica con H₂O (100 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (100 ml) y salmuera acuosa saturada (100 ml). Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se condensó a vacío. Se recristalizó el residuo con hexano-cloroformo (3:1), dando la lactona (4,21 g, 62,1 %) en forma de cristales incoloros. PF: 169-171 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 4,65 (1H, s, OH), 2,91 (2H, t, CH₂, J= 7,2), 2,71 (2H, t, CH₂, J= 7,4), 2,21 (3H, s, CH₃), 2,19 (3H, s, CH₃), 2,18 (3H, s, CH₃); RMN-¹³C (CDCl₃): δ 169,5 (C=O), 148,2, 144,2, 122,9, 121,8, 119,3, 118,0, (6xAr), 29,1 (3CH₂), 21,3 (4CH₂), 12,2, 12,1, 11,8 (3xArCH₃); IQ 207, (M+1)⁺ 25 %; IE 206, (M)⁺ 100 %.

Ejemplo 2- Ácidos quinónicos de fórmula general (II), Y es O

A. Ácido 3-(3',6'-dioxo-2',4',5'-trimetilciclohexa-1',4'-dieno)-3,3-dimetilpropanoico ($R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=Me$)

Se suspendió 6-hidroxi-4,4,5,7,8-pentametil-1-benzopiran-2-ona (3,7 g, 15,8 mmol) en acetonitrilo (ac., 15 % v/v, 200 ml). Se añadió gota a gota una solución de NBS (3,8 g, 21,3 mmol) en acetonitrilo (ac., 40 % v/v, 60 ml) durante un periodo de 1 hora a la suspensión. Se agitó la mezcla durante 30 minutos adicionales, se diluyó entonces con H₂O (330 ml) y se extrajo con dietiléter (3x75 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con H₂O (2x100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre MgSO₄ y se condensó entonces por bombeo, dando un sólido. Se recristalizó el sólido con acetato de etilo, procurando los ácidos quinónicos en forma de cristales amarillos (1,9 g, 48,1 %). PF: 97-99 °C, bib.: 101-103 °C (Borchardt y Cohen, 1973c). RMN-¹H (CDCl₃): δ 11,04 (1H, s, a, OH), 3,06 (2H, s, CH₂), 2,10 (3H, s, ArCH₃), 1,95 (6H, s, 2x CH₃), 1,43 (6H, s, 2x gem-CH₃); RMN-¹³C (CDCl₃): δ 190,9, 187,4 (2x C=O de quinona), 178,9 (COOH), 152,0, 143,0, 139,0, 138,4 (4x C de anillo), 47,3 (CH₂), 37,9 (C(CH₃)₂), 28,8 (2x gem-CH₃), 14,3, 12,5, 12,1 (3x ArCH₃); EM: IQ 251, (M+1)⁺ 100 %; IE 250, (M)⁺ 5 %.

B. Ácido 3-(3',6'-dioxo-4',5'-dimetilciclohexa-1',4'-dieno)-3,3-dimetilpropanoico ($R_1=R_2=R_4=R_5=Me$, $R_3=H$)

Se suspendió 6-hidroxi-4,4,7,8-tetrametil-1-benzopiran-2-ona (2,0 g, 9,1 mmol) en acetonitrilo (ac., 15 %, 110 ml). Se añadió gota a gota una solución de NBS (2,18 g, 12,3 mmol) en acetonitrilo (ac., 40 %, 35 ml) durante 1 hora a la

suspensión de lactona agitada. Se agitó la mezcla durante 2 horas adicionales, se diluyó entonces con H₂O (180 ml) y se extrajo con dietiléter (3x45 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con H₂O (120 ml) y salmuera saturada (100 ml) y se secaron sobre MgSO₄. Se evaporó la solución orgánica amarilla hasta sequedad y se recristalizó con acetato de etilo, produciendo el ácido quinónico en forma de cristales amarillos (1,3 g, 60,5 %) PF: 92-94 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 10,37 (1H, s a, OH), 6,53 (1H, s, 2-H), 2,94 (2H, s, CH₂), 2,00 (6H, s, 2xCH₃), 1,32 (6H, s, 2x gem-CH₃); RMN-¹³C (CDCl₃): δ 187,9, 187,5 (C=O de quinona), 177,3 (COOH), 152,9, 142,4, 139,7, 132,2 (4x C de anillo), 44,8 (CH₂), 36,8 (C(CH₃)₂), 28,1 (2x gem-CH₃), 12,6, 11,9 (2xAr-CH₃). EM: IQ 237, (M+1)⁺ 22,4 %, 254 (M+NH₄) 100 %; IE 237, (M+1)⁺ 55,3 %.

10 C. Ácido 3-(3',6'-dioxo-2',4',5'-trimetilciclohexa-1',4'-dieno)propanoico (R₁= R₂= R₃= Me; R₄= R₅= H)

Se suspendió la lactona apropiada (1,5 g, 7,3 mmol) en acetonitrilo (ac., 15 %, 90 ml). Se añadió gota a gota una solución de NBS (1,72g, 9,83 mmol) en acetonitrilo (ac., 40 %, 30 ml) durante 1 hora a la suspensión de lactona agitada. Se agitó la mezcla durante 1 hora adicional, se diluyó entonces con H₂O (220 ml) y se extrajo con dietiléter (3x75 ml). Se lavaron los extractos orgánicos combinados con H₂O (150 ml), se secaron sobre MgSO₄, se condensaron a vacío y se recristalizaron con acetato de etilo, produciendo el ácido quinónico en forma de un compuesto amarillo (1,19 g, 73,5 %). PF: 113-115 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 11,00 (1H, a, OH), 2,82 (2H, t, CH₂, J= 7,7), 2,52 (2H, t, CH₂, J= 7,7), 2,11 (3H, s, CH₃), 2,02 (6H, s, 2xCH₃); RMN-¹³C (CDCl₃): δ 187,5, 186,9 (C=O de quinona), 178,5 (COOH), 141,8, 141,6, 140,8, 140,6 (4x C de anillo), 32,6 (2CH₂), 22,1 (3CH₂), 12,4, 12,3, 12,3 (3xAr-CH₃). EM: IQ 223, (M+1)⁺ 100 %; IE 222, (M)⁺ 19,7 %.

Ejemplo 3- Sustratos fluorigénicos de fórmula general (I), Y es O

25 A. 3-Metil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)butanoato de 2-oxo-2H-1-benzopiran-7-ilo (R₁= R₂= R₃= R₄= R₅= Me)(Compuesto A)

Se suspendió en DCM seco (10 ml) una mezcla de ácido 3-(3',6'-dioxo-2',4',5'-trimetilciclohexa-1',4'-dieno)-3,3-dimetilpropanoico (400 mg, 1,7 mmol), DCC (415 mg, 2,0 mmol) y DMAP (21 mg, 0,2 mmol). Se agitó la suspensión durante 30 minutos. Se añadió 7-hidroxicumarina (317 mg, 2,0 mmol) y se agitó la mezcla durante 24 horas adicionales. Se filtró la suspensión resultante y se evaporó el filtrado. Se filtró la suspensión formada, se evaporó, se redisolvió en acetato de etilo y se filtró. Se purificó el extracto orgánico por cromatografía en columna (1:3, acetato de etilo-hexano), procurando el producto: 330 mg (50,0 %) en forma de un sólido amarillo. PF: 128-130 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,68 (1H, d, ArH, J= 9,6), 7,46 (1H, d, ArH, J= 8,4), 7,02 (1H, d, ArH, J= 2,1), 6,94 (1H, d, d, ArH, J= 2,1), 6,39 (1H, d, ArH, J= 9,6), 3,29 (2H, s, CH₂), 2,19 (3H, s, CH₃), 1,94 (6H, s, 2xCH₃), 1,53 (6H, s, 2x gem-CH₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 190,8, 187,3 (2x C=O de quinona), 170,8 (C=OO), 160,3 (C=O de cumarina), 154,7, 152,9, 151,4, 142,8, 142,7, 139,5, 138,9, 128,6, 118,3, 116,7, 116,2, 110,4 (12x C de anillo), 47,7 (CH₂), 39,0 (C(CH₃)₂), 29,9 (2x gem-CH₃), 14,5, 12,7, 12,2 (3xCH₃). EM: ES+ve 417,1 (M+Na) 100 %.

40 B. 3-(4,5-Dimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)-3-metilbutanoato de 2-oxo-2H-1-benzopiran-7-ilo (R₁= R₂= R₄= R₅= Me; R₃= H)(Compuesto B)

Se añadieron DCC (4,18 mg, 2,0 mmol) y DMAP (21 mg, 0,2 mmol) a una suspensión de ácido 3-(3',6'-dioxo-4',5'-dimetilciclohexa-1',4'-dieno)-3,3-dimetilpropanoico (400 mg, 1,7 mmol) en DCM seco (10 ml). Se agitó la mezcla durante 30 minutos y se añadió entonces 7-hidroxicumarina (329 mg, 2,0 mmol). Se agitó entonces la mezcla durante 16 horas. Se filtró la mezcla resultante y se condensó a vacío. Se disolvió el sólido resultante en acetato de etilo y se filtró. Se condensó el filtrado, se redisolvió en acetato de etilo y se filtró, se redujo de nuevo el filtrado resultante a vacío y se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo-hexano 1:3), produciendo el producto en forma de un sólido amarillo, 285 mg (44,4 %). PF: 108-110 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,66 (1H, d, ArH, J= 9,6), 7,44 (1H, d, ArH, J= 8,4), 7,00 (1H, d, ArH, J= 1,8), 6,93 (1H, d, d, ArH, J= 2,1, 2,1), 6,59 (1H, s, ArH), 6,38 (1H, d, ArH, J= 9,6), 3,22 (2H, s, CH₂), 2,02 (3H, s, CH₃), 1,94 (3H, s, CH₃), 1,42 (6H, s, 2xgem-CH₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 188,0 187,0 (2x C=O), 170,1 (C=OO), 160,7 (C=O de cumarina), 154,9, 153,2, 153,1, 143,3, 142,7, 140,3, 132,6, 129,0, 118,7, 117,1, 116,4, 110,7 (12x C de anillo), 45,4 (CH₂), 37,7 (C(CH₃)₂), (2x gem-CH₃), 13,0, 12,3 (2xCH₃). EM: ES+ 403,1 (M+Na).

55 C. 3-(2,4,5-Trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)propanoato de 2-oxo-2H-1-benzopiran-7-ilo (R₁= R₂= R₃= Me; R₄= R₅= H)(Compuesto C)

Se añadió ácido 3-(3',6'-dioxo-2',4',5'-trimetilciclohexa-1',4'-dieno)propanoico (500 mg, 2,3 mmol) a una solución de DCC (557 mg, 2,7 mmol) y DMAP (27 mg, 0,2 mmol) en DCM seco (10 ml) y se agitó la suspensión durante 30 minutos. Se añadió a la mezcla 7-hidroxicumarina (437 mg, 2,7 mmol) y se continuó la agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla resultante y se condensó a vacío. Se disolvió el sólido resultante en acetato de etilo y se filtró. Se condensó el filtrado, se redisolvió en acetato de etilo y se filtró. Se redujo de nuevo el filtrado resultante a vacío y se purificó por cromatografía en columna (eluyendo con acetato de etilo:hexano 1:3), produciendo el producto en forma de un sólido amarillo, 285 mg (34,6 % de rendimiento). RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,69 (1H, d, ArH, J= 9,6), 7,49 (1H, d, ArH, J= 8,4), 7,13 (1H, d, ArH, J= 2,1), 7,06, 7,04 (1H, d, d, ArH, J= 2,1), 6,40 (1H, d,

ArH J= 9,6), 2,94 (2H, t, CH₂ J= 7,5), 2,76 (2H, t, CH₂ J= 7,5), 2,11 (3H, s, CH₃), 2,03 (3H, s, CH₃).

D. 3-Metil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)butanoato de 4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-ilo (R₁= R₂= R₃= R₄= R₅= Me) [MTL8-252]; (Compuesto D)

5 Se suspendió en DCE seco (20 ml) una mezcla de ácido 3-(3',6'-dioxo-2',4',5'-trimetilciclohexa-1',4'-dieno)-3,3-dimetilpropanoico (800 mg, 3,4 mmol), DCC (830 mg, 4,0 mmol) y DMAP (42 mg, 0,4 mmol). Se agitó la suspensión durante 30 minutos. Se añadió 4-metilumbeliferona (634 mg, 3,6 mmol) y se agitó la mezcla durante 24 horas adicionales. Se filtró la suspensión resultante y se evaporó el filtrado. Se filtró la suspensión formada, se evaporó, se redisolvió en acetato de etilo y se filtró. Se evaporó el extracto orgánico y se recrystalizó con acetato de etilo, procurando el producto en forma de cristales amarillos (0,96 g, 69 %). RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,58 (1H, d, ArH, J= 5 Hz), 7,02 (1H, d, ArH, J= 3 Hz), 6,98 (1H, d, ArH, J= 3 Hz), 6,96 (1H, d, ArH, J= 3 Hz), 3,29 (2H, s, CH₂), 2,41 (3H, s, CH₃), 2,18 (3H, s, CH₃), 1,94 (3H, s, CH₃), 1,53 (6H, s, 2xCH₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 190,8, 187,3 (2x C=O de quinona), 170,8 (C=O), 160,4 (C=O de cumarina), 154,1, 152,8, 151,8, 151,5, 142,7, 139,7, 138,8, 125,4, 117,9, 117,8, 114,6, 110,4 (12x C de anillo), 47,7 (CH₂), 38,4 (C(CH₃)₂), 29,0 (2x gem-CH₃), 18,7 (CH₃), 14,4, 126, 12,1 (3xCH₃).

Se sintetizaron los siguientes sustratos de amido como modelos de los compuestos de fórmula general (I), en que X es NR⁸.

20

Ejemplo 4. Sustratos de amido

A. N-Metil-N-fenil-[3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)-3-metil]butanamida

25 Se añadieron DCC (371 mg, 1,8 mmol) y DMAP (22 mg, 0,2 mmol) en DCM seco (10 ml) al ácido quinónico apropiado (400 mg, 1,6 mmol). Se agitó la mezcla durante 30 min y después de dicho tiempo se añadió N-metil-anilina (192,6 mg, 1,8 mmol). Se agitó entonces la mezcla durante 16 horas. Se filtró la suspensión resultante y se lavó con HCl (ac., 0,1 M, 5 ml), se redujo a vacío y se purificó por cromatografía en columna (eluyendo con acetato de etilo:hexano 3:1), produciendo un sólido amarillo del producto: 390 mg (71,9 %). PF: 92-94 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,45 (2H, t, meta H, J= 6,9), 7,36 (1H, t, para H J= 6,8), 7,20 (2H, d, orto H J= 7,2), 3,17 (3H, s, NCH₃), 2,75 (2H, s, CH₂), 2,10 (3H, s, CH₃), 2,01 (3H, s, CH₃), 1,97 (3H, s, CH₃), 1,30 (6H, s, 2xgem-CH₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 191,2 (C=O de quinona), 187,7 (C=O de quinona), 172,1 (C=O), 154,8, 144,0, 143,6, 137,7, 136,2 (5x C de anillo), 129,8 (meta C), 127,8 (para C), 127,5 (orto C), 47,6 (CH₂), 38,0 (C(CH₃)₂), 37,1 (NCH₃), 28,4 (2x gem-CH₃), 14,1, 12,7, 12,1 (3x CH₃). EM: ES+ 362,2 (M+Na).

35

B. N-Metil-N-fenil-[3-(4,5-dimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)-3-metil]butanamida

40 Se añadió ácido 3-(3',6'-dioxo-4',5'-dimetilciclohexa-1',4'-dieno)-3,3-dimetilpropanoico (400 mg, 1,69 mmol) a una solución de DCC (371 mg, 1,80 mmol) y DMAP (22 mg, 0,180 mmol) en 10 ml de DCM seco. Se agitó la mezcla durante 30 minutos y después de dicho tiempo se añadió N-metil-anilina (181,8 mg, 1,80 mmol). Se agitó entonces la mezcla durante 16 horas. Se filtró la mezcla, se lavó con HCl (ac., 0,1 M, 5 ml), se redujo a vacío y se purificó por cromatografía en columna (eluyendo con acetato de etilo:hexano 3:1), dando un sólido amarillo del producto, 330 mg (60,4 %). PF: 110-112 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,44 (2H, t, meta H J= 7,4), 7,36 (1H, t, para H J= 7,2), 7,16 (2H, d, meta H J= 7,5), 6,49 (1H, s, ArH de quinona), 3,16 (3H, s, NCH₃), 2,02 (3H, s, CH₃), 1,99 (3H, s, CH₃), 1,16 (6H, s, 2x gem-CH₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 188,2 (C=O de quinona), 188,0 (C=O de quinona), 171,3 (C=O), 155,5, 144,1, 142,3, 139,6, 130,4 (5x C de anillo), 129,8 (2x meta C), 127,8 (para C), 127,5 (2x orto C), 44,4 (CH₂), 37,4 (C(CH₃)₂), 37,2 (NCH₃), 28,5 (2x gem-CH₃), 12,7, 11,9 (2x CH₃ de quinona). ES: ES+ 348,1 (M+Na).

45

C. N-Metil-N-fenil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)propanamida (R₁= R₂= R₃= Me; R₄= R₅= H)

50

55 Se añadieron DCC (371 mg, 1,8 mmol) y DMAP (22 mg, 0,2 mmol) en DCM seco (10 ml) al ácido quinónico (64) apropiado (400 mg, 1,8 mmol) y se agitó durante 30 minutos. Se añadió a la mezcla agitada N-metil-anilina (192,6 mg, 1,8 mmol). Se agitó entonces la mezcla durante 16 horas. Se filtró la mezcla resultante, se lavó con HCl (ac., 0,1 M, 5 ml), se redujo a vacío y se purificó por cromatografía en columna (eluyendo con acetato de etilo:hexano 3:1), produciendo un sólido amarillo del producto: 285 mg (50,9 %). PF: 69-71 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,40 (2H, t, meta H J= 7,4), 7,32 (1H, t, para H J= 7,2), 7,17 (2H, d, orto H J= 7,5), 3,26 (3H, s, NCH₃), 2,75 (2H, t, CH₂ J= 7,8), 2,19 (2H, t, CH₂, J= 7,8) 2,00 (3H, s, 2xCH₃), 1,94 (3H, s, CH₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 187,6 (C=O de quinona), 186,8 (C=O de quinona), 171,7 (C=O), 143,8, 142,9, 141,0, 140,4 (5x C de anillo), 129,8 (2x meta C), 127,9 (para C), 127,3 (2x orto C), 37,4 (NCH₃), 32,8, 23,0 (2xCH₂), 12,4, 12,3, 12,1 (3xCH₃). EM: ES+ 334,2 (M+Na).

60

D. N-Fenil-[3-metil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)]butanamida (R₁= R₂= R₃= R₄= R₅= Me)

65 Se añadieron DCC (371 mg, 1,8 mmol) y DMAP (22 mg, 0,2 mmol) en 10 ml de DCM seco al ácido quinónico apropiado (400 mg, 1,6 mmol) y se agitó durante 30 minutos. Se añadió a la mezcla agitada anilina (148,8 mg, 1,6

mmol). Se agitó entonces la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla resultante, se lavó con HCl (ac., 0,1 M, 5 ml), se redujo a vacío y se purificó por cromatografía en columna (eluyendo con acetato de etilo:hexano 3:1), produciendo un producto sólido amarillo: 410 mg (78,8 %). PF: 152-154 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,40 (2H, d, orto **H** J= 8,1), 7,28 (2H, t, meta **H** J= 7,7), 7,13 (1H, s, **NH**), 7,07 (1H, t, para **H** J= 7,4), 3,02 (2H, s, **CH**₂), 2,15 (3H, s, **CH**₃), 1,95 (6H, s, 2x**CH**₃), 1,50 (6H, s, 2xgem-**CH**₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 191,6 (**C**=O de quinona), 187,5 (**C**=O de quinona), 170,2 (**C**=O), 153,0 (**C** de alqueno de quinona), 143,3 (**C** de alqueno de quinona), 138,3 (**C** de alqueno de quinona), 138,2 (ipso **C** de anilina), 137,6 (**C** de alqueno de quinona), 129,0 (meta **C**), 124,3 (para **C**), 119,8 (orto **C**), 50,5 (**CH**₂), 38,4 (**C**(CH₃)₂), 29,1 (2xgem-**CH**₃), 14,2 (**CH**₃ de quinona), 12,7 (**CH**₃ de quinona), 12,2 (**CH**₃ de quinona). EM: ES+ 348,1 (M+Na).

E. *N-Fenil-[3-(4,5-dimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)-3-metil]butanamida* (R₁= R₂= R₄= R₅= Me; R₃= H)

Se añadieron DCC (371 mg, 1,80 mmol) y DMAP (22 mg, 0,180 mmol) en DCM seco (10 ml) al ácido quinónico apropiado (400 mg, 1,69 mmol) y se agitó durante 30 minutos. Se añadió a la mezcla agitada anilina (157,2 mg, 1,69 mmol). Se agitó entonces la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla resultante, se lavó con HCl (ac., 0,1 M, 2 ml), se redujo a vacío y se purificó por cromatografía en columna (eluyendo con acetato de etilo:hexano 3:1), produciendo un sólido amarillo (86), 390 mg (73,9 %). PF: 131-133 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 7,37 (2H, d, orto **H** J= 7,5), 7,27 (2H, t, meta **H**, J= 7,8), 7,07 (2H, t, para **H**, J= 7,4), 7,05 (**NH**, intercambio de D₂O), 6,60 (1H, s, **H** de quinona), 2,94 (2H, s, **CH**₂), 2,02 (3H, s, **CH**₃), 2,00 (3H, s, **CH**₃), 1,38 (6H, s, 2xgem**CH**₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 188,4 (**C**=O de carbonilo de quinona), 187,9 (**C**=O de carbonilo de quinona), 169,1 (**C**=O de carbonilo de amida), 153,5 (**C** de quinona), 142,3 (**C** de quinona), 140,0 (**C** de quinona), 137,4 (ipso **C** de anilina), 132,0 (**C** de quinona), 129,0 (meta **C**), 124,4 (para **C**), 119,8 (orto **C**), 48,3 (**CH**₂), 37,6 (**C**(CH₃)₂), 28,5 (2xgem**CH**₃), 12,6 (**CH**₃ de quinona), 11,9 (**CH**₃ de quinona). EM: ES+ 334,1 (M+Na).

F. *N-Fenil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)propanamida* (R₁= R₂= R₃= Me; R₄= R₅= H)

Se añadieron DCC (371 mg, 1,80 mmol) y DMAP (22 mg, 0,180 mmol) en DCM seco (10 ml) al ácido quinónico apropiado (400 mg, 1,80 mmol) y se agitó durante 30 minutos. Se añadió a la mezcla agitada anilina (167,4 mg, 1,80 mmol). Se agitó entonces la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla resultante, se lavó con HCl (ac., 0,1 M, 2 ml), se redujo a vacío y se purificó por cromatografía en columna (eluyendo con acetato de etilo:hexano 3:1), produciendo un sólido amarillo del producto, 360 mg (67,2 %). PF: 135-137 °C. RMN-¹H (CDCl₃): δ 8,09 (1H, s, **NH**), 7,51 (2H, d, orto **H** J= 7,8), 7,30 (2H, t, meta **H** J= 8,0), 7,08 (1H, t, para **H** J= 7,4), 2,89 (2H, t, **CH**₂ J= 7,7), 2,50 (2H, t, **CH**₂, J= 7,8), 2,08 (3H, s, **CH**₃), 2,00 (6H, s, 2x**CH**₃). RMN-¹³C (CDCl₃): δ 187,4, 187,4 (2x **C**=O de quinona), 170,0 (**C**=O), 142,2, 141,7, 141,0, 140,4, 137,8 (5x **C** de anillo), 129,0 (meta **C**), 124,3 (para **C**), 119,8 (orto **C**), 36,2 (**CH**₂), 23,0 (**CH**₂), 12,5, 12,3 (3x**CH**₃). EM: ES+ 320,2 (M+Na) 100 %.

Ejemplo 5- Solubilidad y pureza

Solubilidad en NMP: Se preparó una solución del producto del Ejemplo 3D (MTL8-252) en NMP y se diluyó adicionalmente a 0,1 M en NMP. Se valoró la pureza del compuesto mediante UPLC usando un gradiente de acetonitrilo de 1-99 %. Se usaron volúmenes de inyección de 0,5 µl, 1 µl, 2 µl, 3 µl y 5 µl. Se determinó que la pureza era de casi 100 % basándose en los datos de UV a 265 nm. Los ajustes de FL Plus eran (alto voltaje de PMT, λ_{exc} 410 nm y λ_{em} 550 nm, fuera del pico). Se detectó un solo pico con un tiempo de retención de aprox. 4,3 min. El MTL8-252 era igualmente muy soluble en DMSO.

Las soluciones madre acuosas de NMP y DMSO en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 10, dieron como resultado una solución ligeramente turbia que no sedimentaba cuando se centrifugaba a 13.000 rpm en una microcentrífuga de mesa. Sin embargo, el área de pico de la señal de UV HPLC no parecía haber sido alterada (en comparación con la de la muestra diluida en NMP). La filtración usando una membrana de 0,2 micrómetros dio como resultado una solución transparente, pero no se detectó pico por HPLC, sugiriendo que el material se retenía en el filtro de nailon. Se obtuvo un resultado similar para la solución madre de DMSO diluida. Experimentos posteriores utilizaron la solución madre diluida a 0,1 M en tampón fosfato 10 mM, pH 7,0, e inyectada directamente en la columna de UPLC.

Ejemplo 6- Estabilidad de MTL8-252 en NMP y tampón de fosfato de sodio

Se valoró la estabilidad de MTL8-252 0,1 M en NMP durante un periodo de 2 horas a 37 °C. El compuesto parecía estable, como se demuestra por el hecho de que el área del pico de absorbancia UV permaneciera sustancialmente inalterado. No se observó liberación detectable de 4-metilumbeliferona (4-MU). Se llevó a cabo un experimento similar con solución madre de DMSO diluida en tampón fosfato de sodio 10 mM. El resultado (véase la Figura 2) muestra que MTL8-252 es significativamente estable durante al menos 1 h.

Ejemplo 7- Evaluación de la actividad de MTL8-252 con NQO1 humana

Se llevó a cabo la HPLC inicial en muestras que contienen MTL8-252 (0,1 mM), NADH (0,5 mM) y hNQO1 0,5 µg/ml en tampón fosfato (10 mM, pH 7) usando un gradiente de acetonitrilo de 1-99 % y un volumen de inyección de µl. Se

mantuvo la temperatura a 37 °C. Se muestran los resultados en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1- Datos de resumen (velocidades iniciales)

Velocidad de disminución de la concentración de MTL8-252 ($\mu\text{M}/\text{min}$) (n= 4)	Velocidad de formación de 4-MU ($\mu\text{M}/\text{min}$) por FL (n= 2)	Velocidad de formación de 4-MU ($\mu\text{M}/\text{min}$) a 210 nm (n= 2)	Velocidad de formación de lactona ($\mu\text{M}/\text{min}$) (n= 2)
5,9, 6,12, 8,41, 9,05	13,51, 6,90	11,48, 6,0	9,84, 7,61

5 La reducción del compuesto original fue rápida, ya que la mayoría había desaparecido para la segunda inyección. Se encontró que una concentración enzimática de 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hNQO1 era adecuada para determinar la velocidad inicial de reducción de MTL8-252. No se observó una reducción significativa del área del pico en presencia de MTL8-252 solo o de NADH solo (véase la Figura 3). Se calculó la velocidad de reducción de la concentración de MTL8-252 como 5,9 $\mu\text{M}/\text{min}$, y cuando se dividió entre dos la concentración de la enzima, se redujo la velocidad a 1,5 $\mu\text{M}/\text{min}$.

10 Este hallazgo demuestra que MTL8-252 es un sustrato de hNQO1. Hubo un aumento del área de pico de 4-MU cuando se monitorizaba a 325 nm que coincidía con la pérdida de sustrato. Se confirmó esto por un aumento del pico de fluorescencia de 4-MU. La presencia de NADH no interfería con los espectros de FL.

15 Se fijó el punto de corte de los datos de UV inicialmente a entre 220-800 nm, y cuando se redujo la longitud de onda menor a 180 nm, la lactona, 4-MU y MTL8-252 eran bastante evidentes a pesar de la mínima interferencia de ruido de fondo.

20 Al alterar los ajustes del detector FL Plus (bajo voltaje de PMT, λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 550 nm) y calibrar para las medidas de 4-MU estableciendo una gráfica de calibración, puede verse que había una respuesta lineal a 4-MU hasta al menos 200 μM . La concentración máxima usada en los experimentos de incubación es de 100 μM final.

25 Después de la calibración del instrumento, se llevó a cabo un experimento repetido de activación de MTL8-252 por hNQO1, dando como resultado las velocidades de pérdida de MTL8-252 y formación de 4-MU calculadas (véase la Figura 4). La velocidad de pérdida de MTL8-252 era de 8,41 $\mu\text{M}/\text{min}$ y la correspondiente a la formación de 4-MU determinada por fluorescencia era de 13,51 $\mu\text{M}/\text{min}$.

30 Las nuevas gráficas de los datos de UV a 210 nm mostraron velocidades iniciales de formación de 4-MU y lactona que eran de 11,48 $\mu\text{M}/\text{min}$ y 9,84 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente (véase la Figura 5).

Ejemplo 8- Actividad de 4-MU y lactona con hNQO1

35 Se efectuó este experimento para asegurar que los productos de activación no se metabolizaban adicionalmente por hNQO1. Se llevó a cabo la HPLC en muestras que contenían 4-MU y lactona (0,1 mM), NADH (0,5 mM) y hNQO1 (0,2 μg) en tampón fosfato (10 mM, pH 7) usando un gradiente de acetonitrilo de 1-99 % y un volumen de inyección de 2 μl . Se mantuvo la temperatura a 37 °C. Los resultados muestran que ambos subproductos liberados después de la activación de MTL8-252 no eran sustratos de hNQO1 (véase la Figura 6).

Ejemplo 9- Incubación de MTL8-252 con células cultivadas *in vitro*

A. Determinación espectrofotométrica de la luminiscencia

45 Se cultivaron células que expresan NQO1 humanas (HDT7) y células que sin expresión (F179) en medio MEM de Eagle enriquecido con aminoácidos no esenciales y 10 % de FBS. Se recolectaron las células en fase de crecimiento exponencial y se suspendieron en PBS frío a 5×10^6 células/ml. Se añadieron 100 μl de suspensión celular (5×10^5 células) a 3 ml de PBS que contiene MTL8-252 10 μM a 37 °C en una cubeta de fluorímetro y se midió durante 3 minutos la velocidad de aumento de la intensidad de fluorescencia (atribuida a la liberación de 4-MU). El experimento de control contenía sustrato solo en PBS. Los ajustes del espectrofotómetro de luminiscencia fueron los siguientes: λ_{ex} = 360 nm; λ_{em} = 452 a 37 °C.

50 La Figura 7 muestra un aumento significativo de la velocidad de formación de 4-MU (al menos 5 veces) después de la incubación con células que expresan hNQO1 (HDT7) en comparación con las células sin expresión (F179). Había una indicación de un brote inicial de actividad pero, debido a la baja sensibilidad del instrumento, esto no pudo verificarse.

Sin embargo, se repitió el experimento con un detector FL-Plus más sensible ligado a una UPLC.

B. Separación por UPLC seguida de detección por FL-Plus

60 Se recolectaron las células en fase de crecimiento exponencial y se resuspendieron en PBS frío a 5×10^6 células/ml.

Se añadieron 100 μ l de suspensión celular (5×10^5 células) a 1 ml de PBS que contiene MTL8-252 10 μ M a 37 °C y se incubó durante los siguientes periodos de tiempo: 0, 5, 30 y 60 min. Se detuvo la reacción centrifugando las células a 13.000 rpm durante 30 segundos y se inyectó el extracto libre de células (2 μ l) directamente en la UPLC. Se consiguió la separación de metabolitos usando una columna Whatman Partisil C18 (S/N nº 4SF03177) con un gradiente de MeCN 1-99 % durante 10 min a un caudal de 1 ml/min. Los ajustes del detector FL-Plus fueron los siguientes: PMT (bajo), λ_{ex} = 360 nm; λ_{em} = 450 nm. La Figura 8 siguiente muestra la velocidad de formación de 4-MU por células que expresan hNQO1. Las medidas iniciales de velocidad sugieren un aumento de aproximadamente 100 veces de la actividad frente a las células sin expresión. Hay también confirmación de un brote inicial de actividad como se sugiere en el experimento espectrofotométrico de luminiscencia.

El reemplazo de PBS por medio de cultivo celular sugiere que otros componentes del medio pueden reducir MTL8-252, Figura 9 siguiente. La posible fuente es el FBS añadido al medio.

Ejemplo 10- Protocolo típico para incubación de MTL8-252 con células cultivadas *in vitro*

Se adoptó el siguiente procedimiento general para los resultados mostrados en las Figuras 10-19. Se preparó una solución 1 mM de sustrato fluorogénico en DMSO. Se centrifugaron a 1200 rpm muestras de orina o muestras de tampón (típicamente 5-20 ml como se especifica en un experimento dado) que contienen células para sedimentar las células. Se retiró el sobrenadante y se lavó el sedimento con 10 ml de PBS o medio de cultivo como se prescriba para un experimento dado. Se resuspendió el sedimento celular en el tampón/medio deseado (1 ml) y se añadieron 10 μ l de solución de sustrato con mezclado. Después de incubar a 37 °C durante el periodo de tiempo deseado (típicamente 3 minutos), se pasó la mezcla a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 μ m y se mantuvo el filtrado en hielo hasta que se analizó por fluorimetría (100 μ l, 380 nm ex/480 nm em) o HPLC (UPLC) (2 μ l). Se expresa la actividad de NQO1 como concentración del producto (4-MU) producido. Ciertos medios exhibieron una fluorescencia de fondo mayor que otros.

Ejemplo 11- Precisión del ensayo

Se efectuó el procedimiento estándar anterior en muestras por duplicado de células HDT7 productoras de NQO1 añadidas a medio de cultivo u orina. La Figura 10 muestra la precisión de determinaciones por triplicado del número especificado de células añadidas al medio de cultivo. La Figura 11 muestra la precisión de las medidas por duplicado de células HDT7 (10^6 células) añadidas a orina. Las barras de error y EEM del experimento demuestran que las células pueden medirse en medio de cultivo u orina sin ningún efecto adverso sobre la precisión.

Se usó también el procedimiento para ensayar en diversos tipos celulares la actividad de NQO1, a saber HDT7 y F179 (líneas celulares productora de NQO1 y genomanipulada sin producción, respectivamente), las líneas celulares de cáncer de vejiga humanas EJ138 y RT112 y la línea celular de cáncer de próstata humana PC3. Se muestran los resultados en las Figuras 12 y 13. Se usaron números similares de células en cada experimento para permitir la comparación. NC representa un control negativo no celular.

Ejemplo 13- Discriminación entre la actividad de NQO1 y NQO2

Las células de carcinoma de próstata (ejemplificadas por células PC3) expresan tanto la actividad de NQO1 como de NQO2. Sin embargo, esta última se activa solo por la presencia de un cosustrato no presente naturalmente en las células (EP-0152R, 1-carbamoilmetilcarbamoil-1,4-dihidronicotinamida). Esto se demostró como sigue:

Se añadió el sustrato fluorogénico MTL8-252 10 μ M en DMSO (final, 10 μ l) a 440 μ l de PBS que contiene 5×10^5 células PC-3 preincubadas a 37 °C durante 5 min y se ajustó el volumen a 500 μ l con PBS. Después de incubar durante 5 min adicionales, se filtró la mezcla por jeringuilla como anteriormente y se analizaron 2 μ l de sobrenadante por UPLC como se describe anteriormente. Se repitió la reacción con el mismo número de células con la inclusión de EP-0152R 100 μ M (50 μ l) como cosustrato durante la incubación. Se filtró la mezcla de reacción y se analizó como anteriormente. Es conocido que, en ausencia de EP-152R, hNQO2 es inactiva. La Figura 14 muestra que hay un aumento de 1,2 veces en la formación de 4-MU por la adición de un cosustrato selectivo de hNQO2. Esta liberación de 4-MU adicional indica que el ensayo, cuando se suplementa con cosustrato de hNQO2, puede usarse para detectar células tumorales que, adicionalmente o como alternativa, expresan la enzima hNQO2. En el primer caso, cuando se expresan NQO1 y NQO2, puede usarse el ensayo suplementado para proporcionar una señal de ensayo más fuerte y, en el último caso, cuando solo se expresa NQO2, puede usarse el ensayo suplementado para detectar cánceres que expresan hNQO2 solo.

Ejemplo 14- Relación entre el número de células cancerosas y la respuesta del ensayo

Se sometieron diversos números de células RT112 al ensayo anterior para demostrar las capacidades de cuantificación del procedimiento. Se muestran los datos para estas pruebas en la Figura 15. Como se esperaría de un ensayo funcional, a medida que aumenta el número de células con NQO1, lo hace la magnitud de la señal del ensayo. Simultáneamente, se expusieron también las células a 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) usando protocolos

establecidos, para permitir la cuantificación del número total de células mediante la medida de la intensidad de fluorescencia de DAPI celular en el fluorímetro (Figura 16). Por tanto, la valoración de los datos de las Figuras 15 y 16 posibilita determinar la cantidad de señal por célula y el número de células en una muestra productora de dicha señal. Esto es particularmente ventajoso cuando se desea determinar la actividad de NQO1 o NQO2 "por célula".

5

Ejemplo 15- Enriquecimiento/aislamiento/purificación de células

En ciertas situaciones, es ventajoso mejorar la sensibilidad y/o especificidad del procedimiento mediante el enriquecimiento/aislamiento/purificación de células antes del ensayo. Este ejemplo demuestra la capacidad y compatibilidad de la presente invención con dichos procedimientos. Aquí, se aislaron muestras que contienen células cancerosas portadoras del antígeno epitelial Ber-EP4 usando partículas magnetizable recubiertas con anticuerpos de este antígeno (Invitrogen). Se usaron las partículas de acuerdo con las instrucciones del fabricante de tal modo que se obtuvo una suspensión de complejos de partículas/células que se procesó por el protocolo de ensayo estándar descrito anteriormente. La Figura 17 muestra que la recuperación de la actividad de NQO1 en células de cáncer de vejiga RT112 es de aproximadamente un 60-70 % respecto a la del número total de células presentes (100 %, representado por la barra de 0 perlas en la figura) en un intervalo de densidades de partícula (ilustrado por el volumen de la solución madre de perlas del fabricante (4×10^6 partículas/ml) añadido). La Figura 18 muestra resultados comparables para células HDT7 que expresan NQO1 pero no expresan el antígeno Ber-EP4 humano. Esto ilustra la capacidad de enriquecer específicamente la población de células epiteliales, un procedimiento que puede ser deseable en casos en que una muestra contenga un gran número de células, no sobreexpresando probablemente todas NQO1 o NQO2, pero pudiendo aumentar la señal de fondo no específica en el ensayo.

10

15

20

Ejemplo 16- Detección de NQO1 en muestras clínicas

Se obtuvieron muestras de orina (20 ml) de pacientes que asisten a una clínica urológica y se sometieron al ensayo resumido anteriormente. Se expresan los resultados como la relación de concentración de 4-MU (producida por el sustrato fluorogénico como resultado de la actividad de NQO1) de las muestras a la del control de ensayo negativo, y se correlacionaba con el diagnóstico clínico eventual (carcinoma de células transicionales o no). El triángulo blanco representa una muestra que contiene cantidades significativas de desechos, sugiriendo que el uso de inmunoeextracción como se describe en la presente memoria sería beneficioso para aumentar la especificidad. El círculo blanco representa una muestra de un paciente diagnosticado posteriormente con cáncer de vejiga Ta de etapa muy temprana, y es probable que haya insuficientes células para un análisis fiable de esta muestra. Los sustratos quimioluminogénicos descritos en la presente memoria es probable que sean ventajosos cuando se requiere una mayor sensibilidad de detección.

25

30

35

La Tabla 2 muestra los correspondientes resultados para pacientes ya diagnosticados con cáncer de vejiga pero todavía no tratados. La muestra 89 de esta serie no pudo ensayarse debido a la presencia de hematuria macroscópica.

40

45

Se recogieron muestras de orina adicionales (20 ml) de pacientes diagnosticados con carcinoma de próstata. Estas muestras se recogieron después de examen rectal digital. La Tabla 3 muestra los resultados del ensayo de NQO1 para estas muestras. En ambos de estos experimentos, se vio una mayor actividad de NQO1 en aquellas muestras de pacientes con tumores de etapa más tardía. En el procedimiento de la invención, el aumento cuantitativo de la actividad de NQO1/NQO2 con la enfermedad avanzada significa que el procedimiento puede usarse no solo para identificar el cáncer, sino también para valorar la progresión de la enfermedad al relacionar la naturaleza cuantitativa del ensayo con las diversas etapas de la enfermedad. Los especialistas en la materia apreciarán que esto es posible debido a la sensibilidad del ensayo y la patología de la enfermedad.

Tabla 2

Muestras de cáncer de vejiga		
Muestra	Etapa	Relación de concentraciones de 4-MU de muestra/4-MU de control de ensayo negativo (NC)
88	T2	4,0
90	DESC	2,9
91	Ta	1,4
92	Ta	1,5
93	Ta	1,0
NC	N/A	1,0

NC es el control de ensayo negativo, DESC es desconocido

Tabla 3

5

Muestras de cáncer de próstata				
Muestra	PSA	Etapa	Observaciones	Relación de concentraciones de 4-MU de muestra/4-MU de control de ensayo negativo (NC)
105	6,6	T1c	Orina tras ERD	1,2
106	9,2	DESC	Orina tras ERD	1,4
107	6	T1c	Orina tras ERD	1,4
108	3,7	T2a	Orina tras ERD, RTUP anterior	4,0
109	6	T1c	Sin ERD	1,0
NC	n/a	n/a		1,0

NC es control de ensayo negativo, DESC es desconocido. Nota: Se creía originalmente que toda esta cohorte era de recogida de orina después ERD. Sin embargo, al comprobar los registros, la muestra 109 se obtuvo sin ERD. La precisión de la medida es típicamente <10 % CV.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia, en una muestra de orina de un paciente, de células de cáncer de vejiga o próstata que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2, comprendiendo el procedimiento:

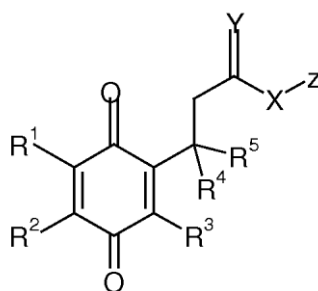
- i. poner en contacto la muestra de orina, o un derivado procesado de la misma, con un compuesto de fórmula general (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id), (Ie) o (If) o una sal de cualquiera de los mismos cuando sea aplicable, donde la muestra de orina contiene o se sospecha que contiene células de cáncer de vejiga o próstata que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2;
- ii. opcionalmente, en caso de que las células de cáncer de vejiga o próstata sobreexpresen o se sospeche que sobreexpresan NQO2, añadir un cosustrato de NQO2 a la muestra; y
- iii. determinar la presencia o ausencia de un compuesto de fórmula:



o un ión de fórmula



donde z y X son como se definen en la fórmula general (I), donde la presencia del compuesto o ión indica la presencia en la muestra de células cancerosas que sobreexpresan NQO1 y/o NQO2; donde la fórmula general (I) es:



(I)

donde R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan cada uno independientemente hidrogeno, halógeno, NR⁶R⁷, C(O)NR⁶R⁷ o alquilo C₁-C₆, -O-(alquilo C₁-C₆) o C(O)O-(alquilo C₁-C₆), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R⁶ y R⁷ representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con halógeno; o

R¹ y R², junto con los átomos de carbono a los que están conectados, forman un sistema de anillo aromático, heteroaromático, carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 miembros;

X es O, S o NR⁸;

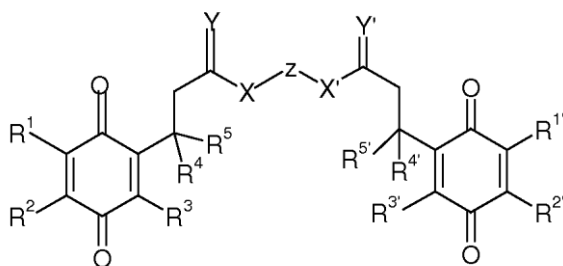
R⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

Y es O, S o NR⁹;

R⁹ es hidrogeno o alquilo C₁-C₃;

z es un resto que está ligado covalentemente con el resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectable;

la formula general (Ia) es:



(Ia)

donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1-C_6 , -O-(alquilo C_1-C_6) o $C(O)O$ -(alquilo C_1-C_6), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno; o

R^1 y R^2 , junto con los átomos de carbono a los que están conectados, forman un sistema de anillo aromático, heteroaromático, carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 miembros;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1-C_6 , -O-alquilo C_1-C_6 o $C(O)O$ -alquilo C_1-C_6 , cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno;

o R^1 y R^2 , junto con los átomos de carbono con los que están conectados, forman un sistema de anillo aromático, heteroaromático, carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 miembros;

X es O, S o NR^8 ;

R^8 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

Y es O, S o NR^9 ;

R^9 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

X' es O, S o NR^8 ;

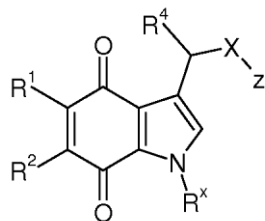
R^8 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

Y' es O, S o NR^9 ;

R^9 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

z es un resto que está ligado covalentemente con el resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectable;

la fórmula general (Ib) es:



donde R^1 , R^2 y R^4 representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR^6R^7 , $C(O)NR^6R^7$ o alquilo C_1-C_6 , -O-(alquilo C_1-C_6) o $C(O)O$ -(alquilo C_1-C_6), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R^6 y R^7 representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con halógeno; o

R^1 y R^2 , junto con los átomos de carbono a los que están conectados, forman un sistema de anillo aromático, heteroaromático, carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido de 5 o 6 miembros;

R^x es H o alquilo C_1-C_3 ;

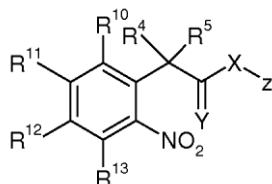
X es O, S o NR^8 ;

R^8 es hidrógeno o alquilo C_1-C_3 ;

Y es O, S o NR^9 ;

z es un resto que está ligado covalentemente con el resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectable;

5 la fórmula general (Ic) es



10 donde R⁴, R⁵, R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR⁶R⁷, C(O)NR⁶R⁷ o alquilo C₁-C₆, -O-(alquilo C₁-C₆) o C(O)O-(alquilo C₁-C₆), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R⁶ y R⁷ representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con halógeno;

15 X es O, S o NR⁸;

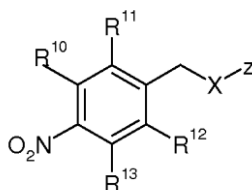
R⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

Y es O, S o NR⁹;

R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

20 z es un resto que está ligado covalentemente con el resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectable;

la fórmula general (Id) es:



25 X es O, S o NR⁸;

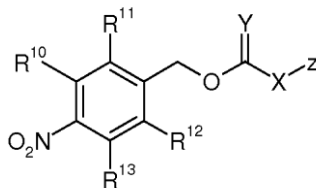
R⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

30 R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR⁶R⁷, C(O)NR⁶R⁷ o alquilo C₁-C₆, -O-(alquilo C₁-C₆) o C(O)O-(alquilo C₁-C₆), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R⁶ y R⁷ representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con halógeno;

35 z es un resto que está ligado covalentemente con el resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectable;

la fórmula general (Ie) es:



40 donde R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR⁶R⁷, C(O)NR⁶R⁷ o alquilo C₁-C₆, -O-(alquilo C₁-C₆) o C(O)O-(alquilo C₁-C₆), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R⁶ y R⁷ representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido

con halógeno;

X es O, S o NR⁸;

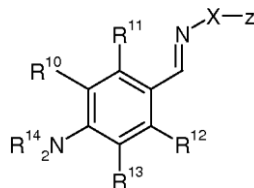
R⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

Y es O, S o NR⁹;

R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

z es un resto que está ligado covalentemente con el resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectable;

10 la fórmula general (If) es:



15 donde R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR⁶R⁷, C(O)NR⁶R⁷ o alquilo C₁-C₆, -O-(alquilo C₁-C₆) o C(O)O-(alquilo C₁-C₆), cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes reactivos;

R⁶ y R⁷ representan cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con halógeno;

R¹⁴ es H o alquilo C₁-C₆ y

X es O, S o NR⁸;

R⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₃;

z es un resto que está ligado covalentemente al resto de la molécula y que, tras la reducción del compuesto de fórmula general (I), se escinde del resto de la molécula formando un compuesto z-XH o ión z-X⁻ detectables.

25 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 donde, en el caso en que las células de cáncer de vejiga o próstata sobreexpresen o se sospecha que sobreexpresen NQO1, se añade un cosustrato de NQO1 a la muestra.

30 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde z comprende un cromóforo o luminóforo.

35 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, donde z comprende un marcador fluorescente, fosforescente, quimioluminiscente o bioluminiscente de tal modo que z-XH o z-X⁻ sea una molécula o ión fluorescente, fosforescente, quimioluminiscente o bioluminiscente; o un modulador de emisiones de una molécula o ión fluorescente, fosforescente, quimioluminiscente o bioluminiscente; o un cofactor para una reacción quimioluminiscente o bioluminiscente.

40 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde las propiedades ópticas del resto z cambian cuando se escinde del resto del compuesto de fórmula general (I), formando el compuesto z-XH o el ión z-X⁻.

45 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, donde el cambio en las propiedades ópticas del resto z comprende un cambio detectable en la longitud de onda de la luz emitida, la retirada del efecto apagador ejercido por el resto de quinona de fórmula general (I) o, en el caso de cofactores, la modulación de su actividad.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el resto z comprende una partícula detectable, por ejemplo una micropartícula de látex coloreada, nanopartícula de oro o partícula magnética.

50 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 7, donde el resto z comprende una porción de unión que se une selectivamente a un resto de captura, donde el resto de captura comprende un copartícipe de unión del resto z.

55 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, donde uno del resto z y el resto de captura es un antígeno y el otro es un anticuerpo; o donde uno de z y el resto de captura es biotina o un derivado de biotina y el otro es avidina o estreptavidina o un derivado de la misma.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde z comprende

fluoresceína, 2-oxo-2*H*-1-benzopirano o 4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-ilo.

11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde, en el compuesto de fórmula general (I), R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ representan cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, NR⁶R⁷, C(O)NR⁶R⁷ o alquilo C₁-C₆, -O-alquilo C₁-C₆ o C(O)O-alquilo C₁-C₆, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de entre halógeno, hidroxilo, tiol, amino, carbonilo, carboxilo, ciano, azido, alqueno C₂-C₆ y alquino C₂-C₆.

12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde en el compuesto de fórmula general (I), independientemente o en cualquier combinación:

R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son cada uno independientemente hidrógeno, metilo o etilo;

X es O o NH e

Y es O.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre

3-metil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)butanoato de 2-oxo-2*H*-1-benzopirano-7-ilo (R¹ = R² = R³ = R⁴ = R⁵ = Me);

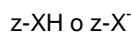
3-(4,5-dimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)-3-metilbutanoato de 2-oxo-2*H*-1-benzopirano-7-ilo (R¹ = R² = R⁴ = R⁵ = Me; R³ = H);

3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)propanoato de 2-oxo-2*H*-1-benzopirano-7-ilo (R¹ = R² = R³ = Me; R⁴ = R⁵ = H); y

3-metil-3-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxociclohexa-1,4-dienil)butanoato de 4-metil-2-oxo-2*H*-cromen-7-ilo (R¹ = R² = R³ = R⁴ = R⁵ = Me).

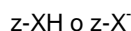
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el paciente tiene o se sospecha que tiene tumores de vejiga superficiales.

15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende poner en contacto la muestra biológica con un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 y donde, en la etapa (iii), determinar la presencia o ausencia de un compuesto o ión de fórmula:



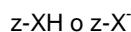
comprende detectar la presencia de un cromóforo o luminóforo.

16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende poner en contacto la muestra biológica con un compuesto como se define en la reivindicación 7 y donde, en la etapa (iii), determinar la presencia o ausencia de un compuesto de fórmula:



comprende detectar la presencia de una partícula coloreada o magnética.

17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende poner en contacto la muestra biológica con un compuesto como se define en la reivindicación 8 o reivindicación 9, y donde, en la etapa (iii), determinar la presencia o ausencia de un compuesto de fórmula:



comprende detectar la presencia del compuesto z-XH o z-X[·] unido al resto de captura.

18. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde la etapa (iii) comprende determinar cuantitativamente la presencia, o determinar la ausencia, del compuesto de fórmula z-XH o z-X[·].

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende adicionalmente la etapa de determinar el número de células en la muestra de orina, o derivado procesado de la misma, con lo que puede expresarse la actividad de NQO1/NQO2 por célula.

20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, donde la etapa (iii) comprende determinar cuantitativamente la presencia o ausencia del compuesto de fórmula z-XH o z-X[·] como una relación de la concentración de z-XH o z-X[·] de la muestra de orina a la de la muestra de control de ensayo negativo.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, donde dicha relación se correlaciona con técnicas de estadificación de células cancerosas conocidas.

Figura 1

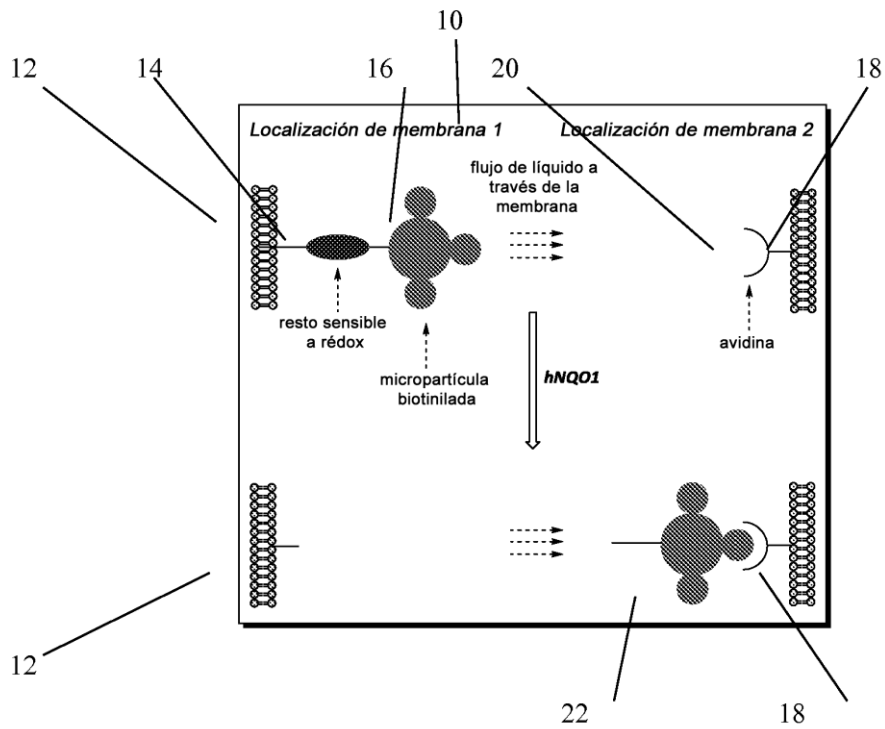


Figura 2

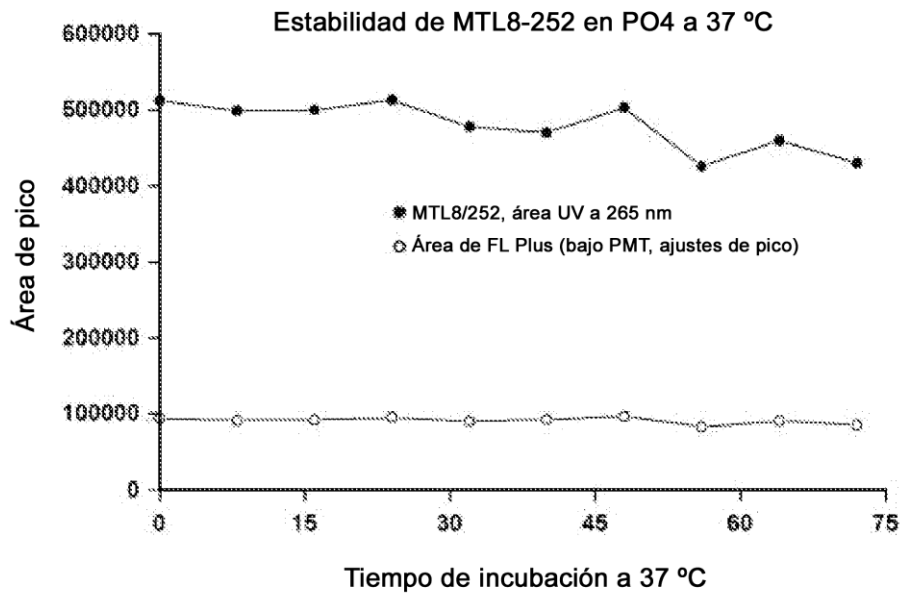


Figura 3

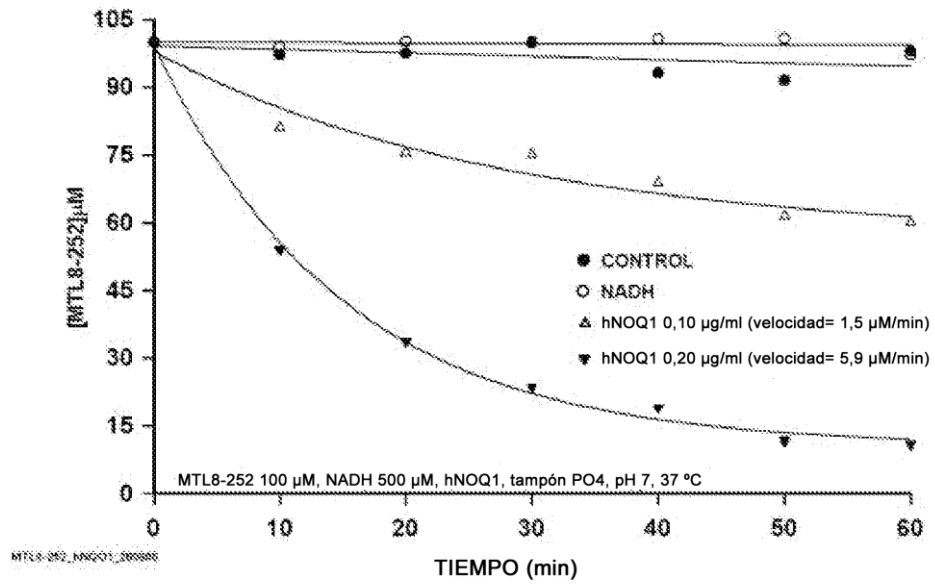


Figura 4

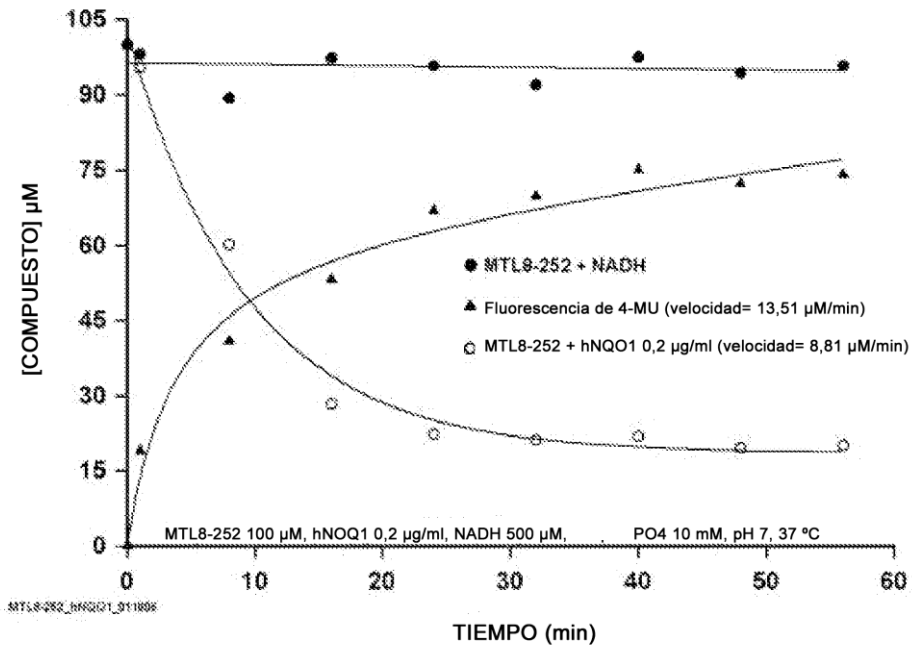


Figura 5

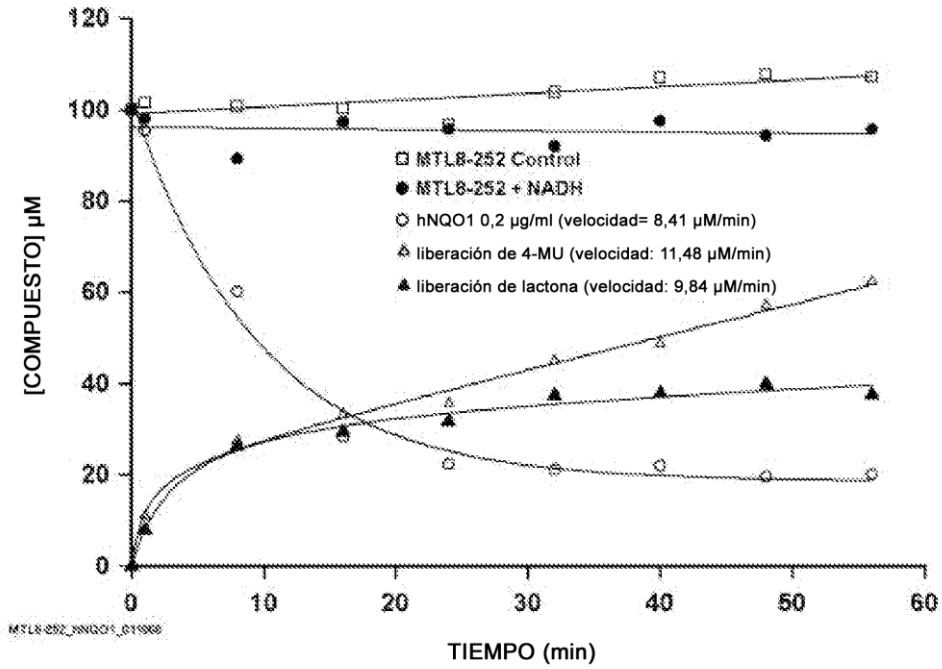


Figura 6

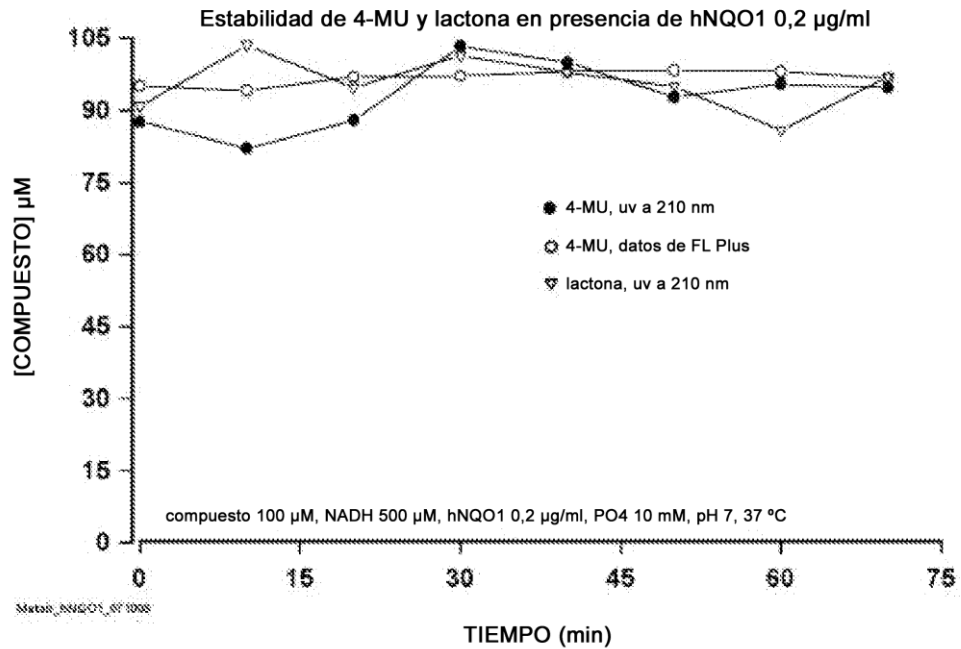


Figura 7

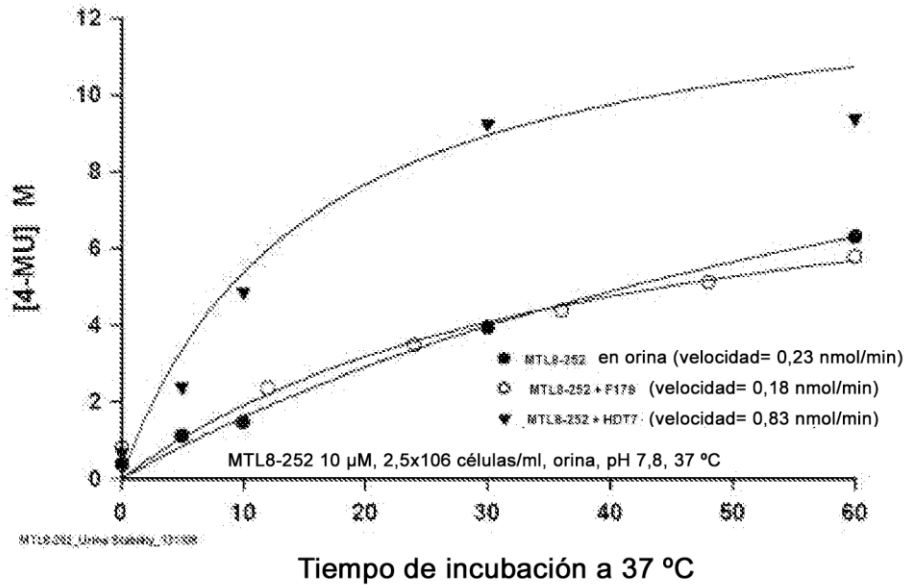


Figura 8

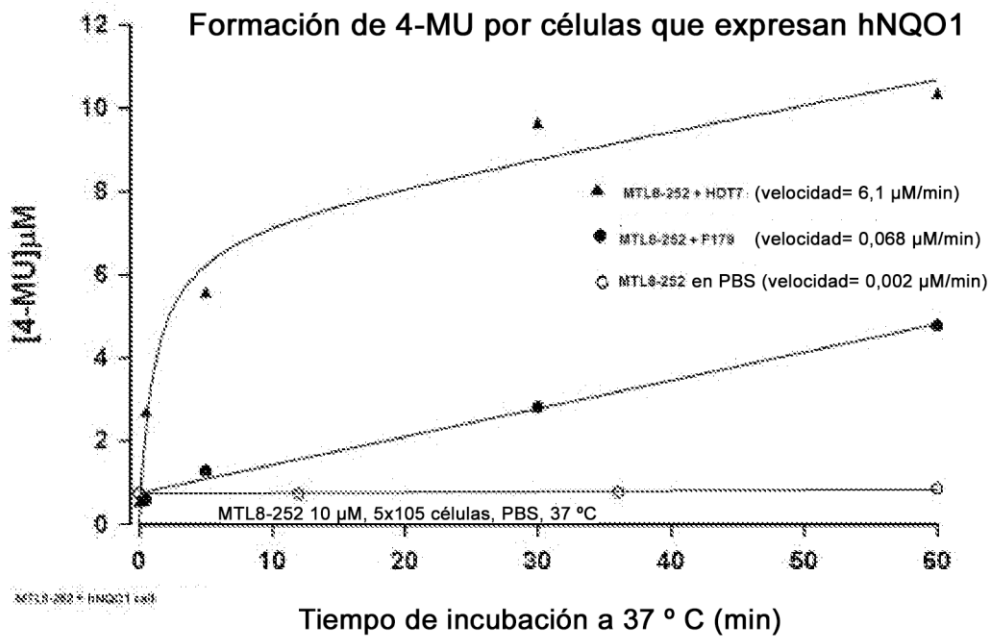


Figura 9

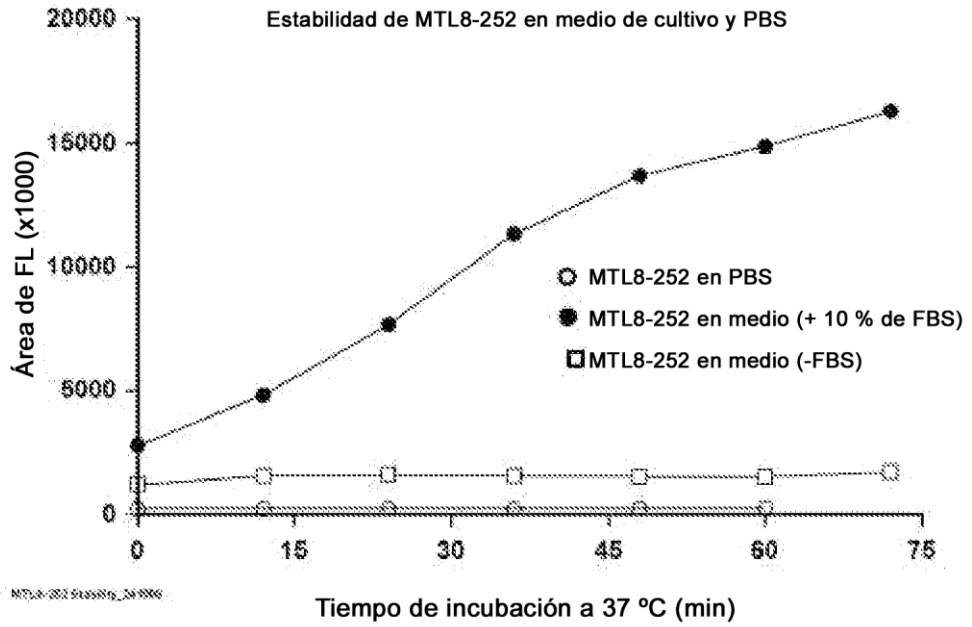


Figura 10

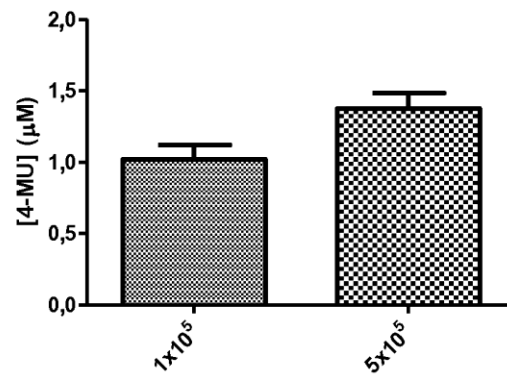


Figura 11

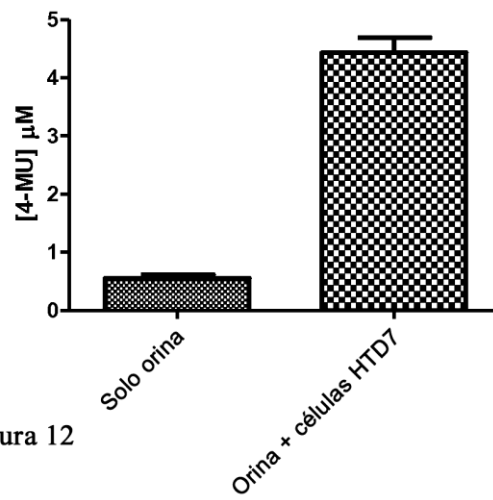


Figura 12

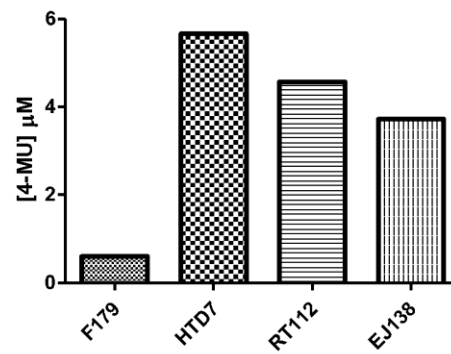


Figura 13

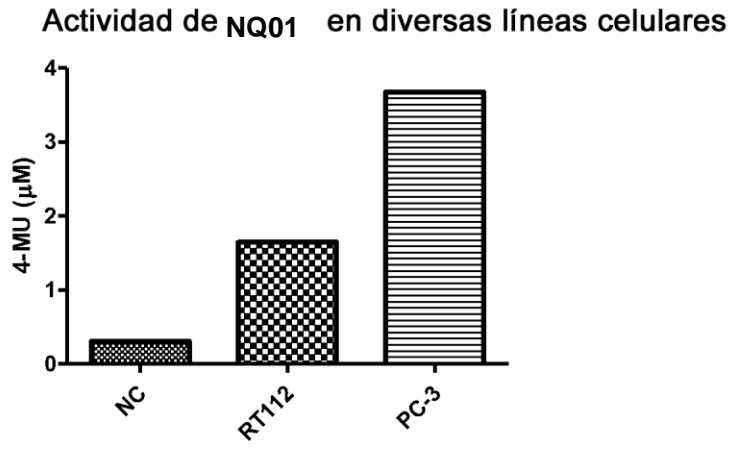


Figura 14

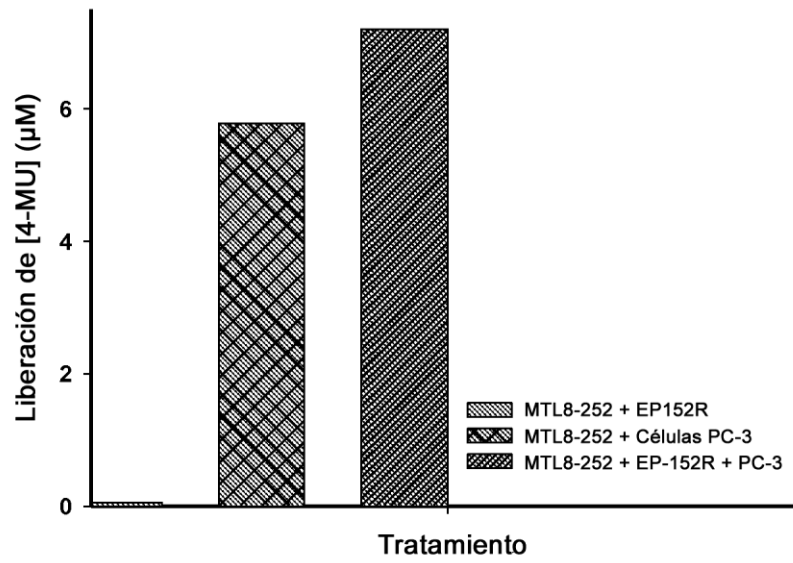


Figura 15

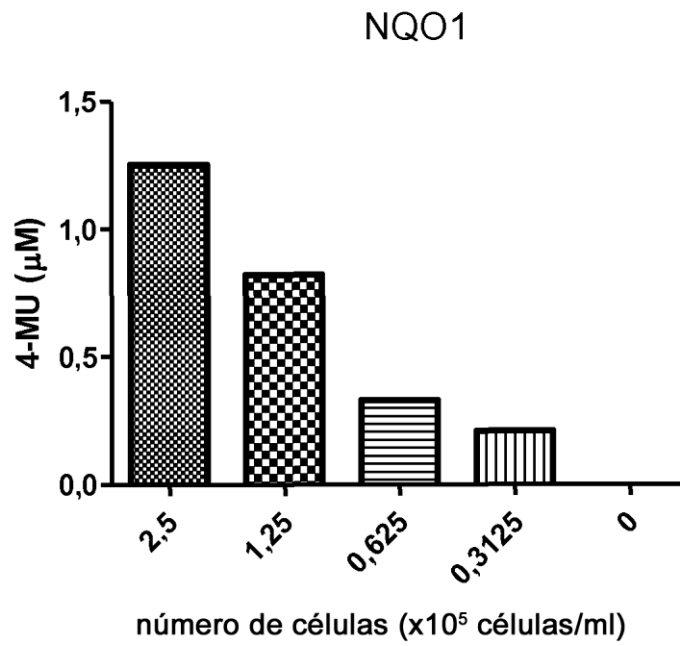


Figura 16

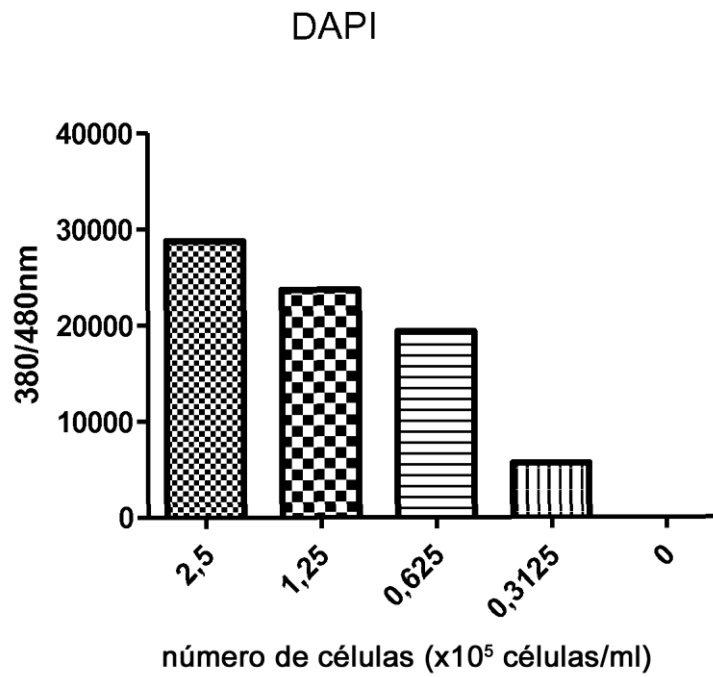


Figura 17

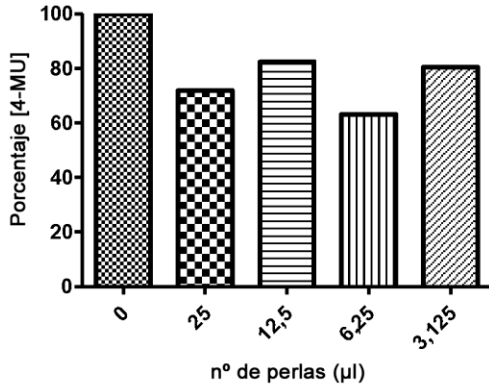


Figura 18

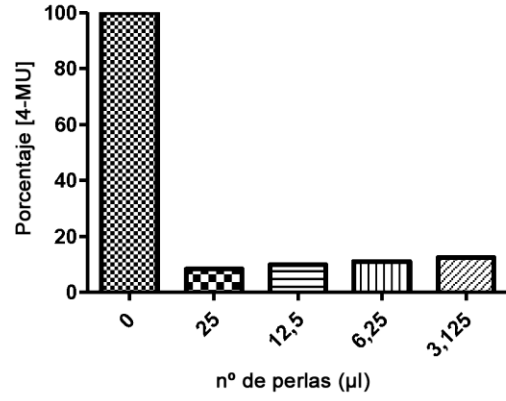


Figura 19

